

博士論文

出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の
切り出しによる細胞死の誘導システムの
確立と効率改善

平成 27 年 1 月

福山大学大学院工学研究科

生命工学専攻

宮本昭弘

目次

第1章 緒論	4
第2章 染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導	
第1節 緒言	13
第2節 材料および方法	
2.1 使用菌株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチド	16
2.2 使用培地	24
2.3 滅菌および培養	27
2.4 DNA の精製	27
2.5 DNA の調製	28
2.6 形質転換法	32
2.7 DNA の酵素処理	34
2.8 アガロースゲル電気泳動	35
2.9 PCR 法	35
2.10 PCR 産物の DNA 回収と精製	37
2.11 DNA のシーケンス解析	38
2.12 パルスフィールドゲル電気泳動	39
2.13 サザンハイブリダイゼーション法	41
2.14 部位特異的組換えによる細胞死の誘導 (プレート)	44
2.15 部位特異的組換えによる細胞死の誘導 (液体培養)	44
2.16 蛍光顕微鏡による細胞の観察	45
2.17 孢子形成	46
2.18 四分子解析	46
2.19 二倍体の作製	47
2.20 菌株およびプラスミドの作製	47

第3節	結果	
3.1	細胞死の誘導システムの構築	52
3.2	二倍体における細胞死の誘導	59
3.3	複数の染色体からのセントロメア DNA の 切り出しによる細胞死の誘導	65
3.4	孢子形成時における細胞死の誘導	69

第3章 セントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

第1節	緒言	84
第2節	材料および方法	
2.1	使用菌株、プラスミドおよびオリゴヌクレオチド	85
2.2	使用培地	87
2.3	滅菌および培養	87
2.4	DNA の操作	87
2.5	部位特異的組換えによる細胞死の誘導 (プレート)	87
2.6	PCR 解析 (生存細胞の解析)	87
2.7	DNA のシーケンシング解析	88
2.8	パルスフィールドゲル電気泳動法による染色体 DNA の 構造の解析	88
2.9	レコンビナーゼ発現プラスミドの機能解析	89
2.10	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	90
2.11	ウェスタンブロット法	91
2.12	菌株の作製	92
第3節	結果	93
第4節	考察	106

第4章 セントロメア DNA の切り出しによる細胞死誘導の効率の改善

第1節 緒言	109
第2節 材料および方法	
2.1 使用菌株、プラスミドおよびオリゴヌクレオチド	110
2.2 使用培地	112
2.3 滅菌および培養	112
2.4 DNA の操作	112
2.5 生存細胞の解析	112
2.6 プラスミドの作製	112
第3節 結果	114
第4節 考察	115
第5章 総合考察	121
参考文献	125
公表論文	132
謝辞	133

第1章 緒論

近年、様々な遺伝子組換え生物の研究および開発が盛んに進められている。遺伝子組換え生物が食糧問題、環境問題、エネルギー問題など人類が抱える課題を解決する重要な鍵の1つとして期待されている。古くから人々が行ってきた品種改良は、有用な形質を持つ生物の選抜、突然変異による形質の付与、交雑など、偶然の産物や経験に依存していた。しかし、遺伝子組換え技術は、分子生物学や遺伝子工学に基づき、有用遺伝子を導入して新規形質を付与させることができ、遺伝子を破壊して特定の形質の消失や、遺伝子置換によりアミノ酸配列をデザインすることも可能となった。これにより、従来の品種改良では遠縁の種間では交配することが出来なかったが、種の壁を越え特定の形質を短い期間で付与することが可能となった。

人類がこの画期的な技術を手にしたのは比較的最近のことである。まず、その歴史を簡単に述べたいと思う^{1,2)}。1953年にWatsonとCrickは、Chargaffの「DNAの塩基存在比の法則」とFranklinが撮影したX線結晶構造解析の結果を基にDNAの二重らせん構造を明らかにした。このDNAの切断や結合を行う酵素の発見は1968年頃である。当時、大腸菌においてファージの増殖が制限される現象が確認され、そこから、ArberやSmithが外来遺伝子に対してDNAを切断する制限酵素を発見した。この制限酵素は、後の遺伝子組換え技術において重要な役割を担うことになる。1972年に今日の遺伝子組換え技術を初めて行ったのはBergである。彼らは、サルウイルスであるSV40のDNAと大腸菌のガラクトース代謝遺伝子を連結し、最初の組換えDNA分子を作製した。その直後にCohenとBoyerが、組換えDNAが大腸菌で実際に機能することを証明した。これをきっかけに遺伝子組換え技術が研究者の間で急速に広まり、商業利用が検討されるようになった。微生物や動物の培養細胞により生産されるバイオ医薬品は、1980年代に実用化された³⁻⁵⁾。このとき初めて遺伝子組換え技術で生成された医薬品がインスリンである。従来、インスリンは、化学合成が困難とされていたが、この画期的な技術は、高純度で大量に生産することができ、さらに構成成分のタンパク質の改変により付加価値を与えることが可能であり、メリットが大きいことが特徴である。遺伝子組換え技術は、医薬品のみならず酵素製剤や研究試薬など、幅広い分野に応用と発展をもたらした。また、農業分野でも遺伝子組換え

作物が栽培されており、害虫抵抗性作物、除草剤耐性作物、ウイルス抵抗性作物など有用な形質が付与された作物が栽培され、作物の生産効率の向上に役立てられている。このように、工業および商業的に飛躍的な進歩を見せ、私たちの身近な生活のみならず、人類の活動や問題解決に重要な技術として期待されている。

しかし、遺伝子組換え技術の急速な発展の一方で、遺伝子組換え生物を問題視する声や法の整備の遅れが議論されることになった。遺伝子組換え生物（Genetically Modified Organism : GMO）が、生態系や生物多様性への悪影響を及ぼさないために必要な処置を講じることを根幹としたバイオセーフティーの考え方が求められるようになった。国際的な生物多様性条約では、生物多様性の保全、生物多様性の構成要素の持続可能な利用、そして遺伝子資源の利用から生ずる利益の公正かつ衡平な分配を目的として、バイオセーフティーに関する「カルタヘナ議定書等」が発効されている⁶⁾。本国でもこれに対応するため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」が制定されて、大気、水または土壌中への拡散を防止する第二種使用等と、それを意図しない第一種使用等（遺伝子組換え作物の栽培等など）に分けて管理されており、遺伝子組換え生物の利用の際には、事前に周辺環境への調査を行い、承認を得ることが義務付けられている⁷⁾。実際には、野外での拡散を防ぐために様々な対策として物理的な封じ込めや隔離が実施されているが、これらの対策の効果や拡散した場合のリスク評価など、遺伝子組換え生物または遺伝子の拡散の影響が顕著化しなければ感知することさえ容易なことではない。

しかし、事前に条件致死性質を付与しておくことにより、遺伝子組換え生物を取り扱う際に自然環境中への拡散によるリスク管理として、また、組換え微生物等を用いたバイオレメディエーションなど環境中で直接利用する場合でも、遺伝子組換え生物を遺伝子レベルでコントロール下に置くことができ、これまでの物理的封じ込め対策と組み合わせることで、さらに確実な防止策として有効であると考えた。

本研究では、遺伝子組換え生物に拡散防止システムを導入することで環境への影響を軽減（安全性を確保）すると共に遺伝子組換え生物より幅広い利用に貢献することを目的としている。その手段として、特定の条件下でタイトに応答する誘導型のプロモーターを用いて真核生物の染色体からセントロメア DNA または必須遺伝子を切り出すことで細胞死を誘導し条件致死を付加させることを提唱する。

そこで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として、酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 由来の pSR1 プラスミド⁸⁾ に備わっている部位特異的組換え系⁹⁾を利用して、染色体からセントロメア DNA を切り出し細胞死を誘導するシステムの構築を検討した。この細胞死システムでは、プロモーターに依存した制御の基でレコンビナーゼを発現させることにより、特定の条件あるいは時期に細胞死を誘導することができ、利用者がプロモーターの種類を選択することで目的に応じて誘導できる。また、微生物のみならず、植物や動物細胞でも応用が可能である。しかし、高等生物は微生物と比較しコストが掛かり、多くが二倍体であるため測定および解析を行う上で扱いにくい。そこで、本研究では、低コストで生物の中でも早い時期に全ゲノム配列が決定され解析も比較的容易であり、一倍体細胞と二倍体細胞の形態で存在する出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物とすることで、両者の比較そして、他の真核細胞への応用の際、基本的な知見を得る上で適切であると判断した。

まず、一倍体細胞における細胞死を検証するため、KA311A 株の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部 (RS) を同じ方向に挿入した後、*GAL1* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するレコンビナーゼ発現プラスミド (*R* 発現プラスミド) を導入した株を作製した(YCD101 株)。第 IV 番染色体は、1.5 Mb と 16 本存在する *S. cerevisiae* の染色体の中で、rDNA の存在する第 XII 番染色体に次いで大きな染色体であり¹⁰⁾、他の染色体と比べ必須遺伝子も 169 個と最も多いため、効果的であると考えた。また、*GAL1* プロモーターは、グルコース存在下では転写が抑制され、グルコース欠乏においてガラクトース存在下で誘導される。したがって、培地中の炭素源に依存しタイトに調節されるためこのプロモーターを選択した。この YCD101 株は、ガラクトース培地で培養するとレコンビナーゼが生産され、セントロメア DNA の両側に存在する RS に作用し、2 個の RS の間で組換えが起こる。染色体からセントロメア DNA が切り出されることで、有糸分裂による分配の際にセントロメア DNA を失うことで染色体は不分離を起こし、娘細胞に正確に分配されず、容易に細胞から染色体が脱落する。染色体を失った細胞は、生育に必要な遺伝子が多数欠けることになり細胞は致死となると予想される。

部位特異的組換え系は R タンパク質 (レコンビナーゼ)^{9,11)} の働きで 2 個の 58 bp の特異的な塩基配列の間で起こる組換えで、染色体の人為的な改変技術に利用できる (Fig. 1-1)

12-14)。部位特異的組換えは特異的な組換え酵素であるレコンビナーゼが特定の 2ヶ所の RS を認識して組換えを起こす。組換えを起こしたい染色体部位 2ヶ所に RS を挿入した後、レコンビナーゼを発現するプラスミドを導入する。レコンビナーゼの発現を誘導することにより部位特異的組換えが起こり、染色体が改変される。組換え部位の染色体上での位置と向きに応じて様々なタイプの組換えが可能である¹²⁻¹⁴⁾。RS が 1本の染色体上に 2ヶ所同じ方向に挿入された場合、RS で挟まれた領域の染色体 DNA が切り出される。逆方向に挿入された場合、RS で挟まれた領域の逆位が起こる。環状 DNA 分子と染色体 DNA の各々に RS が 1ヶ所挿入されていると環状 DNA が染色体 DNA へ組み込まれる。また、異なる染色体 DNA に各々 1ヶ所 RS が挿入されていると非相同染色体間で組換えが起こる (Fig. 1-2)。この組換えシステムは植物細胞などでも機能する^{15,16)}。

真核生物の染色体が体細胞分裂の際に、複製し正確に分配するために必要な DNA 配列が 3種類ある^{10,17)}。染色体上に多数存在し DNA の複製開始に働く複製起点、染色体の末端部に存在し染色体末端の DNA 複製と保護に働くテロメア、および染色体分配に働くセントロメアである。*S. cerevisiae* のセントロメア DNA は、細胞分裂の際、染色体上にある特異的な部位で種々のタンパク質が結合してキネトコア複合体が形成され、有糸分裂時および減数分裂時に伸長した微小管が結合する重要な配列である (Fig. 1-3)¹⁸⁻²²⁾。*S. cerevisiae* の一倍体細胞は、16本の染色体があり、染色体上に 1個のセントロメア DNA が存在している。セントロメア DNA は、全て約 125 bp のサイズで CDE I, CDE II, CDE III の 3つのエレメントから構成される共通構造が存在する。CDE II は 78~86 bp の A と T に富む配列である。8 bp の CDE I と 25 bp の CDE III は非常に高い共通配列を持ち、多数のタンパク質が結合してキネトコア複合体を形成する。この特異的な構造体であるキネトコアがスピンドル極体から伸長してきた微小管が結合するための足場となる。そのため、セントロメア DNA を失った染色体は有糸分裂時に正確に分配されず、染色体が容易に細胞から脱落し、細胞は生育に必須な遺伝子を多数失うため生育困難に陥り死に至る。このように、細胞増殖時に染色体からセントロメア DNA を切り出すと、染色体は正確に分配されず細胞死が起こる。したがって、部位特異的組換えを利用して細胞死を誘導することが可能である。

第 2 章では、染色体からセントロメア DNA を切り出すことによって細胞死を誘導するシステムの確立を目指した。まず、一倍体細胞における細胞死の誘導を検討するため、一倍体細胞の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に RS を同じ方向に挿入した後、この細胞に *GAL1* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するプラスミドを導入し、ガラクトースにより第 IV 番染色体のセントロメア DNA の切り出しが誘導される株を作製した(Fig. 2-1)。次に、この細胞をガラクトースプレートで培養した結果、生存率は 1.4×10^{-5} となり、大幅に低下した。また、ガラクトース液体培地でも生存率は培養時間に伴い経時的に低下した。この時セントロメア DNA の切り出しが起きていることは染色体 DNA のサザン解析によって確認できた。また、二倍体細胞において第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導することで細胞死を起こすことができた。一倍体細胞と二倍体細胞の両方で生存細胞が出現し、さらに、二倍体細胞では一倍体細胞と比べ生存率が高くなることが明らかとなった。そこで、二倍体細胞において、第 IV 番相同染色体に加え、第 V 番相同染色体からもセントロメア DNA の切り出しを誘導した結果、生存率が一倍体と同程度まで低下し、複数の染色体からのセントロメア DNA の切り出しが有効であることが示された。一倍体細胞と二倍体細胞で切り出しの誘導により細胞死を起こすことができ、細胞死の誘導システムを確立できた。また、不稔性質を付与するために、レコンビナーゼ遺伝子のプロモーターを孢子形成時に誘導するプロモーターに置き換え、孢子形成時に第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導したが、孢子の生存率はあまり低下しないことが示され、さらに改良すべきであることが分かった。

第 3 章では、セントロメア DNA を切り出しても生存細胞が僅かに出現するので、一倍体細胞で生存細胞が出現する原因を検討した。プレート培養で第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現した生存細胞クローン 51 株についてセントロメア DNA 近傍の PCR 解析、RS 領域の DNA シークエンス解析、染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動解析、およびレコンビナーゼ発現プラスミドの機能の解析などを行った。その結果、38 株（全クローン中 74.5%）のクローンが 2 個の RS のうち片方が染色体から欠失しており、これが原因で切り出しが起こらなかったことが示唆された。RS の欠失は全て RS の両端にある共通の配列(5'-TCGA-3' 配列)で挟まれた領域で起こっていた。また、3 株 (5.9%) のクローンで切り出しが起こっていた。パルスフィールドゲル電気泳動で分

離した染色体 DNA のサザン解析の結果、3 株の全てで第 IV 番染色体上には *CEN4* は存在しておらず、左腕のテロメア近傍や右腕のテロメア近傍の遺伝子は存在することが判明した。これらの生存細胞クローンでは切り出しが起こった後、セントロメアが新規に形成（ネオセントロメア形成）されたか、他の染色体のセントロメアが挿入された可能性が示唆された。さらに、残りの生存細胞クローンは RS の欠失以外の原因で切り出しが起こらなかったと考えた。生存細胞が出現する主な原因は、染色体から RS が 1 個欠失してセントロメア DNA の切り出しが起こらなかったことであることが明らかとなった。

第 4 章では、セントロメア DNA の切り出しによる細胞死誘導の効率を改善することを検討した。第 3 章で解析した結果から、RS の欠失が主な原因であったため RS の欠失を抑制することを検討した。一倍体細胞において RS の両端にある 2 個の共通した配列の間で欠失が起きていることが示唆されたため、一方の配列を置換することで生存率を 2.3×10^{-6} まで低下させることができた。また、この配列の置換により染色体からの RS の欠失が抑制されていることを確認した。

本研究で確立した細胞死の誘導システムは、第 4 章に記載のシステム改善により、生存率を 1×10^{-6} 程度まで低下させることが可能であり、滅菌の基準である無菌保証水準 (Sterility Assurance level: SAL)²³⁾ をほぼ達成できている。そのため、本システムは実用化においても十分な効果を発揮し、遺伝子組換え生物の野外への拡散防止策として利用することが可能であると考えている。また、セントロメア DNA の切り出しで出現した生存細胞クローンの解析において、ネオセントロメアが生じた可能性が示唆され、今後、核型進化やセントロメアの研究分野に興味深い知見を提供できると考えられる。

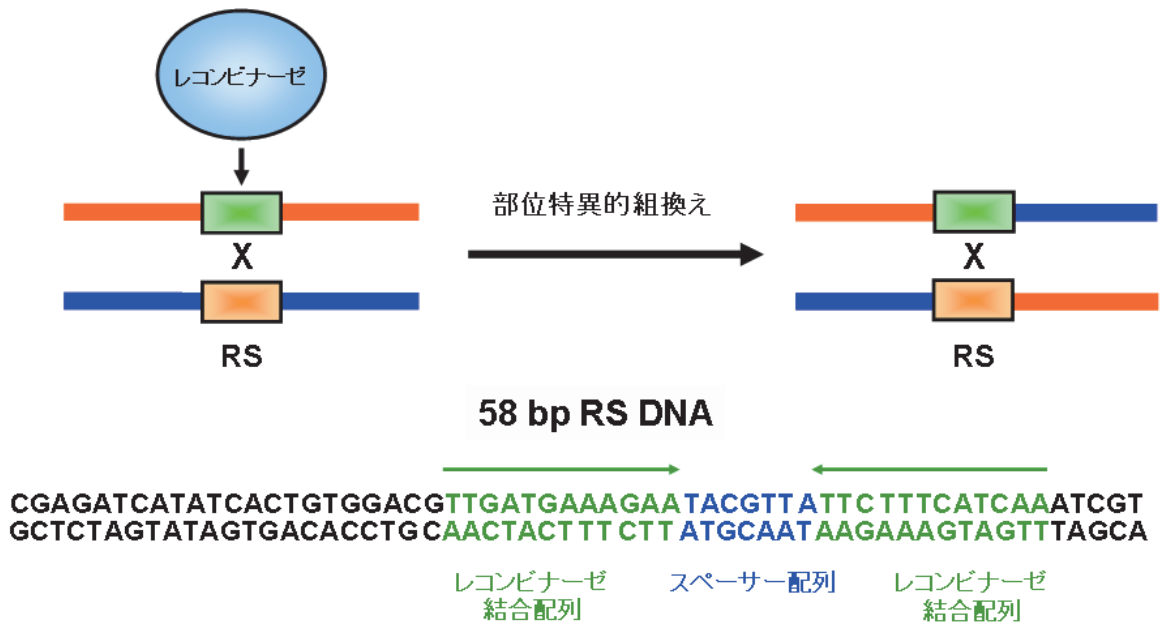


Fig. 1-1 *Zygosaccharomyces rouxii* 由来の pSR1 プラスミド

レコンビナーゼ(Rタンパク質)が58 bpのRSを認識し、2個のRS間で組換えを起こす。58 bpのRSは、スペーサー配列の両側にレコンビナーゼ結合配列が存在しておりレコンビナーゼが、レコンビナーゼ結合配列を認識し結合する。レコンビナーゼは2量体を形成しており、もう1個のRSに結合したレコンビナーゼと作用し4量体を形成し、組換えが起きる。

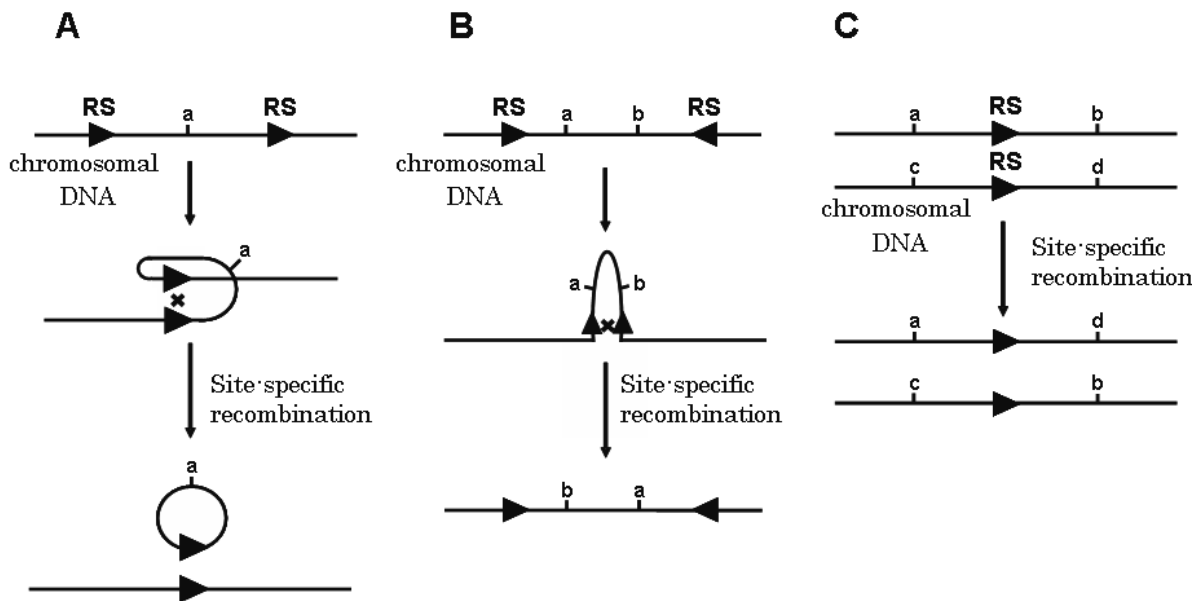


Fig. 1-2 部位特異的組換えによる染色体の人為的な改変技術。組換え標的部 (RS) の染色体上の挿入位置と方向に応じて、(A) 欠失、(B) 逆位、(C) 非相同染色体間の組換えが可能である。欠失では、2 個の RS を同じ向きに挿入することにより、2 個の RS によって挟まれた領域を染色体上から切り出すことができる。逆位では、2 個の RS 配列に挟まれた領域を逆向きにすることができ、非相同染色体間の組換えでは、異なる染色体の間でつなぎ換えを起こすことが可能である。

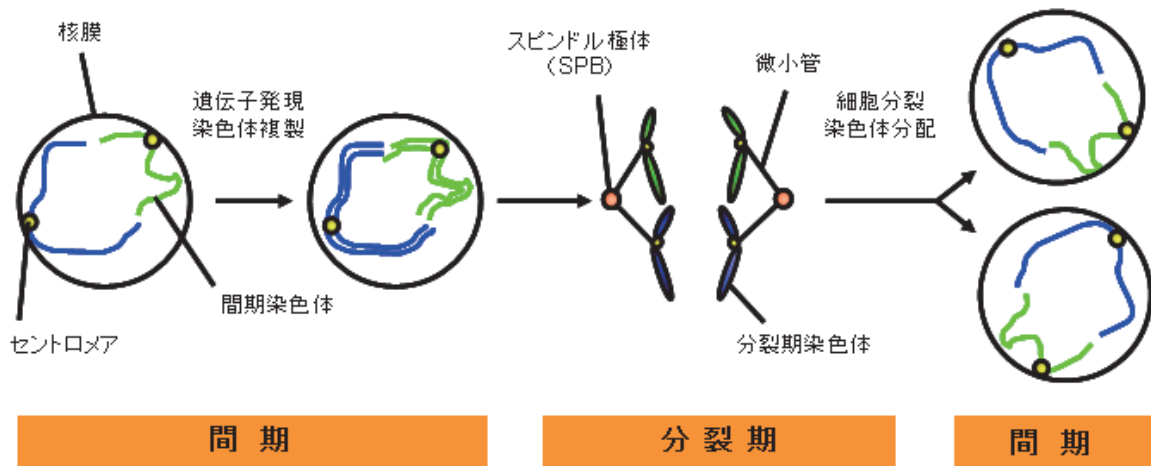


Fig. 1-3 *S. cerevisiae* のセントロメア DNA。一倍体細胞では染色体は 16 本存在し、セントロメア DNA は各染色体上に 1 個存在している。セントロメア DNA は、約 125 bp で、共通構造である CDEI, CDEII, CDEIII のエレメントが存在しており、通常の H3 に代わり変異 H3 ヒストンを 2 分子からなるヌクレオソームを構築し、しだいにキネトコア構造を形成する。また、*S. cerevisiae* のセントロメアは、微小管が 1 本しか捕捉しない点で特徴的である。しかし、他の生物と同様に染色体を維持するためにはセントロメア DNA は必須であることには変わりない。DNA 分配時に染色体の複製が起こり、有糸分裂期に入ると SPB から伸張した微小管が姉妹染色分体上のキネトコアに結合し、それぞれが面する SPB 側へと均等に分配される。したがって、染色体からのセントロメア DNA の欠失は、細胞分裂時に染色体の不分離を起こし、染色体を失った細胞は生育できない。

第2章 染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導

第1節 緒言

遺伝子組換え技術は、食糧危機や環境問題など問題を解決する糸口として期待されている技術の一つである。組換え微生物では、医薬品や酵素製剤の大量生産が可能となり、組換え植物は数十年かかる作物の品種改良の期間を大幅に短縮させ、有用な形質を持たせることで付加価値を付与した。しかし、新たな技術の誕生は、新たな懸念が付きものである。遺伝子組換え技術も例外ではない。組換え生物が野外環境へ拡散した場合、生態系の変化をもたらす可能性がある。そこで、遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐために物理的な封じ込めや、隔離など環境への負担を配慮したバイオセーフティの考え方が求められるようになった。遺伝子組換え生物を扱う際に自然環境中への拡散によるリスク管理や、環境浄化に利用した後に不要となった場合など、事前に条件致死性質を付加させておくことにより、遺伝子組換え生物を遺伝子レベルでコントロール下に置くことが可能であると考えられる。

そこで、出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として、酵母 *Z. rouxii* 由来の pSR1 プラスミドに備わっている部位特異的組換え系を利用して、染色体からセントロメア DNA を切り出し、染色体の分配機能を欠損させて細胞死を誘導するシステムの開発を目指した(Fig. 2-1)。まず、一倍体細胞における細胞死を検証するため、KA311A 株の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部位 (RS) を同じ方向に挿入した後、*GALI* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するレコンビナーゼ発現プラスミド (*R* 発現プラスミド) を導入し、ガラクトースにより第 IV 番染色体のセントロメア DNA の切り出しを誘導する株を作製した(YCD101 株)。次に、この YCD101 株においてガラクトースプレートで培養した結果、生存率は 1.4×10^{-5} となり大幅に低下した。また、ガラクトース液体培地でも培養時間に伴い経時的に生存率は低下した。また、染色体 DNA のサザン解析によってセントロメア DNA の切り出しが確認できたため、一倍体細胞において部位特異的組換え系を利用し染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導できることを証明した。

