

所 属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学 (真木 寿治 教授)		
氏 名	平岡 美奈	提 出	平成12年 1月 6日
題 目	二倍体出芽酵母をモデルとしたヘテロ接合性の喪失 (LOH) の解析		

要旨

癌化のプロセスの1つ、癌抑制遺伝子の不活化に着目した場合、2つある遺伝子の両方が点突然変異と呼ばれる塩基配列レベルでの変異、あるいは染色体欠失、重複、転座等の染色体レベルでの変化によって失活する必要がある。点突然変異の発生率は1世代あたり $10^{-10}/\text{bp}$ 、それに対しヒトのゲノムは $3 \times 10^9 \text{ bp}$ なので、点突然変異だけで癌化を説明することは難しい。そこで考えられるのが、染色体レベルでの変化の発生率が十分に高いという可能性である。実際に癌抑制遺伝子の第2段階目のプロセス (ヘテロ接合性の喪失、LOH) では、染色体欠失が高頻度に観察されており、その重要性が指摘されている。この染色体欠失をはじめとする染色体異常は、細胞の癌化だけでなく、細胞の分化や進化等にも重要な役割を果たしていると言われている。しかしながら、染色体異常については、検出数そのものが少ないためこれまでに系統的な分子レベルでの解析がほとんどなされておらず、その発生メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、二倍体出芽酵母をモデル生物として、1) LOHの定量的な検出系の確立、2) 野生型におけるLOHの発生頻度の測定、および3) 個々の遺伝的变化の種類の同定を行うことにより、どのような遺伝的变化が第2段階目の変異になりうるのか、そしてその中で染色体異常はどのぐらいの重要性を占めているのかを明らかにすることを第一の目標とした。

LOHを検出するために、片方の第III染色体の右腕の中央付近にURA3マーカー遺伝子を挿入した。URA3遺伝子の不活化は5-FOA耐性の表現型を示すため、この実験系では培養中に生じたURA3遺伝子の変異や喪失を5-FOA培地上で選択できる。実際に測定した体細胞分裂の対数増殖時におけるLOHの発生頻度は 2.0×10^{-4} であった。この値は一倍体酵母における5-FOA耐性細胞の出現頻度の約500倍であったことから、二倍体酵母を用いて得られた細胞は二倍体に特異的な遺伝的变化によるものであると考えられた。

次に、5-FOA耐性細胞内の遺伝的变化を同定するために、パルスフィールドゲル電気泳動法およびサザンブロッティングを用いて第III染色体の構造を直接観察した。12実験区、計640クローンを解析した結果、第III染色体のコピー数とサイズの変化パターンをもとに、細胞は大きく3つにクラス分けされた。62%の

細胞では第III染色体のコピー数が2から1に変化していた。第III染色体上に内在するもう一つのヘテロマーカであるMAT遺伝子座を解析したところ、URA3遺伝子を挿入した方と同じ染色体上に存在していたMATa遺伝子も同時に喪失していることが判った。以上の結果より、これらの細胞はURA3遺伝子およびMATa遺伝子を持っていた染色体の喪失によるLOHであると結論した。解析した640クローン中、30%の細胞では染色体構造の変化が観察されなかった。そこで、定量的PCRを用いてURA3遺伝子付近の詳細な構造解析を行ったところ、URA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わり、細胞はホモ接合性になっていることが示された。一般に、出芽酵母では相同組換えの頻度が高く、他の複数のマーカー遺伝子を用いた遺伝学的解析の結果から、このようなホモ接合体はセントロメアとマーカー遺伝子の間における相同染色体分体間の組換え（交叉）あるいは遺伝子変換によるものであると考えられている。興味深いことに、残りの8%の細胞では第III染色体の長さが変化した異常染色体が観察された。異常染色体の大きさについては、本来の第III染色体と比べて10-110 kb小さくなったものや、110-620 kb大きくなったものまで様々なものが確認された。

染色体異常の発生機序に迫るためには、切断点近傍での塩基配列の特徴等、染色体側の構造的要因を明らかにすることも重要であると考えられる。そこで、検出された異常染色体の染色体再編領域を塩基配列レベルで解析することにした。まず、異常染色体の欠失領域を特定するために、第III染色体の左腕上に1箇所、右腕上に関しては約10 kbごとに21箇所の特異的な領域を選定し、各領域のコピー数をPCRを利用して定量した（森、1998年修士論文）。45例の異常染色体を解析した結果、そのコピー数のパターンにより、異常染色体は1) 染色体内部欠失（11例）、2) 相同染色体分体の右腕間の不等交叉（7例）、3) 相同あるいは姉妹染色体分体の右腕-左腕間の不等交叉（10例）、4) 右腕の部分重複を伴う相同あるいは姉妹染色体分体の右腕-左腕間の不等交叉（8例）、5) 他の染色体との転座（9例）の5つのクラスに分類された。次に、この解析で特定された染色体再編の境界位置およびパルスフィールドゲル電気泳動法で直接観察した異常第III染色体のサイズ情報をもとに、切断点を含む染色体再編領域をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、11例の染色体内部欠失は全てMAT遺伝子座とHMR遺伝子座に存在する1.6 kbの共通配列間での相同組換えによるものであることが示唆された。これに対し、塩基配列を決定した24例の不等交叉型および6例の転座型の異常染色体では、TyレトロトランスポゾンあるいはLTR配列といった散在性の繰り返し配列が異常染色体の融合部に介在していた。融合部の配列について詳細に観たところ、22例では切断点2箇所のTy因子あるいはLTR配列間の相同組換えで説明できる形であったが、8例では切断点以外の新たなTy因子配列が混在していた。以上の結果より、体細胞分裂時の野生型出芽酵母におけるectopicな染色体再編について、1) 染色体内部欠失と染色体間での再編それぞれに特有の因子が存在すること、2) 染色体間の再編にはTy因子を介するものが多いこと、3) Ty因子が繰り返し配列を供与する以外に特別な寄与をしていることが示唆された。

二倍体出芽酵母をモデルとした ヘテロ接合性の喪失 (LOH) の解析

平岡 美奈

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 原核生物分子遺伝学講座

(真木 寿治 教授)

平成12年 1月 6日提出

目次

I 序論	7-13
1. 遺伝的变化と癌	7
2. モデル生物を用いた遺伝的变化についての研究	10
3. 本研究の目的	13
II 材料と方法	13-31
1. 試薬および培地	13
2. 菌株	15
3. プラスミドDNA	18
4. 形質転換法	19
5. DNAの調製	19
5-1. プラスミドDNA	19
5-2. 出芽酵母のゲノムDNA	19
5-3. ゲルからのDNAの回収	20
5-4. プローブDNA	20
5-5. 塩基配列解析のためのPCR産物	20
6. アガロースゲル電気泳動	21
7. オリゴマーDNAの化学合成	21
8. PCR法	21
8-1. 一般的なPCR法	26
8-2. コロニーPCR法	26
8-2-1. 点突然変異の検討	27
8-2-2. <i>MAT</i> 遺伝子座の同定	27
8-3. 定量的PCR法	27
8-3-1. <i>URA3</i> 挿入領域の構造解析	27
8-3-2. Genome scanning	28
9. LOHの発生頻度の測定	29
9-1. 二倍体出芽酵母の構築	29
9-2. LOHの発生頻度の測定	29
10. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)	29

10-1. プラグの作製	29
10-2. パルスフィールドゲル電気泳動法	30
11. サザンブロッティング	30
12. DNAの塩基配列解析	31
III 結果	31-76
1. LOHをもたらす遺伝的変化の同定	31
1-1. LOH検出系の構築	31
1-2. 野生型におけるLOH発生頻度の測定	35
1-3. 点突然変異の検討	37
1-4. 第III染色体のコピー数とサイズ変化による分類	39
1-5. クラスA；染色体喪失によるLOH	44
1-6. クラスB；相同染色体間組換えによるLOH	46
1-7. クラスC；異常染色体形成を伴うLOH	49
2. 異常染色体における染色体再編領域の同定	50
2-1. 第III染色体の欠失・増幅領域同定法（Genome scanning）の改良	50
2-2. 異常染色体の構造解析とクラス分類	53
2-2-1. 親株の第III染色体の構造解析	57
2-2-2. クラスI； <i>MAT-HMR</i> 間の染色体欠失	58
2-2-3. クラスII；第III染色体右腕間の不等交叉型	60
2-2-4. クラスIII；第III染色体の右腕-左腕間の不等交叉型	63
2-2-5. クラスIV；第III染色体の右腕部分重複を伴う右腕-左腕間の不等交叉型	65
2-2-6. クラスV；転座型	69
2-3. 再編領域に残されたTy因子の構造的特徴	75
IV 考察	76-94
1. 染色体喪失	77
1-1. 第III染色体における染色体喪失とその発生機構	77
1-2. 染色体喪失の分子メカニズム	77
1-3. 他の染色体における染色体喪失	79
2. 相同染色体間組換え	81
3. 点突然変異およびトランスポゾンの挿入による遺伝子破壊	83
4. 異常染色体の形成を伴うLOH	84

5. 検出系に依存して異常染色体は見つかる	88
6. なぜTy因子を介する異常染色体が数多く見つかるのか？	89
7. 染色体内欠失と染色体間の異所性組換えに関して	91
8. 染色体再編の分子メカニズム	92
9. 今後の展望	94
謝辞	95
参考文献	96-108

I 序論

1. 遺伝的変化と癌

癌は、日本を含む多くの先進国で死因の上位を占めている。そのため、世界中で多数の研究者が癌に関する研究に従事している。分子生物学的手法の躍進により、発癌に関与する多数の遺伝子が同定され、癌は複数の遺伝子の異常が多段階的に蓄積することによって生じる疾患であることが明らかになってきた。また、正常細胞には様々なDNAの傷害や複製エラーに対する修復機能が備わっているが、この修復経路に関与する遺伝子のいずれかに先天的に異常が生じたときには、家族性に癌が発症しやすいことなどもわかってきた。

癌化に関与する遺伝子を単純に分類すると、細胞の増殖調節に直接関わる癌遺伝子・癌抑制遺伝子およびこれらの遺伝子に異常が起こることを防ぐことにより間接的に癌化を抑えているDNA修復関連遺伝子の3種類に大別することができる。癌遺伝子は現在までにすでに70種以上のものが知られている。これらの遺伝子がコードしている産物については、細胞増殖因子やその受容体もしくは増殖シグナルや核蛋白質など、その多くが細胞の増殖に直接関連した物質であり、癌遺伝子産物の質的、あるいは量的な異常が細胞の正常な分裂・分化機構を破綻させていく。質的異常とは、正常遺伝子産物とは異なる性質を持つ遺伝子産物ができる変化を指し、癌遺伝子に質的变化をもたらす事象としては、点突然変異あるいは転座などが観察されている。癌遺伝子産物の量的な変化を引き起こす事象としては、遺伝子のコピー数が増加する重複や転座などが知られている。癌抑制遺伝子の産物は、細胞接着因子関連物質や細胞増殖に直接関与する物質など、現在までに10種類以上のものが同定されている。癌抑制遺伝子の不活化を引き起こす遺伝的変化としては、点突然変異なども認められているが、少なくとも一方の変異は染色体欠失である例が多いことが知られている。

癌遺伝子の場合、2本の相同染色体のうちいずれか一方の遺伝子が異常を起こすと、他方の染色体に正常遺伝子が存在していてもその異常遺伝子が癌化へのアクセラレーターとして働く。それに対し、癌抑制遺伝子の場合には、相同染色体の両方の遺伝子に異常が起こりともに機能が失われない限り、細胞増殖に対するブレーキとしての機能は残されている（two hit theory, Kundson, 1971）。一般に、高発癌家系では、癌抑制遺伝子の一方が点突然変異等により不活化していることが多い。このような場

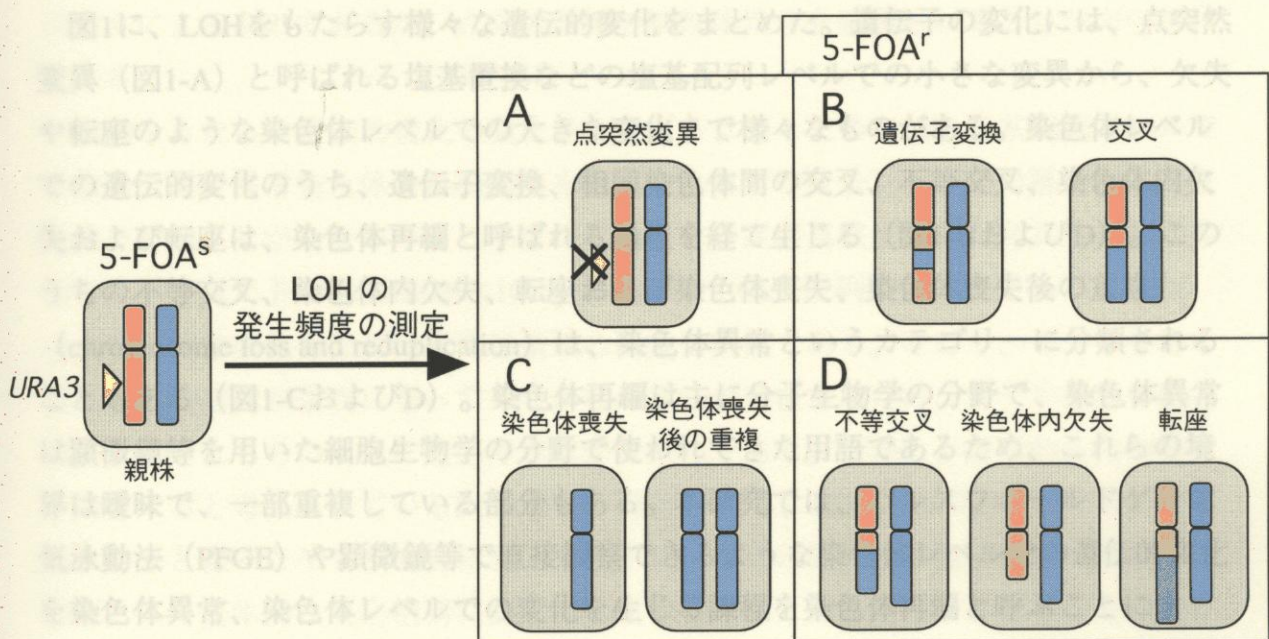


図1 LOH検出系の基本構想とLOHをもたらす様々な遺伝的変化

本研究では、片方の第III染色体の右腕の中央付近に挿入したURA3遺伝子の喪失を指標とすることにより、二倍体生物で生じる様々な遺伝的変化を検出する。野生型のURA3遺伝子を持つ細胞は、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) という薬剤に対し感受性を示す。したがって、5-FOA耐性に変化した細胞を選択することにより、様々な遺伝的変化によりURA3遺伝子の機能が失われた細胞を単離することが出来る。URA3遺伝子を黄色の三角形、URA3遺伝子を挿入した第III染色体を赤色、URA3遺伝子を挿入していない方の第III染色体を青色、他の染色体を紫色で示す。

A) 塩基配列レベルでの遺伝的変化によるURA3遺伝子の不活化。

B) 相同染色体間の組換えによるLOH。URA3挿入領域が相同染色体上の配列に置き換わっているが、染色体の大きさは変わっていない。

C) 染色体喪失によるLOH。染色体喪失後、残った染色体が重複される場合も癌化した細胞では認められている。

D) 異常染色体の形成を伴うLOH。不等交叉、染色体内欠失および転座とは、それぞれ異所性組換えが相同染色体間、単一染色体内あるいは姉妹染色分体間、異種染色体間で起こることを意味する。

B) およびD) における遺伝的変化を生じる課程は、染色体再編とも呼ばれる。C) およびD) に示した遺伝的変化は染色体異常ともいう。

合、1回の遺伝的变化で癌抑制遺伝子の機能が喪失されるため、癌の発症が起こりやすいと考えられている。この癌抑制遺伝子の第2段階目のプロセスは、特にヘテロ接合性の喪失（LOH）と呼ばれる。

図1に、LOHをもたらす様々な遺伝的变化をまとめた。遺伝子の変化には、点突然変異（図1-A）と呼ばれる塩基置換などの塩基配列レベルでの小さな変異から、欠失や転座のような染色体レベルでの大きな変化まで様々なものがある。染色体レベルでの遺伝的变化のうち、遺伝子変換、相同染色体間の交叉、不等交叉、染色体内欠失および転座は、染色体再編と呼ばれる過程を経て生じる（図1-BおよびD）。このうちの不等交叉、染色体内欠失、転座および染色体喪失、染色体喪失後の重複（chromosome loss and reduplication）は、染色体異常というカテゴリーに分類されることもある（図1-CおよびD）。染色体再編は主に分子生物学の分野で、染色体異常は顕微鏡等を用いた細胞生物学の分野で使われてきた用語であるため、これらの境界は曖昧で、一部重複している部分もある。本研究では、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）や顕微鏡等で直接観察できるような染色体レベルでの遺伝的变化を染色体異常、染色体レベルでの変化を生じる課程を染色体再編と呼ぶことにする。

二倍体細胞における遺伝的变化を考えた場合、一般に第1段階目よりも、第2段階目のプロセス（LOH）の方が起こりやすい。例えば、遺伝子変換、交叉等は、相同染色体上の対立遺伝子が既に点突然変異等で不活化している場合にのみ、つまり第2段階目でのみ表現型の変化を伴う。実際に、遺伝子変換や交叉といった、いわゆる相同染色体間の組換え（allelic recombination）は、癌抑制遺伝子の1つであるRb遺伝子座におけるLOHの75%を占めていた（Lasko et al., 1991）。しかしながら、癌化の課程では増殖に有利な細胞が選択されるため（Nowell, 1976）、癌化した細胞で見られる遺伝的变化は、正常細胞で起こるものとは質的にも量的にも異なる可能性が考えられる。癌化の発生や進行を理解するためには、癌細胞における遺伝的变化を同定することも必要であるが、どういう種類の遺伝的变化が正常細胞内で実際にどれくらいの頻度で起こっているのかを明らかにすることも重要であると考えられる。

この目的のために、ヒトやマウスの培養細胞を材料として、高等真核生物における遺伝的变化を検出する実験系が構築されている。これらの検出系では、染色体上のAPRT遺伝子（Fujimori et al., 1992；Gupta et al., 1997；Tischfield, 1997）あるいはTK遺伝子（Liber and Thilly, 1982；Yandell et al., 1986；Li et al., 1992；Honma et al., 1997a,b）のヘテロ接合体を用いることによって、LOHの発生頻度やLOHをもたらす遺伝的变化の種類とその割合を同定している。これらの研究により、TK遺伝子座におけるLOHの発生頻度は 10^{-6} 程度、APRT遺伝子座におけるLOHの発生頻度は 10^{-5} から

10⁴程度であることが示されている。また、同一染色体上に存在する多数のマイクロサテライトマーカーの制限酵素多様性の解析結果やヘテロマーカー部位の定量的なサザンブロッティングの解析結果等より、これらのLOHの50-80%は相同染色体間の組換えによるものであるが、点突然変異や染色体異常も認められることが報告されている。

LOHをもたらす遺伝的変化の発生メカニズムに迫るためには、塩基配列レベルで点突然変異や異常染色体の再編部位を特定するなどの分子レベルでの解析が重要な意味を持つ。しかしながら、ヒトをはじめとする高等真核生物のゲノムサイズは非常に大きく（ヒトの場合は 2.9×10^9 bp/半数体）、塩基配列情報が不足しているため、特に異常染色体における再編領域の同定は困難である。そこで、モデル生物を用いた基礎研究が重要になってくる。種の違いが存在するため、モデル生物を用いた研究がどれくらいヒトに適用できるかは未知である。しかし、遺伝的変化の発生に関与すると考えられているDNA複製、修復、転写、組換え等の酵素群については、ヒトと様々なモデル生物において分子レベルでの相同性が指摘されており、生物にとって基本的な反応機構に関しては生物種を越えた普遍性が存在するものと考えられている。実際に、第三の癌関連遺伝子としてDNA修復関連遺伝子が認識されるに至ったのは、単細胞原核生物の1つである大腸菌*Escherichia coli*における自然突然変異の抑制機構に関する研究の貢献が大きい。

2. モデル生物を用いた遺伝的変化についての研究

点突然変異に関しては、これまでにいくつかのモデル生物において前進突然変異検出系を用いた突然変異スペクトラムの解析がなされており、その分子レベルでの発生メカニズムが解明されつつある。前進突然変異検出系とは、ある遺伝子を標的としてその遺伝子に変異が起こった個体を分離する実験系であり、集団中の突然変異個体の割合から突然変異頻度を測定することができる。また、その突然変異頻度をもとに、1回の細胞分裂あたりに突然変異が起こる確率（突然変異率）が推定される。分離した突然変異体の変異の種類と部位を塩基配列レベルで特定することにより、突然変異スペクトラムが得られる。前進突然変異検出系は、突然変異の生起を直接的に検出・解析することができるため、点突然変異の研究には非常に有効な手段である。

当研究室では、大腸菌のリボソームのS12蛋白質をコードする*rpsL*遺伝子を標的遺伝子とした前進突然変異検出系を用い、これまでに野生型および様々なミューター

ター変異株における自然突然変異の特異性を同定した（青木, 1995年度修士論文；愿山, 1996年度修士論文；真木, 1997；大洲, 1997年度修士論文；上向, 1998年度修士論文）。前進突然変異検出系の特性により、これまでは主に点突然変異について解析が進んでいたが、改良型プラスミドの構築により、今まで検出が困難であった欠失変異が点突然変異と同程度の頻度で発生していることも明らかになった（樋口, 1996年度修士論文）。また、最近では染色体上での*rpsL*遺伝子における自然突然変異の特異性に関する研究も進みつつある（川野, 1997年度修士論文；五十川, 1998年度修士論文；蟹江, 未発表データ；堀端, 未発表データ）。さらに、単細胞真核生物の1つである一倍体出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*においても点突然変異の研究が進んでおり、その分子レベルでの全体像が明らかになってきている（Kunz et al., 1998）。

点突然変異と比較すると、染色体レベルでの遺伝的变化、特に異常染色体の形成を伴うようなものについては、検出数そのものが少ないためこれまでに系統的な分子レベルでの解析はほとんどなされておらず、その発生メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。染色体レベルでの大きな遺伝的变化を網羅的に検出するためには、一倍体細胞よりも、二倍体生物の方が材料として適している。というのは、遺伝子は通常1コピー存在すれば細胞の生存が可能となることから、二倍体細胞を用いた場合では生存に必須な遺伝子機能の消失を生じる遺伝的变化でも検出することができると考えられるためである。

出芽酵母ではその全ゲノムの塩基配列が決定されているため、異常染色体の染色体再編領域を塩基配列レベルで同定することが可能である。また、出芽酵母では相同組換えの活性が高いため、目的とする部位に容易に遺伝子を挿入することができるなど、遺伝子工学的操作も行いやすい。さらに、出芽酵母ではDNA複製、修復、転写、組換え等に関する分子レベルでの解析が進んでおり、これらの基本的な反応に関わる多数の変異体がこれまでに蓄積されているため、遺伝的变化の発生に関わる生体内の諸反応を同定することが出来ると期待される。以上の理由から、二倍体出芽酵母は染色体異常の発生メカニズムを分子レベルで理解するためには有用なモデル生物の1つと見なすこともできる。

実際に、二倍体出芽酵母における染色体再編に関する研究がいくつか報告されている。その中でも、遺伝マーカーのヘテロ接合性の喪失（LOH）を指標とした解析は、点突然変異から染色体喪失、欠失、交叉等の染色体レベルでの遺伝的变化までを同時に検出することが可能であるため、それぞれの遺伝的变化の寄与度を比較することができる有用な系である。過去の報告では、内在性の*CAN1*遺伝子、*LYS2*遺伝子、*MAT*遺伝子、*URA3*遺伝子、*CYH2*遺伝子を標的として、相同染色体間組換えや染色体喪失が遺伝マーカーのLOHのほとんどを占めていることを明らかにしてい

る (Campbell et al., 1975 ; Malone et al., 1980 ; Esposito et al., 1982 ; Hartwell and Smith, 1985 ; Meeks-Wagner and Hartwell, 1986 ; Esposito et al., 1994 ; Bruschi et al., 1995) 。これらの遺伝的変化の発生頻度は、マーカー遺伝子の存在する染色体及びその位置の影響を受けるが、おおよそ前者が 10^{-4} から 10^{-5} 、後者が 10^{-4} から 10^{-7} の頻度で起こることが知られている。

これらの染色体レベルでの変化と比べると低い頻度ではあるが、出芽酵母における異常染色体もいくつか報告されている。一倍体の野生型出芽酵母内で観察されている異常染色体の顕著な例は、Ty因子あるいはLTR配列を介した異所性組換えによる染色体内欠失である。出芽酵母のTy因子は両端に約330 bpのLTR配列をもつ全長5.9 kbのレトロトランスポゾンの1種であり (Boeke, 1991) 、出芽酵母のゲノムのデータベース (SGD、<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>) によると、ゲノム中には52コピーのTy因子および268コピーのLTR配列が確認されている。これまでに、*CYC1*や*sup4*をマーカーとした前進変異検出系あるいは*his4-912* (*HIS4*のプロモーター領域にTy1が挿入されている) の復帰変異検出系において、これらの因子間の異所性組換えによる染色体異常が典型的な株では 10^{-5} から 10^{-7} の頻度で検出されている (Rothstein, 1979 ; Liebman et al., 1979 ; Winston et al., 1984 ; Downs et al., 1985) 。中には、 10^{-2} という高頻度でTy因子間の再編が起こる株も見つかっている

(Picologlou et al., 1988) 。しかしながら、これらの研究のほとんどは遺伝学的解析と制限酵素マッピングまでの解析であり、塩基配列レベルでの解析に関してはLTR配列を含む一部分 (Breilmann et al., 1985 ; Rothstein et al., 1987) 、あるいは1例の転座の再編領域 (Casaregola et al., 1998 ; Rachidi et al., 1999) を決定したものがあるのみである。Ty因子やLTR配列間以外では、第VIII染色体上の*CUP1*遺伝子や第XII染色体上のrDNA領域における染色体内欠失例が報告されている (Klein, 1995) 。*CUP1*遺伝子座では、2.0 kbの遺伝子が順方向に15コピー前後並んでおり、これらの配列間の異所性組換えが 10^{-6} の確率で起こることが知られている。一方、第XII染色体上では、rDNAを含む9.1 kbの領域が100コピー前後順方向に存在しており、 10^{-4} の確率でこれらの繰り返し配列間の染色体内欠失が起こることが見出されている。上記の染色体異常は、すべて繰り返し配列間での相同組換えに起因すると考えられるが、最近、非相同組換えによる染色体異常例も観察された (Chen et al., 1998 ; Chen and Kolodner, 1999) 。Chenらは*CAN1*遺伝子の不活化を指標として、一倍体の*rfa1*、*rad27*および*mre11*変異株で誘発される異常染色体の切断点を塩基配列レベルで解析した結果、これらの変異株では3-20 bp以下の低い相同領域を介して組換えが起こることを明らかにしている。以上の結果は、異常染色体を形成するような分子機構が少なくとも2種類存在していることを示唆するものである。

3. 本研究の目的

本研究の最終目的は、二倍体出芽酵母をモデル生物として、染色体異常の発生メカニズムを分子レベルで理解することである。そのためにまず、1) LOHの定量的な検出系の確立、2) 野生型におけるLOHの発生頻度の測定、および3) 個々の遺伝的変化の種類の同定を行うことにより、どのような遺伝的変化が第2段階目の変異になりうるのか、そしてその中で染色体異常はどのぐらいの重要性を占めているのかを明らかにすることを第一の目標とした。この課程において、本研究では多数の異常染色体を単離することに成功した。染色体異常の発生機序に迫るためには、切断点近傍での塩基配列の特徴等、染色体側の構造的要因を明らかにすることも重要であると考えられる。そこで、検出された異常染色体の染色体再編領域を塩基配列レベルで解析することを第二の目標とした。本研究の結果をもとに、野生型二倍体出芽酵母の体細胞分裂時に第III染色体上で自然に起こるLOHの特徴、および、LOHをもたらす個々の遺伝的変化の発生機構について考察する。

II 材料と方法

1. 試薬および培地

試薬に関しては、Trizma baseについてはSIGMA社製、有機溶媒についてはナカライテスク社製、特に記載のないものについては和光純薬工業から購入したものを使用した。%で表した濃度については、特に記載のない限りw/vとする。酵素に関しては、*EcoR* I、*Xba* I、*Mlu* I、Alkaline PhosphataseおよびT4 DNA ligaseについてはTAKARA社製、*BssH* IIおよび*Sac* IIについては東洋紡社製、*Xma* Iおよび*Pac* IについてはNew England Biolabs社製のものを購入し、特に記載のない限り製造元の指示に従って使用した。クラスIVの異常染色体を解析するための制限酵素マッピング（図17）では、巨大DNA分子を扱うためパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）用に

調整した10-20 µl分のプラグDNAを材料とし、まず用いる制限酵素の至適緩衝液（0.3-1 ml）でプラグを1時間以上洗浄した。その後、10 unitの *Mlu* I、*Sac* IIあるいは *Pac* Iを加えてその至適緩衝液で全量を100 µlとした反応液中で、一晚（11時間以上）酵素の至適温度でインキュベートしてプラグ内のDNAを切断した。以上の操作で準備したプラグをTAE緩衝液に1時間以上浸して緩衝液を交換し、PFGEにてDNA断片を分離した。

大腸菌の培養の基本的な操作に関しては *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) の記述に従った。大腸菌の培養には基本的にLB培地（1% Bacto trypton (Difco社)、0.5% Bacto yeast extract (Difco社)、0.5% NaCl）を用い、寒天培地として使用する場合にはBacto agar（Difco社）を1.5%の濃度で加えた。エレクトロポレーション後の大腸菌の培養にはSOC培地（2% Bacto trypton (Difco社)、0.5% Bacto yeast extract (Difco社)、0.05% NaCl、0.25 mM KCl、10 mM MgCl₂、20 mM Glucose）を使用した。また培地に加える試薬の最終濃度に関しては、アンピシリンについては100 µg/ml、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal、SIGMA社) については40 µg/ml、isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG、SIGMA社) については40 µg/mlとした。アンピシリンについては100 mg/ml、IPTGについては40 mg/mlになるように滅菌水に溶解し、0.45 µmのメンブレンフィルター（クラボウ社）により濾過滅菌した。X-galについては最終濃度が40 mg/mlになるようにジメチルホルムアミドに溶解した。これらの溶液を-30 °Cにて保存し、室温にて保存液を融解して使用した。

出芽酵母の培養については、*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., 1994) および *Methods in Yeast Genetics* (Rose et al., 1990) に記載されている方法に従った。出芽酵母の一般的な培養にはYPD培地（1% Bacto yeast extract (Difco社)、2% Bacto pepton (Difco社)、2% Glucose）を用い、必要に応じて完全合成培地（以下、SC培地と呼ぶ；0.67% Bacto yeast nitrogen base without amino acids (Difco社)、0.2% complete mix、2% Glucose）あるいはSC-drop out培地（特定のアミノ酸や核酸などを加えないdrop-out mixを用いて作製した合成培地、例えば、ウラシルを含まないdrop-out mixを用いた場合はSC-Uraと表記する）を使用した。寒天培地として使用する場合にはBacto agar（Difco社）を2%の濃度で加えた。SC寒天培地およびSC-drop out寒天培地を作製する際には、オートクレーブ滅菌する前に5N NaOHを用いてpH 7.0に調整した。LOHの発生頻度を測定するために使用した5-フルオロオロチン酸（5-FOA）含有寒天培地（0.67% Bacto yeast nitrogen base without amino acids (Difco社)、0.2% drop-out mix-uracil、50 µg/ml Uracil、0.1% 5-FOA、2% Glucose、2% Bacto agar (Difco社)）については、寒天以外の試薬を1/2容量の水に溶かしたものを

0.45 μm のメンブレンフィルター（CORNING社）により濾過滅菌し、オートクレーブ滅菌した1/2容量の4%寒天液と混合して作製した。LOHの発生頻度を測定する際に用いるYPD培地には、ウラシルを20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加えた。最終濃度が2 mg/ml になるようにウラシルを滅菌水に溶解し、0.45 μm のメンブレンフィルター（CORNING社）により濾過滅菌した後、室温で遮光して保存した。

2. 菌株

本研究に用いた出芽酵母*S. cerevisiae*は全てゲノムプロジェクトに用いられたS288c株由来であり、大腸菌*E. coli*は全てK-12株由来である。使用した菌株の遺伝子型等については表1に記載した。染色体上の位置に関しては、出芽酵母のゲノムのデータベース（SGD、<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>）の塩基配列情報に従って、染色体番号と左腕のテロメアからの距離（kb）として表記した（例；III-205）。

YMH1は、第III染色体の右腕のほぼ中央（204895 bpと204896 bpの間）に*URA3*遺伝子が挿入された一倍体酵母である。この株は、一倍体酵母YKU1（*Ura*⁻）にプラスミドpMH116（図2-D、後述）の*URA3*遺伝子を含む*Xba*I-*Xma*I断片を導入した後の*Ura*⁺クローンとして単離された。*Ura*⁺に形質転換した細胞がIII-205領域にのみ*URA3*遺伝子を1コピー保持していることを確認するためには、3種類のプライマーセットを用いたコロニーPCR（後述）を行った。コロニーPCR後、10 μl のPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、バンドのパターンから*URA3*遺伝子の挿入位置を推定した。基本的には、標的部位の上流と下流にプライマーを設計し（図4 プライマーセットA）、標的部位に*URA3*遺伝子が挿入された場合にはPCR産物の大きさが*URA3*遺伝子の分だけ大きくなることを指標にした。目的とする領域に*URA3*遺伝子が組み込まれたと考えられる細胞については、標的部位の外側のプライマーと*URA3*遺伝子内のプライマー（図4 プライマーセットB）を用いたPCRを行って、挿入された遺伝子の方向を確認した。さらに、第V染色体の*ura3*遺伝子領域に関して、トランスポゾンの1つであるTy52が挿入された状態であることを検証するために、Ty52内部に結合するプライマーと*ura3*遺伝子内のプライマー（図4 プライマーセットC）を用いたPCRを行って、328 bpのPCR産物が得られることを確認した。第V染色体の*ura3*遺伝子領域に*URA3*遺伝子断片が組み込まれた菌株では、このPCR産物は増幅されない。以上のPCRを行って、*URA3*遺伝子がIII-205領域に1コピーだけ挿入されたことが確

表1 菌株リスト

A. 出芽酵母

菌株	遺伝子型	入手方法
一倍体		
FY838	<i>MATα lys2 Δ 202 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 ura3-52</i>	Dr. Fred Winstonより分与
YKU1	<i>MATα lys2 Δ 202 leu2 Δ 1 trp1 Δ 63 ura3-52</i>	梅津桂子助手より分与
YMJ1	III-205:: <i>URA3</i> ¹⁾ であること以外はFY838と同じ	渡辺圭一氏より分与
YMH1	III-205:: <i>URA3</i> ¹⁾ であること以外はYKU1と同じ	本研究
二倍体 ²⁾		
RD101	III-205:: <i>URA3</i> /III-205 <i>ura3-52/ura3-52</i>	YMH1 × FY838
RD102	<i>ura3-52/ura3-52</i>	YKU1 × FY838
RD103	III-205:: <i>URA3</i> /III-205:: <i>URA3 ura3-52/ura3-52</i>	YMH1 × YMJ1

B. 大腸菌

菌株	遺伝子型	入手方法
DH5	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	当研究室のストック
DH5α	Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>)であること以外はDH5と同じ	当研究室のストック

1) 第III染色体の左腕テロメアから205 kbの位置（本研究ではIII-205と表記する）にpMH116由来の*URA3*遺伝子断片を挿入した。詳細については材料と方法を参照のこと。

2) 表中には*URA3*あるいは*ura3-52*遺伝子座のみを記す。表記以外の遺伝子型に関しては以下の通りである。

MATα/MATα lys2 Δ 202/lys2 Δ 202 leu2 Δ 1/leu2 Δ 1 trp1 Δ 63/TRP1 HIS3/his3 Δ 200。

