

氏 名	バク 朴	ホン 洪	ソク 石
学位(専攻分野)	博 士	(学 術)	
学 位 記 番 号	博 甲 第 78 号		
学位授与の日付	平成 7 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科・専 攻	工学科学研究科機能科学専攻		
学位論文題目	Synthesis of Mini-Chromosomes and Cytogenetic Analysis of Heterochromatic Genes of <i>Drosophila melanogaster</i> (キイロショウジョウバエにおける mini-染色体の合成とヘテロ クロマチン遺伝子の解析)		
審 査 委 員	(主査) 教 授 渡 辺 隆 夫		
	教 授 遠 藤 泰 久	教 授 松 本 継 男	助教授 山 本 雅 敏

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物の染色体に広く分布するヘテロクロマチンは遺伝学的に不活性な染色体領域とされていたが、最近生物学的に重要な遺伝子の存在が知られるようになった。しかし、ヘテロクロマチンには細胞遺伝学的マーカーがほとんどないことと、高頻度反復配列 DNA が高密度に存在している等の理由で研究は非常に困難とされてきた。本研究は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いて放射線による切断とスクリーニングの染色体工学の手法を応用して、ヘテロクロマチンだけからなる mini-染色体を人工的に作製し、それら mini-染色体を用いて、ヘテロクロマチン内に存在する生物学的に重要な遺伝子として、雄の減数分裂過程の対合 (pairing) に働く pairing sites (染色体対合が起る箇所) と生殖的隔離に働く遺伝子 *zygotic hybrid rescue (zhr)* の解析を行った。さらに mini-染色体から DNA を単離・分析する準備を整えた。

本論文は 2 章で構成されている。

Chapter 1 (Studies of meiotic pairing sites) は Section 1 と Section 2 から成り、*Drosophila melanogaster* の雄における相同染色体の対合 (pairing) と分離に関わる pairing site(s) のヘテロクロマチン内における詳細な細胞学的マッピングの結果が述べられている。

Section 1 (Synthesis of free X duplications carrying a specific region of the centromeric heterochromatin in *Drosophila melanogaster*) では、X 染色体の逆位 $In(1)sc^{LsLsc^{8R}}$ に X 線を照射して両末端のヘテロクロマチンを残し、内部が欠失している mini-染色体を作製した。59 個の mini-染色体を作製し、それらの細胞遺伝学的特徴を調査した。mini-染色体の構造を解明するために、体細胞分裂中における染色体を用いて、第 4 染色体と比較した長さを測定した。X 染色体のヘテロクロマチン構造の基礎的なマッピングに必要な細胞遺伝学的方法と材料を提供したと言える。さらに、キイロショウジョウバエ雄の減数分裂における pairing に mini-染色体がどのように機能するかを遺伝学的に調べた。その結果、完全な pairing site として機能するごく小さな領域 (X 染色体の 1/40、DNA 量では 500 Kbp と推定される) を特定した。この結果は、これまで予想されなかった新しい pairing site の発見であるとともに pairing site DNA の分析を可能にした。

Section 2 (The centric region of the X chromosome rDNA functions in meiotic pairing in *Drosophila melanogaster*) では、核小体形成部位 (nucleolus organizer, NO) に関する最近の仮説「NO すなわち

rDNA が雄の pairing site DNA である」に対して、全く新しい研究方法で rDNA と pairing の関係を解明することを試みた。染色体の末端に rDNA を持つ逆位染色体 $In(1)sc^{V2L}sc^{8R}$ に X 線を照射し、27 個の mini-染色体を作製した。それらの全ては活性のある rRNA 遺伝子を持っており、しかも pairing は完全であった。rDNA を持つか NO 活性がない mini-染色体はこの実験では得られなかったが、新しい pairing site が $In(1)sc^{V2}$ の末端部位（第 4 染色体の 0.4 倍の大きさ）に存在することを明らかにした上で、rDNA と pairing の関係について議論した。また、正常なコピー数の約半分以下の rDNA を持つ mini-染色体を得た。このような染色体の機能単位を最少限度にまで切りつめる方法は、今後、ヘテロクロマチンの各部の遺伝学的研究に広く応用されるであろう。

