

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 麻 見 安 雄

非相同期組換えは、原核生物から真核生物に至るすべての生物種で起きる現象であり、その修復機構の解明は生物学的に非常に重要なテーマであると考えられる。しかしながら、動物細胞を用いた実験は定量性に欠け、またその解析も容易ではないという問題点が存在する。本研究では遺伝的組換えの一つである非同相組換えに特に注目し、出芽酵母を用いた染色体レベルでの非同相組換えの解析を行う系の開発を目的とした。また、開発した検出系を用いて、トポイソメラーゼⅡ阻害剤VP-16による影響を調べた。

第1章においては、まず原核生物および真核生物における非同相組換えについての概説を行った。その中で、原核生物における非同相組換えについて現在までに知られている知見と、真核生物について知られている知見、および真核生物ではまだ確認されていない非同相組換えのモデルについての説明を行った。

第2章では出芽酵母における非同相組換えを調べる系として、染色体上での組換え体の構造解析を簡単で、かつ定量的に検出する実験系を作製した。

作成した系を利用してカナバニンとシクロヘキシミドに耐性を示す形質転換体を得た。野生株における自然状態での組換え体の染色体構造を解析したところ、形質転換体は、欠失変異だけでなく、多重点突然変異や元々の領域にある *cyh2* 遺伝子との遺伝子交叉などが考えられるものが観察された。

第3章では、当初作成した系において問題点があったため、その系に改良を行った。そこで新たに、欠失により染色体再編を起こしたものだけについて求めるための実験方法としてコロニーダイレクトPCR法を利用して系の改良を行った。その結果、コロニーから直接染色体のPCRをおこない、*SaI*処理をして欠失を生じたものだけを非同相組換え体とする事で、真核生物において非同相組換えを特異的に定量する系の開発ができた。新たに開発した組換え検出系を用いて、野生株における非同相組換えを調べた。その結果、非常に低い頻度ながら染色体上での欠失による組換えが起きていることが示された。また、得られた組換え体の組換え部位には長い相同性は認められず0-13bpの短い相同性しか存在していなかった。組換え部位に長い相同性が認められなかったことからこの組換えが非同相組換えであることが明らかになった。

第4章においては、開発した系を用いて染色体再編に関わる因子として、トポイソメラーゼⅡによる非同相組換えの直接的な関与を調べた。この系はまた、薬剤の透過性を増加させるため、*ISE2*変異を導入していることから、トポイソメラーゼⅡ阻害剤VP-16に対する感受性を調べたところ、*ISE2*変異株がこの実験系でも有効であることが確認された。

ここで、VP-16による染色体への影響を調べたところ、野生林において、約100倍高頻度で染色体の再編が起きていることが示された。

染色体の構造を解析したところ、欠失変異を生じる組換えは特定の部位ではなく様々な部位で起きており、生じた欠失の長さも様々であった。さらにいくつかの欠失変異を待つ染色体について組換え部位の塩基配列には長い相同性は認められず2-9bpの短い相同性が存在していた。組換え部位及びその付近に特に顕著な規則性や特徴のある配列（二次構造など）は認められなかった。今回の結果から、阻害剤が真核生物のトポイソメラーゼに影響し、*in vivo*においても非相同組換えが引き起こされることを示唆していた。また短いながら相同性があることから、エンドジョイニングによる機構の関与も示唆された。

以上、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開発した。この系を用いて、トポイソメラーゼⅡ阻害剤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ところ、VP-16を作用させることにより、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示され、非相同組換えにトポイソメラーゼⅡが関与していることが示唆された。本研究で得られた知見は、学術上、応用状貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。