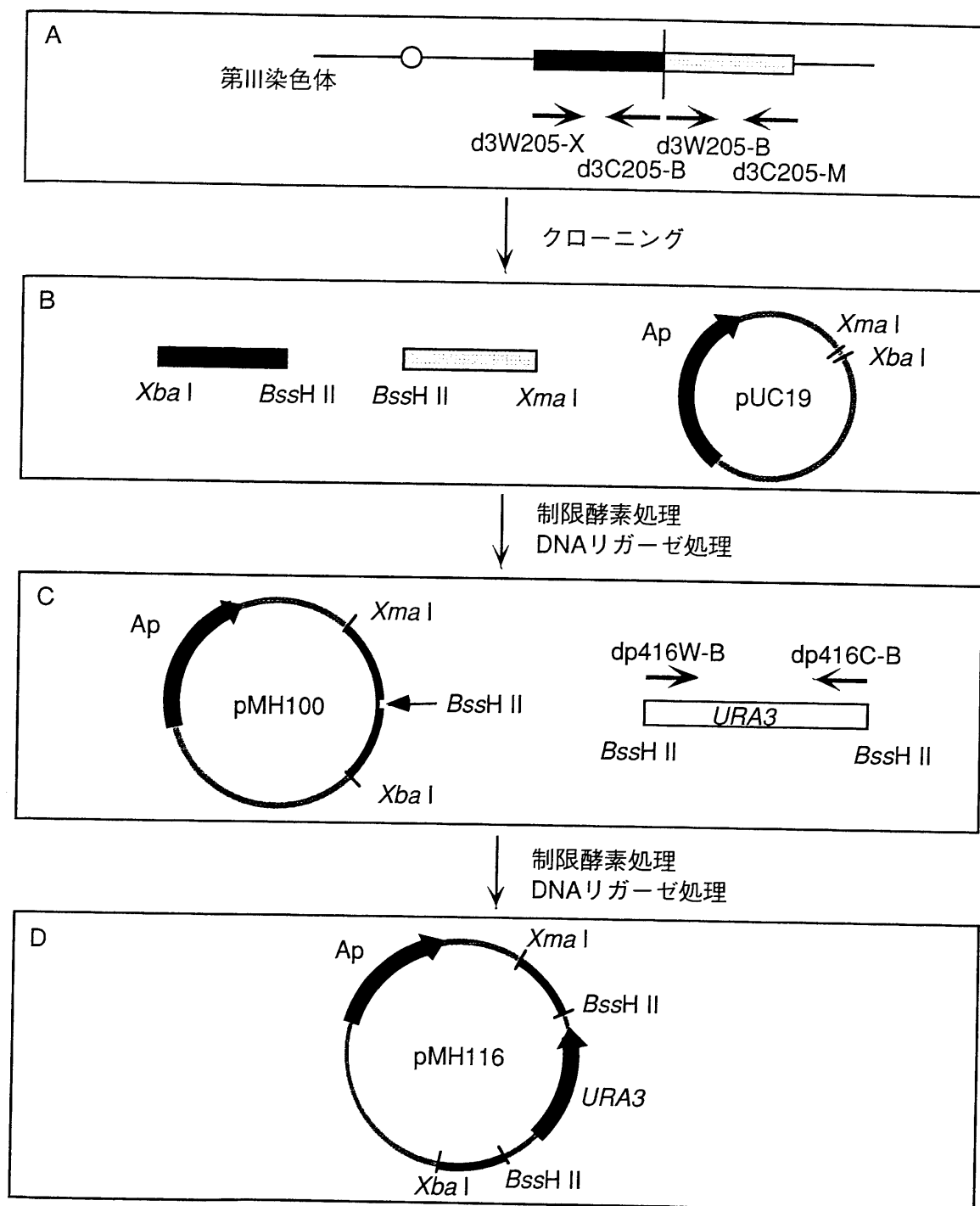


図2 pMH116の構造とその作製方法

pMH100およびpMH116の作製方法に関しては材料と方法を参照のこと。プライマー（d3W205-X、d3C205-B、d3W205-B、d3C205-M、dp416W-Bおよびdp416C-B）の配列および結合位置については表2-Aに記した。

認された株をYMH1と命名した。

二倍体出芽酵母RD101は、第III染色体上に挿入した*URA3*遺伝子のLOHを検出するために、本研究により構築された。このRD101から、異常第III染色体を持つ5-FOA耐性（5-FOA^r）クローンとしてRD101-1からRD101-56が単離された。

3. プラスミドDNA

pRS416（Sikorski and Hieter, 1989；Christianson et al., 1992）はpBluescript由来の大腸菌のレプリコン、アンピシリン耐性遺伝子および出芽酵母の自律複製配列、セントロメア、*URA3*遺伝子を持つ、大腸菌と出芽酵母のシャトルベクタープラスミドである。当研究室のストックよりプラスミドを回収し、PCR法の鋳型DNAおよび出芽酵母の形質転換のポジティブコントロールとして用いた。

pUC19（Yanisch-Perron et al., 1989）は汎用クローニングベクタープラスミドである。宝酒造より購入し、DNA濃度の定量マーカーおよび出芽酵母の第III染色体の特定領域をクローニングする際のベクターとして使用した。

プラスミドpMH116の構造とその作製方法の概要を図2に示す。pMH116は、pUC19の*Xba* I-*Xma* I部位に、出芽酵母のIII-205領域の926 bp（204431-205366 bpに相当する）のほぼ中央に*URA3*遺伝子が挿入された形のDNAを持つ（図2-D）。pMH116の作製に使用したプライマーを表2-Aに示す。エタノール沈殿をはじめ、基本的な操作を行うに際しては*Molecular Cloning*（Sambrook et al., 1989）の記述に従った。pMH116の作製方法は以下の通りである。まず、プライマーとしてd3W205-Xとd3C205-B、あるいはd3W205-Bとd3C205-Mを用いたPCRを行って、出芽酵母の第III染色体の標的DNA断片（それぞれ204431-204895 bp、あるいは204896-205366 bpに相当）を増幅した（図2-A）。この反応により、標的部位である第III染色体の204895-204896 bpの間に新たに*Bss*H II部位が挿入される。PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、プライマーとしてd3W205-Xとd3C205-Bを用いたPCR反応溶液からは両端に*Xba* I部位と*Bss*H II部位を持つDNA断片を、プライマーとしてd3W205-Bとd3C205-Mを用いたPCR反応溶液からは両端に*Bss*H II部位と*Xma* I部位を持つDNA断片をそれぞれゲルから切り出し、順に*Bss*H IIと*Xba* I、*Bss*H IIと*Xma* Iで切断処理した。pUC19ベクタープラスミドについては*Xba* Iおよび*Xma* Iで切断した後、Alkaline Phosphatase処理を行って末端のリン酸基を取り除いた。以上3種類のDNAをエタノール沈殿によって精製した後、試験管内でT4 DNA ligase処理を行った。反応溶液1 µlを大腸菌DH5 αに導入し、アンピシリン、X-galおよびIPTGを含む指示プレート上で白いコロ

ニーを形成した形質転換体からプラスミドDNAを抽出した。制限酵素処理による解析から、pUC19の*Xma*I-*Xba*I部位に出芽酵母の第III染色体の領域926 bpが挿入されていると考えられるプラスミドをpMH100と命名した（図2-C）。同様の操作を行って、pMH100の*Bss*H II部位に*URA3*遺伝子断片を挿入してpMH116を構築した（図2-D）。*URA3*遺伝子断片の両端に*Bss*H II部位を持たせるために、プライマーとして5'側に*Bss*H II部位を付加したdp416W-Bおよびdp416C-Bを用いたPCRを行った。

pRS416、pMH100およびpMH116のDNAの濃度については、これらのDNAを直鎖状にし、濃度既知のpUC19を*Eco*R Iで切断し直鎖状としたものを濃度マーカーとして、アガロースゲル電気泳動することにより定量した。

4. 形質転換法

大腸菌にプラスミドを導入するためには、Gene Pulser（Bio-Rad社）を用いたエレクトロポレーション法を利用した（Sambrook et al., 1989）。出芽酵母に*URA3*遺伝子断片を挿入する際には、酢酸リチウム法（Gietz et al., 1992）を用いた。*URA3*遺伝子断片をpMH116から調整するためには、pMH116を*Xba*Iと*Xma*Iで切断した後、アガロースゲル電気泳動して目的のDNA断片のみをゲルから回収・精製した。

5. DNAの調製

5-1. プラスミドDNA

アルカリ-SDS法（Sambrook et al., 1989）にてプラスミドを保有した大腸菌からプラスミドDNAを調製した。形質転換およびPCR法の鋳型として用いたDNAについては、QIAGEN Plasmid Midi Kit（Qiagen社）を用い、製造元の指示に従って精製した。

5-2. 出芽酵母のゲノムDNA

ガラスビーズ法（Ausubel et al., 1994）を用いて出芽酵母のゲノムDNAを抽出した。Genome scanningの鋳型として用いたDNAについては、nucleon yeast mini prep kit（Amersham社）を用い、製造元の指示に従って精製した。親株一倍体（YMH1およ

びFY838) におけるTy因子の挿入位置を確認する目的のためには、QIAGEN 500/G (Qiagen社) を用い、製造元の指示に従ってゲノムDNAを抽出した。

5-3. ゲルからのDNAの回収

アガロースゲル電気泳動後必要なバンドのみを切り出したゲル、および、定量的PCRの鋳型に用いるためにプラグからDNAを回収する方法としては、QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen社) を用い、製造元の指示に従って精製した。

5-4. プローブDNA

サザンブロッティングのプローブを作製するためには、PCR反応を利用した。プローブに用いたDNA領域と、そのプローブを作製するために用いたプライマーは、以下の通りである。III-54 (d3W54およびd3C54)、III-79 (d3W79およびd3C79)、III-102 (d3W102およびd3C102)、III-124 (d3W123-2およびd3C124)、III-141 (d3W141およびd3C141f)、III-153 (d3W153fおよびd3C153)、III-167 (d3W167およびd3C167f)、I-207 (d1W207およびd1C207)、VII-1054 (d7W1054およびd7C1055)、X-587 (d10W587およびd10C588)、XII-1010 (d12W1010およびd12C1011)、XVI-908 (d16W908およびd16C909)。プライマーの正確な結合位置に関しては、表2を参照のこと。PCR増幅後には、QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen社) を用いて、製造元の指示に従ってプローブDNAを精製した。

5-5. 塩基配列解析のためのPCR産物

サイクルシーケンスの前に、PCRクローニングの際に加えたプライマーを除去する目的で、塩基配列を決定するためのPCR産物をポリエチレングリコール法により精製した。ポリエチレングリコール法に関しては、Lis (1980) およびPaithankar and Prasad (1991) の記述を参考にした。100 μ lのPCR産物に対し、ポリエチレングリコール溶液 (13% Polyethylene glycol 600、1.6 M NaCl) を160 μ l加え、氷上で1時間静置した後、4 $^{\circ}$ C 15000 rpmで20分間遠心して上清を取り除いた。沈殿に800 μ lの冷やしておいた70%エタノールを加え、DNAを洗浄した後、4 $^{\circ}$ C 15000 rpmで10分間遠心して上清を除去した。得られた沈殿を1/10濃度のTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶解し、適当量をサイクルシーケンスの鋳型と

して使用した。

6. アガロースゲル電気泳動

基本的な操作に関しては全て *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) に従った。Agarose LO3 (TAKARA社) を用い、DNAの分子量に応じて0.9-2.0%のゲル濃度で使った。緩衝液にはTAE緩衝液 (40 mM Tris-acetate、2 mM EDTA (pH~8.5)) を用いた。基本的な泳動にはミューピッド泳動槽 (コスモ・バイオ社) を用い、電圧100 Vで15-40分間通電した。ゲルからDNA断片を回収する場合には水平型電気泳動槽 (TAKARA社) を用い、定電圧4 V/cmで120分間あるいは2 V/cmで240分間通電した。泳動後、ゲルを0.5 µg/mlのエチジウムブロマイド水溶液に20-30分間浸してDNAを染色し、UVトランスイルミネーター (アトー社) を用いてゲルに紫外線を照射することによりDNAを観察した。

7. オリゴマーDNAの化学合成

PCR法に用いたオリゴマーDNAの合成についてはグライナージャパン社に依頼した。逆相カートリッジ精製されたものを、最終濃度が200 pmol/µlになるように1/10濃度のTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶解して使用した。本研究において作製したオリゴマーDNAのリストを表2に示す。

8. PCR法

PCR法に関しては、特に記載がない限り *rTaq* polymerase (TAKARA) および添付の10×reaction buffer、dNTP mixを用い、反応には基本的にPE Applied Biosystems社 Model 9600サーマルサイクラーを使用した。PCRの反応溶液Aの組成は、10 mM Tris-HCl (pH8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、200 µM dNTP、0.4 µM primer、0.02 unit/µl *rTaq* polymeraseである。加えたプライマーに関しては、それぞれの項に適宜記す。

表2 プライマーのリスト

A. pMH116の作製

名称 ¹⁾	相同領域 ²⁾	塩基配列 ³⁾
dp416W-B	152-175 (pRS416)	attaagcgcgcGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAG
dp416C-B	1309-1338 (pRS416)	ggatgcgcgcCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
d3W205-X	204431-204460	tggcctctagATTTTAGTGCGATTTTAGAATAACTCTTGG
d3C205-B	204864-204895	attacgcgcgCAATGAAATAATATGTATATGTCTACATAGAG
d3W205-B	204896-204921	ttattgcgcgCTTTTTGTAATAAACGAGGAAAATGG
d3C205-M	205343-205366	ggatgcccgGCTCCACTTGATGCTTCCTTATTG

B. 点突然変異の検出

名称 ¹⁾	塩基配列 ³⁾
dp416W	GGCATCAGAGCAGATTGTACTGAG
dp416C	CTTACGCATCTGTGCGGTATTTC

C. 第III染色体上のプライマー (Genome scanning用以外)

名称 ¹⁾	相同領域 ²⁾	塩基配列 ³⁾
d3W54	53536-53557	CTCACACGATCTGACTGTGACC
d3W79	79121-79142	CAGTATGACTGTGGCGAATACC
d3C79	79392-79413	CCCAAACGTCGTAAAGACTCAG
d3W82	82249-82271	GGATAATCTATCCCCAAATGGAC
d3C83	82854-82877	TGTCTGCACTATGCTAGGAGTTCC
d3W84	83598-83621	CGTGTACATTGATCACATCGACTG
d3W102	101664-101683	TGGTTCGGTTGGTGCTTAGG
d3C102	102039-102061	TCGTTATAATCAAAGGCGTGAGG
d3W123	123003-123023	AGGAACCTCCGAAATAACGAG
d3W123-2	123324-123350	CCTTTTTCTTAACGACCAGATTAACAG
d3C124	123581-123606	CGAATGGTCTAGACTTATTCTCACAG
d3W142	142122-142143	TCGTACAAAGAGGGCATTAAAGC
d3C143	142845-142867	CTACGACCGAGCTATAGCAACAG
d3C144	143590-143612	TCGAATTCTTTTCATCCTTTGAC
d3W148-2	148215-148236	CCTTGTGCACAACTATGGTAGC
d3W148	148286-148310	TGCACTAGTTACACGATTCTTTGAG*
d3C152	152174-152201	CAATTATCTCAGAGAAGATCTTCTTGAG
d3W168	167947-167972	CCACCAGTAGCATTCTTCTGTATCTG
d3W168-2	168127-168156	CAATATAAAAATACTGAATATTGAGACATC*
d3C168	168193-168217	CAAATTATTCACCCATTAAATTGC
d3C169-2	168583-168605	TGAAGGATGATCGTGATCTGTTC
d3W169	168690-168713	CATTTCTCACTATTCTCGGTAAAGG*
d3C169	168712-168690	TAGAAATTGAGGACGAGATGACC
d3W197	197283-197307	AACTATGTCTGCAAACAGTTCTTGG
d3W198	198023-198046	TGAATTGTTGTAGAAGGACGTCTG
d3W199	198753-198778	CCTTAATTCAACTTCTTCTTCTGTTG
d3W200-α	199558-199580	GCACGGAATATGGGACTACTTCG

d3W200-a	292938-292960 [#]	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG
d3C200	199961-199939	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG
d3W205-2	204383-204405	CAACCATTTTAGATGTCTGCAGC
d3W205	204742-204762	AACCCCACTTACCCCTCTGTC
d3C205	205400-205421	GGCAACAGTAGGCAGTGAAAGC
d3C294	293844-293866	CATTATCAATCCTTGCATCCAGC

D. 染色体上のプライマー（第III染色体、Genome scanning用以外）

名称 ¹⁾	相同領域 ²⁾	塩基配列 ³⁾
d1C166	166367-166389	CTGATGACAGTCAGCTATTCACG
d1W207	206919-206940	AACGAGTTCAGCTGGTTCTGTC
d1C207	207315-207338	GGAGAAGCAGTCTTAGAGCATAACG
d5C116	116187-116207	GGATGAGTAGCAGCACGTTCC
d5C116-2	116475-116497	TGTATACACCCGCAGAGTACTGC
d7C542	541798-541822	GGCTTCAAATAGCTAAATAGCAATG
d7W1054	1054284-1054308	GGTACTGGAATTGACATGATCATTG
d7C1055	1055067-1055088	GCATTCCGGTTAGACATTCATC
d10C484	483709-483735	AATTGGCTAATATGAAAGACTCATCAG
d10W587	587180-587200	AACGCTTCTAACACATCACGC
d10C588	587960-587979	AGCCTTCTATGCTGGAGTCG
d12C657	656890-656914	TTCTTCAACCTCCAATTATTATTCG
d12W1010	1009978-1010000	GCATGCGAAGATGAACTGTTATC
d12C1011	1010538-1010560	CCAACAAGTACCGCTCACTACTG
d16C811	810807-810834	TGGTATTTTTACTCACCATTCTATATGC
d16W908	908395-908417	TTCAACCAACCACCTGTTCATAG
d16C909	909191-909218	TGGTATGGTTGTCTGATAGGTATCCTAC

E. Ty因子内のプライマー

名称 ¹⁾	塩基配列 ³⁾
dTF-89	ATGGATTTCCTAAATCCTTGAGGAG
dTF	GATTGGTCTAGCTTCATATGTTGG
dTRF	CCAACATATGAAGCTAGACCAATC
dTR	TGGTACTGAAGCAGGTTGAGG
dTFR	CTCCTCAACCTGCTTCAGTACC
dTF150	GGAAATCATCTGCACGTATGC
dTF150.2	GCTACACACGTCATCGACATC
dTR150.2	GATGCTGAATATCACCTCTTGC
dTF150.3	GGCACTGTACTTGACCTATCG
dTF150.4	CACAATGGAATCCCAACAATTAC
dTR150.4	CACAGGCGCTACCATGTAGAG
dTF150.5	TTAGATGACTGCCGTACTCAACTG
dTF82.11	CCCACACATTTCTCATGGTAGC
dTR82.1	TCACCTCTTGCAACAAATCTAGC
dTF82.2	AGACATCCTATCCGTTGATTATACG
dTR82.2	ACCCGTACTGGATATTGGTACG
dTF82	GAAGAACATTGCTGATGTGATGAC
dTR168	GGGGAATAGTATATGTTGAGCAAGTG
dTF168.3	CGAGAGTTGCATCACATCAGC

F. Genome scanningに用いたプライマー

名称 ¹⁾	相同領域 ²⁾	蛍光色素	塩基配列 ³⁾
d3W54f	53536-53557	6-FAM	CTCACACGATCTGACTGTGACC
d3C54	53791-53813	-	CGTAAATGGTAACATCTTCGCTG
d3W122f	122331-122352	6-FAM	GTTTGCCTCTTTTGAGATACC
d3C122	122564-122587	-	CAACCGTCTTATTTACTCCGAC
d3W131	130693-130710	-	TTTTGCCTTCGCAGCATC
d3C131f	130977-130996	6-FAM	GGAAGCCAAAGGTTTCTTGG
d3W141	141404-141423	-	ATTCTGATCTCTGGCGAACG
d3C141f	141647-141668	6-FAM	ACCTGAGTGGGGTCATTTTACC
d3W153f	152702-152718	6-FAM	CCGGCAATGTCACATCC
d3C153	152894-152914	-	CGACGTTAATCTGCTTCTCG
d3W158	158256-158277	-	CAGCGTTGGTTACTTAAGCTGC
d3C158f	158433-158451	6-FAM	CCTGGGTCAGTTGGTGGTC
d3W167	167116-167134	-	CATCAAGCCCCAGAGTTCC
d3C167f	167432-167450	6-FAM	ACGAGGCATAATGCTGTGC
d3W174	173964-173982	-	ATAGGTGGGTCGACGTTGC
d3C174f	174115-174133	6-FAM	AAGTGGGCTCAATTTTCGG
d3W179h	179423-179442	HEX	AGGCTCATTTAATGGCCAGG
d3C179	179663-179684	-	GCAAGCCGTATAGAATCAATGG
d3W185h	185435-185455	HEX	GAAGCACGTTTGGTATCGAAG
d3C185	185628-185649	-	ATAGCGTGAGTTCCGATATCC
d3W192	191374-191395	-	GCAATTATGTCCTCCTCTTTGG
d3C192h	191628-191652	HEX	AAGACACTTATCCCTAGGAATCAGG
d3W197f	196910-196931	6-FAM	ACTGGTTGGAAAGCGTAAACAC
d3C197	197122-197140	-	ATGATGAATTGTGCGGTGC
d3W205f	205158-205178	6-FAM	TCGTAAACGTGACCCCTTATG
d3C205	205349-205368	-	CAGCTCCACTTGATGCTTCC
d3W209	208718-208738	-	TTTCTTTGTCTGCTCGAGACG
d3C209f	208838-208856	6-FAM	AACAACCTGGTGCAAGACGC
d3W213f	212818-212835	6-FAM	GGTGGCTGCTTCAGATGG
d3C213	213045-213062	-	CGATCAACCTGGCAGTGG
d3W220	220234-220256	-	TTCAGAATTTTGGCAGTGAACC*
d3C220f	220528-220546	6-FAM	ACATGAAGGCCCTGTTTCG
d3W225h	224842-224859	HEX	CTGCGGTGCTTTCTGTCC
d3C225	224996-225016	-	GTCGTGGTGTCTGAAGAGAGC
d3W236f	235994-236015	6-FAM	TGCATTCTAACGCTTACAGTGC
d3C236	236134-236148	-	GCTCCGACGCCATGC
d3W262f	262410-262426	6-FAM	ACATCTCGCAGGGCACC
d3C262	262566-262588	-	GAAGAGGTATTCCGGTAGTTTCG
d3W271	271273-271294	-	TTCCGCACATCTTTTATCTTGG
d3C271h	271496-271516	HEX	ACGAATCAAGGGCAGAATTTG
d3W303f	303395-303413	6-FAM	TTCGACAACGGTAGCATCC
d3C303	303645-303666	-	GTGCAACTGCAGTAGGTCAGTC
d3W313h	312710-312730	HEX	CTCATACGATGGAGCTCGTTC
d3C313	312937-312958	-	TTGGCAGTGTTACTTTCACCTG
d6W104f	104116-104133	6-FAM	AGCTTGCCCAAACCTTGG
d6W104h	104212-104230	HEX	ATGATATTCCCCGTAGCGG

- 1) プライマーの名称に関しては、基本的に以下の法則に従って命名した。出芽酵母の染色体上に結合するプライマーについては、2文字目にその染色体番号をアラビア数字で示す。3文字目には、SGDデータベースに基づき、プライマーの配列がワトソン鎖に相当する場合はW、クリック鎖に相当する場合はCを付加する。4文字目以降の数字は、左腕テロメアからの距離 (kb) を表す。プライマーの名称にp416をもつものは、プラスミドpRS416に結合するプライマーである。このプライマーの場合は、GenBankデータベースの記載に従い、その配列がワトソン鎖に相当するものはW、クリック鎖に相当するものはCを付加する。Ty因子に結合するプライマーに関しては、プライマーの名称の2文字目にTを付加した。この場合、3文字目のF (R) はTy因子の転写の方向と一致する方向 (逆方向) に設計したプライマーであることを意味する。プライマーの名称の最後にB、X、M、f、hを持つものは、それぞれ5'側に *Bss*H II部位、*Xba* I部位、*Xma* I部位、蛍光色素6-FAM、蛍光色素HEXを付加したものである。
- 2) 出芽酵母の染色体上に結合するプライマーに関しては、SGDデータベースに基づき、左腕テロメアからの距離 (bp) でプライマーの正確な結合位置を示した。右肩に#の付いているプライマー (d3W200-a) は *MATa* 遺伝子座に結合するプライマーであるが、SGDでは *MATα* の細胞の塩基配列のみが記載されているため、プライマーの結合位置に関しては *HMR* 遺伝子座に相当する部分を表記した。プラスミドpRS416に結合するプライマーについては、GenBankデータベースに登録されている数字でプライマー結合部位を表した。
- 3) 鋳型DNAに対合する部分を大文字で記した。下線部は制限酵素部位を表す。右肩に*の付いているプライマーは、結合部位の塩基配列がSGDデータベースとは異なっていたもので、ここでは実際の実験に用いたプライマーの塩基配列を表記した。

8-1. 一般的なPCR法

サザンブロッティングのプローブDNAを調整するためには、PCR反応溶液Aに鋳型として親株二倍体RD101のゲノムDNAを1 μ l (約20-100 ng) 加え、全量を100 μ lとした。反応には95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、92 $^{\circ}$ C 1分、58 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 2分の3段階を30サイクル行った。

プラスミドpMH116を構築する場合には、PCR反応中に点突然変異が導入されるのを防ぐ目的で、校正機能を持つ*Ex Taq polymerase* (TAKARA) を*rTaq polymerase*の代わりに使用した。プラスミドに組み込むために、5'側に制限酵素部位を持たせたプライマーを用いてIII-205領域を増幅する場合、PCR反応溶液Aに鋳型として1 μ l (約200-400 ng) の出芽酵母FY838のゲノムDNAを加え、全量を100 μ lとした。反応には95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、92 $^{\circ}$ C 1分、58 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 2分の3段階を25サイクル行った。*URA3*遺伝子断片の両端に*BssH II*部位を持たせるためのPCRでは、PCR反応溶液Aに鋳型として10 ngのpRS416を加え、全量を100 μ lとした。反応条件としては95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、95 $^{\circ}$ C 30秒、55 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 5分の3段階を25サイクル行い、さらに72 $^{\circ}$ C 5分の伸長反応を行った。

親株一倍体 (YMH1およびFY838) のTy因子挿入部位付近、および、異常染色体の再編領域のクローニングの際には、*rTaq polymerase*の代わりに*Ex Taq polymerase* (TAKARA) あるいは*Z-Taq polymerase* (TAKARA) を用いた。このPCRでは、PCR反応溶液Aに鋳型として約10 ngのゲノムDNAを加え、全量を100 μ lとした。*Ex Taq polymerase*を使用して、Ty因子を含む領域を増幅する場合、PCRの反応条件としては95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、92 $^{\circ}$ C 1分、58 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 12分の3段階を30サイクル行った。*MAT-HMR*間の染色体欠失を検出する目的では、この72 $^{\circ}$ Cのインキュベーションを5分に変えてPCR反応を行った。*Z-Taq polymerase*を使用する場合には、製造元の指示に従って*Z-Taq*専用の添付の10 $\times$ reaction buffer、dNTP mix、0.04 unit/ μ l *Z-Taq polymerase*を用いた。また、この場合のPCRの反応条件としては95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、98 $^{\circ}$ C 1秒、58 $^{\circ}$ C 10秒、72 $^{\circ}$ C 1-2分の3段階を30サイクル行った。

8-2. コロニーPCR法

コロニーPCR法は、寒天培地上に生育してきたコロニーをそのままPCR反応液に懸濁するだけでPCRを行うことができる簡便な方法である。コロニーPCRの反応条件に関してはHuxleyら (1990) による報告を参考にした。PCRの反応溶液Aに、鋳型

として 10^4 - 10^5 cells/ μ lの細胞懸濁液を12.5 μ l加えて、反応液の全量を25 μ lとした。反応条件としては95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、92 $^{\circ}$ C 1分、58 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 2分の3段階を30サイクル行った。

8-2-1. 点突然変異の検討

5-FOA^rに変化した細胞の中からURA3遺伝子内の点突然変異体を検出するためには、プライマーとしてdp416Wおよびdp416C（表2-B）を用いたコロニーPCRを行った。これらのプライマーは、第III染色体上に組み込んだURA3遺伝子に特異的に結合する（図6）。コロニーPCR後、10 μ lのPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、PCR産物が確認されたものについては点突然変異に分類した。

8-2-2. MAT遺伝子座の同定

Huxleyら（1990）による報告に従い、コロニーPCR法を用いて細胞の接合型を決定した（図9）。ただし、本研究ではプライマー（d3W200-a、d3W200- α およびd3C200、表2-C）の濃度を0.4 μ Mに変更し、ポリメラーゼとして0.02 unit/ μ lの*rTaq* polymeraseを使用した。

8-3. 定量的PCR法

8-3-1. URA3挿入領域の構造解析

細胞内のIII-205領域がヘテロ接合性のままなのか、それともヘミ接合性あるいはホモ接合性に変化しているのかを確認するために、安田（1996）、川上ら（1996）、中山（1996）による記載を参考にして、定量的PCRを行った。この定量的PCRでは、III-102領域を増幅させるためのプライマー（d3W102およびd3C102、表2-C）とIII-205領域を増幅させるためのプライマー（d3W205およびd3C205、表2-C）を競合させることにより、目的とするURA3挿入領域の接合性を推定する（図10）。鋳型としては、パルスフィールドゲル電気泳動用に作製したプラグ45 μ l分から精製したDNAを0.5 μ l（約3 ng）用い、反応液の全量を25 μ lとした。反応条件としては95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、92 $^{\circ}$ C 1分、58 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 5分の3段階を18あるいは20サイ

クル行った。このうち、10 μ lのPCR産物についてアガロースゲル電気泳動による解析を行った。0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイド水溶液にゲルを30分間浸してDNAを染色し、UVトランスイルミネーター（アトー社）を用いてゲルに紫外線を照射することによりDNAを観察した。電気泳動像をDensitoGRAPHソフト（アトー社）の画像として取り込み、DNA量をNIH image解析ソフトを用いて定量した。

8-3-2. Genome scanning

Genome scanningとは、第III染色体の欠失・増幅領域同定法のことである（図11、森, 1997年度修士論文）。プライマーセットとして表2-Fに挙げた24種類のみを用いたこと以外は、全て森の記述に従って実験を行った。まず、第III染色体上の22箇所のマーカー領域および第VI染色体上の2箇所のコントロール領域を、別々の反応液中でPCR増幅した。この定量的なPCRでは、PCR反応溶液Aに鋳型として3 ng/ μ lのゲノムDNAを1 μ l加え、反応液の全量を25 μ lとした。反応条件としては95 $^{\circ}$ C 1分のDNA変性の後、92 $^{\circ}$ C 1分、58 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分の3段階を17サイクル行った。PCR反応後、あらかじめ10 μ lの滅菌水を分注しておいたエッペンドルフチューブに、24種類のPCR産物を10 μ lずつ加えた。この溶液250 μ lのうちの2 μ lを、0.5 μ lのサイズマーカー（GENESCAN-500 ROX、PE Applied Biosystems社）および10 μ lのホルムアミド（Amresco社）と混合した。この混合溶液を94 $^{\circ}$ Cで4分間熱変性した後、氷中に保存することによりDNAを一本鎖にし、ABI PRISM310（PE Applied Biosystems社）を用いて電氣的に分離した。得られたデータは、ABI PRISM310 collectionソフトウェア（version 1.0.4、PE Applied Biosystems社）およびGeneScanソフトウェア（version 2.1、PE Applied Biosystems社）によって自動的に解析され、DNAの量と大きさが決定された。第III染色体上に設計したマーカー領域のDNA量に関しては、Genotyperソフトウェア（version 2.0、PE Applied Biosystems社）を用いて、同じ蛍光色素を持つ第VI染色体上のコントロール領域のDNA量で標準化した（相対PCR産物量、図12-A）。さらに、第III染色体上の欠失・増幅領域を同定するためには、各マーカー領域ごとに、Microsoft Excel（version 5.0a、Microsoft社）を用いて5-FOA⁺細胞での相対PCR産物量を親株RD101での相対PCR産物量で除算した（相対コピー数、図12-B）。以上の一連の操作を、親株RD101を用いた再現性確認のための実験（図12-A）に関しては5回、RD101由来の異常染色体を持つ5-FOA⁺クローンの欠失・増幅領域同定のための実験（図13）に関しては少なくとも2回繰り返した。

9. LOHの発生頻度の測定

9-1. 二倍体出芽酵母の構築

適当な一倍体酵母をYPD寒天培地上で混合し、4時間以上接合させた後、SC-Trp-HisあるいはSC-Trp-His-Ura寒天培地上で二倍体酵母を選択した。一倍体酵母を完全に除去するために、同じ選択寒天培地上で2回画線培養を行った。寒天培地上で細胞に遺伝的变化が蓄積するのを防ぐ目的で、LOHの発生頻度を測定する場合には必ず直前に二倍体酵母を構築した。

9-2. LOHの発生頻度の測定

LOHの発生頻度を測定する菌株をSC-Ura液体培地3 mlに植菌し、30℃で一晩回転培養した。Uraに変化した細胞に負の選択圧がかからないようにウラシルを20 µg/ml加えたYPD液体培地5 mlに対し、培養液から5-10細胞、あるいは 10^3 細胞を加えた。これらの培養液を、対数増殖期 ($0.1-8 \times 10^7$ cfu/ml) になるまで30℃で回転培養した。培養液を4℃、14000 rpm、5秒遠心して集菌し、50 mM EDTA水溶液で菌体を洗浄した。再び同じ条件で遠心して菌体を沈殿させた後、滅菌水で適当に希釈してYPD寒天培地および5-FOA含有寒天培地に塗布した。30℃にて静置培養し、48時間後に生育してきたコロニーの数を数えた。

得られた5-FOA^rの細胞がウラシル要求性を示すことを確かめるために、5-FOA^rクローンを5-FOA含有寒天培地およびSC-Ura寒天培地上で二晩30℃にて画線培養した。

10. パルスフィールドゲル電気泳動法

10-1. プラグの作製

CHEF yeast DNA plug kit (Bio-Rad社)、あるいはCarle and Olson (1987) の記述に従って出芽酵母の染色体DNAが寒天内に封入されたプラグを作製した。ただし、1つのプラグ (約90 µl) 内に封入する細胞数に関しては、最終濃度が $6-12 \times 10^8$ cells/mlに

なるように調整した。

10-2. パルスフィールド電気泳動法 (PFGE)

泳動にはCHEF Mapper™ XA Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad社) を使用した。アガロースにはPulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad社) を用い、1%のゲル濃度で使用した。緩衝液にはTBE緩衝液 (45 mM Tris-borate、1 mM EDTA (pH~8.5)) を用いた。

必要に応じて泳動条件A (電圧 6.0 V/cm、泳動時間 29.57時間、角度 120° (±60°)、パルス時間に関しては24.03秒の開始パルス時間と1分33.69秒の終了パルス時間の間を直線状に変化させた)、泳動条件B (電圧 6.0 V/cm、泳動時間 34.02時間、角度 120° (±60°)、パルス時間に関しては24.03秒の開始パルス時間と44.69秒の終了パルス時間の間を直線状に変化させた) を使い分けた。また、クラスIVの異常染色体を解析するための制限酵素マッピング (図17) では、10 kbから120 kbまでのDNAを感度良く分離するために、泳動条件C (電圧 6.0 V/cm、泳動時間 28.18時間、角度 120° (±60°)、パルス時間に関しては0.47秒の開始パルス時間と10.29秒の終了パルス時間の間を直線状に変化させた) を用いた。泳動後、0.5 µg/mlのエチジウムブロマイド水溶液にゲルを30分間浸してDNAを染色し、20分間蒸留水で脱色した後、UVトランスイルミネーター (アトー社) を用いてゲルに紫外線を照射することによりDNAを観察した。電気泳動像をDensitoGRAPHソフト (アトー社) の画像として取り込み、第I染色体 (230 kb)、第VI染色体 (270 kb)、第III染色体 (330 kb)、第IX染色体 (440 kb) のDNA量をNIH image解析ソフトを用いて定量した。

