

## 学 位 論 文 題 名

The higher - order structures of Indian muntjac chromosomes

(インドホエジカ染色体高次構築の研究)

## 学位論文内容の要旨

高等真核生物における遺伝子の性質の少なくとも一部は、分裂中期におけるGバンド、Rバンド等分染法で示される染色体構造と密接に結びついていること、またこれらの染色体構造はDNA複製、転写の調節等生物学的機能とも密接に関連していることが示唆され、機能構造体としての染色体高次構造の解析はきわめて重要である。従来の染色体分染法は核型の解析、染色体地図作成等の面で大きな力となっているが、染色体の機能構造の理解には十分貢献しているとは言い難く、より新しい解析的な研究手段の導入が要求される。この観点より申請者は、インドホエジカの種類 (*Muntiacus muntjak*;  $2n = 6♀$ ,  $2n = 7♂$ ) 由来の培養細胞の染色体を材料として、制限酵素や抗Z-DNA抗体処理、あるいは *in situ* ハイブリダイゼーション法などにより、染色体高次構造の解析を行った。

I) 制限酵素消化による特異的分染法、*in situ* ハイブリダイゼーション法、および DA/DAPI 分染法によるインドホエジカ染色体の解析

スライドガラス上に固定した中期染色体を各種制限酵素および RNase で消化し、次の結果をえた。① *HaeIII* は G バンド分染像を、② *EcoRI*\*と *Sau3A* の二重消化は C バンド分染像を示した。③ *AluI*, *EcoRII*, *RsaI* は No.3 染色体セントロメアと No.3+X 染色体セントロメアの一部を分染した。④ *HinfI* は No.3 染色体のセントロメアのみを分染した。②~④の結果は、インドホエジカ染色体 C バンド領域には i) 各セントロメアに共通、ii) No.3+X 染色体特異的、iii) No.3 染色体特異的の、少なくとも3つの異なる反復配列 DNA の存在が示唆された。

次に Chromomycin A<sub>3</sub>, Distamycin A(DA), DAPI(4'-6-diamidino-phenylindole)などの蛍光色素を用いた染色では、No.3+X 染色体セントロメア領域の C バンドは Chromomycin A<sub>3</sub> によって染色される G-C rich な領域と、DA/DAPI によって染色される DA/DAPI バンドの A-T rich な領域のそれぞれ異なった2つの領域から構成されていることが分った。このことは、A-T rich および G-C rich DNA をプローブとした *in situ* ハイブリダイゼーションによっても確認した。すなわち、この染色体における C バンド領域は G-C rich 反復配列と A-T rich 反復配列が形成する2つの異なる構造から成っていることを示すもので、一つの C バンド構造内での異質性を考察する上で極めて興味深い。

## II) 免疫蛍光法によるインドホエジカ染色体の Z-DNA の検出

最近注目されている Z-DNA は遺伝子発現の調節や染色体組み換え等に関与していること

が示唆されている。Z-DNA構造に特異的な抗Z-DNA抗体を用いて、インドホエジカ染色体上のZ-DNA構造の検出を試みた。まず、抗Z-DNA抗体反応が固定条件に影響されることが分かったので、分裂中期細胞より単離した染色体を様々な固定条件で固定後、抗Z-DNA抗体と反応させ、免疫組織化学的に検出した。その結果、①無固定、75%メタノール、カルノア固定した染色体では抗体の反応は認められず、45%酢酸で固定した場合のみ再現性のある結果が得られた。②45%酢酸固定した染色体において、抗体はCバンド、形成部(NORs)、Rバンドに反応した。③これらの領域の抗体反応性はTopo I処理により、Cバンドを除き失われた。このことは染色体上に局在するZ-DNA領域は一定の緊張状態、すなわち超らせん構造と密接に関係していることを示唆する。

また、固定条件と抗体反応性についてSDS-PAGE法により染色体タンパクのレベルから検討した。固定により染色体タンパクの流出がみられ、75%メタノール、カルノア液、45%酢酸の順で溶出が大きく、45%酢酸では、非ヒストンタンパクのみならずコアタンパクの溶出がみられた。したがって、45%酢酸固定後の抗体の反応性の増加はZ-DNA結合タンパクの流出により本来のZ-DNAが抗体と反応し得るようになった為か、またはヌクレオソーム構造が壊され、新たに生じた超らせん構造のZ-DNAが形成されるのか、またはその両方が考えられよう。

### III) 抗Z-DNA抗体反応性に対する制限酵素消化の影響

Z-DNA構造の安定化に関して、メチル化の関与の検討を行なった。染色体標本をメチル化を識別する制限酵素で処理後、抗Z-DNA抗体と反応させた。その結果、①MspI処理ではCバンドおよびNORs領域では抗体の反応性の消失がみられたが、HpaII処理では変化がみられなかった。Rバンド領域では、どの処理によっても反応性が消失した。②HaeIII処理では、DA/DAPIバンド領域のみが抗体と反応した。したがって、Z-DNA構造の安定化にメチル化が関与していること、またHpaII処理後のRバンド領域では、この領域に局在するCpG islandとZ-DNA構造が密接に関与していることが示唆された。

