

所 属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学講座 (真木 寿治 教授)		
氏 名	渡辺 圭一	提 出	平成 14 年 1 月 7 日
題 目	出芽酵母orc変異株における染色体不安定性と チェックポイント制御機構の関与		
<p>要旨</p> <p>欠失、転座などの染色体レベルで生じる大きな変化は総じて染色体異常と呼ばれるが、これらは細胞の癌化やゲノム再編、或いは進化に関して重要な役割を担っている。しかし、その発生機構については不明な点が多い。当研究室では、出芽酵母二倍体細胞の第Ⅲ染色体の一方に導入したURA3遺伝子マーカーの喪失を指標とした染色体異常の検出・解析系を確立し、真核生物での染色体異常発生の特徴や分子機構の解明を行ってきた。本研究ではまず野生株における自然染色体異常の発生に影響を及ぼす染色体構造上の種々の要因を検討したが、結果として、異常検出の指標となるURA3遺伝子マーカーの挿入方向の違いや、遺伝子マーカーの挿入によって生じる相同染色体間での相同配列の位置関係の歪みなどが、僅かではあるが有意に染色体異常の発生に影響を及ぼすことを突き止めた。次に第Ⅴ染色体を標的とした解析を行い、第Ⅲ染色体における場合と比較することによって様々な染色体異常の一般性と特殊性について検討した。その結果、相同染色体間の交叉に起因する遺伝子マーカーの喪失は各染色体のセントロメアとマーカーの距離に依存して両染色体上ではほぼ同頻度で生じるのに対して、染色体喪失や欠失、転座などに関しては発生頻度が各染色体に固有の因子に大きく左右される可能性が示唆された。また、これら一連の解析を通して、出芽酵母において生じる染色体異常の主要な形態が交叉型の異常である事実が判明したが、交叉により遺伝子マーカーが失われる際にはそれに先立って染色体が複製されている必要がある為、体細胞増殖中の細胞において、染色体異常の多くの部分がS期通過後或いはS期通過に伴って引き起こされることが推測された。そこで次にDNA複製に係わる様々な制御機構と染色体異常の発生についての相関について検証した。本研究ではDNA複製開始制御の異常が染色体異常の最初の引き金となる可能性を考え、開始制御の重要な構成因子であるORC(origin recognition complex)の機能に欠損をもつ温度感受性変異株について解析を行った。</p>			

*orc1-4*という変異アリルをホモにもつ二倍体細胞を非許容温度下で生育させた場合には、約3回の細胞分裂を経た後にG2/M期での細胞周期の停止が観察された。この細胞周期停止は永続的なものではなく、一定時間後に停止状態が崩壊し、それに伴って生菌数の減少や染色体異常の誘発が観察された。また*orc1-4*変異株における細胞周期停止はチェックポイント制御に関与する*RAD9*遺伝子に依存的であり、*orc1-4rad9Δ*二重変異株ではG2/M期での停止がそもそも起こらず、生育の非常に早い段階から染色体異常の誘発が見られるようになった。驚くべき事に*orc1-4rad9Δ*二重変異株では生菌数の減少が緩和されており、ORC機能欠損に起因する細胞死に*RAD9*遺伝子が必要であることが明らかとなった。以上の結果は、Orc1pの機能欠損が染色体異常を誘発する潜在力を有してはいるものの、チェックポイント機構が正常に機能している限りにおいては、細胞周期を停止させて修復の為の時間を稼ぐことによって染色体異常の発生が強く抑制されることを意味している。更にチェックポイント機構の関与については、致死性が*RAD9*遺伝子依存的であったことから、ORCの異常による障害が修復不可能であった場合には、細胞を死滅させることによって遺伝情報の安定化に二重に貢献するという可能性が示唆された。

次に*orc1-3*、*orc1-7*、という他の*orc1*アリルを用いて解析を行った。*orc1-3*変異株では*orc1-4*変異株と同様、*RAD9*遺伝子依存的な細胞周期の一過的停止やその後の生菌数の減少及び染色体異常の誘発が認められた。これに対して*orc1-7*変異株では細胞周期停止や増殖阻害は観察されなかったものの、染色体異常の発生頻度が大幅に上昇しており、*orc1-4rad9Δ*二重変異株と類似した表現型が認められた。これらのアリルにおいて変異点は*ORC1*遺伝子上の異なる機能ドメイン上に存在することから、Orc1pの諸機能が幅広く染色体不安定性の抑止に働いていることが推測された。

一方*orc2-1*変異株を用いて解析を行ったところ、26℃条件下で細胞周期の停止や増殖阻害が引き起こされたが、この場合には停止状態の崩壊や染色体異常の誘発は起こらなかった。また、*orc2-1rad9Δ*二重変異株では上記の細胞周期の停止や増殖阻害は解消されたが、染色体異常の発生頻度は依然として低いままであった。これらのことから、Orc2pの機能欠損によっても*RAD9*遺伝子依存的なチェックポイント機構の活性化は引き起こされるが、*orc1*変異株の場合とは異なり、これらの異常は染色体異常につながる潜在力は有しておらず、Orc1pの機能欠損との間に質的な相違が存在することが示唆された。この*orc1*変異株と*orc2*変異株の表現型の違いの原因は不明であるが、DNA複製開始制御におけるOrc1pとOrc2pの役割の違いを反映している可能性が考えられる。

目次

	頁
はじめに	5
第一部	
<i>URA3</i> 遺伝子を指標とした酵母二倍体細胞における染色体異常の研究	
I 序論	7-11
第一節 ゲノムの再編と染色体異常	7
第二節 本研究における目的	8
II 材料と方法	12-18
1 菌株	12
2 プラスミドDNA	12
3 試薬・酵素・培地	12
4 プラスミドDNAの調製	14
5 アガロースゲル電気泳動	14
6 アガロースゲルからのDNAの抽出	15
7 <i>ura3</i> 変異遺伝子の作製	15
8 大腸菌の形質転換法	15
9 出芽酵母の形質転換法	15
10 染色体異常頻度の測定	15
1)二倍体細胞の構築	
2)染色体異常頻度の測定	
11パルスフィールドゲル電気泳動	16
1)プラグの作製	
2)パルスフィールドゲル電気泳動	
12 サザンハイブリダイゼーション	17
1)メンブレンへの転写	
2)プローブDNAの調製	
3)ハイブリダイゼーション・洗浄・検出	
13 PCR	17
1)プライマーDNAの調製	
2)反応条件	

III 相同染色体の相同領域の影響	19-29
第一節 <i>URA3</i> 領域に相同性をもたせた細胞の作製	19
第二節 染色体異常頻度の測定及び分類	22
第三節 <i>URA3</i> 領域に相同配列をもたない場合との比較	24
第四節 考察	24
(1) 相同染色体の相同領域の影響	
(2) 修復系酵素群との関係	
IV 遺伝子マーカーの転写方向の影響	30-38
第一節 補助的な遺伝子マーカーを用いた染色体異常検出系の利用	30
第二節 染色体異常頻度の測定及び分類	32
第三節 <i>URA3</i> 断片の向き異なる2種類の株における比較	32
第四節 考察	34
V 他の染色体における解析	39-48
第一節 染色体異常頻度の測定及び分類	39
第二節 異なる染色体間における染色体異常頻度及び内容の比較	40
第三節 考察	40
VI まとめ	49-53
第一節 相同配列保有株及び「順方向」における変化の意義について	49
第二節 第二節 組換え型変異の一般性とLOH機序との関係	50
第一部参考文献	54-57

第二部

出芽酵母 *orc* 変異株における染色体不安定性とチェックポイント制御機構の関与

VII 序論	60-65
第一節 研究の動機—問題提起	60
第二節 組換え機構と染色体複製の関係	61
第三節 染色体複製におけるORCとチェックポイント機構の役割	63
VIII 材料と方法	66-68
1 <i>orc</i> 変異遺伝子	66
2 菌株と取り扱い	66
3 細胞周期進行の解析	66
4 パルスフィールドゲル電気泳動	66
5 プライマー-DNA	67
XI 結果	69-102
第一章 <i>orc</i> 変異株の作製	69
第二章 <i>orc1-4</i> 変異株の細胞増殖異常と非許容温度下で誘発される染色体異常	69
第一節 非許容温度下での細胞周期停止と生菌数の低下	69
第二節 非許容温度処理後の生残菌に見られる染色体不安定性	70
第三節 <i>URA3</i> マーカーを指標とした染色体異常の解析	73
第三章 <i>orc1-4</i> 変異による細胞死及び染色体不安定性とチェックポイント機構の関係	75
第一節 <i>orc1-4 rad9Δ</i> 二重変異株における非許容温度下での細胞周期進行と生存	76
第二節 <i>orc1-4 rad9Δ</i> 二重変異株における非許容温度下での染色体不安定性	77
第四章 <i>orc1-3</i> 、 <i>orc1-7</i> 変異の細胞増殖と染色体不安定性に及ぼす影響	80
第一節 <i>orc1-3</i> 変異株の性質	80
第二節 <i>orc1-7</i> 変異株の性質	80
第三節 <i>orc1</i> アリルの変異部位について	81
第四節 <i>orc1</i> 変異株でのORC機能欠損の共通点と相違点	81
第五章 <i>orc2-1</i> 変異株の非許容温度下での細胞増殖欠損と染色体異常	85
第一節 各温度での細胞増殖阻害と細胞周期停止	85
第二節 各温度での染色体異常の発生頻度	86
第三節 <i>orc2-1</i> 変異株におけるチェックポイント制御機構の関与-1	86
第四節 <i>orc2-1</i> 変異株におけるチェックポイント制御機構の関与-2	89
第六章 <i>orc</i> 変異株において見られるrDNA領域の構造変化	95
第七章 <i>orc</i> 一倍体細胞における細胞増殖異常とチェックポイント機構の関与	97
第八章 <i>orc1-4</i> 生残菌における細胞周期進行および細胞増殖能の解析	100

X 考察	103-114
第一節 複製開始制御と染色体不安定性の関係について	103
第二節 <i>orc1</i> 及び <i>orc2-1</i> 変異株が示す表現型の比較	104
第三節 <i>RAD9</i> 遺伝子機能が細胞に及ぼす影響についての考察	106
第四節 <i>orc</i> 変異株において引き起こされる異常の実態についての考察	108
第五節 今後の展望	113
 第二部参考文献	 115-121
 謝辞	 122

はじめに

本研究論文は「第一部；*URA3*遺伝子を指標とした酵母二倍体細胞における染色体異常の研究」、並びに「第二部；出芽酵母*orc*変異株における染色体不安定性とチェックポイント制御機構の関与」の二部から構成されている。第一部は博士前期課程(1996-1998)における研究をまとめ、修士論文として発表した内容である。論文作製時から今日までに様々な情報が新たに得られているが、第二部研究開始時にどのようなことが明らかになっていなかったのか、或いはどのようなことを疑問に感じていたのかという研究の展開を重視して、当時のものを最小限度の手直しをするに止めてそのまま記載することにした。

第一部

*URA3*遺伝子を指標とした酵母二倍体細胞における 染色体異常の研究

I 序論

第一節 ゲノムの再編と染色体異常

生物が種として存続するためには、遺伝情報が親から子へ、子から孫へと正確に受け継がれなければならない。しかしその一方で長期的に見た場合には、環境の変化に対応し得る個体を生み出せるだけの潜在的な能力も生物には要求される。すなわち、遺伝情報を安定に存続させることと、遺伝情報に多様性をもたせることの両方が生物にとっては必要不可欠なのであるが、この内の遺伝情報に多様性をもたせること、より正確には遺伝情報に多様性をもった個体群をある一定の割合で出現させることに関しては、ゲノムの再編という現象によるところが大きい。例えばゲノムの一部が重複した場合にはその領域内に存在する遺伝子を余分にもつことになるので、生物はその生育に必須ではない余剰の遺伝子を使って様々なバリエーションをつくり出し、それが生育に有利であるかどうかを「試す」ことができる。また、ゲノムの一部が特定の領域から他の領域に転移した場合には、その新たな連結部位において、ある遺伝子の一部と他の遺伝子の一部が組み合わせられて全く新しい機能を持った遺伝子がつくり出される可能性がある。こうした営みを通して生物は、一般的には非常に長い年月をかけて、新たな環境に適応したり、より生育に有利な資質を獲得したりして種としての進化を遂げることができたと考えられている。

ゲノムの再編が関与するその他の例としては、高等動物において見られる高度に発達した免疫制御のしくみが挙げられる。これらの生物では外界から侵入する様々な抗原をすばやく認識し、その抗原に特異的に結合する抗体を効率良くつくり出す為に、固有の組換えのシステムを利用したゲノムの再編が特定の抗体生産細胞において起こることが知られている。この場合には、様々な抗体をつくり出す可能性をもった細胞が、ゲノムの再編により特定の抗体のみを専門的につくり出す細胞へと分化するのである。この様に、あらゆる生物種においてゲノムの再編は個体の進化や細胞の分化をもたらす極めて重要な現象であるということが出来る。

これに加えて、ゲノムの再編が細胞の癌化にも関与することが知られている。癌化した細胞を解析した多数の研究例においては、ゲノムの一部が失われていたり高度に反復したりするという現象が報告されている。細胞が癌化する過程においては、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、あるいはDNA修復遺伝子として分類される遺伝子群のなかの複数のものが多段階的に機能失調をきたすことが知られているが、この機能失調がゲノムの再編に伴って起こり、そして特定の遺伝子が正常に機能しなくなることによって更なるゲノムの再編が加速度的に押し進められるのではないかと考えられている。

それではこのゲノムの再編はどの様にして起こるのであろうか？

先に示した抗体生産細胞の例や減数分裂時に相同染色体間で定常的に起こる乗換えの場合のように、生物のもつ固有のシステムの制御下において統制的にゲノムの再編がなされる場合もあるが、それ以外の場合でもゲノムの再編は染色体欠失、転座といった自然突然8により無視できないレベルで引き起こされている。特に、個体の進化ということに関しては、有限な性質の単なる組み合わせによらず、偶発的事象により完全に別個な性質が出現する可能性があるという意味において、自然突然変異の寄与は計り知れないほど重大である。

自然突然変異とは、生体内において生命活動に起因してDNA上に間違いが生じる事であるが、このなかには点突然変異のように遺伝子上の数塩基対のみが変質するという小規模なものから、染色体欠失のように染色体の広範な領域にわたって変化が見られるという大規模なものまで様々なものが存在する。これらの内、前者に関しては、大腸菌などの原核生物をモデル生物として用い、様々な遺伝子型のバックグラウンドにおいてプラスミド上の遺伝子に生じる変異を追跡するといった *in vivo* の遺伝学的解析や、人工的に変異を導入した合成オリゴヌクレオチドとモデル生物より抽出した試料の精製標品を用いた *in vitro* の生化学的解析などによって、その発生メカニズム等に関してかなりの部分が明らかになってきている。しかし、後者に関しては、*in vivo* においても *in vitro* においても染色体を取り扱う技術があまり発達していなかったことや、ごく最近まで全ゲノムの情報が絶対的に不足していたことなどからその発生メカニズム等に関して不明な点が数多く残されているというのが実状である。本研究論文では以後、点突然変異などの小規模な自然突然変異と区別する意味で、染色体欠失や転座、染色体喪失などの染色体レベルで生じる変化を総じて染色体異常と呼ぶことにする。

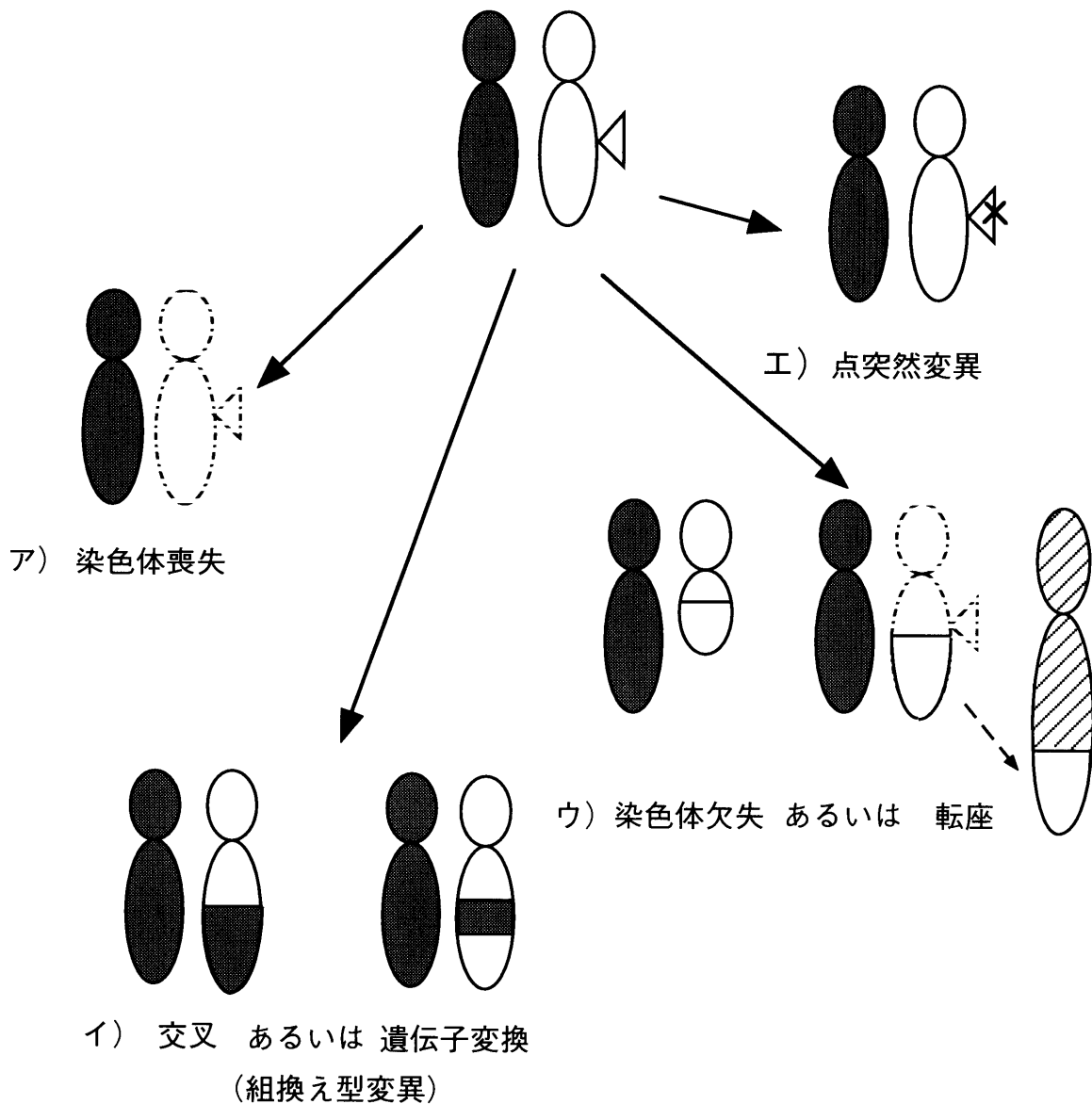
第二節 本研究の目的

前述の様な背景のもと、当研究室ではゲノムの再編を引き起こし得る染色体異常の発生メカニズムを解明するねらいで1995年より梅津、平岡の両名によって出芽酵母二倍体細胞をモデル生物として用いた研究が展開されている。モデル生物として出芽酵母二倍体細胞を用いたのは、真核生物の中ではゲノムサイズが小さく細胞の取り扱いが容易であること、ゲノムプロジェクトにより全ゲノムの配列が判明している為(Goffeau et al., 1996)、変異体におけるゲノム再編の実態を塩基配列レベルで解析できるということ、必須遺伝子が1コピー失われても生育に影響が無く様々なバリエーションの再編例を観察できると考えられることなどの理由からである。またDNAの複製や修復、転写などの例において見られる様に、生命活動の根源を担う諸機作に関してはその骨子の重要な部分が生物種を超えて保存される傾向にあるの

で、単細胞生物である出芽酵母において得られた解析結果から高等生物であるヒトにおける場合を類推することは十分に可能であり、かつ意義のあることである。

研究開始当初はまず、染色体レベルの異常を生じた検体を多数例得る為の実験系を構築することから行われたが、様々な試行錯誤の末、*URA3* 遺伝子マーカーを第Ⅲ染色体に導入し、これが失われることを指標とする最初の染色体異常検出系の基本形態が完成した(図I-1)。第Ⅲ染色体上を解析の場として選定したのは、この染色体における複製開始点(Newlon et al., 1991)、転写単位(Oliver et al., 1992; Goffeau et al., 1996)、減数分裂時の組換えのホットスポット(Zenvirth et al., 1992)、繰返し配列(Oliver et al., 1992; Goffeau et al., 1996)等の解析が進んでおり、これらの知見が染色体異常発生メカニズムの解明のために有用であろうと考えたからである。

平岡らの解析によりこの検出系を用いて染色体喪失、染色体欠失あるいは転座、組換え型変異といった様々な染色体異常が実際に検出されてくることが判った。ここで言う組換え型変異とは交叉もしくは遺伝子変換の事であり、交叉によって遺伝子マーカーが失われる機構としては、DNA複製に伴い倍加した相同染色体間において交叉が生じ、染色体分離の際の組み合わせによって遺伝子マーカーを失った一方の相同染色体と、交叉に関与しなかったもう一方の側の相同染色体が娘細胞に受け継がれるというモデルを考えている(図I-2)。平岡らの解析によると、この検出系を用いて測定した第Ⅲ染色体における染色体異常の発生頻度は 1.7×10^{-4} であり、この内の62%が染色体喪失、30%が組換え型変異、そして8.0%が染色体欠失あるいは転座であるという結果が得られた(平岡, 1996年修士論文)。この様に様々な染色体異常が見られたことから、この*URA3*遺伝子マーカーを用いた検出系が、染色体上で発生する多様なイベントを追跡するためのモデルとして妥当であろうとの感触が得られたので、本研究においてはこの系を用いた解析を更に発展させ、染色体欠失、組換えといった異常の発生に影響を及ぼし得る染色体上の因子について探ることを計画した。染色体上にはセントロメアやテロメアなど、そもそもの染色体全体の維持に不可欠な因子が存在することは良く知られているが、これ以外にも染色体内の一領域の欠失といった部分的な構造変化に影響を及ぼす因子は様々な存在するものと思われる。また、生物は長い年月の末に複製や組換え、修復などのDNA代謝のメカニズムを発達させて来ているが、その一方で染色体構造などのDNA配列上の問題に関しても、今日に至るまでに様々な取捨選択の過程が存在したものと推測される。本研究では染色体異常の発生メカニズムの解析に臨むに当たって、この様なシス因子的な側面からのアプローチを試みた。更に、これまでの解析は全て第Ⅲ染色体上において為されたものであったが、観察によって得られる情報を客観化、一般化して考える為に、本研究では第Ⅲ染色体以外の染色体を対象とした解析も併せて行い、複数の異なる染色体上において一般的に見られる現象を見極めることも試みた。



図I-1 *URA3*遺伝子マーカーの機能喪失を伴う様々な遺伝的变化

*URA3*遺伝子を1コピーもつ二倍体細胞においては、ア) 染色体喪失、イ) 交叉あるいは遺伝子変換（組換え型変異）、ウ) 染色体欠失あるいは転座、エ) 点突然変異などの遺伝的变化により*URA3*遺伝子の機能が喪失する。この場合においても、もう一方の相同染色体は無傷なので個体の生存に問題はないと考えられる。これらの変化は5FOA（5-フルオロオロチン酸）耐性として選抜することが可能である。

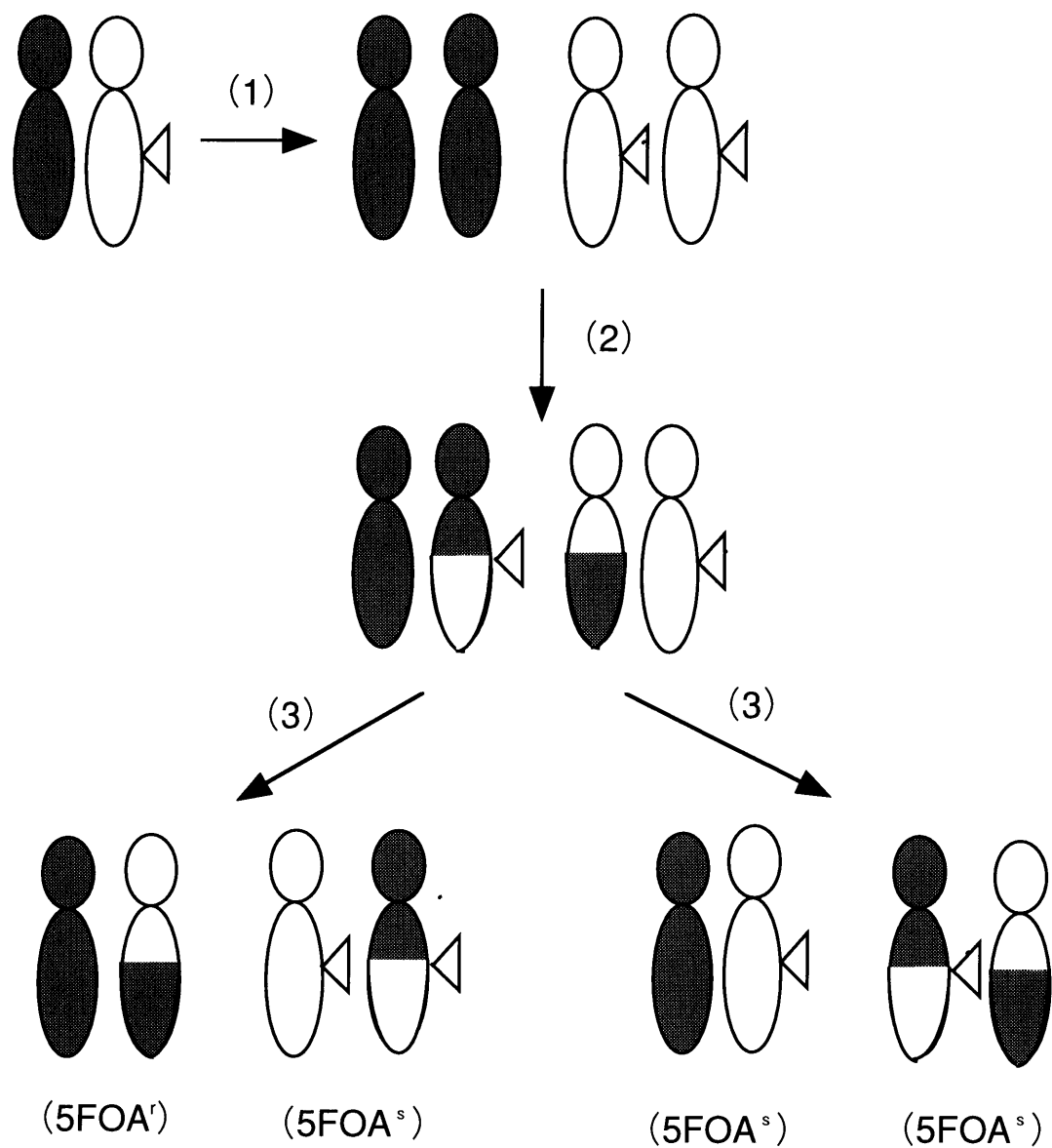


図1-2 交叉による遺伝子マーカー喪失のモデル

Ura3⁺/-である二倍体細胞において、交叉により遺伝子マーカーが失われる機構を示す。すなわち、まず(1)体細胞分裂に際して染色体が倍加し、(2)倍加した相同染色体のうちの一対において交叉が発生すると、(3)染色体分離の際の組み合わせにより遺伝子マーカーを失った娘細胞(5FOA^s)が出現する。

II 材料と方法

1 菌株

本研究に用いた出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は全てゲノムプロジェクトに用いられたS228c株由来であり、大腸菌 (*Escherichia coli*) は全てパリの下水から発見された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II-1に記載した。染色体上の位置に関してはゲノムプロジェクトで示されている情報に従った。

2 プラスミドDNA

pRS416(Sikorski and Hieter, 1989)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及び出芽酵母の自律複製配列、セントロメア、*URA3*遺伝子をもつ、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。pRS415は、*URA3*遺伝子のかわりに*LEU2*遺伝子をもつ点を除いてはpRS416と同機能のものである。

pMH100は、汎用クローニングベクタープラスミドであるpUC19(Yanisch-Perron et al., 1985)の*Xma* I -*Xba* I 部位に第III染色体の204433-205368 bp 間の領域926 bpをクローニングしたプラスミドで、このプラスミドの*Bss*HII 部位にpRS416 由来の*URA3*遺伝子を挿入したのがpMH116とpMH126 である。pMH116においては*URA3* 遺伝子がプラスミド内のアンピシリン耐性遺伝子と同方向に、pMH126においては逆方向に挿入されている。pMH100及びpMH116、pMH126 は当研究室平岡により作製されたものである (平岡, 1996年修士論文)。

pMJ118は本研究において作製したプラスミドであり、pMH116プラスミドの*Nco* I 部位にCATGの4塩基配列が挿入されたものである。

3 試薬・酵素・培地

各種溶液は特に記載のない限り MilliQ 水に、各種培地は脱イオン水に溶解して調製した。

一般的な試薬に関して、特に記載のないものについては、NaCl、KCl 等の塩類および glucose、sucrose 等の糖類は和光純薬の製品を、HCl、glycerol 等の液体試薬はナカライテスク株式会社の製品を、agar、peptone、yeast extract 等の培地成分はDifco 社の製品を、その他の試薬は Sigma 社の製品を使用した。%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。

本研究で使用した酵素類に関して、T4 DNA ligase はTOYOBOのものを、Klenow fragment 及びその他の酵素 (制限酵素および耐熱性polymeraseなど) はTAKARAのものを購入し、製造元の指示に従って使用した。

表II-1 菌株一覧表

a) 出芽酵母 一倍体細胞

菌株	遺伝子型	入手方法
FY838	α <i>lys2</i> Δ 202 <i>leu2</i> Δ 1 <i>his3</i> Δ 200 <i>ura3-52</i>	当研究室のストック
YKU1	<i>a</i> <i>lys2</i> Δ 202 <i>leu2</i> Δ 1 <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i>	当研究室の梅津桂子助手より分与を受けた
YMH1	III 205::URA3であること以外はYKU1と同じ	当研究室の平岡美奈修士より分与を受けた
YMJ1	III 205::URA3であること以外はFY838と同じ	本研究において作製
YMJ2	III 205::ura3-91であること以外はYMJ1と同じ	本研究において作製
YKU21	URA3であること以外はFY838と同じ	当研究室の梅津桂子助手より分与を受けた
YMH5	URA3であること以外はYKU1と同じ	当研究室の平岡美奈修士より分与を受けた
YMJ4	<i>ura3-91</i> であること以外はYKU21と同じ	本研究において作製
YKU23	<i>ade2::hisG</i> であること以外はFY838と同じ	当研究室の梅津桂子助手より分与を受けた
YKU34	<i>a</i> <i>lys2</i> Δ 202 <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i> <i>ade2::hisG</i> III 314::ADE2 III 205::URA3	当研究室の梅津桂子助手より分与を受けた
YKU25	<i>a</i> <i>lys2</i> Δ 202 <i>leu2</i> Δ 1 <i>trp1</i> Δ 63 <i>ura3-52</i> <i>ade2::hisG</i> III 314::ADE2	当研究室の梅津桂子助手より分与を受けた
YMJ11	LEU2であること以外はYKU25と同じ	本研究において作製
YMJ13	III 205::URA3であること以外はYMJ11と同じ ただしURA3遺伝子の方向はYKU34と逆	本研究において作製

b) 出芽酵母二倍体細胞

菌株	接合に用いた一倍体細胞 (本文中での名称)
RD101	YMH1 × FY838 (相同配列欠損株)
RD104	YMH1 × YMJ2 (相同配列保有株)
RD201	YMH5 × YMJ4 (第V染色体における解析に用いた株)
RD301	YKU34 × YKU23 (逆方向)
RD302	YMJ13 × YKU23 (順方向)

c) 大腸菌 (当研究室ストック)

菌株	遺伝子型
DH5 α	<i>supE44</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)

- ・ *ura3-91*は、本研究においてURA3遺伝子のNco I 部位の破壊によって作製した変異遺伝子である。
- ・ III 205::URA3 は第III染色体の205 kbp領域 (URA3 遺伝子マーカー挿入の標的部位) にURA3が挿入されていることを示す。III 314::ADE2 も同様 (314 kbp 領域は 第III染色体右腕のテロメア末端付近にある)。

大腸菌培養の基本的操作は *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989)に記載されている方法に従った。大腸菌の培養にはLB培地 (1% Bacto trypton, 0.5%Bacto yeast extract, 0.5% NaCl) を用い、寒天培地として用いる場合には Bacto agar を1.5%の濃度で加えた。培地に加える試薬の最終濃度に関しては、アンピシリンは100 μ g/ml、X-gal、IPTGはともに40 μ g/mlとした。アンピシリンは100 mg/ml、IPTGは40 mg/ml になるように滅菌水に溶解し、X-gal は40 mg/ml になるようにエタノールに溶解した。これらの溶液を-20℃にて保存し、使用時には常温で融解した。

出芽酵母の培養については、*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., 1994) 及び *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, 2% Bacto pepton, 2% Glucose) を用い、必要に応じて完全合成培地 (以下SC培地; 0.67% Bacto yeast nitrogen base without amino acids, 0.2% complete mix, 2% Glucose ;pH7.0) 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培地と表記) を使用した。寒天培地として使用する場合には Bacto agar を2%の濃度で加えた。変異体の選抜には5FOA含有寒天培地 (0.67% Bacto yeast nitrogen base without amino acids, 0.2% drop-out mix-Ura, 2% Glucose, 2% Bacto agar) を使用した。染色体異常頻度の測定の際にはウラシルを終濃度50 μ g/ml になるように加えたYPD培地を用いて培養した。またADE2遺伝子をマーカーとして用いた場合には、これにアデニンをさらに終濃度30 μ g/ml になるように加えた。ウラシルは2 mg/ml、アデニンは3 mg/mlになるように滅菌水に溶解し、室温で遮光保存した。

4 プラスミドDNAの調製

アルカリSDS法 (Sambrook et al., 1989)にてプラスミド保有菌からプラスミドDNAを調製した。形質転換に用いたプラスミドDNAについては、QIAGENカラム (Diagen GimbH 社) を用い、製造元の指示に従って精製した。

5 アガロースゲル電気泳動

基本的な操作は全て *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989)に従った。Agarose LO3 (TAKARA) を用い、DNAの分子量に応じて0.9-2.0%の濃度でゲルを調製した。緩衝液はTAE溶液 (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA ; pH \sim 8.5) を使用した。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50 Vもしくは100 Vで25-45分間通電した。泳動後、0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイド水溶液に20分程度浸漬して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。

6 アガロースゲルからのDNAの抽出

電気泳動後目的のDNA断片をゲルから切り出して精製する際にはQIA quick Gel Extraction Kit (Diagen GmbH 社) を用い、製造元の指示に従って精製した。

7 *ura3*変異遺伝子の作製

相同染色体間の*URA3*遺伝子マーカー挿入部位における相同性の欠落を補うために*ura3*変異遺伝子を作製した。*ura3*変異遺伝子作製に際して行ったフェノール処理、エタノール沈殿といった基本的な諸操作に関しては、全て*Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) に記載されている内容に従った。

pMH116を*Nco*Iを用いて切断し、反応溶液をフェノール処理及びエタノール沈殿によって精製した。精製した産物のDNA末端をKlenow fragmentを用いて平滑化し、エタノール沈殿によって精製した後、T4 DNA ligaseを用いて再結合した。ライゲーション反応によって得られた目的の環状DNA産物を大腸菌への形質転換実験及び各種制限酵素の切断によって確認し、これをpMJ118と命名した。また、このプラスミド上に存在する*ura3*変異遺伝子を*ura3-91*と命名した。

8 大腸菌の形質転換法

プラスミドDNAを大腸菌に導入する際には塩化カルシウム法を用いた。その基本操作に関しては*Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) の記載に従った。

9 出芽酵母の形質転換法

出芽酵母へのプラスミドDNA及び遺伝子マーカーの導入に関しては酢酸リチウム法(Ausubel et al., 1994)を用いた。形質転換させる出芽酵母にはすべて一倍体細胞を用い、遺伝子マーカーを染色体上に組込む場合には直鎖状のDNAを用いた。

10 染色体異常頻度の測定

1) 二倍体出芽酵母の構築

適当な一倍体細胞をYPD寒天培地上で交配し4時間以上培養した後、接合した二倍体細胞のみが生育可能な寒天培地(SC-Trp His UraあるいはSC-Trp His Ura Ade Leu寒天培地)に画線培養した。この画線培養に関しては一倍体細胞を完全に除去するために二回繰り返した。

2) 染色体異常頻度の測定

頻度を測定する菌株をSC-Ura培地あるいはSC-Ura Ade Leu培地3 mlに植菌し、30℃で一晩回転培養した。この培養液から1000細胞をとり、YPD培地5 mlに植え継いだ。このときのYPD培地には、培養中に生じる変異体に負の選択圧がかからないよ

うにウラシルを50 μ g/ml、ADE2遺伝子をマーカーとして用いている場合には更にアデニンを30 μ g/mlになるように加えておいた。これらの培養液を、分光光度計 (Beckman社製DU640) による、波長600 nmにおける吸光度 (OD₆₀₀) が2.0-2.5 (約 5.0×10^7 cfu/ml) になるまで30°Cで回転培養した。培養液を4°C、14000 rpm、5秒間遠心して集菌し、50 mM EDTA水溶液で菌体を洗浄した。同様の条件で遠心し菌体を沈殿させた後、滅菌水による洗浄をおこなった。同条件で集菌し、これを滅菌水で適当に希釈してYPD寒天培地および5FOA寒天培地に塗布した。また、必要に応じて5FOA-Leu寒天培地 (ロイシンを含まない5FOA寒天培地; 以下同様)、5FOA-Leu Ade寒天培地にも塗布した。30°Cにて静置培養し、一定時間 (48時間あるいは72時間) 後に生育してきたコロニーの数を計測した。

得られた変異体をその後の内容の解析に供する場合には、同条件の寒天培地による画線培養をおこなった。

1 1 パルスフィールドゲル電気泳動

1) プラグの作製

染色体DNAサンプルの作製に関してはアガロースブロック法(Carle and Olson, 1987)により行った。試料菌体を包埋するためのアガロースにはAgarose Low Melt Preparative Grade (BIO RAD社) を用い、これを0.6%の濃度で使用した。

2) パルスフィールドゲル電気泳動

泳動にはCHEF Mapper™ XA Plused Field Electrophoresis System (BIO RAD社) を使用した。アガロースにはPlused Field Certified Agarose (BIO RAD社) を用い、1%の濃度で使用した。緩衝液にはTBE溶液 (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA; pH \sim 8.5) を用い、泳動中の温度が常に14°Cとなる制御下で泳動を行った。その他の泳動条件については表2-2に示す通りであり、これらを用途に応じて使い分けた。泳動後、0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド水溶液にゲルを30分間浸漬してDNAを染色し、1時間 MilliQ 水で脱色した後、UVトランスイルミネーター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、各染色体のDNA量をNIH image解析ソフトを用いて定量した。

表II-2 パルスフィールドゲル電気泳動の泳動条件

	泳動条件A	泳動条件B	泳動条件C
gradient	6.0 V/cm	6.0 V/cm	6.0 V/cm
included angle	120°	120°	120°
pulse time	24.03 s-1 m33.69 s	24.03 s-44.69 s	44.43 s-52.28 s
ramping factor	linear	linear	linear
run time	29 hr 57 min	34 hr 02 min	42 hr 46 min
size range (kbp)	200-1,000	200-500	380-580
主な使用目的	第Ⅲ染色体の解析(1)	第Ⅲ染色体の解析(2)	第Ⅴ染色体の解析

1 2 サザンハイブリダイゼーション

1) メンブレンへの転写

上述のパルスフィールドゲル電気泳動法により分離した出芽酵母染色体を Hybond™-N+メンブレン (アマシャム社) に転写した。転写の操作は全て *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) に記載されている方法に従った。

2) プローブDNAの調製

プローブDNAの作製はPCR法 (後述) により行った。反応産物の精製には QIAquick PCR Purification kit (Diagen GimbH 社) を用い、製造元の指示に従って精製した。

3) ハイブリダイゼーション・洗浄・検出

プローブDNAの標識及び転写後のメンブレンのハイブリダイゼーション・洗浄・検出操作に関しては ECL™ direct nucleic acid labelling and detection system (アマシャム社) を製造元の指示に従って使用した。

1 3 PCR

1) プライマーDNAの調製

PCRに用いたプライマー用のオリゴヌクレオチドのうち、新規に合成したものに関してはグライナージャパンDNA 委託合成事業部に合成を依頼した。逆相カートリッジ精製された標品を、最終濃度が200 pmol/mlになるように1/10濃度のTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA (pH8.0)) に溶解して使用した。本研究において使用したプライマーのリストを表II-3に示す。

2) 反応条件

本研究においてはコロニーPCR法を利用した。これは、寒天培地上に生育してきたコロニーをそのまま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)の報告を参考にした。反応にはPERKIN ELMER社Model 9600サーマルサイクラーを使用し、反応液の調製

にはTAKARA Taq polymerase及び添付の10×reaction buffer、dNTP mixを用いた。反応液の組成は 10 mM Tris-HCl (pH8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、200 μM dNTP、0.4 μM primer、0.02 unit/μl polymerase、鋳型DNA源として10⁴-10⁶細胞を用いた。反応系は25 μlとし、95 °C 1分のDNA変成の後、92 °C 1分、58 °C 2分、72 °C 2分の3段階の反応を30サイクル行った。

また、2組のプライマーセットを競合させ、2つの反応産物の量比を半定量的に測定する場合には、95 °C 2分のDNA変成の後、92 °C 1分、60 °C 2分、72 °C 3分の3段階の反応を26サイクル行った。

