

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成7年度博士課程 入学
氏名 麻見 安雄
指導教官 田之倉 優

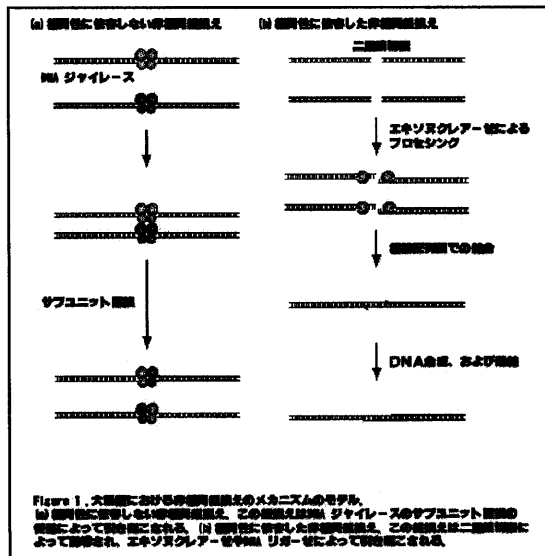
論文題目

出芽酵母における染色体レベルでの非相同組換えの解析系の開発とその応用

[はじめに]

染色体再編は（挿入、欠失、転座、逆位）は非相同組換えにより引き起こされ、しばしばガンや遺伝病の原因となることが知られている。非相同組換えの機構としては、主に2つのモデルが示されている。1つは短い相同性に依存した末端結合による非相同組換えであり、もう1つは DNA トポイソメラーゼのサブユニット交換による相同性に依存しない非相同組換えである(Fig.1)。

DNAトポイソメラーゼはDNA複製や転写時にDNA分子のトポロジーを変化させる酵素である。トポイソメラーゼは2つのタイプに分けられ、I型トポイソメラーゼは正の超らせん構造を弛緩する。またトポイソメラーゼは正の超らせんあるいは弛緩したDNAを二重鎖切断を一時的に作ることによりDNAを負の超らせん構造へと変換する。



特に、抗ガン剤として利用されている VP-16 (etoposide)などのトポイソメラーゼ II 阻害剤は、トポイソメラーゼ II と DNA との反応中間体である cleavable-complex を安定化し DNA の二重鎖切断を促進することが知られている。しかしこれらの阻害剤は治療関連二次性白血病を引き起こすことも知られており治療上での問題となっている。

本研究では、出芽酵母における染色体の再編を解析するために、新しい組換え検出系を作成し、またその系を用いてトポイソメラーゼに依存する組換えについて調べることを目的とした。

[材料と方法]

染色体上での非相同組換え検出系の開発

Saccharomyces cerevisiae

の Chromosome III の LEU2 領域に、CAN1 と CYH2 のネガティブ選択マーカーを導入した株を作成した(Fig.2)。

この株では、カナバニンとシクロヘキシミドの2つの薬剤に感受性であるが、2つのマーカーが同時に欠失すると2つの薬剤に対して耐性となる。

耐性となった組換え体について

コロニーダイレクト PCR を行い染色体の欠失を起こした変異体のみを非相同組換え体とした。

また組換え頻度を測る方法としては、fluctuation test (Luria SE and Delbruck M., (1943))を用い、下記の式を用いて変異率を求めた。

$$m = -\ln P(0) \ln 2 / Nt$$

m: 細胞分裂1回あたりの、1個の細胞における変異率(/cell/division cycle)