11. サザンブロッティング

基本的な操作に関しては全て *Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989) に従った。PFGEで分離したDNAについては、泳動後のゲルを0.25 NのHClに15分間浸して脱プリン反応を起こさせた後、キャピラリートランスファー法あるいはVacuum Blotter Model 785 (Bio-Rad社) を用いてナイロン膜 (Hybond-N+, Amersham社) にDNAを転写した。DNAプローブに関しては、表2にあるプライマーを用いたPCR法によって調整した (前述)。第III染色体を特異的に検出するためのプローブには、左腕上の2箇所の領域 (III-54およびIII-102) を同時に用いた。III-54領域はGenome scanningでの標的マーカーの1つであり、III-102領域はURA3挿入領域の構造解析のための定量的

PCRにおけるコントロール領域である。親株一倍体のTy因子挿入確認のためのプローブには、左腕上のIII-79、右腕上のIII-124、III-141、III-153、III-167に相当する領域をそれぞれ用いた。このうち、III-79およびIII-167領域については、クラスIVの異常染色体の制限酵素マッピングでもプローブとして使用した。クラスVの異常染色体が転座であることを確認するためのプローブには、第I染色体の右腕上のI-207、第VII染色体の右腕上のVII-1054、第X染色体の右腕上のX-587、第XII染色体の右腕上のXII-1010、第XVI染色体の右腕上のXVI-908に相当する領域をそれぞれ用いた。プローブDNAの標識及び検出に関しては、ECL direct nucleic acid labeling and detection system（Amersham社）あるいはGene Images labeling and detection system（Amersham社）を用い、製造元の指示に従って使用した。

12. DNAの塩基配列解析

PCR法を用いてクローニングしたDNA断片に関しては、ポリエチレングリコール法による精製後（前述）、BigDye terminator cycle sequencing kits（PE Applied Biosystems社）を用い、製造元の指示に従って一本鎖DNAを調整した。準備したサンプルについては、キャピラリーシーケンサーABI PRISM310（PE Applied Biosystems社）を用いて、その全塩基配列を決定した。DNA同士の相同性を調べるためには、GeneWorks解析ソフト（version 2.5.1、Oxford Molecular Group）を使用した。

III 結果

1. LOHをもたらす遺伝的变化の同定

1-1. LOH検出系の構築

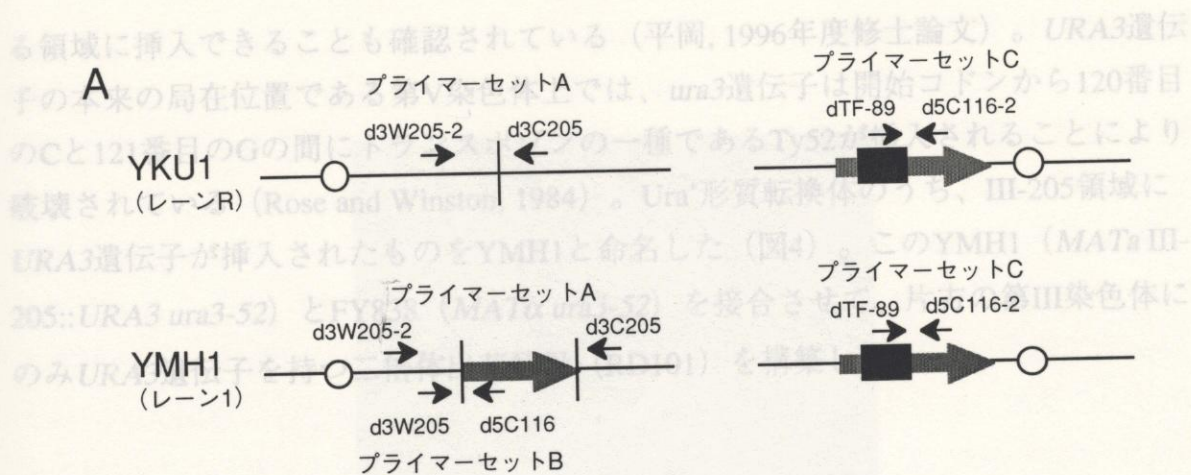
二倍体出芽酵母におけるLOHを検出するために、片方の第III染色体にのみURA3マ

ーカー遺伝子を挿入した（図1）。*URA3*遺伝子はウラシルの生合成に関与する遺伝子のうちの1つであり、*ura3*変異株はウラシル要求性（Ura⁻）を示す。酵母の遺伝子の中でも*URA3*遺伝子は比較的小さい部類に属し、遺伝子産物の全長は267アミノ酸であるため、塩基配列レベルでの変異点の解析が容易である。LOHにより*URA3*遺伝子が不活化した細胞を単離するためには、5-フルオロオロチン酸（5-FOA）を利用する。5-FOAは、ピリミジン環を持つ核酸の新生合成系の中間体であるオロチン酸の類似体であり、出芽酵母の*URA5*遺伝子産物および*URA3*遺伝子産物によって、チミジル酸合成酵素の阻害剤である5-フルオロデオキシウリジンに代謝される。従って、5-FOAを含む培地上で生育できる細胞を選択することにより、*ura3*変異株あるいは*ura5*変異株を得ることができる（Boeke et al., 1984）。*ura3*変異株はウラシル要求性を示すが、*ura5*変異株はウラシルの非存在下でもゆっくりと生育することができるため、5-FOA耐性（5-FOA^r）に変化した細胞をウラシルを含まない合成寒天培地上で培養することにより、両者を識別することが可能である。

出芽酵母の第Ⅲ染色体では、これまでに複製開始点（Campbell and Newlon, 1991；Newlon et al., 1991；Rivier and Rine, 1992；Baudat and Nicolas, 1997）、減数分裂時における組換えのホットスポット（Zenvirth et al., 1992；Wu and Lichten, 1994；Baudat and Nicolas, 1997）等のDNA動態に関わる機能単位の解析が進んでいる。この染色体を用いて任意の領域での遺伝的变化を解析することができる実験系を構築すれば、遺伝的变化に関与する様々な生物機能や特異的なDNA構造を総合的な視点から考察できるものと期待される。

第Ⅲ染色体の全長は330 kbであり、左腕のテロメアから114 kbの位置にセントロメアがある（図3）。*URA3*マーカーを挿入する部位については、1) 第Ⅲ染色体上の遺伝子を破壊しないこと、2) できるだけ広範囲の染色体欠失を検出できるようにすることを考え、出芽酵母のゲノムのデータベース（SGD）でORFに含まれていない第Ⅲ染色体の右腕の中央付近（III-205領域、本研究ではSGDの塩基配列情報に従って、便宜上、染色体上の位置に関しては、染色体番号と左腕のテロメアからの距離（kb）として表記する）を選定した。

出芽酵母の第Ⅲ染色体の標的部位に*URA3*遺伝子を挿入する方法としては、出芽酵母の相同組換え機構を利用した。本研究では、確実に標的部位にマーカー遺伝子を挿入するために、試験管内DNAリガーゼ処理により両端にIII-205領域との相同領域を合計926 bp持つ*URA3*遺伝子断片を作製した（図2および材料と方法を参照）。このDNA断片を一倍体酵母であるYKU1（Ura⁻）に導入し、Ura⁺に形質転換した細胞を選択した。なお、両端に標的部位との相同領域を60 ntずつ持つプライマーを用いて*URA3*遺伝子断片をPCR増幅することにより、より簡便にマーカー遺伝子を目的とす



1.2. 野生型におけるLOH発生頻度の測定

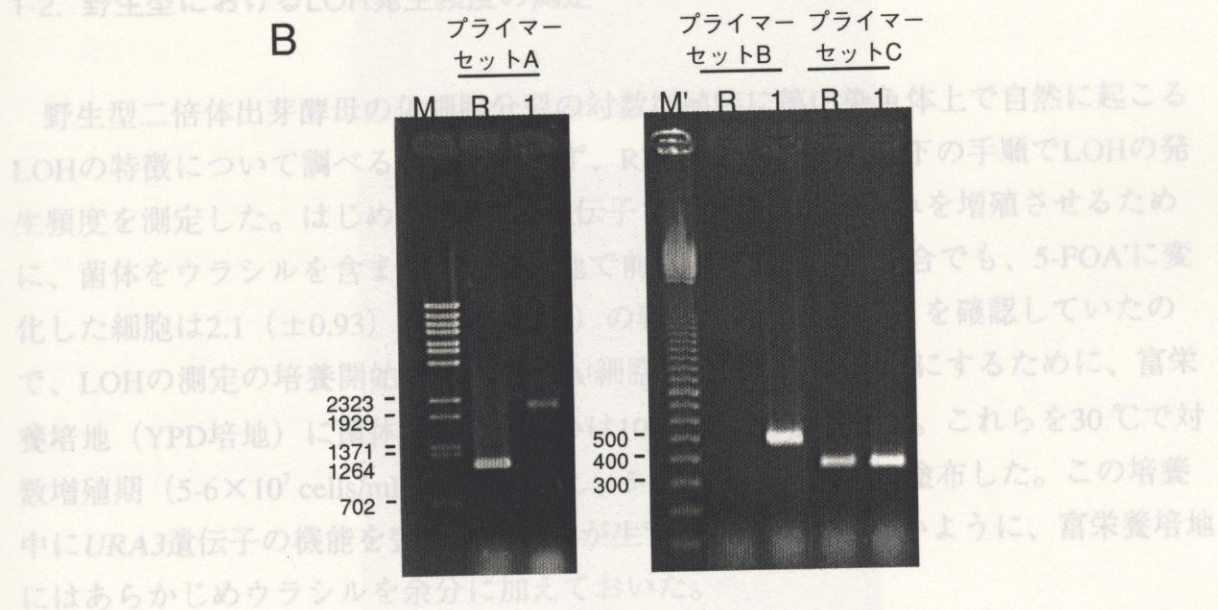


図4 コロニーPCR法によるURA3遺伝子の挿入確認

一倍体出芽酵母であるYKU1 (Ura⁻) に、両端に第III染色体上の標的部 (III-205領域) との相同領域を926 bp持つURA3遺伝子断片 (pMH116のXma I-Xba I断片、図1を参照) を導入し、Ura⁺に形質転換した細胞を単離した。URA3遺伝子が標的部に挿入されたことは、この領域を挟み込む形に設計したプライマーセットA (d3W205-2およびd3C205) を用いたコロニーPCR法で確認した。このPCRでは、YKU1を鋳型とした場合には1039 bp、標的部にURA3マーカーが挿入された細胞を用いた場合には2222 bpのPCR産物が増幅される。プライマーセットB (d3W205およびd5C116) はIII-205領域の上流側とURA3遺伝子内に結合するプライマーであり、III-205領域にURA3遺伝子がセントロメアからテロメアへ向かう方向 (ワトソン鎖側) に挿入されている場合のみ466 bpのPCR産物が得られる。第V染色体上のura3遺伝子は、トランスポゾンTy52の挿入により破壊されているが、そのトランスポゾン内とura3遺伝子内に設計されたプライマーがプライマーセットC (dTF-89およびd5C116-2) である。第V染色体上のura3遺伝子にTy52が挿入されたままであれば、このPCRにより328 bpのPCR産物が観察される。以上の3種類のプライマーセットを用いた解析により、第III染色体上のIII-205領域のワトソン鎖にのみURA3遺伝子を持つことが示された細胞をYMH1と命名した。Mはλ BstPI Iサイズマーカー、M'は100 bpラダーマーカー、RはYKU1、1はYMH1を表す。プライマーの配列及び結合位置に関しては表2を参照のこと。ゲルの下方に見えるバンドはRNAおよびPCR反応に用いられなかったプライマーである。

る領域に挿入できることも確認されている（平岡, 1996年度修士論文）。*URA3*遺伝子の本来の局在位置である第Ⅴ染色体上では、*ura3*遺伝子は開始コドンから120番目のCと121番目のGの間にトランスポゾン的一种であるTy52が挿入されることにより破壊されている（Rose and Winston, 1984）。*Ura⁺*形質転換体のうち、III-205領域に*URA3*遺伝子が挿入されたものをYMH1と命名した（図4）。このYMH1（*MATa* III-205::*URA3 ura3-52*）とFY838（*MATα ura3-52*）を接合させて、片方の第Ⅲ染色体にのみ*URA3*遺伝子を持つ二倍体出芽酵母（RD101）を構築した。

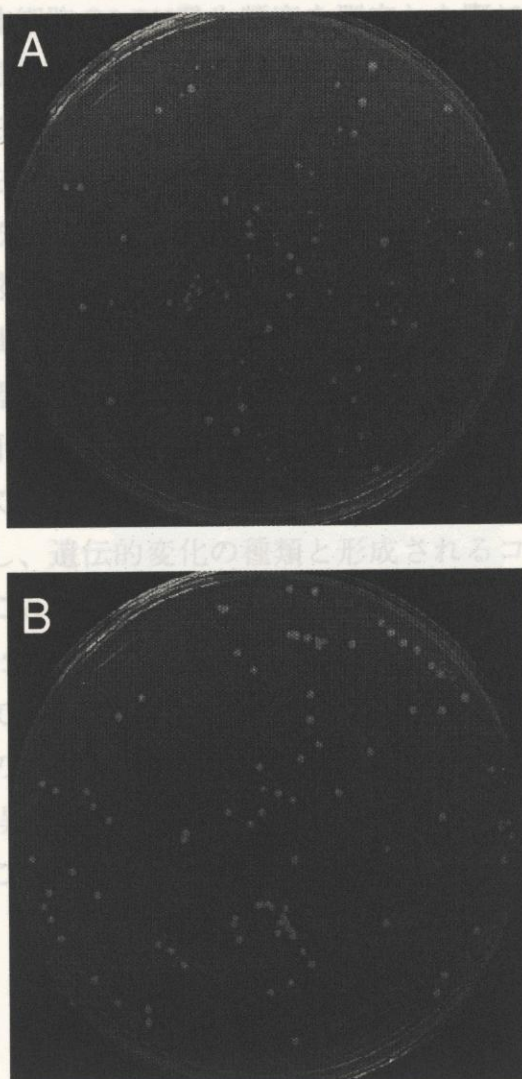
1-2. 野生型におけるLOH発生頻度の測定

野生型二倍体出芽酵母の体細胞分裂の対数増殖時に第Ⅲ染色体上で自然に起こるLOHの特徴について調べるために、まず、RD101を用いて、以下の手順でLOHの発生頻度を測定した。はじめに、*URA3*遺伝子を持つ出芽酵母のみを増殖させるために、菌体をウラシルを含まない合成培地で前培養した。この場合でも、5-FOA'に変化した細胞は $2.1 (\pm 0.93) \times 10^{-5}$ ($n=4$) の頻度で出現することを確認していたので、LOHの測定の培養開始時点で5-FOA'細胞が存在しないようにするために、富栄養培地（YPD培地）に菌体を5-10あるいは 10^3 細胞ずつ植菌した。これらを30℃で対数増殖期（ $5-6 \times 10^7$ cells/ml）まで培養し、5-FOA寒天培地上に塗布した。この培養中に*URA3*遺伝子の機能を喪失した細胞が生育に不利にならないように、富栄養培地にはあらかじめウラシルを余分に加えておいた。

この方法により測定した二倍体RD101における5-FOA'細胞の出現頻度は、 $2.0 (\pm 1.3) \times 10^{-4}$ ($n=23$) であった（表3）。一方、第Ⅲ染色体に*URA3*遺伝子を持つ一倍体YMH1を用いて同様に実験を行ったところ、 $4.3 (\pm 1.3) \times 10^{-7}$ ($n=6$) の頻度で5-FOA'細胞が得られた。二倍体細胞における発生頻度が一倍体細胞における発生頻度の約500倍であったことは、二倍体細胞での遺伝的変化が一倍体細胞とは量的に異なると同時に質的にも異なることを示唆する。また、5-FOA'をもたらす*URA3*遺伝子や*URA5*遺伝子が2コピーずつ存在する二倍体酵母（RD103）からは、平均して $5.5 (\pm 2.9) \times 10^{-7}$ 細胞 ($n=9$) を5-FOA寒天培地上に塗布しても5-FOA'細胞が検出されなかったことより、1コピーの*URA3*遺伝子と2コピーの*URA5*遺伝子を持つ二倍体酵母（RD101）から得られた5-FOA'細胞は*URA3*遺伝子の不活化によるものであると推定される。実際に、RD101由来の640例（12実験区の合計）の5-FOA'細胞をウラシルを含まない合成寒天培地上で画線培養したところ、全てのクローンはこの培地上でコロニーを形成せず、これらの5-FOA'の表現型は*URA3*遺伝子の機能喪失によるもので

あることが示された。RD101から得られた640個の5-FOA⁺細胞に関しては、さらに解析を進めるために5-FOA寒天培地上で画線培養し、クローンを単離した。

第III染色体上で二倍体細胞の5-FOA⁺細胞の形成に、1つ予想しなかった現象が見られた。5-FOA⁺細胞の画線培養時に、*ura3*の形成するものと、明瞭なコロニーの直径が1 mm未満)に形成されるコロニーの割合の5-FOA⁺細胞のYPD液体培地での増殖時間は102分から228分の間にあり、増殖する細胞の倍加時間が有意に遅かったことは、小規模なコロニーを形成することを意味して評価することを意味して、いくつか任意に選出し、遺伝的変化の種類と形成されるコロニーの大きさとの相関についても検討することになった。このうち、6実験区由来の細胞を解析した。また、液体培地での増殖にかかって、遺伝的変化の割合が2-3回、分裂世代数の異なる細胞の割合を比較することになった。



1-3. 点突然変異の検討

遺伝的変化は塩基置換やフレームシフト等の塩基レベルでの変異である点突然変異と、欠失や転座のような染色体レベルの変化の2つに大別できる(図1を参照)。

図5 RD101由来の5-FOA⁺細胞が形成するコロニーの大きさ

まず、本研究で単離された5-FOA⁺細胞の形成に、遺伝的変化が点突然変異かそれ以外のものかを確認するために、二倍体出芽酵母をYPD液体培地にて対数増殖期まで培養し、5-FOA寒天培地上に塗布した。30℃にて48時間培養した後に5-FOA寒天培地上に生育してきた5-FOA⁺細胞のコロニーの形態を示す。

A) 片方の第III染色体に*URA3*マーカーを持つRD101由来の5-FOA⁺細胞。野生型の*URA3*遺伝子を持つ細胞は5-FOA⁺に対し感受性を示すため、遺伝的変化によって*URA3*遺伝子の機能を喪失した細胞のみが5-FOA寒天培地上でコロニーを形成する。

B) RD102。RD102は*ura3/ura3*変異株であるため、5-FOA⁺の表現型を示す。以上の結果より、二倍体出芽酵母の第III染色体上における*URA3*遺伝子の点突然変異頻度は 3.1×10^{-7} ($2.0 \times 10^{-4} \div 640$) 未満であり、この細胞におけるLOHの大部分

あることが示された。RD101から得られた640個の5-FOA⁺細胞に関しては、さらに解析を進めるために5-FOA寒天培地上で画線培養し、クローンを単離した。

第III染色体上で二倍体細胞のLOH発生頻度を測定した際に、1つ予想しなかった現象が見られた。5-FOA⁺細胞のコロニーの大きさは不均一であり、5-FOA寒天培地上で画線培養した時に*ura3/ura3*二倍体細胞（RD102）と同じぐらいの大きさのコロニーを形成するものと、明らかに小さいコロニーを形成するもの（48時間後のコロニーの直径が1 mm未満）に分けられたのである（図5）。小さいコロニーを形成する46例の5-FOA⁺細胞のYPD液体培地における倍加時間を測定したところ、細胞の倍加時間は102分から228分の間であり、その平均は 138 ± 31 分であった。小コロニーを形成する細胞の倍加時間が標準サイズのコロニーを形成するもの（約90分）と比べて有意に遅かったことは、小さいコロニーを形成するような遺伝的变化に関しては過小評価することを意味している。そこで標準サイズのコロニーと小サイズのコロニーをいくつか任意に選出し、遺伝的变化の種類と形成されるコロニーの大きさとの相関についても検討することにした。この目的のために、12実験区由来の640クローンのうち、6実験区由来の544クローンに関しては、1回あたりの解析数を32-48に増やした。また、液体培地での培養中にある種の遺伝的变化を持つ細胞に負の選択圧がかかって、遺伝的变化の分布が変わる可能性を考え、1実験区（1つの培養液）につき2-3回、分裂世代数の異なる細胞を5-FOA寒天培地上に塗布し、それぞれの遺伝的变化の割合を比較することにした。

1-3. 点突然変異の検討

遺伝的变化は塩基置換やフレームシフト等の塩基レベルでの変異である点突然変異と、欠失や転座のような染色体レベルの変化の2つに大別できる（図1を参照）。まず、本研究で単離された5-FOA⁺細胞における遺伝的变化が点突然変異かそれ以外のものであるかを検討するために、第III染色体上に挿入した*URA3*遺伝子断片の両端に特異的に結合する点突然変異検出用プライマーを用い、3つの独立した実験区由来の合計48クロンの5-FOA⁺細胞についてコロニーPCRを行った。その結果、PCR産物が得られたクローンはなく、全てのクローンは点突然変異体ではないことが示された（図6）。残りの592クローンについては後出の定量的PCR法（図10）による解析で点突然変異について検定したが、この場合にも点突然変異は認められなかった。以上の結果より、二倍体出芽酵母の第III染色体上における*URA3*遺伝子の点突然変異頻度は 3.1×10^{-7} ($2.0 \times 10^{-4} \div 640$) 未満であり、この細胞におけるLOHの大部分

二倍体出芽酵母RD101から単離された5-FOA細胞について、LOHをもたらした遺伝的変化が点突然変異である可能性を検討した。第III染色体上に挿入したURA3遺伝子断片の両端に特異的に結合する点突然変異検出用プライマー（dpW416およびdpC416、表2-B）を用い、3つの独立した実験区由来の合計48クローンの5-FOA⁺細胞についてコロニーPCRを行った。このプライマーセットを用いた場合、鋳型としてRD101を用いた場合には1173 bpのPCR産物が得られるが（レーン4）、第III染色体上にURA3遺伝子を持たない二倍体RD102を使用した場合にはPCR産物が増幅されない（レーン5）。代表として、3例のPCR産物の電気泳動像をレーン1-3に示す。Mで表したレーンは100 bpラダーサイズマーカーであり、図の左側に適当なサイズ（bp）のサイズマーカーの泳動位置を示した。

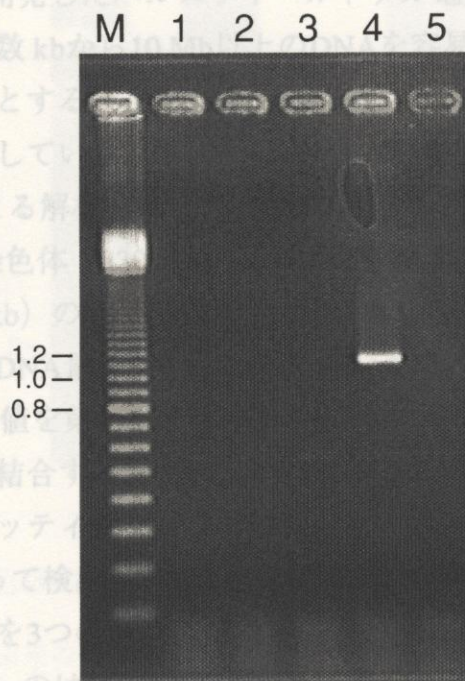


図6 点突然変異の検討

は点突然変異ではなく、染色体レベルの変化によるものであることが示唆された。

1-4. 第III染色体のコピー数とサイズ変化による分類

1982年にSchwartzらが開発したパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）は、多くの改良を経て現在では数 kb から 10 Mb 以上の DNA を容易に分離することが可能となり、出芽酵母をはじめとする微生物の染色体の分離や高等生物の染色体地図の作製等に大きな威力を発揮している。本研究においても 5-FOA⁺細胞の染色体を直接観察するために、PFGE による解析を行った（図7）。泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出した第I染色体（230 kb）、第VI染色体（270 kb）、第III染色体（330 kb）、第IX染色体（440 kb）の DNA 量を定量した。第I染色体、第VI染色体、第IX染色体の大きさを横軸に、DNA 量を縦軸にとって描いたグラフから、330 kb における DNA 量を読みとり、その値を第III染色体が2本ある時の理論値とした。第III染色体の位置に関しては、左腕に結合する2種類のプローブ（III-54およびIII-102、図3-Aを参照）を用いたサザンブロッティングにより検出した（図7）。

この2種類の解析によって検出された第III染色体のコピー数とサイズの変化パターンをもとに、5-FOA⁺細胞を3つのクラスに分類した（図7および表3）。640クローン中、最も多かった（62%）のは第III染色体のDNA量が理論値の約1/2（実測値の平均は 0.57 ± 0.058 ）になり、他に第III染色体由来の新しいバンドが見られなかったものである。この特徴を持つ376クローンに関しては、クラスAに分類した。クラスBに分類された213クローン（30%）は親株と全く同じ電気泳動パターンを示した。また、第III染色体の長さが変化した異常染色体を持つものが51クローン（8%）検出された（クラスC）。クラスCのうち、48のクローンでは、330 kbの位置に泳動する第III染色体のDNA量が理論値の約1/2（実測値の平均は 0.55 ± 0.066 ）になり、第III染色体由来の新たな染色体が観察された。驚いたことに、異なるサイズの第III染色体のみを1コピー持つ細胞がクラスCから独立して3例見つかった。新しい大きさの染色体はもとの大きさと比べて10-110 kb小さくなったものから110-20 kb大きくなったものまで、様々なものが確認された（表4）。この中でも、80 kb短くなったものが見つかったもののうち29%を占めていた。塩基配列レベルで染色体再編領域の同定を行わない限り断言できないが、この80 kbの欠失を起こすような染色体再編のホットスポットが第III染色体上に存在する可能性が考えられた。実際に、-80 kbの異常染色体13例のうち、11例では全く同じところで染色体再編が起こっていた（図14および表5、後述）。

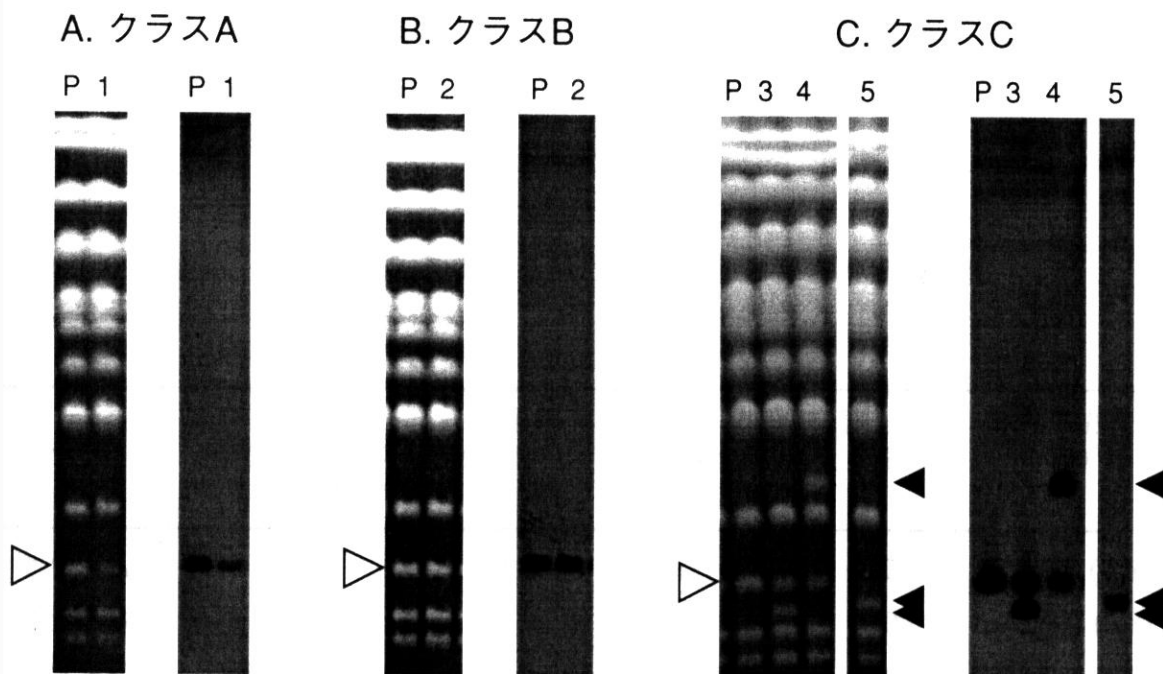


図7 第III染色体のコピー数及びサイズ変化によるクラス分類

二倍体出芽酵母RD101由来の640例の5-FOA⁺細胞の第III染色体を直接観察した結果、細胞は大きく3つ（クラスA-C）に分類された。それぞれのパネルの左側はパルスフィールド電気泳動後、エチジウムブロマイド染色によって可視化した全染色体の泳動像である。右側には、第III染色体の左腕上2箇所（III-54およびIII-102、図2）のプロープを用いたサザンブロッティングにより検出した第III染色体を示す。III-54プロープに関してはプライマーd3W54およびd3C54（表2）、III-102プロープに関してはプライマーd3W102およびd3C102（表2）を用いたPCRにより作製した。図中の白三角は第III染色体、黒三角は第III染色体由来のサイズ異常染色体の泳動位置を表している。親株RD101の泳動像をそれぞれのクラスの左側に示した（レーンP）。

A) 第III染色体のコピー数が2から1に変化していた376クローンに関しては、クラスAに分類した。クラスA細胞の1例をレーン1に示す。

B) 213例では、この2種類の解析では染色体変化が観察されなかった（クラスB、レーン2）。

C) クラスCに分類された51クローンの最も大きな特徴は、染色体レベルでのサイズ変化を起こした異常第III染色体が検出されたことである。異常染色体の大きさに関しては、元の第III染色体と比べて短くなったもの（1例をレーン3に示す）だけでなく、長くなったもの（1例をレーン4に示す）まで、様々なものが見つかった（表4）。また、レーン5に示すように、正常な大きさの第III染色体が観察されず、異常第III染色体のみを1コピー持つ細胞も3例見つかった。

表3 5-FOA⁺細胞のクラス分類および各クラスの出現頻度

クラス	正常な 第III染色体の コピー数	異常第III 染色体の コピー数	観察数 ¹⁾ (クローン)	割合 ²⁾ (%)	出現頻度 ³⁾ ×10 ⁻⁵
クラスA	1	0	376	62	13±9.8 (8.5)
クラスB	2	0	213	30	6.7±3.7 (6.8)
クラスC	1あるいは0	1	51	8.0	1.1±1.1 (0.71)
合計			640	100	20±13 (16)

1) 12の独立した実験区由来。1実験区あたり、16から96クローンの5-FOA⁺細胞を解析した。細胞の分裂世代数が異なるものも含む（図8を参照）。

2) 標準サイズのコロニーを形成する5-FOA⁺細胞と、小サイズのコロニー（48時間培養後のコロニーの直径が1 mm未満のもの）を形成する5-FOA⁺細胞に分けてクラス分類を行い、最後に5-FOA寒天培地上における標準サイズおよび小サイズのコロニーの割合で補正して各クラスの割合を算出した。従って、ここでの割合は単純に各クラスの観察数を総数で割った値とは必ずしも一致しない。細胞の分裂世代数が異なるものも含む（図8を参照）。

3) 体細胞分裂の対数増殖期における5-FOA⁺細胞の出現頻度の平均値および標準誤差を表記する。括弧内の数値は中央値を示す。合計の5-FOA⁺細胞の出現頻度は23の独立した実験区（1 mlあたりの生菌数の実測値は $5.6 (\pm 1.3) \times 10^7$ ）を用いて測定した値である。各クラスの出現頻度に関しては、1実験区あたりの解析数の多い（32から48クローン）6つの独立した実験区（1 mlあたりの生菌数の実測値は $6.5 (\pm 1.2) \times 10^7$ ）由来の224クローンの解析結果から算出した。

表4 異常第III染色体の大きさの分布

変化した 大きさ ¹⁾ (kb)	検出数 ²⁾	
-110	1	(1)
-105	2	(1)
-100	1	(1)
-80	13	(9)
-60	7	(2)
-55	3	(2)
-50	5	(4)
-40	2	(2)
-30	4 ³⁾	(4)
-25	1	(1)
-10	1 ⁴⁾	(1)
+110	1	(1)
+145	1	(1)
+210	1	(1)
+250	1	(1)
+340	2	(2)
+380	2	(2)
+620	1	(1)
合計	51	(9)

1) PFGEで測定された異常第III染色体の大きさを、正常な第III染色体を330 kbとしたときの差で表す。330 kb付近のPFGEでの検出感度は±10 kb程度であった。

2) 9つの独立した実験区から単離された異常第III染色体の検出数。括弧内の数字は、同じ実験区由来の異常染色体を1と見なした場合の数値である。

3) 4クローン中2クローンに関しては、正常な大きさの第III染色体が観察されなかった。

4) この1クローンに関しては、正常な大きさの第III染色体が観察されなかった。

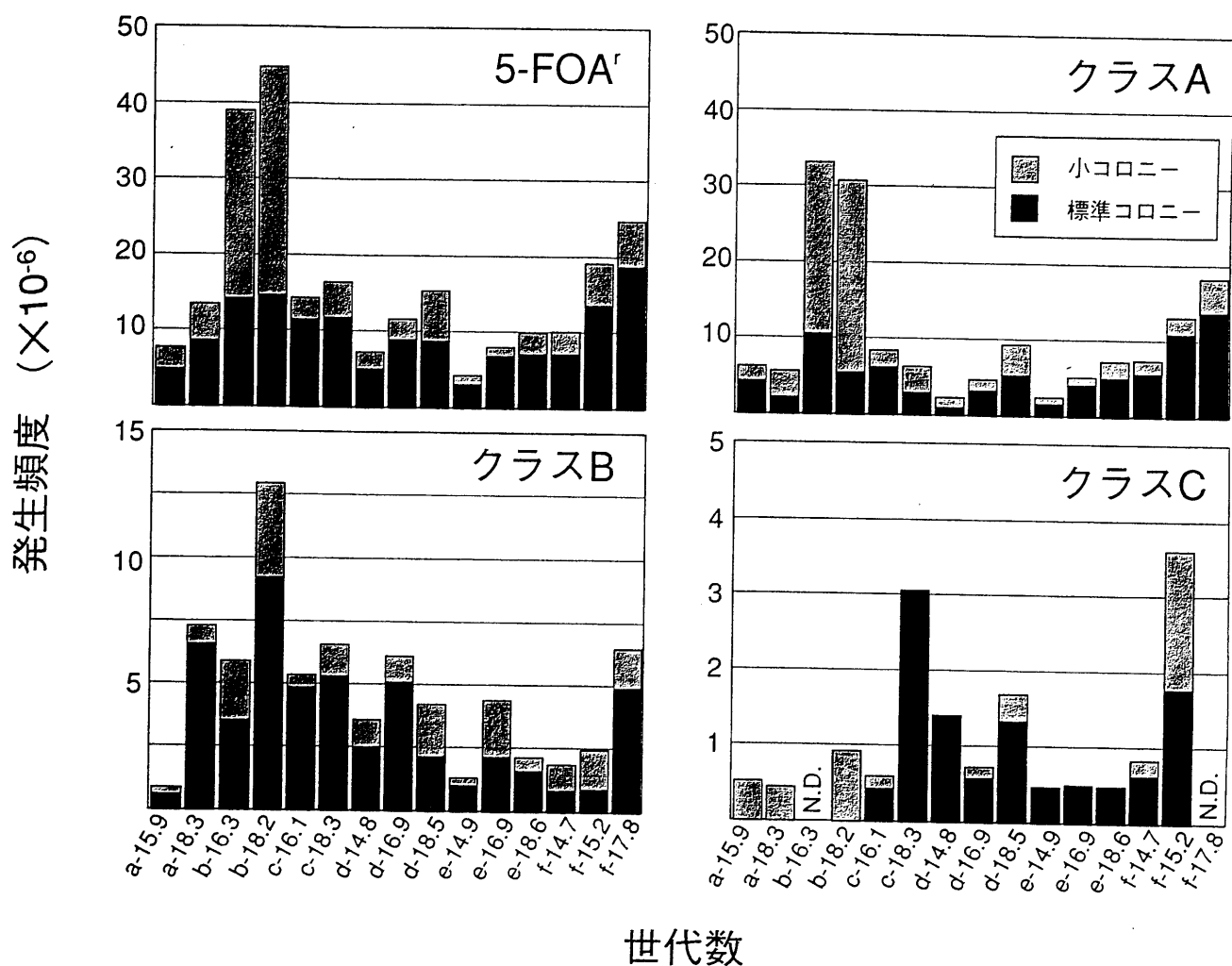


図8 RD101由来の5-FOA⁺細胞のクラス分布

6つの独立した実験区から、対数増殖期における5-FOA⁺細胞の出現頻度を測定した。グラフの横軸のアルファベット (a-f) はそれぞれの実験区を、数字は10³細胞からの世代数を表している。1回の実験につき、32から48個の5-FOA⁺細胞の第III染色体をパルスフィールドゲル電気泳動法及びサザンブロッティングにより直接観察し、クラスA-Cに分類した (図7を参照)。はじめに測定した5-FOA⁺細胞の出現頻度および各クラスの割合から、それぞれのクラスの発生頻度を算出した。この際、標準サイズのコロニーを形成する5-FOA⁺細胞 (黒) と、小サイズのコロニー (48時間培養後のコロニーの直径が1 mm未満、灰色) を形成する5-FOA⁺細胞の割合も同時に調査した。