表II-3 プライマー一覧表

プライマー名	配列	使用目的
1) dⅢFI205	AACCCCACTTACCCCTCTGTC	(ア) (イ) (ウ)
2) dⅢRI205	TAAATTGGTGTCCCAGCAGC	(ア) (イ) (ウ)
3) dⅢFK205	CAACCATTTTAGATGTCTGCAGC	(ア) (ウ)
4) dⅢRK205	GGCAACAGTAGGCAGTGAAAGC	(ア) (ウ)
5) dVFU11	CTTACGCATCTGTGGTGCGTATTTTC	(イ) (エ)
6) dVFU18	TAAGGAACGTGCTGCTACTCATCC	(オ)
7) dVRU43	AAAATCATTACGACCGAGATTCC	(イ) (エ)
8) d3FL739	CCAGTTCTGATACCTGCATCC	(カ)
9) d3RL2213	TCTAAGGCGCCTGATTCAAG	(カ)
10) d5F041	TTCACTTGCCACAACCTCAGC	(オ) (キ)
11) d5R041	GGATAATGGCCTCATGGTACC	(オ) (キ)
12) d5F176	CTATTGCCAACTTCTGCGC	(オ)
13) d5R176	GCCTCTGATGATTGTGTAGCC	(オ)
14) d5FURA3	TGATTCGGTAATCTCCGAGC	(キ)
15) d5RURA3	GTTACTTGGTTCTGGCGAGG	(オ) (キ)
16) d10F089	AACGCTTCTAACACATCACGC	(オ)
17) d10R089	AGCCTTCTATGCTGGAGTCG	(オ)

使用目的 (ア) 第Ⅲ染色体への*URA3*遺伝子マーカー挿入の確認
 (イ) 制限酵素切断による*URA3/ura3*断片の識別
 (ウ) *URA3*遺伝子マーカー挿入方向の確認
 (エ) 第Ⅴ染色体への*URA3*遺伝子マーカー挿入の確認
 (オ) 定量的PCR
 (カ) 第Ⅲ染色体への*LEU2*遺伝子マーカー挿入の確認
 (キ) サザンハイブリダイゼーションのためのプローブDNAの調製

- ・ 1)～7)のプライマーは当研究室平岡により設計されたものであり、本研究においては本人より分与を受けた。
- ・ 8)、9)のプライマーは当研究室梅津により設計されたものであり、本研究においては本人より分与を受けた。
- ・ 10)～17)のプライマーは本研究において設計したものである。

III 相同染色体の相同領域の影響

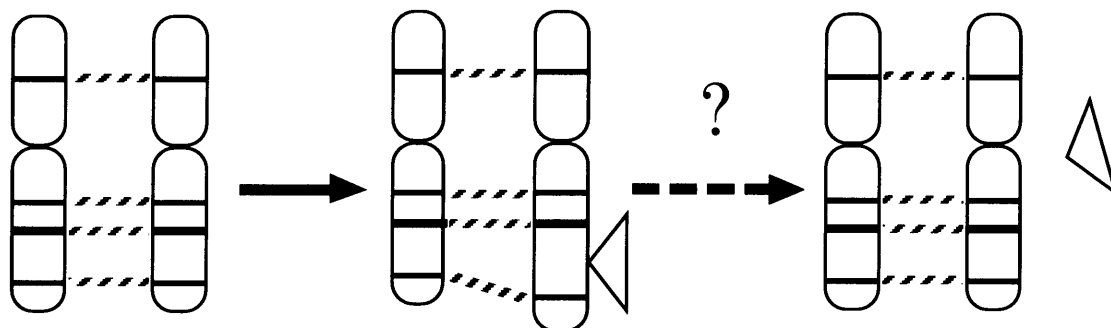
序論においても述べたが、ゲノムの再編を引き起こす染色体レベルの変化に関して、その発生に関与する因子を探ろうというのが本研究の大きな目的の一つである。その様な因子の候補としては様々考えられるであろうが、本研究においてはまず *URA3* 遺伝子マーカー挿入位置周辺の染色体構造に着目し、そのなかで何か染色体異常の発生に結びつきそうなものがないかを考えた。当研究室平岡により構築された染色体異常検出系が本研究の出発点となるが、これは出芽酵母二倍体細胞内の標的とする第Ⅲ染色体の相同染色体の一方に *URA3* 遺伝子マーカーを導入し、この *URA3* 遺伝子の機能が失われることを指標としたものである(図I-1参照)。この系における相同染色体間の *URA3* 断片挿入位置周辺の染色体構造を見てみると、*URA3* 断片の部分のみ相同領域が欠落した形となっていることが分かるが、この相同領域の欠落というものが染色体異常の発生に何らかの影響を及ぼし得ないかと考えた。また、*URA3* 断片挿入に伴い、この断片の大きさ(1187 bp)の分だけ周辺の相同領域の位置関係にずれが生じており、これが原因となって *URA3* 断片の飛び出しのようなことが起こっている可能性も考えられた(図III-1)。そこでまずはこの *URA3* 領域の相同配列の欠落というものの影響について検討する為に、もう一方の相同染色体の方にも *URA3* 断片と相同性の高い配列をもった細胞を作製し、その細胞において見られる現象とこれまでの細胞において見られた現象とを比較検討する事を試みた。

第一節 *URA3*領域に相同性をもたせた細胞の作製

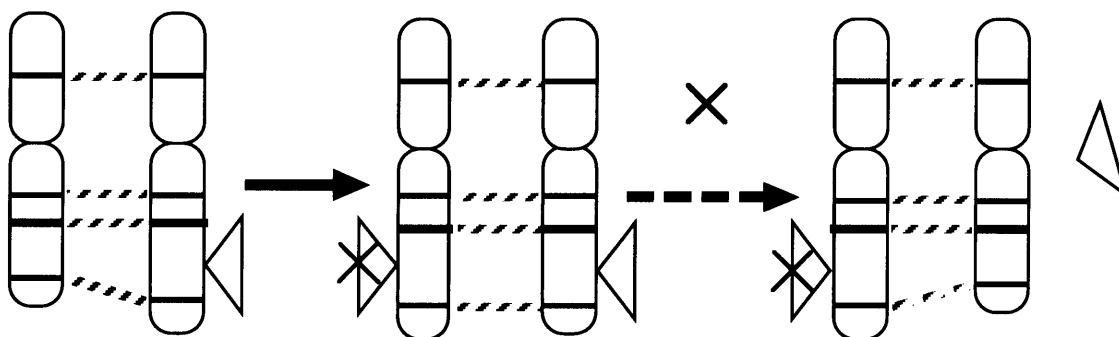
最初に相同染色体のもう一方の側に導入する配列として、(1)*URA3*断片と相同性が高い、(2)*URA3*断片とほぼ同じサイズである、(3)*URA3*断片そのものではない(遺伝子型が+/+)になるから)という3つの条件を満たすDNA断片を作製した。これには *URA3*断片の機能欠損により生じる *ura3*変異遺伝子が最適であると考えたので、*URA3*遺伝子の開始コドンから数えて207 bpの位置にある *Nco* I サイトを Klenow fragment を用いた平滑化によって破壊し、フレームシフト型の変異を導入した(図III-2A)。この変異型の形質が野生型形質により相補されること及び野生型形質が変異型形質に対して優性であることは、*URA3*遺伝子あるいは *ura3*変異遺伝子をもつプラスミドを各々 *ura3*株、野生型株に導入することにより確認した。また、変異導入に伴い、この位置に新たに *Eco*T22 I サイトが生じるので、これを利用すると5FOA耐性細胞の *URA3*領域がどちらの相同染色体由来のものであるかを制限酵素処理によって判別することが可能となる。

次に、作製した *ura3*変異遺伝子を標的部位にもつ一倍体細胞の作製を行ったが、

A



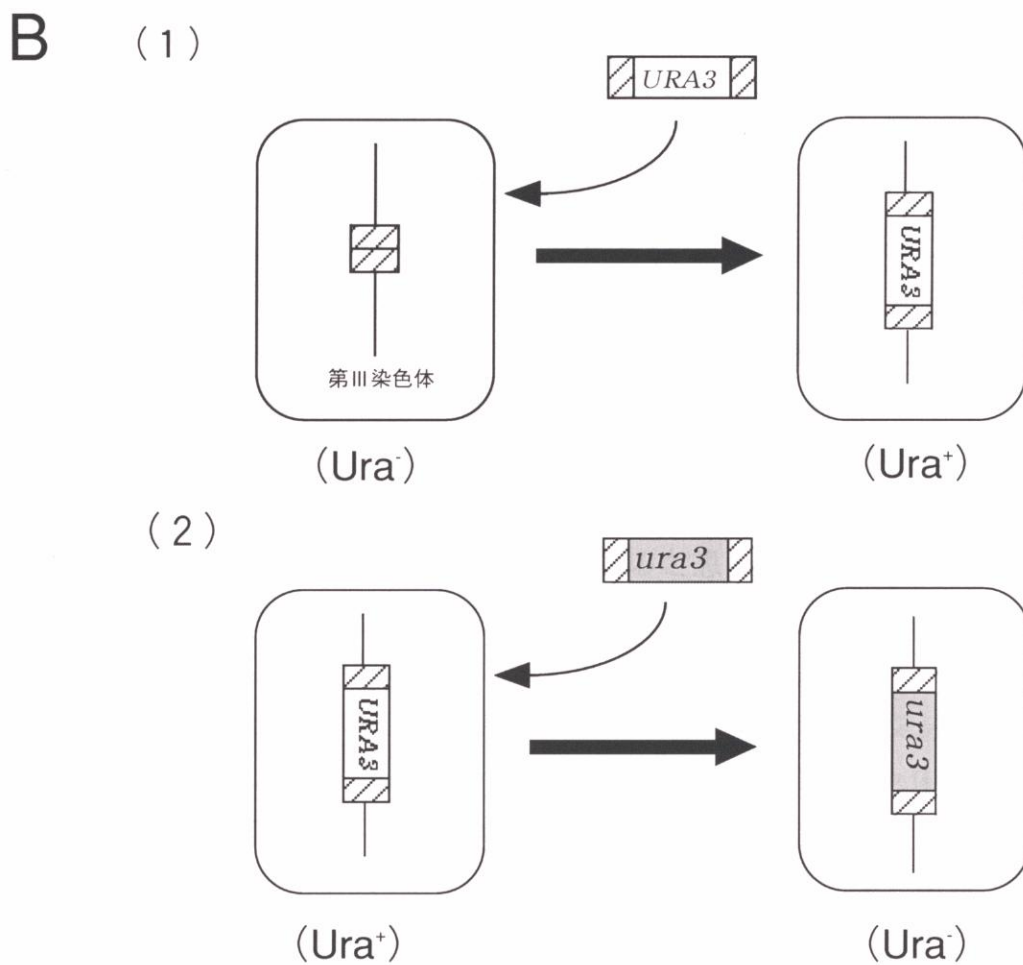
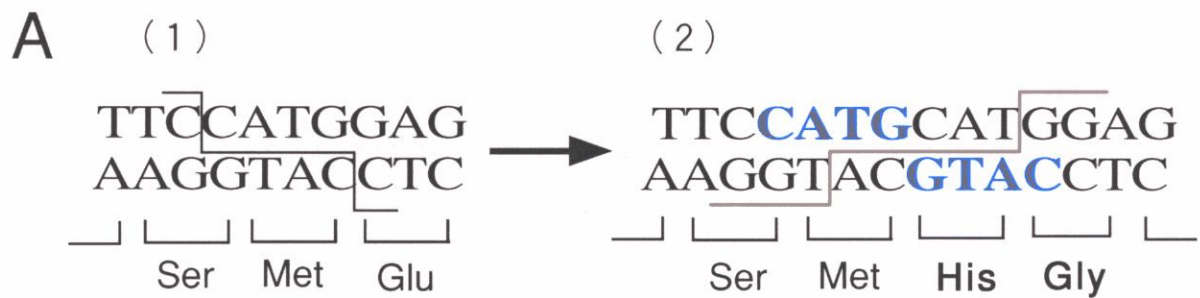
B



図III-1

遺伝子マーカー挿入に伴う相同染色体間の相同領域の位置関係の変化

相同染色体の一方にのみ遺伝子マーカーを導入した場合には、その遺伝子マーカーの大きさの分だけ相同染色体間の相同領域の位置関係にずれが生じる。これが原因となり遺伝子マーカーの飛び出しという現象が起こる可能性が考えられる (A)。ここで、相同染色体のもう一方の側にも遺伝子マーカーと相同な配列を導入すれば位置関係のずれが矯正されるので、遺伝子マーカー飛び出しの可能性は低く抑えられる (B)。



図III-2 標的部位に $URA3$ 相同配列をもった一倍体細胞の作製

A $ura3$ 変異遺伝子の作製

$URA3$ 遺伝子を $NcoI$ サイトで切断(1)、末端をKlenow Fragmentを用いて平滑化した後再結合する。これにより、フレームシフトが生じると共に $EcoT22I$ サイトが新たにできる(2)。

B $ura3$ 変異遺伝子の導入

標的部位に $ura3$ 変異遺伝子($ura3-91$)を直接導入しても表現型が変化しない為、目的の形質変換体を選抜できない。そこでまず標的部位に $URA3$ 遺伝子を導入し Ura^+ とし(1)、この後に改めて $ura3$ 変異遺伝子を導入する(2)。この場合には Ura^+ から Ura^- への表現型の変化を伴うので、形質転換体を5FOAを用いて選抜することができる。

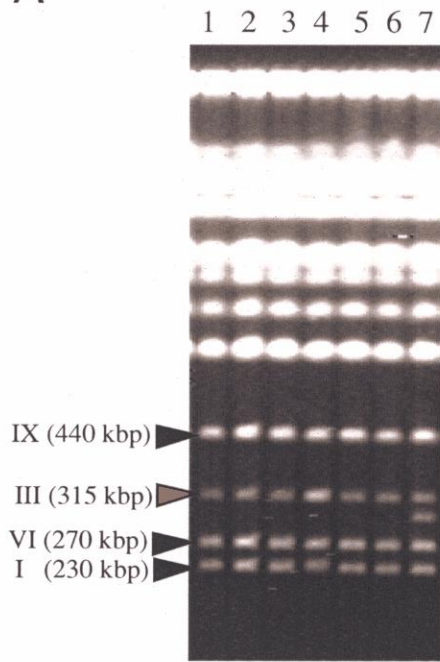
目的の株の標的部位に直接 $ura3$ 断片を導入しても表現型は変化せず(Ura^- のまま)形質転換体の選抜が行えない。そこではじめに標的部位に $URA3$ 断片を導入し($Ura^- \rightarrow Ura^+$)、その $URA3$ 領域を $ura3$ 断片と置き換える($Ura^+ \rightarrow Ura^-/5FOA^s \rightarrow 5FOA^r$)という二段階の手順を踏んだ(図III-2B)。

第二節 染色体異常頻度の測定及び分類

染色体異常の発生頻度の測定及び分類は、本研究で行った3つの解析において少しずつ手法が異なるのでその都度説明する。本節における解析の場合には、当研究室平岡によってなされた相同染色体上に $URA3$ 相同配列をもたない株における場合との比較が目的であった為、発生頻度の測定及び分類に関しても、ほぼ可能な限りその際の方法(平岡, 1996年修士論文)を踏襲した。すなわち、発生頻度の測定においてはまず菌体をウラシルを含まない合成培地で前培養し、そこから約1000個体ずつを取り出し、ウラシルを加えたYPD補強培地による本培養に供した。約18世代まで培養を続けた後、培養液を5FOA寒天培地に塗布し、一定時間(48時間)後5FOA耐性として得られる細胞数を測定し、これを総菌数で割った値をこの生育段階における染色体異常の発生頻度とした。この際、平岡の解析の場合と同様に5FOA耐性として得られた変異体のなかにコロニー形成能が異なると思われる2つの集団が認められたので、これらを標準コロニー、小コロニーと称して区別した。各集団から一定数の検体を無作為に抽出し、以降の分類に供した。

染色体異常の分類においては最初にパルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed Field Gel Electrophoresis; 以下PFGE)によって5FOA耐性細胞の第Ⅲ染色体のサイズの違いや本数を調べた。ここで第Ⅲ染色体が一本分しか定量されず、野生型のものとは異なるサイズのバンドが見られるものを染色体欠失あるいは転座、第Ⅲ染色体が一本分しか定量されず通常とは異なるサイズのバンドも見られないものを染色体喪失、第Ⅲ染色体が通常で二本分定量されるものを点突然変異あるいは組換え型変異として分類した(図III-3A)。点突然変異あるいは組換え型変異と分類された検体については、コロニーPCRによって $URA3$ 領域を増幅し、これを $EcoT22 I$ あるいは $Nco I$ で処理することによって両者を更に区別した(図III-3B)。すなわち、点突然変異においては $URA3$ 遺伝子、 $ura3$ 変異断片由来の増幅産物が1:1の割合で存在するので2つの制限酵素のいずれで処理した場合にも部分消化となるが、組換え型変異においては $ura3-91$ 変異断片由来の増幅産物のみが存在するので $EcoT22 I$ 処理で完全消化、 $Nco I$ 処理で全く消化されないという相違がある為、これによって両者の区別が可能である。

A



A パルスフィールドゲル電気泳動による解析

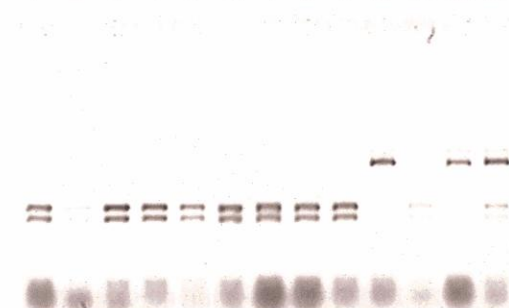
パルスフィールドゲル電気泳動により変異体の各染色体を分離し、これをもとに染色体異常の同定を行った。まず第I、VI、IX染色体のバンドとの比較より第III染色体のバンドの強度を定量し、これが2本分あるものを点突然変異あるいは組換え型変異と分類した(レーン4)。次に、第III染色体が1本分しかないものに関して(レーン1,2,3,5,6,7)通常野生型株には見られないサイズのバンドをもつものを染色体欠失あるいは転座(レーン7)、もたないものを染色体喪失(レーン1,2,3,5,6)と分類した。

B 制限酵素切断による解析

Aの解析で点突然変異あるいは組み換え型変異と分類されたものに関しては、さらに制限酵素切断による解析を行った。変異体のURA3領域をコロニーPCR法により増幅し、これをEcoT22IあるいはNcoIで処理した。点突然変異の場合はURA3断片とura3-91断片を共にもつので、いずれの制限酵素で処理した場合でも部分切断(親株の切断パターンと同じ)となる。点突然変異がNcoIサイトに発生した場合には、NcoI処理で全く切断されず、EcoT22Iで処理した場合に部分切断となる。これに対し、組換え型変異の場合には、NcoI処理で全く切断されず、EcoT22Iで処理した場合は完全に切断される。

B

(1) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



(1) EcoT22I 切断

(2) NcoI 切断

lane;

1-8; sample

9 ;ura3-91 一倍体細胞(YMJ2)

10 ;URA3 一倍体細胞(YMH1)

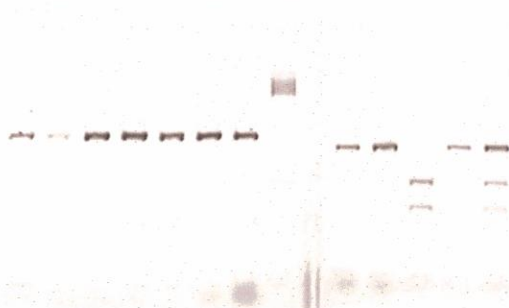
11 ; ura3-91/ - 二倍体細胞(YMJ2×YKU1)

12 ; URA3/ URA3 二倍体細胞(YMH1×YMJ1)

13 ; URA3/ura3-91 二倍体細胞(YMH1×YMJ2)

M ; 分子量マーカー

(2) 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 13



図III-3 相同配列保有株における染色体異常の解析

第三節 *URA3*領域に相同配列をもたない場合との比較

上述の様に相同染色体上の*URA3*領域に相同性をもたせた株(以下相同配列保有株)を作製し、その菌株を用いて発生頻度の測定を13実験区に渡って行った。更にその内の7実験区から各実験区当たり標準コロニー型8個体、小コロニー型10個体程度を抽出し、これらに対して染色体異常の分類を行った。結果は表III-1に示す通りで、染色体異常全体の発生頻度は 1.6×10^{-4} であった。この内の63%が組換え型変異、34%が染色体喪失、3.0%が染色体欠失あるいは転座型の異常であった。この結果を相同染色体上の*URA3*領域の相同配列が欠落した株(以下相同配列欠損株)の結果と比較すると、全体の発生頻度に関してほとんど差は見られなかったが(1.6×10^{-4} と 1.7×10^{-4})、染色体異常の内容に関しては、相同配列保有株において組換え型の変異が高頻度で発生する(10.1×10^{-5} ; 全体の63%)のに対し、相同配列欠損株においては組換え型変異の発生頻度がそれ程高くなく(5.2×10^{-5} ; 全体の30%)、それにかわって染色体喪失が高頻度で発生している(10.7×10^{-5} ; 全体の62%)という相違が見られた(表III-3)。

また、コロニーPCR及び制限酵素処理を行った結果からは、解析を行ったすべての例において増幅された断片が*ura3*変異遺伝子のみ由来することが明らかとなった。このことは、本節の解析においてもこれまでと同様、点突然変異が全く検出されなかったことを意味する。

第四節 考察

(1) 相同染色体の相同領域の影響

本章では相同染色体間の対立領域の相同性(あるいは非相同領域の存在)が染色体異常に影響を及ぼし得るかどうかを調べた。まず最初に、相同染色体のもう一方の側にも*URA3*断片と相同な配列が導入された菌株を構築したが、この細胞においては相同染色体間の*URA3*領域の相同性が補完されると共に、その周囲の相同領域の位置関係のずれも解消されている。これによって、これまでに考えられた*URA3*遺伝子マーカーの飛び出しという現象に対してその可能性を可能な限り打ち消した訳であるが、この場合においても、これまでとほぼ同じオーダーの出現頻度で染色体喪失、組換え、染色体欠失あるいは転座といった様々な染色体異常が見られた。このことは、これまでの解析で見られた染色体異常が*URA3*遺伝子マーカーの飛び出しに依存して起こっている訳ではない事を意味している。言い換えると、我々がこれまで見て来た第III染色体における現象が遺伝子マーカーを人為的に導入したことに起因する特殊なものではなく、細胞自身もつ内在的な因子に基づいて起こる本質的な現象であることが確認されたといえる。

しかしそれでは、*URA3*領域の相同配列の欠落は染色体レベルで見た異常の発生に全く影響を及ぼしていないのだろうか？

表III-1 相同配列保有株における染色体異常頻度の測定 ($\times 10^5$)

実験区	染色体異常頻度	小コロニー%
#1	16.0	16.1
#2	11.2	21.8
#3	9.3	17.3
#4	18.1	17.4
#5	17.7	23.0
#6	15.6	16.0
#7	14.3	17.6
#8	18.7	16.1
#9	17.7	17.2
#10	15.2	17.7
#11	16.3	13.3
#12	20.7	13.0
#13	17.2	20.3
平均±標準偏差	16.0±3.1	17.4±2.9

5FOA^rとして得られる変異体の中にはコロニー形成能に関して異なる性質を持つと思われる2つの集団が存在したので、これらを標準コロニー型、小コロニー型と称して区別した。本研究においては両者の境界を直径0.6 mm(寒天培地上に画線培養して48時間後)とした。

表III-2 相同配列保有株における染色体異常の分類

実験区	# 1		# 2		# 3		# 9	
	標準	小	標準	小	標準	小	標準	小
コロニーの大きさ								
点突然変異	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
染色体欠失・転座	ND	1	ND	1	ND	1	ND	ND
染色体喪失	1	7	2	6	ND	1	4	10
組換え	7	2	6	3	8	8	4	2
計	8	10	8	10	8	10	8	12

実験区	# 10		# 11		# 13		合計	
	標準	小	標準	小	標準	小	標準	小
コロニーの大きさ								
点突然変異	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
染色体欠失・転座	1	1	ND	ND	ND	3	1	7
染色体喪失	2	6	4	4	4	6	17	40
組換え	5	5	4	8	4	3	38	31
計	8	12	8	12	8	12	56	78

- ・ 実験区の番号は表III-1で示したものと同一である。
- ・ 各実験区において標準コロニー型、小コロニー型の異常を別々に集計した。
- ・ 変異体が検出されなかった場合にはNDと表記した。

表III-3 相同配列保有株及び相同配列欠損株における各染色体異常の発生頻度 (×10⁻⁵)

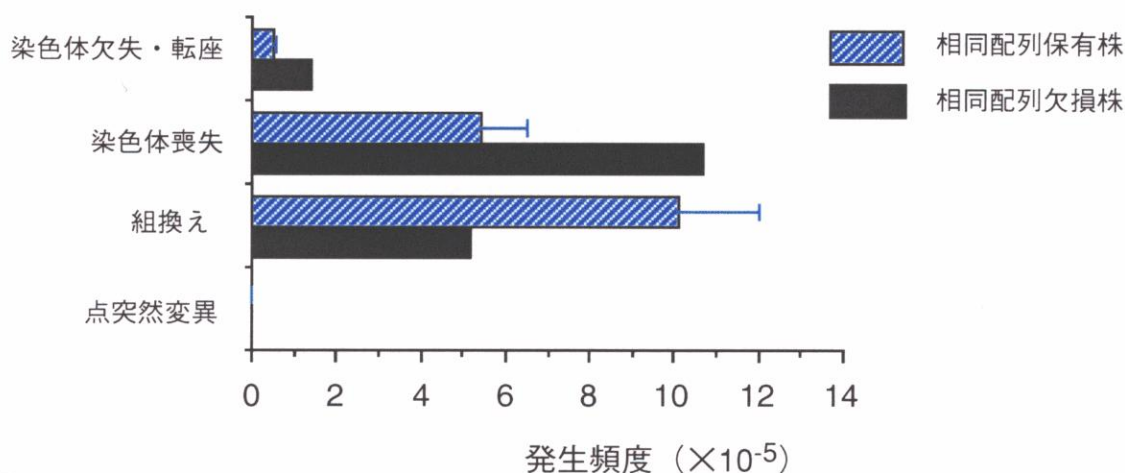
	点突然変異	欠失・転座	染色体喪失	組換え	合計
相同配列保有株 (%)	<0.20	0.49±0.09 (3.1%)	5.5±1.0 (34.1%)	10.1±1.9 (63.1%)	16.0±3.1
相同配列欠損株 (%)	<0.45	1.4 (8.1%)	10.7 (62.0%)	5.2 (30.0%)	17.3
保有/欠損比		0.35	0.51	1.9	0.92

(±標準偏差)
 ・相同配列欠損株における値は平岡が行った解析によるものである。
 ・各染色体異常の発生頻度は以下のようにして求めた。

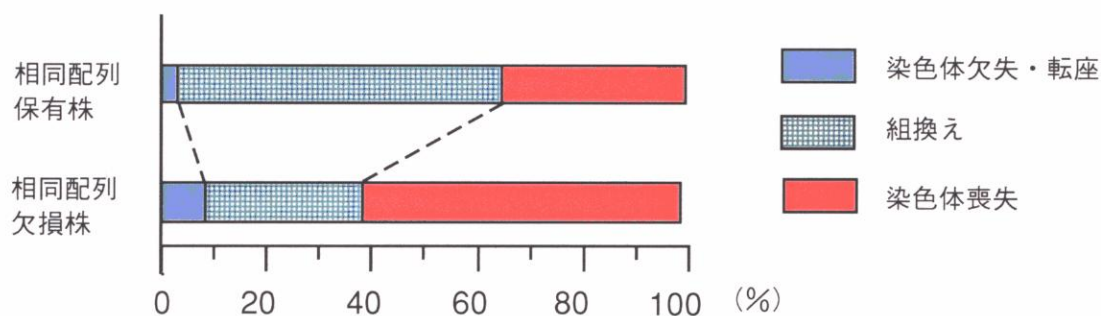
例) 染色体喪失の発生頻度

$$\begin{aligned}
 \left(\begin{array}{l} \text{各実験区} \\ \text{の喪失} \end{array} \right) &= \left(\begin{array}{l} \text{各実験区全体} \\ \text{の異常頻度} \end{array} \right) \times \left\{ \left(\begin{array}{l} \text{各実験区} \\ \text{の標準コロニー型} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \text{標準コロニー型に} \\ \text{おける喪失の割合} \end{array} \right) \right. \\
 &\quad \left. + \left(\begin{array}{l} \text{各実験区} \\ \text{の小コロニー型} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \text{小コロニー型に} \\ \text{おける喪失の割合} \end{array} \right) \right\}
 \end{aligned}$$

A



B



図III-4 相同配列保有株と相同配列欠損株における比較

A 各染色体異常の発生頻度の比較

B 各染色体異常の存在比の比較

前節に示した通り、相同配列保有株と相同配列欠損株の両者において、全体的な染色体異常の発生頻度には確かに殆ど差が見られなかった(1.6×10^4 と 1.7×10^4)。しかしその内容に関して言うと、前者においては組換え型変異が最も多く見られたのに対し(10.1×10^3 ; 全体の63%)、後者においては逆に染色体喪失が最も多く見られ(10.7×10^3 ; 全体の62%)、組換え型変異はそれ程多くない(5.2×10^3 ; 全体の30%)という差異が見られた。これは単に割合の問題ではなく、個別の染色体異常頻度を比較した場合にも言えることであり、この違いこそがURA3相同配列の有無によるものであると考えた。以下では、その理由について考えてみたい。

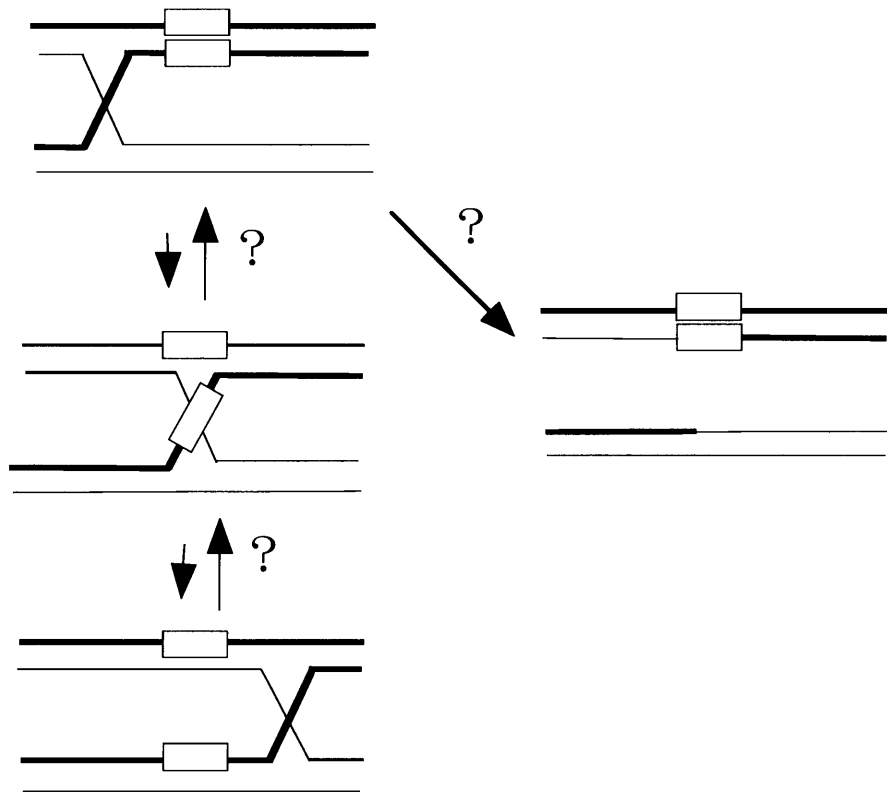
組換え(交叉)によってURA3断片が失われるメカニズムについては序章で示したモデルのように、相同染色体同士の相同組換えがヘテロに存在するURA3断片の喪失のために重要であると考えられる。本研究において組換え型変異体のURA3領域を制限酵素処理した結果から、URA3遺伝子マーカーがura3変異遺伝子(ura3-91)に置き換わっていることが判明し、相同染色体間での組換えが現実になされていることが強く示唆された。このことから、URA3相同配列の染色体異常に及ぼす影響も恐らくこの相同染色体間の相同組換えのメカニズムと何らかの関係があるのではないかと考えた。相同染色体間での組換えにおけるURA3相同配列の影響について考えると、URA3相同配列が相同染色体上に存在しない場合には、相同組換えの際に形成される中間体(Holliday, 1964; Meselson and Radding, 1975)の分岐がこの領域を通過しにくいのではないかと推測される。すなわち相同配列欠損株においては、URA3領域に相同性が無い為この領域を超えての鎖交換が行われにくいという可能性がある。また、仮にこの領域を乗り越えて鎖交換が行われた場合には、それによって形成されるヘテロ二重鎖の相同性がやはり低い為に、URA3領域が周囲の染色体構造より突出したループ状の構造をとり易いのではないと思われる。この様な構造内には損傷も導入され易く、かつ構造自体も非常に不安定であることが推測され、これによって染色体喪失が誘発されているのではないかと考えられる(図III-5)。

以上をまとめると、相同配列欠損株においては、組換えの際の分岐点の移動がURA3領域において妨げられ易く、また組換え後に形成されるヘテロ二重鎖が不安定なために、相同配列保有株に比べて組換え型の発生頻度が相対的に低く、染色体喪失の発生頻度が相対的に高くなっているのではないかと推測される。

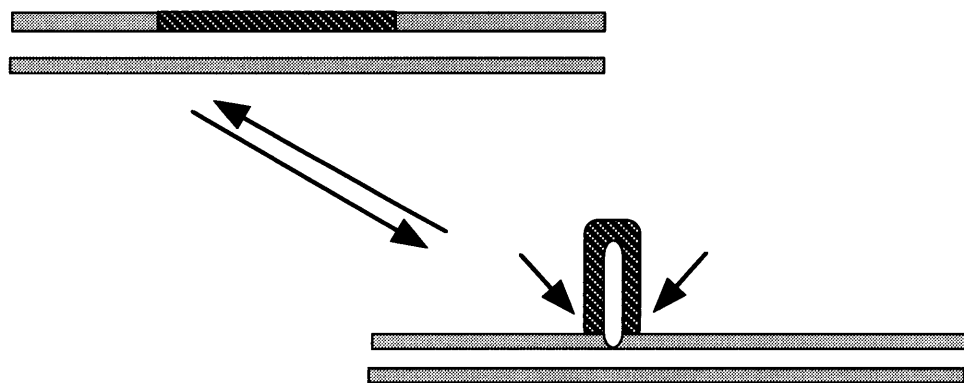
(2) 修復系酵素群との関係

大腸菌において、互いの相同性がそれ程高くないDNA鎖間で組換えがなされようとした場合(homeologous recombination)には、MutSやMutLといったミスマッチ修復系酵素群がRecA蛋白質を介してこの反応を阻害することが知られている(Modrich and Lahue, 1996)。また、組換えによるヘテロ二重鎖形成後に起こる反応としては、ヘテ

A



B



図III-5 *URA3*領域における分岐の移動のモデル

*URA3*領域に相同性をもたない相同染色体間においては、組換え中間体の分岐の移動がこの領域を超えて進みにくいのではないかとと思われる (A)。また、仮に鎖交換がなされた場合には、*URA3*断片のみ相同配列をもたないのでこの領域がループ状に突出するのではないかと予想される (B)。このような構造には、ニックなどの傷が入りやすい。

ロ二重鎖上の塩基の不对合が修復される反応と、一度形成されたヘテロ二重鎖間での塩基の対合がキャンセルされて元の二本鎖DNAに戻る反応との2つが考えられるが、そのどちらの反応が選択されるかは一般にヘテロ二重鎖間の相同性の程度に依存しており、この相同性の認識に関与するのがミスマッチ修復系酵素群であると考
えられている。同様の現象は出芽酵母においても見られ、この場合には*mutS*や*mutL*
のホモログ遺伝子である*MSH2*や*MSH3*、*PMS1*といった遺伝子の発現産物がこの働
きに関与している(Modrich and Lahue, 1996)。本章の解析において*URA3*領域の相同配
列の有無が組換えの起こり易さに影響を及ぼす可能性が示唆されたが、両者の比較
をミスマッチ修復機能欠損というバックグラウンドにおいて行った場合にどのような
結果が得られるか興味深い。また、二本鎖DNA間の相同性が低い領域で見られる10
bp以上の大きなループ構造に関しては、*FEN1*遺伝子産物(Miret et al., 1996; Yao and
Kow, 1996)がこの構造を認識してニックを導入し、これに引き続き除去修復がなさ
れるのではないかと現在のところ推測されているが、この*FEN1*遺伝子機能が欠損し
たときに、相同配列保有株と相同配列欠損株においてそれぞれどのような変化が見ら
れるかというのも興味深いところである。恐らく、この場合には、ヘテロ二重鎖上
のループ構造が修復されずに残り、この部分への損傷の導入が促進される為に相同
配列欠損株における染色体喪失の発生頻度の上昇が顕著になるのではないかと予想
される。

IV 遺伝子マーカーの転写方向の影響

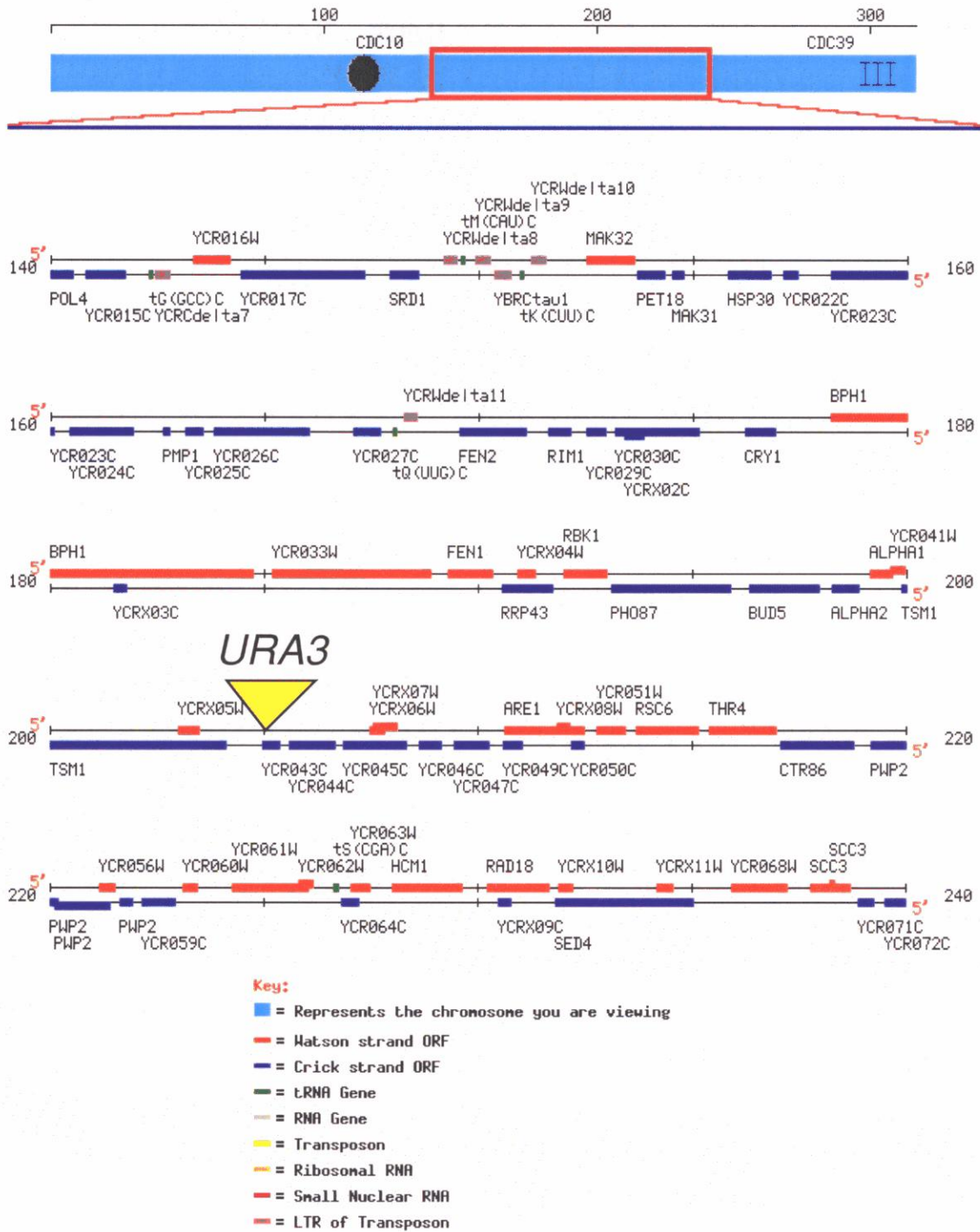
前章では染色体異常の発生に影響を及ぼす因子として相同染色体の相同領域の影響について検証したが、本章ではその他の要因として遺伝子マーカーの転写方向の影響について考える。

そもそも平岡らが検出系の構築の際に *URA3* 遺伝子マーカー挿入の標的部位としたのは、第Ⅲ染色体(全長315 kbp)の右腕(全長200 kbp)のほぼ中央付近である(Oliver et al., 1992)。解析の場を第Ⅲ染色体に選定した理由は序論にも示した通りであるが、遺伝子マーカーの挿入位置としてこの部位を選定したのは、「第Ⅲ染色体の遺伝子を破壊することなくできるだけ広範囲の欠失を解析する」という目的からであり(平岡, 1996年修士論文)、当初は標的部位周辺にどのようなORFが存在するかや遺伝子マーカー挿入の方向について特に問題にすることはなかった。しかしながら、この周辺のORFの構造について詳しく目を向けると、標的部位前後10 kbpにわたって存在するORFがすべて(偽ORFと思われるものは除く)同一の方向を向いており、さらに導入した *URA3* 遺伝子マーカーは、これとは逆の向きに挿入されていることが判明した(図IV-1)。この計20 kbpにわたる領域のORFの方向が揃っていることに意味があるのがどうかは不明であるが、もし意味があるとするならば、それには転写複合体と複製フォークとの衝突を避ける為、あるいはこの領域に存在する遺伝子が共通の発現制御を受ける為である等の理由が考えられる(後述)。

このような領域内に、その領域全体の方向性を遮る形で遺伝子マーカーを導入することが何かしらの染色体異常を誘発する事につながるのではないかと考えたので、本章における解析では、挿入する遺伝子マーカーの方向を領域全体の方向性にそらえた場合と逆にした場合とで染色体異常頻度及び内容に相違が見られないかどうか比較検討することにした。