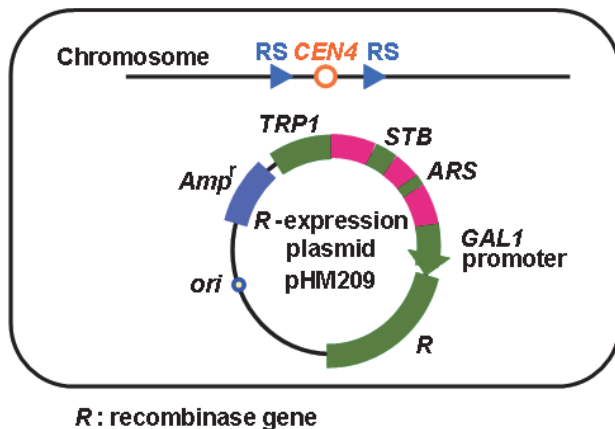
次に、二倍体細胞における細胞死の誘導を検討した。高等生物の多くは二倍体細胞で存在しているため、細胞死誘導システムを二倍体に導入することで効果を検証することは重要な意味を持つ。

二倍体細胞では、相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導することで細胞死を起こすことが可能であると考えられる。そこで、一倍体細胞と同様に第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しを検討した。しかし、二倍体細胞では一倍体細胞と比べ生存率が高くなる傾向が明らかになった。そこで、二倍体細胞において、第 IV 番染色体に加え第 V 番染色体からもセントロメア DNA の切り出しを誘導した結果、生存率が一倍体と同程度まで低下し複数の染色体からのセントロメア DNA の切り出しが有効であることが示された。

以上、出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデルとして、一倍体細胞および二倍体細胞で部位特異的組換え系を利用して相同染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導するシステムを確立することができた。

次に、細胞死の誘導条件について検討した。これまでは、*GAL1* プロモーターを利用しており、ガラクトース存在下でのみレコンビナーゼが発現し細胞死が誘導されるシステムであったが、実用化の際には様々な条件に対応できる柔軟性が求められる。そこで、減数分裂時に機能するプロモーターを利用し細胞死を誘導することで不稔性質を付与できると考えた。出芽酵母 *S. cerevisiae* は、栄養が枯渇した環境にさらされると増殖を停止し、減数分裂と孢子形成を行うため、減数分裂の初期、中期および後期に機能する各プロモーターを利用し、細胞死を誘導したが大幅な生存率の低下は認められなかった。

A. Yeast cell for induction of cell death (haploid)



B. Cell death by excision of CEN DNA

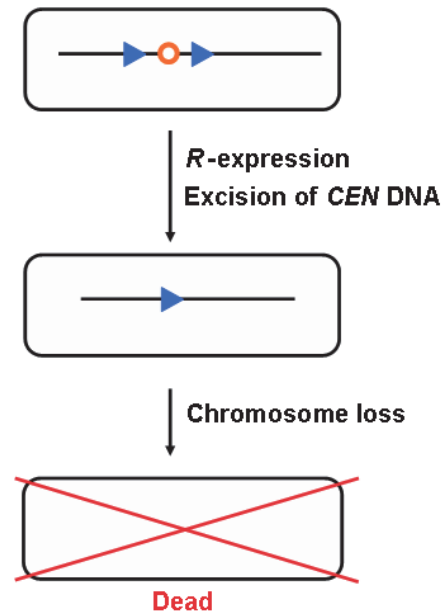


Fig. 2-1 一倍体における細胞死のシステム

A. 細胞死を誘導するための酵母細胞の模式図。B. セントロメア DNA の切り出しによる細胞死の概要。

一倍体細胞において、第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部 (RS) を同じ向きに挿入し、*GAL1* プロモーターの制御下でレコμβナーゼを発現するプラスミド (*R*-発現プラスミド : pHM209) を導入した酵母を作製した。この細胞はガラクトース培地で培養すると、レコμβナーゼが生産され 2 個の RS 間で組換えが起こり、第 IV 番染色体からセントロメア DNA の切り出しが誘導される。セントロメア DNA を失った染色体は細胞分裂時に細胞から脱落し、細胞は致死となる。

第2節 材料および方法

2.1 使用菌株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチド

本研究で使用した酵母 *S. cerevisiae* 株を Table 2-1 に、プラスミドを Table 2-2 に、オリゴヌクレオチドを Table 2-3 に示す。また、プラスミド作製の宿主として *Escherichia coli* DH5α [F⁻ φ80d*lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA-argF*) *U169 recA1 endA1 hsdR17*(r_K, m_K) *supE44* λ⁻ *thi-1 gyrA relA1*] ²⁴⁾を使用した。

Table 2-1 Strains used in this study

Strain	Description	Reference
KA311A	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i>	25
KA311B	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i>	26
YCD101	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209]	This study
YCD102	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209R]	This study
YCD103	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) [pHM209]	This study
YCD104	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) [pHM209R]	This study
YCD105	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. V (RS- <i>CEN4-URA3</i> -RS) [pHM209]	This study
YCD106	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. V (RS- <i>CEN4-URA3</i> -RS) [pHM209R]	This study
YCD107	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) [pRS315]	This study

YCD108	<i>MATα his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pRS315]	This study
YCD109	<i>MATα his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. V (RS- <i>CEN4-URA3</i> -RS) [pRS315]	This study
YCD110	<i>MATα his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) Chr. V (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pRS315]	This study
YCD111	<i>MATα his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209]	This study
YCD112	<i>MATα his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209R]	This study
YCD113	<i>MATα his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) Chr. V (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209]	This study
YCD201	<i>MATα/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) / Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209] [pRS315]	This study
YCD202	<i>MATα/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) / Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS)[pHM209] [pRS315]	This study
YCD203	<i>MATα/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) / Chr. IV (<i>CEN4</i>) [pHM209] [pRS315]	This study
YCD204	<i>MATα/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2</i>	This study

	<i>pho3-1/pho3-1</i> Chr. V (RS- <i>CEN4-URA3</i> -RS) / Chr. V (RS- <i>CEN4-URA3</i> -RS) [pHM209] [pRS315]	
YCD205	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/</i> <i>leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2</i> <i>pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) / Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) Chr. V (RS- <i>CEN4-URA3</i> -RS) / Chr. V (RS- <i>CEN4-URA3</i> -RS) [pHM209] [pRS315]	This study
YCD301	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/</i> <i>leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2</i> <i>pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) / Chr. IV (<i>CEN4</i>) <i>leu2:: RMD1</i> [pRS315]	This study
YCD302	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/</i> <i>leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2</i> <i>pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) / Chr. IV (<i>CEN4</i>) <i>leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pRS314]	This study
YCD304	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/</i> <i>leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2</i> <i>pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) / Chr. IV (<i>CEN4</i>) <i>leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pZR314]	This study
YCD305	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/</i> <i>leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2</i> <i>pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) / Chr. IV (<i>CEN4</i>) <i>leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pIR314]	This study
YCD306	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/</i> <i>leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2</i> <i>pho3-1/pho3-1</i> Chr. IV (<i>CEN4</i>) / Chr. IV (<i>CEN4</i>) <i>leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pSR1314]	This study

YCD307	<i>MATa/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1 [pRS315] [pSR0314]</i>	This study
YCD308	<i>MATa/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1 [pRS315] [pZG3324]</i>	This study
YCD309	<i>MATa/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1 [pRS315] [pIG324]</i>	This study
YCD310	<i>MATa/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1 [pRS315] [pSG1324]</i>	This study
YCD311	<i>MATa/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1 [pRS315] [pSG0324]</i>	This study
YCD312	<i>MATa/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1 [pRS315] [pDG324]</i>	This study
YCD313	<i>MATa/MATα his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4)</i>	This study

	<i>leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pNR324]	
YCD315	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pZNR3324]	This study
YCD316	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pINR324]	This study
YCD317	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pSNR1324]	This study
YCD318	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pSNR0324]	This study
YCD319	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pDNR324]	This study
YCD320	<i>MATa/MATa his3-532/ his3-532 leu2-3, 112/ leu2-3,112 trp1-289 / trp1-289 ura3-1,2/ ura3-1,2 pho3-1/pho3-1 Chr. IV (CEN4) Chr. IV (CEN4) leu2:: RMD1</i> [pRS315] [pYO324]	This study

Table 2-2 Plasmids used in this study

Plasmid	Description	reference
pHM209	2 μ m- <i>ARS STB P_{GALT} R TRP1 Amp^r ori</i>	25
pHM409	RS- <i>CEN4-HIS3-RS Amp^r ori</i>	This study
pRS314	<i>CEN6 ARSH4 TRP1 lacZ Amp^r ori</i>	27
pRS314-R	<i>CEN6 ARSH4 TRP1 lacZ R Amp^r ori</i>	This study
pZR314	<i>CEN6 ARSH4 TRP1 P_{ZIPr} R Amp^r ori</i>	This study
pRS315	<i>CEN6 ARSH4 LEU2 lacZ Amp^r ori</i>	27
pRS316	<i>CEN6 ARSH4 URA3 lacZ Amp^r ori</i>	27
YCp19	<i>CEN4 ARS1 TRP1 URA3 Amp^r ori</i>	28
pGC2	RS- <i>CEN4-URA3-RS Amp^r ori</i>	This study
pYO324	2 μ m DNA- <i>ARS STB Amp^r ori</i>	This study
pYO324R	2 μ m DNA- <i>ARS STB R Amp^r ori</i>	This study
pZR3314	<i>CEN6 ARSH4 TRP1 P_{ZIP1-3}-R Amp^r ori</i>	This study
pIR314	<i>CEN6 ARSH4 TRP1 P_{IME2}-R Amp^r ori</i>	This study
pSR1314	<i>CEN6 ARSH4 TRP1 P_{SPS1}-R Amp^r ori</i>	This study
pSR0314	<i>CEN6 ARSH4 TRP1 P_{SPS100}-R Amp^r ori</i>	This study
pZG3324	2 μ m DNA- <i>ARS STB TRP1</i> <i>P_{ZIP1-3}-GFP Amp^r ori</i>	This study
pIG324	2 μ m DNA- <i>ARS STB TRP1</i> <i>P_{IME2}-GFP Amp^r ori</i>	This study
pSG1324	2 μ m DNA- <i>ARS STB TRP1</i> <i>P_{SPS1}-GFP Amp^r ori</i>	This study
pSG0324	2 μ m DNA- <i>ARS STB TRP1</i> <i>P_{SPS100}-GFP Amp^r ori</i>	This study
pDG324	2 μ m DNA- <i>ARS STB TRP1</i> <i>P_{DIT1}-GFP Amp^r ori</i>	This study
pNR324	2 μ m DNA- <i>ARS STB TRP1 R</i>	This study

	<i>Amp^r ori</i>	
pZNR3324	2μm DNA- <i>ARS STB TRP1</i>	This study
	<i>P_{ZIP1-3}-R Amp^r ori</i>	
pINR324	2μm DNA- <i>ARS STB TRP1</i>	This study
	<i>P_{IME2}-R Amp^r ori</i>	
pSNR1324	2μm DNA- <i>ARS STB TRP1</i>	This study
	<i>P_{SPS1}-R Amp^r ori</i>	
pDNR324	2μm DNA- <i>ARS STB TRP1</i>	This study
	<i>P_{DIT1}-R Amp^r ori</i>	

Table 2-3 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence
HIS3code	5'-TAGCGATAGAGCACTCGATC-3'
HIS3Non	5'-GATCGAGTGCTCTATCGCTA-3'
DIT1P3	5'-GGGGATCCTTTTGTTAATGTCTCGACAAAGC-3'
DIT1P5	5'-GGGAGCTCCTATTTCGCATCAGGATGACC-3'
CEN4P31	5'-TGTATGTCCATGATTCGCCG-3'
CEN4P51	5'-AACTGTGACCGATAAAACCGG-3'
CEN4CD-2	5'-AACTCTAAGAGGAGGTGTGATACTTAT-3'
CEN4CD-1	5'-CTGGGCCATTCTCATGAAGA-3'
SPS1P3Ba	5'-GGGGATCCTTTGTGCTATTTTCTTTGTTG-3'
SPS1P5Sa	5'-GGGAGCTCCATTCCTAAGTCTTC-3'
SPS100P3Ba	5'-GGGGATCCAATAGCTGATTGGGTTCTTAG-3'
SPS100P5Sa	5'-GGGAGCTCCCAAGCCATCTCATGTTATC-3'
HIS3CD-2	5'-GGAAAGCGCGCCTCGTTCAG-3'
ZIP13P5Sa	5'-GGGAGCTCACCTGTTCATCGTTGACGAA-3'
ZIP1P3Ba	5'-GGGGATCCTCTCTAAAAATTTAGCCGCCGAGG-3'

CEN5C3P	5'-TATCGGAAACGTGTACCGTG-3'
HIS3CD-1	5'-TCCGCTGCACGGTCCTGTTC-3'
ZIP1seq5-2	5'-TAGCTGAATATTGTCACCTC-3'
HIS3CD-1	5'-TCCGCTGCACGGTCCTGTTC-3'
CEN5C1P	5'-ACATGCTACATAAGTCCGAG-3'
IME2P5Sa	5'-GGGAGCTCAGATAAACCCAATGCCCCAG-3'
IME2P3Ba	5'-GGGATCCAAATGACCTATTAAGTTAAGCTT-3'
GFP5Bam	5'-GGGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC-3'
GFP3Sal	5'-GGGTCGACTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC-3'
MATL	5'-GCCAATAAGACTCTACCCAG-3'
MATR	5'-GTCCCGTATAGCCAATTCGT-3'
MATX	5'-CACTCTCTGGTAACTTAGGT-3'
HIS3Rseq	5'-CCTCCACCAAAGGTGTTCTT-3'
URA3-5	5'-GGTAATCTCCGAGCAGAAGG-3'
URA3-3	5'-ATCATTACGACCGAGATTCC -3'

2.2 使用培地

2.2.1 大腸菌用完全培地 [Luria-Bertani (LB) 培地]

E. coli の培養には、LB 培地を使用した。脱イオン水に Yeast extract (DIFCO Laboratories: Detroit, MI, U.S.A.) 5 g、Trypton (DIFCO Laboratories) 10 g、NaCl (和光純薬工業株式会社) 5 g を溶かし、1 N NaOH (和光純薬工業株式会社) 1 ml を加えた後、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 15 g を加えた。また、アンピシリン耐性選択培地を作製する場合は、オートクレーブ滅菌後に最終濃度 50 µg/ml となるようにアンピシリン (Viccillin: 明治製菓株式会社) を加えた。

2.2.2 酵母用完全培地 (YPAD 培地)

Yeast extract (DIFCO Laboratories: Detroit, MI, U.S.A.) 10 g、Bacto-pepton (DIFCO Laboratories) 20 g、グルコース (和光純薬工業株式会社) 20 g、アデニン硫酸塩 (和光純薬工業株式会社) 0.06 g を量り取り、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 20 g を加えた。

2.2.3 2%グルコース合成選択培地 (SGlc (H-X) 培地)

Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids & Ammonium Sulfate (DIFCO Laboratories: Detroit, MI, U.S.A.) 1.7 g、硫酸アンモニウム (ナカライテスク株式会社) 5.0 g、グルコース (和光純薬工業株式会社) 20 g、アデニン硫酸塩 (和光純薬工業株式会社) 0.06 g を量り取り、アミノ酸・核酸塩基混合液 H [ウラシル、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニンを各 0.4 g/l、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン塩酸塩を各 0.6 g/l、バリンを 3.0 g/l、フェニルアラニンを 1.2 g/l (以上、和光純薬工業株式会社またはナカライテスク株式会社)] から選択したいアミノ酸または核酸塩基 (X) を除いた溶液 (H-X 溶液) 50 ml を加え、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 20 g を加えた。

2.2.4 5%グルコース合成選択培地 (SGlc (H-X) 培地)

染色体からのセントロメア DNA の切り出しのコントロールとして 5%グルコース合成選択培地を使用した。

Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids & Ammonium Sulfate (DIFCO Laboratories: Detroit, MI, U.S.A.) 1.7 g、硫酸アンモニウム (ナカライテスク株式会社) 5 g、グルコース (和光純薬工業株式会社) 50 g、アデニン硫酸塩 (和光純薬工業株式会社) 0.06 g を量り取り、アミノ酸・核酸塩基混合液 H [ウラシル、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニンを各 0.4 g/l、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン塩酸塩を各 0.6 g/l、バリンを 3.0 g/l、フェニルアラニンを 1.2 g/l (以上、和光純薬工業株式会社またはナカライテスク株式会社)] から選択したいアミノ酸または核酸塩基 (X) を除いた溶液 (H-X 溶液) 50 ml を加え、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 20 g を加えた。

2.2.5 5%ガラクトース合成選択培地 (SGal (H-X) 培地)

染色体からのセントロメア DNA の切り出しにおいてレコンビナーゼの発現を誘導するために 5%ガラクトース合成選択培地を使用した。

Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids & Ammonium Sulfate (DIFCO Laboratories : Detroit, MI, U.S.A.) 1.7 g、硫酸アンモニウム (ナカライテスク株式会社) 5.0 g、ガラクトース (和光純薬工業株式会社) 50 g、アデニン硫酸塩 (和光純薬工業株式会社) 0.06 g を量り取り、アミノ酸・核酸塩基混合液 H [ウラシル、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニンを各 0.4 g/l、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン塩酸塩を各 0.6 g/l、バリンを 3.0 g/l、フェニルアラニンを 1.2 g/l (以上、和光純薬工業株式会社またはナカライテスク株式会社)] から選択したいアミノ酸または核酸塩基 (X) を除いた溶液 (H-X 溶液) 50 ml を加え、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 20 g を加えた。

2.2.6 5%ラフィノース合成選択培地 (SRaf (H-X) 培地)

染色体からのセントロメア DNA の切り出しにおいて前培養として 5%ラフィノース合成選択培地を使用した。

Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids & Ammonium Sulfate (DIFCO Laboratories : Detroit, MI, U.S.A.) 1.7 g、硫酸アンモニウム (ナカライテスク株式会社) 5.0 g、ラフィノース (和光純薬工業株式会社) 50 g、アデニン硫酸塩 (和光純薬工業株式会社) 0.06 g を量り取り、アミノ酸・核酸塩基混合液 H [ウラシル、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニンを各 0.4 g/l、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン塩酸塩を各 0.6 g/l、バリンを 3.0 g/l、フェニルアラニンを 1.2 g/l (以上、和光純薬工業株式会社またはナカライテスク株式会社)] から選択したいアミノ酸または核酸塩基 (X) を除いた溶液 (H-X 溶液) 50 ml を加え、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 20 g を加えた。

2.2.7 前孢子形成培地 (preSPO 培地)

酢酸カリウム (ナカライテスク株式会社) 10 g、Yeast extract (DIFCO Laboratories : Detroit, MI, U.S.A.) 1.25 g、グルコース (和光純薬工業株式会社) 1 g、アミノ酸・核酸塩基混合液 H [ウラシル、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニンを各 0.4 g/l、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン塩酸塩を各 0.6 g/l、バリンを 3.0 g/l、フェニルアラニンを 1.2 g/l (以上、和光純薬工業株式会社またはナカライテスク株式会社)] から選択したいアミノ酸または核酸塩基 (X) を除いた溶液 (H-X 溶液) 50 ml を加え、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 20 g を加えた。

2.2.8 孢子形成培地 (SPO 培地)

二倍体細胞で孢子形成時にレコンビナーゼの発現を誘導するために孢子形成培地を使用した。酢酸カリウム (ナカライテスク株式会社) 20 g、アミノ酸・核酸塩基混合液 H [ウラシル、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニンを各 0.4 g/l、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン塩酸塩を各 0.6 g/l、バリンを 3.0 g/l、フェニルアラニンを

1.2 g/l (以上、和光純薬工業株式会社またはナカライテスク株式会社)] から選択したいアミノ酸または核酸塩基 (X) を除いた溶液 (H-X 溶液) 50 ml を加え、脱イオン水を加えて全容を 1 l とした。平板培地を調製する場合は、これに寒天 (和光純薬工業株式会社) 20 g を加えた。

2.2.9 フィルム培地

四分子分析に使用するため、YPAD 寒天フィルム培地を作製した。YPAD 寒天培地をオートクレーブ滅菌後、メスピペットで YPAD 寒天培地溶液 5 ml を量り取った。直径 9 cm シャーレに注入し、均等な厚さになるように薄く広げた後、固化させた。寒天フィルム培地は、火炎滅菌 (アルコール滅菌) したマイクロスパーテルで 1.5 x 4 cm のサイズに切り取って四分子分析に使用した。

2.3 滅菌および培養

培地は、全てオートクレーブ (1 kgf/cm²、10 分間) で滅菌して使用した。酵母は、28 °C で静置培養 (Lo-Temp Incubator Model IL62 : ヤマト科学株式会社) または振とう培養 (120 rpm : Bio-Shaker BR-300LF・株式会社タイテック) を行った。大腸菌は、37 °C で静置培養 (IS62・ヤマト科学株式会社) または振とう培養 (120 rpm : Bio-Shaker BR-300L・株式会社タイテック) を行った。

2.4 DNA の精製

2.4.1 エタノールによる DNA の沈殿 (エタノール沈殿)

DNA を含む溶液に 1/10 容の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液 (和光純薬工業株式会社) を加え、さらにその 2.5 倍容の 99.5% エタノールを加えて混合し、-80 °C で 10 分間放置した。遠心分離 (13,000 rpm、7 分間 : MX-100 微量高速遠心機、株式会社トミー精工) を行い、上清を取り除いた。99.5% エタノール 1 ml を加えて遠心分離 (13,000 rpm、3 分間 : MX-100 微量高速遠心機) した後、エタノールを捨て、DNA を洗浄した (エタノールリンス)。DNA を減圧下で乾固した。

2.4.2 フェノール-クロロホルム抽出

DNA 溶液からタンパク質などの不純物を取り除くために、フェノール-クロロホルム抽出による不純物の除去操作を行った。DNA を含む溶液に TE 緩衝液 [10 mM トリス-塩酸 (pH8.0)、1 mM Na₂EDTA] に飽和させたフェノールあるいはフェノール-クロロホルム (v : v = 1 : 1) 混合液を等容加えて混合した。1.5 ml 容マイクロチューブを用いて遠心分離 (13,000 rpm、10 分間 : MX-100 微量高速遠心機、株式会社トミー精工) した後、DNA 画分である上層を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。この操作を 2 回繰り返した。

2.5 DNA の調製

2.5.1 大腸菌からのアルカリ変性によるプラスミド DNA の少量調製

プラスミド DNA を簡便に調製する方法として Birnboim と Doly によるアルカリ変性法²⁹⁾ を一部改変した方法を用いた。50 µg/ml アンピシリンを含む LB 平板培地で一晚静置培養した大腸菌を約 2~3 cm² かき取り、1.5 ml 容マイクロチューブに移し、I 液 [50 mM グルコース、25 mM Tris ヒドロキシアミノメタン-HCl (pH8.0) 、10 mM Na₂EDTA] 0.1 ml に懸濁した。II 液 [0.2 N NaOH、1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS : 和光純薬工業株式会社)] 0.2 ml を加え、穏やかに攪拌して、氷中で 5 分間放置した。さらに、III 液 [3 M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH4.8)] 0.15 ml を加え、激しく攪拌した後、氷中で 15 分間放置した。遠心分離 (14,000 rpm、10 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機・株式会社トミー精工) し、得られた上澄みを新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに移した。99.5%エタノール 1 ml を加えて攪拌し、遠心分離 (12,000 rpm、5 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) し、DNA を回収した。上澄みを捨て、沈殿に IV 液 [0.1 M 酢酸ナトリウム、50 mM Tris-HCl (pH8.0)] 0.1 ml を加えて溶解した。99.5%エタノール 0.25 ml を加えて攪拌し、遠心分離 (12,000 rpm、5 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) し、DNA を回収した。再び上澄みを捨て、99.5%エタノール 1 ml を加え、遠心分離 (12,000 rpm、3 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) し、DNA を洗浄した。上澄みを捨て、減圧下で乾固した。乾固 DNA を TE 緩衝液 50 µl に溶解し、4 °C で保存した。

2.5.2 QIAprep-Spin Miniprep Kit によるプラスミド DNA の少量調製

少量のプラスミド DNA を高純度で調製するために QIAprep-Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH : Hilden, Germany) を用いた。50 µg/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 5 ml で大腸菌を一晩振とう培養した。1.5 ml 容マイクロチューブに培養液を移し、集菌 (13,000 rpm、1 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機・株式会社トミー精工) した。P1 緩衝液 (菌体懸濁緩衝液 : キットに付属、使用する前に付属の 10 mg/ml RNase A 溶液 200 µl を加えた) 250 µl を加え、懸濁した。P2 緩衝液 (溶菌緩衝液 : キットに付属) 250 µl を加えて穏やかに 4~6 回逆さまにして攪拌して溶菌した。N3 緩衝液 (中和緩衝液 : キットに付属) 350 µl を加え、穏やかに 4~6 回逆さまにして攪拌し、遠心分離 (14,000 rpm、10 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) した。上清 (プラスミド DNA 溶液) を 2 ml 容のコレクションチューブにセットしたカラムに移し、遠心分離 (13,000 rpm、1 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) した。この操作で DNA はカラムに結合する。通過液を捨て、PB 緩衝液 (キットに付属) 500 µl を加え、遠心分離 (13,000 rpm、1 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) した。通過液を捨て、DNA を洗浄した。カラムに PE 緩衝液 (洗浄緩衝液 : キットに付属、PE 濃縮液 6 ml に 99.5% エタノール 24 ml を加えて調製した) 750 µl を加え、遠心分離 (13,000 rpm、1 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) し、通過液を捨て DNA を洗浄した。再度、遠心分離 (13,000 rpm、1 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) し、カラム内の溶液を完全に取除いた。カラムを新しい 1.5 ml 容マイクロチューブにセットした後、カラムの中央に EB 緩衝液 (溶出緩衝液 : キットに付属) 50 µl または 100 µl を加えて、1 分間放置した。遠心分離 (13,000 rpm、1 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機) してカラムから DNA を溶出した。再度、この溶出操作を繰り返した後、エタノール沈殿、エタノールリンスを行い、DNA を回収した。減圧下で DNA を乾固した。乾固 DNA を TE 緩衝液 50 µl に溶かし、4 °C で保存した。

2.5.3 Hispeed plasmid Midi kit を用いた DNA の調製

QIAprep-Spin Miniprep Kit よりも多量のプラスミド DNA を調製するために Hispeed plasmid Midi kit (Qiagen GmbH : Hilden, Germany) を用いた。50 µg/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 5 ml で大腸菌を 8 時間振とう培養した。培養液 100 µl を新鮮な 50