### IV) 染色体上での(GT)<sub>n</sub>配列の局在性

DNAのZ型構造にはプリン-ピリミジンの繰り返し配列が存在しているので、この配列について染色体上での分布を*in situ*ハイブリダイゼーション法により検討した。その結果、①(GT)<sub>n</sub>配列はNORsおよびテロメア領域に強い局在性が認められた。②真正クロマチン領域の局在性もみられたが、Rバンドとの対応は認めにくかった。③(GC)<sub>n</sub>配列は染色体上では認められなかった。したがって、インドホエジカゲノムにおいては長い(GC)<sub>n</sub>配列(n>10)が存在しないかまたは非常に少ないものと思われる。

Holmquist および Bernardi らの研究によってRバンドとGバンドのDNAが遺伝子の存在様式から見て多くの面で異なっていることが示されている。本研究においてはこれらのバンド構造がDNAの塩基配列の違いだけではなく、DNAの高次構造およびメチル化とも密接に関係していることを示した。またDA/DAPIバンドは興味深い現象にも拘らず、他のバンドに較べその機構解明が非常に遅れている。Z-DNAの関与が一つの仮説としてHolmquistによって提出されていたが、本研究の結果はこれを支持する初めての例である。インドホエジカ染色体DA/DAPIバンドに局在する反復配列DNAの解析はこのバンドの機構解明に有力な手段となり得ると思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 勉 弘

副 査 教 授 堀 浩

副 査 助教授 高 木 信 夫

## 学 位 論 文 題 名

The higher-order structures of Indian muntjac chromosomes

(インドホエジカ染色体高次構築の研究)

植田孝之提出の学位論文は主論文(英文)と参考論文(英文7編、和文1編)よりなる。主論文はインドホエジカ(*Muntiacus muntjak*;染色体数 $2n=7$ )由来の培養細胞を材料として、その染色体高次構造について、制限酵素や抗Z-DNA抗体処理法および*in situ* ハイブリダイゼーション法など分子細胞遺伝学的手法を用いて検討したものである。

申請者はまず、スライドガラス上に固定した中期染色体を各種制限酵素で処理し、それらの分染像より、Cバンド領域には、①各染色体の動原体(セントロメア)に共通、②No.3およびNo.3+X染色体に特異的なDA/DAPIバンド、③No.3染色体特異的の、少なくとも3つの異なる反復配列DNAの存在を示唆する結果をえた。また、No.3+X染色体セントロメア領域のCバンドはGC含量が多い領域とAT含量が多いそれぞれ異なった2つの領域から構成されていることを明かにした。このことは一つのCバンド内で異質性が存在することを示したもので、Cバンドの生成機構を考察する上で極めて興味深い発見である。

最近注目されているZ-DNAは遺伝子発現の調節や染色体組み換え等に関与していることが示唆されている。申請者はZ-DNA構造に特異的な抗Z-DNA抗体を

用いて、インドホエジカ染色体上のZ-DNA構造はCバンド、仁形成部(NORs)およびRバンド上に局在することを見出した。また、これら領域の抗Z-DNA抗体反応性はトポイソメラーゼ I処理により、Cバンドを除き失われた。このことは染色体上に局在するZ-DNA領域は一定の緊張状態、すなわち超らせん構造と密接に関係していることを示唆するものとして注目されるものである。

Z-DNA構造の安定化に関してプリン・ピリミジンの繰り返し配列がどのように関与しているのか、シトシン塩基のメチル化についての検討を行なった。染色体標本をメチル化を識別する種々の制限酵素で処理後、抗Z-DNA抗体と反応させた。その結果、①MspI処理ではCバンドおよびNORs領域では抗体の反応性の消失がみられたが、HpaII処理では変化がみられなかった。Rバンド領域では、どの処理によっても反応性が消失した。②HaeIII処理では、DA/DAPIバンド領域のみが抗体と反応した。したがって、Z-DNA構造の安定化にメチル化が関与していること、また、HpaII処理後のRバンド領域では、この領域に局在するCpG islandとZ-DNA構造が密接に関与している知見をえた。

DNAのZ型構造のプリン・ピリミジンの繰り返し配列について、GCおよびGT配列を認識するプライマーをプローブとして、染色体上での分布を*in situ*ハイブリダイゼーション法により検討した。その結果、①(GT)*n*配列はNORs領域および染色体末端部に局在していること、②真正クロマチン領域での局在性もみられたが、Rバンドとの対応は見られなかった、③(GC)*n*配列は染色体上では認められなかった。したがって、インドホエジカゲノムにおいては長い(GC)*n*配列(*n*>10)が存在しないか、存在しても非常に少ないという結果がえられ、染色体DNA構造を解析する上で興味ある知見である。

以上の研究成果は、染色体のバンド構造がDNAの塩基配列の違いだけではなくDNAの高次構造およびメチル化とも密接に関係していることを示したものであり、染色体の高次構造ならびにバンド生成機構等の解明に重要な貢献をなすものである。

参考論文は主論文の内容に直接関係ある3編の論文の他に染色体機能など遺伝子発現などに関連する論文5編からなり、いずれも内外の学術専門誌に発表され、それらの内容はいずれも新知見を含むものとして関連分野において高く評価されている。

審査員一同は主論文と参考論文の内容及び最終試験の成績を慎重に検討した上で、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有することを認めた。