第一節 補助的な遺伝子マーカーを用いた染色体異常検出系の利用

これまでの解析では *URA3* 遺伝子マーカーのみを用いていたが、本章の解析においては当研究室梅津が新たに構築した、複数の遺伝子マーカーを用いた検出系を利用することにした。これは、*URA3* 遺伝子マーカーが失われることを指標としている点ではこれまでと変わらないが、第Ⅲ染色体左腕に *LEU2* 遺伝子を、右腕末端部のテロメア領域付近に *ADE2* 遺伝子を補助マーカーとして導入している点が異なる。これにより、5FOA耐性を示す個体の大まかな分類が栄養要求性の違いをもとに寒天培地上で簡便に行えると同時に、PFGEによる解析と併用することで更に詳細な分類を行うことが可能となる。具体的にはこれまでの検出系において組換え型変異と呼んでい



図IV-1 第III染色体 *URA3* マーカー挿入部位周辺のORF構造

Saccharomyces Genome Database より転載した第III染色体 *URA3* 遺伝子マーカー挿入部位周辺のORF地図を示す。図中の赤い長方形で示された部分がワトソン鎖上に存在するORF、青い長方形で示された部分がクリック鎖上に存在するORFである。黄色い三角で示された地点が *URA3* 遺伝子マーカー挿入部位であり、前後10 kbpに存在するORFがほぼ全て（偽ORFと思われるものは除く）クリック鎖側にあることがわかる。この場合、この領域の転写方向は右から左へ（テロメア側からセントロメア側へ）ということになるが、「順方向」ではこれと同方向に（クリック鎖上に）、「逆方向」ではこれと逆方向に（ワトソン鎖上に）転写方向をもつように *URA3* 遺伝子が組み込まれることになる。また、図中のこの他の領域でもいくつかのORFが一方の側の鎖上に偏って存在する傾向が見て取れる。

たものが交叉と遺伝子変換に、染色体欠失あるいは転座と呼んでいたものが染色体
内欠失と染色体間組換え(不等交叉を含む)に分類し直される(図IV-2)。しかし、検出
系が異なる為これまでの解析結果を単純に比較対象に用いることはできず、このた
め本章の研究においてはURA3遺伝子マーカーの方向を入れ換えたいずれの場合にお
いても新たに染色体異常頻度の測定を行うことにした。

第二節 染色体異常頻度の測定及び分類

染色体異常頻度の測定に対する基本的な考え方はこれまでと同じであり、アデニ
ン、ロイシン、ウラシルを含まない合成培地で前培養したのち、ここから1000細胞
を取りYPD培地にアデニン、ウラシルを加えた補強培地に植菌して本培養を行っ
た。この培養液を5FOA寒天培地及び5FOA-Leu寒天培地(ロイシンを含まない5FOA
寒天培地)、5FOA-Ade Leu寒天培地(アデニン、ロイシンを含まない5FOA寒天培地)
に一定量ずつ塗布する事により、(5FOA⁻)、(5FOA⁻ Leu⁺)、(5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁺)の表現
型を示す変異体の発生頻度を各々測定した。次に(5FOA⁻)の発生頻度から(5FOA⁻
Leu⁺)の発生頻度を、(5FOA⁻ Leu⁺)の発生頻度から(5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁺)の発生頻度を減
じることにより(5FOA⁻ Leu⁺)、(5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁺)の表現型を示す変異体の発生頻度を
求めた。

これらのうち、a) (5FOA⁻ Leu⁺)、b) (5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁺)、c) (5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁺)の表現
型を示す変異体が各々 a)染色体喪失、b)交叉もしくは染色体間組換え、c)遺伝子変
換もしくは染色体内欠失に対応する(図IV-2)。ここで、b)のカテゴリーに属する交叉
と染色体間組換えとを比較すると、両者の間には後者の場合にのみ第Ⅲ染色体のサ
イズに変化が生じるという違いがある。同様の関係がc)のカテゴリーに属する2つ
の変異に対しても成り立つので、次に、b)およびc)に属する変異体を一定数抽出し、
PFGEに供して第Ⅲ染色体のサイズを調べることを行い、これにより交叉と染色体間
組換えあるいは遺伝子変換と染色体内欠失の存在比を求めた。この系においては、
点突然変異も c)の表現型を示す事になるが、前章及び平岡の解析において、これま
で点突然変異が全く現れていないということからその存在割合は無視できるほど小
さいと考え、本章における解析ではこれ以降点突然変異を区別する為の実験は行わ
なかった。また、a)の表現型を示す変異体が全て染色体喪失であることは実験系構
築の際の予備実験において梅津により確認されている。

第三節 URA3断片の向きの異なる2種類の株における比較

上述の手法に従ってURA3遺伝子マーカーの方向を周辺領域のORFの方向に揃えた
場合(以下「順方向」)、及び逆向きにした場合(以下「逆方向」)において各々27実験
区、16実験区にわたり染色体異常頻度の測定を行った。さらに、「順方向」のb)の

検体を6実験区から合計56個体、c)の変異体を7実験区から合計91個体抽出し、これらをPFGEによる染色体異常の分類に供した。「逆方向」のPFGEによる分類のデータに関しては当研究室梅津が行った解析の結果を参考にしている。

それぞれの結果は表IV-1から表IV-4までに示す通りであり、全体の発生頻度に関しては「逆方向」の場合が「順方向」の場合に比べてわずかに高い値となったが(1.66×10^{-4} と 1.82×10^{-4})、これが有意の差であるかは不明である。各染色体異常を別個に見た場合には、染色体喪失の発生頻度が「順方向」に比べ「逆方向」で高く(6.2×10^{-5} と 9.9×10^{-5})、交叉及び遺伝子変換型の発生頻度は「逆方向」に比べ「順方向」で高い値となったが(6.2×10^{-5} 、 0.1×10^{-5} と 9.3×10^{-5} 、 0.2×10^{-5})、これらの差は数学的に見て有意なものであった。また、染色体内欠失型の検体に関しては、「順方向」「逆方向」いずれの場合においてもPFGEで調べた限りにおいて全て同じ性質のもの(約80 kbpのサイズの減少を示す)であった。

第四節 考察

URA3遺伝子マーカーを標的部局周辺のORFの方向に揃えて挿入した場合(「順方向」)と逆向きに挿入した場合(「逆方向」)における染色体異常頻度及びその内容を比較することによって、染色体上のORF群の転写方向の統合性が染色体異常の発生に何かしらの影響を及ぼし得ないかということを検証したのが本章における解析である。その結果として染色体喪失については、「順方向」に比べて「逆方向」において発生頻度が高く、交叉、遺伝子変換については反対に「逆方向」に比べて「順方向」において発生頻度が高いという相違が見られた(前節参照)。この相違は非常に僅かなものではあるが、多数の実験区(「順方向」27、「逆方向」16)にわたって解析を行ったことにより、数学的に有意な違いであると結論付ける事が出来た。これを根拠に染色体異常発生に転写方向の統合性が何らかの影響を及ぼし得るという見解に立って、以下において本章の解析結果が何を意味するのかを考えてみたい。

転写方向の違いによって影響を受ける可能性のある因子としてまず考えられるのが複製フォークの進行である。複製フォークと転写複合体が衝突した場合、複製フォークがそこで停止するという現象がこれまでに知られており(Liu and Alberts, 1995; Deshpande and Newlon, 1996)、枯草菌等の例においては、転写複合体と複製フォークとの衝突を避ける為に、主要な遺伝子に関してはその転写の方向が複製フォークの進行方向を妨げない様なかたちでゲノム上に配置されているということが示唆されている(Kunst et al., 1997)。ここで、我々の解析においてURA3断片挿入の標的部局としている領域周辺の複製方向について文献的に調べてみたところ、この領域においては複製の方向が周囲のORFの転写方向と一致しているらしいことが解った(Baudat and Nicolas, 1997)。このことから、「逆方向」の細胞においては、挿入したURA3遺

表IV-1 *URA3*遺伝子マーカーの挿入方向が異なる2種類の菌株における染色体異常頻度の測定 ($\times 10^{-5}$)

A	実験区	染色体異常頻度	(1) 頻度	(2) 頻度	(3) 頻度
	#1	23.1	7.1	15.0	1.0
	#2	16.0	9.5	5.9	0.6
	#3	14.2	4.5	9.1	0.6
	#4	13.9	6.3	7.3	0.3
	#5	18.7	4.3	14.1	0.3
	#6	15.4	6.6	8.4	0.4
	#7	11.4	4.7	6.0	0.7
	#8	24.0	3.5	20.2	0.3
	#9	22.9	15.3	7.4	0.3
	#10	28.9	3.9	24.0	1.0
	#11	17.3	3.0	13.2	1.1
	#12	14.7	4.7	9.3	0.7
	#13	13.6	3.0	9.4	1.2
	#14	13.5	4.5	8.4	0.6
	#15	24.1	7.7	16.2	0.3
	#16	11.2	7.2	3.8	0.2
	#17	14.1	6.5	6.2	1.3
	#18	15.1	9.0	5.9	0.2
	#19	10.7	4.0	6.4	0.4
	#20	22.5	9.3	12.8	0.4
	#21	12.9	5.3	7.4	0.2
	#22	12.8	5.1	7.3	0.4
	#23	13.7	4.7	8.0	1.1
	#24	13.2	4.4	8.1	0.7
	#25	12.6	7.7	4.5	0.4
	#26	21.5	6.7	12.3	2.5
	#27	15.7	8.4	6.9	0.5
	平均±標準偏差	16.6±4.8	6.2±2.7	9.7±4.8	0.7±0.5
B	実験区	染色体異常頻度	(1) 頻度	(2) 頻度	(3) 頻度
	c1	21.2	15.7	4.8	0.7
	c2	13.6	11.1	2.3	0.2
	c3	23.1	16.9	5.7	0.5
	c4	12.8	4.8	8.0	0.9
	c5	12.0	5.2	6.3	0.6
	c6	24.2	16.6	7.1	0.5
	c7	22.5	7.8	13.5	1.2
	c8	13.0	7.2	5.1	0.7
	c9	21.5	8.1	10.9	2.5
	c10	26.8	16.5	7.8	2.5
	c11	15.2	9.0	5.7	0.5
	c12	13.0	8.5	4.2	0.3
	c13	17.8	7.0	10.5	0.4
	c14	24.0	11.5	11.6	0.9
	c15	15.5	5.5	9.5	0.6
	c16	14.5	6.6	7.3	0.6
	平均±標準偏差	18.2±5.0	9.9±4.3	7.5±3.0	0.8±0.7

A 順方向 / B 逆方向

- (1) (5FOA⁻ Leu⁻) ; 染色体喪失
 (2) (5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁻) ; 交叉あるいは染色体間組換え
 (3) (5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁺) ; 遺伝子変換あるいは染色体内欠失

表IV-2 順方向細胞における染色体異常の分類

A; (5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁺) 表現型内の分類
B; (5FOA⁻ Leu⁺ Ade⁻) 表現型内の分類

実験区	#6	#7	#11	#12	#13	#14	#15	7totals	control
遺伝子変換	3	3	2	3	2	8	7	28	9
染色体内欠失	3	12	12	9	11	6	9	62	81
合計	7*	15	14	12	13	14	16	91	90

B

実験区	#6	#7	#11	#12	#13	#14	6totals	control
交叉	10	10	7	7	9	10	53	49
染色体間組換え	ND	ND	ND	1	2	ND	3	11
合計	10	10	7	8	11	10	56	60

- * 第Ⅲ染色体が二本共失われた変異体が一個体存在した。恐らく二重変異体であると思われるが、この個体に関する同定はできなかった。
- ・ 実験区番号は染色体異常頻度測定を表における順方向細胞の実験区番号と一致する。
- ・ 逆方向細胞における解析結果は梅津が行ったものである。これをcontrolとして記載する。
- ・ 変異体が検出されなかった場合にはNDと表記した。

表IV-3 順方向及び逆方向細胞における各染色体異常の発生頻度 (×10⁻⁵) その1

	染色体喪失	遺伝子変換	染色体内欠失	交叉	染色体間組換え	合計
順方向	6.20±2.65	0.20±0.15	0.44±0.34	9.22±4.55	0.53±0.26	16.6±4.84
(%)	(37.3%)	(1.2%)	(2.7%)	(55.5%)	(3.2%)	
逆方向	9.85±4.33	0.08±0.07	0.76±0.62	6.15±2.46	1.38±0.56	18.2±5.03
(%)	(54.1%)	(0.4%)	(4.2%)	(33.8%)	(7.6%)	
順/逆比	0.63	2.5	0.58	1.5	0.38	0.91

(±標準偏差)

例) 交叉の発生頻度

$$\left(\begin{array}{l} \text{各実験区の交叉の} \\ \text{発生頻度} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{l} \text{各実験区の(2)型(5FOA}^{\text{-}} \text{ Leu}^{\text{+}} \text{ Ade}^{\text{-}} \text{)} \\ \text{発生頻度} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \text{(2)型全体に占める} \\ \text{交叉の割合} \end{array} \right)$$

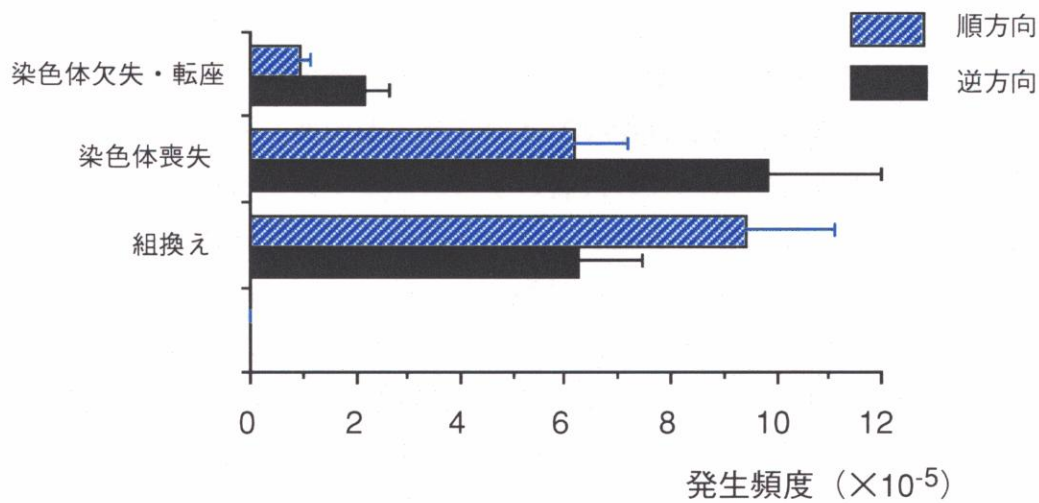
表IV-4 順方向及び逆方向細胞における各染色体異常の発生頻度 (×10⁻⁵) その2

	欠失・転座	染色体喪失	組換え	合計
順方向	0.97±0.46	6.2±2.7	9.4±4.6	16.6±4.8
(%)	(5.8%)	(37.3%)	(56.7%)	
逆方向	2.1±1.0	9.9±4.3	6.2±2.5	18.2±5.0
(%)	(11.8%)	(54.1%)	(34.2%)	
順/逆比	0.45	0.63	1.5	0.91

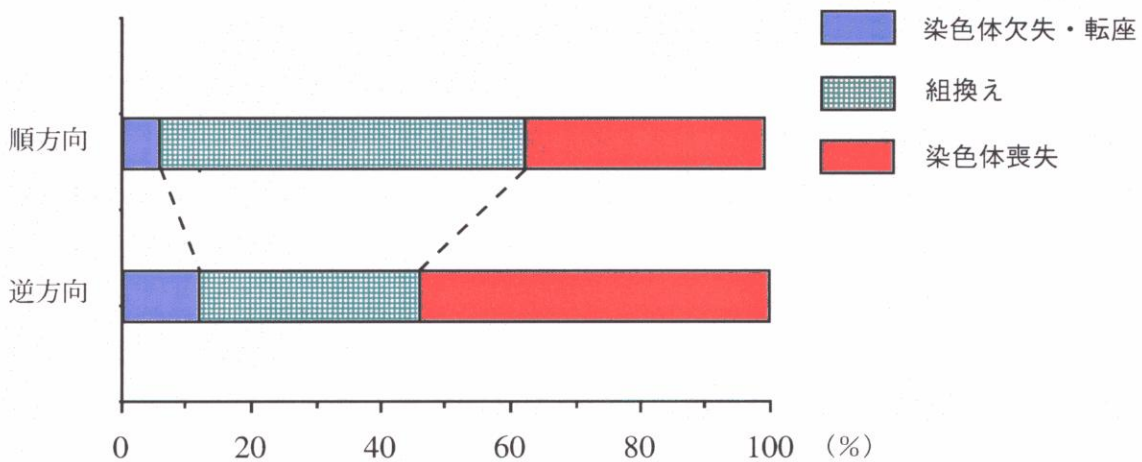
(±標準偏差)

染色体間組換え及び染色体内欠失を「染色体欠失・転座」と、交叉及び遺伝子変換を「組換え」として分類した場合の各染色体異常の発生頻度を示す。頻度の求め方は表IV-3と同様である。

A



B



図IV-3 順方向及び逆方向細胞における比較

- A 各染色体異常頻度の比較
- B 各染色体異常の存在比の比較

(注) 数学的有意差の判定について

「順方向」における各染色体異常頻度の平均値及び標準偏差を各々 m_1, σ_1 , 解析した実験区数を n_1
 「逆方向」における各染色体異常頻度の平均値及び標準偏差を各々 m_2, σ_2 , 解析した実験区数を n_2
 とすると、帰無仮説 $H_0: m_1=m_2$ のもとでは

$$Z = \frac{m_1 - m_2}{(\sigma_1^2/n_1 + \sigma_2^2/n_2)^{1/2}}$$

は $N(0,1)$ の正規分布に従う。従って、99%の有意水準のもとで帰無仮説 H_0 を検定すると、その棄却域は $|Z| \geq z(0.01)=2.58$ となる。染色体喪失、交叉、遺伝子変換、組換え型変異の $|Z|$ の値を求めると、それぞれ3.05, 2.87, 3.55, 2.95となりいずれもこの棄却域に入ることが判る。よって帰無仮説 H_0 は棄却され、 m_1 と m_2 の間に有意の差があることが認められる。

伝子マーカーの転写方向が複製の方向と逆になる為、この領域において先の複製フォークの停止という現象が生じている可能性がある。

また、この領域内のORFが共通のシス因子やトランス因子を利用しており、発現制御に関していわゆる「共同体」を形成している可能性も考えられる。ベクタープラスミド内に遺伝子を挿入する際に、その挿入の方向によって遺伝子の発現量が大きく異なることがあるというのは周知の事実である。この場合には、挿入した遺伝子のもつ転写促進配列(プロモーター結合配列など)とベクタープラスミド上にある転写促進配列が加算的に働くことなどが原因として考えられるが、このようなシス因子の相加的効果(あるいは相乗効果)が、出芽酵母の染色体上において見られても何ら不思議なことではない。つまり、複数のORFが互いの転写方向を一つにすることで、全体的な発現レベルを高める効果があるのではないだろうか。この中に他の遺伝子を逆向きに導入することは、領域全体の発現レベルを低下させるのみならず、例えば転写複合体同士の衝突といった、系の制御から外れた現象を引き起こすことや、転写複合体が停止してしまうDNA構造をつくり出すことにつながりかねない。

すなわち、上のいずれの場合であっても「逆方向」においては複製や転写のための蛋白質あるいは蛋白質複合体がDNA鎖上に停滞している機会が多くなっているのではないかと想像される。このことが「順方向」と「逆方向」の間で見られる差を生み出しているとする、複製あるいは転写の複合体がDNA上にとどまっている領域においては、クロマチン構造が開裂している為にエンドヌクレアーゼなどの攻撃を受けやすく、これによって「逆方向」においては染色体喪失の発生頻度が上昇するのではないかとといったことが考えられる。また、やはり同様の理由により「逆方向」においては、染色体上の他の領域で形成された組換え中間体の分岐の移動がこの領域で妨げられる為に交叉、遺伝子変換といった染色体異常の発生頻度が低下するのではないかとすることも想像される。

以上のことはあくまで可能性に過ぎず、このような仮説を検証するためには、転写の効果が強調されるような実験系をデザインする必要がある。この為の工夫として、誘導的に発現できる強力なプロモーターをURA3遺伝子に連結し、その制御下でURA3遺伝子を強発現させてやれば、遺伝子マーカー導入の方向による違いが強調されて見えてくるかも知れないと考えている。また、純粹に転写方向及び複製方向と染色体異常の関係を解析していこうとするならば、そもそも遺伝子マーカーを挿入する標的部位を、例えばリボゾームDNA領域のような、常に転写レベルが高く、しかも構造的に複製の方向が一方向に限定されているような領域に選定し直すと良いのかも知れない。

V 他の染色体における解析

前二章における解析では染色体異常発生に影響を及ぼし得る染色体上の因子を探ることを目的としていたが、本章では少し視点を変えて、これまで第III染色体において見られた様々な現象が果たして他の染色体においても一般的に見られるのかどうか検証することを目的とし、第III染色体以外の場(第V染色体)において染色体異常の解析を行った。第III染色体以外の染色体として第V染色体を選択したのは、野生株における*URA3*遺伝子の本来の局在部位がこの第V染色体左腕に存在するという理由からである。それ故、遺伝子マーカーの外来性というものを全く考慮する必要がなく、解析で得られる現象を完全に内発的な、自然発生的なものとしてとらえることができる。

そもそも、遺伝子マーカーの人為的導入に起因する染色体異常の誘発ということに関してはあくまで可能性の域を超えないが、遺伝子マーカーが最も安定に存在するのはどの様な場合かと考えたときに、本来の局在部位にある状態が通常は最も安定なのではないかという推測がなされる。故に、この最も安定な状態で存在すると思われるマーカー遺伝子を指標とした染色体異常の発生頻度及びその内容の解析が今後の研究を進める上での一つの目安となるのではないかと考えた。

第一節 染色体異常頻度の測定及び分類

この様な構想から、前章の解析の際に用いた補助的な遺伝子マーカーを取り払い、再び*URA3*断片を単独の遺伝子マーカーとして用いる検出系に立ち戻った。解析を行う二倍体細胞は *URA3/ura3*である必要があるので、第V相同染色体上の一方の*URA3*遺伝子については機能欠損が起こっていないなければならない。この*URA3*遺伝子の破壊は、野生型遺伝子を*ura3*変異遺伝子(*ura3-91*)に置き換えることによって行った。染色体異常頻度の測定に関しては以前の場合と全く同様に行ったが、染色体異常の分類に際して今回は定量的PCRの利用を計画した。これは、第V染色体と第VIII染色体のサイズが近似しており(575 kbpと563 kbp)、PFGEによる両者の分離が困難であった為である。定量的PCRにおいては a)*URA3*領域に特異的に結合するプライマーと b)第V染色体右腕の一部に特異的に結合するプライマー、並びに内部標準として c)第X染色体(常に2本存在する)の一部に特異的に結合するプライマーを作製し、これらの内二組ずつを競合させてPCR反応を行い増幅断片の強度比を求め、その結果から*URA3*領域が何コピーあるか、第V染色体が何本あるかを判定した。すなわち、染色体喪失の場合には第V染色体が1本しか存在しないので(a/c, b/c, a/b)の値が野生型株を(1, 1, 1)としたときに(1/2, 1/2, 1)となり、同様に染色体欠失あるいは転座

の場合には第V染色体右腕は2本あるが $URA3$ 領域に関しては1コピーしか存在しないと考えられるので(a/c, b/c, a/b) = (1/2, 1, 1)、組換えあるいは点突然変異の場合には第V染色体が2本あり、 $URA3$ 領域に関しても2コピー存在するので(a/c, b/c, a/b) = (1, 1, 1)となるはずである(図V-1)。この目的に沿ったプライマーを設計し、組換え型の変異体、喪失型の変異体を鋳型DNA源として予備実験を行ったところ、適当なPCRの反応サイクル(26サイクル)において両者に理論通りの明確な相違が見られた(図V-2)。このことから上述の構想に基づく検出系が十分に実用可能であると判断したので、本章における染色体異常の分類に関してはこの定量的PCRの結果をもとに行った。さらに、組換えあるいは点突然変異に関してはこれまでと同様の方法により両者を区別した。また、染色体欠失あるいは転座に関しては、視覚的な染色体サイズの変化によって染色体異常を検出するという意味と、変化したサイズの大きさを調べるという意味から、第V染色体右腕の一部あるいは $URA3$ 領域に特異的に結合するプローブDNAを用いたサザンハイブリダイゼーションも併せて行った(図V-3)。

第二節 異なる染色体間における染色体異常頻度及び内容の比較

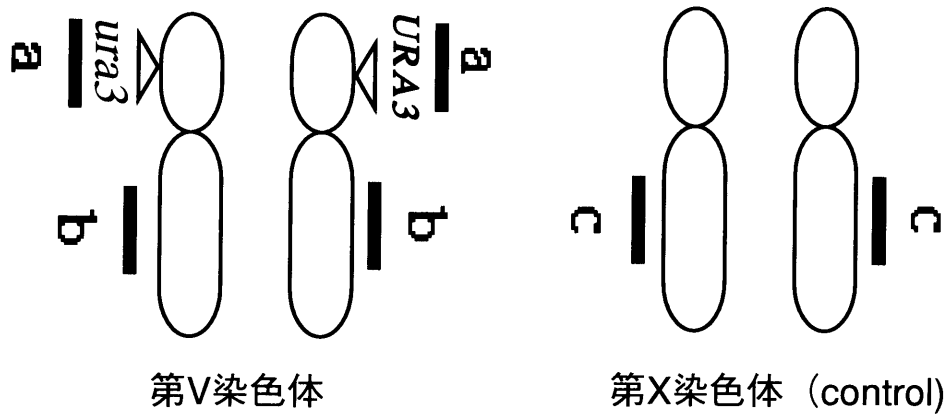
本章では合計10の実験区から染色体異常の発生頻度を求め、このうちの5実験区から標準コロニー型16個体、小コロニー型16個体を抽出し、計152の検体について定量的PCR及びサザンハイブリダイゼーションを行った。さらに組換えあるいは点突然変異であると思われたものに対してはコロニーPCR、制限酵素処理を行い両者を区別した。

解析の結果得られた第V染色体における染色体異常頻度は 3.7×10^{-5} であったが(表V-1)、この値は同様の単一マーカー系において測定した相同配列保有株における頻度(1.6×10^{-4})の1/4以下であった。また、染色体異常の内訳について見てみると、第V染色体において最も多かったのが組換え型変異であり、これが全染色体異常の95%を占めていた。その他に見られたのは染色体喪失であり、これが残りの5.0%を占めていた。これら2つの染色体異常の発生頻度を第III染色体における場合と比較すると、組換え型変異において約2.9倍の、染色体喪失において約30倍の低下が見られたことになる(表V-3)。これまで第III染色体において見られていた染色体欠失あるいは転座型の染色体異常に関しては、今回の場合定量的PCRによる解析でもサザンハイブリダイゼーションによる解析でも全く検出されなかった。点突然変異の検体もやはり検出はされなかったが、これに関しては第III染色体の場合と同様である。

第三節 考察

第III染色体で見られる現象が他の領域でも一般的に見られる現象なのかどうかを検証するために、 $URA3$ 遺伝子の本来の局在場所である第V染色体における解析を

A



表(1) 各変異体におけるバンドの強度比の理論値
(野生型株における値を1とした場合)

	a/c値	b/c値	a/b 値
染色体喪失	1/2	1/2	1
欠失・転座	1/2	1	1/2
組換え/点突然変異	1	1	1

図V-1 定量的PCRによる染色体異常の分類

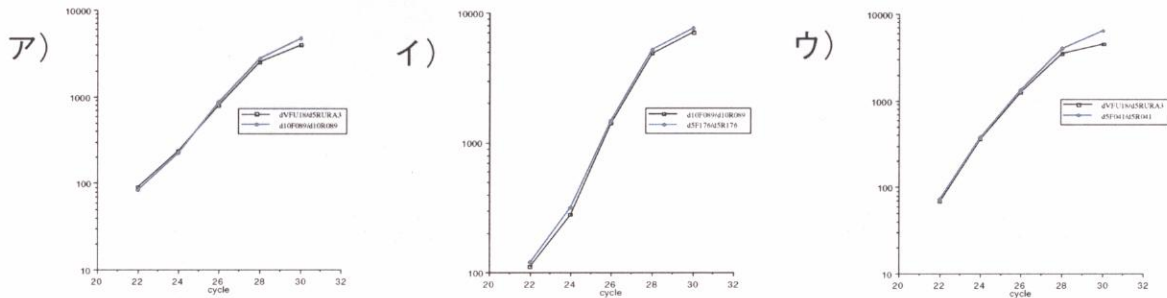
A 定量的PCRを用いた実験系の概念図

図Aに示すように a) 第V染色体左腕のURA3領域、b) 第V染色体右腕の一領域、c) 第X染色体右腕の一領域に特異的に結合するプライマーを設計し、この内の2組ずつを競合させてPCR反応を行った場合、各反応における反応産物の強度比 a/c、b/c、a/b値は、染色体喪失、欠失・転座、組換え型変異において表(1)のように異なる。これをもとに染色体異常の同定のための実験系を構築した。

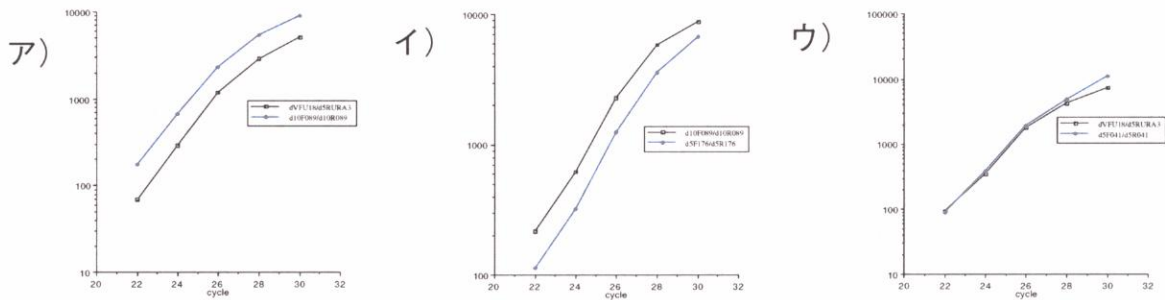
B

	プライマー名	増幅する領域
ア) a/c値	{ dVFU18 / d5RURA3 d10F089/d10R089 URA3領域 (第V染色体左腕に存在) 第X染色体右腕の一領域
イ) b/c値	{ d5F176 / d5R176 d10F089/d10R089 第V染色体右腕の一領域 第X染色体右腕の一領域
ウ) a/b値	{ dVFU18/d5RURA3 d5F041 / d5R041 URA3領域 第V染色体右腕の一領域

1 組換え型変異体を鋳型DNA源とした場合



2 染色体喪失型変異体を鋳型DNA源とした場合



表(2) 各変異体における強度比の実測値(野生型株の値を1とした場合)

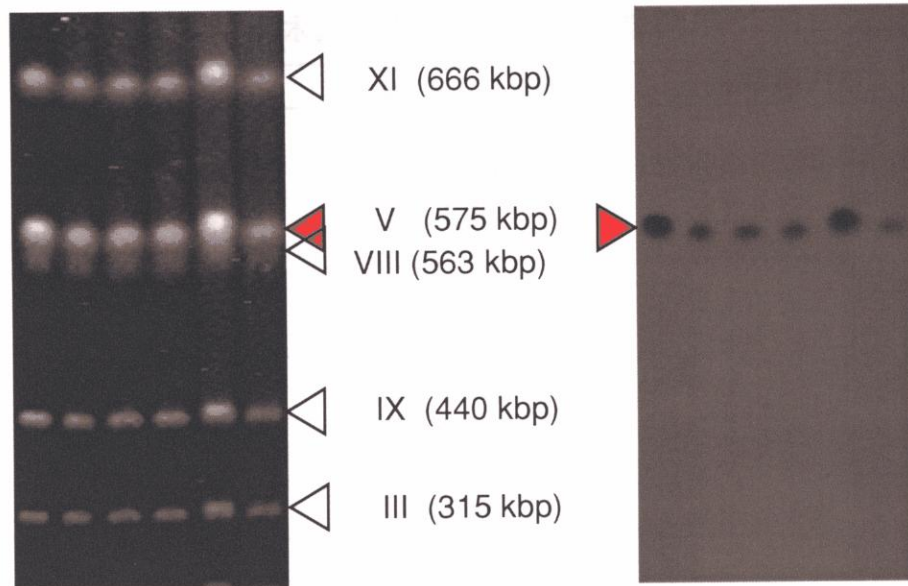
	a/c	b/c	a/b
強度比1	1.00 ± 0.14	1.02 ± 0.14	0.88 ± 0.14
強度比1/2	0.52 ± 0.08	0.55 ± 0.06	—

(±標準偏差)

図V-2 定量的PCRによる染色体異常の分類 (続き)

B プライマーの設計、反応サイクルの決定

ア) a/c値、イ) b/c値、ウ) a/b値を求めるために各々に対応したプライマーを実際に設計した(図B上)。これらのプライマーを競合させて22-32サイクルまでPCR反応を行い、反応が指数関数的に進む範囲を調べた(図B中)。図で、1が組換え型の変異体を鋳型DNA源として用いた場合であり、2が染色体喪失型の変異体を鋳型DNA源として用いた場合である。鋳型DNAとして用いる細胞数は 2×10^5 とした。この結果から、26サイクルまでの反応ならば第V染色体が2本の場合も1本しかない場合でも反応が指数関数的に進み、産物の量比が鋳型となるDNA量比を反映すると考えた。これをもとに、変異体152サンプルに対して反応26サイクル時点での産物量を定量し、a/c値、b/c値、a/b値をそれぞれ求めた(図B下)。このとき、a/c値、b/c値に関しては強度比1及び強度比1/2を示す集団を明確に区別することができた。また、a/c値に関しては強度比1/2を示す個体は見られなかった。



(パルスフィールドゲル電気泳動像)

(サザンブロット像)

図V-3 サザンハイブリダイゼーションによる解析

パルスフィールドゲル電気泳動により分離した染色体をメンブレンに転写し、これをサザンハイブリダイゼーションに供した。このときのプローブDNAとしては1) *URA3*領域に特異的に結合するものと、2) 第V染色体右腕の一領域に特異的に結合するものの2種類を用いた。

表V-1 第V染色体における染色体異常頻度の測定 (×10⁻⁵)

実験区	染色体異常頻度	小コロニー%
#1	3.76	2.7
#2	2.12	6.9
#3	4.46	3.7
#4	2.73	6.7
#5	3.04	8.7
#6	5.50	3.5
#7	4.16	3.9
#8	1.58	9.8
#9	4.81	2.7
#10	4.83	6.2
平均±標準偏差	3.70±1.29	5.5±2.5

・小コロニーの表記に関しては表III-1と同様である。

表V-2 第V染色体における染色体異常の分類

実験区	# 1		# 2		# 3	
	標準	小	標準	小	標準	小
コロニーの大きさ						
点突然変異	ND	ND	ND	ND	ND	ND
染色体欠失・転座	ND	ND	ND	ND	ND	ND
染色体喪失	ND	4	ND	13	ND	5
組換え	8	12	16	3	16	11
計	8	16	16	16	16	16

実験区	# 4		# 5		合計	
	標準	小	標準	小	標準	小
コロニーの大きさ						
点突然変異	ND	ND	ND	ND	ND	ND
染色体欠失・転座	ND	ND	ND	ND	ND	ND
染色体喪失	2	6	ND	3	2	31
組換え	14	10	16	13	70	49
計	16	16	16	16	72	80

- ・実験区の番号は表V-1で示したものと同一である。
- ・各実験区において標準コロニー型、小コロニー型の異常を別々に集計した。
- ・変異体が検出されなかった場合にはNDと表記した。

表V-3 第V染色体及び第III染色体における各染色体異常の発生頻度
($\times 10^{-5}$)

	点突然変異	欠失・転座	染色体喪失	組換え	合計
第V染色体 (%)	<0.05	<0.05	0.18 \pm 0.06 (4.9%)	3.5 \pm 1.2 (95.1%)	3.7 \pm 1.3
第III染色体 (%)	<0.20	0.49 \pm 0.09 (3.1%)	5.5 \pm 1.0 (34.1%)	10.1 \pm 1.9 (63.1%)	16.0 \pm 3.1
III/V 比		>10	30	2.9	4.3

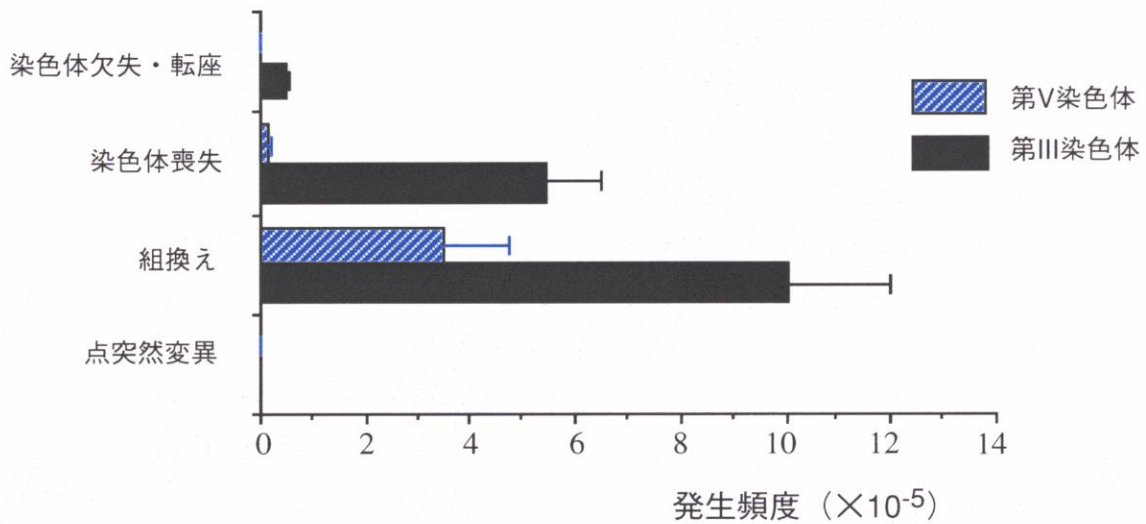
(\pm 標準偏差)

- ・ 第III染色体における値は相同配列保有株のものである。
- ・ 各染色体異常の発生頻度は以下のようにして求めた。

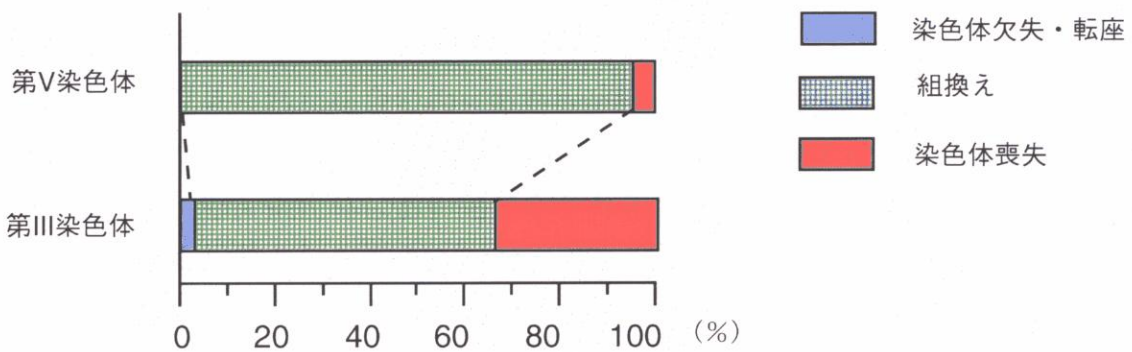
例) 染色体喪失の発生頻度

$$\left(\begin{array}{l} \text{各実験区の喪失} \\ \text{の発生頻度} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{l} \text{各実験区の全} \\ \text{体の異常頻度} \end{array} \right) \times \left\{ \begin{array}{l} \left(\begin{array}{l} \text{各実験区の標準コ} \\ \text{ロニー型の存在比} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \text{標準コロニー型に} \\ \text{おける喪失の割合} \end{array} \right) \\ + \left(\begin{array}{l} \text{各実験区の小コロ} \\ \text{ニー型の存在比} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \text{小コロニー型にお} \\ \text{ける喪失の割合} \end{array} \right) \end{array} \right\}$$

A



B



図V-4 第V染色体及び第III染色体における比較

A 各染色体異常頻度の比較

B 各染色体異常の存在比の比較

行ったところ、染色体異常頻度及びその内容に関して両染色体間に様々な相違が見られた。ここでの比較の対象としては、同じ単一の遺伝子マーカーを使って解析した相同配列保有株の結果を用いている。

まず染色体異常頻度に関してであるが、第V染色体における発生頻度の値は 3.7×10^5 であり、第III染色体における場合(1.6×10^4)の1/4以下に過ぎなかった。この原因を探るために各染色体異常を別個に比較していくことにする。

最初に点突然変異についてであるが、第V染色体における解析でも、これまでの第III染色体における解析と同様、点突然変異型の変異体は全く検出されなかった。このことから、染色体上のある特定の遺伝子に着目した場合、その遺伝子の機能が失われることに対しては、点突然変異のような塩基レベルで起こる突然変異の寄与よりも、組換え、染色体喪失といった染色体レベルで起こる変化の寄与の方が一般的に遥かに(100倍以上)大きいであろうということが示唆される。

次に組換え型変異について見てみると、第V染色体においては検出された全染色体異常の実に95%をこの組換え型変異が占めていたが、その発生頻度は 3.5×10^5 と、第III染色体における値のおよそ1/3であった。この染色体間の発生頻度の格差は他の染色体異常に比べて最も小さいものである。今回の検出系においては利用しているマーカーがURA3遺伝子単一なので交叉と遺伝子変換を区別することはできないが、第四章の「順方向」や「逆方向」細胞における解析結果を参考にすると組換えのかかなりの部分(97%以上)が交叉であると予想できる。相同染色体間における交叉の発生頻度は大まかに言って遺伝子マーカーとセントロメア間の距離に比例すると見なせるが、この距離は第III染色体においては約95 kbp、第V染色体においては約35 kbpであるから、物理的距離について単位長さ当たりの組換え型変異の発生頻度を求めると、前者で0.11、後者で0.10と両者において殆ど変わらない値となる。このことから、組換え型変異に関しては両染色体において発生の状況に大差はないものと思われる。