以上は第III染色体のみに着目して分類した結果であるが、第III染色体と他の染色体での複数変化を持つ細胞もいくつか単離された。クラスAの376クローンのうち、第I染色体も1コピーになっていた細胞が3例、第VI染色体も1コピーになっていた細胞が1例、短くなった1コピーの第VI染色体を持つものが1例見つかった（データは示さない）。また、クラスCに分類された51クローンのうち、1例（RD101-24）では他の複数の染色体が異数化していた（データは示さない）。

次に、各クラスと形成されるコロニーの大きさの相関について述べる。6実験区由来の544クローンのPFGEでの分類結果のまとめを図8に示す。クラスAでは40%、クラスBでは29%、クラスCでは34%の細胞が小さいコロニーを形成していた。これらの割合は、5-FOA⁺細胞全体に占める小コロニーの割合（31（±13）%、n=21）とほぼ一致した。また、分裂世代数が変わってもクラス分類の割合に大きな差は見受けられなかった。以上の結果より、クラスA-Cにおける遺伝的変化の種類と形成されるコロニーの大きさに特に相関性はなく、小コロニーの形成はRD101由来の5-FOA⁺細胞に普遍的に見つかる現象であることが示された。

一般に、突然変異頻度をもとに、一回の細胞分裂あたりに突然変異が起こる確率（突然変異率）が算出される（Lea and Coulson, 1948；Drake, 1991）。この計算の前提の一つに、液体培地での細胞培養中において、変異体は親株と同様に分裂するというものがある。したがって、本研究で観察されたように5-FOA⁺細胞の一部の倍加時間が長くなる場合、突然変異頻度をもとにして算出した突然変異率は過小評価であることになる。故に、本研究では5-FOA⁺細胞の出現頻度のみを明記することにした。

1-5. クラスA；染色体喪失によるLOH

クラスAに分類された5-FOA⁺クローンの特徴は、第III染色体のコピー数が2から1に変化していたことである（図7-A）。このクラスのもっとも単純な説明は、*URA3*遺伝子を挿入した方の染色体（YMH1由来）の喪失である。この可能性を追求するために、第III染色体上に内在するもう一つのヘテロマーカである*MAT*遺伝子座を解析することにした。YMH1由来のIII-205領域の5 kbセントロメア側には*MATa*遺伝子、もう一方の第III染色体の相同部位には*MATα*遺伝子が存在している（図9-A）。コロニーPCR法（Huxley et. al, 1990）を用いてこの*MAT*遺伝子座を同定したところ（図9-B）、クラスAの376例全てについて*MATα*特異的なPCR産物のみが検出された。以上の結果より、クラスAの5-FOA⁺細胞は、*URA3*遺伝子および*MATa*遺伝子が

図9 コロニーPCR法によるMAT遺伝子座の同定

A) 第III染色体の模式図。第III染色体の配列を横線、セントロメアを白丸、MAT遺伝子座を白四角、URA3遺伝子を白三角、プライマーを矢印で示す。プライマーの配列および正確な結合位置に関しては、表2-Cを参照のこと。セントロメア-MAT遺伝子、MAT遺伝子-URA3遺伝子の物理的距離は、それぞれ86 kb、5 kbである。このPCRでは、図中に示した3種類のプライマーを同時に加えてPCR反応を行うことにより、MAT α 細胞を鋳型とした場合には544 bp、MAT α 細胞を鋳型とした場合には404 bpのPCR産物が得られる。

B) モデル細胞を用いた予備実験。Mは100 bpラダーサイズマーカー、a、 α 、a/ α はそれぞれYMH1 (MATa)、FY838 (MAT α)、RD101 (MATa/MAT α)を鋳型とした場合のPCR産物の電気泳動像を示す。MATa及びMAT α 由来のPCR産物の泳動位置を矢印で表した。して検証した。親株では1.9 kbのPCR産物zが得られ、8回予備実験を行った結果、y/xの実測値の平均は 0.43 ± 0.036 (理論値0.5) であった。クラスIの染色体欠失を持つクローンを鋳型とした場合には、1.9 kbのPCR産物zは見られず、11回予備実験を行った結果、y/xの実測値の平均は 0.47 ± 0.032 (理論値0.5) であった。また、鋳型として第III染色体にURA3遺伝子を持たない二倍体酵母を用いた場合に

存在していたYMH1由来の染色体喪失によってLOHに到ったと結論した。

1-6. クラスB；相同染色体間組換えによるLOH

クラスBの213クローンはPFGE解析において親株と全く同じ電気泳動パターンを示し、染色体レベルでのサイズ変化もコピー数変化も観察されなかった（図7-B）。これらの細胞における遺伝的变化としては、1) 点突然変異、2) PFGEの検出限界（10 kb）以下の小さな欠失あるいは重複、3) トランスポゾンの挿入、4) セントロメアとマーカー遺伝子の間における相同染色分体間の交叉、5) 遺伝子変換、6) *URA3*遺伝子のみの切り出し、7) 染色体喪失後の重複（chromosome loss and reduplication）、等の可能性が考えられた。これらの遺伝的变化については、*URA3*挿入領域がヘテロ接合性のままのもの（点突然変異、挿入、重複など）、ヘミ接合性に変化するもの（欠失など）、ホモ接合性になるもの（交叉、遺伝子変換、*URA3*のみの切り出し、染色体喪失後の重複など）の3つに分類することも可能である。そこで、さらに遺伝的变化の種類を特定するために、*URA3*挿入領域付近を定量的にPCRで増幅し、その微細な構造の違いを解析することにした。定量的PCR法による分類の基本構想は以下の通りである。第III染色体の左腕に設計したプライマー（得られるPCR産物を電気泳動したものをバンドx（398 bp）とする）と*URA3*遺伝子を挟む形に設計したプライマー（PCR産物のうち*URA3*遺伝子を持たない第III染色体由来のものをバンドy（680 bp）、*URA3*遺伝子を持つ第III染色体由来のものをバンドz（1853 bp）とする）を共存させてPCRを行う（図10-A）。この方法では、鑄型としてヘテロ接合体、ヘミ接合体、ホモ接合体を用いた場合のPCR産物の分子比は、それぞれ $x:y:z = 2:1:1$ 、 $2:1:0$ 、 $2:2:0$ になり、遺伝的变化の違いを識別することが可能であろうと予想した。

そこでまずはこれらの分子比を見分けることができるかを確かめるために、モデル実験を行った（図10-B レーン7-9）。親株（RD101）、本研究で同定されたクラスIの染色体欠失を持つクローン（図14および表5、後述）、第III染色体に*URA3*遺伝子を持たない二倍体酵母（RD102）をそれぞれヘテロ接合体、ヘミ接合体、ホモ接合体のモデルとして検証した。親株では1.9 kbのPCR産物zが得られ、8回予備実験を行った結果、y/xの実測値の平均は 0.43 ± 0.036 （理論値0.5）であった。クラスIの染色体欠失を持つクローンを鑄型とした場合には、1.9 kbのPCR産物zは見られず、11回予備実験を行った結果、y/xの実測値の平均は 0.47 ± 0.032 （理論値0.5）であった。また、鑄型として第III染色体に*URA3*遺伝子を持たない二倍体酵母を用いた場合に

は、1.9 kbのPCR産物zは観察されず、8回予備実験を行った結果、y/xの実測値の平均は 0.80 ± 0.11 (理論値1)であった。以上の結果より、1.9 kbのPCR産物zの有無とy/xの実測値からこれら3種類のクローンが示された。

上記の予備実験をもとに、PFOBでは染色体レベルでのサイズ変化もコピー数変化も見られなかったクラスBのクローンが示された(図10-B)。この結果より、クラスBの全てのクローンでは、URA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わってホモ接合性になっていることが示された。

先に述べたとおり、クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

クラスBの細胞では、第III染色体上のURA3遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わっていることが示された。

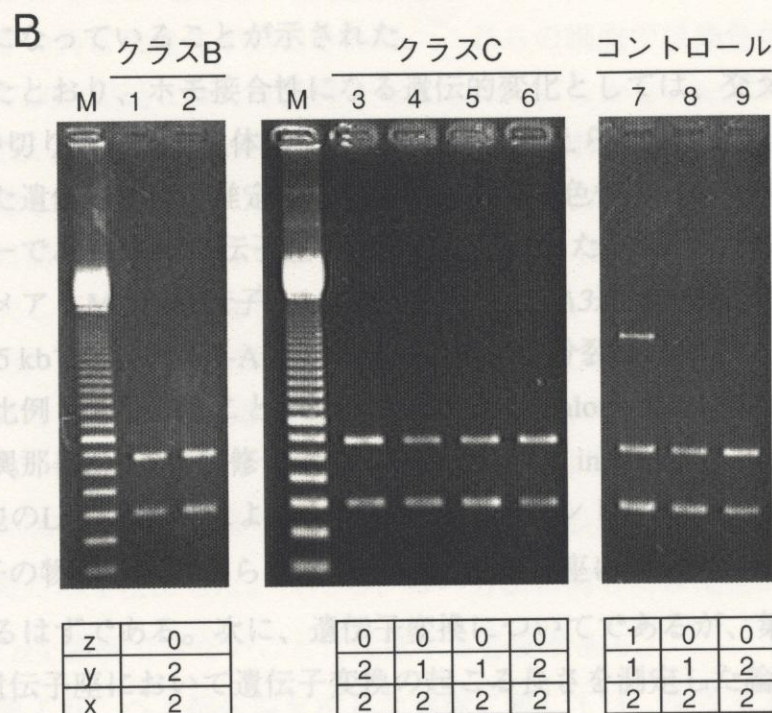
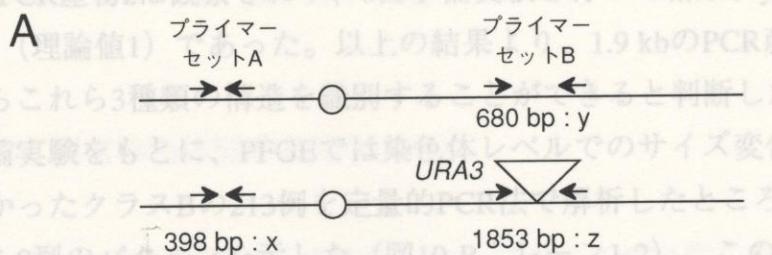


図10 定量的PCR法によるIII-205領域の構造解析

A) 親株RD101の第III染色体の模式図。第III染色体の配列を横線、セントロメアを白丸、URA3遺伝子を白三角で示す。プライマーの大まかな結合位置及びその方向に関しては、矢印で示した。プライマーセットA (d3W102およびd3C102、表2-C) は、左腕上のIII-102領域に結合するプライマーであり、PCR反応により398 bpのDNA断片 (x) が増幅される。プライマーセットB (d3W205およびd3C205、表2-C) はIII-205領域に結合するプライマーで、URA3遺伝子を持たない第III染色体から680 bp (y)、URA3遺伝子を挿入した第III染色体から1853 bp (z) のPCR産物が得られる。この定量的PCR法では、上記の4つのプライマーを1つの反応溶液中で競合させてPCR反応を行うことにより、目的とするIII-205領域の構造を定量的に解析する。

B) PCR産物の電気泳動像。定量的PCR後、反応産物の一部を電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色によりDNA断片を可視化した。クラスBクローン (レーン1-2)、クラスCクローン (レーン3-6) を用いた場合の代表例を示す。レーン7-9は、モデル細胞を用いた定量的PCRのコントロール実験の結果である。ヘテロ接合型、ヘミ接合型、ホモ接合型のモデル細胞には、それぞれ親株RD101、RD101-3 (MAT-HMR間の染色体欠失を持つ細胞、後述)、RD102 (URA3遺伝子をIII-205領域に持たない一倍体同士を接合させた二倍体酵母) を使用した。DNA断片x、yおよびzの泳動位置を矢印で表示した。定量的結果、推定されたDNA断片x、yおよびzの分子比に関しては、図の下部に記した。

は、1.9 kbのPCR産物 z は観察されず、8回予備実験を行った結果、 y/x の実測値の平均は 0.80 ± 0.11 （理論値1）であった。以上の結果より、1.9 kbのPCR産物 z の有無と y/x の実測値からこれら3種類の構造を識別することができると判断した。

上記の予備実験をもとに、PFGEでは染色体レベルでのサイズ変化もコピー数変化も見られなかったクラスBの213例を定量的PCR法で解析したところ、すべてのクローンは2:2:0型のパターンを示した（図10-B レーン1-2）。この結果より、クラスBの全てのクローンでは、*URA3*遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わってホモ接合性になっていることが示された。

先に述べたとおり、ホモ接合性になる遺伝的变化としては、交叉、遺伝子変換、*URA3*のみの切り出し、染色体喪失後の重複等が考えられる。さらにクラスBの細胞内で起こった遺伝的变化を推定するために、第III染色体上に内在するもう一つのヘテロマーカである*MAT*遺伝子座を調べることにした。SGDによると、第III染色体のセントロメアと*MATa*遺伝子、*MATa*遺伝子と*URA3*遺伝子の物理的距離は、それぞれ86 kb、5 kbである（図9-A）。一般に、体細胞分裂時においても、交叉は物理的距離にほぼ比例して起こることが知られている（Malone et al., 1980；渡辺, 1997年度修士論文；興那嶺, 1998年度修士論文；Hiraoka et al., in press）。したがって、もしクラスBの細胞のLOHが交叉によるものであれば、セントロメア、*MATa*遺伝子、*URA3*遺伝子の物理的距離から考えて、*MAT*遺伝子座に関しては α/α の方が a/α よりも多く見つかるはずである。次に、遺伝子変換についてであるが、第V染色体上に内在する*URA3*遺伝子座において遺伝子変換の起こる長さを測定した論文によると、*URA3*遺伝子を含む4-10 kbの領域が相同染色体上の配列に置き換わっていた（Judd and Petes, 1988）。したがって、*MAT*遺伝子座の解析では、クラスBの細胞のLOHが遺伝子変換に起因していたか否かを特定することは困難である。もし*URA3*遺伝子のみが切り出されたのであれば、細胞の*MAT*遺伝子座は変化していない（ a/α のまま）と考えられる。それに対し、染色体喪失後の重複の場合であれば、細胞の*MAT*遺伝子座は α/α になっていると推定される。

以上の予想のもと、クラスAの細胞の*MAT*遺伝子座を同定したときと同様に、コロニーPCR法を用いてクラスBの213例全ての細胞の*MAT*遺伝子座を解析した。その結果、82%（174/213）の細胞では*MATa*由来のPCR産物のみが観察され、残りの18%（39/213）の細胞では*MATa*と*MATa*由来のPCR産物が得られた。このことは、染色体レベルでのサイズ変化もコピー数変化も見られなかったクラスBの細胞は交叉によってホモ接合体になったという可能性を示唆している。あるいは、クラスBの細胞のLOHの原因は1つではなく、複数あるのかもしれない。この点については、他の

研究結果とも比較しながら、後に考察の項で述べる。

1-7. クラスC；異常染色体形成を伴うLOH

クラスCの最も大きな特徴は、染色体レベルでサイズが変化した異常第III染色体が観察されたことである（図7-C）。表4に示すように、本研究では第III染色体由来の様々な大きさの異常染色体が検出された。これらの細胞では染色体欠失、重複、転座等によってLOHが起こった可能性が考えられた。しかし、いずれの場合においても、*URA3*遺伝子が不活化していることから、*URA3*挿入領域は欠失しているのではないかと予想した。そこでクラスCの51例のうち、45例を定量的PCR法で解析したところ、38例に関しては2：1：0型のパターンを示し（図10-B）、少なくとも*URA3*挿入領域は欠失していると結論した。興味深いことに、4例は2：2：0型のパターンを示し（図10-B）、*URA3*挿入領域はホモ接合型に変化していた。また、正常な大きさの第III染色体を持たず、10-30 kb短い異常第III染色体のみが確認された3例も、2：2：0型（1：1：0型）のパターンを示した（データは示さない）。さらに、上記の45例のクラスCの*MAT*遺伝子座もPCR法を用いて解析したところ、45検体全て*MAT* α 由来のPCR産物のみを検出した。ただし、この方法に関しては定量的に行っていないため、 α/α と α を識別できないことに注意する必要がある。

以上の結果より、ヘミ接合型を示した38例に関しては、少なくとも*MATa-URA3*遺伝子を含む領域が欠失していることが示唆された。興味深いことに、もとの染色体より長くなった異常染色体を持つ細胞は全てこの特徴を有していた。これらの異常染色体のもっとも単純な説明は転座である。DNA複製後に第III染色体のセントロメアと*MATa*遺伝子の間で他の染色分体との組換えが起これば、その後の染色体分離によって*URA3*遺伝子を持たない細胞が1/4の確率で出現する（図24を参照）。組換わる相手の染色体とその位置により、様々な大きさの異常染色体が形成されることが予想される。一方、ホモ接合型を示した4例、および異常第III染色体のみが観察された3例については、セントロメアと*MATa*遺伝子の間における第III染色分体間の不等交叉によって説明が可能である（図24を参照）。第III染色分体と他の染色分体が組換わったものが転座であり、第III染色分体同士がずれて組換わったものが不等交叉である。異常第III染色体のみが観察されたものに関しては、組換えに関与したもう片方の染色体が修復されず、染色体喪失に繋がったのかもしれない（図24の右下端の細胞を参照）。

2. 異常染色体における染色体再編領域の同定

染色体レベルでの遺伝的変化の発生機序に迫るためには、切断点近傍での塩基配列の特徴等、染色体側の構造的要因を明らかにすることも重要であると考えられる。しかしながら、喪失した染色体を解析することは不可能である。また、本研究で材料とした出芽酵母は純系であるため、第III染色体では*URA3*および*MAT*遺伝子がヘテロであることを除けば、ほぼ同じ塩基配列を持っていると考えられる。したがって、相同染色体間組換えの染色体再編部位を決定することは困難である。そこで、検出された異常染色体の切断点を塩基配列レベルで解析することにした。

2-1. 第III染色体の欠失・増幅領域同定法（Genome scanning）の改良

当研究室では、Genome scanningと呼ばれる第III染色体上の欠失・増幅領域を同定できる系がすでに確立されている（図11、森, 1997年度修士論文）。この方法では、第III染色体に特異的な多数の領域のコピー数を決定することにより、異常染色体が第III染色体のどの領域までを保持しているかを推定する。親株では全ての領域が理論上2コピー分検出されるが、欠失領域内にあるマーカーのコピー数は親株の半分量になると考えられるため、異常染色体上の欠失領域が判る。コピー数を決定するためには、部位特異的な定量的PCRを利用する。染色体上の欠失領域を網羅的に検出するためには多数のマーカーが必要となるが、2種類の蛍光プライマーおよび半自動的蛍光検出システム（GENESCANTMおよびGenotyperTM）を用いることにより、多数のサンプルを同時に効率よく解析することが可能である。本研究では、系のさらなる効率化のために、森（1997年度修士論文）が設計したプライマーセットのうち、第III染色体の左腕上の1箇所、および右腕上の約10 kbごとの21箇所に設計したものをを用いて（図3-Aおよび表2-F）、第III染色体上の欠失・増幅領域を同定することにした。なお、第III染色体上にあるマーカーのコピー数を調べるための対照として、第VI染色体上にも蛍光色素に応じた2箇所のマーカー領域が選定されている。

第III染色体上の*URA3*遺伝子挿入部位を解析するための定量的PCR（図10）では、2箇所のプライマーセットを単一反応液内で競合させて増幅させることにより、目的部位のコピー数を測定した。一方、Genome scanningでは、1種類のプライマーセット

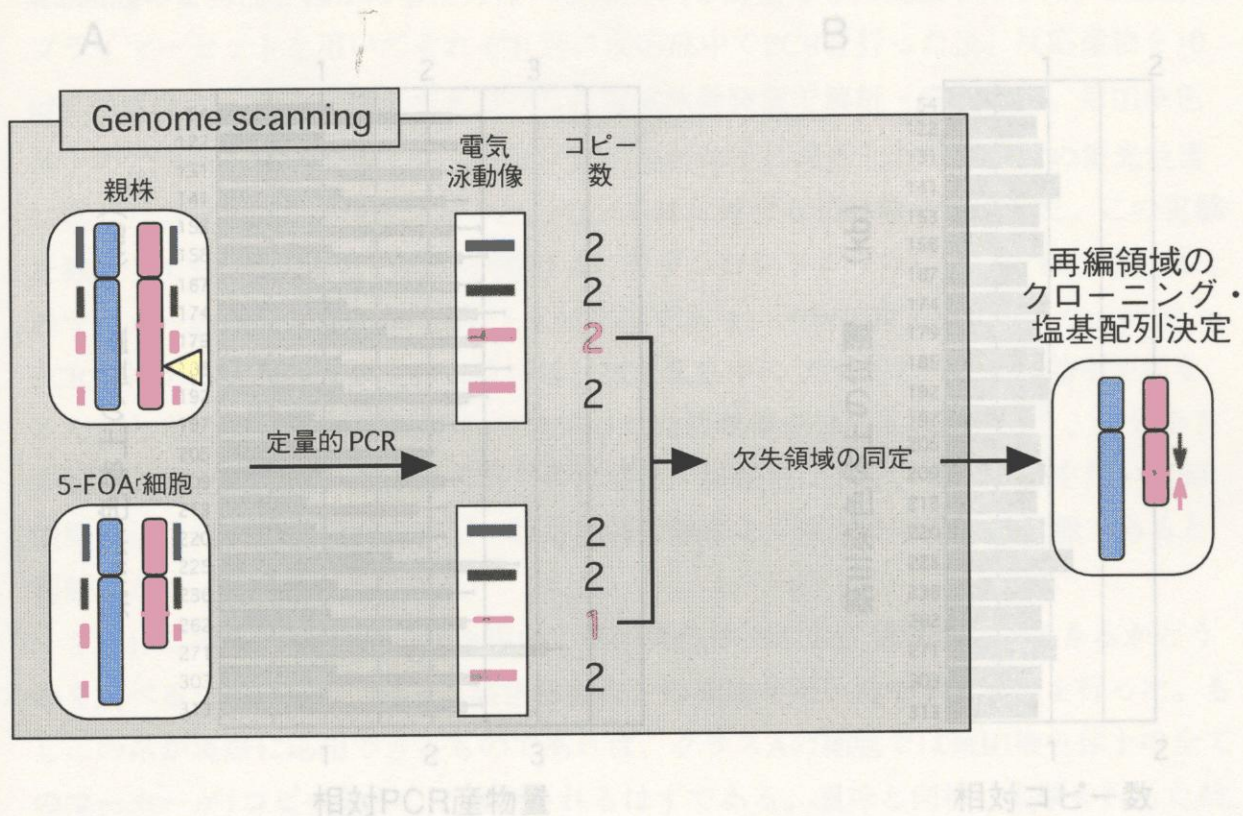


図11 異常染色体の再編領域の構造解析法

まず最初に、異常染色体が第III染色体上のどこまでの領域を保持しているのかを確認するために、Genome scanningを行う。Genome scanningでは、第III染色体の22箇所（左腕の中央付近に1箇所、右腕については約10 kbごとに21箇所）の領域のコピー数を決定することにより、第III染色体上の欠失・増幅領域が同定される（森, 1997年度修士論文）。この図では、模式的に4箇所のマーカー領域のみを示す。コピー数を決定するためには、部位特異的な蛍光プライマーを用いた定量的PCRを利用する。欠失した領域内のPCR産物は1コピー分に減少するため、各領域のPCR産物量を親株と5-FOA^r細胞とで比較することにより、第III染色体上の欠失領域が推定される。さらに、同定された欠失領域の上流側と下流側にあるプライマーを用いて異常染色体の再編領域をクローニングし、その塩基配列を決定する。

B) 第III染色体上の欠失領域を同定するためには、各マーカー領域ごとに、5-FOA^r細胞の相対PCR産物量を親株のそれと除算した。親株の相対PCR産物量を2とした場合のクラスA細胞の相対コピー数をグラフに示す。

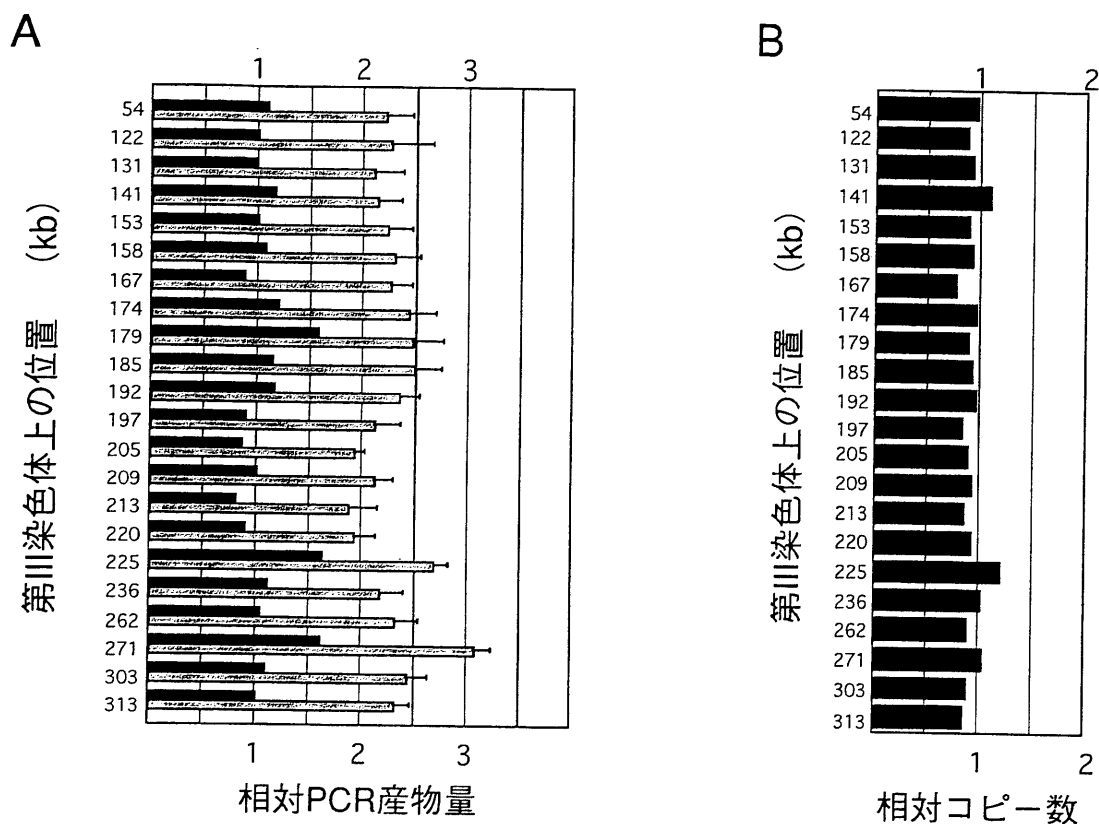


図12 Genome scanningの再現性および信頼性の検討

A) 第III染色体上に設計したマーカー領域のコピー数を決定するために、それぞれの領域のPCR産物量を、第VI染色体上のコントロール領域のPCR産物量で除した。コントロール領域のPCR産物量を2とした場合の各マーカー領域の相対PCR産物量をグラフに示す。親株二倍体RD101を鋳型として5回実験を繰り返した結果の平均値を灰色の棒線で、標準誤差を細い線で表示した。黒い棒線は、片方の第III染色体を喪失したクラスA細胞を鋳型として得られた相対PCR産物量を表している。

B) 第III染色体上の欠失領域を同定するためには、各マーカー領域ごとに、5-FOA'細胞の相対PCR産物量を親株のそれで除算した。親株の相対PCR産物量を2とした場合のクラスA細胞の相対コピー数をグラフに示す。

につき1つの反応液でPCR反応を行い、得られたPCR産物を等量ずつ混合し、1サンプルにつき1レーンで電気泳動することによって多数のサンプルを効率よく、半自動的に解析している。この場合問題となるのは、加える鋳型DNA量等のPCR反応液の均一性、PCR産物を混合する際の信頼性・再現性等である。そこで、改良型Genome scanningの妥当性を確かめるために、親株DNAを鋳型とした実験を行った。24種類のプライマーセットを用いてそれぞれ別の反応液中でPCRを行った後、反応産物を10 μ lずつ混合し、その一部をキャピラリー電気泳動装置で解析・定量した。第III染色体上の22箇所のPCR産物に関しては、第VI染色体上に設計したそれぞれの蛍光色素に応じたコントロールを2コピーとして、それに対する相対値を算出した。この実験を独立して5回繰り返した結果を図12-Aに示す。コントロールに対する第III染色体上のマーカーのPCR産物比は1.88から3.08の間であり、平均値は2.29であった。相対PCR産物比にばらつきが見られるのは、PCR反応中のプライマーの増幅効率が異なるためと考えられる。5回の実験で測定された標準偏差は10%前後であり、十分小さかった。以上の結果より、この系での再現性・信頼性は高く、この方法を用いて第III染色体上の多数の領域のコピー数を同時に効率よく決定することは可能であると判断した。

さらにこのGenome scanningを用いて第III染色体上の欠失領域が同定できるかどうかを調べるために、クラスA（染色体喪失）の細胞を用いたモデル実験を行った。もしこの系が実際に応用できるものであれば、クラスAの細胞では第III染色体上の全てのマーカーが1コピー分として検出されるはずである。親株と同様に実験を行った結果、染色体喪失株での第III染色体上のマーカーのPCR産物比は0.808から1.62の間であり、平均値は1.10であった（図12-A）。図12-Bに示すとおり、それぞれのマーカー領域ごとに、親株に対する染色体喪失株の相対コピー数を計算すると、全て親株の半分量（0.78コピーから1.2コピーの間、平均は0.94コピー）になっていた。以上の結果より、設計した全てのマーカー位置に関して1コピー分と2コピー分の違いは検出可能であり、この系を用いて第III染色体上の欠失領域が同定できると結論した。

2-2. 異常染色体の構造解析とクラス分類

異常染色体が第III染色体由来の領域をどこまで持っているかを同定するために、片方の第III染色体にのみURA3マーカーを挿入した二倍体株（RD101）から単離された45例の異常染色体を持つクラスCの細胞をGenome scanningで解析した。Genome scanningの結果と、マーカー挿入部位の構造解析のために行った定量的PCRの結果を

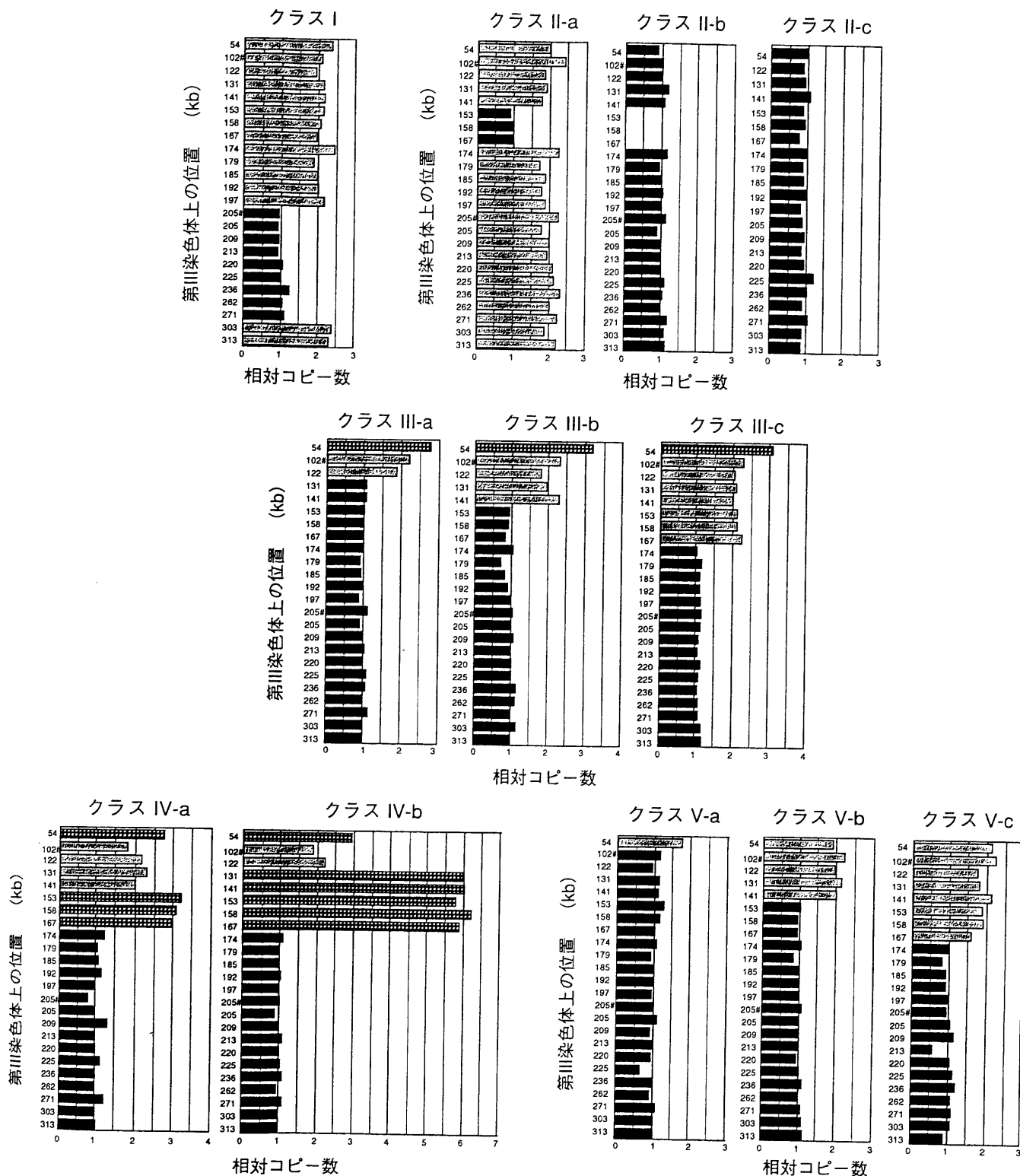


図13 異常染色体の欠失・増幅領域の同定とクラス分類

異常染色体が第III染色体由来の部分をどこまで保持しているのかを調べるために、45例のクラスC細胞を定量的PCR法（図10を参照）およびGenome scanning（図11を参照）を用いて解析した。この2種類の解析により、細胞は大きく5つ（クラスI-V）に分類された。さらに、コピー数が変化する境界領域に基づき、クラスII-Vの異常染色体はa-cの亜型に分けられた。それぞれのクラスの代表的な結果を1例ずつ示す。各クラスの詳細については本文を参照のこと。相対コピー数が1コピーに変化していた領域を黒色で、2コピーのままであった領域を灰色で、3コピー以上に変わった領域を格子柄で表した。#を付けたマーカー領域（102#および205#）のデータは、定量的PCRによるものである。この場合、PFGEで測定した第III染色体のコピー数をIII-102#領域のコピー数と見なした。III-205#領域のコピー数に関しては、III-102#領域に対する相対比より算出した。

