

論文内容の要旨

申請者氏名 平 岡 美 奈

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/bp、それに対しヒトのゲノムは 3×10^9 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) 個々の遺伝的変化の種類を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。

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変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変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ーである*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染色体の長さに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。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 平 岡 美 奈

染色体の再編はゲノム情報の維持および生物進化を考える上で最も基本的な問題である。また、癌や各種の遺伝病などの遺伝子疾患の発症に伴って、頻繁に染色体再編が見出される。これらのことから、染色体再編の発生や制御の分子機構の解明は生物学上の問題にとどまらず医学の上でも重要な課題となっている。本論文は、出芽酵母二倍体細胞を用いて自然染色体異常の発生をヘテロ接合性の喪失 (Loss of heterozygosity; LOH) の観点から明らかにすることを目的として、新たな実験・解析系の開発とそれらを用いた自然染色体異常の構造的特徴の解析を行ったもので、以下の成果をあげている。

1) 酵母第III染色体上の特定の部位に *URA3* マーカー遺伝子を挿入し、その機能喪失を指標として LOH を定量的に検出する実験系を開発した。また、パルスフィールドゲル電気泳動およびサザンブロットを用いて、LOH の種類を同定する方法を確立した。さらに、定量的 PCR 法を用いて、染色体再編領域の詳細なマッピングを可能にする手法を確立した。

2) 上記の方法を駆使して、二倍体出芽酵母の体細胞分裂に付随して発生する LOH について体系的な解析を実施し、LOH の原因として染色体喪失、相同染色体間組換え、異常染色体の発生を同定し、それぞれの発生頻度や特徴に関する考察を行った。

3) 異常染色体に起因する LOH につき、多数のサンプルを塩基配列レベルで解析することにより、異常染色体の発生様式および発生機構に関する考察を行った。

以上のように、本論文は真核生物二倍体細胞における LOH に関して世界で初めて体系的な解析を行い、それらの構造的特徴や発生機序を詳細に明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。