染色体喪失に関しては、第V染色体における発生頻度は 1.8×10^6 であった。この値は、第III染色体で見られた場合の約1/30でしかなく、両染色体間において非常に大きな差が見られたと言える。また、第V染色体の全染色体異常に占める割合もわずか5.0%に過ぎず、第V染色体においては染色体喪失が見かけ上非常に起こり難いタイプの異常であると考えられる(但し後述の染色体欠失、転座といった染色体異常よりは高頻度で発生している)。染色体喪失の発生メカニズムに関しては、二重鎖切断等により生じたDNA末端がエキソヌクレアーゼの侵食を受け、その傷がセントロメアやテロメア領域に達するというモデルや、体細胞分裂期における姉妹染色体の分離異常によるといったモデルなどが主に考えられる。前者の場合は染色体の修繕のされ易さ、後者の場合には細胞分裂期の微小管との相互作用に伴う染色体動態のメ

カニズムと関係するが、いずれにせよ染色体喪失の発生頻度は、その染色体が世代を通じてどの程度安定に保持されるかを示す一つの指標となり得るものである。その値において染色体間で約30倍もの差が見られたことは驚きであるが、この差の意味するところが第V染色体が特別に安定であるということなのか、あるいは第III染色体がことさら不安定であるという事なのかを今回の結果のみから判断することは難しい。これらの疑問を明らかにする為には、最低でももう一つ他の染色体にURA3遺伝子を導入して解析を行う必要がある。

ここで、可能性は低いが、第III染色体と第V染色体が同程度に安定であることも考えられなくはない。すなわち第V染色体においても第III染色体と同程度に染色体喪失が発生しているが、第V染色体が失われたときには生育に極端に負担がかかり、変異体が死に至るケースが多いために見かけ上喪失の発生頻度が低くなっているとする考え方である。この場合には、二倍体細胞において一方の染色体が失われることで生育が不利になるということと、第III染色体が失われた場合と第V染色体が失われた場合とでその効果(生育への影響、死に至る確率)が異なるということの2つを仮定しなければならない。これを指し示すような実験結果はこれまでのところほとんど得られていないが、唯一、小コロニー型の集団の存在がこの仮説を支持するのではないかと考えている。本研究では5FOA耐性として得られる変異体において、標準コロニー型と小コロニー型というコロニー形成能の異なる二つの集団がみられたが、両者の間では染色体異常の内容に相違があり、染色体喪失型の変異体に関してはコロニーが小型化する傾向にあることが見て取られた(表III-2, 表V-2参照)。同様の現象はBruschiら(1995)が行った研究においても観察されており、相同染色体の一方を失うことで実際に生育に何らかの抑制が働く可能性はあると言える。また、第V染色体における解析で小コロニー型の集団の存在割合及び絶対的な出現頻度が低かった(表III-1, 表V-1参照)ということも、本来小コロニー型の個体を形成する筈の喪失型変異体の多くが死に至った為であるとするならばこの仮説に迎合する。本研究においては小コロニー型の集団がどのようなメカニズムで発生するのかということに関しての解析は行っていないが、この問題を解明することが先の仮説を検証する上で重要な鍵となって来るであろう。

最後に染色体欠失及び転座についてであるが、第III染色体においてはある一定の頻度で見られていたこれらの染色体異常が第V染色体の場合には全く検出されなかった。第III染色体にマーカーを挿入した系では、これらの異常が他染色体との組換えや自身の内部での組換え、あるいは不等交叉(相同染色体の相同領域以外の部分との交叉)によって起こることが判っている。この異種領域間における組換えの際には、Suttonら(1992)の研究において見られた現象と同様に、ゲノムの各所に散在しているTy配列やtRNAをコードする遺伝子領域の相同性が利用されているのではないか

ということが現在推察されている。それでは第V染色体においてはこれらの配列がまばらであるために染色体欠失や転座型の染色体異常が見られないのであろうか？しかしながらTy配列やtRNA遺伝子の分布を実際に調べて見たところでは、第V染色体においてもこれらの配列が、マーカーの喪失を伴う様な欠失あるいは転座を引き起こし得る位置に存在していた(data not shown)。このことから、Ty配列やtRNA遺伝子の分布以外に、欠失や転座の起こり易さを規定している因子が存在するのではないかと考えられる。

これに関係すると思われる報告がWuら(1995)によってなされている。出芽酵母においては、*MAT*部位(mating-type locus)が*HML*領域あるいは*HMR*領域と部位特異的な組換えを起こすことによって接合型が変化することが知られている。例えば接合型がa型の細胞においては*MAT*部位(*MATa*)は*HMR*領域ではなく*HML*領域を組換えの相手として選ぶが(*MATa* donor preference)、この組換えの配向性を制御するシス因子が染色体上の別の領域に存在することが示唆されている。この様な染色体上の領域は染色体ドメイン(chromosomal domain)と呼ばれているが、染色体ドメインの存在は、染色体上のある領域と他の領域が組換えを起こす際の組換えの起こり易さがその領域間の相同性のみではなく他の因子によっても規定され、なおかつその因子が必ずしも近接して存在する必要がないことを意味している。出芽酵母の全ゲノム配列が決定されている現在においては、この様な因子の働きにより、ゲノム内のある特定の領域で相同性に依存しない組換えが高頻度になされているという事例が見つかってくるのではないかと期待している。

VI まとめ

第一節 相同配列保有株及び「順方向」における変化の意義について

本研究では染色体異常の発生に影響を及ぼし得る因子について探ることと、染色体異常の発生メカニズムに関して、染色体を問わずに一般的に見られる現象を見極めるという2つの目的を掲げた。1つ目の目的に対しては、遺伝子マーカーの相同配列の有無及び挿入方向を変化させることによって、相同染色体上の相同領域の存在効果や遺伝子発現の方向性というものが、染色体レベルで見られる変化に対してどのような影響を及ぼし得るかということを検証した。今回の結果では、これらの影響が染色体異常の全体的な発生頻度ではなく、発生した染色体異常の内容に対して現れた様に見受けられた。これらの因子が作用するメカニズムについては各章の考察において推測した通りであるが、ここでは2つの解析結果をあわせて、両者から総合的に解釈できることがないか考えてみることにする。2つの解析のいずれの場合においても全体の染色体異常頻度がほぼ変わらずにその内訳のみが変わったように見えたという事実は、染色体喪失や欠失といった染色体異常が、各々の発生する過程の多くの部分を共有していることを示唆していると思われる。この問題に関しては第二部の冒頭において再び論じることにするが、上の様に考えた場合、本研究で検証した相同染色体上の相同領域の影響や転写の方向性というものは、染色体異常の原因となる損傷の導入の程度ではなく、導入された損傷の修復効率、或いは修復の配向性に影響すると言える(第二部序論も参照のこと)。

また、上述の2つの解析において観察された変化はいずれも、各染色体異常の発生頻度としてコントロールの菌株と比較した場合にせいぜい1/2倍から2倍程度の相違を示すに止まったが、このような僅かな相違に果たして本当に意味があるのだろうかということが疑問となる。通常様々な変異株における突然変異頻度の比較において2倍程度の差はそれ程問題とはされない。しかしながら本研究において行った解析は全て野生株を用いており、細胞は様々な染色体上の問題に対処するための機能を完全に有している点に注意を要する。例えばDNA損傷の修復に関与する何らかの遺伝子に機能欠損が生じていれば、細胞内で生じる損傷に対処することができなくなるので、その影響は染色体異常頻度の大幅な上昇として現れるかも知れない。これに対して、染色体の構造に関して何らかの染色体異常を誘発し得る問題が生じていたとしても、この問題に十分に対処できるだけの機能が備わっていれば、その影響は結果的に殆ど表面化しないことも考えられる。すなわち、各種変異株における2倍程度の染色体異常頻度の上昇と、野生株における2倍程度の頻度の上昇では、その持つ意味合いが全く異なると言える。更に、様々な変異株においては特定の遺伝子

の機能欠損がDNA代謝の様式を変化させたり、或いは従来のDNA代謝のバランスを崩すことにつながるので、細胞進化などの観点から染色体異常形成後の細胞の辿る運命を考えることにあまり意味はない。一方、本研究で解析した野生型の菌株においては、染色体異常を示す検体も引き続き細胞分裂を繰り返している(コロニー形成能力を有している)ことから、約18世代の間に2倍程度の染色体異常の誘発があったとすれば、次の18世代の間にもやはり同程度の異常の亢進が予想される。進化などの長期的な視野にたった場合には、こうした僅かな差が積み重なって大きな影響を及ぼすことも考えられる。以上のような理由から、本研究の解析において観察された変化にはそれなりの意味があると私は考えている。

第二節 組換え型変異の一般性とLOH機序との関係

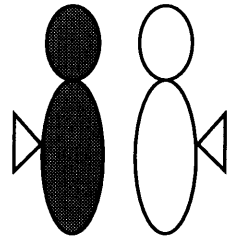
本研究の2つ目の目的である、染色体異常の発生メカニズムに関して染色体を問わずに一般的に見られる現象を見極めるということに対して、検出の指標となる *URA3* 遺伝子マーカーの本来の局在部位である第V染色体における解析を行い、第III染色体における解析結果との比較を行った。2つの染色体において見られる相違点については考察で触れた通りであるが、それ以外に共通点として、いずれの染色体においても組換え(交叉、遺伝子変換)型の異常が第一義的に起こっているという事実を指摘することが出来る。

序論でも少し触れたが、細胞が癌化する過程においては複数の遺伝子について多段階的にその機能が失われていくというメカニズムが考えられている。ここで、ある特定の遺伝子に着目した場合、それが癌抑制遺伝子のように不活化によって癌化をもたらすようなものであるならば、その機能が完全に失活するためには相同染色体上の対立遺伝子の双方に異変が起きなければならない。この2つの遺伝子が同時に失われることはまれで、通常はまず第一段階の変化によってその片方の機能が失われたヘテロ接合の状態になり、ここに第二段階目の変化が生じてもう片方の機能も失われるという経緯をたどる(発癌の二段階説; Knudson, 1971)。ここで、第二段階目の変化に着目した場合に見られる現象は特にヘテロ接合性の喪失(LOH; loss of heterozygosity; Cavenee et al., 1983)と呼ばれている。LOHは点突然変異、染色体喪失、染色体欠失、組換え型変異のいずれによっても引き起こされ得るが、遺伝性の癌(第一段階目の変化が既に生じており、これが遺伝的に受け継がれている)におけるLOHの発生期序を解析した研究例においては染色体欠失が他の異常に比べてより大きな割合でLOHを引き起こす可能性が示唆されている(Ichii et al., 1992; Miyoshi et al., 1992)。一方、本研究において5FOA耐性として観察される変異体は全て *URA3* 遺伝子に関して (+/-) → (-/-) という経緯を経ているが、ここで見られる現象は先の発癌の二段階説における第二段階目の変化、すなわちLOHの過程に他ならない。このことか

ら、出芽酵母二倍体細胞におけるLOHの発生メカニズムを本研究から推測することが可能となるが、今回解析した第Ⅲ、第Ⅴ染色体のいずれの場合においても組換え型の異常が第一義的に見られたという結果は、少なくとも出芽酵母においては、染色体欠失ではなく組換え型変異がLOHの主たる原因であるという事を示唆している。また、点突然変異、染色体欠失、転座といったものは第一段階目の変化としても第二段階目の変化としても起こり得るが、これに対し組換え型変異による遺伝子マーカーの喪失は、遺伝子がヘテロな状態にあることが前提であり、2つの遺伝子が共に正常である場合には起こり得ない。すなわち、組換え型変異の発生は第二段階目の変化に限られ、第一段階目の変化としては有り得ないことになる。このことから考えて、組換え型変異が他の染色体異常よりも絶対的に高頻度で発生しているという事実は、組換え型変異の関与しうる第二段階目の変化の方が、組換え型変異の関与し得ない第一段階目の変化に比べて起こりやすいということの意味するのではないだろうか。

少々蛇足となるが、本研究における5FOA耐性型変異体をLOH解析のモデルと見なして得られた結果をもう一度振り返ると、以下のような興味深い推論が導き出される。LOHを念頭に置きつつ解析を行った菌株の染色体構造を詳細に見比べると、相同配列欠損株の場合が第一段階目の変化としてURA3領域の欠失が生じたときのモデル、相同配列保有株の場合が第一段階目の変化として4塩基の挿入という比較的小さな変化が生じたときのモデルに各々相当していることに気づく(図VI-1)。両者において染色体異常の内容に若干の相違が見られたことは既述の通りであるが、このことから、LOHの発生(内容)が、第一段階目にどのような変化が起こったかに影響されること、言い換えれば染色体異常の発生に関して、それ以前に起こった染色体異常の種類が影響を及ぼすことが可能性として考えられる。

最後に、出芽酵母において組換え型変異がLOH発生の主流となっていることの生物学的意義について考察したい。まず、生物のゲノム構造という側面に着目した場合、ヒトなどの高等動物においては、サテライトDNAに代表される高度反復配列の存在割合が高いという特徴があるが、このような状況下で頻繁に相同組換えが生じたのでは遺伝情報を維持することが極めて困難になるものと思われる。すなわち、ヒトなどの高等生物は、進化の過程で現在のようなゲノムの構造を形成するのに伴い、組換えや染色体間の相互作用を抑制し、それに代替する修復のシステムが発達してきたのではないかと推測される。実際に、これらの生物種においては、二重鎖DNA切断などの損傷が生じた際に切断端を非相同的につなぎ合わせる修復様式(nonhomologous end joining; NHEJ)が機能することが明らかとなっている(Resnick, 1976; Schiestl and Petes, 1991)。また、個体を形成する細胞の数や複雑さという側面に着目した場合、ヒトなどの多細胞生物において細胞レベルでの多様性を増すこと

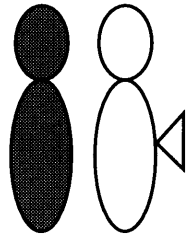


(*URA3/URA3* 野生型株)

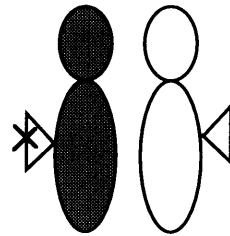
第一段階目の変化

*URA3*領域の欠失

4塩基の挿入

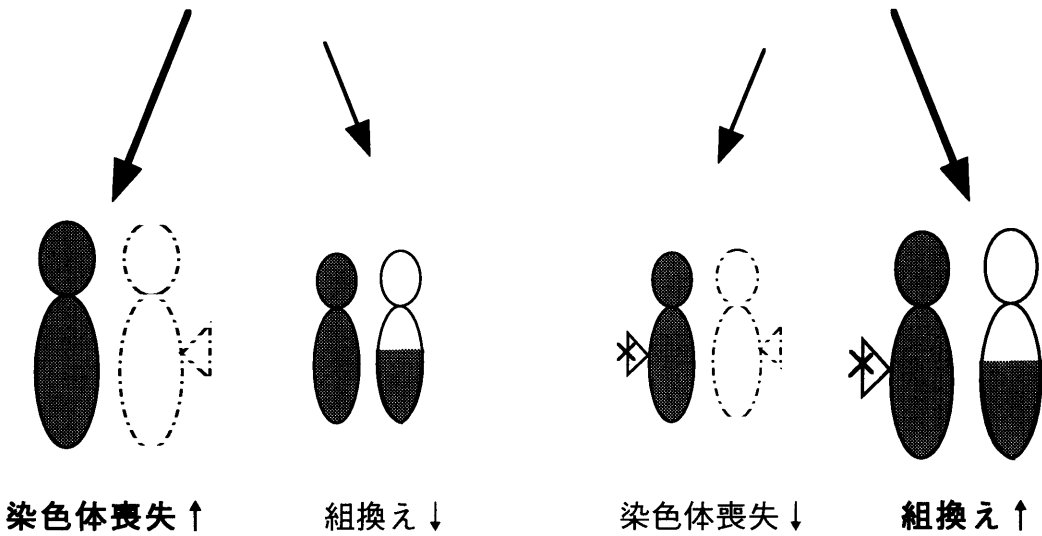


(相同配列欠損株)



(相同配列保有株)

第二段階目の変化



染色体喪失 ↑

組換え ↓

染色体喪失 ↓

組換え ↑

図VI-1 染色体構造とLOHの関係

解析を行った菌株の染色体構造をLOHとの関連で比較すると、相同配列欠損株及び相同配列保有株は、第一段階目の変化として各々 *URA3*領域の欠失が生じた場合と4塩基の挿入という比較的小さな変異が生じた場合に見立てられる。両者の解析において染色体異常の内容に相違が見られたことから、第一段階目に生じた変化の種類により第二段階目の変化に影響が及ぼされる可能性が示唆される。

は、組織あるいは個体全体としての統制を困難にすることにつながる。このことから類推すると、出芽酵母などの単細胞生物においては、多細胞生物の場合のように細胞間の統制をとる必要はなく、むしろ相同組換えの機構を選択することで、より広い領域における対立遺伝子の変化を積極的に引き起こしているとは考えられないだろうか。これによって多様性に富んだ集団を生みだし、急激な環境変動下でも生存可能な個体を残す潜在力を獲得し得るので、このことが種としての存続のために有利に働く可能性があるものと思われる。以上をまとめると、単細胞生物、多細胞生物において相同組換え、NHEJが各々発達しているのは、生物が自らの種の存続のために独自の戦略を採ったからに他ならないということが推測される。

第一部参考文献

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.

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.

Carle, G. F., and Olson, M. V. (1987). Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 155, 468-82.

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.

Deshpande, A. M., and Newlon, C. S. (1996). DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* 272, 1030-3.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-7.

平岡美奈 (1997). 二倍体出芽酵母における染色体の不安定性：遺伝子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.

Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi, Volume 5 (Great Britain.

Huxley, C., Green, E. D., and Dunham, I. (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* 6, 236.

Ichii, S., Horii, A., Nakatsuru, S., Furuyama, J., Utsunomiya, J., and Nakamura, Y. (1992). Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mol Genet* 1, 387-90.

Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-3.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A., and et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-56.

Liu, B., and Alberts, B. M. (1995). Head-on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase transcription complex. *Science* 267, 1131-7.

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

Miret, J. J., Parker, B. O., and Lahua, R. S. (1996). Recognition of DNA insertion/deletion mismatches by an activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 24, 721-9.

Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., and Nakamura, Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1, 229-33.

Modrich, P., and Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65, 101-33.

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 [published erratum appears in *Genetics* 1992 Jan;130(1):235]. *Genetics* 129, 343-57.

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.

Resnick, M. A. (1976). The repair of double-strand breaks in DNA; a model involving recombination. *J Theor Biol* 59, 97-106.

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).

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).

Schiestl, R. H., and Petes, T. D. (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7585-9.

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.

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.

Wu, T. C., and Lichten, M. (1994). Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* 263, 515-8.

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.

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.

Yao, M., and Kow, Y. W. (1996). Cleavage of insertion/deletion mismatches, flap and pseudo-Y DNA structures by deoxyinosine 3'-endonuclease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 30672-6.

Zenvirth, D., Arbel, T., Sherman, A., Goldway, M., Klein, S., and Simchen, G. (1992). Multiple sites for double-strand breaks in whole meiotic chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 11, 3441-7.

第二部

出芽酵母*orc*変異株における染色体不安定性と チェックポイント制御機構の関与

yes

VII 序論

第一節 研究の動機—問題提起

これまでに見たように、第一部では出芽酵母二倍体細胞の染色体異常の発生に影響を及ぼす種々の染色体上の要因を検討した。この結果、異常検出の指標となる *URA3* マーカー遺伝子挿入の方向性の違いや、マーカー遺伝子挿入によって生じる相同染色体間での相同配列の位置関係の歪みなどが僅かではあるが有意に染色体異常の発生に影響を及ぼすことが示された。また複数の染色体を標的とした解析から、染色体異常の中には各々の染色体に共通して起こる一般的なものと染色体毎に発生頻度が大きく異なるものの二種類が存在しており、特定の異常形成に影響を及ぼす因子が染色体上に存在する可能性が示唆された。更に第一部の解析の重要な結論として、出芽酵母において生じるヘテロ接合性喪失の主要な形態が相同染色体間の交叉に起因する事実が明らかとなった。交叉によりマーカー遺伝子が失われる際にはそれに先立って染色体が複製されている必要がある為、上記の結果は体細胞分裂中の出芽酵母におけるヘテロ接合性喪失の多くの部分がS期通過後或いはS期通過に伴って起こることを意味している。

近年当研究室の *URA3* マーカーを指標とした他の研究においても様々な興味深い知見が得られている。まず平岡らによる染色体異常部位の塩基配列レベルの解析から、欠失や転座などの染色体異常に関しては、*MAT* 遺伝子座と *HMR* 遺伝子座間の共通配列やゲノム中に散在する *Ty* 因子間の相同配列を介して染色体同士がつながり換わっていることが明らかとなった(平岡, 2000年博士論文)。また出芽酵母の相同組換えに決定的な役割を担う *RAD52* 遺伝子の機能が欠損した変異株においては、欠失、転座を含むあらゆる染色体異常の発生頻度が低下し、染色体喪失の発生頻度のみが特異的に上昇するという結果が得られている(吉田ら, 未発表)。上の二つの結果はいずれも相同組換え機構の関与が交叉や遺伝子変換のみならず欠失や転座といった染色体再編型の異常に対しても重要であることを示している。欠失や転座は染色体のサイズ変化をもたらすが、実際の解析の多くの場合においてサイズ変化が確認されたのは一对の相同染色体の一方のみであったことから、これら染色体再編の多くが引き起こされるのもS期後或いはS期通過の最中であり、この場合にも先と同様にS期における染色体複製のイベントや倍加した染色体同士の相互作用(クロストーク)が重要であると考えられる。

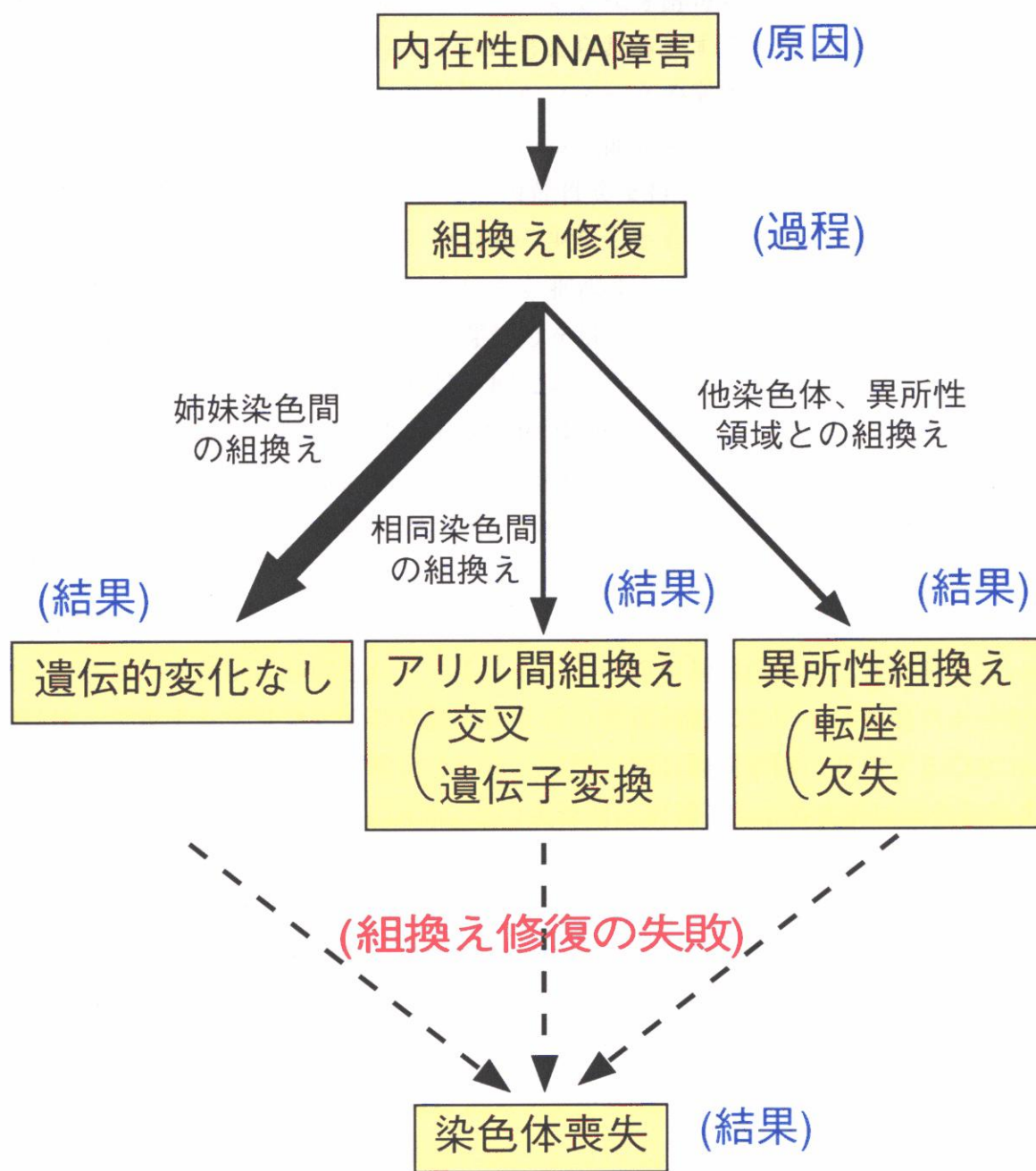
以上を総合すると欠失、転座、交叉、染色体喪失喪失といった様々な染色体異常(の少なくとも一部)は同一のDNA損傷を出発点とし、相同組換え機構による修復反応というプロセスを部分的に共有し得るというモデルを想定することが出来る。体

細胞増殖中の細胞内で内在的に生じる染色体上の損傷は通常相同組換え機構を利用した姉妹染色体間の組換えによって正確に修復されているが、組換えを行う対象として相同染色体の相同領域が選択された場合には交叉が、異所的な相同配列が選択された場合には欠失や転座などの染色体再編が、更にこれらの修復に失敗した場合に染色体喪失が引き起こされるという因果関係がこのモデルでは考えられる(図VII-1)。ここで一つ注意しなければならないのは、相同組換えの反応自体はあくまで染色体上の損傷を修復するプロセスであって染色体上の損傷それ自身ではないという点である。すなわち、相同組換え機構が利用され、その結果として様々な染色体異常が引き起こされる為には、まず最初に組換えによる修復を必要とする何らかの異常が組換えとは独立に生じていなければならないことになる。このような染色体異常の大もとの原因となる損傷をここでは内在性DNA障害と呼ぶことにするが、当研究室では内在性DNA障害の実態が何であるかという点に関してあまり焦点を当てて来なかった。他のグループが行った出芽酵母の組換えの研究の数々においても、放射線照射やメチルメタンスルホン酸(MMS)などの薬剤処理、或いはHOエンドヌクレアーゼや制限酵素を発現させることで細胞内にDNA損傷を誘発させ、組換え反応が生じ易い状況を人工的に作り出している場合が多く、内在性DNA障害の問題を重要視している様には見受けられなかった。これらの研究では障害を外部から導入するという手法の性質上、DSBs(Double Strand Break, 二重鎖DNA切断)が組換え反応の最初の出発点として想定されているが、放射線や薬剤の影響下に無い通常の細胞内で生じる内在性DNA障害がDSBsと一致するのかどうかは明らかではない。また仮にそうであったとしても、細胞内のどの様な生理作用と連動してDSBsが生じるのかという問題は未解明のまま残ることになる。

以上のような観点から本研究では染色体異常の最初の引き金となる内在性DNA障害の実態は何なのか、或いは内在性DNA障害がどの様にして生じるのか、といった問題を解明することを出発点とした。

第二節 組換え機構と染色体複製の関係

それでは実際にこうした問題に迫る為にはどうすれば良いのだろうか？そのヒントは大腸菌における研究に見出された。大腸菌では4.2 Mbpのゲノムの複製を通常一對の複製フォークが担っているが、ゲノム複製中に様々な理由からフォークの進行が阻害され、時には結果としてフォークが崩壊する事態が引き起こされることもある。このような場合に複製フォークの再進行やフォークの再構築を助けるメカニズムの一部として組換えによる修復機構が利用されていることが明らかにされている(reviewed by Kogoma, 1997)。極端な場合には、組換えはDNA複製のバックアップの為にこそ存在するのだという説すら提唱されている(for review, see



図VII-1 内在性染色体異常の発生機序のモデル

転座や欠失、交叉や遺伝子変換、染色体喪失(の少なくとも一部)などの染色体異常は、細胞内に生じた大もとの原因(内在性DNA障害)を修復する為に組み換え機構が働いた結果であると捉えることができる。しかし、組み換え反応はあくまで過程の段階に位置するのであって内在性DNA障害それ自身では無いという点に注意を要する。

Kuzminov, 1999)。その是非は定かではないが、出芽酵母においても組換え機構がこうした役割を担っている可能性は十分に考えられる。すなわち、DNA複製の際に生じた何らかの異常が複製フォークの停止やフォークの崩壊をまねき、その修復のために組換え反応が必要とされる可能性である。前述の通り様々な染色体異常の発生がS期通過を条件としていることもこの可能性を支持しているように思われるが、これらを考え併せると、染色体異常の発生の少なくとも一部に関しては、その原因をDNA複製のなかに見出せるのではないかと推測することができる。

DNA複製ということに関して、出芽酵母をはじめとする真核生物においては一回の細胞分裂につきDNA複製が正確に一回だけ行われる為に厳密な制御がなされることが知られている(reviewed by Diffley, 1996; Stillman, 1996)。その制御様式は多岐にわたっており、複製の開始時期を決定する制御機構を始めとして、一度活性化された複製開始点(origin)が同一の細胞周期内で再活性化されること無く不活性の状態を保つ機構など様々である。また大腸菌とは異なり、真核生物は各染色体上に複数のoriginをもつが、どのoriginがS期のどの段階で、或いはどのタイミングで活性化するかといった事も厳密に制御されている。仮にこの複製制御機構が正常に働かない場合には、マルチレプリコンでの複製様式を持つ真核細胞においては複製フォークの進行に異常をきたす可能性が考えられる。実際、細胞周期制御に関与するCDC (cell division cycle) 遺伝子群の内、CDC6などの複製開始制御遺伝子の変異は染色体喪失などの異常を引き起こすことが知られている(Bruschi et al., 1995)。この様に真核生物においては、実際に複製を行うDNAポリメラーゼなどの複製装置に加えて、DNA複製の開始時期の決定や全体的な統合を担う制御因子の存在も正確なDNA合成を行う為に不可欠であると言える。

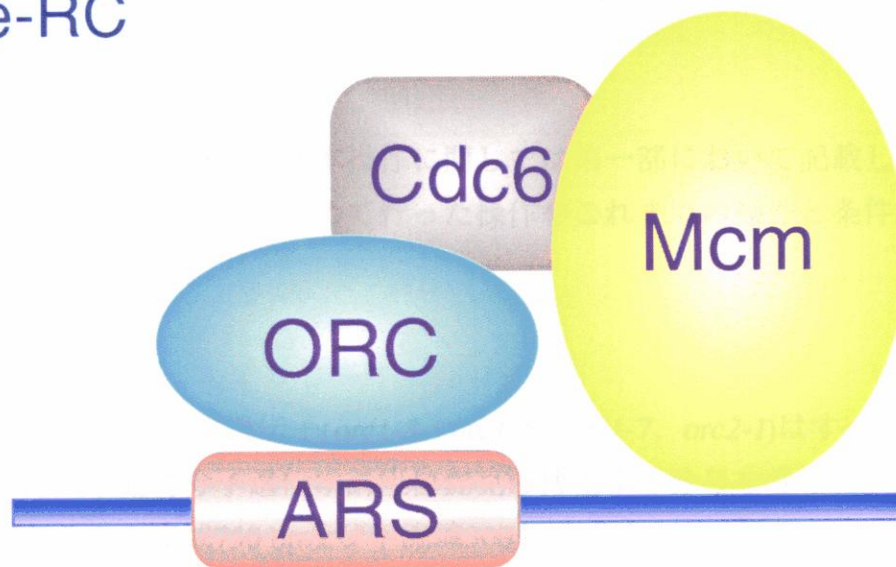
第三節 染色体複製におけるORCとチェックポイント機構の役割

出芽酵母においてDNA複製の制御に関与する因子は様々存在するが、本研究ではその中でも特に複製開始制御機構の重要な構成因子であるORC(origin recognition complex; Bell and Stillman, 1992)に着目した。ORCはOrc1pからOrc6pまでの6つのサブユニットから構成される蛋白質複合体であり、各サブユニットをコードする遺伝子は何れも生育に必須である(Bell et al., 1993 and 1995; Li and Herskowitz, 1993; Micklem et al., 1993; Loo et al., 1995)。ORCサブユニットの六量体構造はヒトなどの高等真核生物に至るまで保存されており(Gavin et al., 1995; Gossen et al., 1995)、進化を通じてORCが複製開始に決定的な役割を果たすことが示唆されている(reviewed by Dutta and Bell, 1997)。出芽酵母ORCはorigin内のARS (autonomous replicating sequence) 領域に結合しているが、ここを足場としてM期後期からG1期にかけてCdc6p、MCM複合体が結合してpre-RC (pre-replicative complex)が形成される。またS期に入り一度

originが活性化した後にpre-RCはpost-RCと呼ばれる構造に変化するが、ORC自身は細胞周期を通じて常にARS領域に結合した状態を維持することが報告されている(図VII-2; Diffley et al., 1994; Aparicio et al., 1997; Tanaka et al., 1997)。この様にORCは複製開始制御の土台を担う重要な構成因子であり、更に生育に必須であることからORCの機能に欠損が生じた場合にはDNA複製に重大な影響が及ぼされることが考えられる。そこで本研究ではORCのサブユニットをコードするORC遺伝子の温度感受性変異体を用いて解析を行い、非許容温度下においてORCの機能欠損がDNA複製の異常を引き起こし、ひいては様々な染色体異常の形成につながり得るかどうかを検証することにした。

既に述べた通り細胞周期制御は一回の細胞分裂につき一回のDNA複製が行われるよう厳密に制御されているが、こうした仕組みの他にもDNA複製の際に何らかの異常が生じた場合に、その異常を感知して細胞周期の進行を停止させるチェックポイントと呼ばれる機構が存在することが知られている(reviewed by Boddy and Russell, 1999)。仮にORC遺伝子の機能欠損が複製フォークの停止やそれに起因するDSBsを誘発するならば、これらの異常はチェックポイント機構に感知され、その結果として細胞周期の停止が起こることが予想される。内在性DNA障害の問題に取り組むには細胞周期制御に加え、チェックポイント機構の影響も無視することはできない為、本研究を進めるに当たってはこれらの問題を考慮に入れ、細胞の増殖及び細胞周期進行の状況と染色体異常の発生メカニズムを統合的に解析することを試みた。

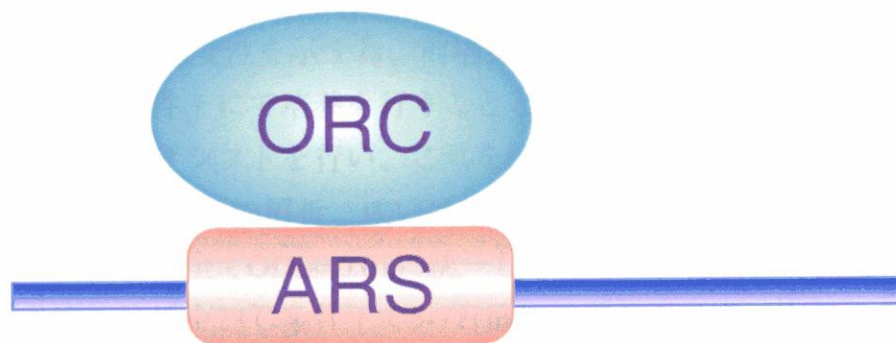
pre-RC



[M期後期～G1期]



post-RC



[S～G2/M期]

図VII-2 出芽酵母における複製開始制御因子の会合

M期後期からG1期にかけてARS (autonomous replicating sequence)に結合しているORCを足場としてCdc6p、MCM複合体などの複製開始制御因子が会合し、pre-RC (pre-replicative complex)が形成される。またS期に入りoriginが活性化した後にはこれらの因子が開離してpost-RCが形成される。ここでORC自身は細胞周期を通じて常にARS領域に結合した状態になっている。

VIII 材料と方法

出芽酵母の取り扱いなどの基本操作に関しては第一部において記載してあるので省略する。ここでは第二部で初めて行った操作やこれまでの操作と条件が変更された部分のみを記載する。

1 *orc*変異遺伝子

本研究で用いた*orc*変異遺伝子(*orc1-3*、*orc1-4*、*orc1-7*、*orc2-1*)はすべて奈良先端科学技術大学院大学動物分子遺伝学講座白髭克彦博士より分与を受けた。*orc1*変異遺伝子はORFとその上流域750 bp及び下流域300 bpを含む断片がYCplac22の*Xba I*-*Sac I*サイトにクローニングされたものを頂いた。*orc2-1*遺伝子はORF内のHind III-*Xba I* サイトがYIp211にクローニングされたものを頂いた。

2 菌株と取り扱い

上記の*orc*変異遺伝子をこれまでと同様の操作により出芽酵母一倍体細胞に導入して*orc*変異株を作製した。*RAD9*遺伝子の破壊の際には、ゲノムプロジェクトにおいて作製された*rad9*Δ株の標的領域をPCR法で増幅し、これを利用して目的の菌株の形質転換を行った。第二部の解析で新たに作製した菌株について表VIII-1に記載する。また*orc*変異株は温度感受性を示す為、前培養などの操作で細胞を培養する必要が生じた場合には23℃条件下にて培養を行うこととした。本培養に際しては前培養液を植え継ぐと同時に温度シフトを行い、これを0時点と定めた。細胞の生存率の測定やFACSによる細胞周期進行の解析、或いは染色体頻度の測定に際しては、本培養開始時点における菌濃度を全てOD₆₀₀=0.01に統一して行った。生菌数の測定に関しては菌液を塗布した寒天培地を23℃条件下で5-7日静置培養した段階で出現するコロニー数を計測した。

3 細胞周期進行の解析

FACSによる細胞周期進行の解析はPauovichらによる方法(Pauovich et al., 1995)に従った。

4 パルスフィールドゲル電気泳動

プラグの作製や通常の染色体異常解析の際の泳動条件に関しては前述の通りであるが、博士論文研究においては新たにrDNA領域の解析も行っているため、この時に用いた泳動条件を表VIII-2に記載する。

表VIII-1 菌株一覧表

a) 出芽酵母一倍体細胞

菌株	遺伝子型	入手方法
YKU34	<i>a lys2 Δ 202 trp1 Δ 63 ura3-52 ade2::hisG III 314::ADE2 III 205::URA3</i>	既出
YKU23	<i>α lys2 Δ 202 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 ura3-52 ade2::hisG</i>	既出
YMJ23	<i>orc1-3</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究において作製
YMJ24	<i>orc1-3</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究において作製
YMJ25	<i>orc1-4</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究において作製
YMJ26	<i>orc1-4</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究において作製
YMJ27	<i>orc1-7</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究において作製
YMJ28	<i>orc1-7</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究において作製
YMJ29	<i>orc2-1</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究において作製
YMJ30	<i>orc2-1</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究において作製
YMJ33	<i>rad9 Δ</i> であること以外はYMJ 23と同じ	本研究において作製
YMJ34	<i>rad9 Δ</i> であること以外はYMJ 24と同じ	本研究において作製
YMJ35	<i>rad9 Δ</i> であること以外はYMJ 25と同じ	本研究において作製
YMJ36	<i>rad9 Δ</i> であること以外はYMJ 26と同じ	本研究において作製
YMJ39	<i>rad9 Δ</i> であること以外はYMJ 29と同じ	本研究において作製
YMJ40	<i>rad9 Δ</i> であること以外はYMJ 30と同じ	本研究において作製

b) 出芽酵母二倍体細胞

菌株	接合に用いた一倍体細胞	本文中の名称
RD301	YKU34 × YKU23	野生株
RD601	YMJ23 × YMJ24	<i>orc1-3/orc1-3</i> 細胞
RD602	YMJ25 × YMJ26	<i>orc1-4/orc1-4</i> 細胞
RD603	YMJ27 × YMJ28	<i>orc1-7/orc1-7</i> 細胞
RD604	YMJ29 × YMJ30	<i>orc2-1/orc2-1</i> 細胞
RD605	YMJ33 × YMJ34	<i>orc1-3rad9 Δ</i> 株
RD606	YMJ35 × YMJ36	<i>orc1-4rad9 Δ</i> 株
RD607	YMJ39 × YMJ40	<i>orc2-1rad9 Δ</i> 株

表VIII-2 rDNA領域解析の為のPFGE泳動条件

	(Blk1)	(Blk2)
gradient	2.0 V/cm	6.0 V/cm
included angle	106°	120°
pulse time	20 m 00 s - 35 m 04 s	1 m 18.98 s - 2 m 25.98 s
ramping factor	linear	linear
run time	72 hr 00min	11 hr 08 min

5 プライマー-DNA

第2部の解析において新たに作製したプライマーのリストを表VIII-3に示す。

表VIII-3 プライマー一覧表

プライマー名	配列	使用目的
1) d13FORC1	GTAAACTGTGGAGCTCATAA CCTAAGTCCCTTAGAGTTCCG	ORC1 ORFの増幅
2) d13RORC1	GGCGATCCTCTAGAGATATAT ATAAGCACCTAGGTGGCCAGC	ORC1 ORFの増幅
3) dFORC1047	TAATGTTGTGCGAACTCTGGGC	orc1-4 変異の確認
4) dFORC1764	TGACGCTTCTGTACAACCTCC	orc1-3 変異の確認
5) dRORC2639	TTGCCTAGCTGACGTTCTGG	orc1-7 変異の確認
6) dF557ORC2	TTCTCCAGTGGCCTCATCTAGG	orc2-1変異の確認
7) dR3858ORC2	CAAGGACACAGGAAGGTAGTGC	orc2-1変異の確認
8) dF1RAD9	TAGCTTGGTGGTTCGAAGACC	rad9Δ領域の増幅
9) dR2RAD9	AGACCTTACCAACGTTGTTGG	rad9Δ領域の増幅
10) dF2RAD9	GACATCGATTCCAGTTCAGC	RAD9遺伝子破の確認
11) dR4RAD9	CCTAGAAGGTATTAACCTCAGCGG	RAD9遺伝子破の確認
12) dKANB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	RAD9遺伝子破の確認
13) dKANC	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	RAD9遺伝子破の確認