μg/ml アンピシリンを含む LB 液体培地 150 ml に植菌して一晩振とう培養した。500 ml 容遠心管に培養液を全量移し、集菌 (7,000 rpm、5 分 : RS-20IV 遠心機、TA-16 ローター・株式会社トミー精工) した。菌体に滅菌水 5 ml を加えて懸濁し、50 ml 容プラスチック製遠心チューブに移して集菌 (3,000 rpm、10 分間 : 05PR-22 遠心機、日立工機株式会社) した。菌体を P1 緩衝液 (菌体懸濁緩衝液 : キットに付属) 6 ml で懸濁した。P2 緩衝液 (溶菌緩衝液 : キットに付属) 6 ml を加えて、穏やかに 4~6 回逆さまにして攪拌し、室温で 5 分間放置した。P3 緩衝液 (中和緩衝液 : キットに付属、冷蔵) 6 ml を加えて、穏やかに 4~6 回逆さまにして攪拌した。スクリューキャップを取り付けた QIA フィルターカートリッジに溶菌液を移し、室温で 10 分間放置した。この間に、Hispeed Midi Tip に QBT 緩衝液 (平衡化緩衝液 : キットに付属) 4 ml を加え、チップ内の緩衝液がなくなるまで放置して、フィルターを平衡化し、QIA フィルターカートリッジのキャップを取り外し、QIA フィルターカートリッジにプランジャーを一定の力で穏やかに挿入し、QIA フィルターカートリッジ内の液を平衡化済みの Hispeed Midi Tip に注ぎ入れた。この操作によって、タンパク質は QIA フィルターカートリッジのフィルターにトラップされ、プラスミド DNA は Hispeed Midi Tip のフィルターに結合する。QC 緩衝液 (洗浄緩衝液 : キットに付属) 20 ml を Hispeed Midi Tip に注ぎ入れ、DNA を洗浄した。QF 緩衝液 (溶出緩衝液 : キットに付属) 5 ml を Hispeed Midi Tip に注ぎ入れ、DNA を溶出させ、13 ml 容丸底遠心チューブ (アシスト株式会社) に回収した。この DNA 溶液にイソプロパノール 3.5 ml を加え、室温で 5 分間放置した。この液を QIA precipitator Midi Module を取り付けた 20 ml シリンジに移し、プランジャーを一定の力で挿入し、液を QIA precipitator を通過させた。この操作で DNA は QIA precipitator Midi Module のフィルターに結合する。20 ml シリンジから QIA precipitator を取り外しプランジャーを外した後、再び 20 ml シリンジにセットし、20 ml シリンジに 70%エタノール 2 ml を注ぎ入れ、プランジャーを挿入して 70%エタノールを QIA precipitator を通過させ、DNA を洗浄した。

QIA precipitator をシリンジから取り外した後、シリンジからプランジャーを外した。再度シリンジを QIA precipitator にセットしてプランジャーを素早く挿入し、QIA precipitator に空気を送り DNA を乾燥させた。この乾燥操作を 2 回繰り返した。シリンジから QIA precipitator を外し、QIA precipitator を 5 ml シリンジに付け変えた。シリン

ジに TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、1 mM Na₂EDTA) 1 ml を注ぎ入れ、プランジャーを挿入して DNA を溶出させ、DNA 溶液を 1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。溶出された DNA 溶液を同様の方法で再度 QIA precipitator を通過させ、溶出液を 1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。フェノール-クロロホルム抽出、エーテル抽出、エタノール沈殿、エタノールリンスを行って DNA を回収した。DNA を減圧下で乾固した後、TE 緩衝液 300 µl に溶かし、4 °C で保存した。

2.5.4 *Saccharomyces cerevisiae* からの染色体 DNA の調製

S. cerevisiae からの染色体 DNA の調製は、Hereford らの方法³⁰⁾ に従った。酵母を YPAD 液体培地 8 ml に植菌し、28 °C で一晩振とう培養した。この培養液を M2 サイズの試験管に移し、集菌 (3,000 rpm、5 分間、4 °C : himac CF7D2 遠心機、日立工機株式会社) した。菌体を 0.2 M トリス (ヒドロキシアミノメタン) 水溶液 [(pH 未調整)、和光純薬工業株式会社] 1.0 ml に懸濁し 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、β-メルカプトエタノール (和光純薬工業株式会社) 50 µl を加え混合した。室温で 30 分間放置した後、集菌 (3,000 rpm、5 分間、4 °C : MX-100 微量高速遠心機、株式会社トミー精工) した。菌体をザイモリアーゼ溶液 [0.125 mg/ml Zymolyase 100T (生化学工業株式会社)、1.0 M ソルビトール、40 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8)] 1.0 ml に懸濁し、28 °C で 1 時間放置しスフェロプラスト化した。集菌 (3,000 rpm、5 分間 : MX-100 微量高速遠心機) し、菌体を溶菌緩衝液 [0.2 M 塩化ナトリウム、0.1 M Na₂EDTA、5% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、50 mM Tris-HCl (pH8.5)] 0.5 ml に懸濁した。1 mg/ml プロナーゼ [アクチナーゼ E (科研製薬株式会社) : 使用する前に 37 °C で 1 時間放置し DNase を失活させた。] 水溶液 5 µl を加え混合し 60 °C で 30 分間放置して溶菌した。この溶菌液に TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM Na₂EDTA] で飽和したフェノール-クロロホルム混合液 (v : v = 1 : 1) 0.5 ml を加え穏やかに攪拌した。遠心分離 (14,000 rpm、10 分間 : MX-100 微量高速遠心機) 後、上層液を別の 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、タンパク質を除いた。もう一度除タンパク質操作を行い、上層液に 2 倍容の 99.5%エタノールを加え、穏やかに攪拌後、DNA 沈殿を回収した。DNA を 70%エタノールで洗浄後、減圧下で 20 分間乾固した。乾固 DNA に TE 緩衝液 (pH8.0) 300 µl を加え 4 °C で一晩放置し、DNA を溶解し、DNA

溶液に 1 mg/ml RNase [Ribonuclease A (Sigma Aldrich chemical company, St. Louise, MO, U. S. A.):使用する前に沸騰水浴で 15 分間加熱しゆっくり冷却して DNase を失活させた。] 水溶液 30 μ l を加え 37 °C で 30 分間時々穏やかに混ぜながら反応させた。この DNA 溶液に 1 mg/ml プロナーゼ水溶液 3 μ l を加え 37 °C で 30 分間時々穏やかに混ぜながら反応させた。フェノール-クロロホルム抽出による除タンパク質操作を 2 回行った後、2 倍量の 99.5%エタノールを加え、DNA 沈殿を回収した。DNA を 70%エタノールで洗浄後、減圧下で 20 分間乾固した。乾固 DNA に TE 緩衝液 (pH8.0) 100 μ l を加え 4°C で一晩放置し、DNA を溶解した。この DNA 溶液を 4°C で保存した。

2.6 形質転換法

2.6.1 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換は、Morrison の方法³¹⁾に従って行った。大腸菌を LB 液体培地 10 ml に植菌し、37°C で一晩培養した。この培養液を新鮮な LB 液体培地 1 l に接種し、培養液の 600 nm 波長における濁度 (OD₆₀₀) が 0.5~0.6 に達するまで 37°C で振とう培養した。培養液を TA-16 チューブに移し、氷中で 15 分間冷却した後、集菌 (0 °C、8,000 rpm、5 分間 : RS-20IV 遠心機、TA-16 ローター・株式会社トミー精工) し、菌体を 0.1 M 塩化マグネシウム (和光純薬工業株式会社) 水溶液 250 ml に懸濁した。集菌 (0 °C、8,000 rpm、5 分間 : RS-20IV 遠心機、TA-16 ローター) し、菌体を 0.1 M 塩化カルシウム (和光純薬工業株式会社) 水溶液 250 ml に懸濁し、氷中で 20 分間放置した。集菌 (0 °C、8,000 rpm、5 分間 : RS-20IV 遠心機、TA-16 ローター) した後、菌体を 0.1 M 塩化カルシウム水溶液 42.5 ml とグリセロール (ナカライテスク株式会社) 7.5 ml を混合した溶液に懸濁した。この懸濁液をコンピテント細胞懸濁液とした。コンピテント細胞懸濁液 0.1 ml を 1.5 ml 容マイクロチューブに分注し、ドライアイスが入ったアセトンの中で急速凍結させ、-80°C で保存した。コンピテント細胞懸濁液は使用時に氷中で解凍した。コンピテント細胞懸濁液 0.1 ml に DNA 溶液 (20 μ l 以下、0.5~1 μ g) を加えて混合して、氷中で 25 分間放置した。42 °C で 2 分間加熱した後、LB 液体培地 1 ml を加え攪拌し、37°C で 1 時間静置培養した。アンピシリンを含む LB 平板培地に適当量を塗布し、37°C で一晩静置培養して、形質転換体をコロニーとして得た。

2.6.2 *S. cerevisiae* の形質転換

S. cerevisiae の形質転換は Ito らの酢酸リチウム法³²⁾を一部改変して行った。*S. cerevisiae* を YPAD 液体培地 5 ml に植菌し、28 °C で一晩振とう培養した。培養液 2 ml を YPAD 液体培地 50 ml (坂口フラスコ) に植菌し、28 °C で約 3 時間振とう培養した後、培養液の 660 nm 波長における濁度 (OD₆₆₀) を測定した。培養液を 50 ml 容遠心管 (Cellstar PP-Test tubes, 50 ml sterile : 株式会社グライナー・ジャパン) に移し、集菌 (3,000 rpm、5 分間 : himac CF7D2 遠心機・日立工機株式会社) した。菌体に TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM Na₂EDTA] 5 ml を加えて懸濁した後、M2 サイズの試験管に移して集菌 (3,000 rpm、5 分間 : himac CF7D2 遠心機) して菌体を洗浄した。菌体を LA 溶液 [0.1 M 酢酸リチウム (和光純薬工業株式会社) を含む TE 緩衝液 (pH8.0)] 5 ml に懸濁した後、M4 サイズの試験管に移し、28 °C で 1 時間振とうした。懸濁液を新しい M2 サイズの試験管に移し、集菌 (3,000 rpm、5 分間 : himac CF7D2 遠心機) した。OD₆₆₀ 値が 1.5 に対して LAG 溶液 [0.1 M 酢酸リチウム (和光純薬工業株式会社)、15% (v/v) グリセロール (和光純薬工業株式会社) を含む TE 緩衝液 (pH7.6)] 5 ml で懸濁した。この懸濁液をコンピテント細胞懸濁液とした。1.5 ml 容マイクロチューブにコンピテント細胞懸濁液を 300 μl ずつ分注し、20 μl 以下の DNA 溶液 (5~20 μg) と PEG 水溶液 [50% (w/v) ポリエチレングリコール 4000 (関東化学株式会社)] 0.7 ml を加え、混合した後、28 °C で 1 時間静置培養した。適当量を選択平板培地に塗布した。28 °C で 2~4 日間静置培養して形質転換体をコロニーとして得た。

2.6.3 *S. cerevisiae* の形質転換 (簡便法)

S. cerevisiae の形質転換において、プラスミド DNA による形質転換など形質転換効率が
高い場合は、Ito らの酢酸リチウム法³²⁾を簡便にした方法で行った。*S. cerevisiae* を YPAD
液体培地 5 ml に植菌し、28 °C で一晩振とう培養した。培養液 0.2 ml を YPAD 液体培地
5 ml に植菌し、28 °C で約 3 時間振とう培養した。培養液を M2 サイズの試験管に移し、
集菌 (3,000 rpm、5 分間 : himac CF7D2 遠心機・日立工機株式会社) した。菌体に TE 緩
衝液 [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM Na₂EDTA] 5 ml を加えて懸濁した後、集菌 (3,000

rpm、5分間：himac CF7D2 遠心機）して菌体を洗浄した。LA 溶液 [0.1 M 酢酸リチウム（和光純薬工業株式会社）を含む TE 緩衝液（pH8.0）] 3 ml を加えて懸濁した後、M4 試験管に移し、28 °C で1時間振とうした。懸濁液を新しい M2 サイズの試験管に移し、集菌（3,000 rpm、5分間：himac CF7D2 遠心機）した。LAG 溶液 [0.1 M 酢酸リチウム（和光純薬工業株式会社）、15%（v/v）グリセロール（和光純薬工業株式会社）を含む TE 緩衝液（pH7.6）] 0.3~0.4 ml を加え、懸濁した。この懸濁液をコンピテント細胞懸濁液とした。1.5 ml 容マイクロチューブにコンピテント細胞懸濁液を 0.15 ml ずつ分注し、DNA 溶液（10 µl 以下 3~5 µg）と PEG 水溶液 [50%（w/v）ポリエチレングリコール 4000（関東化学株式会社）] 0.35 ml を加え、混合した後、28 °C で1時間静置培養した。適当量を選択平板培地に塗布した。28 °C で2~4日間静置培養して形質転換体をコロニーとして得た。

2.7 DNA の酵素処理

2.7.1 制限酵素反応

制限酵素は *EcoRI*、*BstPI*、*BamHI*、*HindIII*、*SalI*、*NcoI*、*SacI*、*ScaI*、*SspI*、*XhoI*、*BglII* を使用した。制限酵素はタカラバイオ株式会社、東洋紡株式会社、ニッポンジーン株式会社、MBI Fermentas co., LTD (Vilnius, Lithuania) 、New England BioLabs Inc. co., LTD (Beverly, MA, U.S.A.) 、Roche Diagnostics co., LTD (Mannheim, Germany) から購入した。添付説明書の指示通り、各酵素が最高の活性を与える緩衝液を選択し、1倍濃度の緩衝液中に DNA 濃度が 0.1 µg/µl となるように DNA 溶液を調製した。この DNA 溶液に DNA 1 µg 当り 1 unit の制限酵素を加え混合後、通常 37 °C で2時間以上反応を行った。場合によっては、0.1 µg/ml RNase 水溶液 [Ribonuclease A (Sigma Aldrich chemical co.,LTD、St. Louise, MO, U. S. A.) : 使用する前に沸騰水浴中で15分間加熱し、ゆっくり冷却して DNase を失活させた] 1 µl を加えた。

2.7.2 T4 DNA ligase 反応

T4 DNA ligase 反応（ライゲーション反応）は T4 DNA ligase（タカラバイオ株式会社）の添付説明書に従って行った。乾固 DNA を滅菌水 22.5 µl と10倍濃度ライゲーション緩衝液 [660 mM Tris-HCl（和光純薬工業株式会社）pH7.6、66 mM MgCl₂、100 mM DTT、

1 mM ATP] 2.5 μ l で溶解し、T4 DNA ligase (350 unit/ μ l) 1 μ l を加えた。16°C で 3 時間以上反応を行った。

2.8 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動法は Tanaka らの方法³³⁾ に従い、0.7% (w/v) スラブゲルで TAE 緩衝液を使用して行った。脱イオン水に 0.7% となるようにアガロース (Agarose L03 : タカラバイオ株式会社) を加え、電子レンジで加熱して溶解した。50 倍濃度 TAE 緩衝液 [2 M Tris-酢酸 (pH 8.0) (和光純薬工業株式会社)、50 mM Na₂EDTA (関東化学株式会社)] を 1 倍濃度となるように加え、さらに、10 mg/ml 臭化エチジウム (ナカライテスク株式会社) 水溶液を最終濃度 0.5 μ g/ml となるように加え混合後、ゲルトレイに注ぎ固化させ、アガロースゲルを作製した。試料は DNA 溶液に 1/10 容量の 10 倍濃度泳動用色素 [40% (w/v) ショ糖 (和光純薬工業株式会社)、0.25% (w/v) Bromophenol Blue (ナカライテスク株式会社)] を加えて調製した。サイズマーカーとして λ DNA (λ clI₈₅₇ Sam7 : タカラバイオ株式会社) の *Bst*P1 断片 (8.5 kb、7.2 kb、6.4 kb、5.7 kb、4.8 kb、4.3 kb、3.7 kb、2.3 kb、1.9 kb、1.4 kb、1.3 kb、0.7 kb、0.2 kb、0.1 kb) を用いた。泳動槽はミューピッド小型泳動槽 (アドバンス株式会社) を使用し、定電圧 100 V で 30 分間泳動を行った。トランスイルミネーターでゲルを UV 照射し、Printgraph (AE-6911 FXFD 型・アトー株式会社) によって画像を取り込み、その画像を感熱紙にプリント (UP-895・アトー) し、DNA バンドを観察した。

2.9 PCR 法

2.9.1 PCR 法 (*Ex Taq* polymerase)

PCR (polymerase chain reaction) 法は Saiki らが開発した方法³⁴⁾ を一部改変して行った。酵素に Takara *Ex Taq* polymerase (タカラバイオ株式会社) を使用し、増幅装置は GeneAmp PCR System 2400 (アプライドバイオシステムジャパン株式会社) または、サーマルサイクラー wako WK-0232 (和光純薬工業株式会社) を使用した。0.2 ml 容 MicroAmp リアクションチューブ (Applied biosystems, Foster, CA, U. S. A.) に 10 倍濃度 *Ex Taq* 緩衝液 (20 mM Mg²⁺) 5 μ l、dNTP 混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP がそ

れぞれ 2.5 mM の混合液) 4 μ l、プライマー (2 種類 ; 20~27mer、20 pmol/ μ l) 各 2 μ l、
鋳型 DNA (50 ng/ μ l) 1 μ l を入れ、滅菌水 36 μ l を加え全量を 50 μ l とした。 *Ex Taq*
polymerase (タカラバイオ株式会社) 0.5 μ l を加え、ピペッティングで軽く攪拌した後、
増幅装置にセットし、94 °C で 4 分間プレ加熱を行った後、二本鎖 DNA の熱変性を 94 °C
で 1 分間、プライマーのアニーリングを 57 °C で 1 分間、相補鎖 DNA の伸長・合成を 72 °C
で増幅 DNA の長さ 1 kb 当たり 1 分間 のサイクルを 25~30 サイクル繰り返した。72 °C
で 10 分間ポスト加熱を行った。増幅 DNA のサイズと量は、アガロースゲル電気泳動で確
認した。PCR 反応産物は 4 °C で保存した。

2.9.2 PCR 法 (KOD DNA polymerase)

PCR 法は Saiki らが開発した方法³⁴⁾ を一部改変して行った。PCR 反応の忠実度を高め
るために、酵素に α 型 DNA ポリメラーゼである KOD DNA polymerase (東洋紡株式会社)
を使用し、増幅装置は Gene Amp PCR System 2400 (アプライドバイオシステムジャパン
株式会社) または、サーマルサイクラー wako WK-0232 (和光純薬工業株式会社) を使用し
た。0.2 ml 容 MicroAmp リアクションチューブ (Applied biosystems, Foster, CA, U. S.
A.) に 10 倍濃度 KOD plus 緩衝液 5 μ l、dNTP 混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP がそ
れぞれ 2.0 mM の混合液) 5 μ l、25 mM MgSO₄ 3 μ l、プライマー (2 種類 ; 20~27mer、
20 pmol/ μ l) 各々 0.75 μ l、鋳型 DNA (50 ng/ μ l) 1 μ l をとり、滅菌水 34.5 μ l を加え全量
を 50 μ l とした。KOD- plus-Ver. 2 1 μ l を加え、ピペッティングで軽く攪拌した後、増幅
装置にセットし、94 °C で 2 分間プレ加熱を行った後、二本鎖 DNA の熱変性を 98 °C で 10
秒間、プライマーのアニーリングを 58 °C で 30 秒間、相補鎖 DNA の伸長・合成を 68 °C
で増幅 DNA の長さ 1 kb 当たり 1 分間のサイクルを 25 サイクル繰り返した。68 °C で 10
分間ポスト加熱を行った。増幅 DNA のサイズと量は、アガロースゲル電気泳動で確認した。
PCR 反応産物は 4 °C で保存した。

2.10 PCR 産物の DNA 回収と精製

2.10.1 リコチップによる DNA 断片の回収

DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法 [0.7% (w/v) アガロース (Agarose L03: タカラバイオ株式会社)、1×TAE 緩衝液、サブマリン泳動槽 (マリソル株式会社)] で、定電圧 110 V で分離した。UV ランプ (UVP, Upland, CA, U.S.A.: 主波長 365 nm) でゲルを UV 照射し、目的の DNA 断片が十分に分離していることを確認した。泳動を止め、目的の DNA 断片バンドの数 mm 下流に TaKaRa リコチップ (タカラバイオ株式会社) を、黒い面を DNA 側に向けて差し込み、再び泳動を行った。ゲルを UV 照射して、目的の DNA 断片がリコチップに回収されたことを確認し、リコチップをゲルから取り出した。リコチップを付属の専用マイクロチューブに入れ、遠心分離 (5,000 rpm、5 秒間: MX-100 微量高速冷却遠心機・株式会社トミー精工) し、1.5 ml 容マイクロチューブに DNA 溶液を回収した。DNA 断片をエタノール沈殿、エタノールリンスして DNA を回収し、減圧下で乾固した。

2.10.2 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up による DNA の回収

PCR 産物の精製には NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY - NAGEL GmbH & Co.KG. Duren. Germany) を用いて MACHEREY-NAGEL の製品添付説明書に準拠した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動法 [0.7% (w/v) アガロース (Agarose L03: タカラバイオ株式会社)、1×TAE 緩衝液、サブマリン泳動槽 (マリソル株式会社)] で、定電圧 110 V で分離した。UV ランプ (UVP, Upland, CA, U.S.A.: 主波長 365 nm) でゲルを UV 照射し、目的の DNA 断片が十分に分離していることを確認した。泳動を止め、目的の DNA 断片バンドを火炎滅菌済みのマイクロスパーテルで切り取り、1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、ゲル重量を測定した。ゲル重量 100 mg 当たり 200 μ l の NT1 緩衝液を加え、50 °C で 5~10 分間インキュベート (2 分間毎に穏やかに攪拌した) しゲルを完全に溶かした。コレクションチューブにセットしたカラムに、ゲル溶解液を全量移して遠心分離 (11,000 g、30 秒間: トミー精工株式会社、MX-100) した。通過液を捨て、カラムに NT3 緩衝液を 700 μ l 加え、遠心分離 (11,000 g、30 秒間: トミー精工株式会社、MX-100) した。もう一度、遠心分離を行い NT3 緩衝液を取り除いた。新しい 1.5 ml 容マイクロチューブにカラムをセットし、カラムのメンブレンに NE 緩衝液を 20 μ l 加え、室温で 1 分間

放置し、遠心分離（11,000 g、30 秒間：トミー精工株式会社、MX-100）し DNA を溶出させた。この操作を 3 回繰り返す、得られた溶出液を精製 DNA とした。この精製 DNA 溶液のエタノール沈殿を行い DNA を回収し、減圧下で乾固した後、TE 緩衝液（pH 8.0）50 μ l に溶かし 4°C で保存した。

2.11 DNA のシーケンス解析

2.11 オートシーケンサーによる DNA 断片のシーケンシング

DNA のシーケンス解析は、オートシーケンサーを使用し、シーケンシング反応はジデオキシ法³⁵⁾を改良したサイクルシーケンシング法³⁶⁾で行った。シーケンシング反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Applied biosystems, Foster, CA, U. S. A.）を使用し、Applied biosystems の添付説明書の反応プロトコルを改良して、スケールを 2 分の 1 にして行った。0.2 ml 容 MicroAmp リアクションチューブ（Applied biosystems）にプライマー（20 mer、0.5 pmol/ μ l）3 μ l、鋳型 DNA 250 ng、ターミネータープレミックス [A, G, C, T-BigDye Terminator、dGTP、dATP、dTTP、dCTP、トリス-塩酸緩衝液（pH9.0）、AmpliTaq DNA polymerase：アプライドバイオシステムジャパン]4 μ l を混合し、無菌水を加えて全量を 10 μ l とした。GeneAmp PCR System 2400（アプライドバイオシステムジャパン株式会社）を用いて PCR 反応を行い、DNA をラベリングした。PCR 反応は、二本鎖 DNA の熱変性を 95 °C で 10 秒間、プライマーのアニーリングを 50°C で 5 秒間、相補鎖 DNA の伸長・合成を 60°C で 4 分間の反応を 1 サイクルとして 25 サイクル繰り返して行った。PCR 反応液 10 μ l を 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、さらに、3 M 酢酸ナトリウム水溶液 1 μ l、95%エタノール 25 μ l を加えて混合した後、室温で 15 分間放置した。遠心分離（15,000 rpm、20 分間：MC-150 遠心機、株式会社トミー精工）し、上澄みをピペットマンを用いて除いた。70%エタノール 125 μ l を加え、遠心分離（15,000 rpm、5 分間：MC-150 遠心機）して DNA を沈殿として回収した。DNA を減圧下で乾固した。DNA 沈殿に HiDi ホルムアミド 18 μ l を加え 20~30 回ピペッティングして溶解し、DNA 溶液を Genetic アナライザーチューブ（アプライドバイオシステムジャパン株式会社）に移し、チューブセプタ（アプライドバイオシステムジャパン株式会社）でしっかりと蓋をした。このサンプルをキャピラリーシーケンサー

(ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer : アプライドバイオシステムジャパン株式会社) にセットし、キャピラリー電気泳動および DNA 塩基配列の決定を行った。DNA 塩基配列は、Genetyx-Mac Ver. 10.1 (ゼネティックス株式会社) を用いて解析した。

2.12 パルスフィールドゲル電気泳動

2.12.1 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 用の酵母染色体 DNA の調製

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 用の酵母染色体 DNA の調製は、Carle と Olson の方法³⁷⁾を一部改変して行なった。酵母菌株を 5% SRaf (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で 2 日間振とう培養した。培養液の 660 nm 波長における濁度を測定し、OD₆₆₀ 値が 0.4 となるように新鮮な 5% SGlc (H-W) 液体培地 200 ml と 5% SGal (H-W) 液体培地 200 ml に植菌し、28°C で振とう培養した。培養液を 2 時間おきに 8 時間後までサンプリングし、パルスフィールドゲル電気泳動のために染色体 DNA が包埋されたプラグを作製した。各サンプリング時に培養液の OD₆₆₀ 値を測定し、OD₆₆₀ 値が 9 相当の培養液 1 ml を 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、集菌 (12,000 rpm、1 分間、4 °C : MX-100 微量高速遠心機) した。菌体を、T₁₀E₅₀ 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH7.5)、50 mM Na₂EDTA] 1 ml に懸濁し、遠心分離 (12,000 rpm、1 分 : MX-100 微量高速遠心機) し、洗浄した。次に、T₁₀E₅₀ 緩衝液 130 µl、β-メルカプトエタノール 5 µl、ザイモリエース溶液 [Zymolyase 100T を 20 mg/ml となるように 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) に溶解した] 2 µl を加え、予め 37°C で保温しておいた 1% (w/v) 低融点アガロース (Seaplaque GTG : Lonza Rockland, Inc., U. S. A.) 水溶液を加えて懸濁し、ゲル形成器に流し込み、氷上でゲル化し酵母菌体をアガロースゲルに包埋した。ゲル断片を 4 ml 容チューブに移し、LET 溶液 [10 mM Tris-NaOH (pH7.5)、0.5 M Na₂EDTA] 0.4 ml、β-メルカプトエタノール 30 µl を加え、37°C で一晩インキュベートした。LET 溶液を除去後、proteinase K (和光純薬) 1.6 mg を含む NDS [10 mM Tris-NaOH (pH9.5)、0.5 M Na₂EDTA、1% (w/v) N-ラウロイルサルコシナトリウム] 溶液 0.8 ml を

加え、50°Cで24時間以上静置し、溶菌およびタンパク質分解を行った。NDS溶液を除去した後、T₁₀E₅₀緩衝液2 mlを加えてゲル断片を洗浄した。この洗浄操作を1時間おきに4回繰り返した後、T₁₀E₅₀緩衝液1 mlを加えて染色体DNAが包埋されたゲル断片を4°Cで保存した。

