

端部着糸型染色体モデルを用いたロバートソン転座機構の解析

大阪大学大学院生命機能研究科染色体機能制御研究室

石井 浩二郎

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

私は、公益財団法人アステラス病態代謝研究会の平成22年度(第42回)研究助成に基づいて、自然界で頻発するロバートソン転座の分子機構の解析を試みました。以下に記すとおり、当初の研究計画に従ってそれぞれの実験を推し進め、最終的に分子機構解析のための基礎固めを着実に行うことができました。しかし、そこに至るまでに実験レベルでいくつかの難題を克服する必要があり、研究自体の進捗は予想していたよりもはるかに遅れてしまいました。結果として、満足な成果を得られる段階には現時点では未到達です。以下にその内容について具体的に記述し、研究報告といたします。

ロバートソン転座はヒトにおいて最も多く見られる染色体転座の1つです。その出現頻度は、約900人に1人の割合と算出されています。しかし、以下に詳述するように、その転座様式の特性から、転座が起きても遺伝子数にほぼ増減が起りません。均衡型の相互転座のひとつとして分類されるほどです。そのため、転座が起きてもその当事者に障害が出ることはまずほとんどありません。ロバートソン転座が高頻度に見出される理由の一つはその点にもあるとも考えられます。

しかしロバートソン転座の保因者は、自らの染色体ゲノムを次世代に伝える段階において、それがスムーズに行えない問題に遭遇する可能性を高くはらみます。それはすなわち、形成された配偶子において染色体の不均衡が生じる可能性のことを意味します。実際、保因者の子孫には流産や出生児の染色体異常などの問題が見出されます。問題の程度はまちまちですが、多くの場合、それはロバートソン転座を起こした染色体の種類に依存しています。最もシビアな場合には100%の異常に至ることさえもあります。

そのようなロバートソン転座ですが、その高頻度な発生のメカニズムについては未だ十分な理解が得られていません。発生メカニズムを解析し理解するためには、まず染色体転座の発生そのものをリアルタイムで感知することがどうしても不可欠であると考えます。しかしながら、現状ではその適切な実験モデルが存在していません。そこで本研究では、詳細な遺伝的解析が可能な単細胞真核生物である分裂酵母において、ロバートソン転座の発生をモニターするアクセス系を確立し、その背景にある分子機構を解明しようと考えました。

2. 方法

ロバートソン転座は、端部着糸型染色体(動原体が染色体の末端部に形成された染色体)の間で起こります。ヒト染色体では、第13、14、15、21、22番染色体が端部着糸型であり、ロバートソン転座の限られた対象になります。動原体がほぼ末端部にあるということはすなわち、それらの染色体では短腕は極めて短く、基本的に長腕のみからなる染色体ということになります。遺伝子はその全てが長腕にコードされます。そして、転座自体は動原体部分で端部着糸型染色体同士が融合し、それぞれの染色体の長腕が新たな融合染色体の両腕を形成するかたちで起こります。もともとの染色体での短腕部分は全染色体セットからは失われることとなりますが、そもそもコードする遺伝子がほとんど無かったため、その脱落はゲノム遺伝子の増減につながりません。一方で融合した染色体には、もともとの染色体が持っていた遺伝子が全てコードされ、それが通常の間中部着糸型染色体として1コピーを安定に受け継がれていくため、染色体の本数は減少するもののゲノム遺伝子としては完全なセットがロバートソン転座後も維

持・継承されることになるのです。

私たちはこれまでに、分裂酵母においてこのような端部着糸型染色体の理想型を誘導することに成功しています。分裂酵母は3本の染色体から成る生物であり、その全てが中間部着糸型染色体です。しかしながら、生きた細胞において一つの染色体から動原体部分を除去すると、新たな動原体が染色体末端部に形成され、端部着糸型となることを見出しました。

ヒト第13、14、15、21、22番染色体の短腕には、実際には遺伝子が全く無いわけではなく、高度に反復したrDNA遺伝子などが存在し、それら染色体短腕に特徴的な凝縮を生み出しています。分裂酵母においても、第3番染色体の両テロメア末端のすぐ内側部には高度に反復したrDNA遺伝子が存在します。第3番染色体の動原体を除去した際に得られた新しい動原体は、rDNA遺伝子反復領域をその他の遺伝子コード領域と区切る場所に形成され、それはまさしくロバートソン転座を生み出すヒト端部着糸型染色体と同一の染色体構成でした。これはロバートソン転座を生み出す染色体モデルとして最適であると考え、以下の方法でロバートソン転座の発生の検出を試みました。