IX 結果

第一章 *orc*変異株の作製

本研究の解析に用いた*orc1*変異株は全て奈良先端大動物分子遺伝学講座白髭克彦博士らにより単離されたものである(Hori et al., 1996)。同研究室では出芽酵母Orc1pの細胞周期進行に及ぼす影響を解析することを目的として部位非特異的或いは部位特異的変異導入法により様々な*orc1*変異株を単離したが、W303株のバックグラウンドにおいてこれら*orc1*変異株は温度感受性を示し、非許容温度下で細胞が死滅するという結果が得られていた。これらの変異株ではOrc1pの機能欠損が細胞周期進行に影響することも観察されており、細胞が死滅する際に細胞周期制御機構(或いはその異常)が関与する可能性が示唆されていたが、実際に細胞が死に至る過程においてどのような事象が起こるのかについては不明な点も多く残されていた。この問題に対して我々は細胞の死滅の過程で染色体異常が引き起される可能性を考え、当研究室で構築した染色体異常検出系を用いて解析することを計画した。こうした経緯から、白髭氏より*oc1-3*、*orc1-4*、*orc1-7*という3種類の*orc1*変異遺伝子の供与を受け、これらを当研究室で用いているFY株のバックグラウンドに導入した。動物分子遺伝学講座でのこれまでの解析は基本的に一倍体細胞を用いて行われているが、当研究室の染色体異常検出系が二倍体での解析を想定したものである為、本研究では一連の*orc*変異株の解析を二倍体を用いて行った。

第二章 *orc1-4*変異株の細胞増殖異常と非許容温度下で誘発される染色体異常

第一節 非許容温度下での細胞周期停止と生菌数の減少

出芽酵母においてはDNA代謝に関与する遺伝子に変異が生じると、細胞が大きな芽を出した状態(large budded cell)で増殖を中止する場合があることがこれまでに知られている。これは染色体の複製が完了しないまま、或いはDNA上に生じた損傷が未修復のまま細胞分裂が行われるのを防ぐ為に様々なチェックポイント制御機構が機能しており、変異株において生じる異常がこれらのチェックポイント機構を活性化させ、分裂の前段階で細胞周期の停止を引き起こす為であると考えられている。今回我々が解析に用いた*orc1-4*という温度感受性変異体においても非許容温度下(37°C)

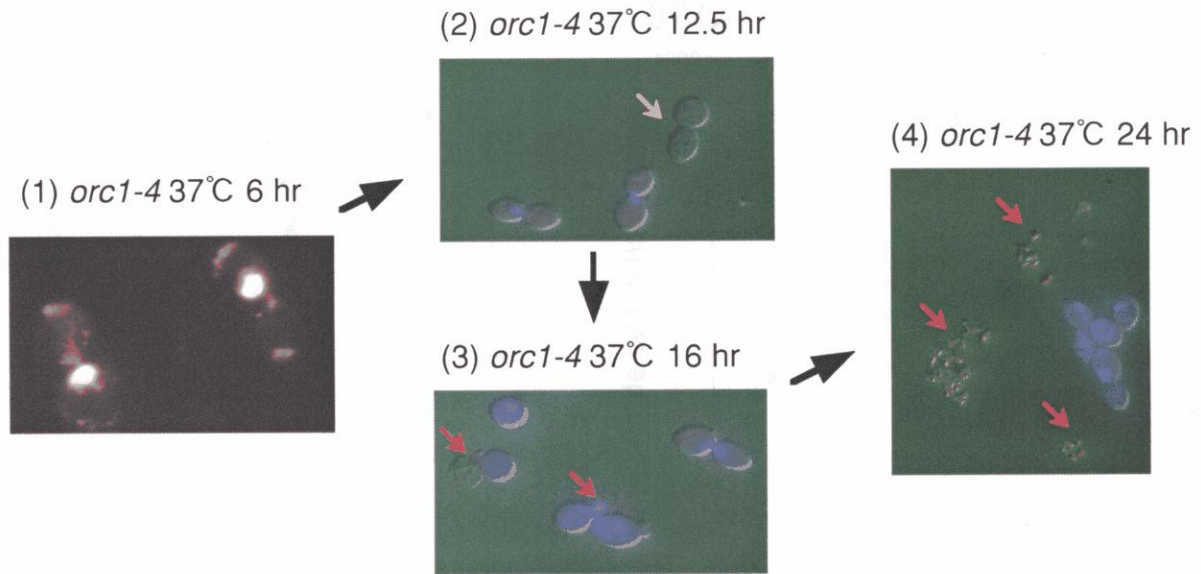
でこの様な形態上の異常が認められた。*orc1-4*と野生型のヘテロ二倍体細胞 (*ORC1/orc1-4*)は野生株と全く同じ挙動を示すが、*orc1-4*をホモに持つ二倍体細胞 (*orc1-4/orc1-4*; 以下単に*orc1-4*細胞又は*orc1-4*変異株と記す)では37℃培養後およそ6時間の段階で上記の大きな芽を出した状態の細胞が多数観察された。またDAPIによる核染色の結果、これらの細胞では核が出芽胞の肩付近に局在することが確認された(図IX-2-1)。しかし更に培養を継続した場合には、培養後およそ12時間を過ぎた頃から無核化した細胞群が出現し、その後は次第に細胞の残骸のようなものが見られるようになった(図IX-2-1)。

この*orc1-4*変異株の細胞周期進行の状況をFACS法により解析したところ図IX-2-2に示す結果が得られた。許容温度下(23℃)で非同調培養した*orc1-4*細胞を37℃に移すとFACSのピークは徐々に4C付近にシフトしていき、およそ8時間後にピークが完全に単一のものとなった。先に述べた細胞の形状及びこのFACSパターンの推移から、*orc1-4*変異株においてはORCの機能欠損がチェックポイント機能を活性化し、細胞周期をG2/M期で停止させる、いわゆるG2/M arrestが引き起こされたものと考えられる。しかしその後も更に細胞周期の状況を観察し続けたところ、およそ10時間目以降から4C付近にあったピークが次第に幅広になり、それに伴って2C或いはそれよりも少ないDNA含量のところに新たなピークが見られる様になった。この10時間目以降に見られるFACSパターンの変化は、何らかの理由でG2/M arrestの状態が維持できなくなり、arrestの崩壊或いは逸脱といった現象が引き起こされたことを示していると思われる。これらの新たなピークを示す細胞群は、先の顕微鏡観察において見受けられた無核化の細胞や細胞の残骸様の物質に対応していることが推測される。

次にこれら細胞周期進行の異常を細胞の生存と関連させる目的で*orc1-4*変異株の生菌数の推移を調べた(図IX-2-3)。許容温度下では*orc1-4*細胞の生育は野生株と相違がないのに対し、37℃ではおよそ8~10時間目までは緩やかに生菌数が増加するものの、それ以後は下降の一途を辿るという傾向が見られた。この生菌数の増減のタイミングは先のG2/M期での細胞周期停止とその崩壊のタイミングとほぼ一致しており、このことから、arrestの崩壊後、細胞の大部分が死に至ることが示された。

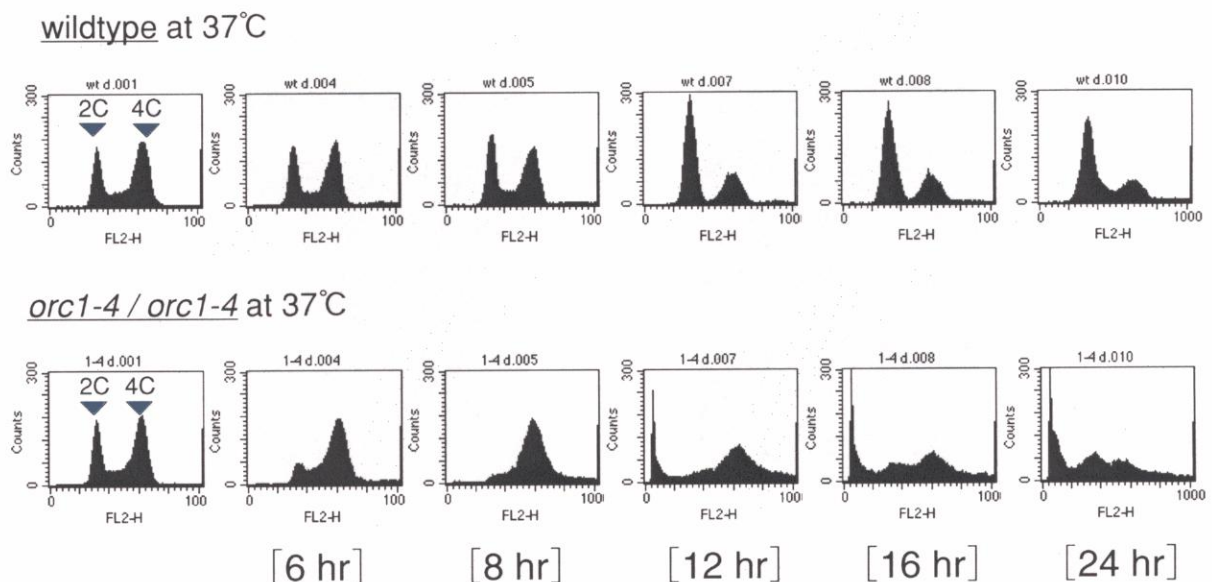
第二節 非許容温度処理後の生残菌に見られる染色体不安定性

図IX-2-3のように37℃で培養した*orc1-4*細胞は温度シフト24時間後には約80~90%までが死滅していたが、生き残った約10~20%の細胞においても染色体上にORC機能欠損の何らかの痕跡が見られないかを次に検証した。37℃で24時間処理した培養液をYPD寒天培地に塗布し、許容温度下に戻して形成された生残菌のコロニーから60個を選抜して純化し、それらの染色体の状態をパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)により解析した(図IX-2-4)。解析に供しているのが二倍体細胞である為、



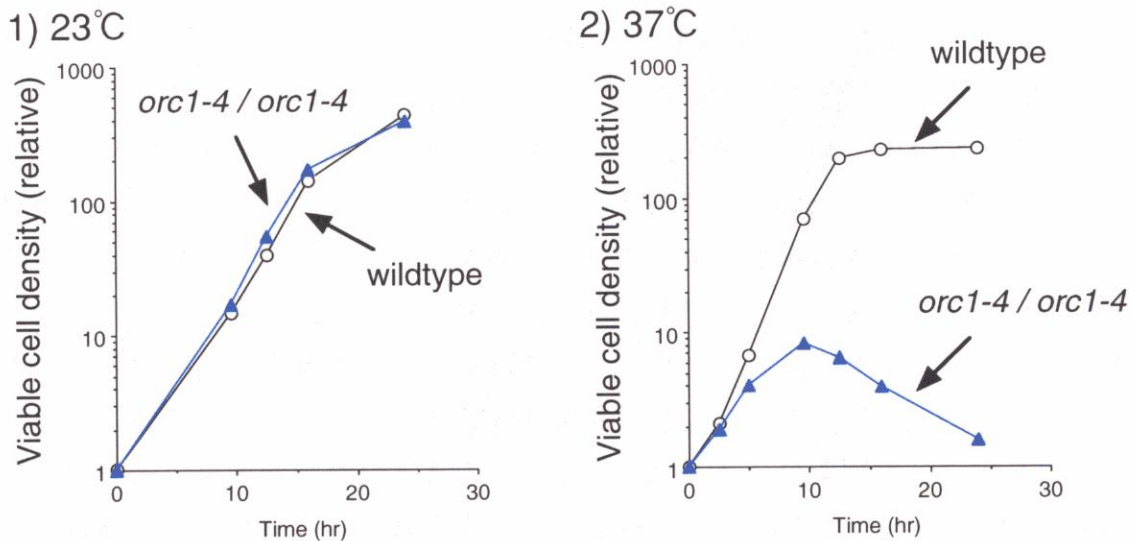
図IX-2-1 *orc1-4*変異株の非許容温度下における細胞形態の観察

*orc1-4*変異株を非許容温度下(37°C)で培養し、DAPI染色により細胞の形態及び核の形状を観察した。(1) 培養後6時間付近では大きな芽を出した形態(dumbbell shape)で核が出芽細胞との境界部分(bud neck)に存在するものが多数観察された。(2) また、その後の観察では培養時間の経過と共に無核化した細胞が現れ始め(↘)、(3), (4) 更に時間が経過した場合には形態や核の分布に明らかな異常を持つ細胞や、細胞の残骸のようなものが出現していた(↘)。



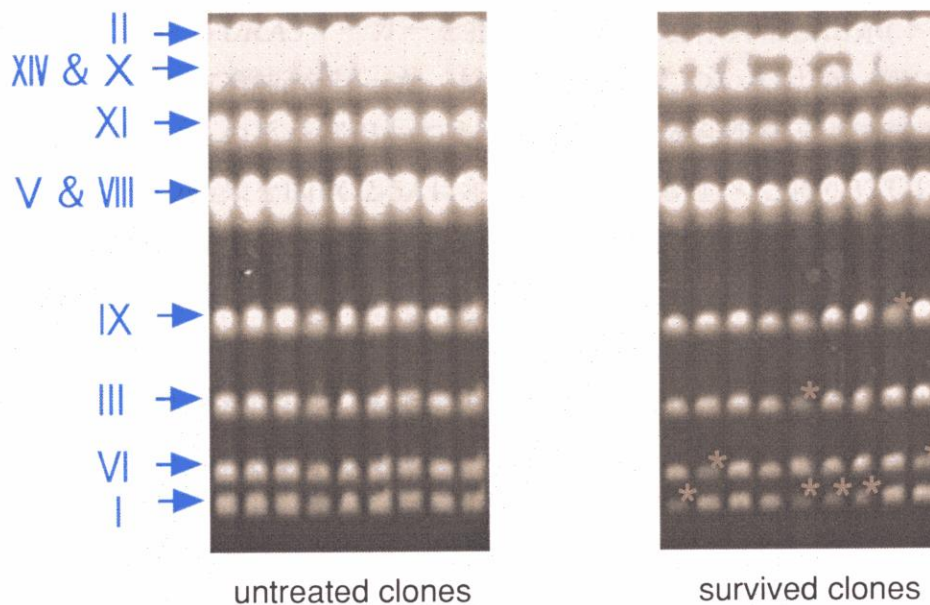
図IX-2-2 野生株及び*orc1-4*変異株における細胞周期進行の解析

23°Cで非同調培養した野生株及び*orc1-4*変異株の細胞集団を37°Cに移し(0 hr)、温度シフト後の各時点において培養液の一部をサンプリングしてFACS解析に供した。図中2C及び4CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。



図IX-2-3 *orc1-4*変異株の非許容温度及び許容温度下での生育曲線

*orc1-4*変異株の 1) 非許容温度(23°C)、及び 2) 許容温度(37°C)下での細胞増殖の様子を図に示す。23°Cで非同調培養した細胞を $OD_{600}=0.01$ となるようにYPD培地に植え継ぎ、23°C或いは37°Cの条件下で培養を行った。培養開始後任意の時間にサンプリングした菌液をYPD寒天培地に塗布し、23°Cで5日から7日間の静置培養後に形成されるコロニーの数を計測した。また、同条件下での野生株の細胞増殖の様子もあわせて解析した。各時点における生菌数の増減は培養開始時の生菌数を1とした時の相対比で表してある。



図IX-2-4 非許容温度処理後の*orc1-4*生残菌における様々な染色体の欠落

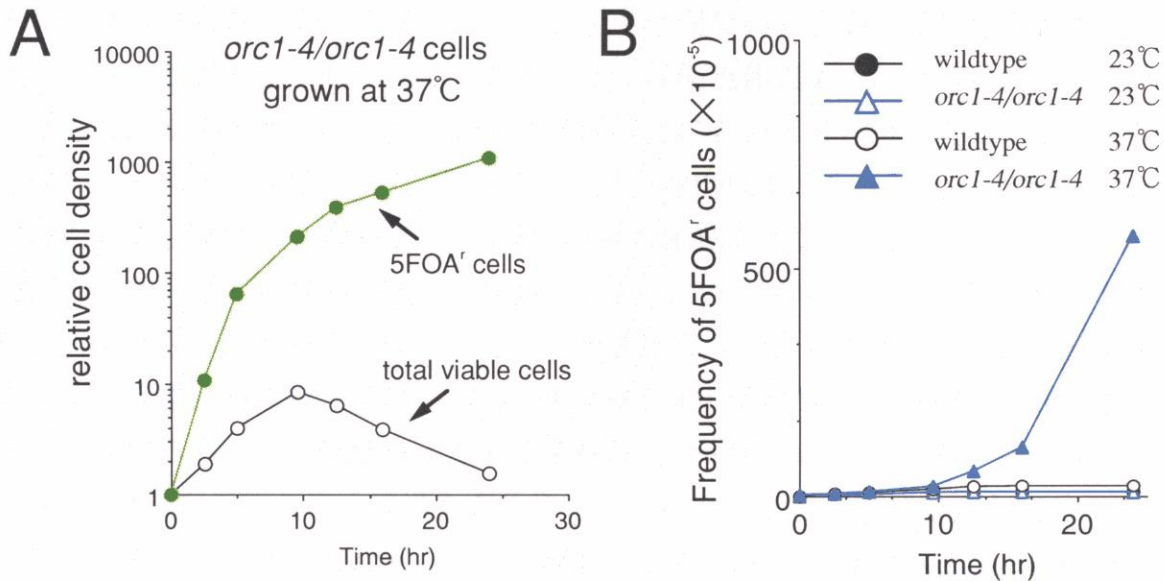
*orc1-4*変異株を37°Cで24時間処理し、この時点で生き残った細胞を23°C条件下でクローニングした。各クローン(survived clones)における染色体の状態をPFGEにより解析した結果を図に示す。図中で2本の染色体の一方が失われ、バンドの強度が弱くなっているものに関して*で表している。また、コントロールとして、非許容温度処理をせず、23°Cで24時間培養した場合の*orc1-4*クローン(untreated clones)におけるPFGE解析の結果もあわせて示す。図の左にあるギリシャ数字は染色体の番号を示している。

PFGEの像が示すバンドは各々が一对の相同染色体に対応して2コピー分のバンド強度を持っている。37℃で処理しない(23℃条件下で24時間培養)対照群の細胞ではいずれのサンプルにおいても各バンドの強度比は一定であり、二本の相同染色体が安定に保持されている事が明らかであったが、これに対して*orc1-4*細胞を37℃条件下で処理した場合には、特定のバンドの強度が同じサンプル内の他のバンドに比して半減して見られるという事例が高頻度(17/60)で確認された。この事例に伴い通常とは異なるサイズのバンドの出現は認められなかった為、これらのサンプルでは一对の相同染色体の片方が完全に消失したものと結論され、このことから、ORCの機能欠損が染色体喪失を高頻度に誘発することが示された。また今回解析した限りにおいても失われた染色体は各クローンにより様々であったので(第I, VI, IX, XI, XVI, X染色体など)、ここで見られた事例はある特定の染色体或いは特定のoriginに関して起こるものではなく、あらゆる染色体において一般的に起こり得ることが考えられた。

第三節 *URA3* マーカーを指標とした染色体異常の解析

前節の結果から、*orc1-4*変異が生残菌における様々な染色体の不安定化(染色体喪失)の原因となっている可能性が示されたが、果たして欠失や転座といったその他の染色体異常に関してもORC機能欠損が影響を及ぼし得るのかを検討する為、次に第III染色体における*URA3*マーカーを指標とした染色体異常検出系(トリプルマーカーシステム)を用いて解析を行った。検出系の説明については第一部に記載してあるので省略するが、この系を利用してまず最初に5FOA耐性を示す細胞数の経時的変化を測定した。その結果を図IX-2-5Aに示すが、先にも述べた通り37℃における*orc1-4*細胞の全生菌数は温度シフト後およそ10~12時間後から減少を始めるのに対し、5FOA耐性を示す生菌数はそれとは異なり時間の経過に伴って増加していく傾向が認められた。これを染色体異常の出現頻度(生細胞全体に占める5FOA耐性個体の割合)という形で表した結果が図IX-2-5Bである。37℃での*orc1-4*細胞は同条件下における野生株或いは23℃における野生株および*orc1-4*細胞自身に比べて5FOA耐性個体の出現頻度が有意に高く、温度シフト後24時間の時点でその差は20倍以上にも及んでいた。また、この異常頻度の上昇は温度シフト後12時間目以降に(すなわちG2/M arrestの崩壊の後)に顕著になっており、それ以前(9.6時間目)には殆ど確認されなかった。このことを細胞周期の進行状況に関連させて考えると、G2/M arrestが維持されている間、すなわちチェックポイント機構が正常に機能している間は染色体異常の形成は抑制されており、G2/M arrestが崩壊した後に初めて異常頻度の上昇がもたらされるのではないかと推測される。

更に24時間目の時点における染色体異常の内容について詳細に解析した結果が表IX-2-1である。各染色体異常の発生頻度に関して、23℃では野生株と*orc1-4*細胞との



図IX-2-5 *URA3* マーカーを指標とした染色体異常の解析

A 非許容温度下で誘発される5FOA耐性細胞の増加

*orc1-4*変異株を37°Cで培養し、5FOA耐性を示す細胞数の経時的な変化を解析した。図 III-2-3に示したように全生菌数の割合は温度シフト後10-12時間目以降減少するのに対して、5FOA耐性個体の割合はこの時間帯になっても更に増加する傾向が見られた。

B 野生株及び*orc1-4*変異株における5FOA耐性細胞の出現頻度

23°C及び37°C培養時の野生株或いは*orc1-4*変異株における5FOA耐性細胞の出現頻度を経時的に測定した。各時点における出現頻度の測定は何れも最低5実験区において行っており、それらの平均値から図の値を求めた。

表IX-2-1 培養24時間後の野生株及び*orc1-4*株における染色体異常の分類

	発生頻度($\times 10^{-5}$)			
	23°C		37°C	
	野生株	<i>orc1-4</i>	野生株	<i>orc1-4</i>
染色体喪失	6.7 (1.0)	6.4 (0.96)	6.6 (1.0)	400 (61)
アリル間組換え型	4.2 (1.0)	4.4 (1.0)	12 (1.0)	23 (1.9)
(遺伝子変換	0.64 (1.0)	0.44 (0.69)	1.2 (1.0)	3.0 (2.5)
(交叉	3.6 (1.0)	4.0 (1.1)	11 (1.0)	19 (1.8)
異所性組換え型	1.4 (1.0)	0.66 (0.46)	3.1 (1.0)	25 (8.1)
(染色体欠失	0.43 (1.0)	0.21 (0.49)	0.64 (1.0)	6.3 (9.8)
(染色体間組換え	0.99 (1.0)	0.44 (0.44)	2.4 (1.0)	19 (7.8)
計	12 (1.0)	11 (0.92)	22 (1.0)	450 (21)

- ・ 染色体異常の発生頻度の測定は野生株及び*orc1-4*変異株の23°C条件下、37°C条件下において各々5実験区ずつ行い平均値を算出した。この際、PFGEによる解析は(5FOA⁺, Leu⁺, Ade⁻)、(5FOA⁺, Leu⁺, Ade⁺)のサンプルに対して各場合とも計60+40サンプルずつ行った。
- ・ 各染色体異常の発生頻度の決定法に関しては第一部参照
- ・ アリル間組換え型及び異所性組換え型染色体異常の発生頻度(斜体)は、遺伝子変換と交叉もしくは染色体欠失と染色体間組換えの発生頻度を各々合計した値である。
- ・ 括弧内は各温度下での野生株の値を1とした場合の倍率を表している。

間に相違は見られなかったが、37°Cでは両者の間でいくつかの染色体異常の発生頻度に大きな相違が見られた。最も顕著なものは染色体喪失で、その差は60倍以上にも及んだ。また染色体内欠失や染色体間組換えにおいても7-10倍程度の差が見られたが、これに対し遺伝子変換や交叉に関しては3倍以下とそれ程大きな差は見られなかった。染色体喪失を除くこれら4種類の染色体異常のなかで、遺伝子変換や交叉は相同染色体の相同領域間で起こる組換えによって生じる為、アリル間組換え型の染色体異常と呼ぶことができる。一方、染色体内欠失や染色体間組換えは異種染色体との組換えや、姉妹染色体或いは相同染色体の相同領域以外の部位間で起こる組換えに起因する為、異所性組換え型の染色体異常と呼ぶことができる。尚、点突然変異などURA3内で起こる小規模な変化については、分類上遺伝子変換と同じカテゴリーに属するが、それらの変異の占める割合がそれ程大きくないことから(our previous data)、本研究ではこれらを更に区別するための解析は行わなかった。

以上をまとめると、*orc1-4*変異株においては染色体喪失および異所性組換えが誘発されており、相同染色体アリル間の組換えについては顕著な誘発は見られないと結論される。

第三章 *orc1-4*変異による細胞死および染色体不安定性におけるチェックポイント制御機構の関与

前章では*orc1-4*細胞においてORCの機能欠損がチェックポイント機構を活性化し、細胞周期の進行をG2/M期で停止させることが明らかとなった。また、生菌数の減少や染色体異常の誘発に関しては一度形成されたG2/M arrestの崩壊に伴って観察されたことから、これらの現象にもチェックポイント機構の働きが密接に関係しているように思われた。そこで、*orc1-4*変異株においてチェックポイント機構がそもそも機能していない場合には細胞の生存や染色体異常の発生にどのような変化が現れるのかについて検討することにし、この目的の為にRAD9遺伝子を破壊した二重変異株を作製した。

RAD9遺伝子はHartwellらが提唱したチェックポイントコントロールという概念を証明するものとして出芽酵母で最初に見出された遺伝子であり(Hartwell and Weinert, 1989)、この遺伝子を欠損した変異株は通常の細胞増殖に影響は無いものの、MMSなどのDNA傷害剤に対して強い感受性を示す様になる。この感受性は微小管重合阻害剤を用いて強制的に細胞周期を停止させることにより抑制される為、RAD9遺伝子産物(Rad9p)は損傷の修復そのものに関わるのではなく、修復を行う時間を稼ぐ為に働いていると理解されている(Weinert and Hartwell, 1988)。その後の研究によりチェッ

クポイント制御機構の概念は多様化し、実際に様々な経路が存在することが明らかになっているが、その中でRAD9遺伝子は主にDNA上の損傷に応答して細胞周期の進行をG1期あるいはG2期で停止させるチェックポイント機構(いわゆるDNAダメージチェックポイント)に関与するものと考えられており、この経路に異常が生じた場合には損傷に応じた細胞周期の停止が起こらなくなり、MMSなどに対する感受性が増すものと考えられている(reviewed by Paulovich et al., 1997b; Weinert, 1998)。主に遺伝学的な解析からRad9pはDNA損傷の感知に働くシグナルセンサーとして機能しており、感知したシグナルをMec1pやRad53pなどのシグナルトランスデューサーを介してCyclin/CDK複合体などのエフェクターまで伝達する(for review, see Ellidge, 1996)というモデルがこれまで考えられてきたが、近年の知見によるとRad9pはMec1pによるリン酸化を受け、リン酸化型Rad9pはRad53pと直接相互作用することが報告されている(Emili, 1998; Sun et al., 1998; Vialrd et al., 1998)。またMec1pとRad9pのどちらが経路のいわゆる“上流”に位置するのかについても議論が続いている(Foss, 2001)。このようにRad9pの分子機作に関しては未だ不明な点も多いが、その一方でRAD9依存的なチェックポイント機構の活性化が細胞周期の様々な時点で行われていることも確認されている。その一例としてS期内のDNA損傷に対してもRAD9経路が働くことが示されている為(Paulovich et al., 1997a)、本研究で見られたORCの機能欠損によるチェックポイント機構の活性化にもこのRad9pが関与している可能性が考えられた。

第一節 *orc1-4 rad9*Δ二重変異株における非許容温度下での細胞周期進行と生存

まず、実際に*orc1*変異株で見られるG2/M arrestにRAD9遺伝子産物が関与しているかどうかを確かめる為に、*orc1-4 rad9*Δホモ二倍体細胞における細胞周期進行の状況をFACS法により解析した(図IX-3-1)。37℃条件下で*rad9*Δ単独変異株のFACSパターンに野生株との相違は見られなかったが、これに対して*orc1-4 rad9*Δ二重変異株では4Cのピークのポテンシャルは高いものの、*orc1-4*単独変異株で見られた様な完全なG2/M期での細胞の蓄積が起こらなくなっていた。この結果は*orc1-4*変異株におけるG2/M arrestがRad9pに依存して起こる現象であり、Orc1pの機能欠損により生じる何らかの異常がシグナルとしてRAD9経路に認識可能であることを意味している。

また障害に応じた細胞周期の停止機能に欠損を持つ*orc1-4 rad9*Δ二重変異株においては、Orc1pの異常に対処する為の十分な時間が得られず、染色体に障害を抱えた細胞がそのまま次のM期に移行する為、細胞の生存に関して*orc1-4*単独変異株よりも深刻な被害がもたらされることが予想された。しかし実際に二重変異株の非許容温度下での生菌数を調べたところ、この様な予想に反して亢進的な生存比の低下は観察されず、むしろ*orc1-4*単独変異株において見られた生存比低下が逆に緩和される傾向にあることが明らかになった(図IX-3-2A)。このことは*orc1-4*変異によるOrc1p機能欠

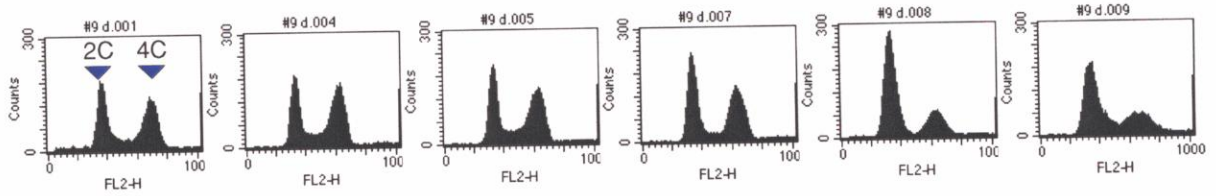
損そのものは必ずしも致命的なものではなく、細胞が死滅する為にはRAD9遺伝子に依存したチェックポイント機構の何らかの作用が必要であることを示している。

第二節 *orc1-4 rad9*Δ二重変異株における非許容温度下での染色体不安定性

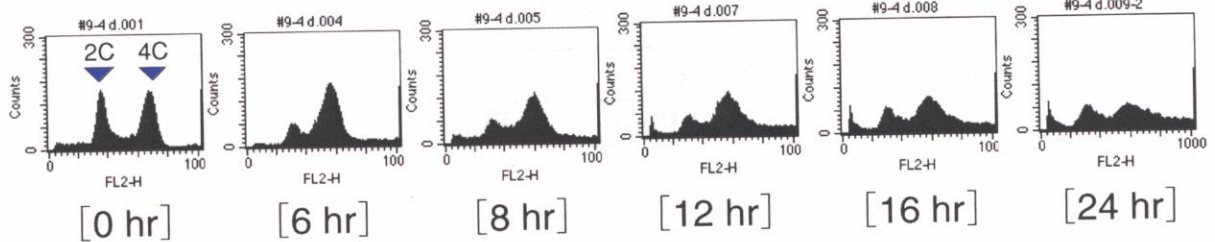
一方*orc1-4 rad9*Δ二重変異株の37℃での染色体異常の発生頻度を測定したところ、図IX-3-2Bに示す様に*orc1-4*単独変異株の場合に比べてより大幅な染色体異常の亢進が確認された。また*orc1-4*単独変異株では染色体異常の誘発が温度シフト後12時間目以降から起こり始めたのに対し、二重変異株においてはそれ以前の比較的早い時期から大幅な頻度の上昇が認められた。このことからRAD9遺伝子の機能が*orc1-4*変異による染色体異常の発生を抑制していることを結論できる。恐らくはOrc1pの機能欠損に起因する何らかのシグナルをRad9p経路が認識して細胞周期を停止させることで、染色体上に生じた異常が次世代に受け継がれることを抑止しているのではないかと推測される。

RAD9遺伝子破壊の染色体異常形成への影響をより詳細に解析する為、次に*orc1-4 rad9*Δ二重変異株の温度シフト後24時間の時点で生じる染色体異常の同定と分類を行った(表IX-3-1)。まず全体の発生頻度を比較したところ、*rad9*Δ単独変異株及び*orc1-4 rad9*Δ二重変異株の染色体異常頻度が野生株に比べ各々4.7倍、73倍に上昇していた。*orc1-4*単独変異株の野生株に対する頻度の上昇が21倍であるので、*orc1-4 rad9*Δ二重変異株においてはRAD9遺伝子及びORC1遺伝子機能欠損の影響が相加的ではなく相乗的に現れていると表現できる。各々の染色体異常の発生頻度を個別に比較すると、*orc1-4 rad9*Δ二重変異株では染色体喪失や染色体内欠失、染色体間組換え及び交叉に関して顕著な上昇が見られた。これらの結果をアリル間組換え型、異所性組換え型そして染色体喪失の3つに分類して比較した場合には以下の可能性が考えられる。まず*rad9*Δ単独変異株では3種全ての染色体異常の発生頻度が野生株に比べ3倍から9倍程度上昇していたが、この結果は野生株においてRAD9遺伝子の効果が内在的に生じるあらゆるタイプの染色体異常の抑制に働くことを意味している。*orc1-4*単独変異株と野生株との比較は先にも述べた通りであり、ORC機能欠損が染色体喪失と異所性組換え型の染色体異常の発生に特に影響を及ぼしていたが、*orc1-4*株においてチェックポイント制御機構が同時に欠損した場合にも各々のタイプの染色体異常の発生頻度が更に3~8倍程度上昇しており、このことから*orc1-4*単独変異株においてもチェックポイント機構は様々なタイプの染色体異常の抑制に関与しているものと思われる。

以上をまとめると野生株、*orc1-4*単独変異株のいずれにおいても、チェックポイント機構は特殊な染色体異常にのみ関与するのではなく、様々な染色体異常に全般的に関与しており、その発生レベルを低く抑えることに貢献していると結論できる。

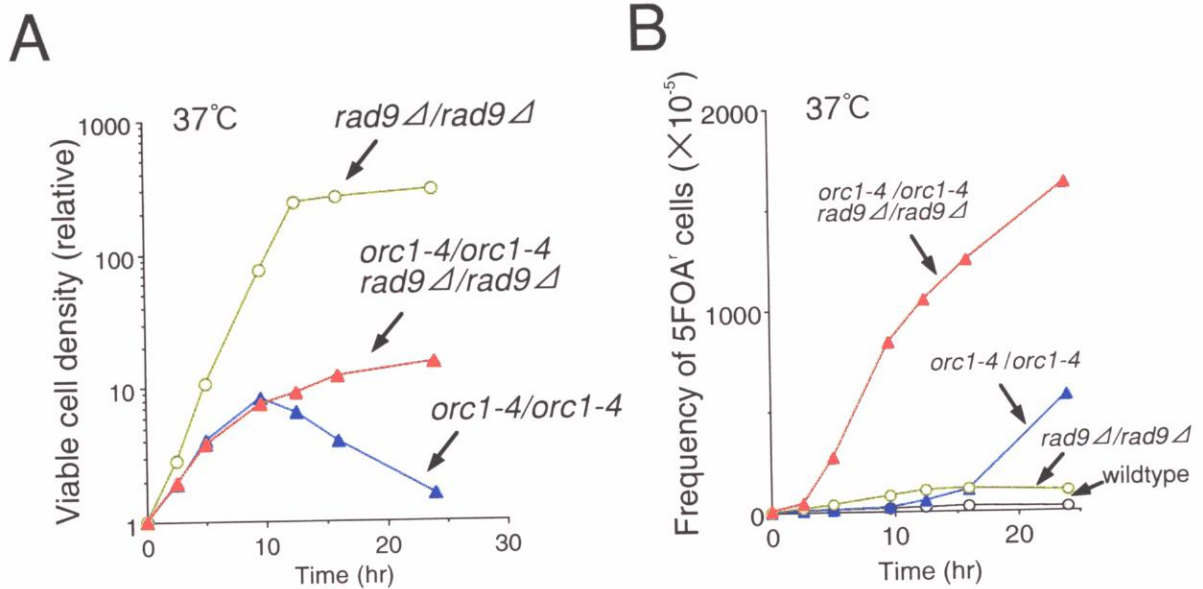


orc1-4/orc1-4 rad9Δ/rad9Δ at 37°C



図IX-3-1 *rad9Δ*株及び*orc1-4 rad9Δ*株における細胞周期進行の解析

23°Cで非同調培養した*rad9Δ*変異株及び*orc1-4 rad9Δ*二重変異株の細胞集団を37°Cに移し(0 hr)、温度シフト後の各時点において培養液の一部をサンプリングしてFACS解析に供した。図中2C及び4CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。



図IX-3-2 37°Cでの*rad9Δ*株, *orc1-4 rad9Δ*株の細胞増殖と染色体異常

A *rad9Δ*変異株及び*orc1-4 rad9Δ*二重変異株の生育曲線

37°C条件下における*rad9Δ*変異株及び*orc1-4 rad9Δ*二重変異株の細胞増殖の様子を図に示す。また、比較の意味で*orc1-4*変異株における結果も併記する。

B *rad9Δ*変異株及び*orc1-4 rad9Δ*二重変異株における5FOA耐性細胞の出現頻度

37°C培養時の*rad9Δ*変異株及び*orc1-4 rad9Δ*二重変異株における5FOA耐性細胞の出現頻度を経時的に測定した。各時点における出現頻度の測定は何れも最低5実験区において行っており、それらの平均値を求めた。比較の意味で野生株及び*orc1-4*変異株における結果も併記する。

表IX-3-1 24時間培養後の*rad9*Δ, *orc1-4 rad9*Δ株の染色体異常の分類

	発生頻度(×10 ⁻⁵) at 37°C			
	野生株	<i>rad9</i> Δ	<i>orc1-4</i>	<i>orc1-4 rad9</i> Δ
染色体喪失	6.6 (1.0)	56 (8.5)	400 (61)	1300 (200)
アレル間組換え型	12 (1.0)	36 (3.0)	23 (1.9)	150 (13)
(遺伝子変換	1.2 (1.0)	1.5 (1.2)	3.4 (2.8)	1.7 (1.4)
(交叉	11 (1.0)	34 (3.2)	19 (1.8)	150 (14)
異所性組換え型	3.1 (1.0)	10 (3.4)	25 (8.1)	110 (36)
(染色体内欠失	0.64 (1.0)	2.5 (3.8)	5.9 (9.2)	8.0 (12)
(染色体間組換え	2.4 (1.0)	7.9 (3.3)	19 (7.8)	100 (42)
計	22 (1.0)	100 (4.7)	450 (21)	1600 (73)

- ・ 37°Cで24時間培養後の*rad9*Δ及び*orc1-4 rad9*Δ株における染色体異常の発生頻度を測定した。測定は各々5実験区ずつ行い平均値を算出した。この際、PFGEによる解析は(5FOA', Leu', Ade'), (5FOA', Leu', Ade')のサンプルに対して計48+64サンプル(*orc1-4 rad9*Δ株)、48+48サンプル(*rad9*Δ株)ずつ行った。比較の為に野生株及び*orc1-4*変異株における値も併記する。
- ・ アレル間組換え型及び異所性組換え型染色体異常の発生頻度(斜体)は、遺伝子変換と交叉もしくは染色体内欠失と染色体間組換えの発生頻度を各々合計した値である。
- ・ 括弧内は野生株の値を1としたときの倍率を表している。

第四章 *orc1-3*、*orc1-7*変異の細胞増殖と染色体不安定性に及ぼす影響

これまでに述べた様に、*orc1-4*変異株ではORCの機能欠損がRAD9遺伝子に依存するG2/M期での細胞周期の停止や生菌数の減少、或いはRAD9遺伝子に抑制される染色体異常の誘発を引き起こしていた。このような表現型が*orc1-4*変異に特異的であるのか、それとも他の*orc1*変異にも共通して見られるものなのかを検証する為、本章では*orc1-3*及び*orc1-7*というの2つのアレルに関して新たに解析を行った。両アレルは*orc1-4*と同じく劣性であり、野生型ORC1遺伝子とのヘテロ二倍体(ORC1/*orc1-3*、ORC1/*orc1-7*)は37°C条件下で野生株と全く同じ表現型を示したので、ここではホモ二倍体における結果のみを示すことにする。

第一節 *orc1-3*変異株の性質

まず*orc1-3*株の細胞周期進行の状況をFACS解析により調べた(図IX-4-1)。*orc1-3*株の細胞周期進行の特徴は先の*orc1-4*株の場合と同様であり、37°Cに温度シフト後およそ8時間目までに一度完全なG2/M arrestが起き、その後10時間目以降に4Cのピークが幅広になり、2C或いはそれ以下のDNA含量のところに新たにピークが出現するというパターンが得られた。*orc1-3*変異の細胞生存に及ぼす影響もまた*orc1-4*変異と同様であり、G2/M arrestの崩壊とほぼ同時期に生菌数の減少が始まるという相関が見られた(図IX-4-2A)。さらに染色体異常の出現頻度を測定したところ、*orc1-3*株においてもG2/M arrestの崩壊に伴うように温度シフト後12時間目以降から顕著な5FOA耐性細胞の出現頻度の上昇が観察された(図IX-4-2B)。

ここまでの結果から、*orc1-3*株の様々な表現型が*orc1-4*株のものと非常に類似性が高いことが明らかとなった。そこで*orc1-3*株においてもチェックポイント機構が同様に関与しているのかどうかを確かめる為に*orc1-3 rad9*Δ二重変異株を作製して解析を行った。結果は図IX-4-1及び図IX-4-2に示す通りであり、*orc1-3 rad9*Δ二重変異株でもRAD9遺伝子の破壊によりG2/M arrestの解除や致死性の解消、染色体異常の更なる亢進が観察された。このことからチェックポイント機構は*orc1-3*、*orc1-4*両変異株に同種の効果を発揮していると結論できる。

