

2S25 哺乳類人工染色体 (MAC) の構築と染色体機能の解析

○舩本 寛

(名古屋大学大学院理学研究科)

出芽酵母では、自律複製配列、セントロメア、そしてテロメアの機能配列を組み合わせた酵母人工染色体 (YAC) が構築され、各種ゲノム解析に利用され威力を発揮している。残念ながら出芽酵母のこれらの配列は哺乳類細胞では機能しない。哺乳動物ではテロメア以外の機能配列には不明な点が多く残されていた。我々のグループではヒト 21 番染色体セントロメア領域 DNA の構造解析から、この領域には性質の異なる二つの巨大アルフォイド領域($\alpha 21-I$ と $\alpha 21-II$) が隣接して存在することを明らかにした。アルフォイド DNA は 171bp の繰り返しを基本単位とする高頻度反復配列の一つであり、ヒトの全ての染色体セントロメア領域に分布する。アルフォイド DNA に機能するセントロメアを構成する能力があれば、ヒト細胞内でも人工染色体 (MAC: Mammalian Artificial Chromosome) の構築は可能であるはずだという仮定の基に我々は研究を進めた。

アルフォイド配列とセントロメア機能との関連について明らかにするため、 $\alpha 21-I$ と $\alpha 21-II$ 由来の約 100 kb DNA 断片を YAC を用いてクローン化した。酵母内での組換え反応を利用しアルフォイド YAC の末端をヒトテロメア配列で置き換え、薬剤耐性遺伝子を挿入した後、この YAC DNA を精製し、リポフェクション法を用いてヒト培養細胞 (HT1080)へ導入した。導入 YAC DNA に複製する能力やセントロメア機能が備わっていれば、薬剤耐性となった細胞株中でミニ染色体として保持されている可能性が高い。そこで、形質転換細胞株を FISH で詳しく解析した結果、 $\alpha 21-I$ 由来の YAC を導入して得られた細胞株中ではミニ人工染色体が高い頻度で形成されていた。これらの人工染色体は基本的には細胞あたり 1 個で、非選択培地中でも細胞増殖を経て安定に維持されていることが判った。人工染色体上にはセントロメア・キネトコア蛋白の CENP-A, -B, -C や-E 等も分布しており、機能するセントロメア・キネトコアが形成されていることが判明した。FISH やサザンハイブリダイゼーションによる解析から、人工染色体上には宿主染色体断片は検出されず、導入した YAC がほぼ原型のまま約 30 コピー末端同士でつながって一本の人工染色体を形成していることが判明した。 $\alpha 21-II$ 由来の YAC を導入して得られた細胞株中では YAC はすべて宿主染色体に組み込まれており、セントロメアは形成されなかった。これらの結果は、 $\alpha 21-I$ が新規セントロメア・キネトコア形成や人工染色体形成に必要な配列であることを示している。特定のアルフォイド DNA がセントロメア機能発現に深く関わっている可能性が示唆された。哺乳動物でも限定された DNA から人工染色体を構築することに成功した。しかし同時に新たな疑問も多く生じてきた。なぜ、導入した YAC は増幅しているのか。100 kb 程度のアルフォイド YAC ではまだセントロメア機能に不足なのか。染色体としての大きなサイズが必要なのか。細胞へ導入した YAC はなぜ 100%の効率で人工染色体とならないのか。これら疑問の解決を目指しながら、MAC を用いて染色体の基本的機能の研究を進めている。

Construction of Mammalian Artificial Chromosome (MAC) and Analysis of Chromosome Function

○Hiroshi Masumoto

Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University
centromere, kinetochore, alphoid DNA, artificial chromosome, CENP-B