Chapter 2 (Study of a speciation gene) は、mini-染色体を用いた遺伝学的手法をヘテロクロマチン遺伝子のひとつ（雑種致死救済遺伝子）に応用した。種分化遺伝子（speciation gene）のひとつと考えられている雑種致死救済遺伝子、(*zhr*) は X 染色体のヘテロクロマチン内にだけ特異的に存在する高頻度反復配列 1.688 m/cm^3 satellite DNA ではないかと考えられていた。両者の関係を分子遺伝学的に調べたところ、2 つの mini-染色体、 $Dp(1:f)1205$ と $Dp(1:f)1187$ は *zhr* 遺伝子は欠如しているが 1.688 サテライトは持っていた。これらの mini-染色体を雑種ゲノムに 2 倍量入れ、雑種の致死性のどう影響するかを調べた。その結果 *zhr* 遺伝子は 1.688 g/cm^3 satellite DNA そのものではなく、未知の反復配列 DNA であると推定された。

X 染色体由来の mini-染色体の作製とその遺伝学的应用により次のことが明らかとなった。(1)異なる X 染色体逆位を利用してユニークな構造を持つ mini-染色体作製の方法を確立した。(2)キイロショウジョウバエの X-染色体には少なくとも 2 つの pairing sites がヘテロクロマチンの中に局在しており、完全な pairing に必要な DNA 量は、X 染色体の $1/40$ 程度以下である。(3)今回合成した mini-染色体の中で最も小さいものは、第 4 染色体の 0.5 以下の大きさで、DNA のサイズにして $2-3 \text{ Mbp}$ 以下と推定される。この大きさは染色体として機能する最少 DNA 量に近い値であり、pairing site を持った完全な mini-染色体としては世界で最初に合成されたものである。この DNA 量はパルスフィールド電気泳動で単離が可能ため、将来 pairing 機構の解明に有効な材料になると思われる。(4) $In(1)sc^{V2L}sc^{8R}$ 由来の mini-染色体は rDNA の活性を持っている。rDNA 遺伝子の発現とその調節あるいは NO の形成などに応用が期待できる。(5) 雑種致死救済遺伝子 *zhr* は 1.688 g/cm^3 satellite DNA ではなく別の反復配列で構成されている可能性が高い。

高等真核生物における多様な mini-染色体の合成は初めての試みである。本研究の成果は、減数分裂を経由することが可能なベクターとして、高等真核生物の染色体工学研究に新しい道を開くと思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究の意義は遺伝子研究法に、新しい技術と材料を導入したことにある。すなわち(1)染色体を人工的に切断し、染色体の体細胞分裂と減数分裂の双方で pairing 機能を有する mini-染色体を合成したこと。(2)得られた mini-染色体はパルスフィールド電気泳動で単離できる程のサイズであること。(3)得られた mini-染色体を用いて、減数分裂に働く pairing site や種分化遺伝子 *Zhr* を分析したことである。特に、従来詳細な研究が不可能とされていたヘテロクロマチン領域に存在する遺伝子の解析を可能にした功績は大きい。

一般に高等真核生物の遺伝子分析は、原核生物あるいは下等真核生物を利用して行われてきたが、本研究は、mini-染色体をベクターとして、高等真核生物のシステムで、減数分裂を経て、遺伝子を次代に正確に伝える道を開いた。

本研究は 2 部 3 章に分かれて、全て英文で書かれており、一貫した明解な論旨と豊富なデータで構成されている。第 1 章はすでに筆頭著者として査読制度のある雑誌 (Japanese Journal of Genetics Vol. 68:

83-95, 1993) に報告されており、第 2 章は国際誌 *Chromosa* (Berlin) に投稿中、第 3 章は *Japanese Journal of Genetics* Vol. 70 (1995) に印刷中である。