表5 異常染色体の解析結果のまとめ

Genome scanning による分類	サイズ変化 ¹⁾ (kb)	単離体の名前 ²⁾	再編に 関与した 因子 ³⁾	相同配列の 長さ (kb)	相同性 (%)
クラスI	-80 (-94)	RD101-3	<i>MAT, HMR</i>	1.6	99.8
クラスI	-80 (-94)	RD101-7	<i>MAT, HMR</i>	1.6	99.8
クラスI	-80 (-94)	RD101-18, 19, 21	<i>MAT, HMR</i>	1.6	99.8
クラスI	-80 (-94)	RD101-29	<i>MAT, HMR</i>	1.6	99.8
クラスI	-80 (-94)	RD101-48	<i>MAT, HMR</i>	1.6	99.8
クラスI	-80 (-94)	RD101-50, 51, 52, 55	<i>MAT, HMR</i>	1.6	99.8
クラスII-a	-40 (-35)	RD101-1	Ty1-2, Ty1-5	5.9	96.6
クラスII-a	-40 (-35)	RD101-5	Ty1-2, Ty1-5	5.9	96.6
クラスII-b	-30 (-29)	RD101-13 ⁴⁾	Ty1-3, Ty1-5	5.9	96.6
クラスII-a	-30 (-29)	RD101-17	Ty1-3, Ty1-5	5.9	96.6
クラスII-a	-30 (-29)	RD101-27	Ty1-3, Ty1-5	5.9	96.6
クラスII-b	-30 (-29)	RD101-46 ⁴⁾	Ty1-3, Ty1-5	5.9	96.6
クラスII-c	-10 (-5.3)	RD101-15 ⁴⁾	Ty1-2, Ty1-3	5.9	96.0
クラスIII-a	-105 (-130)	RD101-41	delta6, Ty1-1	0.33	90.0
クラスIII-a	-105	RD101-42	N.D.	N.D.	N.D.
クラスIII-b	-100 (-111)	RD101-49	delta7, Ty1-1	0.29	86.4
クラスIII-c	-60 (-72)	RD101-9	Ty1-4, Ty1-1	5.9	97.4
クラスIII-c	-60 (-72)	RD101-14	Ty1-4, Ty1-1	5.9	97.4
クラスIII-c	-60 (-72)	RD101-37, 44	Ty1-4, Ty1-1	5.9	97.4
クラスIII-c	-60 (-72)	RD101-43, 45	Ty1-4, Ty1-1	5.9	97.4
クラスIII-c	-60 (-72)	RD101-47	Ty1-4, Ty1-1	5.9	97.4
クラスIV-a ⁵⁾	-55	RD101-23, 24	Ty1-3, Ty1-1	5.9	96.5
クラスIV-a ⁵⁾	-55	RD101-26	Ty1-3, Ty1-1	5.9	96.5
クラスIV-a ⁵⁾	-50 (b)	RD101-6	Ty1-3, Ty1-1	5.9	96.5
クラスIV-a ⁵⁾	-50 (a)	RD101-28	Ty1-2, Ty1-1	5.9	97.3
クラスIV-a ⁵⁾	-50 (a)	RD101-53, 54	Ty1-2, Ty1-1	5.9	97.3
クラスIV-b ⁵⁾	+145	RD101-2	Ty1-4, Ty1-1	5.9	97.4
クラスV-c	-110	RD101-22	N.D.	N.D.	N.D.
クラスV-b	-80	RD101-12	N.D.	N.D.	N.D.
クラスV-c	-80 (-90)	RD101-25	Ty1-4, Ty1-1(I)	5.9	96.8
クラスV-c	-25 (-17)	RD101-20	Ty1-4, Ty1-2(XVI)	5.9	98.1
クラスV-b	+110 (+85)	RD101-34	Ty1-3, Ty1-2(X)	5.9	98.4
クラスV-a	+210	RD101-11	N.D.	N.D.	N.D.
クラスV-b	+250 (+239)	RD101-33	Ty1-2, Ty1-3(XII)	5.9	99.6
クラスV-b	+380 (+366)	RD101-35	Ty1-2, Ty1-1(VII)	5.9	96.0
クラスV-b	+380 (+372)	RD101-56	Ty1-3, Ty1-1(VII)	5.9	97.5

N.Dは、異常染色体の再編部位が未だに特定されていないことを示す。

1) PFGEで測定された異常第III染色体の大きさを、正常な第III染色体を330 kbとしたときの差で表す。括弧内の数値は、PCRと塩基配列解析により決定された再編領域から予想される異常第III染色体の大きさを表している。

2) 同じ実験区由来かつ再編領域の塩基配列が全く同じであった単離体に関しては、1つの細胞が培養時に分裂した姉妹細胞である可能性が考えられるため、ここでは同じ列中に表記した。

3) 特に記載のないものは、第III染色体上に存在している因子である。第III染色体以外に局在していた配列に関しては、SGDの記述に従った因子名で表記し、その染色体番号を括弧内にローマ数字で記した。

4) 正常な大きさの第III染色体が観察されず、異常第III染色体のみが検出された。

5) クラスIV-a異常染色体については2箇所、クラスIV-b異常染色体については5-6箇所の再編領域があると予想されるが（図17-AおよびCを参照）、本研究ではそれぞれ1箇所の染色体再編領域しか同定されなかった。従って、再編領域から予想される異常第III染色体の大きさに関しては省略した。

-50 (a)および-50 (b)の染色体構造については、図17-Cに示した通りである。

併せて、図13に示す。第III染色体のコピー数のパターンより、異常染色体を5つのクラスに分類した（図13および表5）。それぞれのクラスの詳細については後に述べる。

2-2-1. 親株の第III染色体の構造解析

クラスIIからクラスVまでに共通する特徴として、コピー数が変化する境界領域はIII-54からIII-102、III-122からIII-131、III-141からIII-153、III-167からIII-174の4箇所の内のいずれかであったことが挙げられた（図13）。そこで、これらの領域に共通する構造について検討することにした。4箇所の内の3箇所は、LAHS、RAHS、FRAHSと呼ばれるTy因子の挿入のホットスポットの領域を含んでいた（図3）（Warmington et al., 1986 ; Warmington et al., 1987 ; Stucka et al., 1989 ; Newlon et al., 1991 ; Wicksteed et al., 1994）。このホットスポット領域では、いくつかの株間でTy因子やLTR配列の数に違いが見られるため、ゲノムプロジェクトでもこれらの領域の配列は公表されていない（Oliver et al., 1992）。残りの1箇所（III-122からIII-131の間）に関しては、2つのtRNAと1つのLTR配列が見つかった（図3）。Ty1とTy3はtRNAの5'側に転移する傾向があること（Chalker and Sandmeyer, 1990 ; Ji et al., 1993）、Ty因子間の組換えによる染色体異常が報告されていることより（Boeke, 1991）、境界領域に当たる4箇所にはTy因子が存在する可能性が考えられた。

4箇所の境界領域にTy因子が挿入されている可能性を検証するために、親株二倍体RD101を構築する際に用いた2つの一倍体、FY838およびYMH1の境界領域付近の染色体構造を解析した。1つ目の方法では、Ty因子を切らない制限酵素の1つであるEae Iで一倍体から抽出したDNAを消化し、電気泳動で分離した後、標的とする領域に特異的なプローブを用いてサザンブロッティングを行い、目的DNA断片の大きさを測定した。2つ目の方法では、適当なプライマーを用いて調べたい領域をPCRで増幅し、その塩基配列を決定した。

以上の実験の結果、本研究で用いた2つの一倍体株（FY838およびYMH1）では、第III染色体上に5つのTy1が存在していることが明らかになった（図3-B）。Ty1の存在様式はゲノムプロジェクトで用いられた株の1つであるAB972の構造とよく似ていた（Wicksteed et al., 1994）。塩基配列を決定した全領域に関して、FY838およびYMH1で違いは認められなかった。以下に、SGDで報告されている第III染色体の構造と異なる部分を列記する。新たに見つかったTy1に関しては、ゲノムプロジェクトの法則に従い、左腕から順にTy1-1、Ty1-2、Ty1-3、Ty1-4、Ty1-5と命名した。ま

ず、左腕上のIII-83領域に関しては、LAHSとして知られているが、tRNA^{Glu}とLTRの1種であるdelta1の間にTy1-1が右向きに挿入されていた（図3-B）。III-123にあるtRNA^{Pro}の付近ではTy因子は見つからなかった。III-141からIII-153の間（RAHS）では、いくつかの再編が見られた。1つ目は、tRNA^{Gly}のセントロメア側24 bpのところからdelta7の内部45 bpまで（SGDでは142398-142499 bpに相当する）、102 bpの領域が欠失していたことである。欠失した領域の両側には10 bpの繰り返し配列が見つかったことより、この欠失は繰り返し配列間の組換えあるいは複製中のスリッページによって生じたと考えられる。2つ目は、第III染色体の148321-151376 bpに相当する3 kbの領域が欠失し、その代わりに、間に1つのdeltaを共有する形で2つのTy1が右向きに存在していたことである（図3-B Ty1-2およびTy1-3）。これは、2つのTy因子が挿入した後に内側2つのLTRのホモロジーを利用してその間の領域が欠失したと考えられている（Warmington et al., 1987）。しかしながら、2つのTy1の間にあるdelta因子の配列がそれぞれの反対側のdelta因子とも欠失した領域内にあったdelta因子とも違う配列であったことは、この仮説と矛盾する。欠失が起こった後に点突然変異が蓄積して今のような配列になったとも考えられるが、これはTy因子間の組換えに切断点以外の第3のTy因子が関与した例かもしれない（後述）。III-168領域付近はFRAHSとして知られているが、ここにも1つのsigmaと呼ばれるTy3のLTRと2つのTy1が挿入されていた。tRNA^{Gln}の5'側すぐにsigmaが右向きに存在し、そのsigmaを二分する形で左向きにTy1-4が見つかった（図3-B）。また、そのすぐテロメア側に右向きのTy1-5も確認された（図3-B）。以上のような比較的大きな再編以外にも、塩基配列を決定した領域内では塩基配列レベルでの小さな違いがいくつか観察された（データは示さない）。

2-2-2. クラスI；*MAT-HMR*間の染色体欠失

クラスIの特徴は、PFGEで直接観察した異常第III染色体の大きさが元の染色体と比べて80 kb短くなっていたことと、Genome scanningの結果*URA3*マーカー挿入部位を含むIII-205からIII-271までの9箇所領域が1コピー分に見えたことである（図14-A）。このようなタイプの異常染色体は45例中最も多く、11例見つかった（表5）。

第III染色体の右腕上には*MAT*および*HMR*という1585 bpのよく似た配列が順方向に存在しており（図14-B）、過去にこの*MAT-HMR*間の欠失が報告されている

（Hawthorne, 1963）。Genome scanningで検出された境界領域に当たるIII-197からIII-205の間には*MATa*、III-271からIII-303の間には*HMRa*が局在していること、および

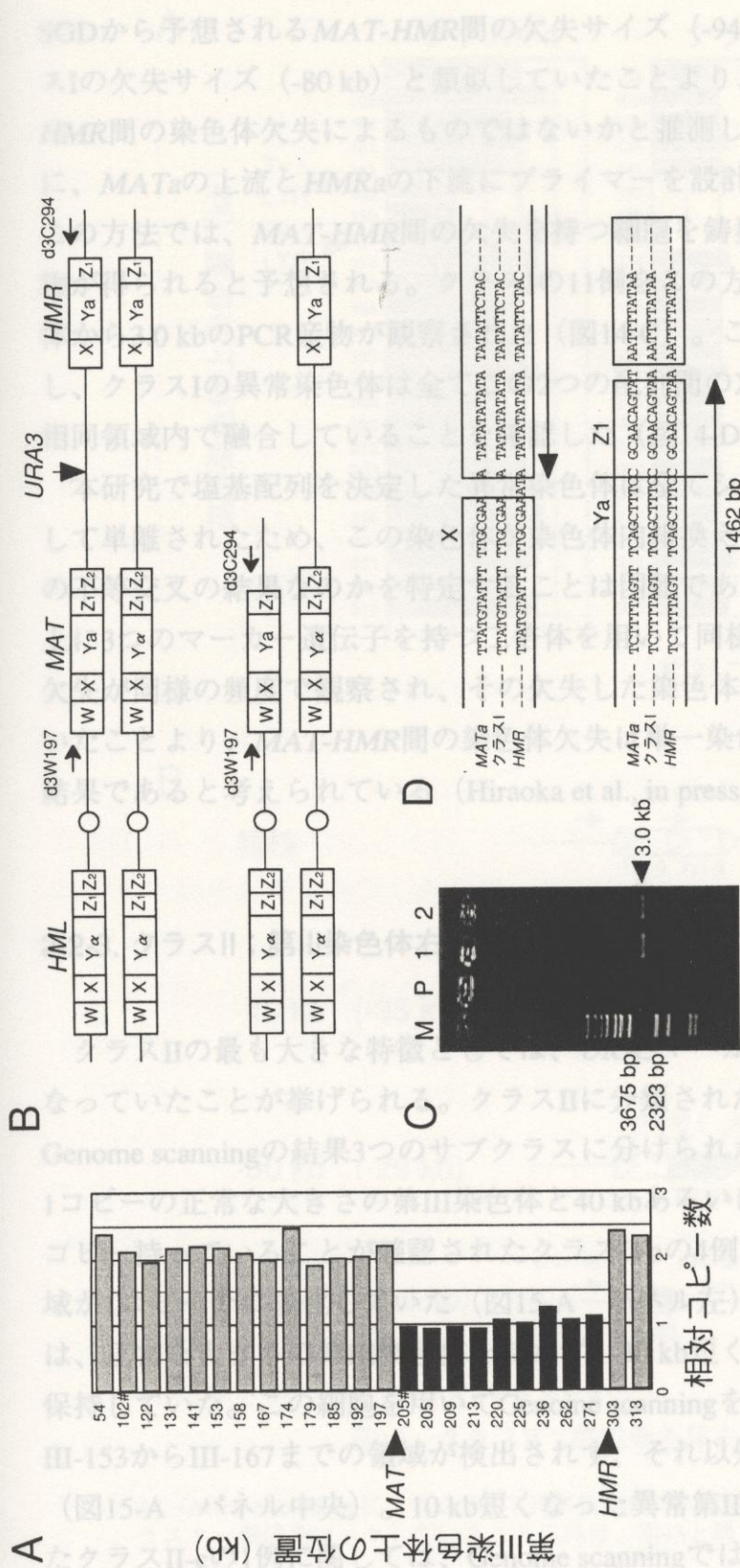


図14 クラスI: MAT-HMR間の染色体欠失

- A) Genome scanningによるクラスI異常染色体の欠失領域の同定。MATおよびHMR遺伝子座をマークしていること以外は、図13と同じ。
- B) 第三染色体上のHML、MATおよびHMR遺伝子座。第三染色体の配列を横線、セントロメアを白丸、接合型のカセット領域を四角形で表す。同じアルファベットで示した領域は、それぞれ相同な配列を持っている。上段に親株RD101の第三染色体の模式図、下段にMAT-HMR間の染色体欠失を持つ細胞の第三染色体の模式図を示す。URA3遺伝子が挿入されている方の染色体に関しては、下向き矢印で区別した。染色体再編領域をクロニングするために用いたプライマーセット (d3W197およびd3C294、表2-C) の大まかな結合位置を横矢印で表示した。親株ではこの2つのプライマーは97 kb離れているが、MAT-HMR間で欠失が起こると2959 bpのPCR産物が得られると予想される。
- C) MAT-HMR間の染色体欠失の検出。B) で示したプライマーセットを用いてPCR反応を行った。Mはλ-BsP Iサイズマーカーであり、P、1-2はそれぞれ親株RD101、クラスI細胞のうちの2例を鋳型とした場合のPCR産物を示している。クラスI細胞特異的に観察されたDNAの泳動位置を三角で明示した。
- D) クラスI異常染色体の再編領域の塩基配列。上段にMATa、中段にクラスIの再編領域、下段にHMRの塩基配列を示し、配列の上部には接合型のカセット領域名を記した。完全に相同な配列を持つ部分を四角で囲み、さらに組換えが起こったと考えられる領域を矢印でマークした。

SGDから予想される*MAT-HMR*間の欠失サイズ (-94 kb) がPFGEで測定されたクラスIの欠失サイズ (-80 kb) と類似していたことより、クラスIの異常染色体は*MAT-HMR*間の染色体欠失によるものではないかと推測した。この可能性を検証するために、*MATa*の上流と*HMRa*の下流にプライマーを設計し、PCRを行った(図14-B)。この方法では、*MAT-HMR*間の欠失を持つ細胞を鋳型とした場合に2959 bpのPCR産物が得られると予想される。クラスIの11例をこの方法で解析したところ、全ての検体から3.0 kbのPCR産物が観察された(図14-C)。このPCR産物の全塩基配列を決定し、クラスIの異常染色体は全てこの2つの配列間のX-Ya-Z1と呼ばれる1462 bpの完全相同領域内で融合していることを確認した(図14-D)。

本研究で塩基配列を決定した異常染色体は全てシングルマーカの喪失を指標として単離されたため、この染色体が染色体内組換えによるものか相同第III染色体間の不等交叉の結果なのかを特定することは困難である。しかし、片方の第III染色体上に3つのマーカ遺伝子を持つ二倍体を用いて同様の解析をした場合でも全く同じ欠失が同様の頻度で観察され、その欠失した染色体は他の2つのマーカを保持していたことより、*MAT-HMR*間の染色体欠失は単一染色体内で相同組換えが起こった結果であると考えられている(Hiraoka et al., in press)。

2-2-3. クラスII；第III染色体右腕間の不等交叉型

クラスIIの最も大きな特徴としては、*URA3*マーカの挿入部位がホモ接合性になっていたことが挙げられる。クラスIIに分類された異常染色体は7例であるが、Genome scanningの結果3つのサブクラスに分けられた(表5および図15-A)。PFGEで1コピーの正常な大きさの第III染色体と40 kbあるいは30 kb短くなった異常染色体を1コピー持っていることが確認されたクラスII-aの4例では、III-153からIII-167までの領域が1コピー分に変化していた(図15-A パネル左)。クラスII-bに分類された2例は、正常な大きさの第III染色体を持たず、30 kb短くなった異常第III染色体を1コピー保持していた。この細胞を用いてGenome scanningを行った場合、クラスII-aと同じIII-153からIII-167までの領域が検出されず、それ以外の領域は1コピー分観察された(図15-A パネル中央)。10 kb短くなった異常第III染色体のみを1コピー持っていたクラスII-cの1例に関しては、Genome scanningでは全ての領域が1コピー分として判定され、第III染色体上の欠失領域は検出されなかった(図15-A パネル右)。

次に、Genome scanningの結果をもとに、クラスIIに分類された異常染色体の再編領域のクローニングを試みた。クラスII-aおよびクラスII-bの細胞では、III-153から

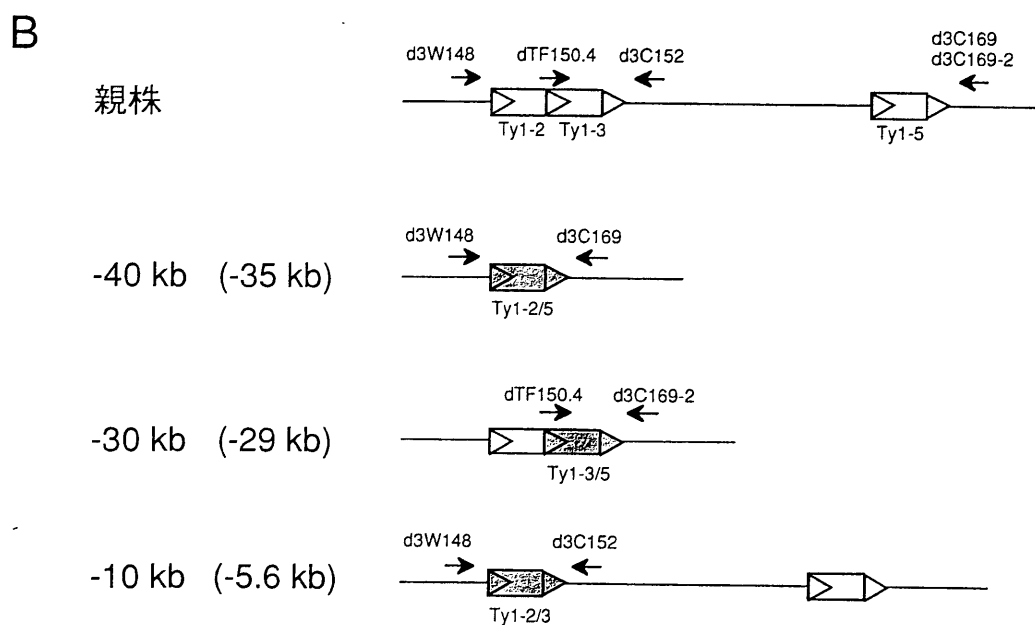
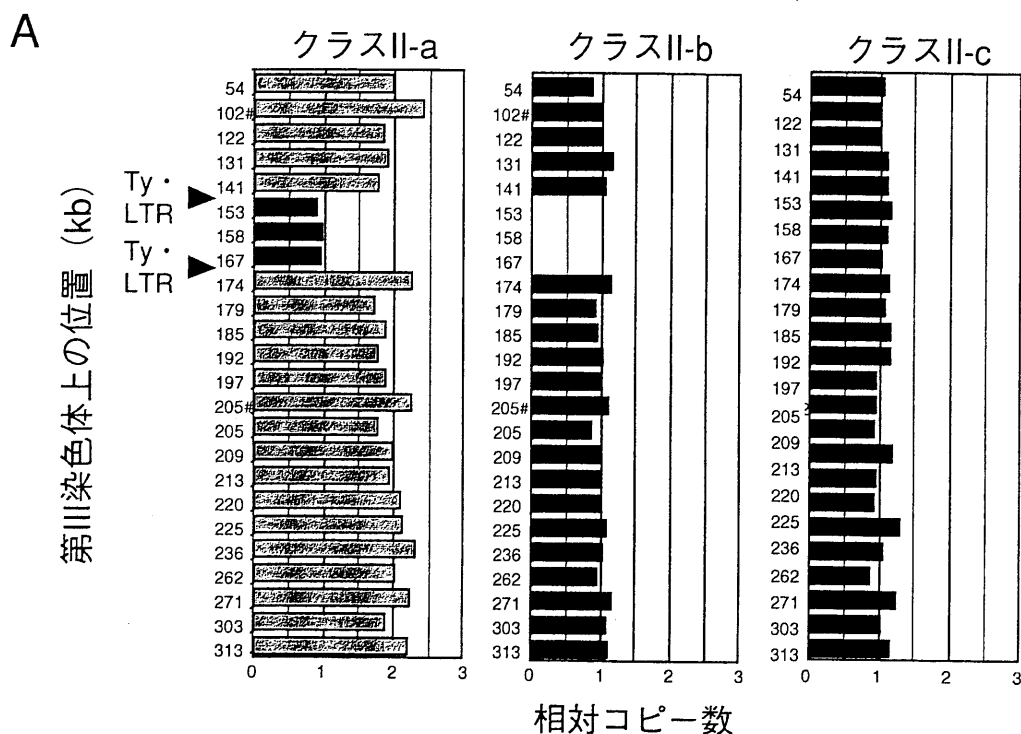


図15 クラスII：第III染色体右腕間の不等交叉型

A) Genome scanningによるクラスII異常染色体の欠失領域の同定。Ty因子およびLTR配列のクラスター領域をマークしていること以外は、図13と同じ。

B) クラスII異常染色体の再編領域のクローニング。第III染色体の配列を横線、LTR配列を三角形、Ty因子を三角形と四角形で表す。再編部位のクローニングに用いたプライマーの名称と大まかな結合位置を図中に示す。プライマーの正確な対合位置に関しては、表2を参照のこと。クローニングされた再編領域内に存在していたTy因子（灰色）については、その全塩基配列を決定した。2-4段目の数値はPFGEで測定された異常第III染色体の大きさを、括弧内の数値はPCRと塩基配列解析により決定された再編領域から予想される異常第III染色体の大きさを表している。

III-167までの領域が欠失しているように見えた。図3に示したとおり、境界領域に当たるIII-141とIII-153の間およびIII-167からIII-174の間には、同じ方向を向いたTy1が存在している。過去にTy因子間の染色体再編例が報告されていたため（Boeke, 1991）、これらの異常染色体もTy因子間で融合しているのではないかと考えた。

この可能性を検証するために、Ty1-2のすぐ上流のプライマーとTy1-5のすぐ下流のプライマーを組み合わせてPCRを行った（図15-B）。親株ではこれらのプライマーは41 kb離れているため、この組み合わせで明瞭なPCR産物は観察されなかった。それに対し、-40 kbの異常染色体を持つ細胞を用いた場合では、6.4 kbのPCR産物が得られた。得られたPCR産物の塩基配列を決定し、-40 kbの異常染色体では1つのTy因子が残される形でTy1-2の上流とTy1-5の下流が繋がっていることを明らかにした（図15-B 2段目）。このような欠失が起こると染色体はもとの第III染色体より35 kb短くなることが予想されるが、この仮説はPFGEで直接観察した大きさの違い（-40 kb）とよく一致していた。また、30 kb短い異常第III染色体を持つ細胞から抽出したDNAを鋳型として用いたPCRでは、12 kbのPCR産物が検出された。このことは-30 kbの異常染色体では2つのTy因子が残される形で染色体再編が起こった可能性を示唆していた。Ty1-2とTy1-3の間にあるLTR配列とTy1-5のセントロメア側のLTR配列との組換え、あるいはTy1-3とTy1-5間での組換えはこの条件を満たすが、再編部位のTy因子の塩基配列を決定した結果、調べた4例は全て後者であることが判明した（図15-B 3段目）。

クラスII-cの異常染色体の欠失領域はGenome scanningでは検出されなかったが、-10 kbという異常染色体の大きさと、第III染色体上のTy因子の位置より（図3）、この異常染色体はTy1-2とTy1-3間での組換えによるものではないかと考えた。そこでTy1-2のすぐ上流のプライマーとTy1-3のすぐ下流のプライマーを組み合わせてPCRを行ったところ（図15-B）、親株では13 kb、クラスII-cの細胞では6.5 kbのPCR産物が観察された。このクラスII-c由来のPCR産物の塩基配列を決定し、予想通りTy1-2とTy1-3間での染色体再編の結果その間の5.6 kbの領域が欠失していることを確認した（図15-B 4段目）。

以上の結果をまとめると、クラスIIの異常染色体は、調べた7例全て第III染色体の右腕上に存在するTy1の配列を介して融合していた（表5および図15-B）。URA3マーカー挿入領域が相同染色体上の配列と置き換わっていたことを併せて考えると、クラスIIの異常染色体は、左腕テロメアから右腕上のTy因子までのURA3遺伝子を持つ第III染色体由来の部分と、右腕上のTy因子から右腕テロメアまでのURA3遺伝子を持たない第III染色体由来の部分とを併せ持つと推定される。このような融合染色体を生じる1つの可能性は、相同染色体分間の不等交叉である。つまり、DNA複製後に相同

染色分体間で不等交叉が起こり、*URA*遺伝子を持たない2つの染色分体が1つの細胞に分配されれば、クラスIIの多くに見られたように1つの正常な染色体と1つの融合染色体を持つ細胞が生じる（図24を参照）。第III染色体の右腕上には同じ向きのTy1が3つ存在しており（図3-B）、全ての組み合わせの再編例が見つかった（表5および図15-B）。しかしながら、検出されたものは全てもとの染色体より短くなったものであった（図15-B）。この結果の解釈については考察の項で述べる。

2-2-4. クラスIII；第III染色体の右腕-左腕間の不等交叉型

クラスIIIに分類されたクローンの特徴は、第III染色体左腕上の1箇所の領域（III-54）が3コピー分に変化していたことと、右腕上のあるところから末端までの領域が1コピー分に減少していたことである。10例の異常染色体がこのクラスに分類され、さらに右腕上の境界領域より3つのサブクラスに分けられた（表5および図16-A）。PFGEで-105 kbの異常染色体が確認されたクラスIII-aの2例ではIII-131からIII-313まで（図16-A パネル左）、-100 kbの異常第III染色体を持っていたクラスIII-bの1例ではIII-153からIII-313まで（図16-A パネル中央）、-60 kbの異常染色体が観察されたクラスIII-cの7例ではIII-174からIII-313まで（図16-A パネル右）の領域が異常染色体上では欠失しているように見えた。クラスIIIのもう1つの共通点は、Genome scanning（III-54）および定量的PCR（III-102）に用いた第III染色体左腕上の2箇所の領域をプローブとしたサザンブロッティングにおいて、異常染色体の方が正常な第III染色体よりも濃く検出されたことである（図16-B）。PFGEおよび定量的PCRの結果よりIII-102領域は2コピー分のままと考えられるのにGenome scanningではIII-54領域が3コピー分に増加していたことを併せて考えると、サザンブロッティングの結果は異常染色体上でIII-54領域が重複していることを示唆している。

この左腕上の重複と右腕上の末端領域までの大きな欠失の最も単純な説明は、右腕の欠失した部位の代わりに左腕の配列が逆向きに続くことである。左腕と右腕上にある逆向き配列間で組換えが起これば、両端にテロメアを持つ安定な染色体が生じると考えられる。

この条件を満たすように、クラスIIIの右腕上の境界領域に相当する3箇所には左向きのLTR配列あるいはTy1が存在し、左腕上には右向きのLTR配列およびTy因子が見つまっている（図3）。クラスIIIの異常染色体がこれらの配列間の組換えによって生じた可能性を検証するために、欠失した領域のすぐ上流に当たる右向きのプライマーと左腕にあるTy1-1のすぐ上流に右向きに設計したプライマーを組み合わせPCR

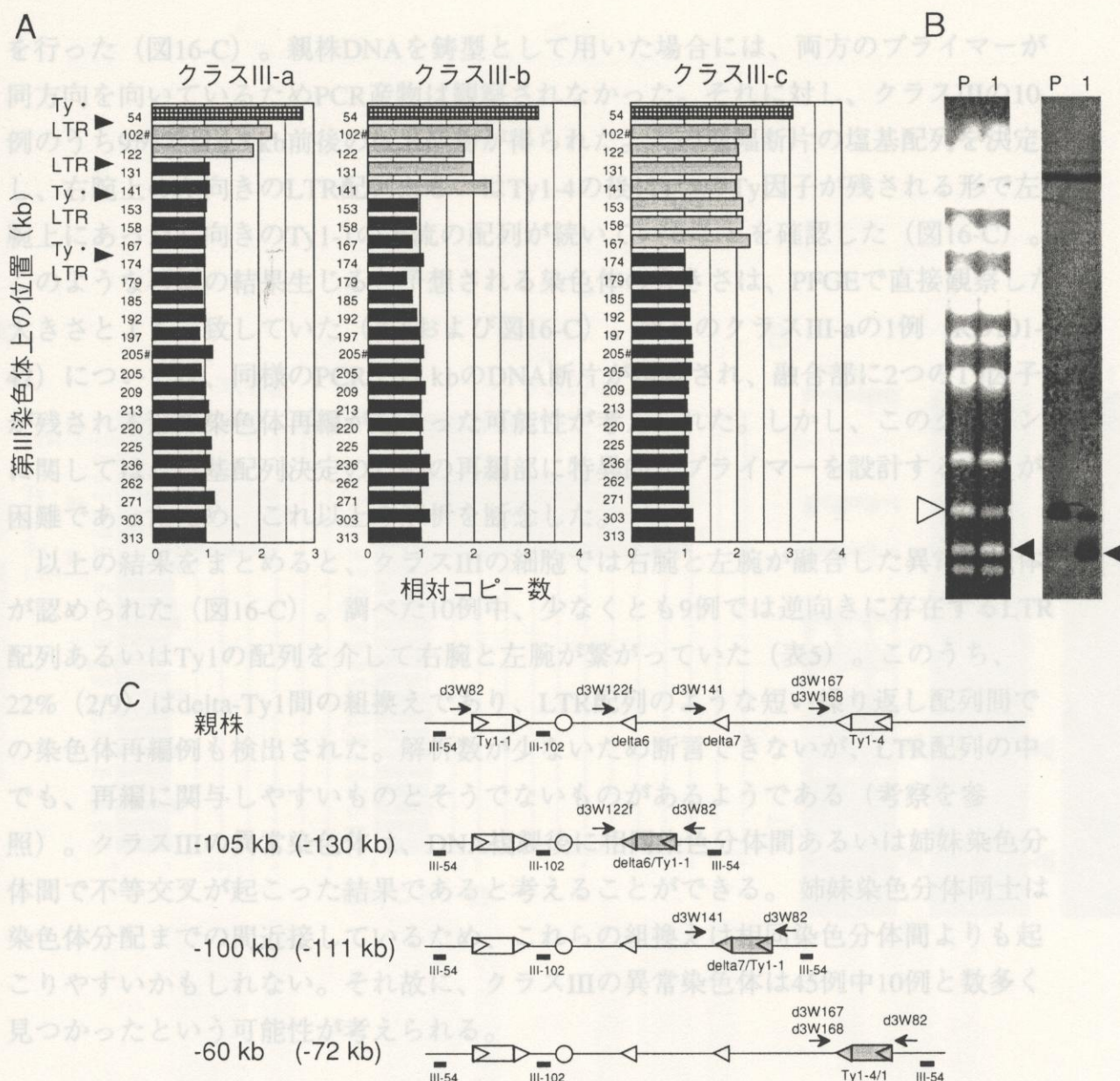


図16 クラスIII：第III染色体の右腕-左腕間の不等交叉型

A) Genome scanningによるクラスIII異常染色体の欠失・重複領域の同定。Ty因子およびLTR配列のクラスター領域をマークしていること以外は、図13と同じ。

B) クラスIII異常染色体の重複部位の確認。PFGEで全染色体を分離した後、第III染色体左腕上のIII-54およびIII-102領域をプローブとしてサザンブロッティングを行った。プローブの大きな結合位置に関してはC)を参照のこと。親株（レーンP）および代表としてクラスIII-c細胞の1例（レーン1）を用いて得られた結果を示す。第III染色体の泳動位置を白三角、異常第III染色体の泳動位置を黒三角で表示した。

C) クラスIII異常染色体の再編領域のクローニング。第III染色体の配列を横線、セントロメアを白丸、LTR配列を三角形、Ty因子を四角形で表す。再編部位のクローニングに用いたプライマーの名称と大きな結合位置、およびB)のサザンブロッティングに用いたプローブの大きな結合位置を図中に示す。プライマーの正確な対合位置に関しては、表2を参照のこと。クローニングされた再編領域内に存在していたTy因子（灰色）については、その全塩基配列を決定した。2-4段目の数値はPFGEで測定された異常第III染色体の大きさを、括弧内の数値はPCRと塩基配列解析により決定された再編領域から予想される異常第III染色体の大きさを表している。

を行った（図16-C）。親株DNAを鋳型として用いた場合には、両方のプライマーが同方向を向いているためPCR産物は観察されなかった。それに対し、クラスIIIの10例のうち9例では6.5 kb前後のPCR産物が得られた。この増幅断片の塩基配列を決定し、右腕上の左向きのLTR配列あるいはTy1-4の後に1つのTy因子が残される形で左腕上にあった右向きのTy1-1の上流の配列が続いていることを確認した（図16-C）。このような再編の結果生じると予想される染色体の大きさは、PFGEで直接観察した大きさとよく一致していた（表5および図16-C）。残りのクラスIII-aの1例（RD101-42）については、同様のPCRで12 kbのDNA断片が増幅され、融合部に2つのTy因子が残される形で染色体再編が起こった可能性が考えられた。しかし、このクローンに関しては、塩基配列決定のための再編部に特異的なプライマーを設計することが困難であったため、これ以上の解析を断念した。

以上の結果をまとめると、クラスIIIの細胞では右腕と左腕が融合した異常染色体が認められた（図16-C）。調べた10例中、少なくとも9例では逆向きに存在するLTR配列あるいはTy1の配列を介して右腕と左腕が繋がっていた（表5）。このうち、22%（2/9）はdelta-Ty1間の組換えであり、LTR配列のような短い繰り返し配列間での染色体再編例も検出された。解析数が少ないため断言できないが、LTR配列の中でも、再編に関与しやすいものとそうでないものがあるようである（考察を参照）。クラスIIIの異常染色体は、DNA複製後に相同染色分体間あるいは姉妹染色分体間で不等交叉が起こった結果であると考えられる。姉妹染色分体同士は染色体分配までの間近接しているため、これらの組換えは相同染色分体間よりも起こりやすいかもしれない。それ故に、クラスIIIの異常染色体は45例中10例と数多く見つかったという可能性が考えられる。