第二節 *orc1-7*変異株の性質

これに対し*orc1-7*株のFACS解析では、8~12時間目付近でG2ピークの割合が高くなるものの、*orc1-3*株及び*orc1-4*株に見られた顕著なG2/M arrestやその後の崩壊は観察されなかった(図IX-4-1)。また細胞の生育に関しても*orc1-7*株では温度シフトによる生菌数の減少は見られず、野生株に比較的近い速度で細胞増殖が行われてることが明らかとなった(図IX-4-2A)。これらの解析では*orc1-7*変異による明白な異常は認め

られなかったが、*orc1-7*変異株はDNA傷害剤であるメチルメタンスルホン酸(MMS)に対して*orc1-3*株や*orc1-4*株と同等かそれ以上の強い感受性を示していた(図IX-4-3)。更に染色体異常の出現頻度に関しても5FOA耐性細胞の出現頻度の上昇が確認されたことから(図IX-4-2B)、*orc1-7*変異がORCの機能に何らかの欠損を生じていることは間違いないものと思われる。*orc1-3*株や*orc1-4*株とは異なり、MMSに対する感受性が30℃で既に現れている一方で、細胞増殖に関しては37℃でも大きな変化が見られないことから、*orc1-7*株は温度変化に対する依存性が低い性質を持つといえる。尚*orc1-3*株や*orc1-4*株での染色体異常頻度の上昇が12時間目以降に見られていたのとは異なり、*orc1-7*株での頻度の上昇はそれ以前の段階から既に現れていた。

第三節 *orc1*アレルの変異部位について

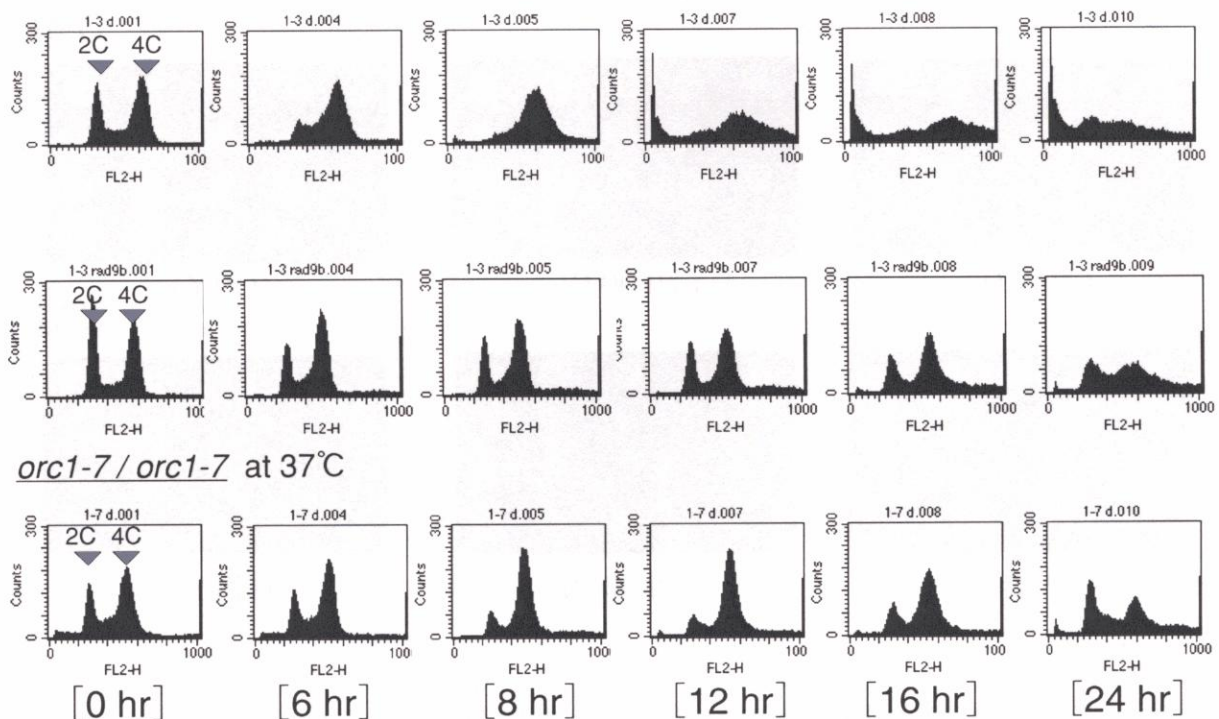
今回我々が解析した3つの*orc1*アレルの変異部位について言及すると、*orc1-3*、*orc1-4*アレルでは各々511T→G、401T→Cとなる点突然変異が生じており、これによって171番目のフェニルアラニンがバリンに、134番目のロイシンがプロリンに変化している(図IX-4-4)。これらの変異はいずれもORC1遺伝子の5'末端側のSIR3遺伝子との相同性が見出されている領域内に生じている。BellらによればこのSIR3相同領域の完全欠失はDNA複製や細胞の生育に影響がないと結論されているが(Bell et al., 1995)、この領域内に生じた点突然変異がOrc1pの全体的な構造を変化させ、DNA複製に関するORCの機能に影響を及ぼす可能性は否定できない。一方*orc1-7*アレルでは1697G→Aとなる点突然変異が生じており、これにより566番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換されている。この*orc1-7*変異はORC1遺伝子内のA-loopと呼ばれるATP加水分解ドメイン内に存在するが、*orc1-7*変異株で見られた表現型とOrc1pのATP加水分解能との関係は不明である。

第四節 *orc1*変異株でのORC機能欠損の共通点と相違点

これまでに解析を行った*orc1-3*、*orc1-4*、*orc1-7*の3種類の*orc1*変異株と*orc1-3 rad9*Δ、*orc1-4 rad9*Δの2種類の二重変異株について、各々の変異株の細胞周期進行と染色体異常に関する表現型を表IX-4-1にまとめた。先に示したように*orc1-3*株と*orc1-4*株は共通の表現型を有しており、ともに一過的なG2/M arrestを引き起こすが、その後arrestの崩壊とリンクする形で生菌数の減少や染色体異常の誘発が観察された。また*orc1-3*、*orc1-4*変異株の両者はRAD9遺伝子欠損の影響に関しても共通しており、*orc1-3 rad9*Δや*orc1-4 rad9*Δ二重変異株においては非許容温度下でのG2/M arrestが起こらず、染色体異常の発生頻度が更に上昇する反面、生存比の低下が見られなくなっていた。これに対して*orc1-7*株ではG2/M arrestや細胞増殖への顕著な影響が見られない一方で、染色体異常に関しては発生頻度の大幅な上昇が確認された。こうし

た *orc1-7* 株の表現型は *orc1-3* 株や *orc1-4* 株よりはむしろ *orc1-3 rad9Δ* や *orc1-4 rad9Δ* 二重変異株の表現型と共通点が多い。更に *orc1-3 rad9Δ* や *orc1-4 rad9Δ* 二重変異株においては染色体異常の誘発が温度シフト後比較的早い段階から現れるのも特徴であったが、同様の傾向は *orc1-7* 株でも観察されている。これらの類似性から考えると、*orc1-7* 株においてはチェックポイント機構にも何らかの異常が生じている可能性が考えられる。すなわち、*orc1-7* 株においても *orc1-3* 株や *orc1-4* 株と同様に ORC の機能欠損が G2/M arrest を引き起こす潜在性は有しているものの、同時にチェックポイント機構にも何らかの異常がもたらされるので、実際の細胞周期の停止には至らないのではないかと考えられる。こうした観点からいえば、*orc1-7* 変異はある種の(チェックポイント機能欠損が併発した)*orc1-4* 変異の亜系ととらえることが出来るかもしれない。*orc1-7* 株が通常の細胞増殖にはほとんど障害を見せないが、MMS に対して強い感受性を示すという事実も、こういった可能性を支持しているものと思われる。

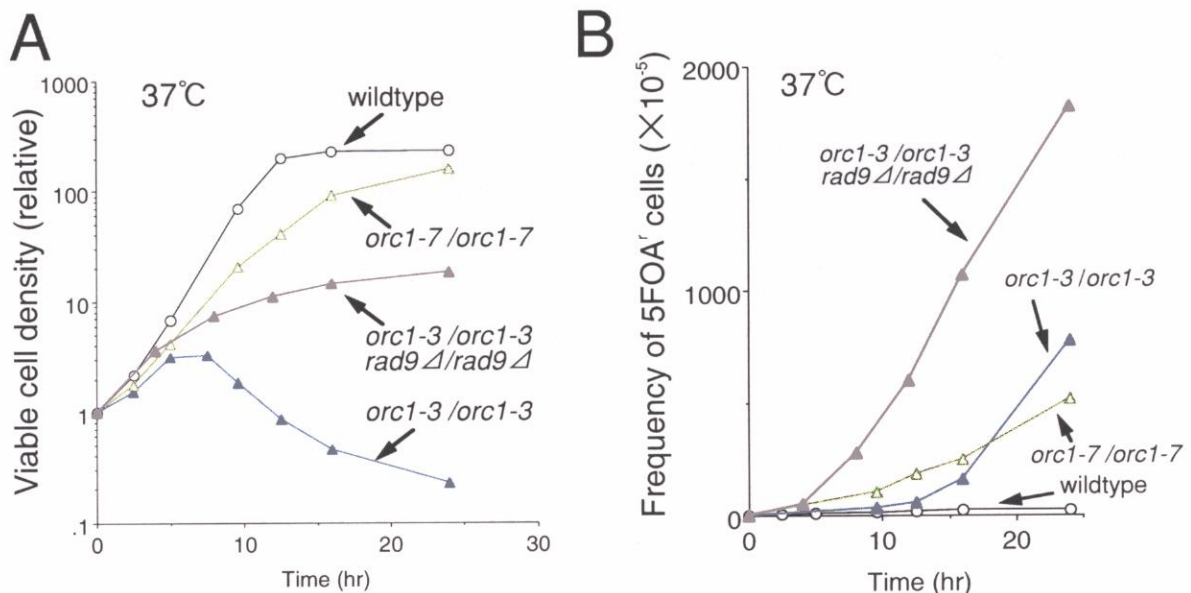
これら *orc1* 変異株における解析の全体的なまとめとして、Orc1p の機能欠損は染色体異常の誘発の原因となるが、Orc1p の機能欠損それ自身は必ずしも致命的なものではなく、変異株が致死性を示す際にはチェックポイント機構が活性化され、G2/M 期での細胞周期停止及び arrest の崩壊という過程を経ることが必要条件であると結論できる。また解析した3種類の *orc1* 変異株の全てにおいて染色体異常頻度が顕著に上昇していたことは、*ORC1* 遺伝子の機能を考える上で重要な点であると思われる。前述のように *orc1-3*、*orc1-4* 変異と *orc1-7* 変異とでは変異部位が存在するドメインが全く異なる為、*ORC1* ORF 上の特定の領域が染色体異常形成に関与している訳では無いものと推測される。染色体異常の誘発に関しては Orc1p が機能欠損した場合に比較的一般的に現れる現象といえるのではないだろうか。



orc1-7 / orc1-7 at 37°C

図IX-4-1 *orc1-3*株, *orc1-3 rad9Δ*株, *orc1-7*株の細胞周期進行の解析

23°Cで非同調培養した各々の変異株を37°Cに移し、温度シフト後の各時点において培養液の一部をサンプリングしてFACS解析に供した。図中2C及び4CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。



図IX-4-2 *orc1-3*株, *orc1-3 rad9Δ*株, *orc1-7*株の細胞増殖と染色体異常

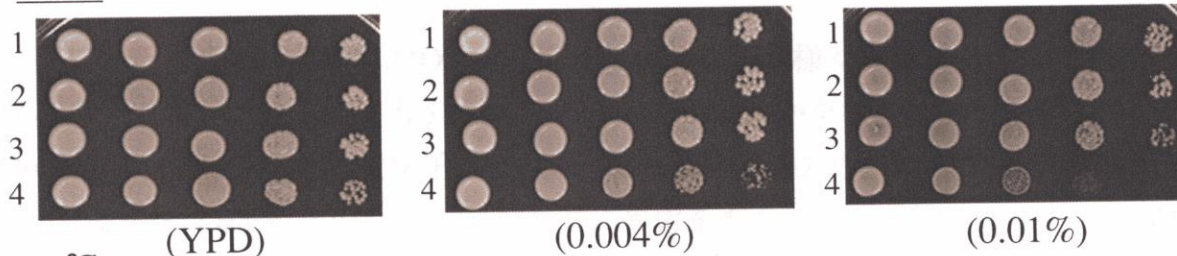
A *orc1-3*株, *orc1-3 rad9Δ*株, *orc1-7*株の生育曲線

37°C条件下における*orc1-3*株, *orc1-3 rad9Δ*株, *orc1-7*株の細胞増殖の様子を図に示す。また、比較の意味で野生株における結果も併記する。

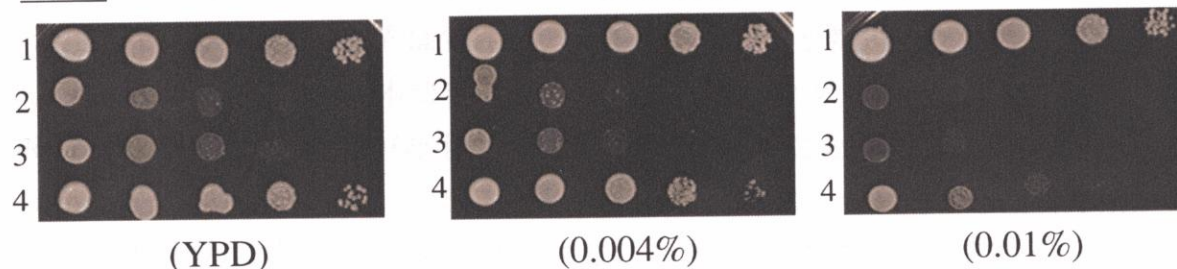
B *orc1-3*株, *orc1-3 rad9Δ*株, *orc1-7*株における5FOA耐性細胞の出現頻度

37°C培養時の*orc1-3*株, *orc1-3 rad9Δ*株, *orc1-7*株における5FOA耐性細胞の出現頻度を経時的に測定した。各時点における出現頻度の測定は何れも最低4実験区において行っており、それらの平均値から図の値を求めた。

30°C



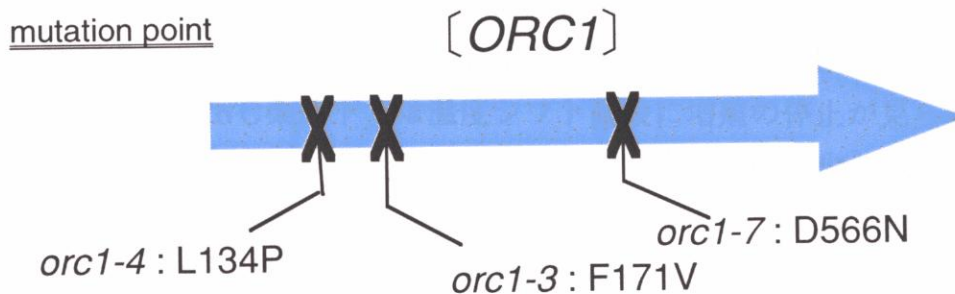
37°C



1. wildtype 3. *orc1-4/orc1-4*
2. *orc1-3/orc1-3* 4. *orc1-7/orc1-7*

図IX-4-3 *orc1*変異株におけるMMS感受性の解析

23°C条件下で対数増殖期にある培養細胞を $OD_{600}=0.8$ となるように調整し、1/10ずつ段階希釈してMMSを含む寒天培地にスポットした。このプレートが30°C及び37°C条件下で静置培養し、MMS存在下における細胞増殖の様子を観察した。



図IX-4-4 *orc1*変異株における変異部位

表IX-4-1 *orc1*変異株における表現型のまとめ

	temp. (°C)	G2/M arrest	abrogation of G2/M arrest	loss of cell viability	induction of LOH events
<i>orc1-3 / orc1-3</i>	37°C	yes	yes	yes*	yes*
<i>orc1-4 / orc1-4</i>	37°C	yes	yes	yes*	yes*
<i>orc1-4 / orc1-4 rad9Δ/rad9Δ</i>	37°C	no	—	no	yes
<i>orc1-7 / orc1-7</i>	37°C	no	—	no	yes

* after abrogation of G2/M arrest

第五章 *orc2-1*変異株の非許容温度下での細胞増殖欠損と染色体異常

次に、これまでに見られたOrc1pの機能欠損に基づく様々な表現型がORCの他のサブユニットの異常によっても引き起こされるのかどうかを検証する為に、本章ではOrc2pをコードするORC2遺伝子に欠損をもつ変異株(*orc2-1*)を用いて解析を行った。*orc2-1*変異株はHM領域のサイレンシングに異常をもつ温度感受性変異株として単離されており(Foss et al., 1993)、ORC2 ORF内のC末端付近に1808C→Tとなる点突然変異が生じている。*orc2-1*変異は劣性のアレルであることが報告されているが(Foss et al., 1993; Bell et al., 1993)、本研究で用いたFY株のバックグラウンドにおいてもORC2/*orc2-1*ヘテロ二倍体が野生株と同様の挙動を示すことを確認している(data not shown)。一方、*orc2-1/orc2-1*ホモ二倍体では*orc2-1*変異の生育に対する阻害効果が強過ぎて37℃条件下で急激に細胞が死滅することが予備実験の段階で明らかとなった為、これまでと同様の条件下で解析を行い、単純に*orc1*変異株の結果と比較することは困難であると思われた。そこで今回は幾つかの培養温度を設定し、各温度下における解析を並行して進めていくことで*orc2-1*変異株の特性を断層連続写真的に理解することを試みた。

第一節 各温度での細胞増殖阻害と細胞周期停止

まず様々な温度条件下で*orc2-1*変異株の生菌数の増減を調べたところ図IX-5-2Aのような結果が得られた。*orc2-1*変異株は23℃条件下において野生株とほぼ変わらない速度で増殖したが、26℃条件下では温度シフト直後に増殖の停止が見られた。また28℃以上の条件下においては温度シフト後の急激な生菌数の減少が観察された。*orc1-3*変異株や*orc1-4*変異株では生菌数が減少するまでにある程度の時間(およそ8-10時間)を必要としたが、高温域の*orc2-1*変異株ではこのようなタイムラグは存在せず、温度シフト直後からORC機能欠損が細胞増殖阻害に作用しているように見られた。

次にFACS法により*orc2-1*変異株の細胞周期進行を解析した(図IX-5-1)。23℃条件下では、生菌数の増加に対応して24時間目までのどの時点においても2Cと4Cのピークがほぼ1:1に近い割合で観察されるという、対数増殖期の細胞集団に典型的なFACSパターンが得られた。これに対し37℃条件下では、温度シフト後およそ80分の時点からG1/S期における細胞周期の停止が見られた。*orc2-1*変異株のこうした挙動は以前Bellらが報告した内容とも合致する(Bell et al., 1993)。しかしながら培養温度が37℃を下回る場合には、細胞周期の停止の位置(FACSにおけるピークの位置)がG1/S期よりも後方(G2/M期側)にシフトする傾向が見られ、30℃~32℃ではS期内で、26℃~28℃では*orc1-3*株や*orc1-4*株と同様にG2/M期での細胞周期進行の停滞が観察された。こうした変化は*orc2-1*変異の細胞に及ぼす影響が培養温度により異なることを意味してい

と思われる。すなわち37℃条件下ではOrc2pの機能欠損の程度が強くDNA複製が殆ど行われない為にG1/S期の細胞が蓄積するが、26℃～28℃条件下ではOrc2pの機能欠損が比較的弱く、ある程度のDNA合成が可能であるが複製完了までには十分でない為にG2/M期の細胞が蓄積するのではないかと推測される。しかしながら、G2/M期での細胞周期の停止が見られた温度条件下においても、*orc2-1*変異株では*orc1-3*変異株や*orc1-4*変異株において見られたG2/M arrestの崩壊を示す兆候(12時間目以降2C以下の位置に新たなピークが出現することなど)は認められなかった。*orc2-1*変異株と*orc1-3*、*orc1-4*変異株との間には、細胞が死に至る過程において何らかの質的相違が存在するのかもしれない。

第二節 各温度での染色体異常の発生頻度

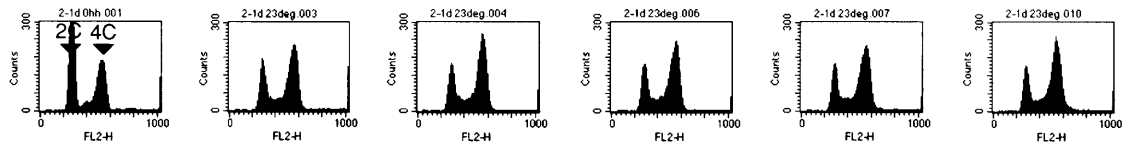
更に様々な温度条件下での、温度シフト後24時間の時点における染色体異常の発生頻度を測定した結果が図IX-5-2Bである。*orc2-1*変異株は高温域での生育障害が強すぎて殆どの細胞が死滅してしまう為に、32℃以上の条件下での異常頻度は決定できなかった。解析が可能であった23℃から30℃の範囲内では、いずれの温度条件下においても*orc2-1*変異株は野生株の頻度と同程度の値を示すに止まった。更に26℃条件下では補助マーカーの栄養要求性やPFGEを利用して染色体異常の詳細な分類を行ったが、この場合にも野生株と比較して特定の染色体異常の発生頻度が突出して上昇しているという傾向は見られなかった(表IX-5-1)。これらの結果から考えると、*orc2-1*変異株において引き起こされるOrc2pの機能欠損は染色体異常発生に関して特に影響を及ぼさない性質のように思われる。

第三節 *orc2-1*変異株におけるチェックポイント制御機構の関与-1

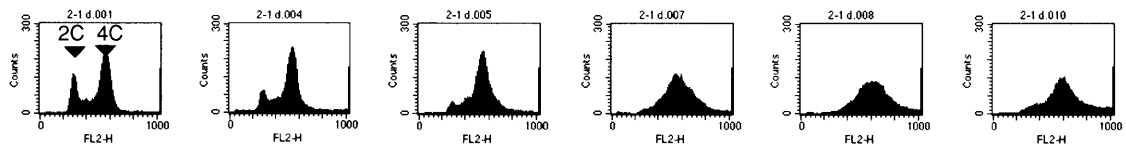
しかしながら、これまでに見た様にRAD9依存的な経路は染色体異常の抑制に関与する為、*orc2-1*変異株でもこうしたチェックポイント機構の働きが*orc2-1*変異の染色体異常を誘発する潜在性を覆い隠している可能性が考えられた。また、細胞の生育に関してもチェックポイント機構がこれまでと同様の役割を担っているのであれば、*orc2-1*変異株においてもRAD9遺伝子が欠損した場合に何らかの致死性の緩和が見られることが期待される。そこで次にこれらチェックポイント機構の様々な関与の可能性を検証する目的で*orc2-1 rad9Δ*二重変異株を作製した。

*orc2-1 rad9Δ*二重変異株の解析に際しては、まず最初にG2/M期での停止の時期や細胞の生存に関して*orc1-3*株や*orc1-4*株に比較的近い表現型が見られた26℃条件下において諸性質を検討した。FACS解析により細胞周期の進行を調べたところ、*orc2-1*単独変異株においてG2/M arrestが引き起こされた条件下で*orc2-1 rad9Δ*二重変異株は細胞周期の停止を起こさなくなっており(図IX-5-3)、*orc2-1*変異株におけるチェック

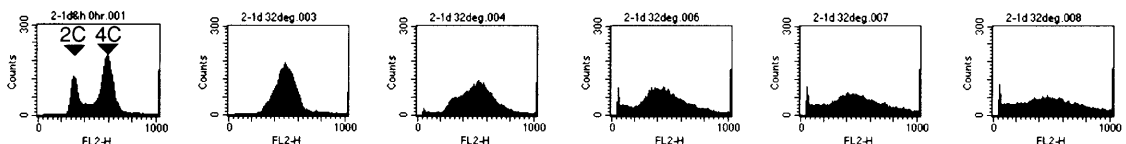
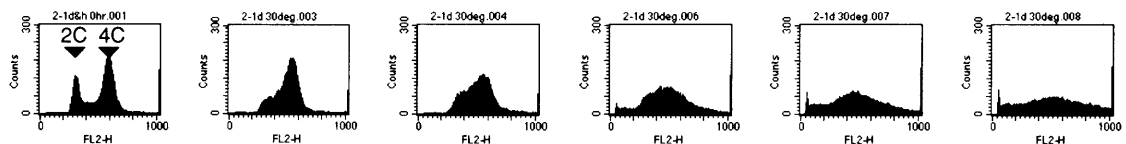
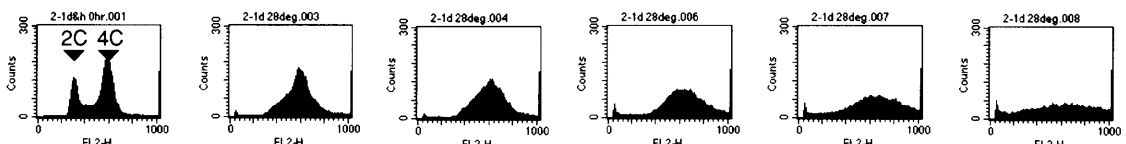
orc2-1 / orc2-1 at 23°C



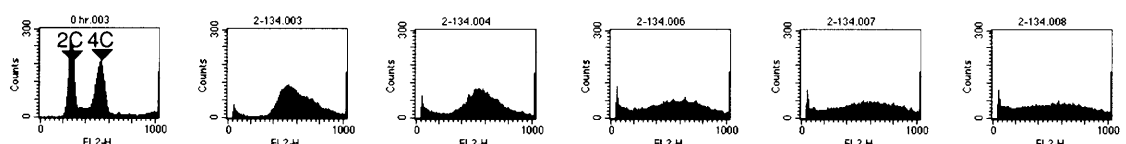
orc2-1 / orc2-1 at 26°C



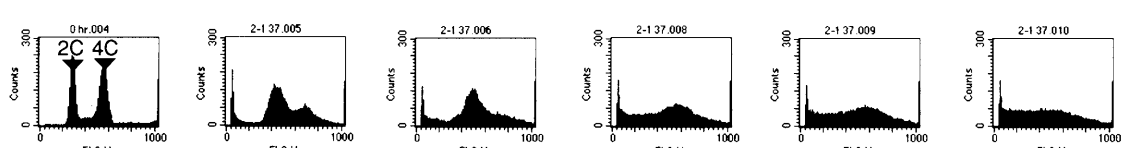
orc2-1 / orc2-1 at 28°C



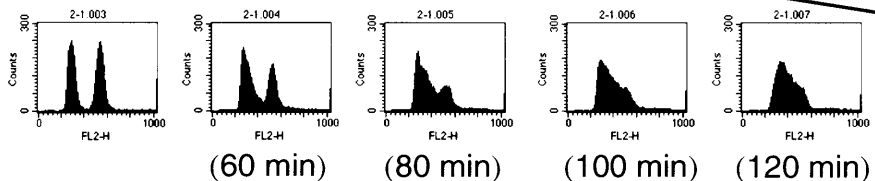
orc2-1 / orc2-1 at 34°C



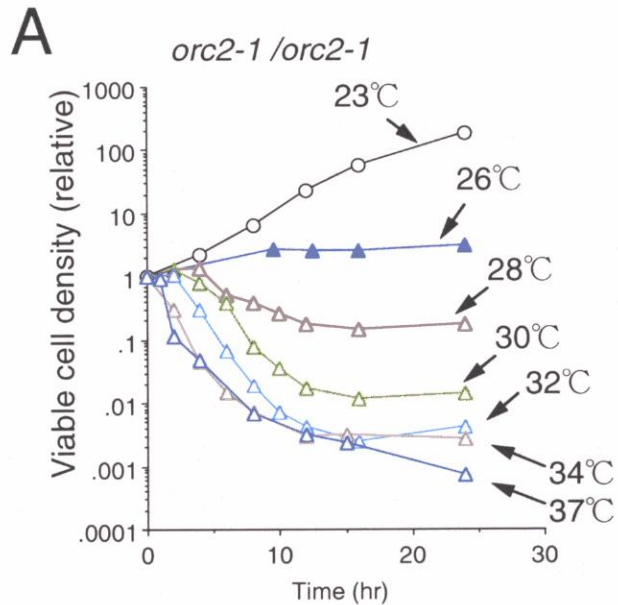
orc2-1 / orc2-1 at 37°C



[6 hr] [8 hr] [12 hr] [16 hr] [24 hr]



23°Cで非同調培養した*orc2-1*変異株を様々な温度に移し、温度シフト後任意の時点において培養液の一部をサンプリングしてFACS解析に供した。図中2C及び4CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。



B

Frequency of 5FOA^r cells at 24 hr ($\times 10^{-5}$)

	wildtype	<i>orc2-1/orc2-1</i>
23°C	12.3±1.45	14.1±7.35
26°C	18.7±1.27	19.8±5.79
28°C	N.D.	17.8±12.0
30°C	18.2±5.04	16.5±7.48
32°C	N.D.	≤37.1
37°C	21.6±2.19	N.D.

図IX-5-2 *orc2-1*変異株における細胞増殖と染色体異常

A 様々な培養温度下における *orc2-1*変異株の生育曲線

各温度条件下における *orc2-1*変異株の細胞増殖の様子を図に示す。

B *orc2-1*変異株における5FOA耐性細胞の出現頻度

様々な温度下で24時間培養した場合の *orc2-1*変異株における5FOA耐性細胞の出現頻度を測定した。各温度における出現頻度の測定は何れも最低4実験区において行っており、それらの平均値から表の値を求めた。また、比較の意味で同条件下における野生株の値も併記した。

N.D.=not determined

表IX-5-1 *orc2-1*株における24時間培養後の染色体異常の分類 (26°C)

	発生頻度($\times 10^{-5}$)					
	野生株 23°C		野生株 37°C		<i>orc2-1</i> 26°C	
染色体喪失	6.7	(1.0)	6.6	(0.99)	13	(1.9)
アレル間組換え型	4.2	(1.0)	12	(2.8)	14	(3.2)
(遺伝子変換 交叉	0.64	(1.0)	1.2	(1.9)	1.5	(2.4)
	3.6	(1.0)	11	(3.0)	12	(3.4)
異所性組換え型	1.4	(1.0)	3.1	(2.1)	2.2	(1.6)
(染色体欠失 染色体間組換え	0.43	(1.0)	0.64	(1.5)	0.12	(0.28)
	0.99	(1.0)	2.4	(2.4)	2.1	(2.1)
計	12	(1.0)	22	(1.8)	28	(2.3)

- ・ 26°Cで24時間培養後の *orc2-1*変異株における染色体異常の発生頻度を測定した。頻度の測定は5実験区で行い、その平均値を算出した。また、PFGEによる解析は(5FOA^r, Leu⁺, Ade⁻)、(5FOA^r, Leu⁺, Ade⁺)のサンプルに対して計40+40サンプルずつ行った。比較の為に23°C及び37°C条件下の野生株における値も併記する。
- ・ アレル間組換え型及び異所性組換え型の発生頻度(斜体)は、遺伝子変換と交叉もしくは染色体欠失と染色体間組換えの発生頻度を各々合計した値である。
- ・ 括弧内は野生株23°C条件下の値を1としたときの倍率を表している。

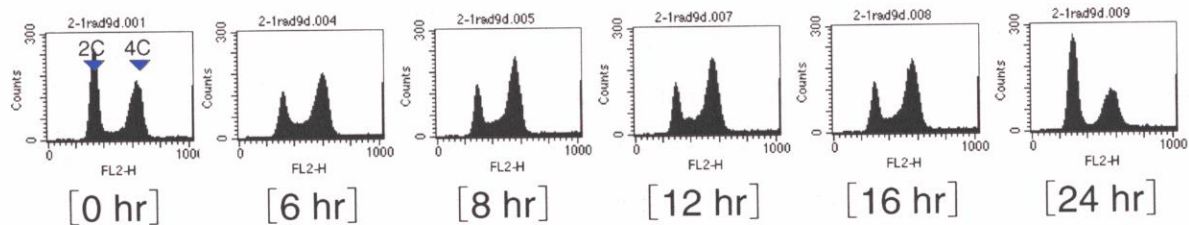
ポイント機構の活性化もRAD9遺伝子に依存的であることが明らかとなった。*orc2-1 rad9*Δ二重変異株の生菌数の増減を調べたところ、RAD9遺伝子の欠損により*orc2-1*変異がもたらす生育阻害(生菌数が横這いの状態)が抑制され、細胞増殖が大幅に回復していることがわかった(図IX-5-4A)。このことから、少なくとも26℃条件下では*orc1-3*或いは*orc1-4*変異株の場合と同様、*orc2-1*変異株においてもOrc2pの機能欠損自体が必ずしも致命的なものではなくRAD9遺伝子産物の働きに依存して細胞が死滅するという事実が確認された。

一方*orc2-1 rad9*Δ二重変異株の染色体異常の発生頻度を測定した場合には、*orc1-3 rad9*Δ株や*orc1-4 rad9*Δ株のような相乗的な発生頻度の上昇は認められず、*orc2-1*或いは*rad9*Δ単独変異株における発生頻度の相加的な値を示すに止まった(図IX-5-4B)。このことは*orc2-1*株ではRAD9遺伝子の機能の有無が染色体異常の誘発に影響しないことを意味している。すなわち、RAD9遺伝子が染色体異常の誘発を抑制しているのではなく、そもそもOrc2pの機能欠損が染色体異常を引き起こす性質のものではないことが推測される。

第四節 *orc2-1*変異株におけるチェックポイント制御機構の関与-2

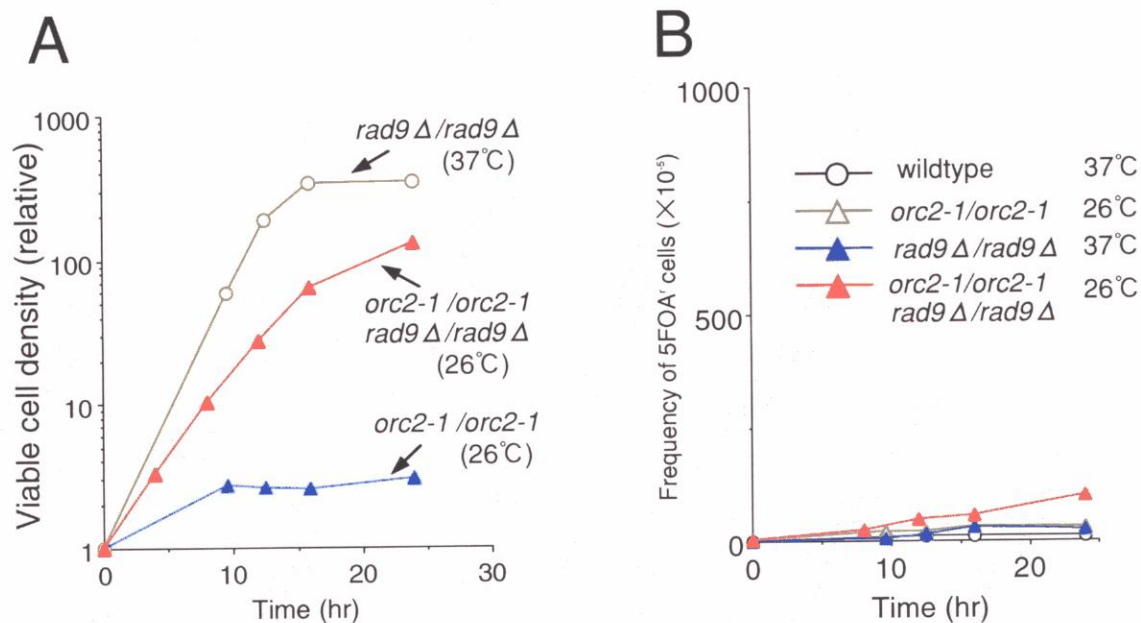
前節までの解析から、26℃条件下におけるOrc2pの機能欠損はそれ自身が必ずしも致命的なものではなく、また染色体異常の誘発にも関係しないという結論が導き出された。このことから考えるとOrc2pの機能欠損は一見無害のようにも思えるが、変異株において通常と異なる事象(少なくともRad9pにシグナルとして認識される事象)が生じていることは確かである。また、培養温度の違いによってOrc2p欠損のDNA複製に対する影響が異なる可能性が示唆されている為、より高温の条件下で*orc2-1*変異が染色体異常の引き金となる潜在力を有する可能性は否定できない。更に*orc2-1*変異のこうした変化に伴いチェックポイント機構の対処の仕方にも変化が現れることが予想される。すなわち26℃条件下での*orc2-1*株の生育阻害(横這いの状態)はRAD9遺伝子の欠損により解消されることが示されたが、高温域で見られるより深刻な細胞死に関しても果たしてRAD9遺伝子の欠損がそれを緩和し得るのかどうかということは不明である。これらの問題を検証する為に、26℃以外の様々な条件下においても*orc2-1 rad9*Δ二重変異株の解析を試みた。

まず*orc2-1*株の場合と同様に28℃から37℃までの間で5点培養温度を設定して細胞の生育状況を調べた(図IX-5-6A)。*orc2-1*株が明らかな生菌数の減少を示した28℃条件下においても*orc2-1 rad9*Δ株では増殖阻害の強い回復が観察された。これに対して、培養温度が30℃を超える場合には*orc2-1 rad9*Δ株においても徐々に生育が悪化する傾向が見られ、34℃を過ぎたところから生菌数の減少が起り始めた。このことから、高温域において*orc2-1*変異がもたらす細胞の死滅はRAD9遺伝子の欠損によって



図IX-5-3 *orc2-1 rad9Δ*二重変異株の26°Cにおける細胞周期進行

23°Cで非同調培養した*orc2-1 rad9Δ*二重変異株を26°Cに移し、任意の時点において培養液の一部をサンプリングしてFACS解析に供した。図中2C及び4CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。



図IX-5-4 *orc2-1 rad9Δ*二重変異株の26°Cでの細胞増殖と染色体異常

A *orc2-1 rad9Δ*二重変異株の26°Cにおける生育曲線

*orc2-1 rad9Δ*二重変異株の26°Cにおける細胞増殖の様子を図に示す。比較の意味で*rad9Δ*単独変異株(37°C)及び*orc2-1*単独変異株(26°C)の細胞増殖の様子も併記する。

B *orc2-1 rad9Δ*二重変異株の26°Cにおける5FOA耐性細胞出現頻度

様々な温度下で24時間培養した場合の*orc2-1*変異株における5FOA耐性細胞の出現頻度を測定した。出現頻度の測定は4実験区において行っており、それらの平均値から図の値を求めた。比較の意味で野生株(37°C)、*rad9Δ*変異株(37°C)、*orc2-1*変異株(26°C)の値も併記する。

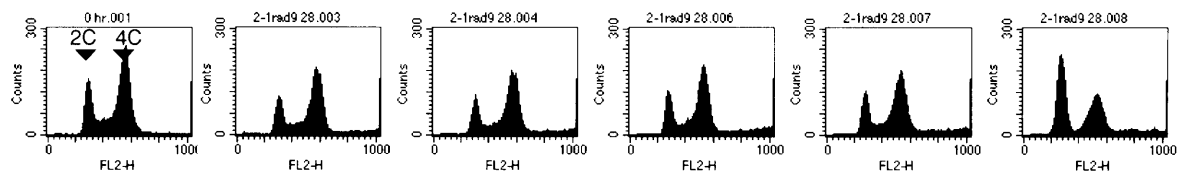
完全には打ち消されないことが明らかとなった。しかしながら図IX-5-6Bに示すように、何れの温度下においても温度シフト後24時間の時点で *orc2-1 rad9*Δ 二重変異株の生存比は *orc2-1* 単独変異株の生存比を二桁(約100倍)程度上回っている為、高温条件下においてもこれまでのような *RAD9* 遺伝子破壊の効果が部分的には存在しているものと結論できる。

また、28℃以上の各温度下における *orc2-1 rad9*Δ 株の細胞周期進行の状況もあわせて観察した(図IX-5-5)。先の結果で生菌数が増加していた条件下(28℃、30℃、32℃)では *RAD9* 遺伝子の破壊により G2/M arrest が起こらなくなるという FACS パターンが得られた。これに対して生菌数の減少が確認された34℃、37℃条件下においては、*RAD9* 遺伝子の欠損にも関わらず細胞周期が G2/M 期で停止するという FACS パターンが得られた。この結果により、*orc2-1 rad9*Δ 株においては34℃以上の条件下で *RAD9* 遺伝子に依存しないチェックポイント機構が関与する可能性が推測される。細胞の生育との関連から考えると、この未知のチェックポイントの存在が高温域における *orc2-1 rad9*Δ 株の細胞死に影響しているのかも知れない。*orc2-1* 変異の影響は培養温度の上昇に連れて複雑化し、Rad9p以外の経路によってもチェックポイント機構を活性化する様になるのではないかと考えられる。

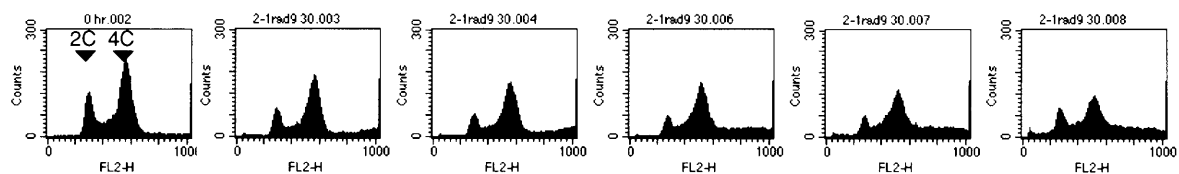
一方、染色体異常の発生頻度に関しては30℃及び32℃において新たに解析を行ったが、26℃の場合と同じく *orc2-1* 変異株と比較して大幅な上昇は認められなかった(図IX-5-7)。

ここで前章までの結果も含め、*orc2-1* 株や *orc2-1 rad9*Δ 株で見られた表現型を表IX-5-2にまとめた。これら全体を見渡した時には、*orc1* 変異株と *orc2* 変異株の場合をあわせて何か統合的なモデルを考えるというよりは、両者を別個のケースとして扱うのが妥当であるように思われる。Orc1pとOrc2pの機能欠損の比較という点から考えると、両変異株における異常はともに *RAD9* 遺伝子産物にシグナルとして認識され、チェックポイント機構の活性化を引き起こしていた。しかし、この様な共通性にもかかわらず、Orc1pの異常が染色体異常を引き起こす潜在力を有しているのに対してOrc2pの異常にはこの様な潜在力は認められないという相違があった。