分裂酵母は通常的生活環では一倍体細胞として存在します。しかし、第3番染色体だけは二本になった異数体細胞も生存することが可能です。ただ、そのような細胞は不安定で、特に選択圧をかけずに細胞を培養すると、すぐさま一方の第3番染色体を失い、通常の一倍体細胞になってしまいます。しかしながら、二本の第3番染色体の間でロバートソン転座が起これば、その異数体細胞は選択圧が無くても安定な異数体のままであることが予想されます。そこで、ade6-210とade6-216というアレル間相補の可能な二つの変異をそれぞれの第3番染色体にヘテロで持たせた異数体細胞を作成し、そのアレル間相補が選択圧のない状況でも維持されることを指標に、ロバートソン転座の発生検出を行いました。

3. 結果 研究成果

まずはade6-210変異とade6-216変異をそれぞれの端部着糸型第3番染色体にヘテロに持つ異数体細胞株の作成を行いました。しかしながら、染色体型が野生株酵母とは異なる端部着糸型染色体酵母では、通常の遺伝交雑による細胞株作成を行うことが不能であり、求める細胞株の作成には多大な時間と労力を要しました。さらに正常な倍数体とは異なる異数体の単離は容易ではなく、最終的に三倍体減数分裂を行わせることで、求める異数体細胞株の作成に成功しました。

得られた異数体細胞株では、予想通り選択圧非存在下では即座の一倍体化が起これば、それはade6遺伝子変異によって容易に確認されました。すなわち、ロバートソン転座は分裂酵母内で起こる現象としても十分に検出可能であると結論づけられました。

その株を用いて、ロバートソン転座の発生検出を試みました。選択圧下での長期培養（100世代程度）、あるいは高温ストレス条件培養（37℃）を試みました。その結果、現時点では転座の検出には至っていません。

実際には複数の異なる端部着糸型第3番染色体異数体細胞株が取得されており、それぞれの株間でrDNA遺伝子領域の反復度が異なっていることが、パルスフィールドゲル電気泳動による染色体解析により判明しています。そのようはrDNA遺伝子領域（短腕）の染色体状態の違いがロバートソン転座の出現に与える影響を今後解析する予定にしています。

4. 考察 まとめ

現在までの解析により、分裂酵母を用いてロバートソン転座のリアルタイムでの検出が可能な生細胞実験系が完成し、そのアッセイ系を用いた予備的な実験が完了しました。アッセイのバックグラントは低く、転座を感度良く検出することは十分に可能であるものと考えられます。

予備的な実験結果では、ロバートソン転座の検出には至っていません。これは、転座の発生自体は極めて高頻度なものではないことを意味しています。むしろ、通常の培養および温度シフト培養ではほとんど感知できないレベルの出現頻度であり、これらの環境下ではむしろロバ

ートソン転座は発生しないと結論づけてもいいように思われます。しかしながら、酵母実験系のメリットを活かして、今後は大量培養と長期培養を計画しており、ロバートソン転座の出現頻度を実際に算出した上で、その起こりにくさは議論したいと考えています。現状ではあくまでも予備的な結果として、発生の低頻度さが示唆されると結論づけます。

仮に低頻度さが明らかとなった場合、その頻度が上昇する状況を想定する必要があるのかも知れないと考えます。実際、私たちのもつ別の実験データでは、動原体の除去自体がそのような染色体再編成応答を誘起し、その結果として端部着糸型の染色体が得られることが示唆されています。何らかの環境シグナルなど、端部着糸型染色体間の融合が促進される要因が天然に存在し、それがロバートソン転座の出現頻度を決定づけている可能性があります。そのような要因は、リアルタイム検出が可能な本実験系以外には解析することが不能であります。今後は、そのような可能性も考慮に入れながら、さらに解析を深めていきたいと考えています。

5. 発表論文、参考文献

Ogiyama, Y., Ishii, K.

The smooth and stable operation of centromeres

Genes Genet. Syst.; in press.