2-2-5. クラスIV；第III染色体の右腕部分重複を伴う右腕-左腕間の不等交叉型

クラスIVのGenome scanning解析結果の特徴としては、1) 左腕のIII-54部位が3コピー分に変化していたこと、2) 右腕のIII-174から末端のIII-313までの領域が1コピー分に減少していたこと、3) 右腕上のいくつかの領域が3コピー分あるいは6コピー分に見えたこと、の3点が挙げられる（図17-A）。右腕上の重複部位およびコピー数より、クラスIVは2種類のサブクラスに分けられた（表5および図17-A）。PFGEにおいて-55 kbの異常染色体が検出された3例および-50 kbの異常染色体が観察された4例はクラスIV-aに、+145 kbの異常染色体を持っていた1例はクラスIV-bに、それぞれ分類された。

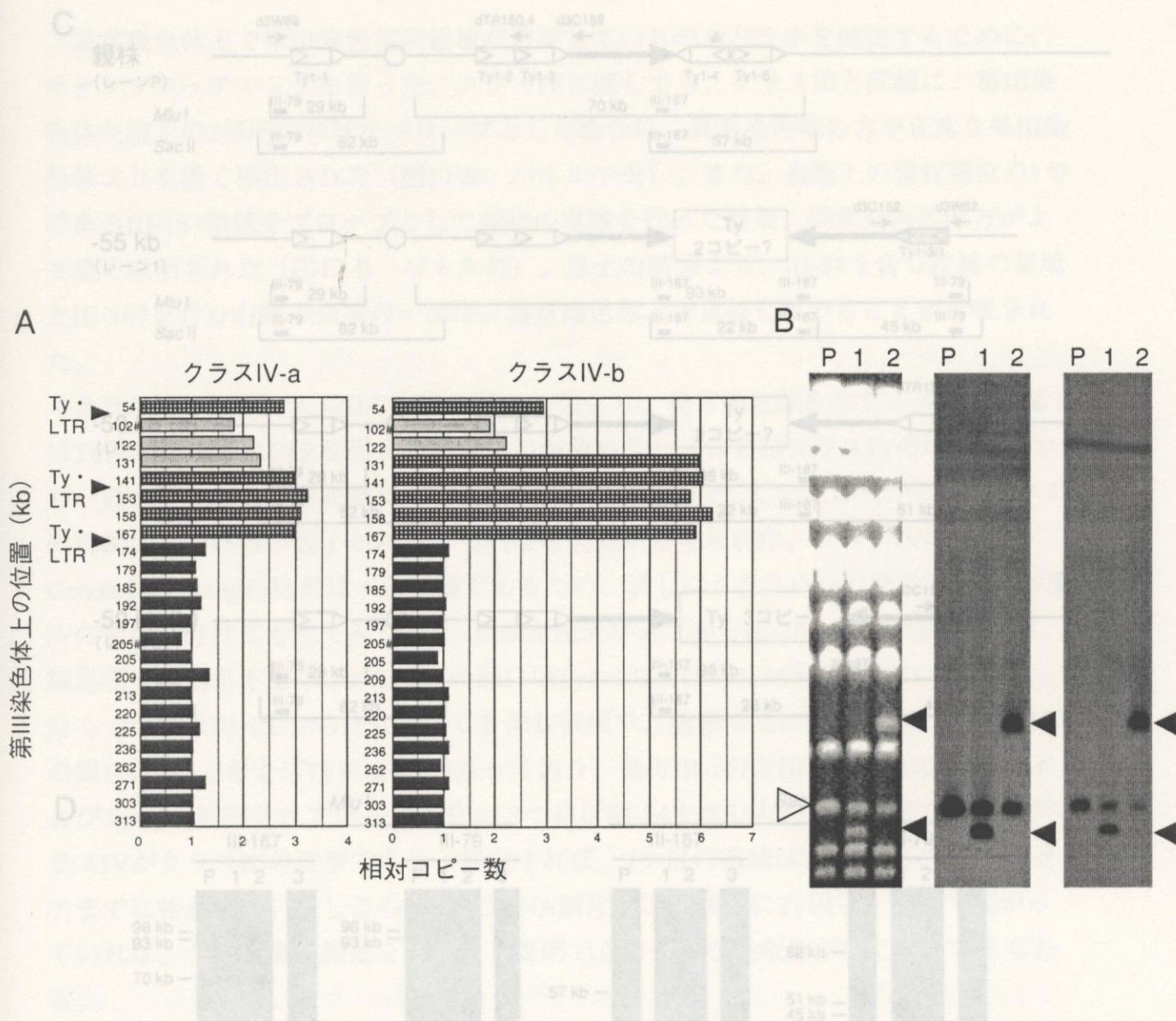


図17 クラスIV：第III染色体の右腕部分重複を伴う第III染色体の右腕-左腕間の不等交叉型

A) Genome scanningによるクラスIV異常染色体の欠失・増幅領域の同定。Ty因子およびLTR配列のクラスター領域をマークしていること以外は、図13と同じ。

B) クラスIV異常染色体の重複部位の確認。PFGEで全染色体を分離した後（パネル左）、Genome scanningで同定された第III染色体上の重複部位をプローブとしたサザンブロッティングを行った。中央のパネルでは第III染色体左腕上のIII-54およびIII-102領域を、右のパネルでは右腕上のIII-167領域をプローブとしている。親株（レーンP）、クラスIV-a細胞の1例（レーン2）およびクラスIV-b細胞の1例（レーン3）を用いて得られた結果を示す。第III染色体の泳動位置を白三角、異常第III染色体の泳動位置を黒三角で表示した。

プローブの大きな結合位置および実際に検出されたDNA断片の大きさ（Dを参照）を示す。再編部位のクローニングに用いたプライマーの名称と大きな結合位置に関しては、第III染色体の上部に表記した。プライマーの正確な対合位置については表2を参照のこと。クローニングされた再編領域内に存在していたTy因子（灰色）に関しては、その全塩基配列を決定した。2-4段目のクラスIV-aの異常染色体の構造は、それぞれD)のレーン1-3に相当する制限酵素マッピングにより推定された。

D) クラスIV-a異常染色体の制限酵素マッピング。クラスIV-a型の異常染色体を持つクラスC細胞のゲノムDNAをパネルの最上段に示してある制限酵素で消化した後、PFGEでDNA断片を分離し、2段目に示す第III染色体上の領域をプローブとしてサザンブロッティングを行った。この解析により、クラスIV-aの異常染色体は3種類に分類された。それぞれの代表例をレーン1-3に、親株を用いて得られたパターンをレーンPに示す。検出されたDNA断片の大きさに関しては、それぞれのパネルの左側に記した。

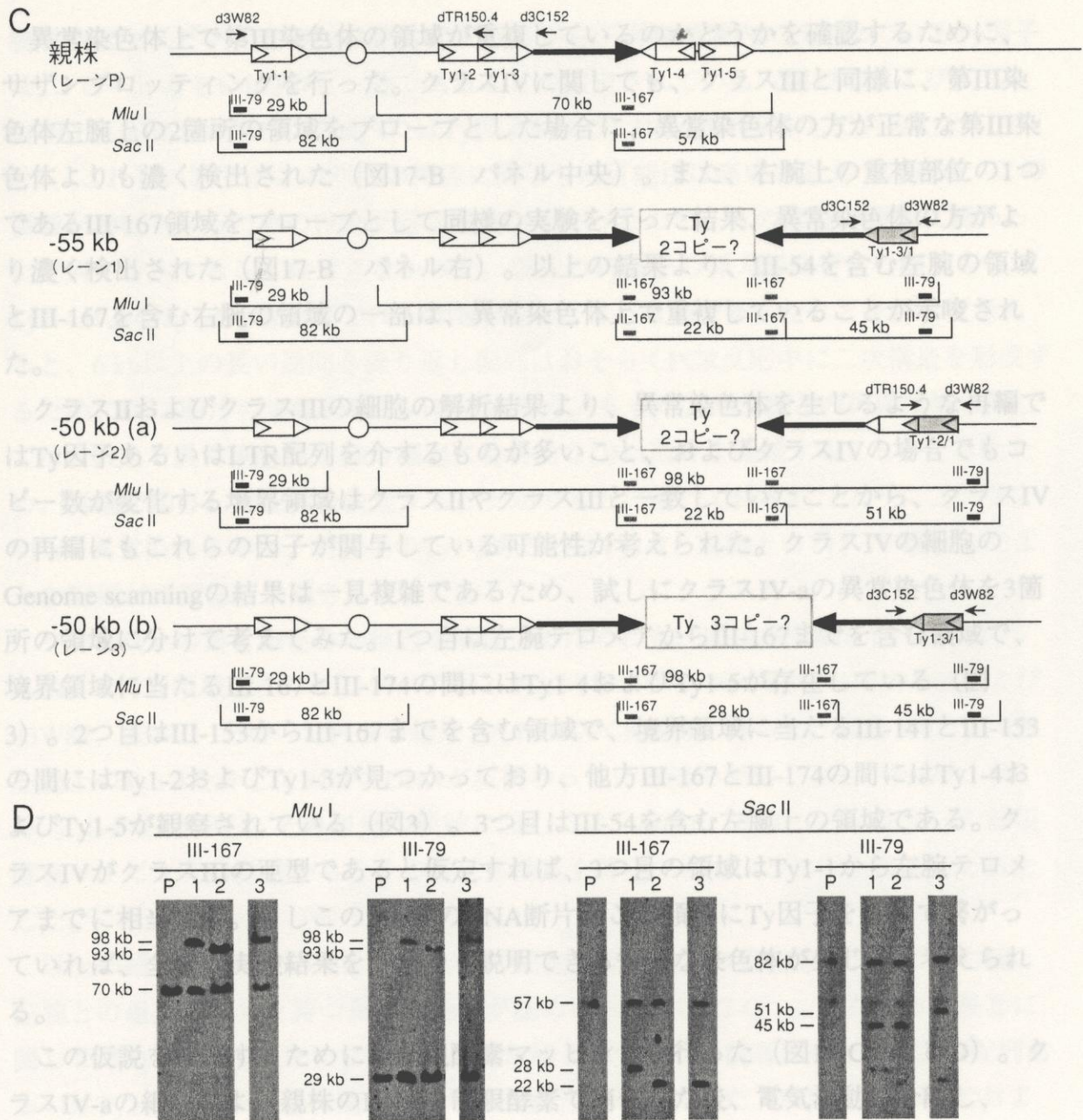


図17-続き

C) クラスIV-a異常染色体の構造解析および再編領域のクローニング。第III染色体の配列を横線、Ty1-3からTy1-4までの領域を太い矢印、セントロメアを白丸、LTR配列を三角形、Ty因子を三角形と四角形で表す。第III染色体の模式図の下には、制限酵素マッピングに用いたMlu IとSac IIの主な切断部位、プローブの大まかな結合位置および実際に検出されたDNA断片の大きさ(Dを参照)を示す。再編部位のクローニングに用いたプライマーの名称と大まかな結合位置に関しては、第III染色体の上部に表記した。プライマーの正確な対合位置については表2を参照のこと。クローニングされた再編領域内に存在していたTy因子(灰色)に関しては、その全塩基配列を決定した。2-4段目のクラスIV-aの異常染色体の構造は、それぞれD)のレーン1-3に相当する制限酵素マッピングにより推定された。

D) クラスIV-a異常染色体の制限酵素マッピング。クラスIV-a型の異常染色体を持つクラスC細胞のゲノムDNAをパネルの最上段に示してある制限酵素で消化した後、PFGEでDNA断片を分離し、2段目に示す第III染色体上の領域をプローブとしてサザンブロッティングを行った。この解析により、クラスIV-aの異常染色体は3種類に分類された。それぞれの代表例をレーン1-3に、親株を用いて得られたパターンをレーンPに示す。検出されたDNA断片の大きさに関しては、それぞれのパネルの左側に記した。

異常染色体上で第III染色体の領域が重複しているのかどうかを確認するために、サザンブロッティングを行った。クラスIVに関しても、クラスIIIと同様に、第III染色体左腕上の2箇所の領域をプローブとした場合に、異常染色体の方が正常な第III染色体よりも濃く検出された（図17-B パネル中央）。また、右腕上の重複部位の1つであるIII-167領域をプローブとして同様の実験を行った結果、異常染色体の方がより濃く検出された（図17-B パネル右）。以上の結果より、III-54を含む左腕の領域とIII-167を含む右腕の領域の一部は、異常染色体上で重複していることが示唆された。

クラスIIおよびクラスIIIの細胞の解析結果より、異常染色体を生じるような再編ではTy因子あるいはLTR配列を介するものが多いこと、およびクラスIVの場合でもコピー数が変化する境界領域はクラスIIやクラスIIIと一致していたことから、クラスIVの再編にもこれらの因子が関与している可能性が考えられた。クラスIVの細胞のGenome scanningの結果は一見複雑であるため、試みにクラスIV-aの異常染色体を3箇所の領域に分けて考えてみた。1つ目は左腕テロメアからIII-167までを含む領域で、境界領域に当たるIII-167とIII-174の間にはTy1-4およびTy1-5が存在している（図3）。2つ目はIII-153からIII-167までを含む領域で、境界領域に当たるIII-141とIII-153の間にはTy1-2およびTy1-3が見つかっており、他方III-167とIII-174の間にはTy1-4およびTy1-5が観察されている（図3）。3つ目はIII-54を含む左腕上の領域である。クラスIVがクラスIIIの亜型であると仮定すれば、3つ目の領域はTy1-1から左腕テロメアまでに相当する。もしこの3種類のDNA断片がこの順番にTy因子を介して繋がっていれば、全ての実験結果を矛盾なく説明できる安定な染色体が生じると考えられる。

この仮説を検証するために、制限酵素マッピングを行った（図17-CおよびD）。クラスIV-aの細胞および親株のDNAを制限酵素で消化した後、電気泳動で分離し、Ty1-1のすぐ上流に当たるIII-79あるいは重複部位の1つであるIII-167をプローブとしてサザンブロッティングを施行した。制限酵素に関しては、右腕上の重複領域を切らない制限酵素の1つである*Mlu* I、あるいはこの領域を1箇所だけ切る制限酵素の1つである*Sac* IIを用いた。両方とも、Ty因子内に制限酵素の認識部位は見つかっていない。この実験と平行して、PCRによる再編領域のクローニングも試みた。以上の2種類の実験結果より、クラスIV-aの7例の異常染色体は3つのサブクラスに分けられたが、いずれの場合でも右腕上のTy因子に挟まれた部分が逆向きに重複した後に左腕上の配列が続いていた（表5および図17-C）。図17-Cを見れば判るとおり、クラスIV-aの異常染色体の再編領域に関しては、逆向き繰り返し配列に挟まれている部分と、右腕の配列と左腕の配列が融合している部分の2箇所がある。前者については、

制限酵素マッピングでのDNA断片の大きさから、再編領域内に残されているTy因子は2コピー分あるいは3コピー分であることが推定されている（図17-CおよびD）。III-167からIII-174までの領域内にはTy因子およびLTR配列が存在しているため（図3）、これらの因子がこの部位の再編に関与した可能性は高いと考えているが、この領域を増幅させるためのPCR反応は成功しなかったため、この部位の再編に関わった配列を特定することはできなかった。親株のTy因子の挿入部位特定の際にもこのTy1-4およびTy1-5を含む形でPCR増幅することは不可能であったことを併せて考えると、6 kb以上の長い逆向き繰り返し配列はおそらくPCR反応中に二次構造を形成するためにDNA断片の増幅が難しいのであろう。もう片方の左腕との再編領域に関しては、PCRで異常染色体を持つ細胞に特異的なDNA断片を増幅することができたため、再編に関与した配列を決定することができた。図17-Cに示したように、クラスVI-aの異常染色体では、右腕上のTy1-2あるいはTy1-3と左腕上のTy1-1が融合したような配列が再編部位に残されていた。

クラスIV-bの異常染色体の構造を解析するためにも、同様の実験を行った。クラスIII-cの再編領域をクローニングするときと同じプライマーセット（d3W168およびd3W82、表2-C）を用いたPCRの結果、6.7 kbのPCR産物が得られ、右腕上のTy1-4と左腕上のTy1-1を介して両者のDNAが組換えわっている部分があることが判った（表5）。しかしながら、それ以外の領域に関しては、*Mlu* I、*Sac* II、*Pac* Iを用いた制限酵素マッピングの結果からはその染色体構造を特定できず、これ以上の解析を断念した。

以上の結果をまとめると、クラスIVの細胞では右腕上の重複部分、および右腕と左腕との組換え部分を持つ異常染色体が認められた（図17-C）。少なくとも後者に関してはTy1の配列を介して染色体再編が起こっており、前者についてもLTR配列あるいはTy1の配列が再編に関与している可能性が考えられた（表5、図17-A、CおよびD）。クラスIVの異常染色体は、クラスIIIと同様に、相同染色分体間あるいは姉妹染色分体間の相互作用の結果生じたと推定される。

2-2-6. クラスV；転座型

Genome scanningにおいて、あるところから末端までの領域が1コピー分に減少しており、他に変化は見られなかった異常染色体に関しては、クラスVに分類した（図18-A）。クラスVの細胞は9例見付き、その境界領域をもとに3つのサブクラスに分けられた（表5および図18-A）。Genome scanningで見る限り、クラスVの境界領域

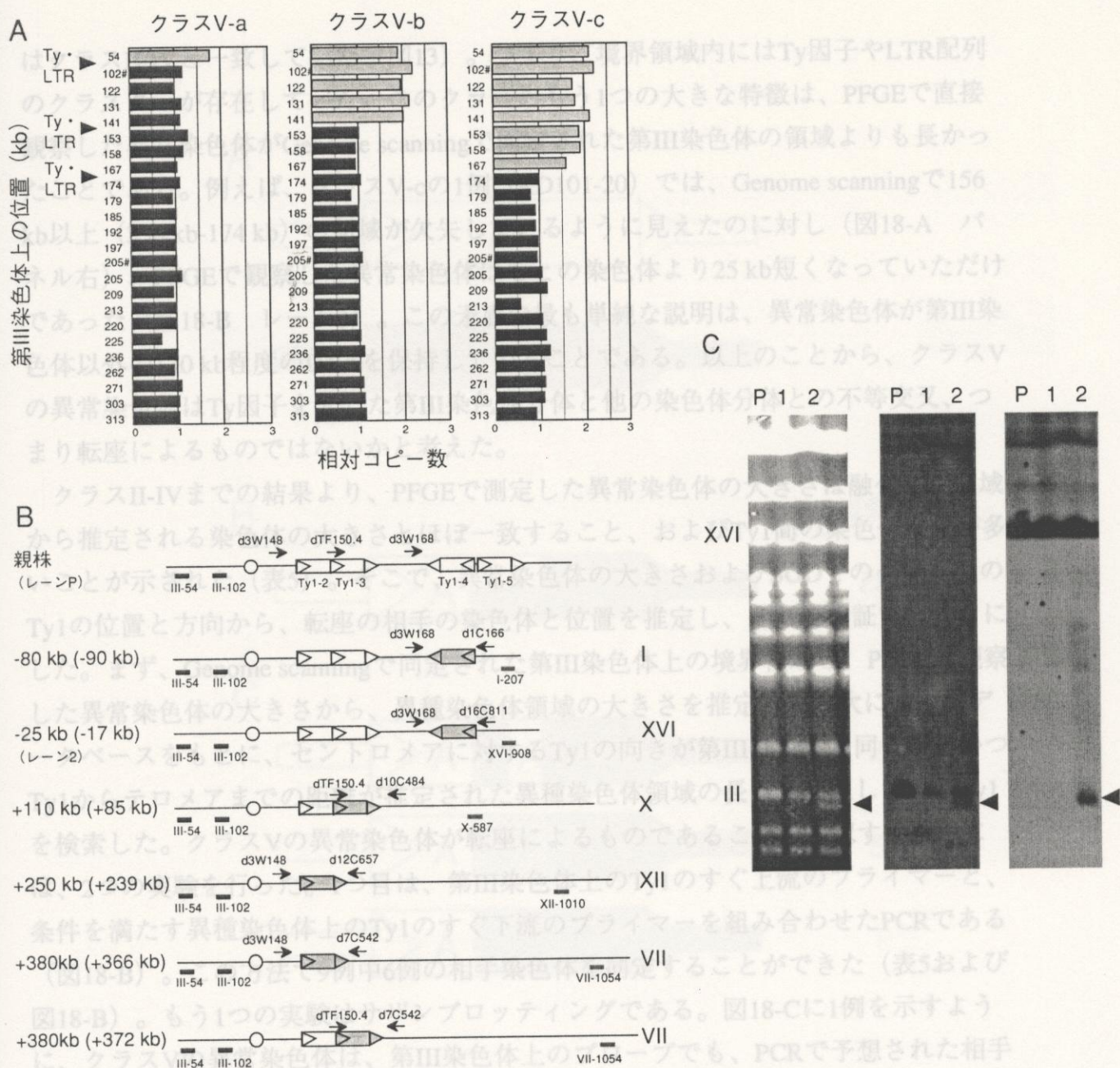


図18 クラスV：転座型

A) Genome scanningによるクラスV異常染色体の欠失領域の同定。Ty因子およびLTR配列のクラスター領域をマークしていること以外は、図13と同じ。

B) クラスV異常染色体の再編領域のクローニング。染色体の配列を横線、セントロメアを白丸、LTR配列を三角形、Ty因子を四角形で表す。再編部位のクローニングに用いたプライマーの名称と大まかな結合位置、およびC) のサザンブロッティングに用いたプローブの大まかな結合位置を図中に示す。プライマーおよびプローブの正確な対合位置に関しては、表2を参照のこと。クローニングされた再編領域内に存在していたTy因子 (灰色) については、その全塩基配列を決定した。2-7段目の数値はPFGEで測定された異常第III染色体の大きさを、括弧内の数値はPCRと塩基配列解析により決定された再編領域から予想される異常第III染色体の大きさを表している。それぞれの異常第III染色体の右側には、転座の相手染色体をローマ数字で明示した。

C) クラスV異常染色体の転座の確認。PFGEで全染色体を分離した後 (パネル左)、第III染色体左腕上のIII-54とIII-102領域 (パネル中央)、あるいは転座の相手の染色体上に設計したプローブ (パネル右) を用いてサザンブロッティングを行った。ここでは親株 (レーンP) および代表として第XVI染色体との転座例 (RD101-20、レーン2) を示す。プローブの大まかな結合位置に関してはB) を参照のこと。第III染色体、第XVI染色体の泳動位置をローマ数字、異常第III染色体の泳動位置を黒三角で表示した。

はクラスII-IVと一致していた（図13）。つまり、境界領域内にはTy因子やLTR配列のクラスターが存在していた。このクラスのもう1つの大きな特徴は、PFGEで直接観察した異常染色体がGenome scanningで同定された第III染色体の領域よりも長かったことである。例えば、クラスV-cの1例（RD101-20）では、Genome scanningで156 kb以上（330 kb-174 kb）の領域が欠失しているように見えたのに対し（図18-A パネル右）、PFGEで観察した異常染色体はもとの染色体より25 kb短くなっていただけであった（図18-B レーン2）。この矛盾の最も単純な説明は、異常染色体が第III染色体以外の130 kb程度のDNAを保持していることである。以上のことから、クラスVの異常染色体はTy因子を介した第III染色体分体と他の染色体分体との不等交叉、つまり転座によるものではないかと考えた。

クラスII-IVまでの結果より、PFGEで測定した異常染色体の大きさは融合した領域から推定される染色体の大きさとほぼ一致すること、およびTy1間の染色体再編が多いことが示された（表5）。そこで、異常染色体の大きさおよびSGDでのゲノム上のTy1の位置と方向から、転座の相手の染色体と位置を推定し、それを検証することにした。まず、Genome scanningで同定された第III染色体上の境界領域と、PFGEで観察した異常染色体の大きさから、異種染色体領域の大きさを推定した。次に、SGDデータベースをもとに、セントロメアに対するTy1の向きが第III染色体と同じで、かつTy1からテロメアまでの距離が推定された異種染色体領域の長さと同様しているTy1を検索した。クラスVの異常染色体が転座によるものであることを確認するためには、2つの実験を行った。1つ目は、第III染色体上のTy1のすぐ上流のプライマーと、条件を満たす異種染色体上のTy1のすぐ下流のプライマーを組み合わせたPCRである（図18-B）。この方法で9例中6例の相手染色体を同定することができた（表5および図18-B）。もう1つの実験はサザンブロッティングである。図18-Cに1例を示すように、クラスVの異常染色体は、第III染色体上のプローブでも、PCRで予想された相手染色体上に新たに設計したよりテロメア側のプローブでも検出された。

以上の結果より、クラスVの9例中6例の異常染色体はTy1を介した転座に起因するものであると結論した。解析数が少ないので断定はできないが、転座の相手染色体に特に偏りは見られず、組換えの相手はランダムのものであった（表5）。残りの未同定の3例に関しては、Ty-LTR、LTR-LTR、他の全く別の配列間等の、Ty1-Ty1以外の組換え、SGDデータベースには載っていないTy1とのTy1間の再編、クラスIVで見られたような重複を伴う転座等の可能性が考えられるが、本研究ではこれ以上の解析を行っていない。

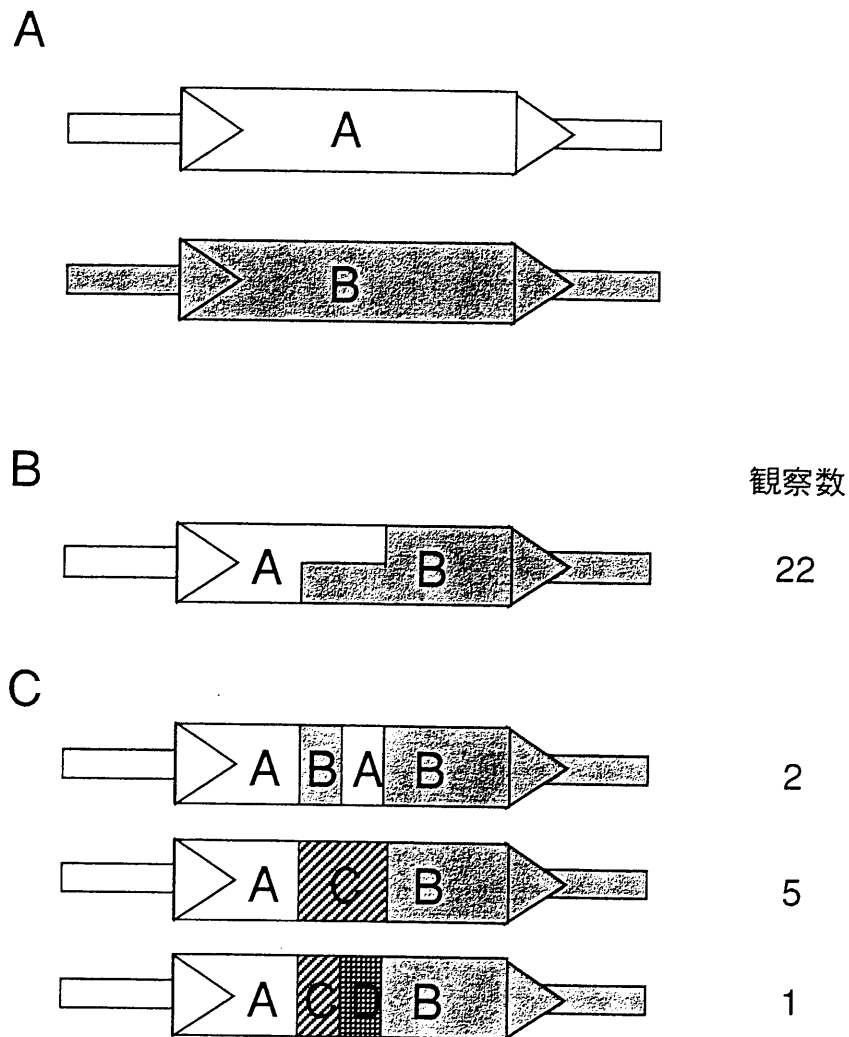


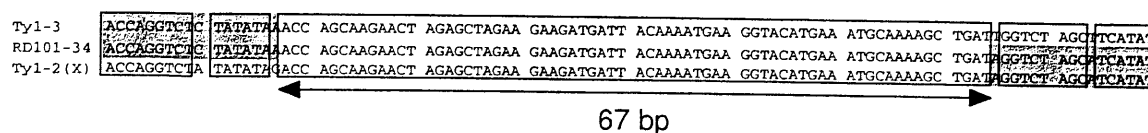
図19 染色体再編部位に残されたTy因子の構造的特徴

染色体の配列を細い四角形、LTR配列を三角形、Ty因子を三角形と四角形で示す。

A) 再編前のTy因子とその周辺領域。2つのTy因子（AおよびB）とその周辺領域を別の色で示した。

B) 異常染色体の再編部位に残されたTy因子の構造。30例のクラスII-Vの異常染色体の染色体再編部位に存在していたTy因子の全塩基配列を決定したところ、単純な組換えで説明できるもの（1列目、タイプI、図20を参照）と、そうでないもの（2-4列目、タイプII、図21を参照）があることが判った。組換えTy因子の構造的特徴および実際の検出数を示す。染色体再編前のTy因子由来の部分をAおよびBで、再編の切断点2箇所には元々存在していなかったTy因子由来の部分をCおよびDで表した。

A



B

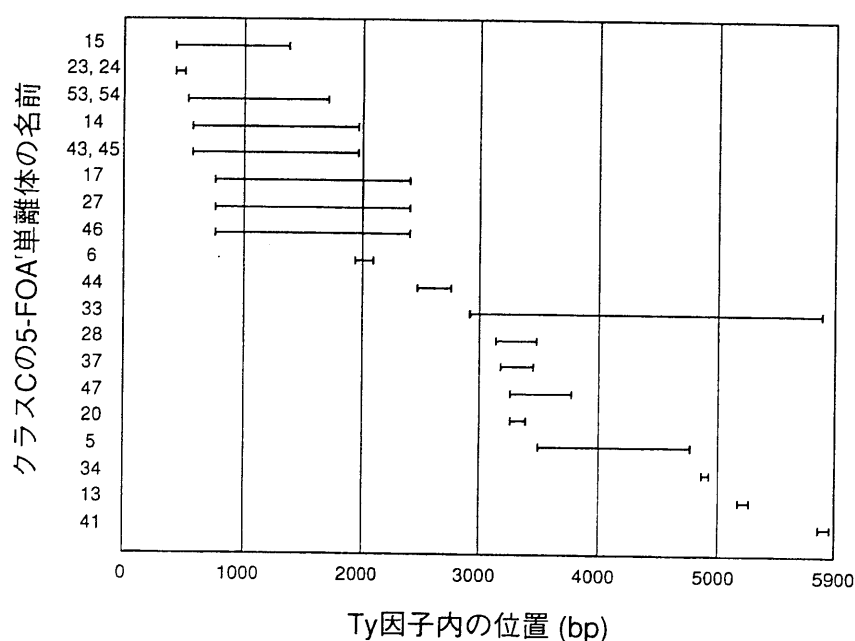
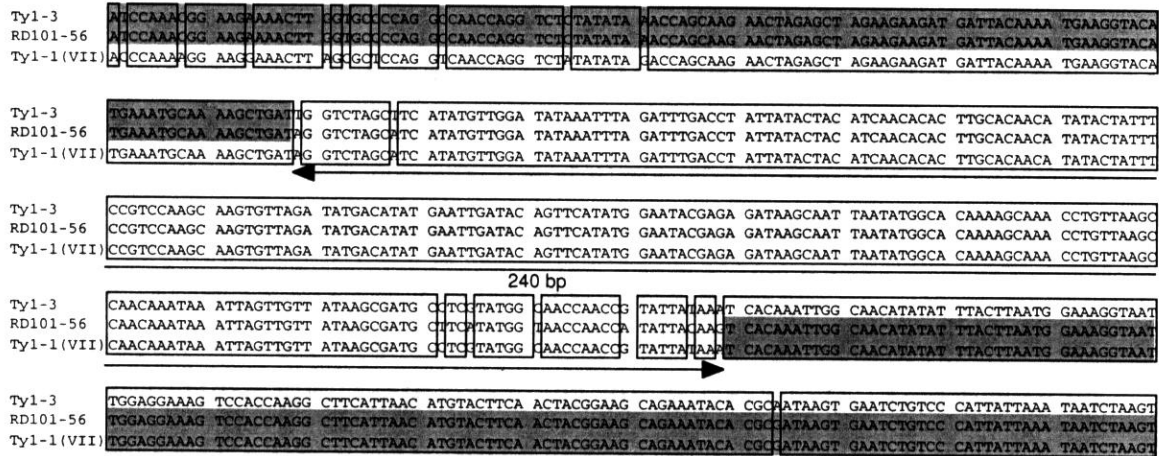


図20 タイプI：単純組換え型

A) タイプI型の染色体再編部位の塩基配列。上段と下段に再編前のTy因子の配列を、中段に異常染色体の再編領域に残されていたTy因子の配列を示す。四角で囲んだ領域は三者のDNAに共通な配列、灰色で示した領域は二者のDNAで連続して共通な配列である。組換えが起こったと考えられる領域については、その範囲の長さと共に矢印で表示した。

B) Ty因子内の組換え位置の分布。A) に1例を示したのと同様の方法で、22例のタイプI型の組換え位置を同定した。A) での矢印がここでは細い横線に相当する。5-FOA'単離体の名前に関しては、図中ではRD101-を省略して表示した。同じ実験区由来かつ再編領域の塩基配列が全く同じであったものには、1つの細胞が細胞培養時に分裂した姉妹細胞である可能性が考えられるため、ここでは1つとして表した。

A



B

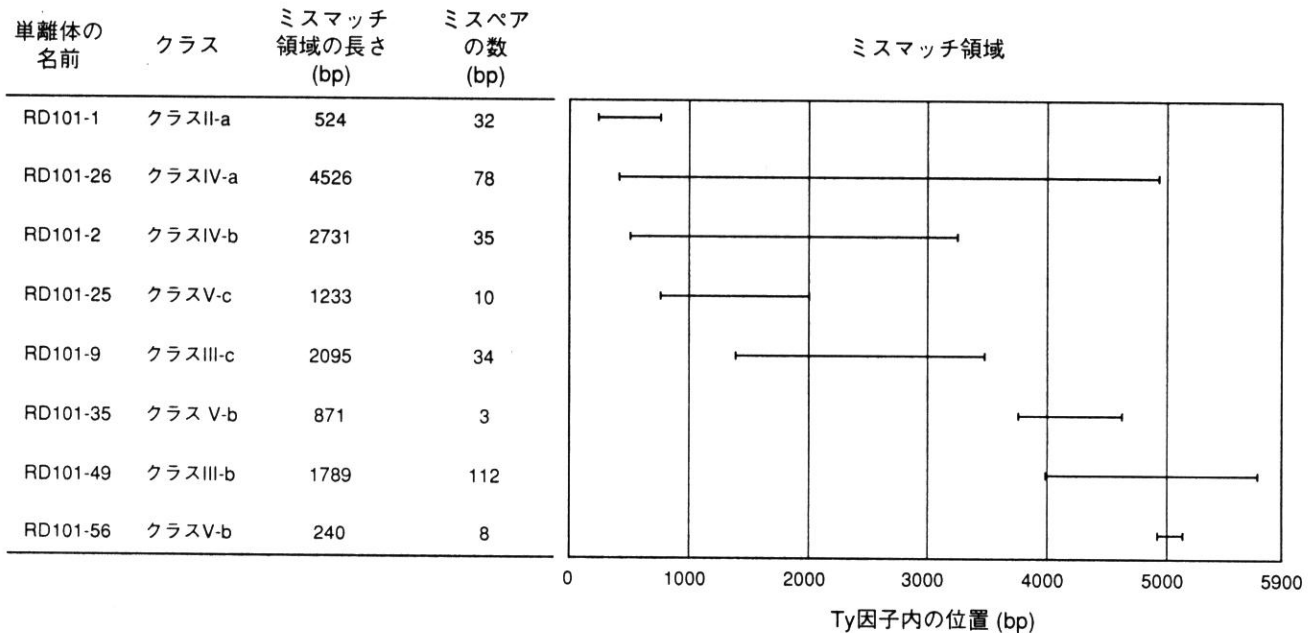


図21 タイプII：複雑型

A) タイプII型の染色体再編部位の塩基配列。上段と下段に切断点2箇所のTy因子の配列を、中段に異常染色体の再編領域に残されていたTy因子の配列を示す。四角で囲んだ領域は三者のDNAに共通な配列、灰色で示した領域は二者のDNAで連続して共通な配列である。切断点2箇所のTy配列とは異なる一連の領域（第3のTy因子の配列）については、その範囲の長さと共に矢印で表示した。