2.12.2 パルスフィールドゲル電気泳動

2.12.1で調製した酵母染色体DNAが包埋されたゲル断片を1/2の大きさに切断してDNA試料として使用した。パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)はCHEF(Counter clamped homogeneous electric fields)法³⁸⁾で行い、装置はCHEF-DRTMII(Bio-Rad laboratories, Inc, CA, U. S. A.)を使用し、設定はCHEF-DRTMIIの使用説明書に準拠した。まず、泳動槽が水平となるように調整した後、泳動槽内に予め4°Cに冷却しておいた0.5×TBE泳動用緩衝液{10×TBE緩衝液[0.9 M Tris-HCl (pH8.3)、0.9 M ホウ酸、25mM Na₂EDTA] 125 mlに脱イオン水 2375 mlを加えて希釈した溶液} 2.5 lを満たし、泳動槽と冷却装置の間を循環させた。蒸留水 95 mlにSeakem LE agarose(Lonza Rockland) 1 gを加え沸騰水溶液中で溶解した後、10×TBE緩衝液 5 mlを加え、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)用1%アガロースとした。酵母染色体DNAを包埋したゲル断片を、アガロースのウェルに差し込み、全てのウェルの隙間に、溶解後約35°Cまでに冷却した0.8%(w/v)低融点アガロース(SeaqPlaque GTG agarose: Lonza Rockland)水溶液を注ぎ込み、室温で約30分間静置して固化させ、ウェルの隙間を埋めた。泳動用緩衝液の温度を14°Cに設定し、アガロースゲルを泳動槽にセットし、定電圧200V, パルスタイム60秒で16時間、定電圧200V, パルスタイム90秒で10時間泳動を行なった。泳動後、アガロースゲルを0.5 mg/ml臭化エチジウム水溶液に30分間浸し、染色した。ゲルを脱イオン水で洗浄した後、トランスイルミネーターでゲルをUV照射し、Printgraphにより画像を取り込み、その画像をプリントアウトし、DNAのバンドを解析した。解析後、ゲルをナイロンメンブレンにブロッティングし、サザン解析を行なった。

2.13 サザンハイブリダイゼーション法

2.13.1 ジゴキシゲニンで標識された DNA の調製

サザン解析に使用する標識プローブは Digoxigenin-11-dUTP 混合液を用いた PCR 法で作製した。DIG-dUTP を含む dNTP 混合液 (DIG-dNTP 混合液) は、1.5 ml 容マイクロチューブに 100 mM dATP、100 mM dCTP、100 mM dGTP (すべてタカラバイオ株式会社) を各々 1 μ l、100 mM dTTP (タカラバイオ株式会社) 0.95 μ l、1 mM DIG-dUTP [alkali-labile (Roche Diagnostics, Mannheim GmbH, Germany)] 5 μ l を加えて、無菌水で全容を 40 μ l として調製した。0.2 ml 容 MicroAmp リアクションチューブ (Applied biosystems, Foster, CA, U. S. A.) に KOD plus 緩衝液 5 μ l、DIG-dNTP 混合液 4 μ l、プライマー (2 種類; 20 mer、20 pmol/ μ l) 各 2 μ l、鋳型 DNA (50 pg/ μ l) 1 μ l を入れ、無菌水を加えて全容を 50 μ l とした後、ピペッティングによって混合した。KOD DNA polymerase [5 U/ μ l (東洋紡株式会社)] 0.5 μ l を加え、ピペッティングにより穏やかに混合した。94 °C で 4 分間プレ加熱した後、二本鎖 DNA の熱変性を 94 °C で 1 分間、プライマーのアニーリングを 57 °C で 1 分間、DNA 鎖の伸長を 68 °C で 1 分間の反応を 1 サイクルとして 25 サイクル繰り返し、68 °C で 10 分間ポスト加熱を行った。PCR 法による増幅 DNA のサイズと量をアガロースゲル電気泳動で確認後、反応液をマイクロチューブに移した。DNA 溶液に 0.2 M Na₂EDTA (関東化学株式会社) (pH8.0) 4.6 μ l、4 M 塩化リチウム (和光純薬株式会社) 5.8 μ l、および 99.5%エタノール 120 μ l を加えて混合し、-80 °C で 10 分間放置した後、遠心分離 (13,000 rpm、10 分間: MX-100 微量高速冷却遠心機、株式会社トミー精工) し、DNA を沈殿として回収した。DNA 沈殿を 99.5%エタノールでリンスした後、減圧下で乾固した。DNA を TE 緩衝液 (pH8.0) 50 μ l に溶解して標識プローブ DNA としてサザンハイブリダイゼーションに用いた。サザン解析に使用したプローブは、*CEN4*DNA と *HIS3*DNA である (*SEN4*DNA は、プライマーとして CEN4P51 と CEN4P31 を使用し、*HIS3*DNA プローブは、プライマーとして HIS3code5 と HIS3code3 を使用して作製した)。

2.13.2 DNA のメンブレンへのブロッティング

アガロースゲル上の DNA のメンブレンへの移行は Southern の方法³⁹⁾ を一部改変し、バキュームトランスファー装置 (BC - 650: バイオクラフト株式会社) を使用して行った。アガロースゲル電気泳動後のゲルを 0.25 N 塩酸に浸し、30 分間穏やかに振とうして DNA を断片化した。ゲルを脱イオン水で 2 回洗浄した。ゲルを変性溶液 (1.5 M 塩化ナトリウム、0.5 M 水酸化ナトリウム) に浸し、室温で 30 分間穏やかに振とうして DNA を変性させた。ゲルを脱イオン水で 2 回洗浄した。中性溶液 [3 M 塩化ナトリウム、0.5 M トリス・塩酸 (pH7.0)] に浸し、30 分間穏やかに振とうして中和させた。バキュームトランスファー装置の上に、下から順にシールシート、脱イオン水に浸したナイロンメンブレン (Pall Biotrans A membrane、孔径 0.2 μm 、Biotrans Transfer membranes、Pall BioSupport Division; Glen Cove, N. Y., U. S. A.)、アガロースゲル、20 \times SSC 溶液 [3 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸ナトリウム (pH7.0)] を含んだスポンジを重ね、バキュームトランスフアー台に接続した真空ポンプで 40 分間吸引し (5 cmHg)、ゲル中の DNA をメンブレンに移行させた。このメンブレンをサービスペーパータオルで挟み、80°C で 1 時間以上加熱し、DNA をメンブレンに固定した。

2.13.3 サザンハイブリダイゼーション (メンブレンが 100 cm² の場合)

サザンハイブリダイゼーションは DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics co., LTD, Mannheim, Germany) を用いて行った。DNA が固定化されたメンブレンとハイブリダイゼーション溶液 {5 \times SSC [20 \times SSC 溶液 (3 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸ナトリウム、和光純薬工業株式会社) を脱イオン水で希釈して調製]、1% (w/v) ブロッキング剤 [ブロッキングストック溶液 (バイアル 10 (not fat dry milk fraction) を終濃度 10% (w/v) となるように緩衝液 1 (0.1 M マレイン酸 (関東化学株式会社)、0.15 M 塩化ナトリウム; pH7.5) に溶解したもの) を脱イオン水で希釈して調製]、1% (w/v) N-ラウロイルサルコシン (ナカライテスク株式会社)、0.02% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) } 20 ml をメンブレンバッグに入れ、68 °C で 3 時間以上保温しプレハイブリダイゼーションを行った。メンブレンバッグの中にメンブレン、ハイブリダイゼーション溶液 3.5 ml を入れ、さらに、ジゴキシゲニンで標識したプローブ DNA [2-13-1 で調製した

ジゴキシゲニンで標識した DNA を沸騰水浴中で 5 分間加熱し変性させた後、氷中で急冷して使用] を最終濃度 25 ng/ml となるように加え、シールした後、68 °C で一晩放置してハイブリダイゼーションを行った。メンブレンバッグからメンブレンを取り出した後、0.1% (w/v) SDS を含む 2 × SSC 溶液に浸し、室温で 5 分間穏やかに振とうして洗浄した。この洗浄操作を 3 回行った。メンブレンを 0.1% (w/v) SDS を含む 0.1×SSC 溶液に浸し、68 °C で 15 分間放置して洗浄した。この洗浄操作を 3 回行った。メンブレンを緩衝液 1 に浸して 1 分間放置し洗浄した。メンブレンを約 100 ml の緩衝液 2 [10% (w/v) ブロッキングストック溶液を緩衝液 1 で 10 倍希釈して調製] に浸し、室温で振とう (55 rpm、30 分間 : water bath incubator BT23、ヤマト科学株式会社) した後、メンブレンをメンブレンバッグに入れ、抗体希釈液 {抗体溶液 [バイアル 8 ; ポリクローナル羊抗体、DIG Fab – Fragment AP – conjugate (750 U/ml)] を遠心 (10,000 rpm、5 分間 : MX-100 微量高速冷却遠心機、株式会社トミー精工) した後 (この反応で、抗原抗体反応でジゴキシゲニンに標識抗体が結合する)、上澄みを緩衝液 2 で 150 mU/ml となるように希釈した} 20 ml を加え、シールした後、室温で 30 分間放置した。メンブレンを取り出し、洗浄緩衝液 [0.3% (v/v) Tween-20 (ポリエチレン (20) ソルビタンモノラウレート、和光純薬工業株式会社) 0.9 ml を緩衝液 1 で希釈し全容を 300 ml として調製 (pH7.5)] 100 ml で振とう (60 rpm、15 分間 : water bath incubator BT23、ヤマト科学株式会社) した。この洗浄操作を 2 回行った。検出緩衝液 [0.1 M トリス-塩酸、0.1 M 塩化ナトリウム (pH9.5)] 20 ml で 3 分間メンブレンを平衡化し、メンブレンと CDP–star 溶液 [CDP–star (Roche Molecular Biochemicals Inc., Germany) 10 µl を検出緩衝液 1 ml に添加] 1 ml をメンブレンバッグに入れシールし、遮光して 25 °C で 5 分間反応させた。この操作によって、アルカリホスファターゼによる発光法で蛍光物質が作られる。メンブレンを新しいメンブレンバッグに移し、メンブレンの入ったバッグを増感スクリーン付きカセットに固定し X 線フィルム (Kodac Diagnostic Film X-Omat AR : Eastman Kodak Company, Rochester, NY, U. S. A.) を入れ室温で 30 分間感光させた。X 線フィルムを現像液 (レンドール : フジフィルム株式会社) に 1 分間浸け現像した後、停止液 [0.3% (v/v) 酢酸水溶液] に 1 分間浸け現像を停止させた。定着液 (レンフィックス : フジフィルム株式会社) に浸け定着させた後、水洗いして乾燥させた。

2.14 部位特異的組換えによる細胞死の誘導(プレート)

染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導を行った株は、染色体上の *CEN4* DNA が RS-*CEN4-HIS3*-RS DNA あるいは RS-*CEN4-URA3*-RS DNA に置き換えられ、さらに *GAL1* プロモーターの下流に *R* 遺伝子 (レコンビナーゼ遺伝子) が連結された *R* 発現プラスミド pHM209 (*TRP1* マーカー) が導入されている。また、コントロール株は、pHM209 の代わりに *R* 遺伝子が破壊されたプラスミド pHM209R⁻ (*TRP1* マーカー) が導入されている。これらの株を 5% SRaf (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で 2 日間振とう培養した。培養液の 660 nm 波長における濁度 (OD₆₆₀) を測定した後、OD₆₆₀ 値が最終 0.8 となるように適量の培養液を無菌水 5 ml に加え希釈した。この希釈培養液をさらに無菌水で 10 倍、100 倍、および 1,000 倍希釈し、各希釈液 50 μl を 5% SGlc (H-W) 平板培地と 5% SGal (H-W) 平板培地に 3 枚ずつ塗布し、28°C で 4 日間静置培養した。生存率は、プレート上に出現したコロニーの個数を計数し、SGlc (H-W) 平板培地に出現したコロニーの個数に対する SGal (H-W) 平板培地に出現したコロニーの個数の比を生存率とした。実験は個別に 3 回以上行い、生存率はそれら実験の平均値で表した。

2.15 部位特異的組換えによる細胞死の誘導(液体培養)

2.15.1 増殖の測定

セントロメア DNA の切り出しが誘導される株と誘導されない株で、液体培養における増殖を検討した。菌株を 5% SRaf (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で 2 日間振とう培養した。この菌体を植え継ぎ 660 nm 波長における濁度 (OD₆₆₀) が 0.05 となるように 5% SGlc (H-W) 液体培地 200 ml と 5% SGal (H-W) 液体培地 200 ml に植菌し、28°C で振とう培養した。培養液を様々な培養時間でサンプリングした。この菌体の増殖は培養液の 660 nm 波長における濁度で調べた。

2.15.2 部位特異的組換えによる細胞死の生存率の測定 (液体培養)

セントロメア DNA の切り出しによって細胞死が誘導されるかを液体培養で検討した。菌株を 5% SRaf (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で 2 日間振とう培養した。この菌体を OD₆₆₀ 波長における濁度が 0.4 となるように 5% SGlc (H-W) 液体培地 200 ml と 5% SGal

(H-W) 液体培地 200 ml に植菌し、28 °C で振とう培養した。培養液を 2 時間おきに 8 時間後までサンプリングし、培養液を無菌水で 10 倍および 1,000 倍に希釈し、各希釈液を 5 µl ずつ 5% SGlc (H-W) 平板培地に 3 枚ずつ塗布し、28 °C で 3 日間静置培養した。培養後、プレート上に出現したコロニーを計数した。0 時間におけるコロニー数に対する各サンプリング時間におけるコロニー数、すなわち、生存細胞の相対数を生存率とした。

2-16 蛍光顕微鏡による細胞の観察

2-16-1 GFP 観察

YCD301 株に pZG2324 プラスミド、pIG324 プラスミド、pSG1324 プラスミド、pSG0324 プラスミド、pDG324 プラスミドを形質転換法で導入してそれぞれ、YCD208 株、YCD209 株、YCD210 株、YCD211 株、YCD212 株を作製した。これらの形質転換体を孢子形成させ GFP タンパク質の発現を顕微鏡による蛍光観察で調べた。2 % SGlc (H-W) 液体培地で 2 日間前培養し、培養液を集菌 (14,000 rpm、10 秒間 : MX-100 微量高速遠心機、トミー精工) した。滅菌水で 3 回洗浄した後、適当量を SPO (H-W) 液体培地 50 ml に植え継ぎ、28 °C で 0 時間から 96 時間まで振とう培養した。24 時間おきに培養液をサンプリングした。培養液 1 ml を 1.5 ml 容マイクロチューブに採り、集菌 (14,000 rpm、10 秒間 : MX-100 微量高速遠心機、トミー精工) した。滅菌水で 1 回洗浄した後、菌体を無菌水に適当に懸濁し希釈してサンプルとした。サンプルを微分干渉コントラスト (DIC) 顕微鏡および Blue 励起光下で蛍光顕微鏡 (対物レンズ倍率 100 倍、Eclipse 50i、株式会社ニコン) で観察した。画像を CCD カメラ (digitalI sight DS-U1) で取り込みパソコン (Windows XP) に保存した。

2-16-2 DAPI 染色

4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) による核染色は、Cooper と Strich⁴⁰⁾ の方法を一部改変して行った。酵母菌体をそれぞれ SGlc (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28 °C で 2 日間振とう培養した。培養液を集菌 (14,000 rpm、10 秒間 : MX-100 微量高速遠心機、トミー精工) した。滅菌水で 3 回洗浄した後、SPO (H-W) 液体培地 50 ml に適当量を植え継ぎ、28 °C で 0 時間から 96 時間まで振とう培養し、24 時間おきにサ

ンプリングした。培養液 1 ml をマイクロチューブに採り、集菌（14,000 rpm、10 秒間：MX-100 微量高速遠心機、トミー精工）した。集菌した菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、菌体に 70 %エタノール 1 ml を加えて 30 分間放置して菌体を固定した。固定した細胞を集菌（14,000 rpm、10 秒間：MX-100 微量高速遠心機、トミー精工）し、滅菌水を 1 ml 加え 5 µg/ml 4,6-diamidino-2- phenylindole Dihydrochloride (DAPI) 溶液 [DAPI (ナカライテスク株式会社) 5 µg を 99.5 %エタノール 1 ml で溶解した] 10 µl を加え、遮光して室温で 15 分放置した。集菌（14,000 rpm、10 秒間：MX-100 微量高速遠心機、トミー精工）し、滅菌水 1 ml で 3 回洗浄後、滅菌水 10 µl で懸濁した。UV 励起光下で蛍光顕微鏡（対物レンズ倍率 100 倍、Eclipse 50i、株式会社ニコン）で観察した。画像を CCD カメラ (DIGITAL SIGHT DS-U1) で取り込みパソコン (Windows XP) に保存した。

2-17 孢子形成

2-17-1 孢子形成（プレート培養）

S. cerevisiae 二倍体を SGlc (H-W) 平板培地に塗り広げ、28 °C で 2 日間培養した（前培養）。平板培地の菌体をチップの先端でかき取り、SPO 平板培地に薄く塗り広げ 25 °C で一晚培養した後、さらに 28 °C で 2 日間培養した。菌体をかき取り、スライドグラス上に置いた滅菌水 5 µl に懸濁して顕微鏡（Nikon Eclipse 50i, 接眼レンズ×10 倍 対物レンズ×40 倍）で観察し、孢子の形成を確認した⁴¹⁾。

2-17-2 孢子形成（液体培養）

孢子形成株を SGlc (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28 °C で 2 日間振とう培養した。培養液を集菌（14,000 rpm、10 秒間：MX-100 微量高速遠心機、トミー精工）した。滅菌水で 3 回洗浄した後、適当量を SPO (H-W) 液体培地 50 ml に植え継ぎ、28 °C で 0 時間から 96 時間まで振とう培養し、孢子を形成させた。

2-18 四分子解析

二倍体株を SGlc (H-W) 選択平板培地に塗り、28 °C で 2 日間培養した（前培養）。平板培地上の菌体をチップの先端でかき取り、SPO 平板培地に薄く塗り広げ 25 °C で一晚培養

した後、28°C で 2 日間培養した。1.5 ml 容マイクロチューブに Zymolyase 水溶液 [0.1 M EDTA, 1.2 M ソルビトール, 0.1 M Tris-HCl (pH7.5), 0.1mg/ml Zymolyase 100T (生化学工業株式会社)] 5 µl を置き、この水溶液にプレートからかき取った子嚢を懸濁した。1.5 ml 容マイクロチューブの蓋をして、室温で 15 分間反応させて子嚢の細胞壁を消化した。YPAD 寒天フィルム培地を 1.5 × 4 cm のサイズに切り、火炎滅菌（アルコール滅菌）したスライドガラスの中央にのせ、寒天フィルム培地の端に Zymolyase 処理を行った子嚢懸濁液を塗りつけた。スライドガラスを寒天フィルム培地が下になるようにチャンバーにのせた後、マイクロマニピレーターのステージに装着した。解剖針をマイクロマニピレーターに取り付け、チャンバーの中に入れ、針先が顕微鏡の視野の中央になるように調節した。四分子（孢子）を顕微解剖し、2.5 mm 間隔で縦に 1 列に並べた。同様にして 4~6 個の子嚢の四分子（孢子）を 5 mm 間隔で横に並べた。寒天フィルム培地を四分子をのせた面を上側にして、YPAD プレートにのせて 28°C で 2~3 日間培養した。

2-19 二倍体の作製

二倍体作製（集団接合法）

二倍体の作製は、集団接合法を利用した。交雑したい一倍体 *S. cerevisiae* の 2 株（**a** 型と **α** 型）を各々 YPAD 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で一晩振とう培養した。これら、2 株の培養液 0.5 ml ずつと YPAD 液体培地 1 ml を 1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、混合した後、28°C で一晩静置培養し、細胞を接合させた。培養液を滅菌水で適量に希釈した後、希釈液を適当な選択平板培地にスプレッドし、28°C で 2~4 日間静置培養した。出現したコロニーを二倍体とした。

2-20 菌株およびプラスミドの作製

レコンビナーゼの発現は *R*-発現プラスミド pHM209²⁵⁾ を使用した。pHM209 *R* は、pHM209 のレコンビナーゼ遺伝子の ORF 内にある *Bgl*/II 部位で pHM 209 を切断し、Klenow 断片で DNA 末端を平滑化した後、自己閉環させて作製した。

第 IV 番染色体からセントロメア DNA を切り出すために染色体上の *CEN4* DNA を 5.7 kb RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA で置換した。この RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA の置換は

pHM409 を使用した。pHM409 は、YCp19^{18,28)} を基本としたプラスミドである。YCp19 は、3.6 kb *EcoRI*-*BamHI* *CEN4* DNA 断片をもつ。pHM409 は、YCp19 の *CEN4* DNA 領域に RS と *HIS3*-RS DNA が *PvuII* 部位と *HpaI* 部位に RS の向きが同じとなるようにそれぞれ挿入されている。pHM409 を *BamHI* と *EcoRI* で切断して得られる RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA をもつ 5.7 kb の DNA 断片で *S. cerevisiae* KA311A 株を形質転換し (His⁺で選択)、第 IV 番染色体のセントロメアが RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA で置換された株を作製した。KA311A 株、この RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA で置換された株を pHM209 および pHM209R で形質転換して YCD101 株~YCD104 株を作製した。

第 V 番染色体からセントロメア DNA を切り出すために染色体上の *CEN5* DNA を RS-*CEN4*-*URA3*-RS DNA で置き換えた。この置換を行うために、pGC2 を使用した。まず、*CEN5* 領域の DNA (3.8 kb) を持つプラスミド pHM741²⁶⁾ を *NcoI* で切断し、Klenow 断片で DNA 末端を平滑化した後、*SaI* リンカーを連結して、pHM741 の *NcoI* 部位が *SaI* 部位に変換されたプラスミド pGC1 を作製した。

次に、pTM14 を鋳型とし、*CEN5*EXSa と *CEN5*EXPm をプライマーとして PCR を行い RS-*CEN4*-*URA3*-RS DNA (3.4 kb) を増幅した。この増幅した DNA を *SaI* と *PmaCI* で切断した後、*SaI* と *PmaCI* で切断して *CEN5* を切り出した pGC1 (5.0 kb DNA 断片) に連結し、pGC2 (*CEN5* を RS-*CEN4*-*URA3*-RS DNA で置換) を作製した。pGC2 を *BamHI* で切断して得られた RS-*URA3*-*CEN4*-RS をもつ 6.8 kb DNA 断片を *S. cerevisiae* KA311A 株に形質転換で導入し *CEN5* DNA を RS-*CEN4*-*URA3*-RS DNA に置き換えた。さらに、pHM209 および pHM209R で形質転換して YCD105 株および YCD106 株を作製した。

第 IV 番染色体と第 V 番染色体からセントロメア DNA を切り出すため、まず、*S. cerevisiae* KA311A 株を、pHM409 を *EcoRI* と *BamHI* で切断して得られる RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA (5.7 kb) で形質転換して *CEN4* DNA を RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA で置換した。さらに、pGC2 を *BamHI* で切断して得られる RS-*CEN4*-*URA3*-RS DNA (6.8 kb) で形質転換して、*CEN5* DNA を RS-*CEN4*-*URA3*-RS DNA に置き換えた。この形質転換体を pHM209 で形質転換することで YCD113 株を作製した。

二倍体細胞で細胞死の誘導を検討するために、KA311A 株と同様の方法で KA311B 株

の *CEN4* DNA を RS-*CEN4-HIS3*-RS DNA に置き換えた株、KA311B の *CEN5* DNA を RS-*CEN4-URA3*-RS DNA に置き換えた株、および KA311B の *CEN4* DNA と *CEN5* DNA をそれぞれ RS-*CEN4-HIS3*-RS DNA と RS-*CEN4-URA3*-RS DNA に置き換えた株を作製した。交雑時の遺伝子マーカーを付与するために、KA311B 株、およびそれら形質転換体に pRS315²⁷⁾ を形質転換で導入した (YCD107 株 ~ YCD110 株)。

下記の組み合わせで交雑し、二倍体細胞を作製した。

YCD201 株 : YCD101 株 x YCD 108 株、 YCD202 株 : YCD103 株 x YCD 108 株、

YCD203 株 : YCD103 株 x YCD 107 株、 YCD204 株 : YCD105 株 x YCD 109 株、

YCD205 株 : YCD110 株 x YCD 113 株

減数分裂時 (配偶子形成時) における細胞死の誘導を検討するために、YCD301 株を作製した。YCD201 株は、*CEN4* DNA を RS-*CEN4-HIS3*-RS DNA に置き換えると減数分裂の核分裂に必須な *RMD1* 遺伝子⁴²⁾ が破壊され孢子形成能を失っている。YCD201 株に *RMD1* 遺伝子を形質転換で導入して孢子形成能を回復し YCD301 株を作製した。

次に、レコンビナーゼ発現プラスミドの pHM209 を *Bam*H1 と *Sal*I で切断して得られたレコンビナーゼ遺伝子断片 (1.9 kb) を YCp 型の pRS314 のマルチクローニングサイトに連結して pRS314-R を作製した。

減数分裂時 (配偶子形成時) に特異的に働く *IME2* (1.0 kb) 、 *ZIP1* (0.6 kb) 、 *SPS1* (0.6 kb) 、 *SPS100* (0.8 kb) 遺伝子のプロモーターの下流にレコンビナーゼ遺伝子を連結して、それぞれ pIR314、 pZR314、 pSR1314、 pSR0314 のプラスミドを作製した。pZR314 は、*S. cerevisiae* の染色体 DNA を鋳型として、ZIP13P5Sa と ZIP1P3Ba のプライマーを用いて PCR を行い、*ZIP1* プロモーター領域 (0.6 kb) DNA を増幅した。この増幅した DNA とプラスミド pRS314-R (6.6 kb) をともに *Sac* I と *Bam*H I で切断し、それぞれの 6.6 kb 断片と 0.6 kb 断片をリコチップで回収し、連結して pZR314 を作製した。pIR314 は、*S. cerevisiae* の染色体 DNA を鋳型として、IME2P5Sa と IME2P3Ba のプライマーを用いて PCR を行い、*IME2* プロモーター領域の DNA を増幅した。この増幅した DNA とプラスミド pRS314-R をともに *Sac* I と *Bam*H I で切断し、それぞれの 6.6 kb 断片と 1.0 kb 断片をリコチップ回収し、*IME2* プロモーター-DNA を pRS314-R のマルチクローニングサイトに挿入して pIR314 を作製した。

pSR1314 は、*S. cerevisiae* の染色体 DNA を鋳型として、SPS1P3Ba と SPS1P5Sa を用いて PCR を行い、*SPS1* プロモーター領域の DNA を増幅した。この増幅した DNA とプラスミド pRS314-R をともに *Sac*I と *Bam*H I で切断し、それぞれの 6.6 kb 断片と 0.6 kb 断片をリコチップ回収し、連結して pSR1314 を作製した。

pSR0314 は、*S. cerevisiae* の染色体 DNA を鋳型として、SPS100P3Ba と SPS100P5Sa のプライマーを用いて PCR を行い、*SPS100* プロモーター領域の DNA を増幅した。この増幅した DNA とプラスミド pRS314-R をともに *Sac*I と *Bam*H I で切断し、それぞれの 6.6 kb 断片と 0.8 kb 断片をリコチップで回収し、連結して pSR0314 を作製した。

減数分裂時（配偶子形成時）に特異的にレコンビナーゼを発現させる pZR314、pIR314、pSR1314、pSR0314 のプラスミドを形質転換で YCD301 株に導入し、YCD304 株 ~ YCD307 株を作製した。

