OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Construction of single-gene chromosome and analysis of mini-chromosome dynamics in Saccharomyces cerevisiae
Author(s)	山岸, 一雄
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49576
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	山岸一雄（やまぎしかずお）
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 ２２５８５ 号
学位授与年月日	平成21年２月13日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Construction of single-gene chromosome and analysis of mini-chromosome dynamics in Saccharomyces cerevisiae （出芽酵母における単一遺伝子染色体の作製とミニ染色体不安定性の解析）
論文審査委員	（主査） 教授 原島 俊 （副査） 教授 小林 昭雄　教授 福井 希一　教授 福崎英一郎 教授 大竹 久夫　教授 金谷 茂則　教授 四方 哲也 教授 清水 浩　教授 仁平 卓也　教授 野地 博行

論文内容の要旨

第1章　緒言

次世代の生命科学、生命工学における基盤技術として、染色体やゲノムを自在に、しかも大規模に操作する染色体工学技術・ゲノム工学技術が重要になってくると考えられる。出芽酵母は古来より有用微生物として、また近年では生化学的、分子生物学的解析に適したモデル生物として重要であり、出芽酵母を材料として、こうした技術を開発することは、基礎、応用両面で新たな展開をもたらすことが期待される。我々は、出芽酵母を材料に、ゲノムを大規模に操作するキーテクノロジーとして、染色体を望みの部位で簡便に、しかも高効率で分断する「染色体分断技術（PCR-mediated chromosome splitting; PCS法）」を開発してきた。

出芽酵母では、100 kb 以下のミニ染色体は、細胞分裂時に高頻度で脱落することが知られている。従って、染色体の分断によって、多数のミニ染色体を持つ細胞（マスター細胞）を作成できれば、ミニ染色体が多様な組合わせで脱落する現象を利用して、物質生産に最適なゲノム組成を持つ、これまでにない新規な細胞を創生することが可能である。本研究では、こうしたアイデアを具現化するため、第2章では、染色体の複製起点（ARS）を含む領域しか対象にできなかったPCS法を改良し、ARSの有無にかかわらず、染色体のどのような領域でもミニ染色体化できる技術（ARS-PCS法）の確立を行った。また、開発したARS-PCS法を用いて、単一遺伝子からなる染色体を作製する技術を開発した。さらに、第3章では、ゲノムの自在な再構成に、ミニ染色体の脱落を制御することが必須であると考え、染色体分断のタイミングを制御できる技術（Conditional chromosome splitting; CCS法）を開発した。最後に、第4章では、ミニ染色体を安定化する技術を開発するために、ミニ染色体の細胞分裂時での高頻度脱落現象がどのようなメカニズムで起こるかの基本的な課題を解決することが必須であると考え、ミニ染色体の細胞分裂時の動態を解析した。

第2章　単一遺伝子染色体作成技術の確立

PCS法を用いたこれまでの染色体分断では、ARSがあることが既知の領域、あるいはデータベースより、出芽酵母ゲノム上に予想されるARSを参照し、生成される染色体がARSを持つように分断する必要があった。この欠点を改良するため、導入するDNA断片に予めARS（*HAARS*）が含まれるような工夫を取り入れることによって、染色体上のARSの有無かかわらず、染色体分断を行える技術へと改良した（ARS-PCS法と命名）。このARS-PCS法の開発によって、染色体のどのような領域でも、ミニ染色体化する技術を確立することができた。

第3章　PI-*Sce*Iエンドヌクレアーゼを利用した染色体分断技術の確立

既述のように、染色体は、その長さの減少に伴い不安定性が増加し、細胞分裂時に脱落することが知られている。単一遺伝子から成る染色体のように極めて短いミニ染色体は、特に脱落率が高く、細胞内に維持させることが難しい。従って、多数のミニ染色体を保持するマスター細胞を作成するためには障害となる。この困難を克服するためには、一斉に脱落を開始させるまで、ミニ染色体を生じさせない染色体分断のタイミングを制御する技術が必要である。そこで、ARS-PCS法で用いる２つのDNA 断片を、出芽酵母ゲノムに無い PI-*Sce*I 認識配列を介して融合し、染色体に導入後、この細胞にPI-*Sce*I 発現ベクターを導入して、一斉に染色体分断を引き起こす技術（CCS法）を開発した。しかし、CCS法によって分断を制御することが可能となったが、PI-*Sce*I の発現時間を長くしても、分断効率は50%程度であり、複数の部位を一斉に分断するためには、さらなる改良が必要であると考えられた。

第4章　染色体長減少に伴う染色体分配異常の解析

ミニ染色体を利用したゲノム再構築技術の確立のためには、ミニ染色体の細胞内での動態を理解することが必須である。そもそも、ミニ染色体はなぜ、高頻度で脱落するのか基本的な課題が解決されていない。そこで、ミニ染色体の安定化技術を確立するための基盤的な知見を得るため、染色体長の減少がどのように染色体の分配異常を引き起こすかの解明を試みた。染色体の分配にはその前段階として、複製されたセントロメアが、その周辺の数十kbに渡って結合するコヒーシン複合体によって接着される必要がある。従って染色体長の減少は、このコヒーシン結合に影響することが予想される。そこで、一倍体細胞の天然の染色体（第6番染色体、270 kb）から長さの異なるいくつかのミニ染色体を作製し、コヒーシンのクロマチン免疫沈降を行った。しかし、セントロメア周辺のコヒーシンの集合に違いは見られなかった。そこで、ミニ染色体の不安定化の原因を単一細胞単位で解析するため、Tet オペレーター/リプレッサーの系を用いてミニ染色体を蛍光染色し、蛍光顕微鏡を利用した動態解析を行った。その結果、前述のように、セントロメア周辺のコヒーシンは正常に結合しているにもかかわらず、ミニ染色体では天然の染色体と比較して、ⅰ）分裂中期におけるスピンドル－動原体の二方向性を確立できない（一方向性）、また、ⅱ）姉妹染色分体の早期分離が高頻度で起こることが観察された。さらに、ⅲ）細胞分裂時の染色体の脱落は、このような一方向性のミニ染色体を持つ細胞が二方向性を確立することなく、分裂期が終結してしまうためであることがわかった。これらの結果から、ミニ染色体では、姉妹染色分体間の接着力が弱く、二方向性の維持が困難であり、このことが高頻度の脱落の原因になっていることを示唆することができた。