B) 第3のTy配列の分布。A) に1例を示したのと同様の方法で、8例のタイプII型のミスマッチ領域を同定した。A) での矢印がここでは細い横線に相当する。表中には、第3のTy配列（ミスマッチ領域）の長さ、および切断点2箇所のTy配列とは異なる塩基（ミスペア）の数も特記した。

2-3. 再編領域に残されたTy因子の構造的特徴

これまでは異常染色体の染色体レベルでの構造解析結果を述べてきたが、最後に塩基配列レベルでの解析結果についてまとめてみた。クラスII-Vの異常染色体に関して、PCRを利用して再編領域付近をクローニングし、34例中30例の染色体組換え部位の塩基配列を決定した結果、30例全て1つのTy因子を残す形で離れた2箇所の領域がTy因子内で融合していることが判った。塩基配列を決定したTy因子の周辺領域には特に変化は見られなかったが、再編の結果生じたTy因子の構造をもとの配列と比較すると、染色体再編を2つのタイプに分けることができた。

タイプIに分類されたのは、切断点2箇所の単純な組換えで説明できるものである(図19-B)。タイプIの再編例は全体の73% (22/30) を占めていた。Ty因子同士は非常によく似た配列を持っているため、組換えが起こったと考えられる点は特定できず、ある範囲内の領域として観察された。その代表例を図20-Aに示す。この例(RD101-34)では、示したはじめの16 bpまでの領域は第III染色体上のTy1-3と同じであり、17 bpから85 bpまでの第III染色体上のTy1-3と第X染色体上のTy1-2に共通した配列のあと、第X染色体上のTy1-2と同じ配列が続いていた。従って、組換えが起こったところは、2箇所のTy因子に共通した67 bpの範囲のどこかであると考えられる。同様に、タイプIの再編領域を同定した結果を図20-Bにまとめた。同じ実験区由来で再編領域も同じであった6例の細胞は、1つの細胞が分裂した結果生じたシスター細胞である可能性が考えられたため、図20-Bでは1種類として表記した。図20-Bを見れば判る通り、Ty因子内の再編領域に明らかな偏りは見られなかった。このことは、Ty因子内に特に組換えが起こりやすいところがあるわけではないことを示唆している。

タイプIIの特徴は、再編部位以外の新たなTy因子の配列が混在していたことである(図19-Cおよび図21-A)。このようなタイプを示す異常染色体はクラスII-Vから合計8例(27%)見つかった。この切断点2箇所に存在していたTy因子とは異なる配列(第3のTy因子の配列、図19-C パネル2段目)が確認された領域は短いもので240 bp、長いもので4526 bpであり、見つかった部位に特に偏りは見られなかった(図21-B)。第3のTy因子の存在を示すミスペアの塩基の数から考えて(図21-B)、ほとんどの再編例は染色体再編と点突然変異が同時に起こった結果であるとは考えにくかった。タイプIIのTy因子を生じる染色体再編の発生メカニズムを推定することは難しいが、それを示唆するような再編例がいくつか見つかった。

8例中、7例に関しては、第3のTy因子の配列が第III染色体上に見つかった。同様の現象が過去にRoederらによって報告されている(1984)。Roederらは、マーカーを

持つTy因子の転移を調べた際に、Ty因子は同一染色体上の近接した部位に転移する傾向があることを発見した。また、この転移に付随した染色体再編例も見つかっている（Roeder and Fink, 1982；Roeder et al., 1984）。彼女らは、3つのTy因子間の組換え（遺伝子変換）によって、このような転移と再編が起こったと考察している

（Roeder and Fink, 1982）。残りの1例（RD101-9）については、第3のTy因子の配列がゲノム上に見つからなかった。このことは、4つのTy因子が関与するような再編が起こった可能性を示唆しているのかもしれない（図19-C パネル3段目）。また、タイプIIのRD101-26では、第III染色体上のTy1-3とTy1-1の間で染色体再編が起こっていたが（図17-C パネル2段目）、間に残されたTy因子の配列はTy1-3、Ty1-1、Ty1-3、Ty1-1という風に2つのTy1の配列が交互に現れているようにも見えた（図19-C パネル1段目）。タイプIIのRD101-35も同様の特徴を持っていた。この2例に関しては、再編領域に存在していた2箇所のTy因子だけで説明することもできるし（図19-C パネル1段目）、第3のTy因子が関与したとも解釈できる（図19-C パネル2段目）。興味深いことに、RD101-1は1つのTy因子を残す形でTy1-2の上流の配列とTy1-5の下流の配列が繋がった異常染色体を持っていたのだが（図15-B パネル2段目）、間に残されたTy因子はTy1-2、Ty1-3およびTy1-5が融合したような配列であった（図15-B パネル1段目を参照）。このことは、2回の組換えが同時あるいは連続的に起こる可能性を示唆している。

IV 考察

本研究では、二倍体生物におけるLOHを分子レベルで理解するために、二倍体出芽酵母の体細胞分裂時において自然に起こる遺伝的変化についての解析を行った。本研究において構築されたLOH検出系では、片方の第III染色体の右腕の中央付近（III-205領域）に挿入したURA3遺伝子の喪失を指標とすることにより、点突然変異から染色体レベルでの大きな変化までを同時に検出することが可能である（図1）。したがって、LOHをもたらす様々な遺伝的変化の寄与度を直接比較することが出来る。これまでにも、内在性のCAN1遺伝子、LYS2遺伝子、MAT遺伝子、URA3遺伝子、CYH2遺伝子を標的としたLOH検出系が構築されているが（Campbell et al.,

1975 ; Malone et al., 1980 ; Esposito et al., 1982 ; Hartwell and Smith, 1985 ; Meeks-Wagner and Hartwell, 1986 ; Esposito et al., 1994 ; Bruschi et al., 1995) 、これらの研究では同一染色体上にある1つあるいは複数の遺伝マーカーを解析することによって、相同染色体間組換えや染色体喪失が遺伝マーカーのLOHの大部分を占めていることを明らかにしている。それに対し、*URA3*遺伝子が不活化した640個もの細胞の染色体形態をPFGEおよびPCRを用いて直接解析した本研究においては、染色体喪失、相同染色体間組換えによるものと思われるものに加えて、異常染色体を形成するようなLOHも多数観察された(図7および表6)。以下に、それぞれの遺伝的变化とその発生メカニズムについて詳しく述べる。

1. 染色体喪失

1-1. 第III染色体における染色体喪失

640個の5-FOA^rクローンの第III染色体をPFGEおよびサザンブロッティングを用いて直接観察したところ、62%の細胞では第III染色体のコピー数が2から1に変化していた(図7-A)。第III染色体上に内在するもう一つのヘテロマーカーである*MAT*遺伝子座を解析した結果、*URA3*遺伝子を挿入した方と同じ染色体上に存在していた*MATa*遺伝子も同時に喪失していたため、これらの細胞は染色体喪失によるLOHであると結論した。本研究で測定した第III染色体の喪失の発生頻度は 1.3×10^{-4} であった(表6)。これまで報告されている出芽酵母における第III染色体の染色体喪失の発生頻度は 10^{-4} 、発生率は 10^{-5} 程度であり(Campbell et al., 1975 ; Surosky and Tye, 1985 ; Surosky et al., 1986 ; Runge et al., 1991)、本研究の結果はこれらの結果とよく一致する。このことより、本研究では片方の第III染色体に人工的にマーカー遺伝子を挿入しているが、この挿入自体が少なくとも染色体喪失の発生に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

1-2. 染色体喪失の分子メカニズム

染色体喪失の発生メカニズムに関しては、現在いくつかの機構が考えられている。第一の可能性は細胞分裂時の不均等分裂である。分裂装置によって姉妹染色单体が2つの娘細胞に均等に分配されなければ、染色体を1本持つ細胞と3本持つ細胞が同時に出現することになる。実際に、セントロメア蛋白質や微小管蛋白質の変異株

表6 二倍体出芽酵母の第III染色体右腕上で自然に起こるLOH

遺伝的変化の種類	発生頻度 ($\times 10^{-5}$)	割合 (%)
染色体喪失	13	62
相同染色体間組換え	6.7	30
異所性組換え		
<i>MAT-HMR</i> 間の染色体内欠失	0.27	2.0
第III染色体間の不等交叉	0.62	4.4
転座	0.22	1.6
合計	20	100

は染色体喪失を高頻度を起こすことが知られている (Cai and Davis, 1990 ; Gerring et al., 1990) 。

第二の可能性としてはヌクレアーゼによる分解が挙げられる。染色体上に二重鎖切断が起こると種々の修復機構によって修復されるが、修復されなかったもの、あるいはセントロメアやテロメア領域まで分解されてしまったものは染色体の喪失につながる事が推定される。組換えおよび放射線照射により引き起こされるDNA損傷後の修復に関与する遺伝子の1つである*RAD52*遺伝子の変異株では、染色体喪失の発生頻度が上昇することが報告されている (Mortimer et al., 1981 ; Haber and Hearn, 1985 ; 吉田, 未発表データ)。また、細胞周期の特定の段階で細胞周期の停止が起こる変異体として同定された*cdc*変異株のうち、*cdc6*、*cdc7*、*cdc14*、*cdc16*、*cdc17*、*cdc20*変異株では高頻度に染色体を喪失することが知られている (Hartwell and Smith, 1985 ; Palmer et al., 1990 ; Bruschi et al., 1995)。さらに、最近当研究室において複製開始制御に関与する遺伝子である*orc1*および*orc2*変異株においても、染色体喪失の発生頻度が上昇することが見出されている (渡辺, 未発表データ)。これらの変異株では二重鎖切断の発生頻度が上昇し、その結果、染色体が喪失すると考えられている。

セントロメアを含む領域の欠失も染色体の喪失を引き起こす可能性がある。セントロメアを喪失したDNAは子孫に安定に保持されないことが知られている (Clarke and Carbon, 1980)。本研究で標的とした第III染色体上には、セントロメアを挟む形に複数のTy1因子およびLTR配列が存在しているため (図3-B)、これらの因子間の組換えがセントロメアの喪失、ひいては染色体喪失に繋がる事が推定される。

1-3. 他の染色体における染色体喪失

第III染色体以外でも、主に遺伝学的解析により、いくつかの染色体で喪失頻度が測定されている。*URA3*遺伝子の本来の局在位置である第V染色体上では、 10^{-5} から 10^{-7} の頻度で染色体喪失が起こることが報告されている (Hartwell and Smith, 1985 ; Meeks-Wagner and Hartwell, 1986 ; Santos-Rosa and Aguilera, 1994)。当研究室でも、*URA3*遺伝子の機能喪失およびPFGEと定量的PCRによる直接的な解析から、 1.0×10^{-6} の頻度で第V染色体が失われることを明らかにしている (渡辺, 1997年度修士論文 ; Hiraoka et al., in press)。また、第VII染色体の喪失の発生率は 10^{-5} から 10^{-7} 程度

(Malone et al., 1980 ; Esposito et al., 1982 ; Meeks-Wagner and Hartwell, 1986 ; Bruschi et al., 1995)、第XV染色体の喪失の発生頻度は 10^{-5} 程度 (Santos-Rosa and Aguilera, 1994) であることが報告されている。これらの染色体喪失の発生頻度や発生率を測

定する際に材料とした菌株の遺伝的背景および実験条件が異なるため、上記の全ての結果を直接比較することは難しいが、少なくとも単一の実験系で複数の染色体を標的とした研究でも、染色体ごとに喪失の発生頻度あるいは発生率が5-100倍違っていた (Meeks-Wagner and Hartwell, 1986; Santos-Rosa and Aguilera, 1994; 渡辺, 1997年度修士論文; Hiraoka et al., in press)。このように、染色体の喪失頻度が染色体ごとに異なることは、染色体喪失が染色体特異的に存在する因子に依存して起こる可能性を示唆している。つまり、先に述べたように、染色体の分離に関与するセントロメアの配列の違いや、染色体脆弱部位の有無、繰り返し配列の存在様式等が染色体喪失の発生に影響を及ぼしているのかもしれない。

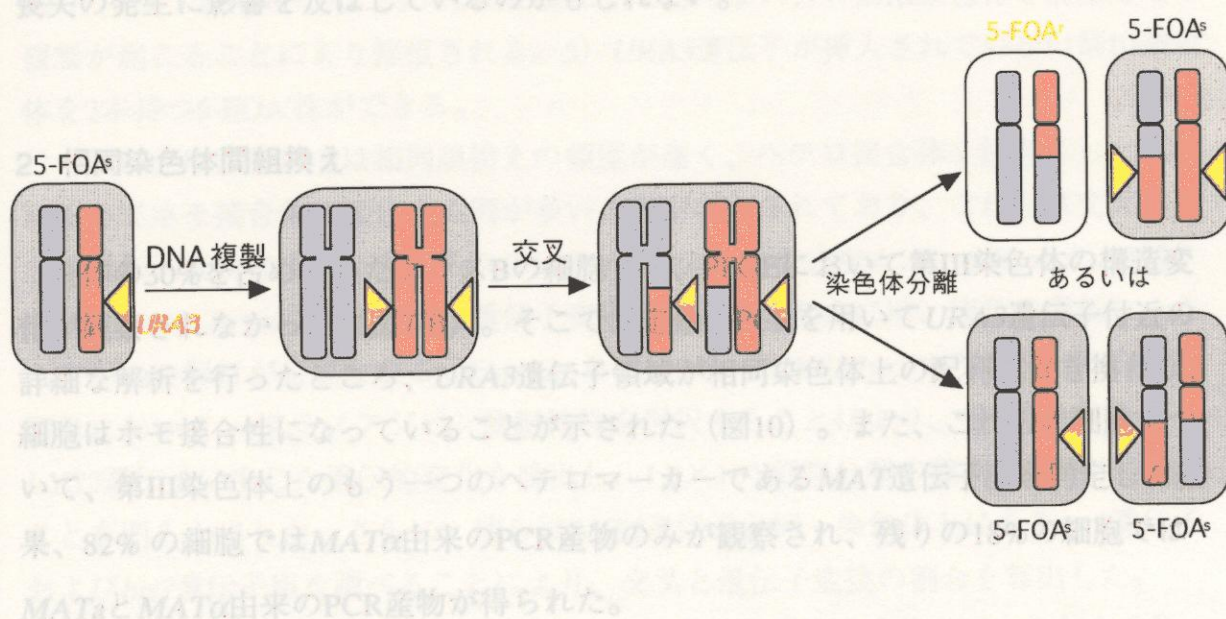


図22 相同染色分体間の交叉によるLOH

URA3遺伝子が挿入された方の第III染色体を赤色、もう一方の第III染色体を青色、URA3遺伝子を黄色の三角で示す。DNA複製後、相同染色分体間で交叉が起こると、その後の染色体分離により、1/4の確立でURA3遺伝子を持たない細胞が生じる。

持つ二倍体酵母が1/4の確率で出現する (図22)。一般に、体細胞分裂時においても、交叉の頻度は物理的距離にはほぼ比例して起こることが知られている (Malone et al., 1980; 渡辺, 1997年度修士論文; 興那嶺, 1998年度修士論文; Hiraoka et al., in press)。SGDによるとCEN III-MATaの物理的距離は86 kb、MATa-URA3の物理的距離は5 kbであるため、もしクラスBの細胞のLOHが交叉によるものであれば、CEN III-MATa間で交叉が起こったもの ($\alpha\alpha$) がクラスBの細胞のうちの95%、MATa-URA3間で交叉が起こったもの ($a\alpha$) が残りの5%を占めることが予想される。これは、実際の解析結果と良く一致していることから、染色体レベルでのサイズ変化もコピー数変化も見られなかったクラスBの細胞は交叉によってホモ接合体に

定する際に材料とした菌株の遺伝的背景および実験条件が異なるため、上記の全ての結果を直接比較することは難しいが、少なくとも単一の実験系で複数の染色体を標的とした研究でも、染色体ごとに喪失の発生頻度あるいは発生率が5-100倍違っていた (Meeks-Wagner and Hartwell, 1986; Santos-Rosa and Aguilera, 1994; 渡辺, 1997年度修士論文; Hiraoka et al., in press)。このように、染色体の喪失頻度が染色体ごとに異なることは、染色体喪失が染色体特異的に存在する因子に依存して起こる可能性を示唆している。つまり、先に述べたように、染色体の分離に関与するセントロメアの配列の違いや、染色体脆弱部位の有無、繰り返し配列の存在様式等が染色体喪失の発生に影響を及ぼしているのかもしれない。

2. 相同染色体間組換え

全体の30%を占めていたクラスBの細胞では、PFGEにおいて第III染色体の構造変化が観察されなかった (図7-B)。そこで、定量的PCRを用いて *URA3* 遺伝子付近の詳細な解析を行ったところ、*URA3* 遺伝子領域が相同染色体上の配列に置き換わり、細胞はホモ接合性になっていることが示された (図10)。また、これらの細胞について、第III染色体上のもう一つのヘテロマーカである *MAT* 遺伝子座を同定した結果、82% の細胞では *MAT α* 由来のPCR産物のみが観察され、残りの18%の細胞では *MATa* と *MAT α* 由来のPCR産物が得られた。

結果の項で少し述べたとおり、ホモ接合性になる遺伝的变化としては、少なくとも次の4通りが考えられる。1つ目の機構は相同染色体間の交叉である。体細胞分裂のDNA合成期以後に第III染色体のセントロメアと *URA3* 遺伝子の間で交叉が起こると、その後の染色体分離により、*URA3* 遺伝子が挿入されていない第III染色体を2本持つ二倍体酵母が1/4の確率で出現する (図22)。一般に、体細胞分裂時においても、交叉の頻度は物理的距離にほぼ比例して起こることが知られている (Malone et al., 1980; 渡辺, 1997年度修士論文; 奥那嶺, 1998年度修士論文; Hiraoka et al., in press)。SGDによると *CEN III-MATa* の物理的距離は86 kb、*MATa-URA3* の物理的距離は5 kbであるため、もしクラスBの細胞のLOHが交叉によるものであれば、*CEN III-MATa* 間で交叉が起こったもの (α/α) がクラスBの細胞のうちの95%、*MATa-URA3* 間で交叉が起こったもの (a/α) が残りの5%を占めることが予想される。これは、実際の解析結果と良く一致していることから、染色体レベルでのサイズ変化もコピー数変化も見られなかったクラスBの細胞は交叉によってホモ接合体に

なったという可能性が示唆された。

遺伝子変換によるマーカー遺伝子の喪失が2つ目の機構である。遺伝子変換の分子機構に関しては、Hollidayモデル (Holliday, 1964)、Meselson-Raddingモデル

(Meselson and Radding, 1975) および二重鎖切断モデル (Szostak et al., 1989) 等が提唱されている。二重鎖切断モデルによると、遺伝子変換によるLOHは以下のように説明できる。1) 第III染色体上の*URA3*遺伝子が挿入された近傍で二重鎖切断が起こる。2) *URA3*遺伝子を含む領域がエキソヌクレアーゼにより分解される。3) 一本鎖になったDNAがもう1本の相同染色体と対合し、2つのHolliday構造が形成される。4) ギャップが生じたところは*URA3*遺伝子を持たない方の第III染色体を鋳型として複製が起こることにより修復される。5) *URA3*遺伝子が挿入されていない第III染色体を2本持つ5-FOA⁻株ができる。

一般に、出芽酵母では相同組換えの頻度が高く、ヘテロ接合体を材料としたLOHにおいてホモ接合体に変化する例が多いことが報告されており、これらは交叉あるいは遺伝子変換によると考えられている (Esposito et al., 1994; Bruschi et al., 1995; Hiraoka et al., in press)。交叉と遺伝子変換を識別するためには、複数の遺伝マーカーを用いた解析が必要となる。Espositoら (1994) は*LYS2/lys2*ヘテロ接合体の出芽酵母において α -アミノアジピン酸耐性株を選択することにより、第II染色体上の*LYS2*遺伝子に生じた遺伝的变化を検出し、 1.2×10^{-4} /細胞分裂の確率でLOHが起こることを明らかにした。さらに、彼らは*LYS2*遺伝子と同一染色体上にある*tyr1*遺伝子および*his7*遺伝子座を調べることにより、交叉と遺伝子変換の割合を算出した。

Espositoらの報告によると交叉は全体の82%、遺伝子変換は全体の18%を占めており、それ以外の変化は検出されなかった。一方、同グループのBruschiら (1995) は第VII染色体上の*CYH2*遺伝子を標的遺伝子としたLOH検出系を用い、*CYH2/cyh2*ヘテロ接合体におけるLOHの発生率を測定した (2.4×10^{-5} /細胞分裂)。彼らは*CYH2*遺伝子と同一染色体上にある*leu2*遺伝子および*ade5*遺伝子座を調べることにより、遺伝的变化の84%が交叉、16%が遺伝子変換であったことを明らかにした。本研究では基本的に一方の染色体に*URA3*遺伝子を挿入したこと以外は特別な操作をしていないため、交叉と遺伝子変換の割合を同定することは困難である。しかし最近、当研究室の梅津らによって3つのマーカー遺伝子を用いたLOH検出系が開発され、その割合が明らかになった (Hiraoka et al., in press)。この実験系で用いられた二倍体酵母

(RD301) の片方の第III染色体には、右腕のIII-205領域に挿入した*URA3*遺伝子のほかにも、左腕に内在性の*LEU2*遺伝子、およびIII-314領域に挿入した*ADE2*遺伝子が存在している。この細胞を用い、5-FOA⁻に変化した細胞が*LEU2*遺伝子および*ADE2*遺伝子を保持しているか調べた結果、全体の34%が交叉、0.27%が遺伝子変換による

LOHであることが示唆された。したがって、本研究で得られたクラスBのホモ接合体も、ほとんどが交叉によってマーカー遺伝子を喪失した可能性が高いと考えている。

クラスBのLOHを生じる3つ目の機構として、欠失変異が挙げられる。マーカー遺伝子の大きさの前後100 bpまでの欠失変異である場合には、定量的PCRの際にPCR産物の大きさの差異を検出することは難しいため、クラスBの細胞がこのような欠失変異体である可能性を完全には除去しきれない。また、第III染色体上に人工的に*URA3*遺伝子を挿入した結果、挿入した*URA3*遺伝子が切り出されたということが考えられる。しかしながら、次に述べる理由から、上記の2つの可能性は否定的である。1つ目は、第III染色体のIII-205領域に*URA3*マーカーを挿入した一倍体出芽酵母YMH1における5-FOA⁺細胞の発生頻度 (4.3×10^{-7}) がクラスBの発生頻度 (6.7×10^{-5} 、表6) よりも100倍低かった、つまり、クラスBの発生が二倍体細胞に特異的な現象であったことである。一倍体で起こる遺伝的变化と二倍体で生じるそれとは必ずしも一致するとは限らないが、*URA3*遺伝子のみ、あるいは*URA3*遺伝子の大きさの前後100 bpまでの欠失変異の発生頻度が一倍体と二倍体で100倍も変化するとは考えにくい。2つ目の根拠は、*MAT*遺伝子座を解析した結果、82%の細胞において*MAT* α 由来のPCR産物のみが観察されたことである。*URA3*遺伝子を含む比較的小さな欠失は、起こっていたとしても、*a*/ α 型を示した残りの18%の細胞に限られる。

染色体喪失後の重複 (chromosome loss and reduplication) がホモ接合体を生じる4つ目の可能性である。この現象は、ヒトの癌化した細胞で高頻度に見られる (Cavenee et al., 1983; Lasko et al., 1991)。しかしながら、上述のトリプルマーカーを用いたLOH検出系において、検出された全てのホモ接合体の左腕に内在する*LEU2*遺伝子が保持されたままであったことより、このLOHが染色体喪失後の重複によるものであるという可能性は否定されている (Hiraoka et al., in press)。

3. 点突然変異およびトランスポゾンの挿入による遺伝子破壊

本研究では塩基置換や*URA3*遺伝子内の小さな欠失・重複などの点突然変異およびトランスポゾンの挿入変異は検出されず、両者の発生頻度は 3.1×10^{-7} 以下であることが推定された (表6)。実際、トリプルマーカーを用いたLOH検出系において、第III染色体に挿入した*URA3*遺伝子内では点突然変異が 7.1×10^{-8} の頻度で起こっていることが示されている (Hiraoka et al., in press)。*URA3*遺伝子の本来の局在位置である第

V染色体上では、点突然変異の発生率は 10^{-7} 程度であることが知られている (Kunz et al., 1998)。また、二倍体出芽酵母におけるトランスポゾン、細胞分裂あたり 10^{-9} から 10^{-7} の頻度で転移することが報告されている (Boeke, 1991)。本研究の結果は、これらの研究結果とは矛盾しない。

4. 異常染色体の形成を伴うLOH

本研究の最も特徴的なことは、染色体レベルでのサイズ変化を起こした異常染色体を多数分離できたことである (図7-C)。酵母の第III染色体の長さは330 kbであるが、得られた異常第III染色体の長さに関しては、もとの染色体と比べて110 kb短くなったものから640 kb長くなったものまで、様々な大きさのものが確認された (表4)。そこで、異常染色体の発生メカニズムに迫るために、異常染色体の再編部位を塩基配列レベルで決定した。

片方の第III染色体にのみURA3遺伝子をもつ二倍体細胞 (RD101) から単離された45例の異常染色体の構造を解析した結果、染色体欠失、第III染色分体間の不等交叉、転座等の染色体再編が検出された。それぞれの遺伝的変化の検出数およびその再編に寄与した因子に関しては表5に、再編領域の塩基配列解析および制限酵素マッピングより推定された異常染色体の構造については図23に、異常染色体の形成のモデルに関しては図24にまとめて記した。

最も多く見つかったのはMAT-HMR間の染色体欠失 (クラスI、図14) で、これは全体の1/4を占めていた。片方の第III染色体上に3つのマーカー遺伝子を持つ二倍体 (RD301) を用いて同様の解析をした場合でも、全く同じ欠失が同様の頻度 (約 3×10^{-6} 、表6) で観察され、その欠失した染色体は他の2つのマーカーを保持していたことより、このMAT-HMR間の染色体欠失は単一染色体内で相同組換えが起こった結果であると考えられている (Hiraoka et al., in press)。

本研究で材料とした細胞は二倍体であるため全ての染色体は2本ずつ存在しているが、明らかに相同染色体間の不等交叉に由来すると思われる異常染色体が7例見つかった (クラスII)。この異常染色体ではセントロメアとURA3マーカーの間にあるTy因子間の配列が欠失しており、さらにURA3マーカー挿入領域が相同染色体上の配列と置き換わっていた (図15)。

クラスIIが第III染色体の右腕間の不等交叉による異常染色体であるのに対し、クラスIIIおよびクラスIVは第III染色体の右腕-左腕間の不等交叉によるものであると考えられた (図16および図17)。これらの異常染色体を生じる組換えに関しては、

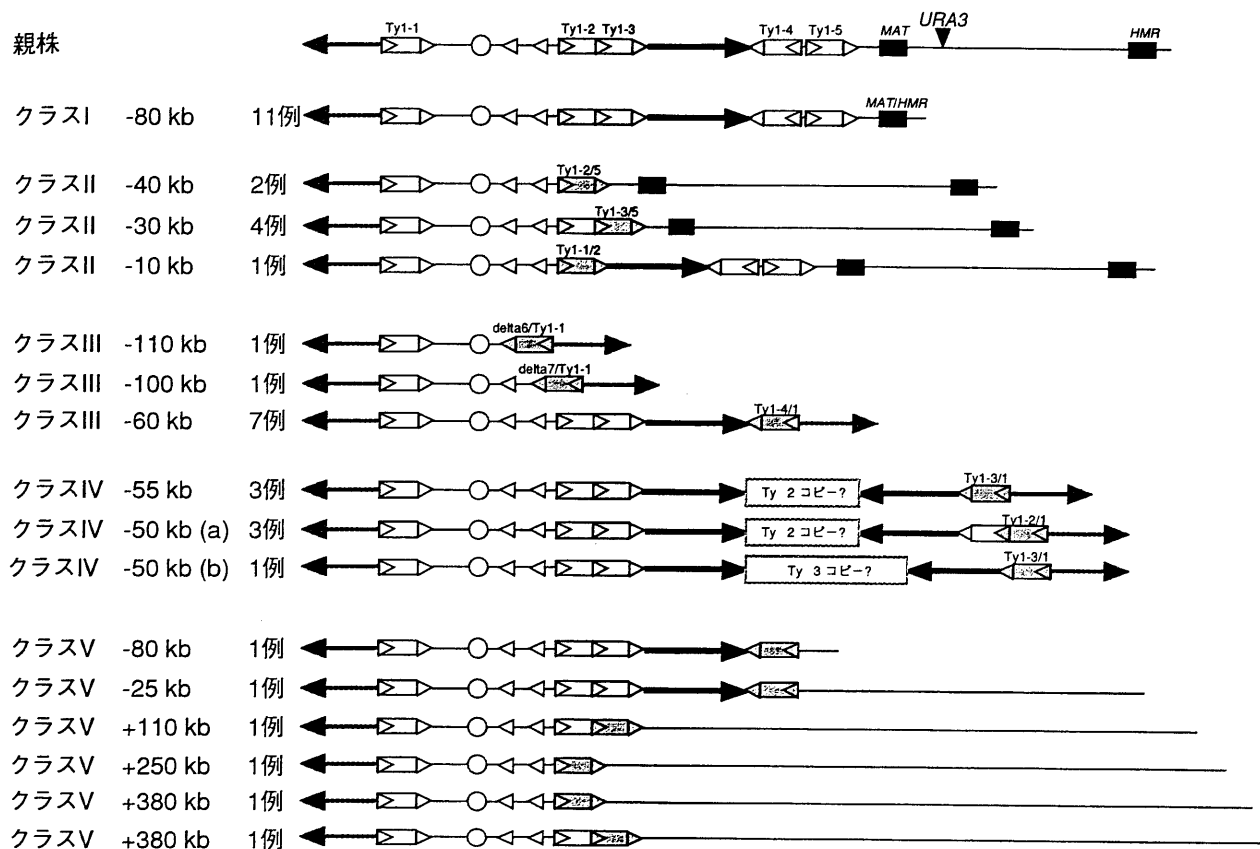


図23 異常第III染色体の構造のまとめ

染色体の配列を横線、左腕テロメアからTy1-1までの領域を太い灰色の矢印、Ty1-3からTy1-4までの領域を太い黒の矢印、セントロメアを白丸、LTR配列を三角形、Ty因子を三角形と四角形、MATおよびHMR遺伝子座を黒い四角形で表す。染色体再編の結果、融合したTy因子に関しては、灰色の三角形と四角形でマークした。それぞれのクラスの詳細については、本文および図14-18を参照のこと。

図24 異常第III染色体の形成を伴うLOHの3つの経路

URA3遺伝子が挿入された方の第III染色体を赤色、もう一方の第III染色体を青色、第III染色体以外のある染色体を紫色、URA3遺伝子を黄色の三角、Ty因子を緑色の三角と四角で示す。野3生型二倍体出芽酵母の体細胞分裂時に第III染色体上で自然に起こる異常染色体の形成経路を3色の矢印で表示した。第一の経路は、第III染色体特異的に存在しているMATおよびHMR遺伝子座間の染色体内欠失である（赤の矢印）。第二の経路としては、第III染色分体間の不等交叉が挙げられる（青の矢印）。DNA複製後、相同染色分体間でずれて交叉が起これば、その後の染色体分離により、1/4の確立でURA3遺伝子を喪失した異常第III染色体を持つ細胞が生じる。第三の経路は転座である（緑の矢印）。基本的な経路は不等交叉と同様であるが、第III染色分体と他の染色分体間で組換えが起こるという点が異なる。第二および第三の組換えに関しては、Ty因子を介するものが多いことが今回明らかになった。

86

相同染色分体間と姉妹染色分体間の2通りの可能性が考えられる。相同染色体が体細胞分裂時にも近い位置に存在しているかどうかは未だに議論中であるが (Kleckner and Weiner, 1993 ; Haber and Leung, 1996 ; Jin et al., 1998) 、少なくとも姉妹染色分体は分裂後期までは近接していることが知られている。第III染色体の右腕-左腕間の不等交叉が45例中18例と数多く見つかったことは、この再編が姉妹染色分体間の組換えによるものであることを示唆しているのかもしれない。クラスIIIおよびクラスIV型の再編に関与した染色分体を同定するためには、片方の染色体の左腕テロメアからTy1-1の間に、2本の染色体を区別するためのマーカーを挿入する必要がある。例えば、*URA3*遺伝子を挿入した方の染色体 (YMH1由来) について、このタイプの染色体再編部位をクローニングする際に用いたプライマー (d3W82) とTy1-1の間に (図16-Cを参照) 、点突然変異を導入して新たな制限酵素部位を構築する。クラスIIIおよびクラスIV型の異常染色体の再編領域を増幅したPCR産物とその制限酵素によって切断されれば、その異常染色体は姉妹染色分体間の不等交叉に起因していることが示される。

クラスIVの異常染色体では、第III染色体の右腕-左腕間の不等交叉部分に加えて右腕上のTy因子に挟まれた領域の部分重複が観察された (図17) 。興味深いことに、8例中7例のクラスIVの異常染色体ではTy因子に挟まれた領域が逆向きに重複しているように見えた。この重複が姉妹染色分体間の不等交叉によるものだと仮定すると、逆方向に組換わる方 (Ty1-4とTy1-5) が順方向に組換わる方 (Ty1-2あるいはTy1-3とTy1-5) よりも近くにあるため起こりやすいのかもしれない (図17-Cを参照) 。Ty1-4とTy1-5間で不等交叉が起こるとセントロメアを2つ持つ染色体ができるが、そのような染色体は不安定で染色体分配時に二重鎖切断が高頻度になると予想される。その結果、修復に失敗したものは染色体喪失に繋がることが予想されるため、Ty因子を介してセントロメアをなくす形に欠失した染色体のみがクラスIV型の異常染色体として検出されるのかもしれない。このようなTy因子が介在する複雑な再編例は、重複あるいは逆位を伴う染色体欠失例等、他にもいくつか報告されている

(Chaleff and Fink, 1980 ; Roeder and Fink, 1980 ; Liebman et al., 1981 ; Roeder and Fink, 1982 ; Roeder et al., 1984 ; Downs et al., 1985 ; Rothstein et al., 1987 ; Picologlou et al., 1988 ; Kupiec and Petes, 1988a ; Sutton and Liebman, 1992 ; Casaregola et al., 1998) 。その中でもRoederらが提唱したモデルに従うと (Roeder and Fink, 1982) 、クラスIVの異常染色体を、左腕テロメアからFRAHSにあるTy因子までの領域、RAHSにあるTy因子からFRAHSにあるTy因子までの領域、LAHSにあるTy1-1から左腕テロメアまでの領域という3つのDNA間の遺伝子変換で説明することもできる。しかしながら、このモデルでは逆方向の重複が優先的に起こる理由を説明することが困難である。こ

のモデルで説明するためには、順方向に重複した染色体は不安定だと仮定する必要がある。

クラスI-IVの異常染色体は全て第III染色体間の再編によるものであるが、本研究では第III染色分体と第III以外の染色分体との組換えの結果生じたと考えられる転座型の異常染色体も観察された（クラスV、図18）。過去にも、Ty因子を介する転座例が塩基配列解析によりいくつか示されている（Breilmann et al., 1985；Casaregola et al., 1998；Rachidi et al., 1999）。

クラスIの異常染色体が第III染色体特異的に存在しているMAT-HMR間の組換えに起因していたのに対し、クラスII-Vの異常染色体の再編領域を塩基配列レベルで解析した結果、Ty1間の組換えが少なくとも82%（28/34）を占めていることが明らかになった（表5）。また、Ty1-LTR間の再編も5.9%（2/34）見つかった（表5）。残りの4例については未だに再編部位が特定されていないが、Genome scanningで同定された境界領域の位置から、この再編にTy因子あるいはLTR配列が関与している可能性は高い（図17-Aおよび図18-A）。