また、減数分裂時にマルチコピー型のレコンビナーゼ発現プラスミドを用いて細胞死の誘導を検討するため、YE_p 型である pYO324 プラスミドに pIR314、pZR314、pSR1314、pSR0314 から *Sac*I と *Bam*H I で切断して得られた *IME2*、*ZIP1*、*SPS1*、*SPS100* 遺伝子の各プロモーターを連結した。これに加え *S. cerevisiae* の染色体 DNA を鋳型として、DIT1P3 と DIT1P5 のプライマーを用いて PCR を行い、*DIT1* プロモーター DNA 断片 (0.8 kb) を増幅し *Sac*I と *Bam*H I で切断して連結した。さらに、発現プラスミドが減数分裂時（配偶子形成時）に特異的に発現しているかを確認するために、各プロモーターの下流にレポーター遺伝子として *GFP* 遺伝子を連結した。*GFP* 遺伝子は、pKS65T プラスミド（片岡正和博士から分譲）を GFP5Bam と GFP3Sal のプライマーを用いて PCR を行い増幅させて *GFP* 遺伝子（タンパク質コード領域）断片 (0.7 kb) を得た。*GFP* 遺伝子断片 (0.7 kb) を *Sal*I と *Bam*H I で切断し、*IME2*、*ZIP1*、*SPS1*、*SPS100*、および *DIT1* の各プロモーターの下流に連結して pIG324、pZG3324、pSG1324、pSG0324、および pDG0324 を作製した。

pIG324、pZG3324、pSG1324、pSG0324、および pDG324 を形質転換で YCD301 株に導入し、YCD308 株 ~ YCD312 株を作製した。*GFP* タンパク質の発現により、各プロモーターの機能を確認した後、pIG324、pZG3324、pSG1324、pSG0324、pDG0324 を *Sal*I と *Bam*H I で切断し、それぞれの断片（pYO324 に孢子形成時に機能する遺伝子の各プロモ-

ターを含む) と *Sal*I と *Bam*H I で切断した pHM209 のレコンビナーゼ遺伝子断片 1.9 kb を連結し、pZNR3324、pINR324、pSNR1324、pSNR0324、および pDNR324 を作製した。pZNR3324、pINR324、pSNR1324、pSNR0324、および pDNR324 を YCD301 株に形質転換で導入し、YCD315 株 ~ YCD319 株を作製した。

第 3 節 結果

3.1 細胞死の誘導システムの構築

私は、遺伝子組換え生物の自然環境中への拡散防止システムの構築のために、酵母 *Z. rouxii* 由来の pSR1 プラスミドに備わっている部位特異的組換え系を利用し、染色体からセントロメア DNA を切り出し細胞死を誘導するシステムを開発した (Fig. 2-1 A)。

本システムは、誘導型のプロモーターを利用することで、特定の時期や環境でのみ真核生物の染色体からセントロメア DNA または、必須遺伝子を切り出すことで細胞死を誘導し条件致死性質を付加させることが可能である。また、微生物のみならず、植物^{15,16)} などでも応用が可能である。しかし、高等生物は微生物と比較しコストが掛かり、多くが二倍体であるため測定および解析が困難である。そこで、本研究では、低コストで解析も比較的容易であり、一倍体細胞と二倍体細胞の形態で存在する出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物とすることで、両者の比較そして、他の真核細胞への応用の際、基本的な知見を得る上で適切であると判断した。

まず、一倍体細胞における細胞死を検証するため、KA311A 株の第 IV 染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部 (RS) を同じ方向に挿入した後、*GAL1* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するレコンビナーゼ発現プラスミド (*R* 発現プラスミド) を導入した株を作製した (YCD101 株)。第 IV 番染色体は、1.5 Mb で 16 本存在する *S. cerevisiae* の染色体の中で、rDNA の存在する第 XII 番染色体に次いで大きな染色体であり、他の染色体と比べ必須遺伝子も 169 個と最も多いため、効果的であると考えた。また、*GAL1* プロモーターは、グルコース存在下では転写が抑制され、グルコース欠乏条件下で、しかもガラクトース存在下で誘導される。したがって、培地中の炭素源に依存しタイトに調節されるためこのプロモーターを選択した。

この細胞 (YCD101 株) は、ガラクトース培地で培養するとレコンビナーゼが生産され、セントロメア DNA の両側に存在する RS に作用し、2 個の標的部 (RS) の間で組換えが起こる。染色体からセントロメア DNA が切り出されることで、有糸分裂による分配の際にセントロメア DNA を失った染色体は不分離を起こし、娘細胞に正確に分配されず、細胞から染色体が容易に脱落する。染色体を失った細胞は、生育に必要な遺伝子が多数欠けるこ

とになり細胞は致死となると予想される (Fig. 2-1 B)。

まず、YCD101 株のプレートにおける生育を調べた。YCD101 株を SRaf (H-W) 液体培地で培養後、培養液を無菌水で 10 倍および 1000 倍に希釈し、希釈液を SGal (H-W) プレートと SGlc (H-W) プレートに等量ずつスプレッドし、培養した。YCD101 株は、SGlc (H-W) プレートでは多数のコロニーが出現したが、SGal (H-W) プレートでは、コロニーはほとんど出現しなかった。また、セントロメア DNA を RS-*CEN4-HIS3*-RS で置換していない YCD103 株や *R* 発現プラスミドのレコンビナーゼ遺伝子が破壊された YCD102 株では SGal (H-W) プレートでも多数のコロニーが出現した (Fig. 2-2)。さらに、プレート上に出現したコロニーの個数を計数し、SGal プレートでの生存率を計算した。生存率は、SGlc (H-W) プレート上に出現したコロニー数に対する SGal (H-W) プレート上に出現したコロニー数の比で表した (Table 2-1)。その結果、YCD101 株 (RS-*CEN4-HIS3*-RS, *R*⁺) の生存率は、 1.4×10^{-5} となり大きく低下したが、YCD102 株 (RS-*CEN4-HIS3*-RS, *R*⁻) や YCD103 株 (*CEN4*R⁺) の生存率はほぼ 1 であった。

次に、液体培養での増殖を調べた (Fig. 2-3 A)。これら 3 株を SRaf (H-W) 液体培地で培養した後、菌体を SGal (H-W) 液体培地と SGlc (H-W) 液体培地に植え継ぎ 52 時間培養した。様々な培養時間で、培養液の 660 nm 波長における濁度 (OD₆₆₀) を測定した。SGlc (H-W) 液体培地では、どの株もよく増殖し、約 20 時間で定常期に達した。SGal (H-W) 液体培地における YCD101 株の増殖は大幅に抑制されており、YCD102 株と YCD103 株は、SGlc (H-W) 液体培地よりも少し増殖が遅かった。この増殖が遅いのは、ガラクトース資化能がグルコース資化能よりも劣っているためであると考えられる。

さらに、液体培養での生存率を調べた (Fig. 2-3 B)。YCD101 株、YCD102 株、および YCD103 株を SRaf (H-W) 液体培地で培養した後、菌体を SGal (H-W) 液体培地と SGlc (H-W) 液体培地に植え継ぎ、8 時間培養した。培養液を 2 時間おきにサンプリングし、無菌水で適当に希釈した後、SGlc (H-W) 平板培地にスプレッドし培養した。出現したコロニーを生存細胞とした。生存率は、液体培養での培養 0 時間におけるコロニー数に対する各サンプリング時間でのコロニー数の比、すなわち、生育可能な細胞の培養 0 時間に対する相対的な個数で表した。YCD101 株を SGal (H-W) 液体培地で培養した時の生存率は経時的に低下し、培養 8 時間後には 6.2×10^{-4} に達した。しかし、他の 2 株 (YCD102 株と YCD103

株) の SGal (H-W) 液体培地での生存率は、1 以上であった。YCD101 株を SGal (H-W) 液体培地で培養している時に、染色体からセントロメア DNA が切り出されていることをサザン解析で確認した。YCD101 株を SRaf (H-W) 液体培地で 2 日間前培養した後、培養液を SGlc (H-W) 液体培地と SGal (H-W) 液体培地に植え継ぎ、0 時間、4 時間および 8 時間においてサンプリングし、菌体から染色体 DNA を調製した。この染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動で分離し、*CEN4* DNA (CEN4P51 と CEN4P31 プライマーで増幅した 513 bp DNA) と *HIS3* DNA (HIS3code5 と HIS3code5 プライマーで増幅した 531 bp DNA) をプローブとしてサザン解析を行った (Fig. 2-4)。サザン解析の結果、*CEN4* プローブでは、SGlc 培地で第 IV 番染色体に絶えず同じ程度の強いシグナルが検出されたが、SGal 培地では、第 IV 番染色体のシグナルは 0 時間では強いが、4 時間と 8 時間では、非常に弱かった。また、培養時間に伴ってシグナルの強度が弱くなっていた。*HIS3* 遺伝子は本来、第 XV 番染色体上に存在しているが、第 IV 番染色体上の *CEN4* の両側に RS を挿入する際の選択マーカー遺伝子として、*CEN4* DNA の隣に挿入されている。第 XV 番染色体のシグナルは、SGlc (H-W) 液体培地と SGal (H-W) 液体培地の両方で絶えずほぼ同程度で強かった。第 IV 番染色体のシグナルは、SGlc (H-W) 液体培地では絶えずほぼ同程度で強かったが、SGal (H-W) 液体培地では、0 時間では強いが、4 時間と 8 時間ではほとんど検出されなかった。これらの結果から、SGal (H-W) 培地では培養 4 時間後にはほとんどの細胞で *CEN4* DNA の切り出しが起こったと考えられる。したがって、SGal (H-W) 液体培地でセントロメア DNA の切り出しが起こることが確認でき、一倍体細胞において部位特異的組換えによってセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を起こすことができた。

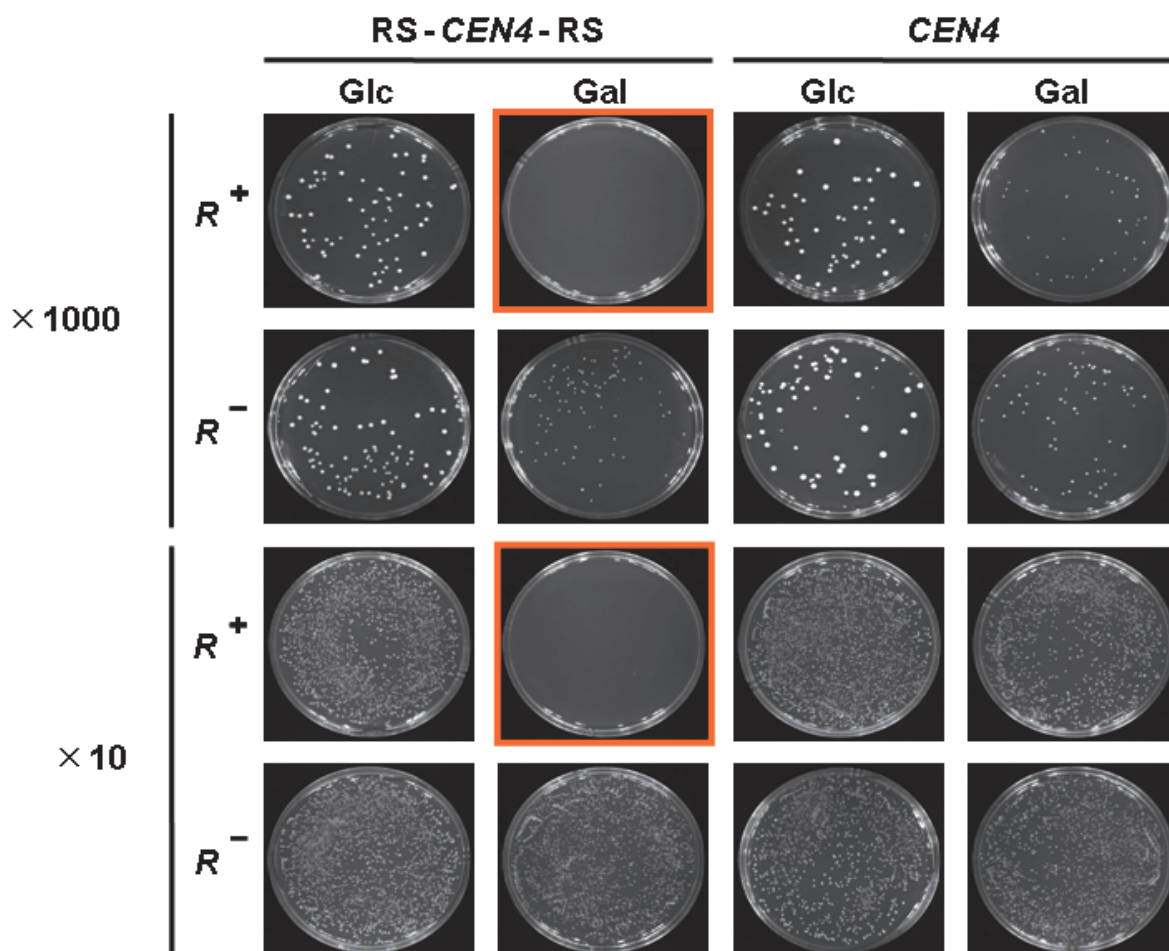


Fig. 2-2 セントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導（一倍体、プレート培養）。菌体を 5 % SRaf (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28 °C で 2 日間振とう培養した。培養液を無菌水で 10 倍 (X 10) および 1,000 倍 (X 1,000) に希釈した。各希釈液を 5 μ l ずつ 5% SGlc (H-W) 平板培地(Glc) と 5% SGal (H-W) 平板培地 (Gal) に塗布し、28 °C で 4 日間静置培養して生育を調べた。RS-*CEN4*-RS は *CEN4* を RS-*CEN4*-*HIS3*-RS で置換した組換え標的的部位をもつ株、*CEN4* は組換え標的的部位をもたない株を表す。*R*⁺ は *R* 発現プラスミド (pHM209) を導入した株を、*R*⁻ は *R* 発現プラスミドの *R* 遺伝子を破壊したプラスミド(pHM209*R*-) を導入した株を表す。

Table 2-1 Cell death by excision of centromeric DNA from a chromosome in plate assay
 (haploid cell , plate culture)

<i>CEN4</i>	Viability (Gal plate / Glc plate)	
	R^+	R^-
RS-<i>CEN4</i>-RS	$1.4 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$	1.1 ± 0.1
<i>CEN4</i>	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0

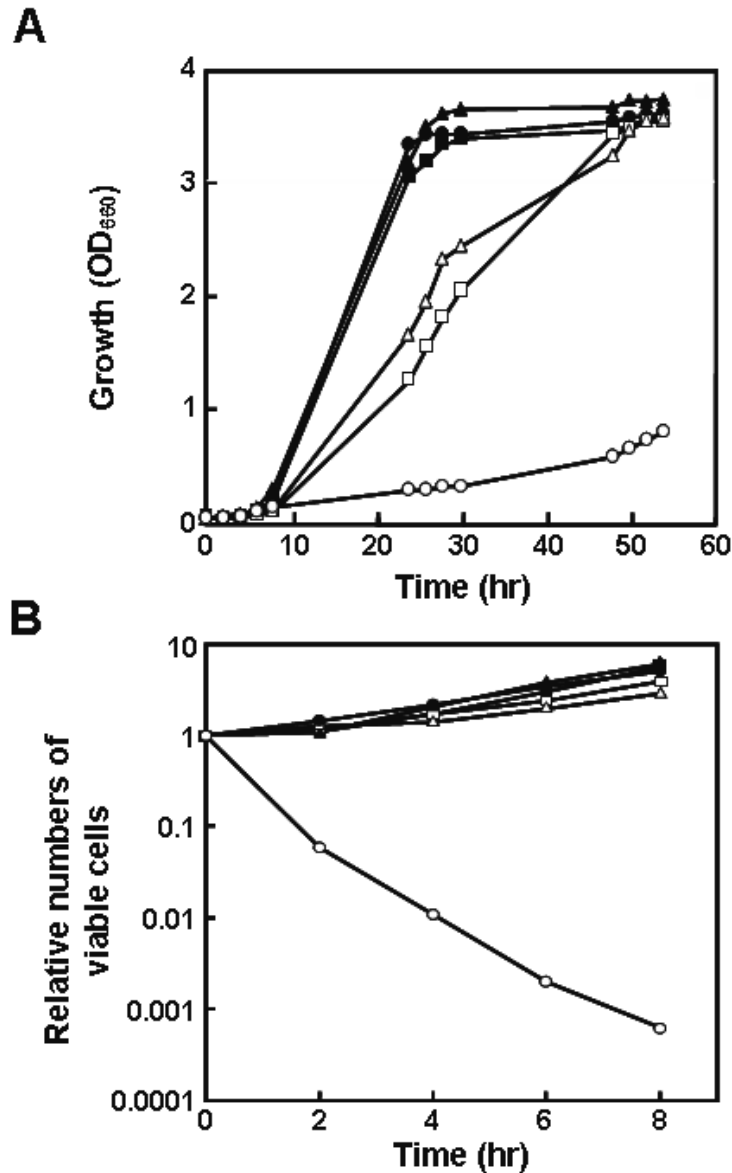


Fig. 2-3 第IV番染色体からのセントロメアDNAの切り出しによる細胞死の誘導(一倍体、液体培養)。CEN4をRS-HIS3-CEN4-RS DNAで置換し、*R*-発現プラスミド(pHM209)を導入した細胞(YCD101株:○および●)、CEN4をRS-HIS3-CEN4-RS DNAで置換せず、*R*-発現プラスミド(pHM209)を導入した細胞(YCD103株:△および▲)、および*R*-発現プラスミド(pHM209)の代わりに*R*遺伝子を破壊したプラスミド(pHM209*R*-)を導入した細胞(YCD102株:□および■)、の増殖(A)と生存率(B)を調べた。各株の菌体を5% S Raf (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28°Cで2日間振とう培養した。培養液を5% S Gal (H-W) 液体培地(○、△および□)と5% S Glc (H-W) 液体培地(●、▲および■)に660 nm波長(OD₆₆₀)の濁度により菌量を(OD₆₆₀ = 0.05)揃え植え継ぎ培養した。菌の増殖は培養液のOD₆₆₀を経時的にサンプリングし調べた。生存率は、培養液を2時間おきにサンプリングし、無菌水で希釈し、各希釈液を5% S Glc (H-W) 平板培地に塗布し28°Cで2日間培養し、5% S Glc (H-W) 平板培地上に出現したコロニーの個数を計数し調べた。生存率はサンプリング0時間の時にプレート上に出現したコロニー数に対する各サンプルのプレート上に出現したコロニー数の比で表した。

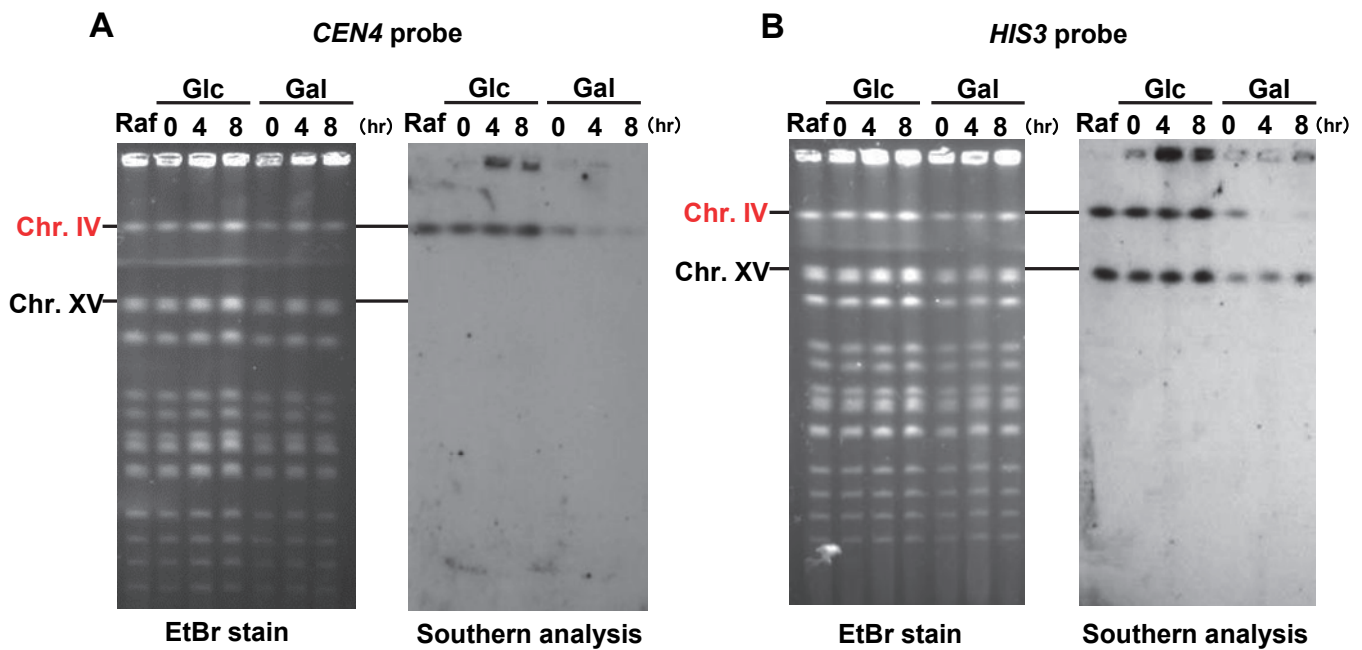


Fig. 2-4 第IV番染色体からのセントロメアDNAの切り出しの確認。YCD101株を5% SRaf (H-W) 液体培地 5 ml に植菌し、28°C で2日間振とう培養した培養液を5% SGal (H-W) 液体培地と5% SGlc (H-W) 液体培地に植え継ぎ28°C で8時間培養した。0時間、4時間後および8時間後にサンプリングした菌体から調製した染色体DNAをパルスフィールドゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで染色した((A)と(B)において左側のパネル)。さらに、DIGで標識した513 bp *CEN4* DNA ((A)における右側のパネル) および531 bp *HIS3* DNA ((B)における右側のパネル) をプローブとしてサザン解析を行った。

3.2 二倍体細胞における細胞死の誘導

S. cerevisiae は二倍体細胞でも栄養増殖を行う。また、植物細胞や動物細胞の体細胞は二倍体が多い。より単純な一倍体細胞で細胞死を誘導するシステムを確立できたので、次に二倍体細胞で細胞死を誘導することを検討した。

一倍体細胞では、染色体一本からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導することができるが、二倍体細胞の場合、細胞死を起こすためには相同染色体の両方からセントロメア DNA を切り出す必要があると考えた (Fig. 2-5)。

まず、二倍体細胞で、YCD201 株、YCD202 株、および YCD203 株の 3 種類の株を作製した。YCD201 株は、第 IV 番相同染色体の両方の染色体で *CEN4* DNA が RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA で置換されている (RS-*CEN4*-*HIS3*-RS/RS-*CEN4*-*HIS3*-RS)。YCD202 株は、第 IV 番相同染色体の一方の染色体で *CEN4* DNA が RS-*CEN4*-*HIS3*-RS で置換されている (RS-*CEN4*-*HIS3*-RS/*CEN4*)。YCD203 株は、第 IV 番相同染色体の両方が置換されていない (*CEN4*/*CEN4*)。すなわち、YCD201 株は第 IV 番染色体の両方に RS を持ち、YCD202 株は片方のみ RS を持ち、YCD203 株は両方とも RS を持っていない。これらの 3 株を SRaf (H-W) 液体培地で培養した後、培養液を無菌水で 10 倍および 1000 倍に希釈し、希釈液を等量ずつ SGlc (H-W) プレートと SGal (H-W) プレートにスプレッドして培養し生育を調べた (Fig. 2-6)。SGal (H-W) プレートにおいて YCD201 株ではコロニーがほとんど出現しなかったが、YCD202 株では小さなコロニーが多数出現し、YCD203 株では多数のコロニーが出現した。また、SGlc (H-W) プレートでは、どの株も多数のコロニーが出現した。YCD202 株でコロニーが小さかった原因は、セントロメア DNA の切り出しによって細胞が $2n-1$ 異数体となり、異数体細胞の増殖が $2n$ 細胞よりも遅いためである (結果省略)。プレートに出現したコロニーの個数を計数した結果、YCD201 株を SGal (H-W) プレートで培養した時の生存率は、大きく低下した (6.9×10^{-4})。この生存率は、一倍体の細胞の生存率 (1.4×10^{-5}) よりも 50 倍高かった。YCD202 株の生存率は 0.5 となり、YCD203 株よりもわずかに低かった。YCD202 株は、第 IV 番相同染色体の片方だけが脱落し、染色体の脱落で生じた $2n-1$ 異数体細胞の増殖が遅く、コロニーが非常に小さいためプレート上に出現したコロニーを全て計数しきれなかったため、生存率は見かけ上低下したと考えられる (Table 2-2)。

次に、YCD201 株、YCD202 株、および YCD203 株の 3 株の液体培養における増殖を濁度で調べた。これらの株を SRaf (H-W) 液体培地で前培養した後、菌体を等量ずつ SGlc (H-W) 液体培地と SGal (H-W) 液体培地に植え継ぎ 52 時間培養した。SGlc (H-W) 液体培地と SGal (H-W) 液体培地での培養液を経時的にサンプリングし、培養液の 660 nm 波長における濁度 (OD₆₆₀) を測定した (Fig. 2-7A)。SGlc (H-W) 液体培地では、これらの 3 株は全てよく増殖し、約 20 時間で定常期に達した。SGal (H-W) 液体培地での増殖は、YCD203 株、YCD202 株、YCD201 株の順で悪くなった。特に YCD201 株は、SGal (H-W) 液体培地での増殖が著しく悪かった。

さらに、YCD201 株、YCD202 株、および YCD203 株の 3 株の液体培地での生存率を調べた。SRaf (H-W) 液体培養で前培養した後、菌体を等量ずつ SGlc (H-W) 液体培地と SGal (H-W) 液体培地に植え継ぎ、8 時間培養した。SGlc (H-W) 液体培地と SGal (H-W) 液体培地での培養液を 2 時間おきにサンプリングした。培養液を無菌水で 10 倍、100 倍、および 1,000 倍に希釈し、希釈液を SGlc (H-W) プレートにスプレッドし、培養した。各サンプル時間で出現したコロニー数を 0 時間で出現したコロニー数で割った値、すなわち、生存細胞の相対的な個数を生存率とした (Fig. 2-7 B)。YCD201 株の SGal (H-W) 液体培地での生存率は、培養時間に伴って、次第に低下し 8 時間後には、 4.0×10^{-3} となった。YCD202 株は、生存率がわずかに低下した。YCD203 株は、生存率の低下は見られなかった。また、SGlc (H-W) 液体培地での生存率は、3 株とも低下しなかった。YCD202 株の SGal (H-W) 培養でわずかに低下したのは、プレートでの生存率の低下と同様の原因によるものであると考えられる。二倍体 YCD201 株の生存率は、一倍体の YCD101 株の生存率と比較すると約 6 倍高い値となった。(培養 8 時間後の生存率は、YCD201 株が 4.0×10^{-3} であり、YCD101 株が 6.2×10^{-4} である)。液体培養でもプレート培養と同様に YCD201 株を SGal 培地で培養すると細胞死が起こった。したがって、二倍体細胞では、相同染色体の両方からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を起こすことができることが明らかとなった。また、二倍体細胞の生存率は、一倍体細胞の生存率よりも高くなる傾向が認められた。

第 2 章 第 3 節の「3.1 細胞死誘導システムの構築」と「3.2 二倍体での細胞死誘導」に記載の研究は、柳本敏彰氏 と共同で実施した。柳本敏彰氏が共同研究の成果を博士論文に記載しているが、成果を本学位論文に使用することを 柳本敏彰氏の承諾を得ている。