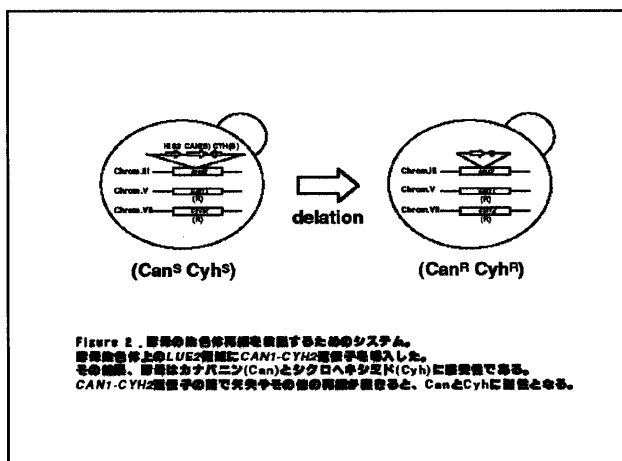
P(0): 組換え体を全く生じなかったプレートの割合、Nt: 最終細胞数

トポイソメラーゼ阻害剤による影響

この系を用いて、抗ガン剤 VP-16 がトポイソメラーゼに依存する組換えを引き起こすかどうか調べた。

組換え体の解析

コロニーダイレクト PCR により染色体欠失が起こっている組換え体について



の解析は、*Sa*II による制限酵素処理を行い電気泳動のパターンにより分類を行った。また、組換え体の結合部位は塩基配列を決定することにより調べた。

[結果と考察]

染色体の再編を検出する系の開発

実験当初、カナバニンとシクロヘキシミドの薬剤耐性を持つものを組換え体としたが組換え体の染色体構造を解析したところ、欠失を起こした組換え体だけでなく、野生型と染色体構造に見かけ上変化のみられないものも得られた。そこで欠失により染色体再編を起こしたものだけについての組換え頻度を求めるために、コロニーダイレクトPCRにより欠失を起こした組換え体のみを非相同組換え体とした。

野生株における組換え頻度とトポイソメラーゼ阻害剤による影響

野生株における染色体欠失の組換え頻度を調べたところ、コントロールグループでおよそ 3.6×10^{-11} / cell / division cycle の頻度で染色体上での欠失による組換えが起きていた。これに対してトポイソメラーゼ阻害剤 VP-16 を作用させた場合では、 3.2×10^{-9} / cell / division cycle の頻度で染色体の欠失が起きていた。このことから未処理菌に比べて VP-16 を作用させると約 100 倍高頻度で染色体の再編が起きていることがわかった(Fig.3)。

また組換え体の解析の結果、非相同組換えによる染色体再編が起きていることが確認された(Fig.4)。コントロールグループと VP-16 処理グループとを比較すると、VP-16 処理グループにおいて、より欠失した領域が大きい傾向がみられた。

以上のことから、トポイソメラーゼ依存の非相同組換えが起きていることが示唆された(Fig.5)。

また、この系を用いて酵母における染色体再編に関与する因子の解析を行うことが可能となった。

さらに、この結果は、大腸菌の DNA ジャイレースに依存する非相同組換えと類似の組換え機構が真核生物にも存在することを示しており、治療関連二次性白血病を引き起こす原因として染色体上での非相同組換えが関与していることが示唆された。

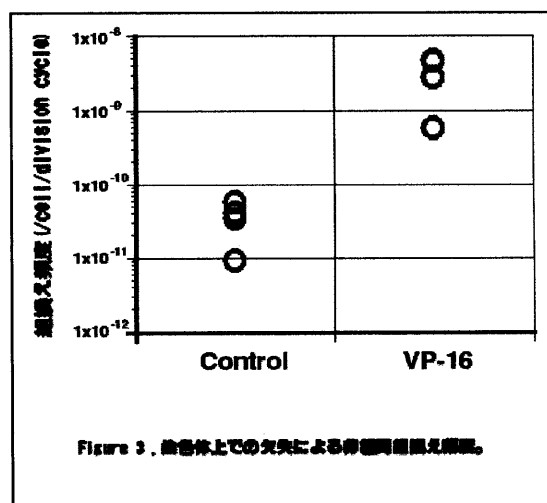


Figure 3. 染色体上での欠失による非相同組換え頻度。

[まとめ]

- 出芽酵母における染色体の再編を解析するために、新しい組換え検出系を作成した。
- この系を用いて、抗ガン剤 VP-16 がトポイソメラーゼに依存する組換えを引き起こすかどうか調べた。
- 結果として VP-16 を作用させた後、未処理菌に比べて染色体の再編が高頻度で起きていることがわかった。
- 従って、この系を用いて酵母における染色体再編に関与する因子の解析を行うことが可能となった。