5. 検出系に依存して異常染色体は見つかる

我々の実験進行中に、Chenらは一倍体出芽酵母を材料として異常染色体の再編領域の塩基配列解析を行い、*rfa1*、*rad27*および*mre11*変異株では3-20 bp以下の低い相同領域を介して組換えが起こることを報告した（Chen, 1998；Chen and Kolodner, 1999）。彼らが指標とした第V染色体上のCAN1遺伝子とセントロメアの間には、Tyを伴わないdelta因子が6つあるのみで、CAN1遺伝子とテロメアの間にはTy因子もLTR因子も見つかっていない。この染色体形状の違いが原因で、彼らの系ではTy因子あるいはLTR配列を介した染色体再編例が見つからなかった可能性が考えられる。同様に、当研究室の以前の報告で第V染色体由来の異常染色体が検出されなかったのは（渡辺, 1997年度修士論文；Hiraoka et al., in press）、第III染色体の再編のほとんどを占めていたMAT、Ty因子といった繰り返し配列が第V染色体左腕上には存在していないことが原因であったと考えられる。第V染色体上のセントロメアと内在性URA3遺伝子との間には、完全長のTy因子は見つかっておらず、Tyを伴わないdelta因子が3つ確認されているのみである。

我々の結果と彼らの結果の違いとして考えられる第2の可能性は、誘導される修復系の違いである。両方とも、ゲノムプロジェクトにも用いられたS288c系の出芽酵母を材料としているが、我々が用いた株は野生型であるため生じた遺伝的変化に関し

ては体細胞分裂中に自然に起こる内在性損傷が開始要因であると推定される。それに対し、Chenらが用いた株は*rfal*等の変異株であるため、染色体の二重鎖切断が高頻度に誘発される可能性が挙げられる。これらの開始要因の違いによって誘導される修復系は異なる可能性が考えられるが、そのために再編に寄与した染色体側の要因が変化したのかもしれない。

検出された再編部位の違いに関して考えられる第3の可能性は、検出できる再編の違いを反映しているということである。一般に、一倍体細胞を用いた解析では、生存に必須な遺伝子を含む欠失は検出できない等の問題点がある。それに対し、本研究では二倍体出芽酵母を材料としているため、点突然変異といった塩基配列レベルでの小さな変異から染色体欠失や転座等の染色体レベルでの大きな変化までを広く検出可能である。この非選択的な検出系でTy因子あるいはLTR配列を介した異常染色体が数多く見つかったことは、異常染色体を生じる再編に関して、Ty因子が重要な役割を果たしていることを意味している。

実際、過去にも、*CYC1*や*sup4*をマーカーとした前進変異検出系あるいは*his4-912* (*HIS4*のプロモーター領域にTy1が挿入されている)の復帰変異検出系において、Ty因子あるいはLTR配列を介した染色体欠失が一倍体細胞内でも 10^{-5} から 10^{-7} の頻度で起こることが報告されている (Rothstein, 1979; Liebman et al., 1979; Winston et al., 1984; Downs et al., 1985)。また、このTy因子間の組換えに着目し、特定のTy因子内に挿入したマーカー遺伝子の喪失を指標として、限定されたTy因子間の再編を選択的に検出している研究もある (Roeder and Fink, 1982; Roeder et al., 1984; Kupiec and Petes, 1988a, b; Melamed et al., 1992)。そのような実験から、Ty因子間の遺伝子変換は同じ染色体上の近接した位置にあるもの同士で起こりやすいこと (Roeder et al., 1984)、及び、TyのcDNAが関与する組換えがあることが明らかになっている (Melamed et al., 1992)。

6. なぜTy因子を介する異常染色体が数多く見つかるのか？

では、なぜTy因子が関与する異常染色体が多いのだろうか？考えられる1つ目の要因は、Ty因子の相同領域が5.9 kbと長いことである。人工的に構築した繰り返し配列間の組換え頻度を測定した論文によると、相同領域の長さが230 bpから1 kb程度の場合には、相同領域の長さに比例して組換え頻度が10倍程度増加していた (Yuan and Keil; Jinks-Robertson, 1993)。相同領域の長さが750 bpから13 kbの場合では、組換え頻度に有意な差は見られなかった (Yuan and Keil, 1990)。出芽酵母のゲノム上に

は、Ty因子の他に、LTR配列やtRNAといった散在性繰り返し配列が存在しているが、これらの長さは70 bpから340 bp程度でしかない。塩基配列を決定した30例中、28例がTy1-Ty1間の組換え、2例がTy1-LTR間の再編であったことは、相同領域の長さの影響かもしれない（表5）。

出芽酵母のゲノム上には52コピーのTy因子及び268コピーのLTR配列が見つかり、これらの配列間の相同性も様々であるが、本研究ではTy1同士の再編では96%以上、Ty1-LTR間の再編では86-90%の相同性を持つものが検出された（表5）。この配列の相同性も組換えに影響を及ぼす因子のうちの1つである。2つの配列間の相同性が低くなるにつれてその間の組換えも起こりにくくなることが証明されている

（Datta, 1997；Chen and Jinks-Robertson, 1999）。彼らの報告によると、350 bpの配列間の組換えにおいて、相同性が100%の場合は 10^{-6} の頻度で組換えが起こるのに対し、相同性が90%から70%の場合には組換え頻度が 10^{-8} から 10^{-10} まで指数関数的に減少していた（Datta, 1997；Chen and Jinks-Robertson, 1999）。ミスマッチ修復関連タンパク質の欠損株ではこの減少が抑えられたため、この負の制御にミスマッチ修復タンパク質が関与していることは明らかである（Datta, 1997；Chen and Jinks-Robertson, 1999）。Ty因子間の異所性組換えは異常染色体に繋がるが、Ty因子の配列の多様性とミスマッチ修復タンパク質の働きにより、そのような再編が抑制されていると考えられる。

第III染色体上には5つのTy1が存在しているが（図3-B）、その全てについてはほぼ同程度に異常染色体の再編例が見つかった（表5）。それに対し、第III染色体上には20個以上のdelta因子があるが（図3-B）、その中で再編例が確認されたのは、III-123にあるdelta6とIII-142にあるdelta7が関するもののみであった（表5）。例えば、Ty1-4と左腕上にある右向きのLTR配列との組換えもクラスIII型の染色体再編に繋がる。これらの配列間の相同性は85-99%と実際に見つかった配列間の相同性（84-89%）とはほぼ同じである。解析数が少ないため断言できないが、以上の結果は単なる相同性の違いだけでは説明できず、tRNA等の周辺領域の配列の影響があるかもしれない。あるいは、LTR配列は転写のプロモーターを含んでいるため、このプロモーター活性の強度の違いが再編に影響を及ぼしている可能性も考えられる。Ty因子間（Nevo-Caspi and Kupiec, 1994）および他の繰り返し配列間の組換えにおいて（Klar et al., 1981；Voelkel-Meiman, 1987；Stewart and Roeder, 1989；Nicolas et al., 1989；Thomas and Rothstein, 1989；Bratty et al., 1996）、転写が組換えを促進しているという論文がいくつか報告されている。

7. 染色体内欠失と染色体間の異所性組換えに関して

当研究室の梅津らの報告では、単一染色体内欠失に関して*MAT-HMR*間の再編の
みが 10^{-6} の頻度で検出され、それ以外の配列を介した再編は観察されなかった

(Hiraoka et al., in press)。今回の結果でも、第III染色体上に挿入したマーカー遺伝子を挟むような形で第III染色体の右腕同士が融合したのは、この*MAT-HMR*間の染色体欠失のみであった(図13)。これらの結果は、第III染色体の右腕の中央付近に挿入した遺伝マーカーの喪失を伴う単一染色体内組換えにおいて、*MAT-HMR*間の染色体内欠失が優先的に起こることを示唆している。梅津らは両者の相同領域の長さが1.6 kbとLTR配列(330 bp程度)よりも長いこと、および、*MAT-HMR*間のとりうる特異的な単一染色体内の高次構造(Wu and Haber, 1995; Wu et al., 1996; Szeto et al., 1997)がその原因ではないかと提唱しているが(Hiraoka et al., in press)、それ以外にも、*MAT-HMR*間の相同性が99%と高いことも要因であったと考えられる(表5)。というのは、第III染色体右腕上には、挿入したマーカー遺伝子を挟むような形でLTR配列は複数存在しているが(図3-B)、それらの配列間の相同性は52-79%しかないからである。一つ注意すべきことは、第III染色体右腕上には同方向のTy1が3つ存在しているが(図3-B)、それらの因子間の染色体内欠失は起こっていても本研究の実験系では検出不可能なことである。この染色体異常を検出するためには、マーカー遺伝子の位置をこれらの因子間に設定し直す必要があるだろう。

一方、染色体間の異所性組換えに関しては、Ty1あるいはLTR因子を介したものが 10^{-5} から 10^{-6} の頻度で見つかった(表5および表6)。この値は、Ty因子関連の染色体内欠失の発生頻度(10^{-5} から 10^{-7})とほぼ一致する(Rothstein, 1979; Liebman et al., 1979; Winston et al., 1984; Downs et al., 1985)。これらの結果より、Ty因子やLTR配列を介した異所性組換えは、単一染色体内、姉妹染色分体間、相同染色分体間、非同源染色分体間を問わず、同程度に生じていることが示唆された。

再編部位に残されたTy因子の全塩基配列を決定した結果、73% (22/30) ではTy因子あるいはLTR配列間の共通配列を介して、離れていた2箇所の領域が融合していた(図19-Bおよび図20-A)。この22例において、再編が起こったと思われる領域を同定したところ、Ty因子内で明らかな組換え位置の偏りは見られなかった(図20-B)。このことから、Ty因子内で特に組換えのホットスポットがあるわけではないことが示唆された。ただし、組換えの鎖交換モデルによると、組換え反応の中間体であるホリデー構造形成時に分岐点が移動するために組換え開始部位と終了部位が一致するとは限らないと言われていることより(Petes et al., 1991)、組換えの最終産物しか検出されないこの実験結果からでは、組換え開始部位のホットスポットが

あるかどうかは未知である。

驚いたことに、残りの8例では切断点2箇所以外のTy因子（第3のTy因子）の配列が染色体の再編部位に見つかった（図19-Cおよび図21）。このような第3のTy因子が介在したと思われるような再編は、本研究特異的ではなく、過去の染色体内欠失例でもいくつか報告されている（Liebman et al., 1981；Roeder and Fink, 1982；Roeder et al., 1984；Downs et al., 1985；Picologlou et al., 1988；Kupiec and Petes, 1988a；Casaregola et al., 1998）。これらの論文では、主に制限酵素マッピングの解析までしか行っていないため、この特徴を持つ再編の割合を過小評価している危険性がある。本研究はTy因子関連の多数の再編例を塩基配列レベルで系統的に解析した初めてのものであるが、Ty因子同士は非常に類似した配列を持っているため、それでもまだ第3のTy因子が関与するような再編の割合を過小評価している可能性が考えられる。つまり、単純に2箇所のTy因子が繋がっているように見えた22例の中にも、同じ塩基配列を持つ第3のTy因子が関与したものがあるかもしれない。

このような複雑な再編がどのようにして生じるのかは判っていない。1つの可能性は、Ty因子内では組換え頻度が高く、2回の組換えも起こりうるというものである。しかしながら、本研究で同定されたTy因子間の異所性組換えの発生頻度は 10^{-5} から 10^{-6} 程度であったため、独立した2回の組換え事象が検出されるとは考えにくい。ただし、クラスIVの異常染色体の形成に関して述べた場合のように、1回目の再編がセントロメアを2つ持つ染色体を産生するために二重鎖切断を高頻度に誘発し、その結果、2回目の組換えが起こるという可能性は考えられる。しかし、3つのTy因子の配列と染色体上の位置を見比べてみたところ、このモデルで説明できるのは、8例中2例のみであった。一方、Roederらは、3箇所のTy因子間の遺伝子変換により、間に第3のTy因子の配列を持つ染色体再編が起こる可能性を指摘している（Roeder and Fink, 1982）。Ty因子が関与する特別な組換えに関しては、他にTy cDNAが介在しているものが知られている（Melamed et al., 1992）。また、二重鎖切断部位にTy因子の一部が挿入されて染色体が修復されたという報告もあり（Moore and Haber, 1996）、そのような修復にTy因子の逆転写酵素が必要とされた（Teng et al., 1996）。このことは、Ty cDNAが二重鎖切断部位の修復に関与した可能性を示唆している。cDNAのような両端を持つDNAは組換えの良い基質となるため（Orr-Weaver et al., 1981）、第3のTy因子はTy cDNAに由来するものかもしれない。

8. 染色体再編の分子メカニズム

既に述べたとおり、本研究において第Ⅲ染色体に挿入したヘテロマーカの喪失に伴う遺伝的变化を同定した結果、62%の細胞は染色体喪失、30%の細胞では相同染色分体間の交叉・遺伝子変換がその原因であると考えられた(表6)。また、残りの8%の細胞の多くは*MAT-HMR*、Ty因子あるいはLTR配列等の相同配列を介した異所性組換えにより、*URA3*マーカを喪失したことが示された(表5、表6および図23)。これらの結果は、ヘテロマーカの喪失に相同組換えの機構が大きく寄与していることを示唆する。

本研究では、相同染色分体間の交叉および繰り返し配列間の異所性組換えに関して、相互組換えとその後の染色体分離によってLOHが起こる可能性を述べた(図22および図24)。しかし、本研究では実験の性質上、5-FOA'となった片方の組換え体しか検出できない。従って、これらの組換えが保存的な相互組換えによるものであるという確証はなく、BIR (break-induced replication) (Malkova et al., 1996)、SSA (single-strand annealing) (Lin, 1984; Maryon and Carroll, 1991; Fishman-Lobell et al., 1992) 等の非保存的組換えによるものである可能性も残されている。

BIRモデルでは、上記の2種類の組換えによるLOHを以下のように説明することが出来る。1) 第Ⅲ染色体上のセントロメアと*URA3*遺伝子の間で二重鎖切断が起こる。2) DNAの末端が5'→3'エキソヌクレアーゼにより分解される。3) 一本鎖になったDNA末端が二本鎖DNAに入り込み、D-ループを形成する。4) 進入した部位からテロメアまでDNAが複製される。5) D-ループが解消され、*URA3*マーカを持たない5-FOA'細胞ができる。このBIRモデルの場合、3) の一本鎖のDNA末端が相同染色体上の同じ位置に進入すれば、正常な大きさの第Ⅲ染色体を2本持つホモ接合体が生じる。それに対し、DNA末端が相同染色体上の異なる位置に入り込んだ場合には本研究で言う染色体欠失型(クラスI) および不等交叉型(クラスII-IV) の異常染色体が生じ、他の染色体上に進入した場合には転座型(クラスV) の異常染色体が形成されることになる。

*MAT-HMR*間の染色体欠失(クラスI) に関しては、次に述べるように、SSAモデルでも説明が可能である。1) *URA3*遺伝子を持つ第Ⅲ染色体上で二重鎖切断が起こる。2) DNA末端が5'→3'エキソヌクレアーゼにより分解され、*MAT*および*HMR*遺伝子座が露出する。3) *MAT-HMR*間で、相補的な配列同士が塩基対合する。4) 突出したDNA末端が切り出され、DNAポリメラーゼによりギャップが埋められる。

相互組換えモデルおよびBIRモデルでは、第Ⅲ染色体の右腕間の異所性組換え(クラスII) に関して、元の染色体より長くなるものと短くなるものが理論上1:1で生じることが予想されが、本研究では後者のみが検出された(図15)。このことより、順方向に部分重複を持つ染色体は非常に不安定で、元の染色体より長くなる形に不

等交叉した染色体はすぐにまた組換えを起こして、元の染色体と同じ長さに戻ったり、短くなったり、染色体喪失に繋がったりして別の遺伝的变化として検出されている可能性が考えられた。

以上、LOHをもたらす3種類の相同組換えの分子メカニズムについて述べた。本研究で同定された染色体再編がどの経路により生じたかを調べるためには、それぞれの組換え経路に依存して特異的に要求される因子の欠損株を用いた解析が必要であろう。

9. 今後の展望

本研究で構築されたLOH検出系は、第III染色体に挿入したURA3マーカーの喪失を第一の指標とし、得られた5-FOA細胞の染色体構造を直接解析することによって、様々な遺伝的变化を同定できるというものである。当研究室では、さらにこの系を発展させて、3つの遺伝マーカーを片方の第III染色体上に持つ二倍体酵母を材料とすることで、より簡便により詳細な遺伝的变化を特定できる実験系も開発されている（Hiraoka et al., in press）。また、第III染色体上の欠失・重複領域を網羅的に検出することができるGenome scanningと名付けられた方法も確立されており、異常染色体の再編領域の系統的な解析も可能である（森, 1997年度修士論文）。これら方法を用いて、組換え欠損変異株、DNA複製異常株等で生じる遺伝的变化の解析をすることは、遺伝的变化の発生メカニズムを解明する大きな手助けになると期待され、実際に当研究室でその研究が始められている。

謝辞

挫折のない人生であれば、それに越したことはないと言う人もいますが、人間は大きな壁を乗り越えてこそ成長していくと私は思います。私にとっての初めての挫折は大学浪人でした。でも今になってみれば、それは私にとって必要な経緯であったと思っています。人生に「もしも」はあり得ませんが、それでも、「もし」私があの時ストレートに大学に進んでいれば、間違いなくこの大学に進学することはありませんでした。この研究室にきたことで、私は生涯忘れられないたくさんの大切な人達、そして、今の研究課題に巡り合うことが出来ました。この出逢いによって、「研究者」としての私だけでなく、ひとりの「人間」としての私も、少なからず成長できたと思っています。はじめから最後まで周りの人々に常に助けていただいた5年間でした。多くの人に支えられて、今の私があることに感謝しています。

本研究を行うにあたり、原核生物分子遺伝学講座 真木寿治教授には、研究に際しての有意義なご指導のみならず、科学的・論理的な考え方や科学者としての自覚等、温かいご助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。真木研究室で過ごした5年間は、私にとって何よりの財産であると思っています。

また、同講座の秋山昌広助教授、真木智子助手、増田雄司博士、関峰秋博士、中澤智子秘書、中嶋淑美秘書、井田慶子氏、並びに学生の皆様には、本研究に関する有意義な議論に加え、研究環境の整備等へのご尽力に対し、深く感謝いたします。さらに、少しずつ違う視点から「出芽酵母において生じる染色体レベルでの遺伝的变化」という大きな目標に向かって一緒に研究に取り組んできた渡辺圭一氏、森昌昭氏、輿那嶺育子氏、吉田純平氏、安島潤氏には、感謝の意を表するとともに、激励の言葉を贈らせていただきます。

特に、出芽酵母の取り扱い方、種々の解析の操作法から、本研究の持つ意義についてまで常に丁寧なご指導と温かい激励を頂きました同講座の梅津桂子助手に対し、心からの謝意を捧げます。梅津桂子助手には、研究面のみならず、私自身の精神的な面に関しても、いつも優しく支えていただきました。梅津桂子助手と一緒に5年間研究できたことを誇りに思います。

最後に、私の希望通りの道を進むことを理解し、終始温かく見守って下さった母には、心から感謝いたしております。

皆様、本当に有り難う御座いました。そして、これからもどうぞよろしくお願い致します。

参考文献

青木 和博 (1995). 大腸菌 *dnaQ* ミューター変異株における突然変異の特異性. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*.

Baudat, F., and Nicolas, A. (1997). Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 5213-8.

Boeke, J. D., LaCrute, F., and Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet.* 197, 345-6.

Boeke, J. D. (1991). Yeast Transposable Elements. In *THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE YEAST SACCHAROMYCES: GENOME DYNAMICS, PROTEIN SYNTHESIS, AND ENERGETICS*, J. R. Broach, J. R. Pringle and E. W. Jones, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 193-261.

Bratty, J., Ferbeyre, G., Molinaro, C., and Cedergren, R. (1996). Stimulation of mitotic recombination upon transcription from the yeast *GAL1* promoter but not from other RNA polymerase I, II and III promoters. *Curr Genet.* 30, 381-8.

Breilmann, D., Gafner, J., and Ciriacy, M. (1985). Gene conversion and reciprocal exchange in a Ty-mediated translocation in yeast. *Curr Genet.* 9, 553-60.

Bruschi, C. V., McMillan, J. N., Coglievina, M., and Esposito, M. S. (1995). The genomic instability of yeast *cdc6-1/cdc6-1* mutants involves chromosome structure and recombination. *Mol Gen Genet.* 249, 8-18.

Cai, M., and Davis, R. W. (1990). Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-

helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell*. 61, 437-46.

Campbell, D. A., Fogel, S., and Lusnak, K. (1975). Mitotic chromosome loss in a disomic haploid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 79, 383-96.

Campbell, J. L., and Newlon, C. S. (1991). Chromosomal DNA replication. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, J. R. Broach, J. R. Pringle and E. W. Jones, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 48-52.

Carle, G. F., and Olson, M. V. (1987). Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 155, 468-482.

Casaregola, S., Nguyen, H. V., Lepingle, A., Brignon, P., Gendre, F., and Gaillardin, C. (1998). A family of laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry rearrangements involving chromosomes I and III. *Yeast*. 14, 551-64.

Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., and White, R. L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*. 305, 779-84.

Chaleff, D. T., and Fink, G. R. (1980). Genetic events associated with an insertion mutation in yeast. *Cell*. 21, 227-37.

Chalker, D. L., and Sandmeyer, S. B. (1990). Transfer RNA genes are genomic targets for de Novo transposition of the yeast retrotransposon Ty3. *Genetics*. 126, 837-50.

Chen, C., Umezu, K., and Kolodner, R. D. (1998). Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae rfa1* mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Mol Cell*. 2, 9-22.

Chen, W., and Jinks-Robertson, S. (1999). The role of the mismatch repair machinery in regulating mitotic and meiotic recombination between diverged sequences in yeast. *Genetics*. 151, 1299-313.

- Chen, C., and Kolodner, R. D. (1999). Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet.* 23, 81-5.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* 110, 119-22.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature.* 287, 504-9.
- Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M., and Jinks-Robertson, S. (1997). Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 9757-62.
- Downs, K. M., Brennan, G., and Liebman, S. W. (1985). Deletions extending from a single Ty1 element in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 5, 3451-7.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 7160-4.
- Esposito, M. S., Maleas, D. T., Bjornstad, K. A., and Burschi, C. V. (1982). Simultaneous detection of changes in chromosome number, gene conversion and intergenic recombination during mitosis of *Saccharomyces cerevisiae* : spontaneous and ultraviolet light induced events. *Current Genetics.* 6, 5-11.
- Esposito, M. S., Ramirez, R. M., and Bruschi, C. V. (1994). Nonrandomly-associated forward mutation and mitotic recombination yield yeast diploids homozygous for recessive mutations. *Curr Genet.* 26, 302-307.
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., and Haber, J. E. (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol.* 12, 1292-303.
- Fujimori, A., Tachibana, A., and Tatsumi, K. (1992). Allelic losses in mutations at the *aprt*

locus of human lymphoblastoid cells. *Mutat Res.* 269, 55-62.

Gerring, S. L., Spencer, F., and Hieter, P. (1990). The *CHL 1 (CTF 1)* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is important for chromosome transmission and normal cell cycle progression in G2/M. *Embo J.* 9, 4347-58.

Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.

Gupta, P. K., Sahota, A., Boyadjiev, S. A., Bye, S., Shao, C., O'Neill, J. P., Hunter, T. C., Albertini, R. J., Stambrook, P. J., and Tischfield, J. A. (1997). High frequency in vivo loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination. *Cancer Res.* 57, 1188-93.

Haber, J. E., and Hearn, M. (1985). Rad52-independent mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* frequently results in chromosomal loss. *Genetics.* 111, 7-22.

Haber, J. E., and Leung, W. Y. (1996). Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 13949-54.

Hartwell, L. H., and Smith, D. (1985). Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae*. *Genetics.* 110, 381-95.

Hawthorne, D. C. (1963). A deletion in yeast and its bearing on the structure of the mating type locus. *Genetics.* 48, 1727-1729.

樋口 久美子, (1996). 自然突然変異における欠失変異の塩基配列特異性. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

平岡 美奈 (1996). 二倍体出芽酵母における染色体の不安定性：遺伝マーカーの喪失を指標にした解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

Hiraoka, M., Watanabe, K., Umezu, K., and Maki, H. Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Genetics.* (in press)

- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi, Volume 5 (Great Britain).
- Honma, M., Hayashi, M., and Sofuni, T. (1997a). Cytotoxic and mutagenic responses to X-rays and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells. *Mutat Res.* 374, 89-98.
- Honma, M., Zhang, L. S., Hayashi, M., Takeshita, K., Nakagawa, Y., Tanaka, N., and Sofuni, T. (1997b). Illegitimate recombination leading to allelic loss and unbalanced translocation in p53-mutated human lymphoblastoid cells. *Mol Cell Biol.* 17, 4774-81.
- Huxley, C., Green, E. D., and Dunham, I. (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.* 6, 236.
- 五十川 亜紗子 (1998). 部分二倍体 $rpsL$ 遺伝子を用いた変異検出系の問題点. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.
- Ji, H., Moore, D. P., Blomberg, M. A., Braiterman, L. T., Voytas, D. F., Natsoulis, G., and Boeke, J. D. (1993). Hotspots for unselected Ty1 transposition events on yeast chromosome III are near tRNA genes and LTR sequences. *Cell.* 73, 1007-18.
- Jin, Q., Trelles-Sticken, E., Scherthan, H., and Loidl, J. (1998). Yeast nuclei display prominent centromere clustering that is reduced in nondividing cells and in meiotic prophase. *J Cell Biol.* 141, 21-9.
- Jinks-Robertson, S., Michelitch, M., and Ramcharan, S. (1993). Substrate length requirements for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 13, 3937-50.
- Judd, S. R., and Petes, T. D. (1988). Physical lengths of meiotic and mitotic gene conversion tracts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 118, 401-10.
- 川上 文清, 高橋 慎博, 井上 浩明, 川村 良久 (1996). 定量的PCR. 蛋白質核酸酵素. 41, 503-509.
- 川野 光興 (1997). 大腸菌染色体DNAにおける自然突然変異の特異性. 奈良先端科学技

- Klar, A. J., Strathern, J. N., and Hicks, J. B. (1981). A position-effect control for gene transposition: state of expression of yeast mating-type genes affects their ability to switch. *Cell*. 25, 517-24.
- Kleckner, N., and Weiner, B. M. (1993). Potential advantages of unstable interactions for pairing of chromosomes in meiotic, somatic, and premeiotic cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 58, 553-65.
- Klein, H. L. (1995). Genetic control of intrachromosomal recombination. *Bioessays*. 17, 147-59.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68, 820-3.
- Kunz, B. A., Ramachandran, K., and Vonarx, E. J. (1998). DNA sequence analysis of spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 148, 1491-505.
- Kupiec, M., and Petes, T. D. (1988a). Allelic and ectopic recombination between Ty elements in yeast. *Genetics*. 119, 549-59.
- Kupiec, M., and Petes, T. D. (1988b). Meiotic recombination between repeated transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 8, 2942-54.
- Lasko, D., Cavenee, W., and Nordenskjold, M. (1991). Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet*. 25, 281-314.
- Lea, D. E., and Coulson, C. A. (1948). The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *Journal of genetics*. 49, 264-284.
- Li, C. Y., Yandell, D. W., and Little, J. B. (1992). Molecular mechanisms of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro. *Somat Cell Mol Genet*. 18, 77-87.

- Liber, H. L., and Thilly, W. G. (1982). Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts. *Mutat Res.* 94, 467-85.
- Liebman, S. W., Singh, A., and Sherman, F. (1979). A mutator affecting the region of the iso-1-cytochrome c gene in yeast. *Genetics.* 92, 783-802.
- Liebman, S., Shalit, P., and Picologlou, S. (1981). Ty elements are involved in the formation of deletions in *DEL1* strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 26, 401-9.
- Lin, F. L., Sperle, K., and Sternberg, N. (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol.* 4, 1020-34.
- Lis, J. T. (1980). Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* 65, 347-53.
- 真木 寿治 (1997). DNA複製エラーの発生と抑制の分子機構. *生化学.* 69, 159-171.
- Malkova, A., Ivanov, E. L., and Haber, J. E. (1996). Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 7131-6.
- Malone, R. E., Golin, J. E., and Esposito, M. S. (1980). Mitotic versus meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics.* 1, 241-248.
- Maryon, E., and Carroll, D. (1991). Characterization of recombination intermediates from DNA injected into *Xenopus laevis* oocytes: evidence for a nonconservative mechanism of homologous recombination. *Mol Cell Biol.* 11, 3278-87.
- Meeks-Wagner, D., and Hartwell, L. H. (1986). Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. *Cell.* 44, 43-52.
- Melamed, C., Nevo, Y., and Kupiec, M. (1992). Involvement of cDNA in homologous recombination between Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 12, 1613-

Meselson, M. S., and Radding, C. M. (1975). A general model for genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 358-61.

Moore, J. K., and Haber, J. E. (1996). Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double- strand breaks. *Nature.* 383, 644-6.

森 昌昭 (1997). 出芽酵母第III染色体における染色体欠失領域の構造解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

Mortimer, R. K., Contopoulou, R., and Schild, D. (1981). Mitotic chromosome loss in a radiation-sensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78, 5778-82.

中山広樹 (1996). バイオ実験イラストレイテッド 3. 本当にふえるPCR.

Nevo-Caspi, Y., and Kupiec, M. (1994). Transcriptional induction of Ty recombination in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 12711-5.

Newlon, C. S., Lipchitz, L. R., Collins, I., Deshpande, A., Devenish, R. J., Green, R. P., Klein, H. L., Palzkill, T. G., Ren, R. B., Synn, S., and et al. (1991). Analysis of a circular derivative of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III: a physical map and identification and location of ARS elements. *Genetics.* 129, 343-57.

Nicolas, A., Treco, D., Schultes, N. P., and Szostak, J. W. (1989). An initiation site for meiotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 338, 35-9.

Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194, 23-8.

大洲 竹晃 (1997). ランフリー *rpsL* 標的遺伝子を用いた複製エラーとその修復機構の解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

Oliver, S. G., van der Aart, Q. J., Agostoni-Carbone, M. L., Aigle, M., Alberghina, L.,

- Alexandraki, D., Antoine, G., Anwar, R., Ballesta, J. P., Benit, P., and et al. (1992). The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature*. 357, 38-46.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., and Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78, 6354-8.
- Paithankar, K. R., and Prasad, K. S. (1991). Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res*. 19, 1346.
- Palmer, R. E., Hogan, E., and Koshland, D. (1990). Mitotic transmission of artificial chromosomes in cdc mutants of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 125, 763-74.
- Petes, T. D., Malone, R. E., and Symington, L. S. (1991). Recombination in Yeast. In *THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE YEAST SACCHAROMYCES: GENOME DYNAMICS, PROTEIN SYNTHESIS, AND ENERGETICS*, J. R. Broach, J. R. Pringle and E. W. Jones, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 407-521.
- Picologlou, S., Dicig, M. E., Kovarik, P., and Liebman, S. W. (1988). The same configuration of Ty elements promotes different types and frequencies of rearrangements in different yeast strains. *Mol Gen Genet*. 211, 272-81.
- Rachidi, N., Barre, P., and Blondin, B. (1999). Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 261, 841-50.
- Rivier, D. H., and Rine, J. (1992). An origin of DNA replication and a transcription silencer require a common element. *Science*. 256, 659-63.
- Roeder, G. S., and Fink, G. R. (1980). DNA rearrangements associated with a transposable element in yeast. *Cell*. 21, 239-49.
- Roeder, G. S., and Fink, G. R. (1982). Movement of yeast transposable elements by gene conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79, 5621-5.

Roeder, G. S., Smith, M., and Lambie, E. J. (1984). Intrachromosomal movement of genetically marked *Saccharomyces cerevisiae* transposons by gene conversion. *Mol Cell Biol.* 4, 703-11.

Rose, M., and Winston, F. (1984). Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the *S. cerevisiae* *URA3* gene. *Mol Gen Genet.* 193, 557-60.

Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). *METHODS IN YEAST GENETICS: A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Rothstein, R. (1979). Deletions of a tyrosine tRNA gene in *S. cerevisiae*. *Cell.* 17, 185-90.

Rothstein, R., Helms, C., and Rosenberg, N. (1987). Concerted deletions and inversions are caused by mitotic recombination between delta sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 7, 1198-207.

Runge, K. W., Wellinger, R. J., and Zakian, V. A. (1991). Effects of excess centromeres and excess telomeres on chromosome loss rates. *Mol Cell Biol.* 11, 2919-28.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Santos-Rosa, H., and Aguilera, A. (1994). Increase in incidence of chromosome instability and non-conservative recombination between repeats in *Saccharomyces cerevisiae hpr1* delta strains. *Mol Gen Genet.* 245, 224-36.

Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122, 19-27.

Stewart, S. E., and Roeder, G. S. (1989). Transcription by RNA polymerase I stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 9, 3464-72.

Stucka, R., Lochmuller, H., and Feldmann, H. (1989). Ty4, a novel low-copy number element in *Saccharomyces cerevisiae*: one copy is located in a cluster of Ty elements and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 17, 4993-5001.

Surosky, R. T., and Tye, B. K. (1985). Construction of telocentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 2106-10.

Surosky, R. T., Newlon, C. S., and Tye, B. K. (1986). The mitotic stability of deletion derivatives of chromosome III in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 414-8.

Sutton, P. R., and Liebman, S. W. (1992). Rearrangements occurring adjacent to a single Ty1 yeast retrotransposon in the presence and absence of full-length Ty1 transcription. *Genetics.* 131, 833-50.

Szeto, L., Fafalios, M. K., Zhong, H., Vershon, A. K., and Broach, J. R. (1997). Alpha2p controls donor preference during mating type interconversion in yeast by inactivating a recombinational enhancer of chromosome III. *Genes Dev.* 11, 1899-911.

Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J., and Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* 33, 25-35.

Teng, S. C., Kim, B., and Gabriel, A. (1996). Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. *Nature.* 383, 641-4.

Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989). The genetic control of direct-repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of *rad52* and *rad1* on mitotic recombination at *GAL10*, a transcriptionally regulated gene. *Genetics.* 123, 725-38.

Tischfield, J. A. (1997). Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *Am J Hum Genet.* 61, 995-9.

上向 健司 (1998). 複製エラーに起因する塩基置換変異の解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

- Voelkel-Meiman, K., Keil, R. L., and Roeder, G. S. (1987). Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell*. *48*, 1071-9.
- Warmington, J. R., Anwar, R., Newlon, C. S., Waring, R. B., Davies, R. W., Indge, K. J., and Oliver, S. G. (1986). A 'hot-spot' for Ty transposition on the left arm of yeast chromosome III. *Nucleic Acids Res.* *14*, 3475-85.
- Warmington, J. R., Green, R. P., Newlon, C. S., and Oliver, S. G. (1987). Polymorphisms on the right arm of yeast chromosome III associated with Ty transposition and recombination events. *Nucleic Acids Res.* *15*, 8963-82.
- 渡辺 圭一 (1997). *URA3*遺伝子を指標とした酵母二倍体細胞における染色体レベルの自然突然変異の研究. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.
- Wicksteed, B. L., Collins, I., Dershowitz, A., Stateva, L. I., Green, R. P., Oliver, S. G., Brown, A. J., and Newlon, C. S. (1994). A physical comparison of chromosome III in six strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. *10*, 39-57.
- Winston, F., Chaleff, D. T., Valent, B., and Fink, G. R. (1984). Mutations affecting Ty-mediated expression of the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. *107*, 179-97.
- Wu, X., and Haber, J. E. (1995). MATa donor preference in yeast mating-type switching: activation of a large chromosomal region for recombination. *Genes Dev.* *9*, 1922-32.
- Wu, X., Moore, J. K., and Haber, J. E. (1996). Mechanism of MAT alpha donor preference during mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* *16*, 657-68.
- Yandell, D. W., Dryja, T. P., and Little, J. B. (1986). Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations. *Somat Cell Mol Genet.* *12*, 255-63.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33, 103-19.

安田 純 (1996). 定量的PCR法 -DNAの定量. 蛋白質核酸酵素. 41, 499-502.

與那嶺 育子 (1998). 出芽酵母染色体再編に及ぼす導入遺伝子の位置効果. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

愿山 郁 (1996). 自然突然変異の特異性：標的遺伝子に対する複製フォークの進行方向の影響. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

Yuan, L. W., and Keil, R. L. (1990). Distance-independence of mitotic intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 124, 263-73.