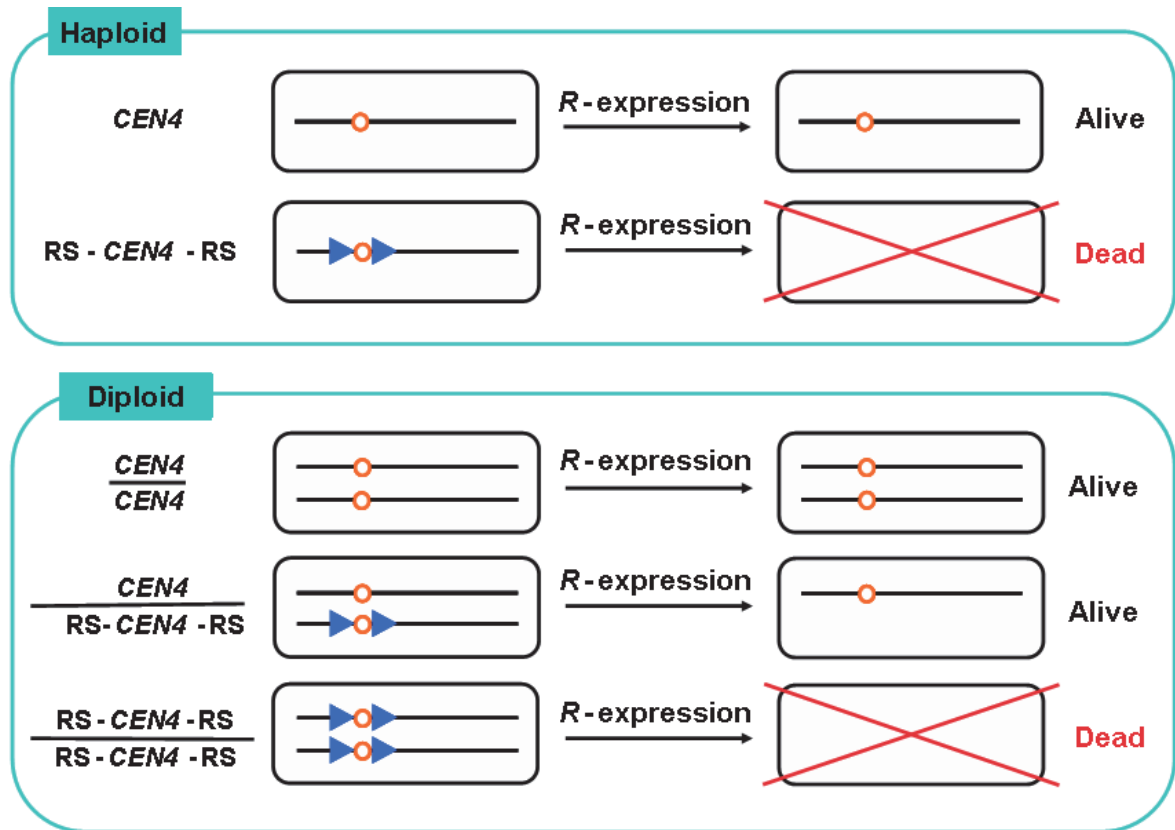


Fig. 2-5 一倍体細胞と二倍体細胞での細胞死の誘導。一倍体細胞では、細胞から一本の染色体が脱落することで細胞死が起こる。二倍体細胞では、相同染色体の両方を脱落させることで細胞死を起こすことができる。また、相同染色体の片方のみ染色体 DNA が脱落した場合、染色体は $2n-1$ となり細胞死は起こらない。

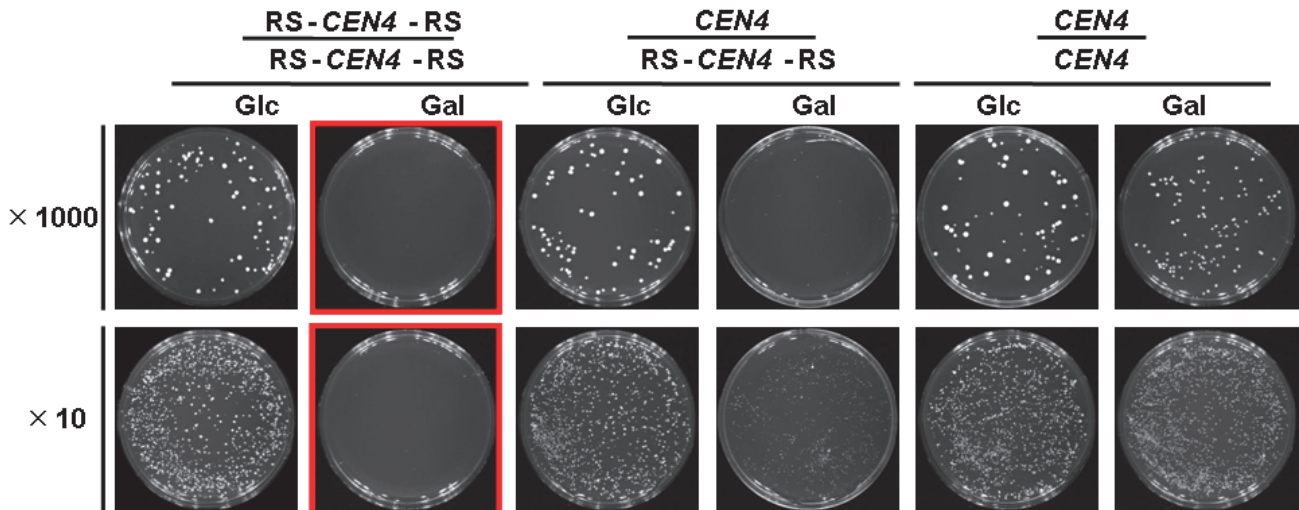


Fig. 2-6 第IV番染色体からのセントロメアDNAの切り出しによる細胞死の誘導。(二倍体、プレート培養)。二倍体において第IV番相同染色体の両方のセントロメアDNAがRS-CEN4-HIS3-RS DNAで置換され、*R*発現プラスミド(pHM209)を導入した株(YCD201株: RS-CEN4-HIS3-RS / RS-CEN4-HIS3-RS)、第IV番相同染色体の片方のセントロメアDNAがRS-CEN4-HIS3-RS DNAで置換され、*R*発現プラスミド(pHM209)を導入した株(YCD202株: CEN4 / RS-CEN4-HIS3-RS)および両方ともセントロメアDNAを置換せず*R*発現プラスミド(pHM209)を導入した株(YCD203株: CEN4 / CEN4)の各菌体を5% SRaf (H-W) 液体培地 5 mlに植菌し、28°Cで2日間振とう培養した。培養液を無菌水で10倍(X10)および1,000倍(X1,000)に希釈した。各希釈液を5 µlずつ5% SGlc (H-W) 平板培地(Glc)と5% SGal (H-W) 平板培地(Gal)に塗布し、28°Cで4日間静置培養して生育を調べた。

Table 2-2 Cell death by excision of centromeric DNA from a chromosome in plate assay
(haploid cells and diploid cells , plate culture)

<i>CEN4</i>	Viability (Gal plate/Glc plate)	
	R ⁺	R ⁻
Haploid		
<i>RS - CEN4 - RS</i>	$1.4 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$	1.1 ± 0.1
<i>CEN4</i>	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0

Diploid		
$\frac{RS - CEN4 - RS}{RS - CEN4 - RS}$	$6.9 \times 10^{-4} \pm 0.6 \times 10^{-4}$	ND
$\frac{CEN4}{RS - CEN4 - RS}$	0.5 ± 0.0	ND
$\frac{CEN4}{CEN4}$	1.1 ± 0.0	ND

ND : not determined.

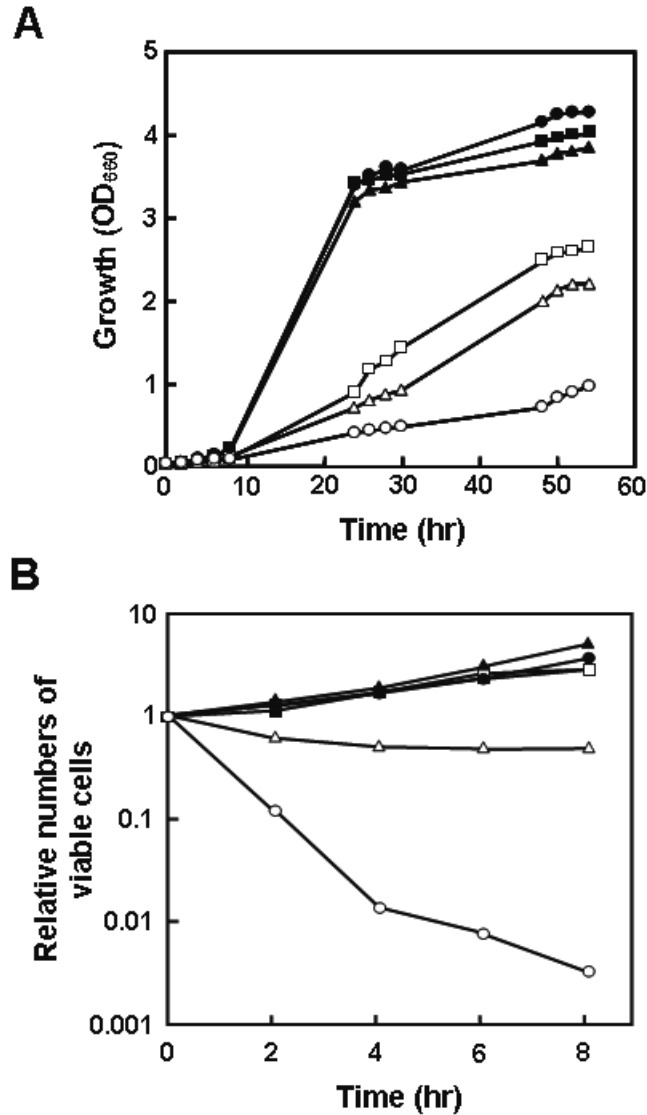


Fig. 2-7 第IV番染色体からのセントロメアDNAの切り出しによる細胞死の誘導(二倍体、液体培養)。二倍体細胞において第IV番相同染色体の両方のセントロメアDNAがRS-*CEN4-HIS3*-RS DNAで置換され、*R*発現プラスミド(pHM209)を導入した株(YCD201株:○および●)、第IV番相同染色体の片方のセントロメアDNAがRS-*CEN4-HIS3*-RS DNAで置換され、*R*発現プラスミド(pHM209)を導入した株(YCD202株:△および▲)および両方ともセントロメアDNAを置換せず*R*発現プラスミド(pHM209)を導入した株(YCD203株:□および■)の増殖(A)と生存率(B)を調べた。各株の菌体を5%SRaf(H-W)液体培地5mlに植菌し、28°Cで2日間振とう培養した。培養液を5%SGal(H-W)液体培地(○、△、および□)と5%SGlc(H-W)液体培地(●、▲、および■)に660nm波長の濁度により菌量を(OD₆₆₀=0.05)揃え植えつぎ培養した。菌の増殖は培養液の660nmの波長における濁度(OD₆₆₀)を経時的にサンプリングし調べた。生存率は、培養液を2時間おきにサンプリングし、無菌水で希釈し、各希釈液を5%SGlc(H-W)平板培地に塗布し28°Cで2日間培養し、5%SGlc(H-W)平板培地上に出現したコロニーの個数を計数し調べた。生存率はサンプリング0時間のときにプレート上に出現したコロニー数に対する各サンプルのプレート上に出現したコロニー数の比で表した。

3-3 複数の染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導

セントロメア DNA の切り出しを誘導した時の生存率は、プレート培養と液体培養の両方で、二倍体細胞が、一倍体細胞よりも高くなった。そこで、二倍体細胞の生存率をさらに低下させるため、第 IV 番相同染色体に加え第 V 番相同染色体からもセントロメア DNA を切り出すことにした。YCD101 株の第 V 番相同染色体のセントロメア DNA (*CEN5*) を RS-*CEN4-URA3*-RS DNA で置換して、第 V 番相同染色体のセントロメア DNA の両側に RS を挿入した (YCD113 株)。さらに、RS を挿入した **a** 型株 (YCD113) と **α** 型株 (YCD110) との交雑により、二倍体細胞で第 IV 番相同染色体と第 V 番相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導できる株 (YCD205 株) を作製した。まず、プレート培養でセントロメア DNA の切り出しを誘導して生存率を調べた (Table 2-3)。YCD205 株を SRaf (H-W) 液体培地で前培養後、培養液を無菌水で 10 倍、および 1,000 倍に希釈して希釈液を等量ずつ SGal (H-W) プレートと SGlc (H-W) プレートに広げ、培養した。その結果、YCD205 株を SGal (H-W) プレートで培養した時の生存率は、 5.0×10^{-5} となり、YCD201 株 (6.9×10^{-4}) よりも低下し、一倍体細胞の生存率とほぼ同程度まで低下した (YCD113 株の生存率は、 2.3×10^{-5})。また、一倍体細胞では、第 IV 番染色体のみからセントロメア DNA の切り出しが誘導される株 (YCD101 株、生存率は 1.4×10^{-5})、第 V 番染色体のみからセントロメア DNA の切り出しが誘導される株 (YCD105 株：生存率は 2.3×10^{-5})、および第 IV 番染色体と第 V 番相同染色体からセントロメア DNA の切り出し誘導される株 (YCD113 株：生存率は 2.3×10^{-5}) の間で生存率に有意な差は認められなかった。次に、YCD205 株の液体培地での増殖を調べた結果 (Fig. 2-8A)、YCD205 株は SGal (H-W) 培地でほとんど増殖しなかった。次に、液体培養における生存率を調べた結果、YCD201 株および YCD204 株よりも有意に低下した (Fig. 2-8B)。これらの結果から、二倍体細胞において複数の相同染色体からセントロメア DNA を切り出すことにより生存率を低下させることができ、効果的な手段であると考えられる。

Table 2-3 Cell death by excision of centromeric DNA from a chromosome in plate assay (diploid , plate culture)

Chromosome (excision)	Viability (SGal plate/ SGlc plate)	
	Haploid	Diploid
Chr. IV	$1.4 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$	$6.9 \times 10^{-4} \pm 0.6 \times 10^{-4}$
Chr. V	$2.3 \times 10^{-5} \pm 0.2 \times 10^{-5}$	$2.1 \times 10^{-4} \pm 0.7 \times 10^{-4}$
Chr. IV + Chr. V	$2.3 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$	5.0×10^{-5}

Chr. IV ; The *CEN4* was replaced with the RS -*HIS3* -*CEN4* - RS construct.

Chr. V ; The *CEN5* was replaced with the RS -*URA3* -*CEN4* - RS construct.

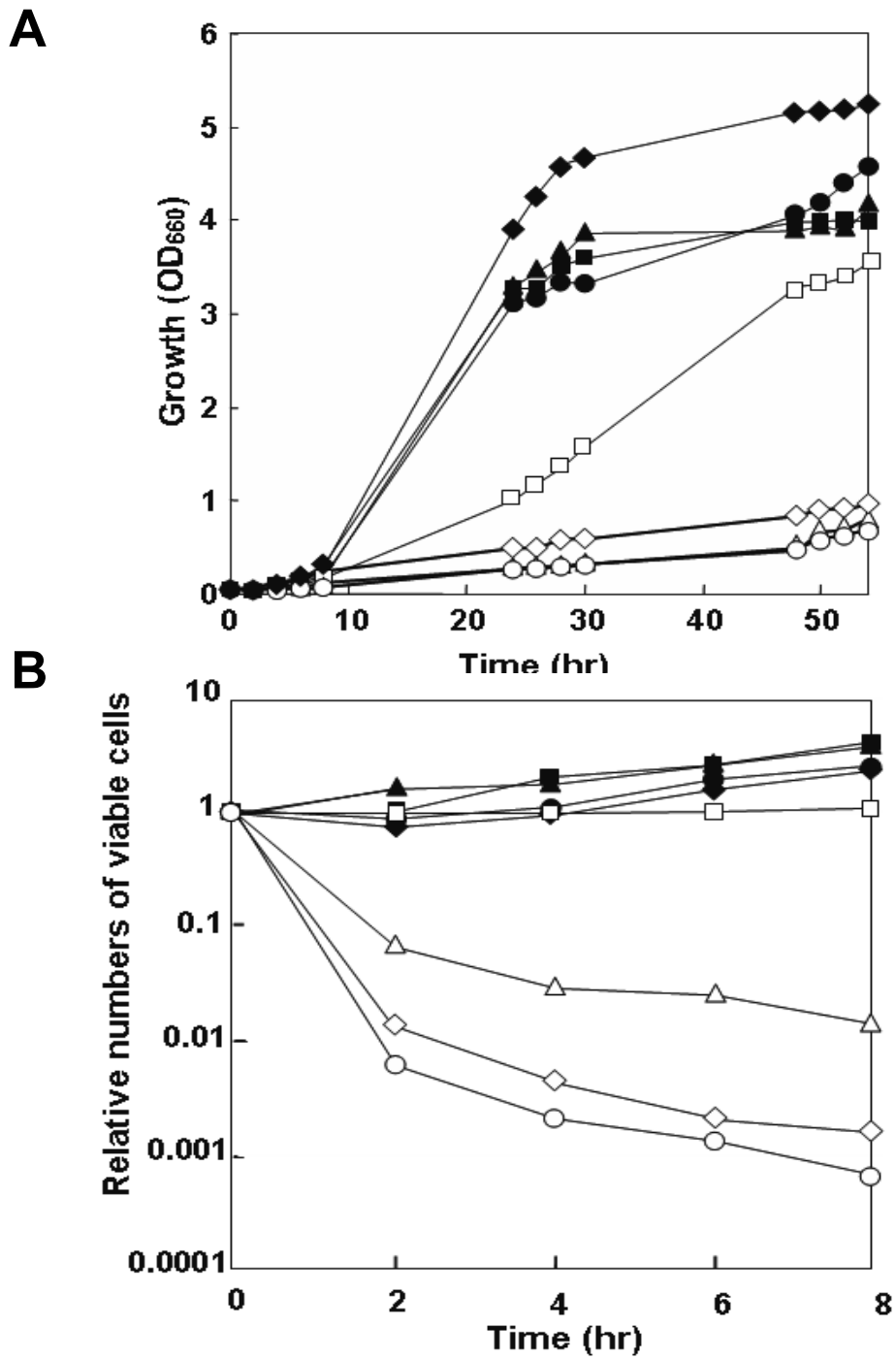


Fig. 2-8 第IV番染色体と第V番染色体からのセントロメアDNAの切り出しによる細胞死 (R^+ 、二倍体、液体培養) (レジェンドは次のページ)

Fig. 2-8 第 IV 番染色体と第 V 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死 (R^+ 、二倍体、液体培養) (前のページの図)

二倍体細胞において第 IV 番相同染色体と第 V 番相同染色体のセントロメア DNA が、それぞれ RS-*CEN4-HIS3*-RS DNA と RS-*CEN4-URA3*-RS DNA で置換した株 (YCD205 株 : ○および ●)、第 IV 番相同染色体 DNA が RS-*CEN4-HIS3*-RS DNA で置換した株 (YCD201 株 : △および ▲)、第 V 番相同染色体 DNA が RS-*CEN4-URA3*-RS DNA で置換した株 (YCD204 株 : ◇および ◆)、および両方ともセントロメア DNA を置換していない株 (YCD203 株 : □および ■) の増殖 (A) と生存率 (B) を調べた。各菌の増殖は培養液の 660 nm の波長における濁度で経時的に調べた。生存率はサンプリング 0 時間のときに 5 % SGlc (H-W) 平板培地上に出現したコロニー数に対する各サンプルのプレート上に出現したコロニー数の比で表した。

3.4 胞子形成時における細胞死の誘導

これまでの実験における細胞死の誘導では、*GAL1* プロモーターを利用し細胞死を起こしてきた。しかし、本システムは特定の条件における誘導型のプロモーターであれば応用が可能であるため、プロモーターを変更し、他の条件下で細胞死を誘導することを検討した。そこで、減数分裂時に発現する遺伝子のプロモーターを利用することにした。減数分裂時（配偶子形成時）に細胞死を起こすことができれば不稔性質を付与できる。*S. cerevisiae* の二倍体細胞は、栄養飢餓環境下に置かれると減数分裂を行い、胞子嚢を形成するため、この胞子形成時に特異的に発現するプロモーターに置き換えることで二倍体栄養細胞から胞子嚢（四分子）が形成される時期に染色体からセントロメア DNA の切り出しが誘導され胞子嚢（四分子）を全て致死にできると考えた (Fig. 2-9A)。

本実験では、胞子形成時に特異的に発現する遺伝子として、*IME2*、*ZIP1*、*SPS1*⁴³⁾、*SPS100*、および *DIT1*^{44,45)} を選び (Fig. 2-9B, Fig. 2-10)^{46,47)}、これらの遺伝子のプロモーターを使用して、胞子形成時における細胞死の誘導を試みた (Fig. 2-9 A)。二倍体 YCD201 株は第 IV 番染色体の *CEN4* DNA を RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA で置換することで減数分裂時の核分裂に必須な *RMD1* 遺伝子が破壊されている。そこで、YCD201 株 (RS-*CEN4*-*HIS3*-RS/RS-*CEN4*-*HIS3*-RS) に *RMD1* 遺伝子を導入して胞子形成能を回復させた (YCD301 株)。次に、この株にレコンビナーゼ発現プラスミドの *GAL1* プロモーターを *ZIP1*、*IME2*、*SPS1*、および *SPS100* の各プロモーターで置き換えたプラスミド (各々 pZR314、pIR314、pSR1314、および pSR0314) を形質転換法で導入した (各々、YCD304 株、YCD305 株、YCD306 株、YCD307 株、YCD302 株は、レコンビナーゼ発現プラスミドを導入していないコントロールである)。これら形質転換体を胞子形成培地 (SPO 培地) に塗布し、胞子を形成させた後、各胞子嚢の四分子をマイクロマニピレーターで解剖して、各胞子の生育を調べ、生存率を算出した (Fig. 2-11)。その結果、*IME2* プロモーターと *SPS100* プロモーターでは、ほとんどの胞子が生育し、*SPS1* プロモーターでは、生存率が 48.5 % に低下した。いずれも栄養増殖時と比べ生存率は高い値となった。生存率が高い原因としてレコンビナーゼ発現プラスミドに YCp 型プラスミド (pRS314 を基本とした) を使用し、コピー数が少ないためレコンビナーゼの発現量が低い可能性が考えられるのでプラスミドをマルチコピー型、すなわち、YE_p 型のプラスミドに変えることに

した。

また、レコンビナーゼが孢子形成時に特異的に発現しているかを確認するために、各プロモーターの下流にレポーター遺伝子として *GFP* 遺伝子を連結したプラスミド (pZG2324、pIG324、pSG1324、pSG0324、pDG0324) を作製し、二倍体細胞 (YCD301 株) に形質転換法で導入した (各々、YCD308 株、YCD309 株、YCD310 株、YCD311 株、YCD312 株)。これらの形質転換体を孢子形成液体培地 (SPO 液体培地) で培養し経時的にサンプリングして、*GFP* の発現、孢子形成率、および DAPI 染色による核数の確認を行った (Fig. 2-12 ~ 2-16)。さらに、顕微鏡観察したものを計数し *GFP* の発現と核の個数を調べ *GFP* 発現細胞の割合と核数の経時変化をグラフにまとめた (Fig. 2-17)。各プロモーターの下流に *GFP* 遺伝子を連結し、*GFP* の発現を調べた結果、*SPS100* では、0 時間で一部発現している細胞が存在していた。*IME2* プロモーター、*ZIP1* プロモーター、*SPS1* プロモーター、および *DIT1* プロモーターでは 0 時間で発現が抑制され、孢子形成時に特異的に発現していることが確認できた。この発現時期を確認したプラスミド (pZG2324、pIG324、pSG1324、pSG0324、および pDG0324) から *GFP* 遺伝子を切り取り、pHM209 のレコンビナーゼ遺伝子と置き換え孢子形成時に発現可能なマルチコピー型のレコンビナーゼ発現プラスミド (pZNR2324、pINR324、pSNR1324、および pSNR0324) を作製し、YCD301 株に形質転換法で導入した (各々、YCD315 株、YCD316 株、YCD317 株、および YCD318 株)。これら形質転換体を孢子形成培地 (SPO 培地) に塗布し、孢子を形成させ子嚢胞子の四分子を解剖し、各胞子の生育を調べ生存率を算出した (Fig. 2-18)。その結果、レコンビナーゼ発現プラスミドを YEp 型に置き換えても生存率は、YCp 型と大差がなく、レコンビナーゼの発現量は、原因でないことが示唆された。また、栄養細胞における細胞死の誘導と比べ減数分裂時の細胞死の誘導は効率が非常に低く、これは、分裂形式の違いや孢子形成に関わる多くのタンパク質が発現しているため、レコンビナーゼが RS に作用しにくいことや、クロマチンが高度に凝縮されていることなどが、原因として考えられる。そのため、減数分裂時の細胞死の誘導は今後、検討の余地がある。