第5章　総括

本研究では、大規模なゲノム操作技術による多様なゲノム組成を持つ新規な細胞の創生を目指して、ⅰ)単一遺伝子染色体の創生技術、ⅱ)PI-*Sce*Iエンドヌクレアーゼを利用した染色体分断のタイミングを制御する技術を確立した。また、ⅲ)染色体長の減少に伴うミニ染色体の不安定性が、ミニ染色体姉妹染色分体間の接着力が減少した結果引き起こされることを示唆することができた。これらの結果より染色体分断により、多数のミニ染色体を持つ細胞を作成し、様々なゲノム組成を持つ出芽酵母細胞を創生するゲノム工学技術を確立するためには、姉妹染色分体間の接着力や、染色体の二方向性のチェックポイント制御による染色体安定化技術の開発が有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は出芽酵母におけるゲノムの改変技術の開発についての研究成果をまとめたものであり、緒論（一章）、本文（二、三、四章）、総合討論（五章）の５章からなっている。

第一章の緒論では、ゲノムの改変技術の開発の必要性と、ゲノム改変技術によって生成される多様なゲノム組成を持つ細胞の有用性を述べ、本研究の目的と意義を明確にしている。

第二章では、染色体のどのような部位でも随意に分断を行うことができるゲノム工学技術、ARS-PCS（Autonomously replicating sequence added PCR-mediated chromosome splitting）法の開発を行っている。従来の染色体分断法(PCS法)は、ARSがあることが既知の領域、あるいはデータベースよりARSがあると予想される領域でしか染色体の分断を行えなかった欠点を改良するため、導入するDNA断片に予め複製起点であるARSが含まれるような工夫を取り入れることによって、ARSの有無にかかわらず、染色体の分断を行える技術へと改良している（ARS-PCS法)。このARS-PCS法を用い、ARSの存在しない、非常に小さな領域を染色体化し、単一遺伝子のみを持つミニ染色体の作製に成功している。

第三章では、ミニ染色体の脱落を制御するため、染色体の分断を一斉に引き起こす技術（Conditional chromosome splitting；CCS法）の開発を行っている。第一章で作製されたような、単一遺伝子から成る極めて短いミニ染色体は、特に脱落率が高く、細胞内に維持させることが難しい。従って、多数のミニ染色体を保持する細胞を作成するためには障害となる。この困難を克服するため、一斉に脱落を開始させるまで、ミニ染色体を生じさせないような染色体分断のタイミングを制御する技術の開発を行っている。すなわち、ARS-PCS法で用いる２つのDNA断片を、出芽酵母ゲノムに無いPI-*Sce*I認識配列を介して融合して、染色体に導入後、この細胞にPI-*Sce*I発現ベクターを導入して、一斉に染色体分断を引き起こす技術（CCS法）を開発している。このようなCCS法によって分断を制御することが可能となったが、PI-*Sce*Iの発現時間を長くしても、分断効率は50%程度であり、複数の部位を一斉に分断するためには、さらなる改良が必要であると結論付けている。

第四章ではミニ染色体の安定化技術を確立するための基盤的な知見を得るため、染色体長の減少がどのように染色体の分配異常を引き起こすかの解明を試みている。まず、姉妹染色分体間の接着を担い、染色体の正確な分配に必須であるコヒーシンタンパクの分布を、一倍体細胞の天然の染色体（第６番染色体、270 kb）および、長さの異なるいくつかのミニ染色体において、クロマチン免疫沈降によって解析している。しかし、コヒーシンの分布に違いは見られなかったため、続いて、ミニ染色体の不安定化の原因を単一細胞単位で解析するため、ミニ染色体を蛍光で可視化できるシステムを構築、蛍光顕微鏡を利用した動態解析を行っている。その結果、ミニ染色体では天然の染色体と比較して、ｉ）分裂中期におけるスピンドルー動原体の二方向性を確立できない（一方向性)、また、ⅱ）姉妹染色分体の早期分離が高頻度で起こることを観察している。さらに、ⅲ）細胞分裂時の染色体の脱落は、このような一方向性のミニ染色体を持つ細胞が二方向性を確立することなく、分裂期が終結してしまうためであることを明らかにしている。これらの結果から、ミニ染色体では、姉妹染色分体間の接着力が弱く、二方向性の維持が困難であり、このことが高頻度の脱落の原因になっていると結論付けている。

第五章の総合討論では、ゲノム改変技術の開発について本研究で得られた成果と知見をまとめるとともに、この分野についての今後の展望を述べている。

以上のように、本論文は、次世代の生命科学・生命工学における新しい基盤技術になると考えられる染色体工学技術、ゲノム工学技術を確立するための基盤となる多くの知見をもたらしたものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。