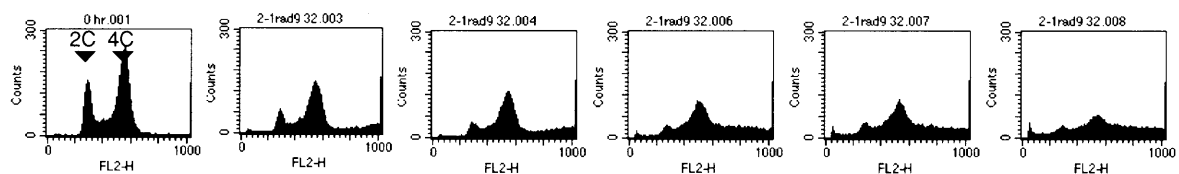
また、チェックポイント機構の役割という点から考えると、*orc1-3* 株や *orc1-4* 株では *RAD9* 遺伝子依存的に細胞死がもたらされたが、*RAD9* 遺伝子を破壊した場合に染色体異常の著しい誘発が見られたことから、これらの変異株においては、チェックポイント機構が細胞の生存に対してというよりはむしろ、ゲノムの安定性に対して大きく寄与しているといえる。一方、*orc2-1* 株においても *RAD9* 遺伝子依存的な生存比の低下が見られたが、この場合には *RAD9* 遺伝子の破壊によっても染色体異常の誘発は起こらなかったことから、チェックポイント機構は細胞の生存やゲノムの安定性以外にも意味があるのかも知れない。



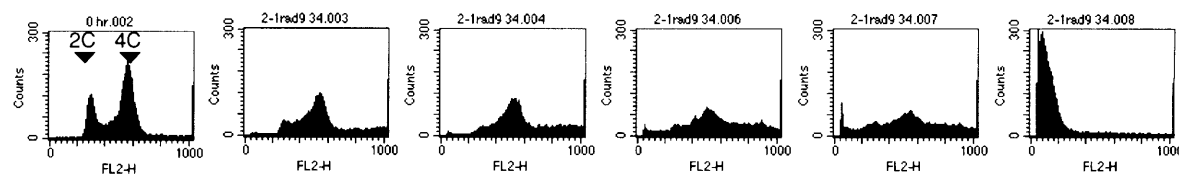
orc2-1/orc2-1 rad9Δ/rad9Δ at 30°C



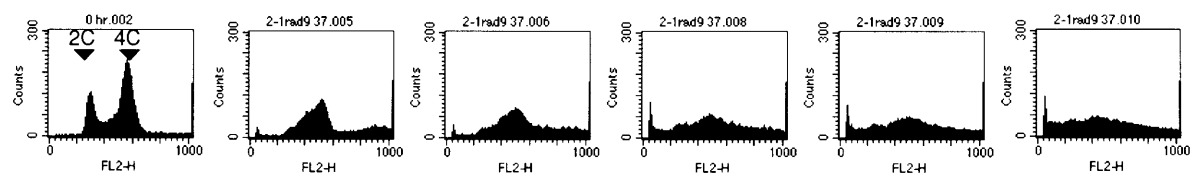
orc2-1/orc2-1 rad9Δ/rad9Δ at 32°C



orc2-1/orc2-1 rad9Δ/rad9Δ at 34°C



orc2-1/orc2-1 rad9Δ/rad9Δ at 37°C

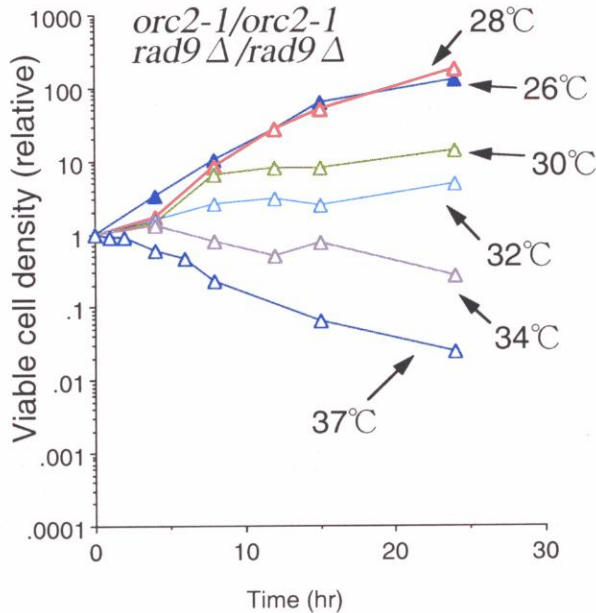


[0 hr] [6 hr] [8 hr] [12 hr] [16 hr] [24 hr]

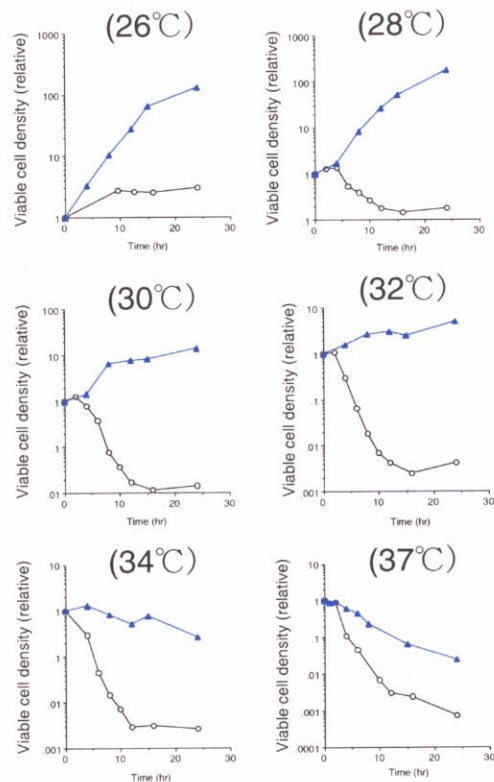
図IX-5-5 高温条件下における *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の細胞周期進行

23°Cで非同調培養した*orc2-1 rad9Δ*二重変異株を様々な温度に移し、任意の時点において培養液の一部をサンプリングしてFACS解析に供した。図中2C及び4CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。

A



B



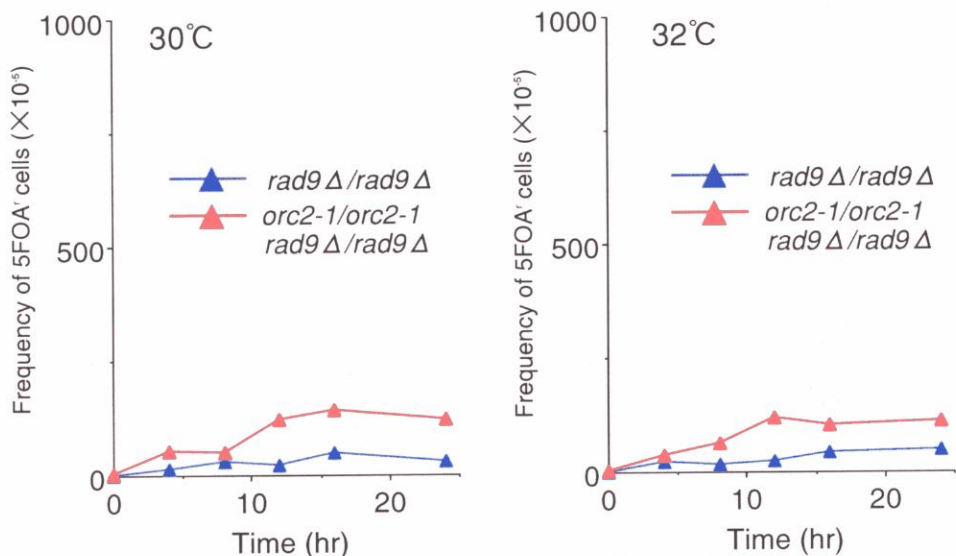
図IX-5-6 高温条件下における *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の細胞増殖

A 高温条件下における *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の生育曲線

28°Cから37°Cまでの各温度下における *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の細胞増殖の様子を図に示す。

B *orc2-1*変異株と *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の細胞増殖能の比較

26°Cから37°Cまでの各温度下において *orc2-1*変異株と *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の細胞増殖能を比較した結果を示す。図で—○—が *orc2-1*変異株、—▲—が *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株を示す。



図IX-5-7 *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の高温条件下での染色体異常

30°C及び32°Cにおける *orc2-1 rad9Δ* 二重変異株の5FOA耐性細胞の出現頻度を測定した。測定は4実験区において行い、それらの平均値を求めた。比較の為に同条件下の *orc2-1*変異株の値も示す。

表IX-5-2 *orc1*変異株及び*orc2-1*変異株における表現型のまとめ

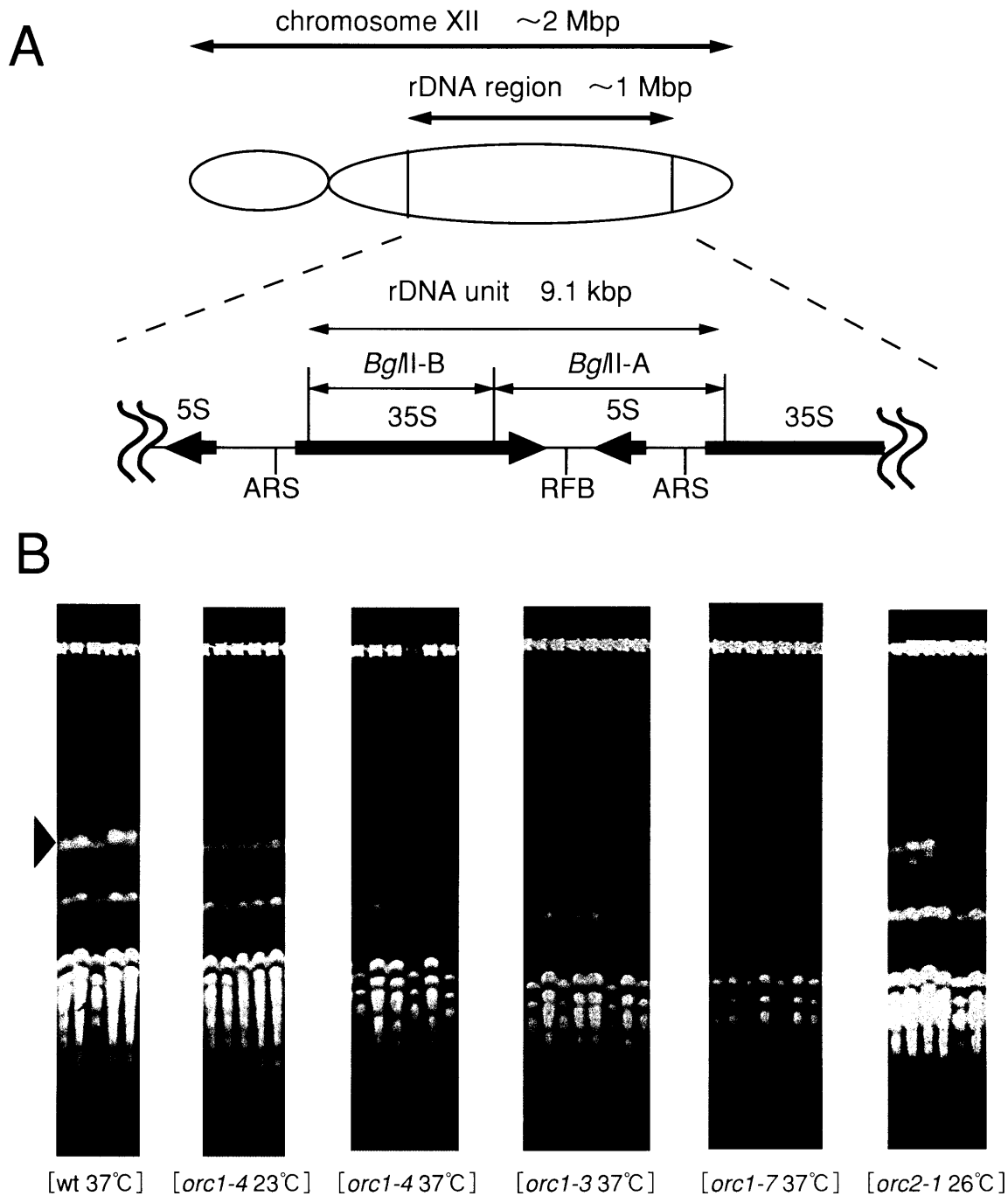
	temp. (°C)	G2/M arrest	abrogation of G2/M arrest	loss of cell viability	induction of LOH events
<i>orc1-3 / orc1-3</i>	37°C	yes	yes	yes*	yes*
<i>orc1-4 / orc1-4</i>	37°C	yes	yes	yes*	yes*
<i>orc1-4 / orc1-4 rad9 Δ/rad9 Δ</i>	37°C	no	—	no	yes
<i>orc1-7 / orc1-7</i>	37°C	no	—	no	yes
<i>orc2-1 / orc2-1</i>	26°C	yes	no	yes	no
<i>orc2-1 / orc2-1 rad9 Δ/rad9 Δ</i>	26°C	no	—	no	no

* after abrogation of G2/M arrest

第六章 *orc*変異株において見られるrDNA領域の構造変化

これまでの解析から *orc1* 変異株では非許容温度下で第III染色体における染色体異常の発生頻度が大幅に上昇することが明らかとなった。解析の指標となる *URA3* マーカーは第III染色体の右腕中央付近に位置するが、この領域の染色体構造に他の領域と比べて特殊性は認められず、従って、第III染色体上で見られたORC機能欠損の効果は他染色体上でも同様に起こり得るものと推測される。すなわち体細胞分裂中の細胞において通常の染色体が安定に複製・維持される為に正常なORC(Orc1p)の機能が一般的に重要であるということがいえるが、これに対してORCの機能がその他の特殊な染色体構造の安定性にも寄与し得るかどうかは今のところ明らかでない。出芽酵母のゲノム中には幾つかな特徴的な領域が存在するが、その一例として本研究ではrDNA領域の特殊性に着目した。出芽酵母のrDNA領域は第XII染色体上に存在しており、9.1kbpのユニットが100~200コピー繰り返し並ぶ構造を形成している(Petes, 1979)。また各rDNAユニット内にoriginが存在する為、領域全体で100~200のoriginが密集していることになるが、この領域内では転写複合体との衝突を避ける為にDNA複製の方向が厳密に制御されることが知られている(図IX-6-1A; Brewer et al., 1992, Kobayashi et al., 1992)。こうした特殊性から、この領域でのDNA複製に異常が生じた場合には、複製と転写のアンカップリングから複製フォークと転写複合体の衝突が引き起こされ、修復のために組み換えが頻発する結果としてrDNAリピートのコピー数が様々に変化することが予想される。そこで本章ではこれまでに解析した全ての *orc* 変異株においてORCの機能欠損がrDNA領域の構造に影響を及ぼすかどうかを検証した。

非許容温度下で24時間処理した各 *orc* 変異株の生残細胞をクローニングし、それらの第XII染色体の状況をPFGE及びrDNAユニット内の配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより解析した。図IX-6-1Bに示す通り、*orc1-4* 株においては高温処理に依存してクローン毎に第XII染色体の著しいサイズ変化が生じていた。同様の現象は *orc1-3* 株や、更に、第III染色体における染色体異常の誘発を示さなかった *orc2-1* 株においても37℃或いは26℃条件下で各々認められた。一方、*orc1-7* 株ではクローン毎に異なるというようなサイズ変化は見られなかったが、それに代わって第XII染色体が均一に短縮していることが確認された。これらrDNA領域の異常は極めて高頻度に起こっており、解析したほぼ全ての *orc* 変異株の生残菌のクローンにおいて上記の異常が観察された。この他、サイズ変化の傾向としては、全てのサンプルが通常のrDNAサイズよりも小さくなっており、今回の解析からは通常のサイズを上回る例は検出されなかった。



図IX-6-1 *orc*変異株におけるrDNA領域の解析

A rDNA領域の構造

rDNA領域は第XII染色体に存在し、9.1 kbpのユニット(*BglII-A* + *BglII-B*)が繰り返し並んでおり、FY株においてはこの構造が全長約1 Mbpに達している(株の系統によってコピー数は多少異なる)。rDNAユニット内には複製起点(ARS:autonomous replicating sequence)が存在するが、図中右から左方向への複製フォークの進行はRFB(replication fork barrier)を通過する際に阻害される。RFBは左から右方向への複製フォークの進行は阻害せず、これによって35S rRNAの転写方向が常に複製の方向と一致することが保証されている。

B *orc*変異株におけるrDNA領域の異常

各*orc*変異株の24時間培養後の生残菌クローンの染色体をPFGEにより解析した。図中rDNA領域が存在する第XII染色体の通常サイズを▼で示した。

以上の結果から解析した *orc* 変異株における ORC の機能欠損はいずれも rDNA 領域の不安定化を引き起こすということが結論できる。特に *orc2-1* 変異株では第 III 染色体における染色体異常の発生頻度に変化が見られなかったが、少なくとも rDNA 領域のような特殊な染色体構造に対しては *orc2-1* 変異が影響を及ぼし得ることが明らかとなった。*orc2-1* 変異株においてこれまで RAD9 経路がどのような異常をシグナルとして認識しているのか不明であったが、本章での解析から、この問題に rDNA 領域の異常が関与している可能性が考えられる。

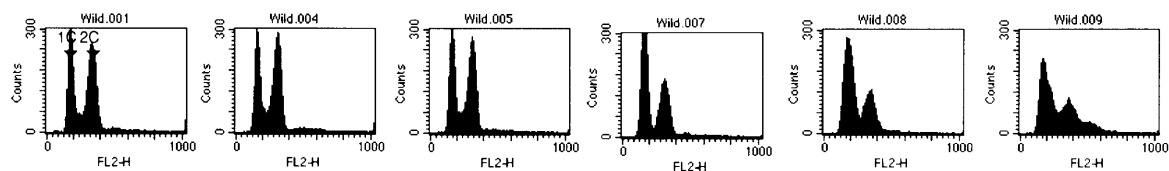
第七章 *orc* 一倍体細胞における細胞増殖異常とチェックポイント機構の関与

本研究では ORC 機能欠損の染色体異常誘発への影響を考えるという実験の性質上、一連の解析を全て二倍体細胞を用いて行ってきた。二倍体細胞における *URA3* マーカーを指標とした染色体異常の発生頻度は野生株でおよそ 10^4 のオーダーであるが、これと同様の実験を一倍体細胞に対して行った場合にはその発生頻度が 10^7 のオーダーにまで低下する為、一倍体を用いて染色体異常の解析を定量的に行うことは非常に困難となる。しかしながら FACS 法による細胞周期の進行状況の解析や生菌数の測定に関しては一倍体細胞においてもこれまでと同様に行うことが可能である。そこで本章では、3 種類の *orc1* 変異 (*orc1-3*, *orc1-4*, *orc1-7*) と *orc2-1* 変異並びに 4 種類の *rad9* Δ 変異 (*rad9* Δ , *orc1-3 rad9* Δ , *orc1-4 rad9* Δ , *orc2-1 rad9* Δ) の細胞周期進行及び生菌数の解析を一倍体細胞を用いて行うことにした。

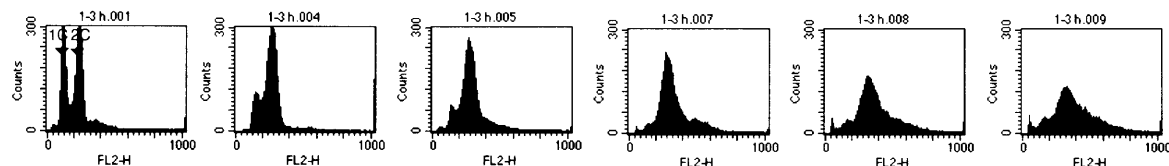
まず最初に非許容温度下における細胞周期進行の状況を観察した。その結果は図 IX-7-1 に示す通りであるが、*orc1-3* 株や *orc1-4* 株においては二倍体細胞と同様のタイミングで G2/M arrest が引き起こされるものの、12 時間日以降に G2/M arrest の崩壊を示す兆候が現れない(兆候が弱い)という相違が見られた。この結果から *orc1-3*, *orc1-4* 一倍体細胞において生じる G2/M arrest は、二倍体細胞における場合とは異なり比較的安定に保持されるのではないかと推測される。一方、野生株や *orc1-7* 株、*rad9* Δ 株においては FACS パターンに二倍体と異なる傾向は見受けられなかった(図 IX-7-1、図 IX-7-2)。また *orc1-3 rad9* Δ , *orc1-4 rad9* Δ , *orc2-1 rad9* Δ においてはいずれも G2/M arrest が起こらなくなっており、一倍体細胞においてもこれらの ORC 機能欠損が引き起こすチェックポイント機構の活性化が RAD9 経路依存的であることが確認された。

次にこれら一倍体細胞の生菌数を測定し、*orc* アリル毎に RAD9 遺伝子欠損の有無を比較する形でまとめた結果を図 IX-7-3 に示した。対照とする意味で二倍体細胞

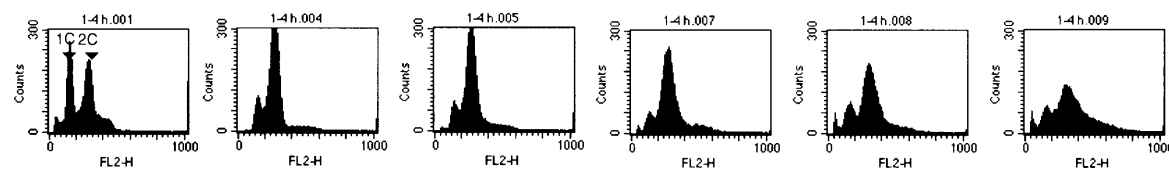
wildtype at 37°C



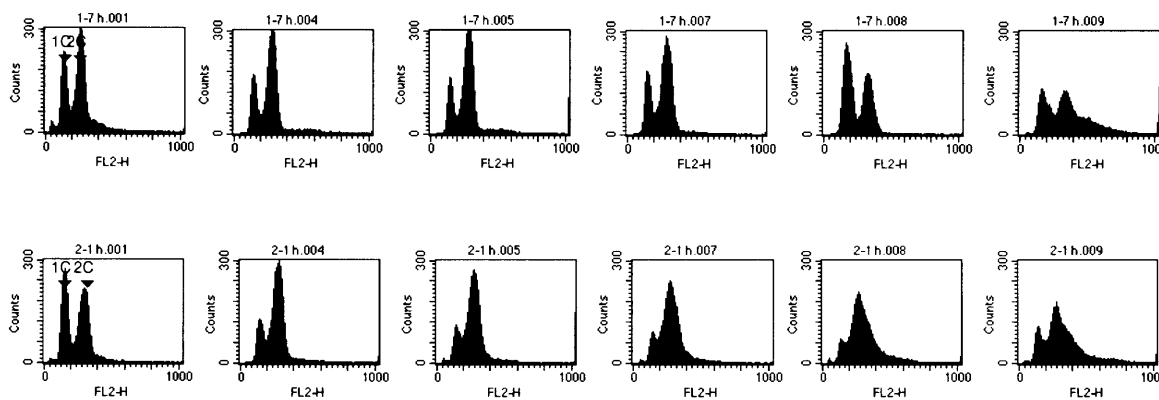
orc1-3 at 37°C



orc1-4 at 37°C

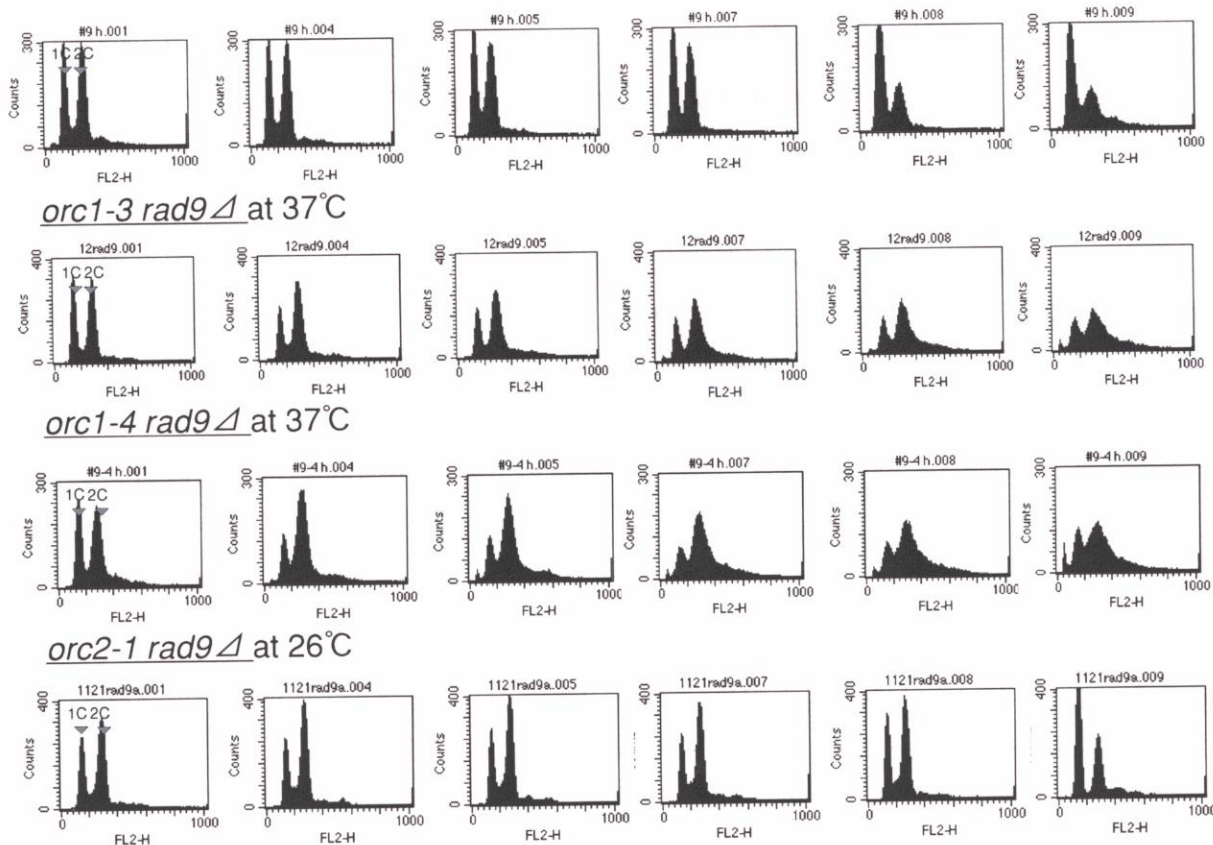


orc1-7 at 37°C



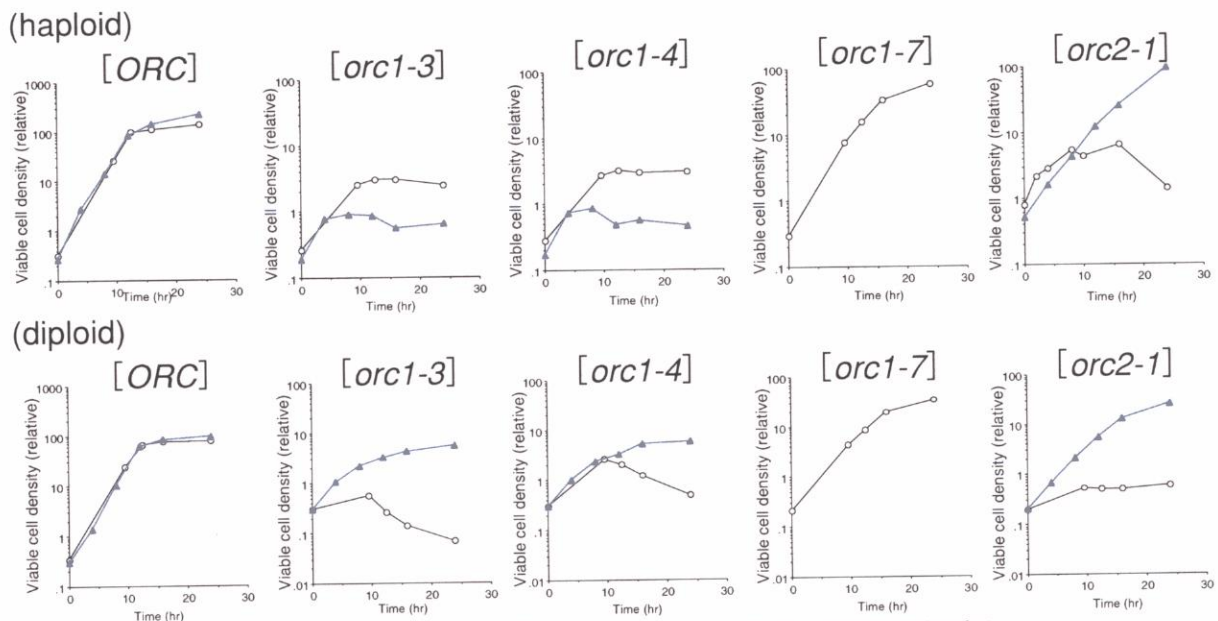
図IX-7-1 一倍体*orc*変異株における細胞周期進行の解析-1

23°Cで非同調培養した一倍体*orc*変異株及び野生株を26°C(*orc2-1*)或いは37°C(それ以外)に移し、温度シフト後の各時点において培養液の一部をサンプリングしてFACS解析に供した。図中1C及び2CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。



図IX-7-2 一倍体orc変異株における細胞周期進行の解析-2

23°Cで非同調培養した一倍体rad9Δ変異株及びorc rad9Δ二重変異株を26°C(*orc2-1 rad9Δ*)
 或いは37°C(それ以外)に移し、温度シフト後の各時点において培養液の一部をサンプリング
 してFACS解析に供した。図中1C及び2CのDNA含量をもつ細胞の位置を▼で示した。



図IX-7-3 一倍体orc変異株における細胞増殖の解析

26°C(*orc2-1*)或いは37°C(それ以外)条件下での一倍体orc変異株の生育曲線を求めた。図では各
 orc変異についてRAD9とrad9Δを対比させる形でまとめた。図中○がRAD9であり、▲が
 rad9Δである。また、比較の意味で二倍体細胞における結果も併記する。

における結果も同様にまとめた。先に述べた通り *orc1-3*、*orc1-4* 二倍体細胞では *RAD9* 遺伝子の破壊によって致死性が解消されるという結果を得ているが、これに対して *orc1-3* 或いは *orc1-4* 一倍体細胞においては、*RAD9* 遺伝子の欠損により更に重度の生存比低下が引き起こされる結果となった。一方 *orc2-1* 変異に関しては、*RAD9* 遺伝子破壊の効果に一倍体細胞と二倍体細胞の間で相違は見られなかった。このような相違が何故生じるのかについては、染色体異常の問題が関係すると思われる。二倍体細胞において *RAD9* 遺伝子の破壊は *Orc1p* の機能欠損による染色体異常を亢進していたが、一倍体においても同様の現象が起こった場合、染色体喪失や欠失といった異常によって細胞は生育に必須な遺伝子を容易に失うことになるので、染色体異常が亢進されることは細胞死の増加に直結する。すなわち、二倍体細胞では各々の染色体が二本ずつ存在する為に染色体異常の発生が細胞の死に直接的には結びつかず、生存を維持する余地が存在したが、一倍体細胞では各々の染色体が一本ずつしか存在しない為に染色体異常の発生が直接細胞の死につながる。こうした必須遺伝子の欠損を補い得る余剰の染色体セットの存在の有無が、*RAD9* 遺伝子の欠損による生存への影響として現れるのではないかと推測される。また *orc2-1* 変異株においてはそもそも染色体異常が誘発されない為、一倍体と二倍体との間で *RAD9* 遺伝子欠損の効果に相違が現れないものと考えられる。

第八章 *orc1-4* 生残菌における細胞周期進行および細胞増殖能の解析

第二章で見たように *orc1-4* 細胞を 37°C で処理すると、温度シフトから 10-12 時間目近辺を境に G2/M 期で停止していた細胞周期が再び動き出すという arrest の崩壊が観察され、その後 24 時間目までに生菌数は 10-20% 程度に低下していた。この時点で生き残った細胞において染色体の異数化が高頻度で生じていたことは前述の通りであるが、これら生残菌がその他にどのような性質を示すのかは重要な問題といえる。特に、G2/M arrest の崩壊を乗り越えて生き残った細胞において ORC 機能欠損の認識やチェックポイント制御がこれまで通りになされているのかは興味深い点である。また G2/M arrest の崩壊がどのようなメカニズムで起こるのか、或いは G2/M arrest 崩壊の現象にどのような生物学的意義があるのかについて本研究では明らかではないが、これらの疑問を考える上でも *orc1-4* 生残菌から得られる情報は有用であろうと思われた。こうした意図から、本章では *orc1-4* 生残菌において細胞周期進行や細胞増殖にどのような変化が生じているのかということの検証を行った。

実験の概要は図 IX-8-1A に示す通りであり、一倍体 *orc1-4* 株の接合により作製した *orc1-4* 二倍体細胞のシングルコロニー(ここでは StC と呼ぶことにする)を 23°C 条件下

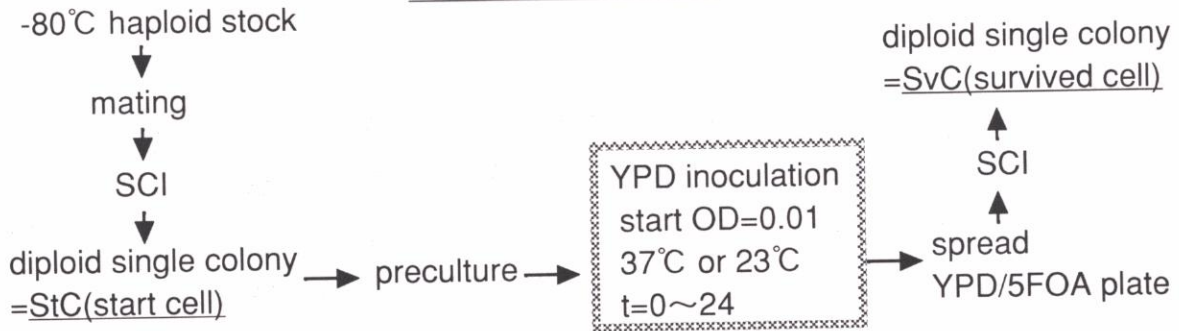
で前培養し、この一部をYPD培養液に接種して37℃条件下で24時間処理後(本培養)、培養液をYPDプレートに塗布し、23℃条件下でプレート上に形成されたコロニーをクローン化した(これをSvCと呼ぶ)。このSvCを再度前培養から本培養の操作に供し、二度目となる37℃処理の際に細胞周期進行に異常が生じているのかどうかを観察した。独立に得た6つの生残菌クローン(SvC①-⑥)に対して解析を行ったところ、図IX-8-1Bに示す様にそのいずれもがStCとは異なるFACSパターンを示していた。その内の一つ(SvC-②)においては4C以上の位置にも新たにピークが出現しており、DNAの過剰複製、もしくは複製と細胞分裂のアンカップリングが起こっているものと推測された。また、それ以外のクローンにおいてもStCのような明らかなG2/M期での細胞周期の停止は見られず、ORC機能欠損自身、或いはそれに感応するチェックポイント制御機構のいずれかの反応過程が変容しているのではないかと推測された。

更にこれらSvCの非許容温度下での細胞の生存について調べたところ、程度の差はあるものの解析した6つのクローン全てにおいて生育障害が緩和されており、StCで見られた生菌数の減少が引き起こされなくなるのが明らかとなった(図IX-8-1C)。SvC④と⑤では温度シフト後10時間以降は細胞数はほぼ一定であり、FACS解析でもG2期の細胞の割合が他のクローンに比べて大きいことと一致する。一方、それ以外のクローンでは温度シフト後も増殖速度は若干低下するものの生菌数は対数的に増加し続けていた。

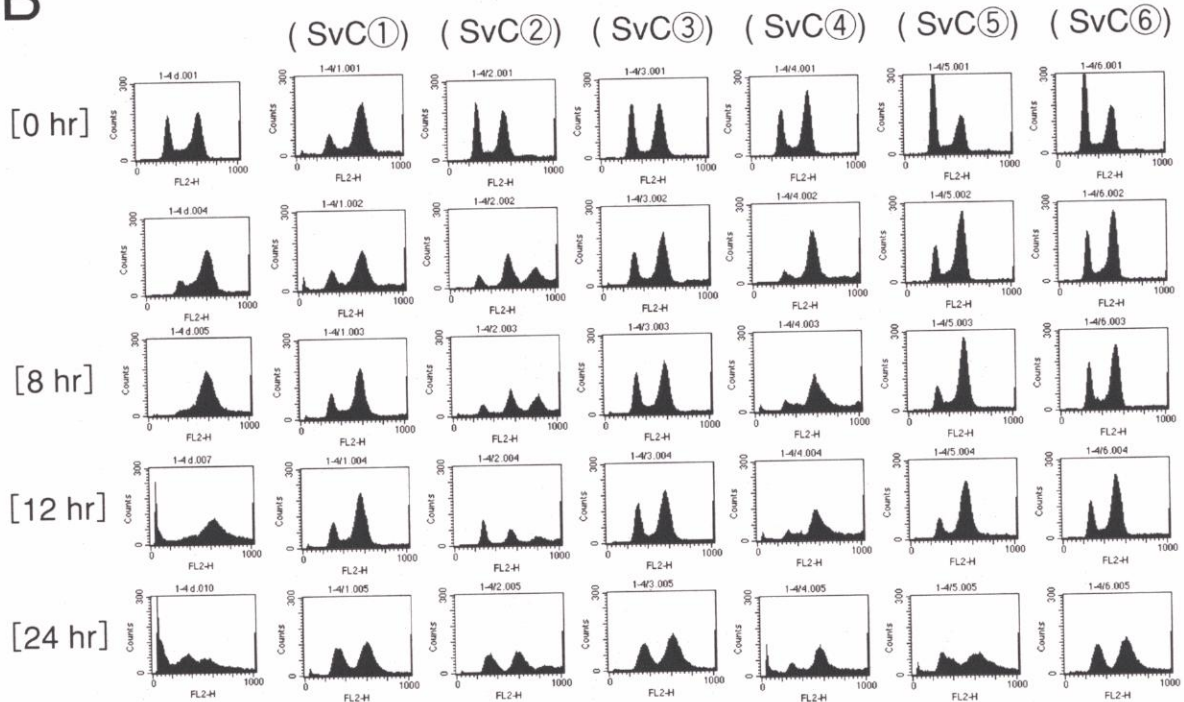
以上の結果をまとめると、*orc1-4*変異株において一度G2/M arrest後に死を免れた細胞は、その後の高温処理に対して細胞周期の停止や細胞死を引き起こさなくなると結論できる。言い換えると、SvCにおいてはチェックポイント制御に何らかの異常が生じるにも関わらず、このことが細胞の生存に対して必ずしもマイナスには働かないという事を意味する。*orc1-4*生残菌におけるチェックポイント異常が特定の遺伝子に関する復帰変異によるものではないかという可能性も考えられるが、解析に用いているのが二倍体であること(通常 of 劣性変異であれば表現型として表れるまでに2ヒット必要)及び解析した全てのサンプル(6/6)において見られたことから、今回観察された現象を復帰変異により説明することは確率的に困難である。