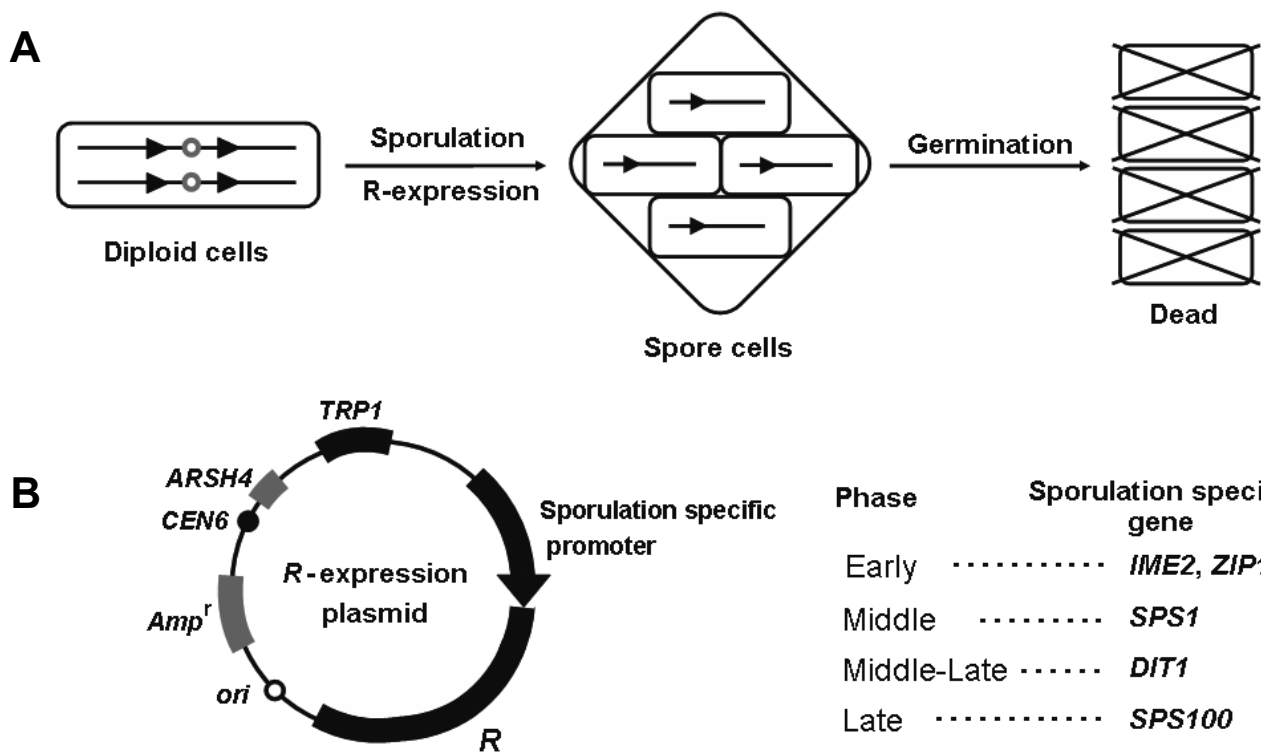


Fig. 2-9 減数分裂時（孢子形成時）における細胞死の誘導

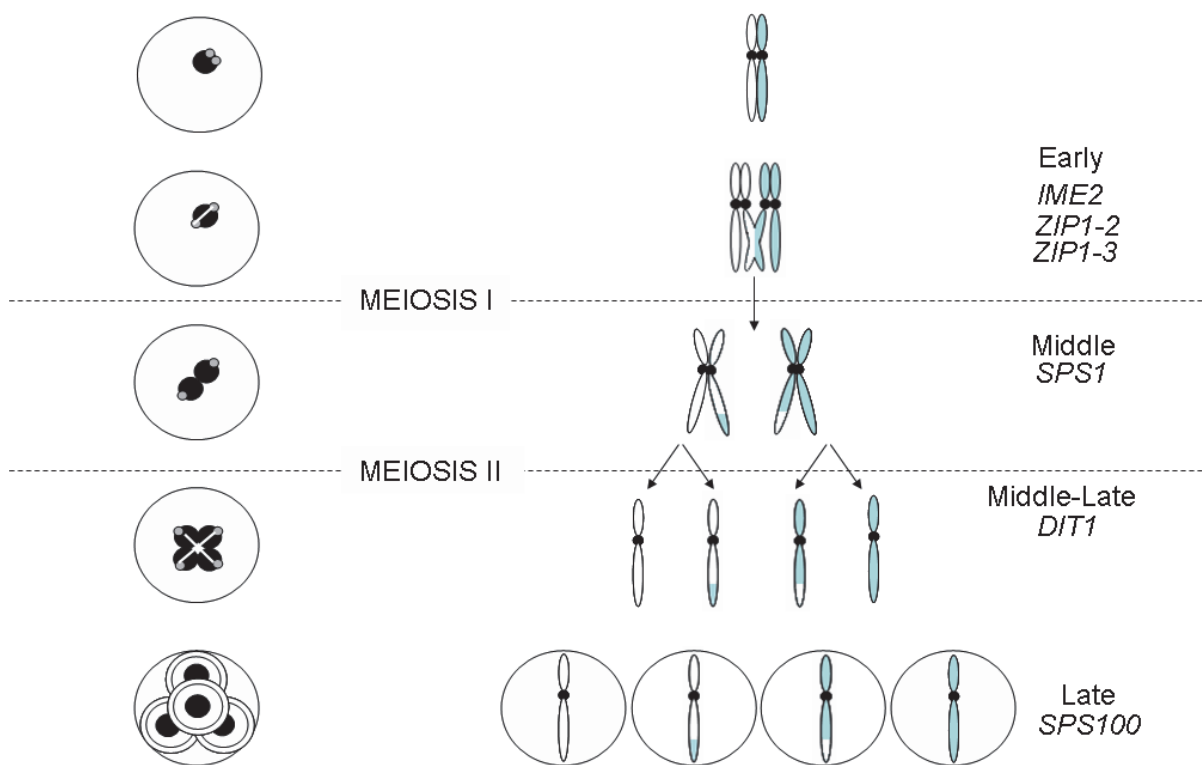


Fig. 2-10 *S. cerevisiae* の減数分裂と胞子形成に関わる遺伝子

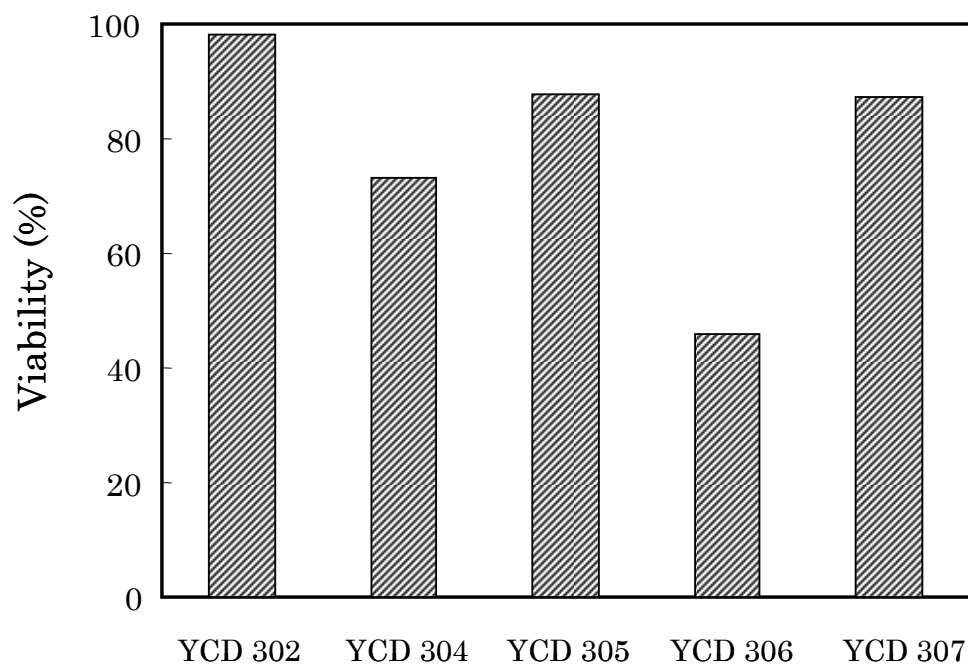


Fig. 2-11 減数分裂期（孢子形成時）における染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導（生存率）

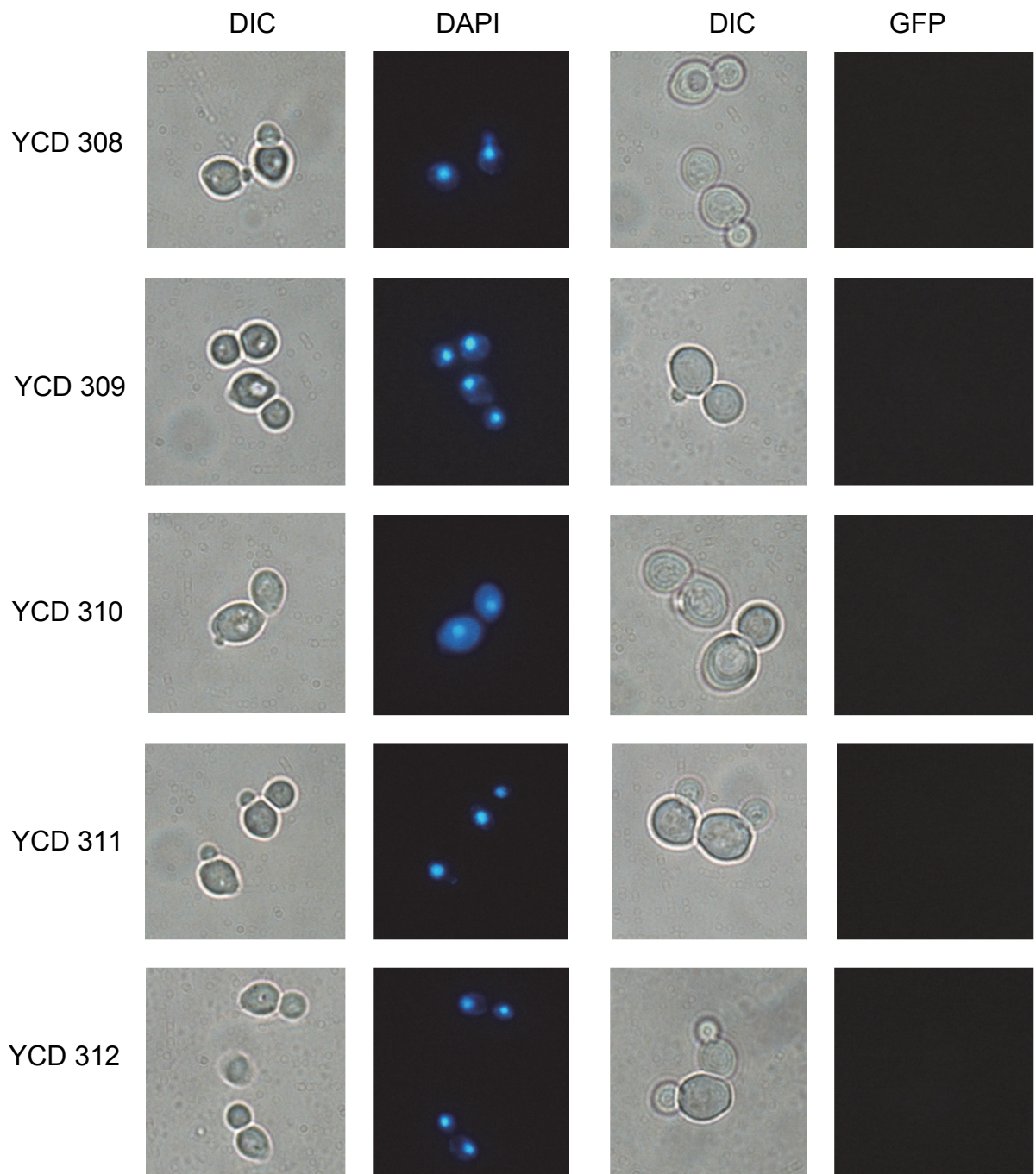


Fig. 2-12 胞子形成 0 時間における DAPI 染色および GFP の観察

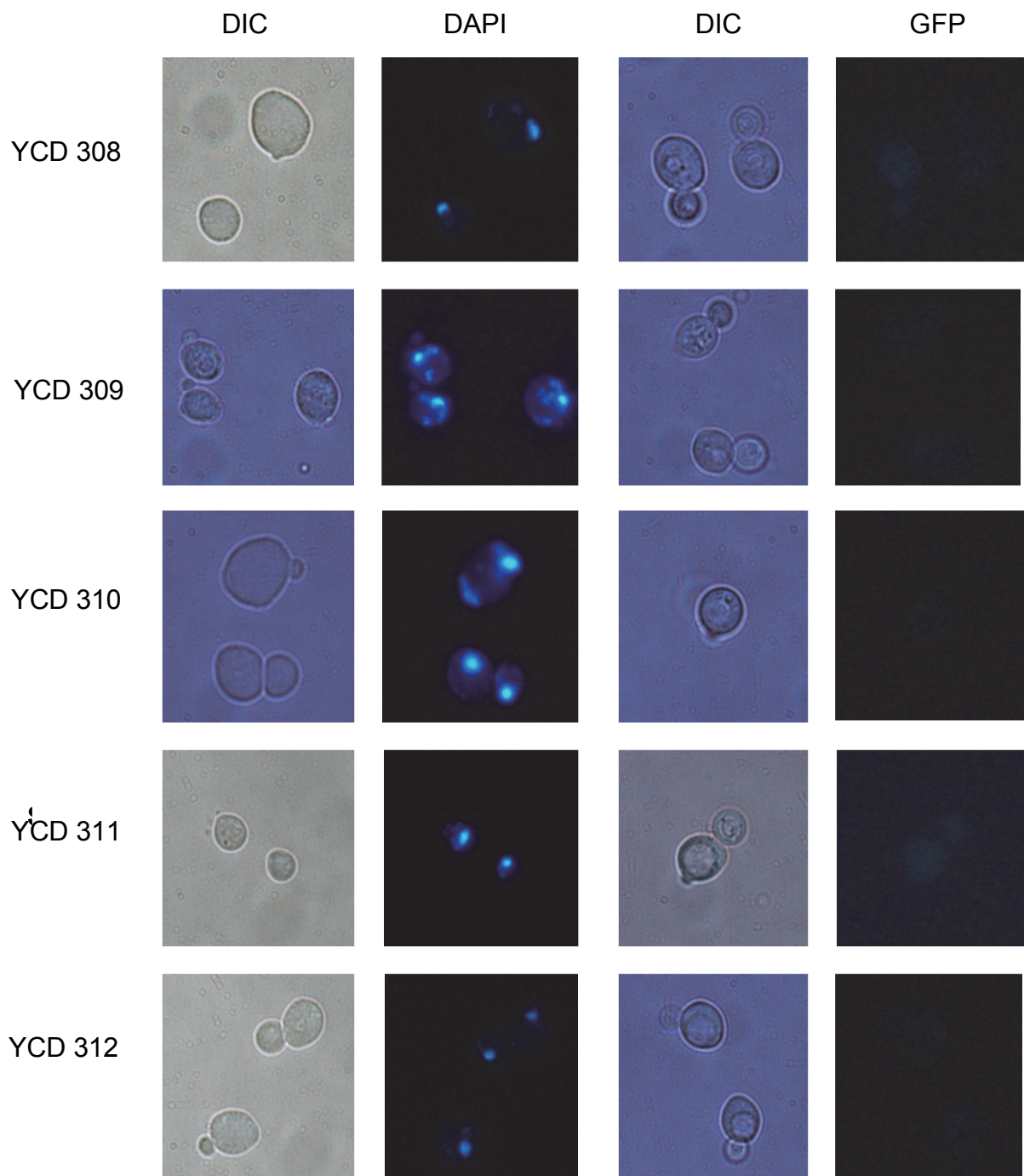


Fig. 2-13 胞子形成 24 時間における DAPI 染色および GFP の観察

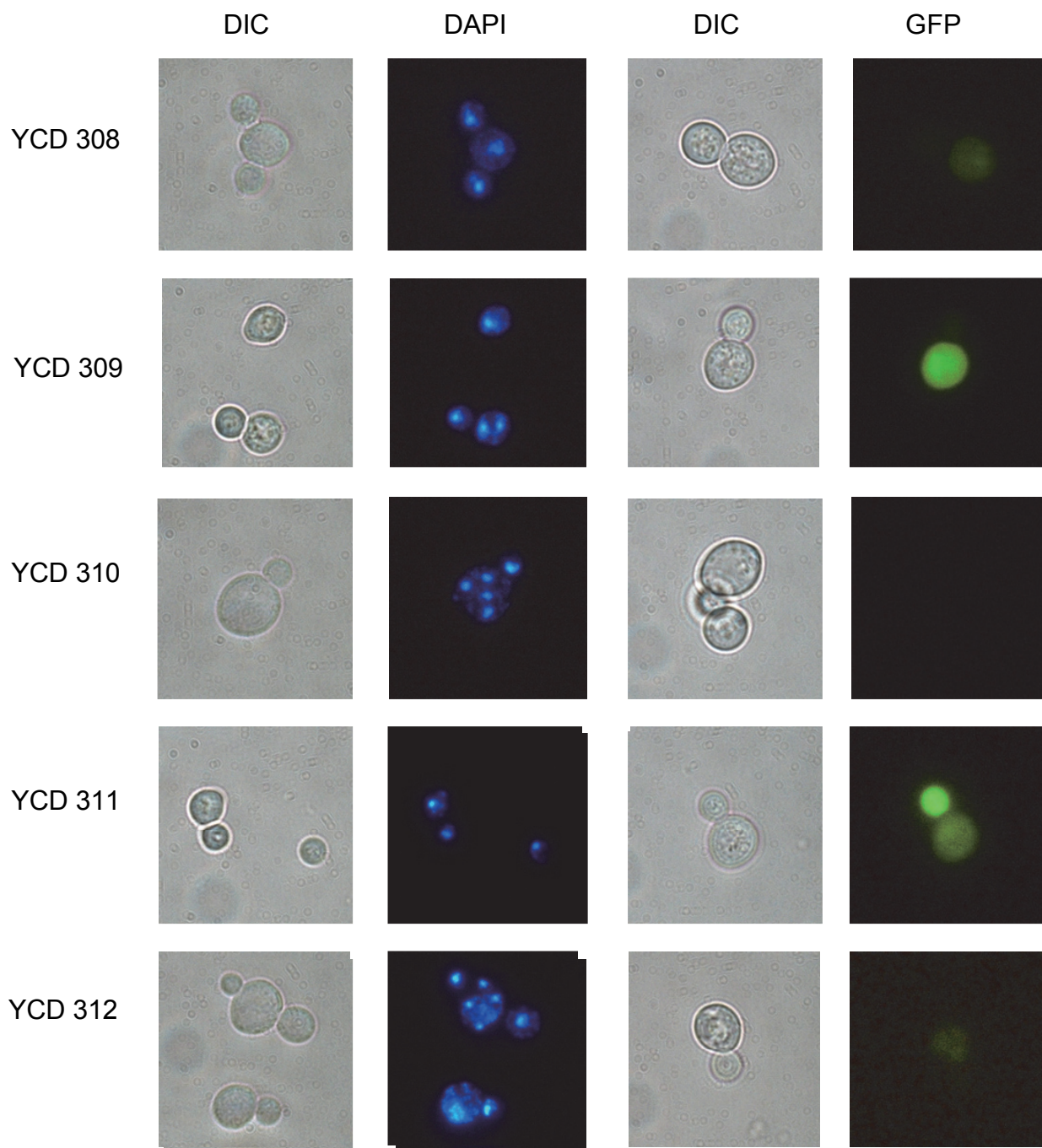


Fig. 2-14 胞子形成 48 時間における DAPI 染色および GFP の観察

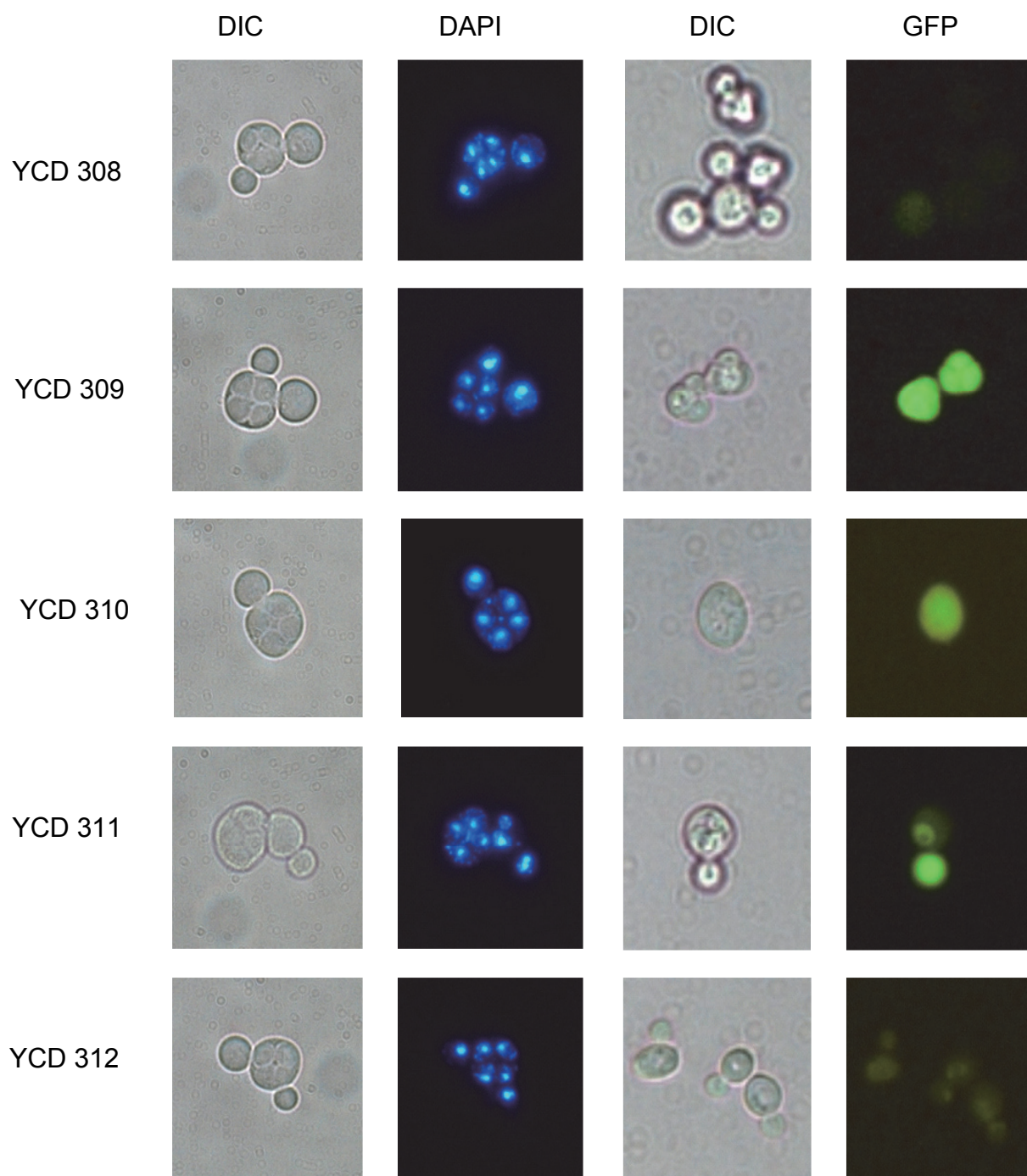


Fig. 2-15 胞子形成 72 時間における DAPI 染色および GFP の観察

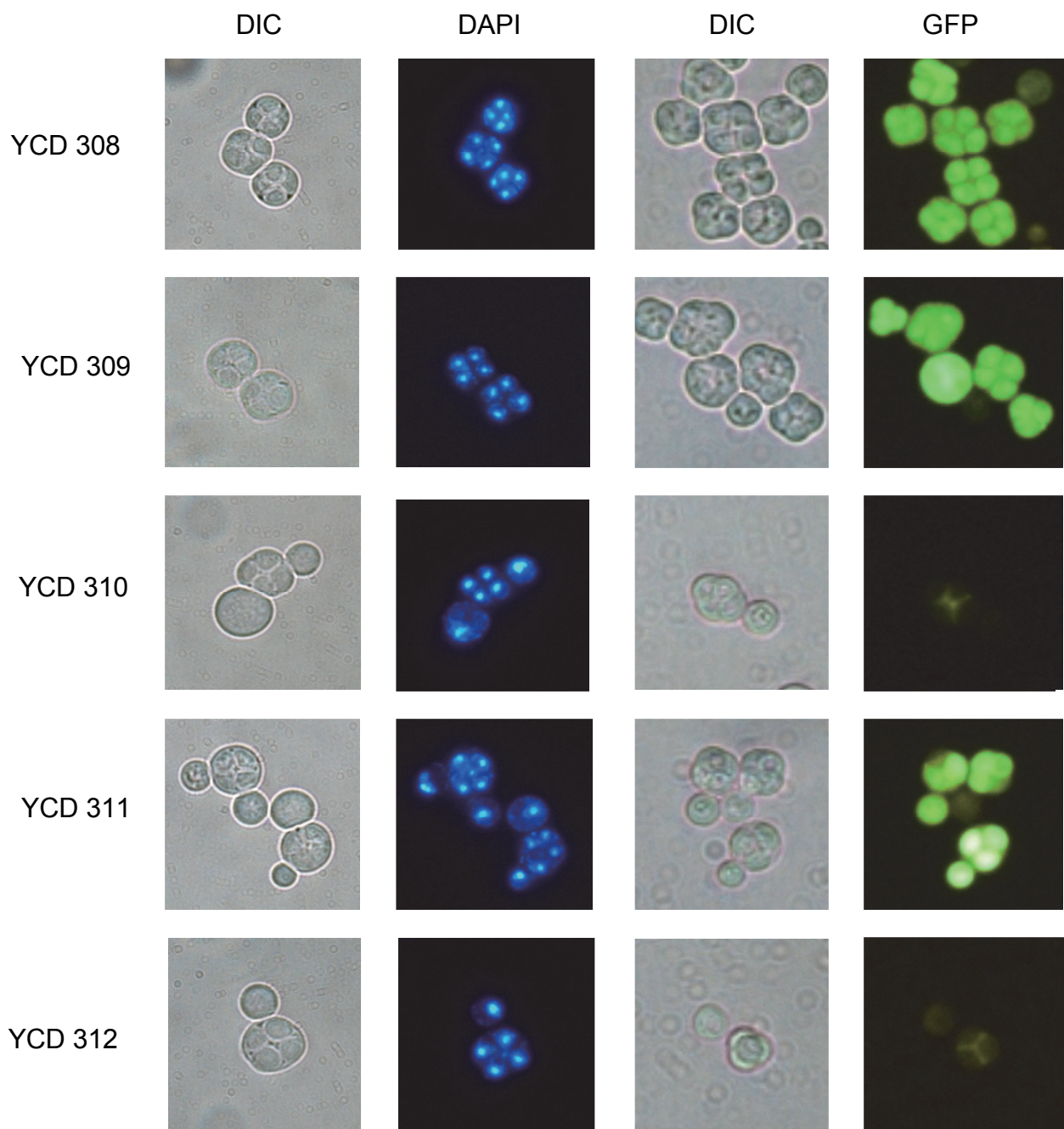


Fig. 2-16 胞子形成 96 時間における DAPI 染色および GFP の観察

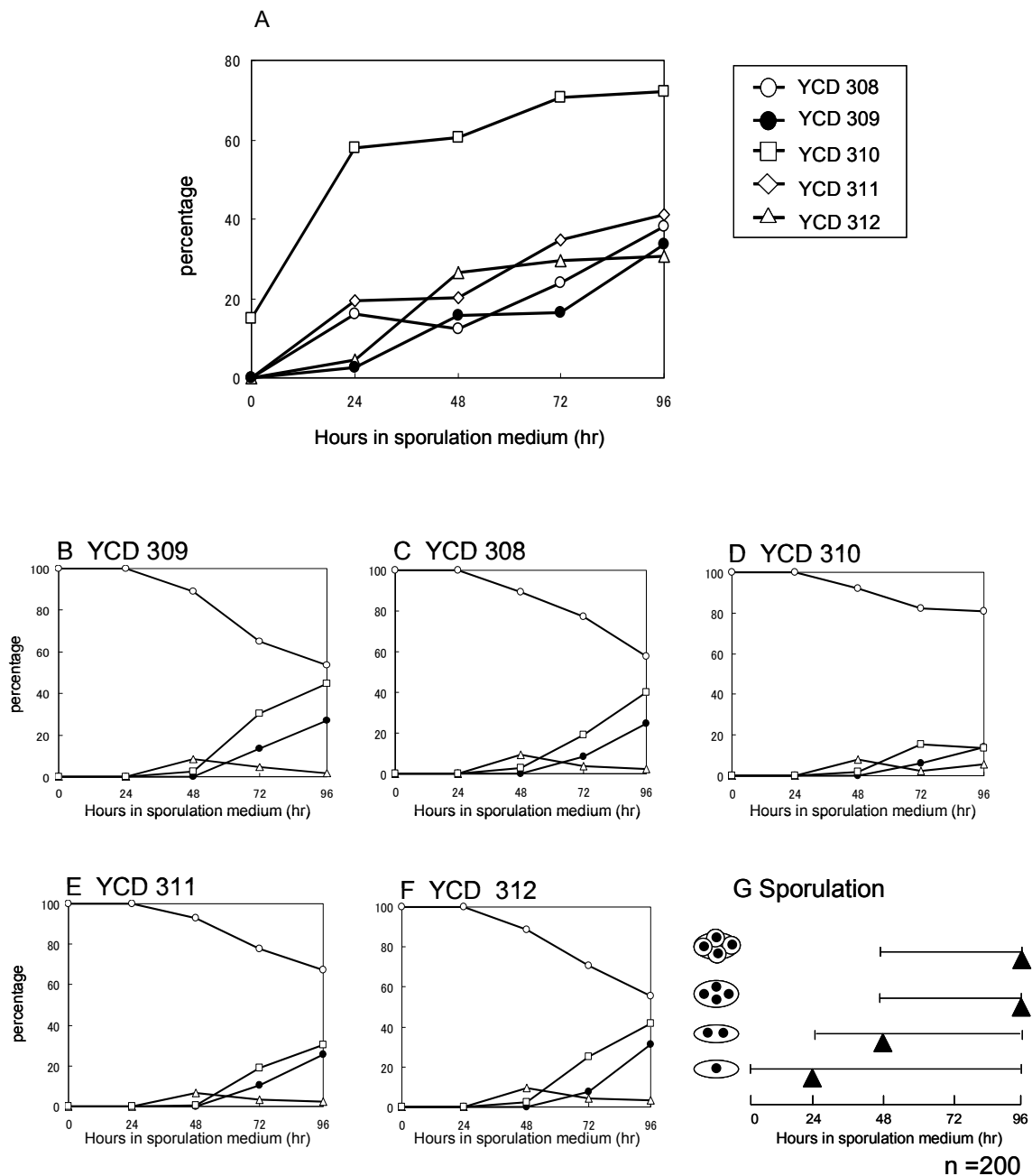


Fig. 2-17 胞子形成における経時的な GFP の発現と胞子形成率および核数

減数分裂期（胞子形成時）に機能する遺伝子である *IME2*、*ZIP1*、*SPS1*、*SPS100*、および *DIT1* のプロモーターの下流に *GFP* 遺伝子を連結したプラスミド (pZG2324、pIG324、pSG1324、pSG0324、pDG0324) を、二倍体細胞 (YCD301 株) に形質転換法で導入した YCD308 株 (*ZIP1-GFP*)、YCD309 株 (*IME2-GFP*)、YCD310 株 (*SPS1-GFP*)、YCD311 株 (*SPS100-GFP*)、YCD312 株 (*DIT1-GFP*)、を用いて胞子形成時の各プロモーターの発現 (A) を調べた。また、胞子形成液体培地(SPO 培地)における培養液を経時的にサンプリングした培養細胞を DAPI 染色により核を染色して、胞子嚢、一核から四核の各胞子嚢を計数し調べた (B~F (胞子形成率: ●、一核細胞の割合: ○、二核細胞の割合: △、四核細胞の割合: □))。 (G) は、胞子形成培地での培養時間と子嚢形成のステージを表している。