A

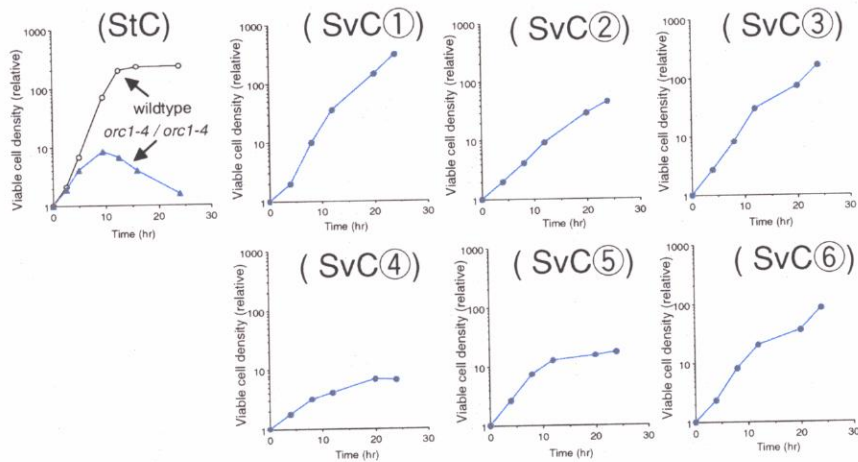
実験の基本スキーム



B



C



図IX-8-1 *orc1-4*生残菌における細胞周期進行及び細胞増殖能の解析

A 実験のフローチャート B *orc1-4*生残菌のFACS解析 C *orc1-4*生残菌の生育曲線
 詳細は本文参照

X 考察

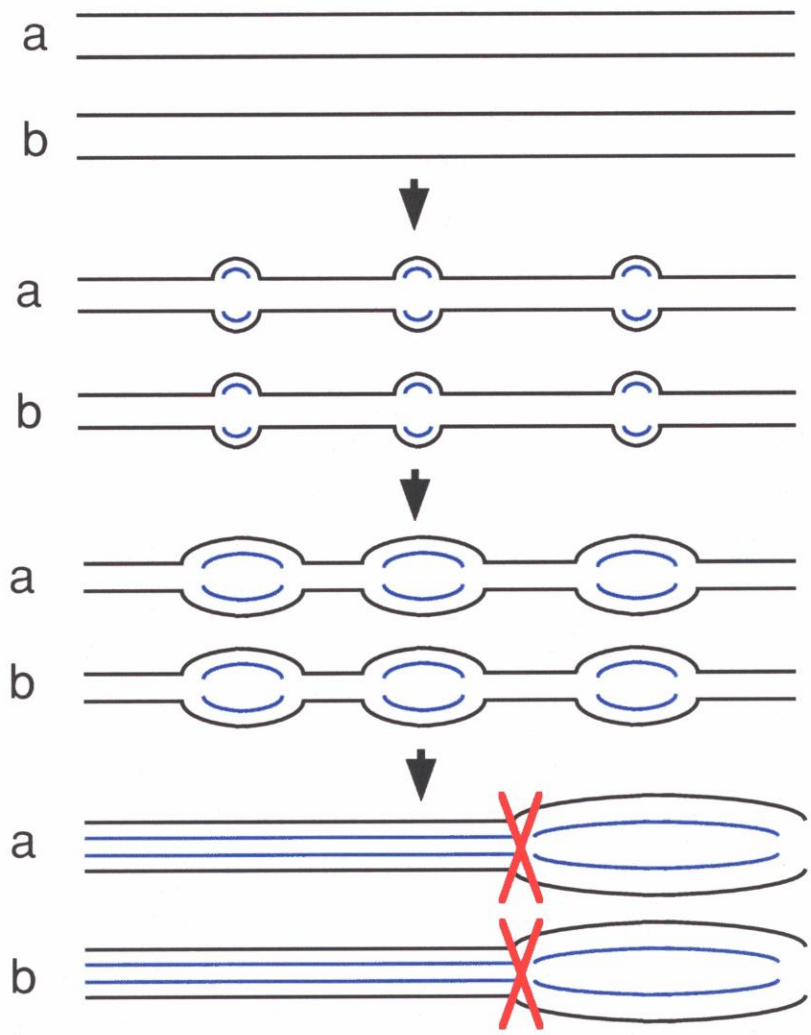
第一節 複製開始制御と染色体不安定性の関係について

本研究では体細胞分裂中の出芽酵母において生じる染色体異常の発生原因について探ることが当初の目的であった。この目的に鑑みると、ORCの機能欠損が実際に様々な染色体異常を引き起こし得るという今回の解析結果は、内在的に生じる染色体異常の少なくとも一部がS期複製開始制御の異常をその引き金としている可能性を示唆している。今回の解析結果は温度感受性変異株におけるものであるが、生物物理学的な観点からすれば、どの様な機能蛋白質であっても低頻度ではあるが固有の確率で「間違い」を起こすと考えられているので(内在性エラー説)、野生株においても内在的に生じる染色体異常の一部がORC(或いはその他の複製開始制御因子)の持つ内在性エラーに起因することが考えられる。複製開始制御と染色体不安定性との関係に関しては、出芽酵母MCMの機能欠損によってミニ染色体の保持率が低下すること(Yan and Tye, 1993)や*cdc6-1*変異株において染色体喪失の発生頻度が上昇すること(Bruschi et al., 1995)、或いは分裂酵母MCM変異株において体細胞期の組換え頻度が上昇すること(Liang et al., 1999)などがこれまでに報告されているが、染色体異常を欠失や転座、交叉や遺伝子変換、染色体喪失などの形に詳細に分類して解析を行ったのは本研究が初めてである。本研究では*orc1-4*株を非許容温度下で培養した場合に、染色体内欠失や染色体間組換えといった異所性組換え型の染色体異常や染色体喪失が誘発されていたのに対し、遺伝子変換や交叉といった相同アリル間組換え型の染色体異常に関しては発生頻度に顕著な上昇が認められなかった(第二章)。こうした染色体異常の形成について少し考えてみると、まず染色体喪失に関しては、解析を行った時点においてG2/M arrestの状態に異常が生じており、細胞周期の停止状態が何らかの要因で維持できなくなっていると思われることから、ORCの機能欠損によって染色体の一部もしくは全部が倍加しないまま細胞分裂を行うことなどが原因の一つとして考えられる。また染色体内欠失や染色体間組換えといった染色体異常の発生頻度が上昇していたことから、細胞内に組換えを起こし易い状況、或いは組換えの基質となるDNA構造が数多く生み出されていることが予想される(後述)。しかしながら遺伝子変換や交叉といった染色体異常の発生頻度がそれ程上昇していないという解析結果は、*orc1-4*株においては異所性組換えの方が相同アリル間組換えに比べて好まれる傾向にあることを示唆している。これは細胞が組換えを行う際に、相同染色体の方が異所性の領域より組換えの相手として選択され易いという通常の組換えの配向性(preference)に反しており(reviewed by Haber, 2000)、*orc1-4*株においては異所性組換えが起り易いか、もしくは相同アリル間の組換えが遂行され難

い特殊な事情が存在することが予想される。これを説明する一つの仮説として、ここでは相同染色体間における染色体複製の同時性の問題を考えた(図X-1)。二倍体細胞における複製の際に相同染色体同士がどのような関係にあるのかはこれまでのところ明らかでないが、仮に相同染色体間での染色体複製が同調的に開始されたとすると、ORCの機能欠損の影響下、クロマチンの構造上の問題などにより一方の相同染色体上で複製の異常に伴うDNA障害が生じた際には、もう一方の相同染色体においても同じ理由で同じ場所に障害が生じている危険性が高いことが想像される。組換え修復という概念は通常あるDNA鎖(donor)に生じた障害を別の無傷のDNA鎖(recipient)を鋳型として修復するというものであるが、上述の様に相同染色体の相同領域に同時に異常が生じている場合には相同染色体アレル上の配列を利用して障害を修復することが不可能になる。こうした状況に陥った場合に、複製が未だ完了していない、或いは既に完了した異所性の領域が組換えの相手として選択される必要性が生じるのではないかと推測される。また *orc1-4 rad9* Δ 二重変異株ではアレル間組換え型の変異(主に交叉)に関しても十数倍程度の頻度上昇が見られたことから(第三章)、*orc1-4*変異自体にはこのタイプの染色体異常を引き起こす潜在性も備わっていると考えられる。それにもかかわらず実際の染色体異常の発生頻度に前述の様な偏り(配向性)が現れる背景には、ここにもRad9pの機能が何らかの形で関与している可能性が想像される。

第二節 *orc1*及び*orc2-1*変異株が示す表現型の比較

今回解析した*orc1*変異株及び*orc2-1*変異株においては何れもチェックポイント機構の活性化により細胞周期停止や生菌数の減少がもたらされていたが、前者ではOrc1pの機能欠損が染色体異常の誘発を引き起こしていたのに対し、後者ではOrc2pの機能欠損が染色体異常の誘発にはつながらないという相違が見られた。Orc2pの機能欠損の問題に関しては解析を行ったのが単一の変異アレルのみである為、他の*orc2*アレルを解析した場合にこれまでの*orc1*アレルと同様に染色体異常の誘発が現れることも考えられる。しかしながら本研究では*orc2-1*株の解析を様々な温度条件下で行っており、培養温度の変化に伴いarrestが引き起こされる細胞周期上の位置や生菌数減少の程度に様々な変化が観察されたが、依然として染色体異常の発生頻度は低いままであった。このことからするとOrc2pの機能欠損が一般的に染色体異常につながり得ない可能性も十分に考えられる。すなわち*orc1*変異株と*orc2-1*変異株における表現型上の対比は解析を行った変異型アレルの特殊性に起因するのではなく、両変異株におけるORC機能欠損の質的な相違、さらに言えばOrc1pとOrc2pとが持つ機能的な相違を反映していることが考えられるのではないだろうか。



図X-1 相同染色体間におけるDNA複製の同時性の仮説

相同染色体間(a, b)での染色体複製がある程度同調的に行われていると仮定すると、ORCの機能欠損の影響下で、クロマチンの構造上の問題などにより一方の相同染色体上で複製フォークの進行阻害が生じた場合には、もう一方の相同染色体においても同じ場所で同時に障害が生じている危険性が高いことが想像される。この場合には相同染色体アレル間の組換えを利用して障害を修復することが不可能になる。

序論にも記したようにORCの各サブユニットをコードする遺伝子は進化を通じて高度に保存されているが、近年の研究によると高等真核生物のOrc1サブユニットとOrc2サブユニットの間には幾つかの点で互いに異なる性質も見出されている。その一例としてショウジョウバエやハムスター、ヒトなどにおいて、Orc2pは細胞周期を通じて常にクロマチンに安定に結合しているが、Orc1pはM期からG1期の間クロマチン上に存在していないか、或いはクロマチンへの結合が非常に不安定となることが知られている(Pak et al., 1997; Ritzi et al., 1998; Yu et al., 1998; Natale et al., 2000)。またショウジョウバエやハムスターのOrc2p存在量は細胞周期を通じて比較的一定に保たれるのに対し、(クロマチン結合型の)Orc1pの存在量は細胞周期によって大きく異なり、DNA複製開始の能力がこのOrc1pの存在量に依存することが示唆されている(Asano and wharton, 1999; Natale et al., 2000)。更にヒトではORC1の発現量が組織毎に異なっており、精巣や大腸粘膜など増殖の盛んな組織ではOrc1 mRNAレベルが高く、心臓や脳など通常増殖を行っていない組織ではOrc1 mRNAが検出不能である(ORC2の発現はこれら非増殖組織でも見られる)という報告例も存在する(Thome et al., 2000)。これに加えてショウジョウバエ及びヒトにおいてORC1の転写制御にE2Fが関与することも見出されている(Ohtani et al., 1996; Asano and Wharton, 1999)。E2FはG1期からS期への細胞周期進行を制御する転写調節因子であり、様々な増殖因子によるシグナルを受けたE2FはRB蛋白質から開離して活性化し、染色体上に存在するE2F結合サイトに結合して標的遺伝子の転写を促進させる(reviewed by Dyson, 1998)。このようにOrc1サブユニットがE2Fによる転写制御の標的となっていることは細胞増殖(DNA複製開始)の決定にOrc1pが重要であることを示している。これらの情報を総合すると、高等真核生物のOrc2pとOrc1pには挙動的にも機能的にも互いに異なる性質が存在し、前者はヒストン蛋白質のような(origin周辺)構造蛋白質的な側面が強いのに対し、後者は比較的移動度が高く、細胞内外の情報に応じて機能する調節因子的な側面が強いのではないかと解釈できる。出芽酵母においてはOrc1pとOrc2pは安定な複合体の一部として細胞周期を通じて常にクロマチンに結合していることが報告されており、上記のような挙動的な相違は認められていないが(Diffley et al., 1994; Liang and Stillman, 1997; Fujita et al., 1998)、それでも尚高等真核生物に類似した機能的相違が両サブユニットの間に存在する可能性は残っている。

第三節 RAD9遺伝子機能が細胞に及ぼす影響についての考察

本研究ではorc1-3、orc1-4変異株やorc2-1変異株において、Rad9pの有無が興味深い表現型の相違を生み出していた。そこでこれらのorc変異株が示すORC機能欠損の影響を、Rad9pが存在する場合としない場合との比較から考えてみることにする。既に述べたように二倍体のorc1-3、orc1-4、orc2-1株は何れもRad9p存在下においてG2/M

arrestや生存比の低下を引き起こしていたが、これに対してRad9p非存在下ではこのような細胞周期の停止は起こらず、細胞の致死性に関してもRad9pが存在する場合に比べて緩和されることが確認された。これらの結果は、ORCの機能欠損がもたらす異常に対して、チェックポイント機構の活性化に伴い細胞周期の停止が引き起こされる場合の方が細胞の生存に悪影響が現れるということの意味している。このことはチェックポイントコントロールに対して通常考えられている存在意義、すなわち細胞周期の停止によって障害を修復する時間を稼ぐと共に、障害を抱えた細胞が次の細胞周期に移行するのを防ぐことで細胞の生存を助ける、という通念に矛盾するように思われる(reviewed by Elledge, 1996)。仮にorc変異株においてRAD9経路が修復の時間を提供する為だけに存在しているならば、orc-rad9 Δ 二重変異株の生存がorc単独変異株の生存を上回ることは有り得ない。通常チェックポイントコントロールの存在意義として考えられている概念としては、もう一つ、ゲノム情報の維持ということがあるが、orc1-3株やorc1-4株においてRAD9遺伝子を破壊した場合に染色体異常が更に亢進していたことから、この機能に関しては本研究でもチェックポイント機構の役割が果たされていると言える。今回の解析で見られた一連の現象は、チェックポイント機構が担う二つの役割、すなわち細胞の生存とゲノム情報の維持という問題に関して、後者が前者に優先されることを意味しているのかも知れない。

このことと関連して、チェックポイント機構の活性化により細胞周期を停止させた細胞において障害が修復し切れない場合にはどのようなことが起こるのだろうかということも興味深い問題である。出芽酵母においては、DNA損傷を受けてG2/M期で停止していた細胞が一定時間の後に細胞周期の進行を再開するadaptationという現象がこれまでに知られている(Sandell and Zakian, 1993; Toczyski et al., 1995; Lee et al., 1998)。adaptationはRAD9遺伝子やRAD17遺伝子に依存的であり(rad9/rad17の場合にはそもそもG2/M arrestが起こらない)、adaptationにより細胞周期進行を再開した細胞は、損傷が未修復であるにも関わらずその後の細胞周期をarrest無しで進むことができるようになる(“truly adapted to the signal triggering arrest”)。単細胞生物においては細胞周期が永久に停止し続ける状態は細胞の死に等しいので、障害が細胞の修復限界を超える場合には、一か八かでも細胞周期を進行させて細胞分裂を行うことが有効な戦略となるのかも知れない。Hartwellら(Toczyski et al., 1995)によるadaptationの定義(1, DNA損傷などのシグナルにより細胞周期停止の状態が続くこと。2, その後細胞がarrestを乗り越えること。3, その際に細胞はシグナルを有したままであること。)は本研究におけるG2/M arrestの崩壊にも当てはまると思われるので、G2/M arrest崩壊のメカニズムを解析して行く上でこのようなadaptationとの共通性は非常に興味深い。

また一方で、ヒトなどの高等真核生物においては障害が細胞の修復限界を超える場合にアポトーシスが誘導され、DNAの断片化などの特徴的な過程を経て細胞が死

滅することが知られているが(Cl Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993)、出芽酵母にアポトーシス経路が存在するかどうかは現在までのところ明らかではない。単細胞生物においてアポトーシス経路が必要であるかどうかの議論は慎重に検討されるべきであるが、今回の解析で見られたRad9p依存的な致死性がチェックポイント機構に関連して細胞死が誘導された結果であるという可能性も考えられる。以前の研究例においても、生育に必須でないプラスミドDNA上に修復不可能な障害(DSBs)が導入された場合にRad9p依存的な生存の悪化をもたらされることが報告されている(Bennett et al., 1993)。仮にこうした細胞死のメカニズムが実在するならば、出芽酵母においても、チェックポイント機構は修復の為に細胞周期を停止させる働きに加えて、障害が正しく直されなかった場合にその細胞を積極的に死滅させることでゲノム情報の安定化を二重に保証していることになる。

第四節 *orc*変異株において引き起こされる異常の実態についての考察

今回の解析を行った段階では、*orc*変異株において引き起こされる異常が実際にどういったものであるのか、ということが未解明であり、かつ大きな疑問点であろうと思われる。これに対して直接的な情報を得るには、ゲルシフトアッセイやフットプリンティング法、免疫沈降法などの生化学的或いは細胞生物学的手法が不可欠となるが、本研究ではこの様な解析は行っていない為、*orc*変異株における異常の実態を断言することは出来ない。しかしながら本研究における解析からも、この問題に対して間接的に何らかの情報は得られているように思われる。そこで本節では、これまでに得られた幾つかの状況証拠からORC機能欠損がもたらす異常の構造を推測することを試みた。これまでに見て来たように、*orc1*変異株と*orc2-1*変異株との間でORCが抱える異常に質的な相違が存在することが考えられるので、ここではそれぞれを別個に取り扱うことにする。

まず*orc1*変異株における異常についてであるが、典型的な例として*orc1-4*株の場合を考えると、この変異株においてORCの異常がどのようなものであったかを示す状況証拠の一つとして、変異株における異常がRAD9経路に認識可能な形態であったという事実を挙げることができる。RAD9経路が実際にどのような分子構造を認識するのは現在までのところ正確には理解されていないが、DNAダメージチェックポイントに関与しており、MMSや放射線処理などに応じて細胞周期を停止させることなどから考えると、RAD9経路が少なくともこれらの傷害剤が生み出すDNA損傷を認識することは間違い無く、幾つかの報告からその実態は一本鎖DNA構造に類するものではないかと推測されている(Garvik et al., 1995; Lydall and Weinert, 1995)。更に状況証拠の二つ目として、様々な染色体異常の分類と同定の解析から*orc1-4*変異株においてはOrc1pの機能欠損が組換えを起こし易い状況をつくり出していることが明らかと

なっている。通常組換えが起こる際には一本鎖或いは二本鎖の不安定化したDNA末端が生じる必要があるが、MMS処理や放射線照射などの操作によってこのような組換えの基質が数多く生み出されることは良く知られている通りであり、一つ目の状況証拠と考え併せると、*orc1-4*変異株においてはMMSや放射線を用いた場合に類似したDNA損傷が生じている可能性が高いと思われる。

それでは何故複製開始制御因子の機能欠損によってMMSなどに類似の効果が現れるのであろうか？これに関係すると思われる三つ目の状況証拠として、*orc1-4*株においてはFACSパターンの上で完全なG2/M arrestが見られるまでには温度シフトから約8時間を要しており、この間に生菌数はおよそ8倍から10倍程度上昇していたという事実を挙げることが出来る。このことは温度シフトによりORC機能欠損が導入された後もおよそ3回程度は細胞増殖が可能であったことを意味する。もし仮にDNA複製の開始が全く行えなくなったとしたならば、細胞周期はG1期か或いはS期の非常に早い段階で停止しているはずであり、生菌数が増加することも有り得ない。このことから考えると、温度シフト直後の*orc1-4*株においてはある程度の複製開始の能力は残存しており、時間の経過とともに徐々にRad9p依存的なチェックポイント機構の活性化の機会が増していくのではないかと推測される。白髭博士らが行った二次元ゲル電気泳動による解析でも、*orc1-4*変異株において温度シフト直後の複製開始の際に部分的な複製開始活性が残存していることが確認されている。以上の事柄を総合すると、*orc1-4*株においてまず最初に起こっている異常は複製開始効率の低下であり、活性なレプリコンの数が少ないことがその後の事態を招いているものと推測される。恐らくは活性な複製起点の数が減少することで個々のフォークが担う複製範囲が拡大し、結果として複製にかかるストレスが増大するのではないと思われる。このような状況においても最初の2、3回の複製は何とかとり行うことが出来るが、細胞増殖を重ねるうちに更にストレスが蓄積してゆき、複製フォークの進行が阻害される確率が高まることが予想される。

また序章でも述べたように、マルチレプリコンでの複製様式を持つ真核細胞においては特定のoriginが活性化しないことが全体の制御体系を狂わせ、複製フォークの進行に異常をきたす可能性が考えられる。真核生物が何故複数の複製起点を持つのかについては不明であるが、可能性の一つとしては、通常のDNA複製の際にも相当な細胞内ストレスが存在しており、内在的な障害のためにフォークの進行が阻害されることがしばしばあって、これを乗り越えて正確な複製を遂行する為に複数の複製起点が必要なのであろうと考えられる。この仮説を支持すると思われる報告が幾つかのグループにより為されている(Nash et al., 1988; Vallen and Cross, 1995)。彼らはG1サイクリンの強発現によるS期進行(premature entry into S phase)の際にゲノムの不安定化や細胞死が引き起こされることを確認しているが、その解釈として不適切なS

期侵入が複製完了に十分な数のoriginを活性化することができないためではないか、といった議論が展開されている(in review Paulovich et al., 1997b)。この例にも見られる通り、通常のDNA複製においても内在的にフォーク停止が引き起こされおり、その状況乗り越えるために一定数のoriginの活性化が必要であるとするならば、複製開始効率の低下はそれだけで複製完了を阻害するに十分なレプリカティブストレスに成り得ると考えられる。仮に一つの複製フォークが進行を阻害されたとしても、その前方に複製起点が存在すれば、そこからの別のフォークの流れ込みによって問題が解決する可能性は高い。しかし、活性な複製起点の数が極端に減少している状況下では、反対方向からのフォークの流れ込みを期待することは出来ず、一度停止したフォークは独力で進行を再開しなければならない。このような場合の複製フォークの再構築の手段として、相同組換え機構の利用の必要性が生まれるのではないかと考えられる。複製フォークの再構築の為には通常姉妹染色体間において組換え反応が行われなければならないが、この時に生じる遊離のDNA末端は他染色体との組換えを起こす基質にもなるので、染色体欠失や転座などの染色体異常が引き起こされるものと考えられる。またDNA末端が不安定化することでDNA鎖が部分的に一本鎖の状態になることや末端部分からの削り込みにより一本鎖のDNA分解産物が出現することが予想されるが、これらの構造が主にRad9pの認識する標的となっているのではないかと推測される。

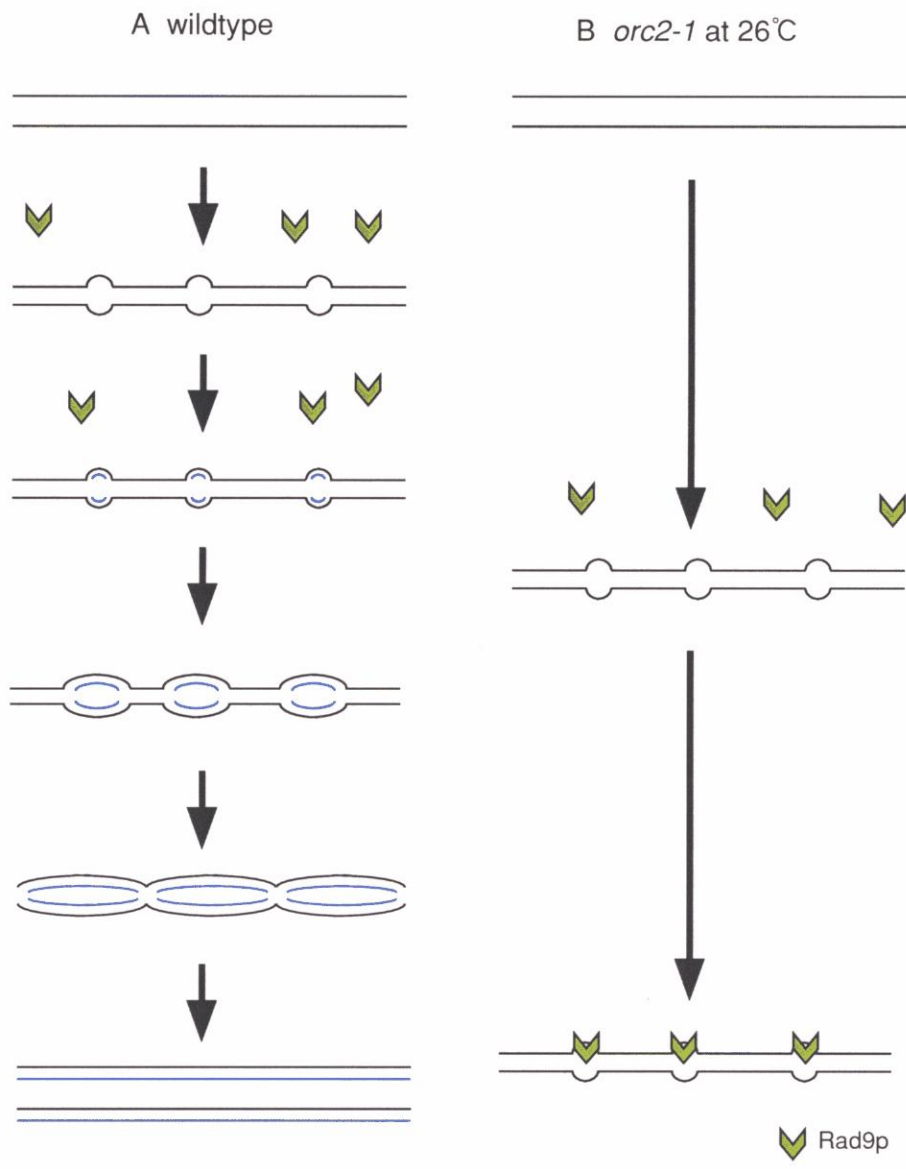
これに加えて、近年van Brabantらは約170kbpの“origin-free”な領域をもつ人工染色体が導入された細胞においてRad9p依存的なチェックポイント機構の活性化が引き起こされることを報告している。彼らはまたRAD9遺伝子欠損の条件下で人工染色体が不安定化し、“origin-free”な領域内で欠失が頻発することも見出しているが(van Brabant et al., 2001)、こうした事例は本研究における解析結果や上の考察と非常に良く合致している。

出芽酵母ORCには複製開始制御に関する機能以外にもHM領域やテロメア近傍領域のサイレンサーとしての機能(Bell et al., 1993; Foss et al., 1993; Fox et al., 1997)や、intra-sチェックポイントに関する機能(Shirahige et al., 1998)が存在することが知られているが、orc1-4株においてこれらの諸機能に異常が生じているのかどうかを次に検討する。まずサイレンシングの機能に関してであるが、通常サイレンシングに関与する他の遺伝子は生存に必須ではない場合が多く、加えてサイレンシングに働く遺伝子の機能欠損が細胞周期の停止(G2/M arrest)を引き起こすという報告も無いので、今回見られたorc1-4株の異常はやはりORCが担う生育に必須の機能、すなわちDNA複製と関連したものである可能性が強いと考えられる。白髭博士らが行った解析によってもorc1-4株はHM領域やテロメア近傍におけるサイレンシングの効果に異常を示さないことが確認されている。更に二次元ゲル電気泳動による解析では、活性化

の効率は低下するもののlate origin活性化のタイミングに関して野生株と大きな相違が見られなかったことから、intra-S チェックポイント制御に関しても異常が無いものと判断している。

ではこれに対してorc2-1株において生じる異常はどのようなものであるといえるのだろうか？まず26℃や28℃といった比較的低温域において引き起こされる異常について考察すると、この温度域におけるOrc2p異常の特徴としては、orc1-4株における場合と同様にRAD9遺伝子依存的に細胞周期の停止や細胞の生育阻害が引き起こされることが挙げられ、このことからorc2-1株における異常も何らかの形でRAD9経路に認識され得る構造であることが推測される。しかしながらorc2-1株ではRAD9遺伝子を破壊した場合にも染色体異常の誘発が認められなかった点がorc1-4株の場合と大きく異なっており、このことからorc2-1株においては組換えにつながる遊離のDNA末端が生じていないと考えられる。加えてorc2-1rad9Δ二重変異株では細胞の増殖能も野生株に近い程度にまで回復しており、解析した限りにおいてRad9pが関与するチェックポイント機構の活性化にどのような意味合いが存在するのか不明であった。第六章の解析からorc2-1株においてもrDNA領域に変化が見られ、このことがチェックポイント機構の認識する異常である可能性も考えられたが、ここではそれ以外の可能性について検討を試みることにする。まず染色体異常の誘発や細胞の生存に特に異常がないことから、低温域のorc2-1株には基本的にDNA複製の能力が備わっており、Rad9pの影響を受けない場合にはほぼ通常通りの形式で細胞増殖を行うことが可能であると考えられる。即ちorc2-1株における異常は、orc1-4株において推測されるフォーク停止のような具体的な構造を持っているのではなく、例えば複製開始の諸過程において特定の反応段階が遅延するといった様な不定形のものではないかと思われる。それではRad9pはどのような構造をシグナルとして認識するのかという事が次に問題となるが、これに対しては複製開始の際に二重鎖がほどけて生じるバブル構造内の一本鎖DNAなどがその候補として考えられる(図X-2)。通常の複製の場面では非常に短時間しか現れないこの様な一過的な中間体構造も、次のステップへの進行が遅延して比較的長時間露出されるようなことになればRAD9経路が認識する対象となり得るのではないだろうか。

一方37℃条件下においてはRAD9遺伝子の破壊による致死性の緩和も部分的であり、RAD9経路に依らない細胞周期進行の停滞が観察された為、Orc2pの機能欠損の形態も低温域の場合とは異なり複雑化していることが予想される。Rad9pに依存しない細胞の死滅という事に関して、ORCやその他の複製開始制御因子自身が、DNA複製が開始されない状況下で細胞分裂を阻止するチェックポイント機構(G1-Mチェックポイント)の構成因子であるという報告が以前になされており(Toyn et al., 1995; Weinreich et al., 2001)、高温下のorc2-1変異株ではこのチェックポイント機構に欠損



図X-2 *orc2-1*変異株(26°C)におけるORC機能欠損の実体のモデル

*orc2-1*株(26°C)におけるチェックポイント機構の活性化の問題に関して、通常の染色体複製中に生じる一本鎖DNA構造(複製開始時の二重鎖巻き戻しによる一本鎖構造など)をRad9pが標的とすることを仮定した。(A)正常な複製の過程においてはこのような一本鎖DNA構造の露出は短時間であり、速やかに二重鎖構造が復元される為にRad9pは感知しない。(B)これに対して*orc2-1*株では、DNA複製を遂行する能力は有しているものの、反応に要する時間が増す為に一本鎖DNA構造が長時間露出される結果となり、Rad9pがこれを認識することになるのではないかと想像される。

が生じることが生菌数減少の一因となっている可能性が考えられる。

第五節 今後の展望

序論でも述べた様に、真核生物はDNA上に生じた損傷の修復や染色体の複製、分離を正しく遂行する為の厳密な制御機構を有している為、体細胞分裂中の細胞において染色体異常の発生原因となるDNA障害が如何なるものであれ、それはチェックポイント機構の活性化をも引き起こす可能性が高いことが予想された。本研究において解析したORCの機能欠損は正にこの様なDNA障害のモデルと一致しており、染色体異常の発生頻度が上昇していた*orc1*変異株においては、染色体異常の誘発をチェックポイント機構の関与を抜きにして考える事が出来ない程両者は深く結びついていることが明らかとなった。染色体異常の発生原因についてはこの他にも様々なものが存在するものと思われるが、それらが生体内でどの様な生理機能と連動して生まれるのか、或いは細胞周期上のどの段階で生じているのかといったことを念頭に置くことが重要であると思われる。恐らく組換えや修復といった研究分野においても、細胞周期制御やチェックポイント機構の関与の問題は、現実には細胞内で起こる現象に則して考える際に今後避けては通れないものと思われる。

第六章に示した通り、解析した全ての*orc*変異株においてrDNA領域に異常が認められたが、rDNA領域は核内において特異的に結合する蛋白質群とともに核小体と呼ばれるサブコンパートメントを形成することが知られている。この構造体は様々な蛋白質のリザーバーとして機能しており、減数分裂時の細胞周期制御に際して関連短蛋白質の迅速な量的調節に貢献していることが明らかになっている(reviewed by Garcia and Pillus, 1999)。体細胞分裂においてrDNA領域が同様に機能しているとの報告はこれまでのところ無いが、その可能性は十分に考えられる。更にこの領域の不安定化に伴い、環状化したrDNAリピートが染色体からポップアウトすることが細胞の老化制御に重大な影響を及ぼしていることが明らかになっており(reviewed by Sinclair et al., 1998a and b; Jhonson et al., 1999)、rDNA領域は近年多くの研究者が注目する極めて重要な研究対象の一つであるといえる。また、DNA複製という点に関してもrDNA領域はoriginの密集した特殊な領域であり、この領域の染色体複製の状況をモニターしてM期進行や細胞周期停止といった制御を行っている可能性も考えられる。今後の展開を考える上で*orc*変異体がこの領域に高頻度に異常を誘発するという事実は非常に興味深い点である。

また第七章で見た様に、*orc1-3*株や*orc1-4*株においては、*RAD9*遺伝子欠損の生存に対する影響が一倍体細胞と二倍体細胞との間で異なっていたが、ORC機能欠損とチェックポイント制御の関係を細胞の倍数性という問題を通して考えるのも重要ではないかと思われる。これまで出芽酵母の細胞周期制御及びチェックポイント制御

に関する研究は主に一倍体細胞においてなされており、二倍体細胞においてなされた研究の蓄積はそれほど多いとは言えない。しかし、前述の通り必須な遺伝子群が一組しかないのか、或いはもう一組余分に存在するのかといった相違は当然のことながら細胞内にDNA障害が導入された際に細胞の生存に大きく影響する。重ねて自然界において出芽酵母は通常二倍体で存在しており、一倍体細胞は配偶子的な意味合いをもっている為、両者の間で細胞周期制御の様式、或いは様々なDNA障害に対処する基本戦略が異なっている可能性は十分に考えられる。今後は一倍体細胞と二倍体細胞の双方で解析を行い、両者を比較することでチェックポイント機構の存在意義に対する理解がより深まるのではないかと期待される。

最後に、本研究で用いた染色体異常検出系はヘテロ接合性の喪失(LOH)を検出する目的で構築されているが、今回の結果から複製開始制御の異常が発癌に結びつく可能性について考察する。これまでに見た通り、*orc1-3*や*orc1-4*といった変異株においてはLOHが高頻度に誘発されるものの、細胞周期の停止も同時に引き起こされるので単独では発癌の原因とはなりにくいことが予想される。しかしRAD9遺伝子のようなチェックポイント制御に関与する遺伝子が併せて欠損した場合にはORCの機能欠損は極めて強力な発癌原因と成り得る。一方*orc1-7*の様な変異が生じた場合には、染色体異常を高頻度に誘発し、なおかつ細胞周期の停止も起こらないので単独でも十分に発癌の原因となることが可能である。これまでのところヒトORC遺伝子が発癌の原因遺伝子として単離されたという研究例は存在しないが、今後そうした報告がなされる可能性は十分に考えられる。また第八章で見た様に*orc1-4*生残菌ではチェックポイント機能に異常が生じており、G2/M arrestが引き起こされなくなった細胞群においては生存比低下も回復していたが、こうした解析結果は*orc*変異株が示す致死性がORC機能欠損自身のもつ直接的影響ではなく、それがシグナルとして認識され、チェックポイント機構を活性化することによって初めて生み出されるものだという事を示している。このように考えると細胞の生存がチェックポイント経路におけるシグナルのやり取りによって決定されているという側面があることは否めない。こうした細胞周期制御に異常を示す個体群が出現するという現象に関してはヒト細胞の癌化の過程においても実際に観察されており、この場合にも一定時間の細胞周期停止の後、その制御を無視して増殖を繰り返す細胞群が出現することがこれまでに報告されている(Chan et al., 1999)。*orc1-4*変異株で見られた現象が、今後こうした発癌のメカニズムを解明する上で何らかの知見を与えるモデルとなることを期待したい。

第二部参考文献

Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., and Bell, S. P. (1997). Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase, *Cell* 91, 59-69.

Asano, M., and Wharton, R. P. (1999). E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*, *Embo J* 18, 2435-48.

Bell, S. P., and Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex, *Nature* 357, 128-34.

Bell, S. P., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1993). Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication, *Science* 262, 1844-9.

Bell, S. P., Mitchell, J., Leber, J., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1995). The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing, *Cell* 83, 563-8.

Bennett, C. B., Lewis, A. L., Baldwin, K. K., and Resnick, M. A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5613-5617.

Boddy, M. N., and Russell, P. (1999). DNA replication checkpoint control, *Front Biosci* 4, D841-8.

Brewer, B. J., Lockshon, D., and Fangman, W. L. (1992). The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription, *Cell* 71, 267-76.

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.

Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage, *Nature* 401, 616-20.

Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., and Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways, *Nature* 362, 849-52.

Diffley, J. F. (1996). Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells, *Genes Dev* 10, 2819-30.

Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J., and Rowley, A. (1994). Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo, *Cell* 78, 303-16.

Dutta, A., and Bell, S. P. (1997). Initiation of DNA replication in eukaryotic cells, *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 293-332.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins, *Genes Dev* 12, 2245-62.

Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science* 274, 1664-72.

Emili, A. (1998). MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage, *Mol Cell* 2, 183-9.

Foss, E.J. (2001). Tof1p regulates DNA damage responses during S phase in *S. cerevisiae*, *Genetics* 157, 567-577.

Foss, M., McNally, F. J., Laurenson, P., and Rine, J. (1993). Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*, *Science* 262, 1838-44.

Fox, C. A., Ehrenhofer-Murray, A. E., Loo, S., and Rine, J. (1997). The origin recognition complex, SIR1, and the S phase requirement for silencing, *Science* 276, 1547-51.

Fujita, M., Hori, Y., Shirahige, K., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (1998). Cell cycle dependent topological changes of chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Cells* 3, 737-49.

Garcia, S. N., and Pillus, L. (1999). Net results of nucleolar dynamics, *Cell* 97, 825-8.

Garvik, B., Carson, M., and Hartwell, L. (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint, *Mol Cell Biol* 15, 6128-38.

Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995). Conserved initiator proteins in eukaryotes, *Science* 270, 1667-71.

Gossen, M., Pak, D. T., Hansen, S. K., Acharya, J. K., and Botchan, M. R. (1995). A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex, *Science* 270, 1674-7.

Haber, J. E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet* 16, 259-64.

Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events, *Science* 246, 629-34.

Hori, Y., Shirahige, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. (1996). Characterization of a novel CDC gene (*ORC1*) partly homologous to *CDC6* of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Biol Cell* 7, 409-18.

平岡美奈 (2000). 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. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 博士論文.

Johnson, F. B., Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1999). Molecular biology of aging, *Cell* 96, 291-302.

Kobayashi, T., Heck, D. J., Nomura, M., and Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (*Fob1*) protein and the role of RNA polymerase I, *Genes Dev* 12, 3821-30.

Kobayashi, T., Hidaka, M., Nishizawa, M., and Horiuchi, T. (1992). Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Gen Genet* 233, 355-62.

Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription, *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 212-38.

Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda, *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 751-813.

Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., Umez, K., Kolodner, R. D., and Haber, J. E. (1998). *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage, *Cell* 94, 399-409.

Li, J. J., and Herskowitz, I. (1993). Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system, *Science* 262, 1870-4.

Liang, C., and Stillman, B. (1997). Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants, *Genes Dev* 11, 3375-86.

Liang, D. T., Hodson, J. A., and Forsburg, S. L. (1999). Reduced dosage of a single fission yeast MCM protein causes genetic instability and S phase delay, *J Cell Sci* 112, 559-67.

Loo, S., Fox, C. A., Rine, J., Kobayashi, R., Stillman, B., and Bell, S. (1995). The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression, and DNA replication, *Mol Biol Cell* 6, 741-56.

Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes, *Nature* 362, 847-9.

Lydall, D., and Weinert, T. (1995). Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest, *Science* 270, 1488-91.

Micklem, G., Rowley, A., Harwood, J., Nasmyth, K., and Diffley, J. F. (1993). Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing, *Nature* 366, 87-9.

Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., and Futcher, A. B. (1988). The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog, *Embo J* 7, 4335-46.

Natale, D. A., Li, C. J., Sun, W. H., and DePamphilis, M. L. (2000). Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals, *Embo J* 19, 2728-38.

Navas, T. A., Zhou, Z., and Elledge, S. J. (1995). DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint, *Cell* 80, 29-39.

Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996). Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor, *Mol Cell Biol* 16, 6977-84.

Pak, D. T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., and Botchan, M. R. (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes, *Cell* 91, 311-23.

Paulovich, A. G., and Hartwell, L. H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage, *Cell* 82, 841-7.

Paulovich, A. G., Margulies, R. U., Garvik, B. M., and Hartwell, L. H. (1997a). RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage, *Genetics* 145, 45-62.

Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., and Hartwell, L. H. (1997b). When checkpoints fail, *Cell* 88, 315-21.

Petes, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 410-4.

Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R. A., and Knippers, R. (1998). Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin, *J Biol Chem* 273, 24543-9.

- Sandell, L. L., and Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss, *Cell* 75, 729-39.
- Santocanale, C., and Diffley, J. F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication, *Nature* 395, 615-8.
- Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. (1998). Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression, *Nature* 395, 618-21.
- Sinclair, D., Mills, K., and Guarente, L. (1998a). Aging in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu Rev Microbiol* 52, 533-60.
- Sinclair, D. A., Mills, K., and Guarente, L. (1998b). Molecular mechanisms of yeast aging, *Trends Biochem Sci* 23, 131-4.
- Stillman, B. (1996). Cell cycle control of DNA replication, *Science* 274, 1659-64.
- Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D. S., and Stern, D. F. (1998). Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint, *Science* 281, 272-4.
- Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K. (1997). Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs, *Cell* 90, 649-60.
- Thome, K. C., Dhar, S. K., Quintana, D. G., Delmolino, L., Shahsafaei, A., and Dutta, A. (2000). Subsets of human origin recognition complex (ORC) subunits are expressed in non-proliferating cells and associate with non-ORC proteins, *J Biol Chem* 275, 35233-41.
- Toczyski, D. P., Galgoczy, D. J., and Hartwell, L. H. (1997). CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint, *Cell* 90, 1097-106.
- Toyn, J.H., Johnson, A. L., and Johnston, L. H. (1995). Segregation of unreplicated chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a novel G1/M-phase checkpoint, *Mol Cell Biol* 15, 5312-5321.

Vallen, E. A., and Cross, F. R. (1995). Mutations in RAD27 define a potential link between G1 cyclins and DNA replication, *Mol Cell Biol* 15, 4291-302.

van Brabant, A. J., Buchanan, C. D., Charboneau, E., Fangman, W. L., and Brewer, B. J. (2001). An origin-deficiency yeast artificial chromosome triggers a cell cycle checkpoint, *Mol Cell* 7, 705-713.

Weinert, T. (1998). DNA damage checkpoints update: getting molecular, *Curr Opin Genet Dev* 8, 185-93.

Weinert, T. A., and Hartwell, L. H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science* 241, 317-22.

Weinreich, M., Liang, C., Chen, H. H., and Stillman, B. (2001). Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle, *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11211-11217.

Yan, H., Merchant, A. M., and Tye, B. K. (1993). Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast, *Genes Dev* 7, 2149-60.

Yu, G., Wu, J. R., and Gilbert, D. M. (1998). Analysis of mammalian origin specification in ORC-depleted *Xenopus* egg extracts, *Genes Cells* 3, 709-20.

謝辞

本研究を行うに当たり御指導を頂いた原核生物分子遺伝学講座 真木寿治教授並びに秋山昌広助教授、真木智子助手、梅津桂子助手、中嶋淑美秘書、及び原核生物分子遺伝学講座の皆様は厚く御礼申し上げます。

細胞形態の顕微鏡観察法を教えて頂いた細胞遺伝学講座 守家成紀助教授、*orc*変異遺伝子の分与や様々な御助言、実験手法の手ほどきを頂いた動物分子遺伝学講座 白髭克彦助手並びに研究グループの皆様は深く感謝いたします。

最後に、現在の道を生きる上で経済的な面からも精神的な面からも支えてくれた両親に心から感謝します。