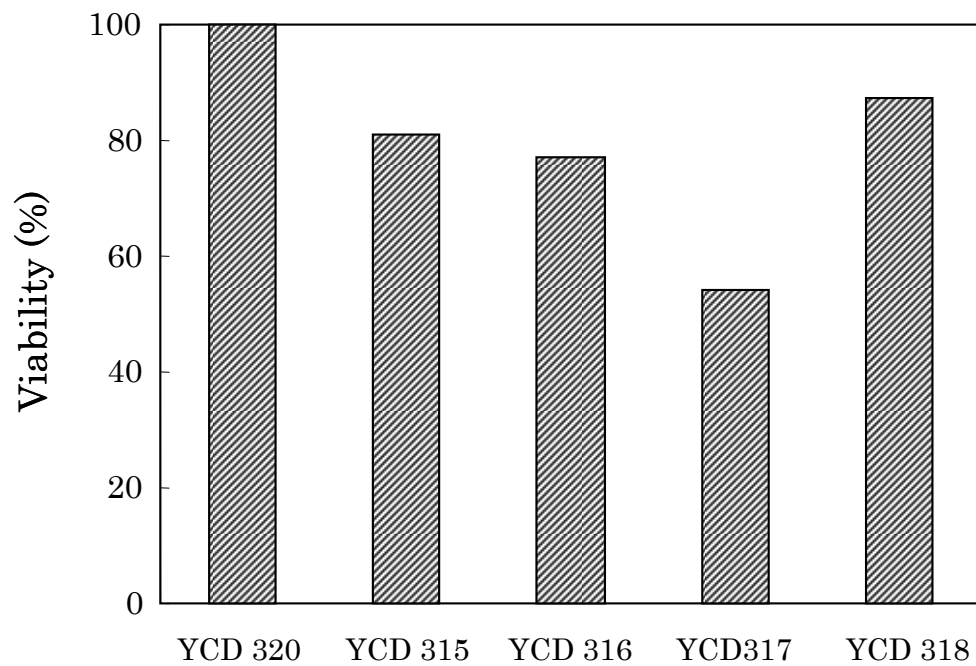


Fig. 2-18 減数分裂時（孢子形成時）における染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導（生存率）

第4節 考察

遺伝子組換え生物 (Genetically Modified Organism : GMO) が、生態系や生物多様性への悪影響を及ぼさないために必要な処置を講じるバイオセーフティの観点から、生物学的な遺伝子組換え生物の拡散防止システムの構築を目指した。拡散防止策として、条件致死性質や不稔性質の付与が有効であると考え、*Z. rouxii* 由来の pSR1 プラスミドに備わっている部位特異的組換え系を利用して、特定の条件下で染色体からセントロメア DNA を切り出し細胞死を誘導するシステムを確立した。

セントロメア DNA を部位特異的組換え系による切り出しのターゲットとした理由は、セントロメア DNA が、染色体の機能や維持に必須なドメインであり、セントロメア DNA を失った染色体は有糸分裂時に不分離を起こし、細胞は生育に必須な遺伝子を多数失い生育が困難となるためである。したがって、生存する上で必要な遺伝子を挟むように組換え標的部位 RS を挿入し、特定の環境条件に発現する遺伝子のプロモーターを利用し、レコンビナーゼを発現させることで、これを切り出し細胞に致命的なダメージを与えることができると考えた。そこで、細胞死の誘導のモデルとして、*S. cerevisiae* の KA311A 株の一倍体細胞の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に RS を同じ方向に挿入した後、*GAL1* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するレコンビナーゼ発現プラスミドを導入し、YCD101 株を作製した。YCD101 株のレコンビナーゼ発現の誘導には、*GAL1* プロモーターを利用しているため、ガラクトース培地で培養するとレコンビナーゼが生産され、染色体からセントロメア DNA が切り出される。コントロールとして、RS をもたない YCD103 株、レコンビナーゼ遺伝子を破壊した YCD102 株、そして、細胞死の誘導システムをもつ YCD101 株を用いたが、ガラクトースプレートにおける培養条件で生存率の低下が確認できた株は、YCD101 株のみであった。また、生存率は、 1.4×10^{-5} となり、大幅に生存率が低下することが明らかとなった。

液体培養では、増殖が著しく抑制されており、生存率も時間と共に低下した。この時の培養細胞の染色体 DNA のサザン解析から、経時的にセントロメア DNA が切り出されていることが確認できた。これらのことから、部位特異的組換え系を利用し、一倍体細胞の染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を起こし、生存率を大きく低下できる

ことが判明した。

次に、二倍体細胞での細胞死の誘導を検討した。二倍体細胞では、相同染色体の両方の *CEN4* を *RS-CEN4-HIS3-RS* に置き換えた YCD201 株を作製し細胞死を誘導した。二倍体細胞のプレート培養での生存率は、 6.9×10^{-4} であり、一倍体細胞と比較すると 50 倍ほど高い生存率であった。液体培養においても同様に一倍体細胞よりも生存率が高い傾向が示唆された。これは、一倍体細胞では、染色体上のターゲットであるセントロメア DNA が一箇所であるのに対し、二倍体細胞では、相同染色体のセントロメア DNA をほぼ同時に切り出す必要があるため、レコンビナーゼタンパク質が RS に作用する頻度や、一倍体細胞で示唆された生存原因が二倍体細胞では大きく影響している可能性が考えられる。

また、YCD202 株におけるガラクトース培養では、非常に増殖が遅いことが特徴であり、そのため、コロニーが非常に小さくプレート上に出現した全てのコロニーを計数することが難しいため、見かけ上の生存率の値が下がっている。YCD202 株は、ガラクトース培養時に第 IV 番相同染色体の片方だけが脱落し、染色体の脱落で生じた $2n-1$ 異数体細胞となり、第 IV 番染色体の遺伝子産物の量が減少することで、細胞周期に遅延が生じている。しかし、 $2n-1$ 異数体細胞は、増殖を繰り返すことで正常な二倍体細胞に復帰することが知られている。また、液体培養での生存率の低下は認められないことも加え、YCD202 株におけるプレート培養では、培養時間を延長することで正確な生存率を求めることができる。

二倍体細胞の生存率を低下させるため、複数の染色体からセントロメア DNA を切り出すことを検討した。二倍体細胞で第 IV 番相同染色体と第 V 番相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導できる YCD205 株 を作製した。プレート培養で切り出しを誘導した結果、生存率は 4.8×10^{-5} となり、YCD201 株 (6.9×10^{-4}) よりも低下し、一倍体細胞の生存率とほぼ同程度まで低下したことから、二倍体細胞において複数の相同染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導は、有効な手段であると言える。これは、切り出されるセントロメア DNA を複数にすることで、細胞から染色体 DNA が脱落する頻度が上昇したため、生存率が低下したと考えている。

しかし、一倍体細胞で第 IV 番染色体および第 V 番染色体からセントロメア DNA を切り出した場合、第 IV 番染色体のみから、または第 V 番染色体のみからセントロメア DNA を切り出した時と比較して生存率の低下は認められなかった。また、これまでの細胞死の誘

導では、一倍体細胞と二倍体細胞での誘導、切り出す染色体（第 IV 番染色体、第 V 番染色体）を変えての誘導や複数の染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる誘導を行ったが、生存細胞の出現により、生存率は 10^{-5} 以下にならないことが判明した。液体培養においても培養 50 時間以降は、増殖が確認でき、生存を可能としている原因が存在していることが強く示唆された。

また、本研究では、部位特異的組換え系を利用したセントロメア DNA の切り出しは、第 IV 番染色体と第 V 番染色体で検証している。しかし、*S. cerevisiae* の染色体は 16 本存在しているので、セントロメア DNA の切り出しを行う染色体の種類により結果に異差が生じることは容易に考えられる。そのため、各染色体での比較を行いその要因は何かを調べることは重要であると思われる。

次に、減数分裂期（孢子形成時）に機能する遺伝子 *IME2*、*ZIP1*、*SPS1*、*SPS100*、および *DIT1* のプロモーターを使用して、減数分裂期（孢子形成時）において細胞死が誘導されるか検討した。孢子形成の後、各孢子嚢をマイクロマニピレーターで解剖して孢子の生育を調べた結果、生存率は最も低いもので 48.5% となり、栄養増殖時と比べ生存率は非常に高い値となった。生存率が高い原因として、レコンビナーゼの発現量に着目し、発現プラスミドを YCp 型から YEp 型に変更して試みたが、生存率の低下は認められなかった。また、発現プラスミドの発現時期を GFP レポーター遺伝子を使用して確認した結果、栄養増殖時はほとんど発現しておらず、減数分裂期（孢子形成時）に特異的に発現が確認できたことから、レコンビナーゼタンパク質の発現量や発現プラスミドの機能による原因の可能性は低いと考えられる。

栄養細胞の体細胞分裂と比べ減数分裂では、クロマチンの凝縮などの染色体の構造や空間的配置などダイナミックに変化していることがレコンビナーゼと RS DNA の物理的な接触、あるいは 2 個の RS DNA の接触を妨げ、セントロメア DNA の切り出しが起きにくくなっている可能性が考えられる。また、減数分裂期に染色体からの切り出しが難しい場合、孢子の発芽時にレコンビナーゼを発現させて配偶子の機能を不活性化させることで不稔性を付与できる可能性があると思われる。減数分裂時の細胞死の誘導は効率が非常に低いことから、原因の解明や適切なプロモーターの探索など検討の余地がある。

第3章 セントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

第1節 緒言

第2章で *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換え系を利用して染色体からセントロメア DNA を切り出すことにより細胞死を誘導することを検討した。その結果、一倍体細胞では染色体1本からセントロメア DNA を切り出すことで、また二倍体細胞では相同染色体の両方からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導でき、細胞死の誘導システムを確立できた。実用化に向けて、生存率をできる限り下げることが重要である。YCD101株を SGal プレートに広げ培養した時、生存率は 1.4×10^{-5} と大幅に低下したが、コロニーが僅か出現した。また、SGal 液体培地で培養した時、培養約50時間以降で増殖速度が増大した。このように、セントロメア DNA の切り出しで細胞死を誘導している時に生存細胞が出現する。それらの生存細胞が出現する仕組みを解明し、その仕組みに基づき、生存細胞の出現を抑制することで、生存率をさらに低下できれば、実用化に有効であると考えられる。そこで、第3章では、一倍体細胞で生存細胞が出現する仕組みを検討した。生存細胞が出現する仕組みとして次の(1)～(7)の可能性が考えられる。(1) 第IV番染色体からの RS DNA の欠失によって切り出しが起こらない。(2) レコンビナーゼ発現プラスミドにある *P_{GALI}-R* 遺伝子の発現が生存細胞で抑制されている。(3) 染色体から切り出された *CEN4* DNA をもつ DNA 断片が第IV番染色体のどこかの位置に組み込まれた。(4) *CEN4* DNA が切り出された後、第IV番染色体のどこかの位置に新たにセントロメア DNA が形成された(ネオセントロメアが形成された)。(5) *CEN4* DNA が切り出された後、他の染色体のセントロメア DNA が組み込まれた。(6) 切り出しによって *CEN4* DNA を失った染色体が他の染色体に融合した。(7) *CEN4* DNA が切り出された後、キネトコア構成タパク質の過剰発現によりセントロメア様領域が染色体の分配に機能する。そこで、プレート培養で第IV番染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現した生存細胞クローン51株についてセントロメア領域の構造のPCR解析、RS領域のDNAシーケンス解析、染色体DNAのパルスフィールドゲル電気泳動解析、およびレコンビナーゼ発現プラスミドの機能解析などを行った。その結果、主な原因は、2個のRSのうち一方が染色体から欠失し、切り出しが起こらなかったことが明らかとなっ

た。RS の欠失は全て RS の両端にある共通の配列（5'-TCGA-3' 配列）で挟まれた領域で起こっていた。また、切り出しが起こった後に新しいセントロメア（ネオセントロメア）が形成されたか、他の染色体のセントロメア DNA が挿入された可能性が示唆された。さらに、残りの生存細胞クローンは RS の欠失以外の原因で切り出しが起こらなかったことが考えられた。これらの結果より染色体からの RS の欠失を抑制することで生存率をさらに低下できる可能性が示唆された。

第 2 節 材料および方法

2.1 使用菌株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチド

本研究で使用した酵母 *S. cerevisiae* 株を Table 3-1 に、プラスミドを Table 3-2 に、オリゴヌクレオチドを Table 3-3 に示す。また、プラスミド作製の宿主として *Escherichia coli* DH5α [F⁻ φ80d*lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA*-*argF*) *U169* *recA1* *endA1* *hsdR17*(*rK*, *mK*) *supE44* λ-*thi-1* *gyrA* *relA1*] ²⁴⁾を使用した。

Table 3-1 Strains used in this study

Strain	Description	Reference
YCD100	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2</i> <i>pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS)	This study
YCD101	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2</i> <i>pho3-1</i> Chr. IV (RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209]	This study
YSC1 series	Surviving cell clone derived from YCD101 (Clone 1 - Clone 51)	This study
YSC2 series	Transformant of YSC1 with plasmid pHM153 DNA	This study
YSC3 series	Transformant of YCD100 with plasmid pHM209 DNA recovered from YSC1	This study

Table 3-2 Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Reference
pHM209	<i>P_{GALI}-R</i> 2μm DNA - <i>ARS STB TRP1 Amp^r ori</i>	25
pHM153	<i>P_{GALI}-R</i> 2μm DNA - <i>ARS STB LEU2 Amp^r ori</i>	12
pFA6a-3HA-kanMX6	3HA <i>KanMX Amp^r ori</i>	48

Table 3-3 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence
CEN4P51	5'-AACTGTGACGATAAAACCGG-3'
CEN4P31	5'-TGTATGTCCATGATTCGCCG-3'
HIS3code5	5'-TAGCGATAGAGCACTCGATC-3'
HIS3code3	5'-AGGTGGCTTCTCTTATGGCA-3'
CEN4Hpa	5'-TACTCCAGGTACAGTCCTCT-3'
CEN4Pvu	5'-GTGGTCAGAACCACAGTTAG-3'
HIS3RSseq	5'-CCTCCACCAAAGGTGTTCTT-3'
CEN4P31C	5'-CGGCGAATCATGGACATACA-3'
PHO135	5'-GCATTACCATACACCCTGGA-3'
PHO133	5'-GGTCTTGGATAATCGTGCGA-3'
HSP315	5'-TGTATTCTACAGTGACGGCG-3'
HSP313	5'-AAGCGTCGATGGATCTTACG-3'
CSE4HAF2	5'-AGACATGCAACTAGCAAGAAGAATCAGGGGACAG TTTATTCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'
CSE4HAR1	5'-AAAGGGAAAAATCGGCTCCAGCCCTGAAGCACAA ATATCAGCATAGGCCACTAGTGGATC-3'
CSE4CDERC	5'-TTTTATGTTTCGGTAATCATAAACA-3'
CSE4CDELC	5'-GTCACATGCTTATAATCAACTTTTT-3'

2.2 使用培地

酵母用培地

酵母用培地は、YPAD 培地、SGlc 培地、SGal 培地、および SRaf 培地を使用した。各培地の組成は第 2 章に記載した。

大腸菌用培地

大腸菌用培地は、LB 培地を使用した。LB 培地の組成は第 2 章に記載した。

2.3 滅菌および培養

培地は、全てオートクレーブ (1kgf/cm²、10 分間) で滅菌して使用した。酵母は、28 °C で静置培養または振とう培養を行った。大腸菌は、37 °C で静置培養または振とう培養を行った。

2.4 DNA の操作

DNA の精製、DNA の調製、形質転換法、DNA の酵素処理、アガロース電気泳動、DNA 断片の回収は、第 2 章に記載した。

2.5 部位特異的組換えによる細胞死の誘導 (プレート)

部位特異的組換えによるセントロメア DNA の切り出しの誘導によって細胞死が起こるかは、プレート培養で検定した。プレート培養での検定方法は、第 2 章に記載した。また、この細胞死の誘導を何回も繰り返して 51 株の生存細胞クローンを取得した。

2.6 PCR 解析 (生存細胞の解析)

一倍体 YCD101 株の細胞死の誘導 (プレート) で出現した生存細胞のセントロメア領域の構造を生存細胞のゲノム DNA を鋳型とし、CEN4Hpa と CEN4Pvu をプライマーとした PCR 法で解析した。PCR 法は第 2 章に記載した方法で行った。増幅 DNA のサイズをアガロースゲル電気泳動で解析した。増幅 DNA のサイズは、セントロメア DNA の切り出し誘導前の YCD101 株では 3.0 kb であり、もし、セントロメア DNA の切り出しが起これば、

0.8 kb と小さくなる。また、生存細胞クローンにおいて *CEN4* DNA が存在するかを決定するために、ゲノム DNA を鋳型とし、*CEN4* の centromere DNA element (CDE) の両端部分の CEN4CDERC と CEN4CDELIC をプライマーとした PCR 法で解析した。

2.7 DNA のシーケンシング解析

一倍体 YCD101 株でセントロメア DNA の切り出しを誘導した時に出現した生存細胞において 2 個の RS 領域の DNA のシーケンシングを行った。左腕にある RS DNA では、Watson 鎖と Crick 鎖の塩基配列は、それぞれプライマー CEN4Pvu と CEN4P31C を使用して決定した。また、右腕にある RS DNA では、Watson 鎖と Crick 鎖の塩基配列は、それぞれプライマー HIS3RSseq と CEN4Hpa を使用して決定した。DNA のシーケンシングは、第 2 章に記載した方法で行った。DNA 塩基配列は、Genetyx-Mac Ver. 10.1 (ゼネテックス株式会社) を用いて解析した。

2.8 パルスフィールドゲル電気泳動法による染色体 DNA の構造の解析

生存細胞の染色体 DNA の構造は、パルスフィールドゲル電気泳動法で解析した。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 用の酵母染色体 DNA の調製は、第 2 章に記載した方法を一部改変して、生存細胞を YPAD 液体培地 5ml に植菌し、28 °C で一晩振とう培養した培養液を使用して調製した。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)、分離 DNA のサザン解析は、第 2 章に記載した方法で行った。サザン解析のプロローブは、*CEN4* DNA、*HIS3* DNA、*SSD1* DNA、*PHO13* DNA、および *HSP31* DNA を使用した。*CEN4* DNA プロローブは、プライマーとして CEN4P51 と CEN4P31 を使用した PCR で増幅した 513 bp DNA であり、*HIS3* DNA プロローブは、プライマーとして HIS3code5 と HIS3code3 を使用した PCR で増幅した 531 bp DNA である。また、*PHO13* DNA プロローブは、プライマーとして PHO135 と PHO133 を使用した PCR で増幅した 761 bp DNA であり、*HSP31* DNA プロローブは、プライマーとして HSP315 と HSP313 を使用した PCR で増幅した 659 bp DNA である。

2.9 レコンビナーゼ発現プラスミドの機能解析

生存細胞においてレコンビナーゼ発現プラスミド pHM209 が機能しているかを、(A) 生存細胞に pHM209 (*TRP1* マーカー) と選択マーカー遺伝子が異なる pHM153 (*LEU2* マーカー) を導入した細胞で細胞死が起こるか、と (B) 生存細胞から回収した pHM209 を YCD101 株 (*CEN4* の両側に RS をもつ) に導入した細胞で細胞死が起こるかで検討した。生存細胞で pHM209 が機能していれば、(A) の実験で細胞死は起こらないが、(B) の実験で細胞死が起こると考えられる。また、生存細胞で pHM209 が機能していない場合は、その逆の結果が得られると考えられる。(A) の実験は、生存細胞 (YSC1 株シリーズ) に形質転換法で pHM153 を導入し、得られた形質転換体 (Leu⁺ Trp⁺) においてセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導 (プレート培養) を行い、生存率を調べた。(B) の実験は、生存細胞 (YSC1 株シリーズ) から pHM209 を回収し、回収した pHM209 を用いて YCD101 株を形質転換し、得られた形質転換体 (Trp⁺) においてセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導 (プレート培養) を行い、生存率を調べた。生存細胞からの pHM209 の回収は、第 2 章に記載した「QIAprep-Spin Miniprep Kit によるプラスミド DNA の少量調製」を一部変更して行った。生存細胞を YPAD 液体培地 8 ml に植菌し、28 °C で一晩振とう培養した。この培養液を M2 サイズの試験管に移し、集菌 (3,000 rpm、5 分間、4 °C : himac CF7D2 遠心機、日立工機株式会社) した。菌体を 0.2 M トリス (ヒドロキシアミノメタン) 水溶液 [(pH 未調整)、和光純薬工業株式会社] 1.0 ml に懸濁し 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、 β -メルカプトエタノール (和光純薬工業株式会社) 50 μ l を加え混合した。室温で 30 分間放置した後、集菌 (3,000 rpm、5 分間、4 °C : MX-100 微量高速遠心機、株式会社トミー精工) した。菌体を Zymolyase 溶液 [0.125 mg/ml Zymolyase 100T (生化学工業株式会社)、1.0 M ソルビトール、40 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8)] 1.0 ml に懸濁し、28 °C で 1 時間放置しスフェロプラスト化した。集菌 (3,000 rpm、5 分間:MX-100 微量高速遠心機) し、QIAprep-Spin Miniprep Kit を使用して pHM209 を調製した。

2.10 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

酵母細胞から調製した全タンパク質は、12.5 % アクリルアミドゲルを用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Laemmli 法⁴⁹⁾に準拠した。

予め、2枚の泳動用ガラス板（アトー株式会社）の間にシールガスケット（アトー）を挟んでマグネットクリップ（アトー）で固定して、泳動プレートを組み立てた。50 ml 容ビーカーに Lower Tris 液 [超純水に TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl ethylene diamine) 400 μ l、Tris 36.4 g、SDS (sodium dodecyl sulfate) 0.8 g を加えて混合し、10 N HCl を加えて pH8.8 に調製し、超純水で 200 ml にメスアップした] 2.25 ml、超純水 3.75 ml、および 30% アクリルアミド溶液 3.0 ml を加え、ソニケーター（SUS-2000, 株式会社島津製作所）で 5 分間脱気した。この溶液に 10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム水溶液 140 μ l を混合して 2枚のガラスプレートの間に流し込んだ。Lower ゲル溶液の上に脱イオン水を重層し、室温で 30 分間放置して固化させた後、脱イオン水を捨てた。50 ml 容ビーカーに Upper Tris 液 [超純水に Tris 12.2 g、SDS 0.8 g、TEMED 800 μ l を加えて混合し、12 N HCl を加えて pH6.8 に調製し、超純水で 200 ml にメスアップした] 0.75 ml、30 % アクリルアミド溶液 0.45 ml および、超純水 1.8 ml を加え、脱気後 10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム水溶液 90 μ l を混合し、Lower gel の上に流し込み、コーム（アトー）を差し込み室温で 30 分間放置し固化した。泳動プレートからコームを外した後、作製されたウェルを脱イオン水で洗浄した。泳動プレートからマグネットクリップをはずし、電気泳動槽（アトー）にセットした。泳動槽を泳動緩衝液 [Tris 9.084 g、SDS 3.0 g、Glycine 43.2 g を脱イオン水に溶解し、メスアップして 3 l とした] で満たした。サンプル緩衝液 [2.5 M Tris-HCl (pH6.8) 1 ml、SDS 1.22 g、Glycerol 4 ml、2-Mercaptoethanol 2 ml、Bromo phenol blue 0.4 mg、超純水 3 ml を混合] を加え、加熱処理済のタンパク質試料および分子量マーカー（Precision plus protei standards、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）を各ウェルに流し込み、定電流（C.C. mode 16 mA、Power station 1000VC、アトー）で泳動し、各タンパク分子種を分離した。

2.11 ウェスタンブロット法

生存細胞における Cse4p の発現量をウェスタンブロット法⁵⁰⁾で検討した。生存細胞の Cse4p には HA タグが付加されており、ウェスタンブロット法は抗 HA 抗体を使用して行った。以下に、メンブレンが 70 cm²、1 次抗体が 10,000 倍希釈、2 次抗体が 5,000 倍希釈の場合の方法を記載する。酵母細胞の全タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、濾紙 (Whatman International Ltd. Haverhill, MA, U.S.A.) 6 枚と Immobion™-P Transfer Membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A.) 1 枚をゲルと同じ大きさに切り、予め濾紙 2 枚を +電極緩衝液 I [Tris 18.171 g を超純水に溶解させ、pH10.4 に合わせ、メタノール 50 ml を加え、超純水で 500 ml にメスアップした] に、1 枚を +電極緩衝液 II [Tris 1.514 g に超純水を溶解させ、pH10.4 に調整し、メタノール 50 ml を加え、超純水で 500 ml にメスアップした] に、3 枚を -電極緩衝液 [Tris 1.514 g とグリシン(和光純薬工業) 1.501 g を超純水に溶解させ、pH9.4 に合わせ、メタノール 50 ml を加え、超純水で 500 ml にメスアップした] に浸しておいた。一方、メンブレンはメタノールに 1 分間、超純水に 2 分間、+電極緩衝液 I に 5 分間浸しておいた。ホライズブロット (AE-6675・P/N 型、アトー株式会社) の +電極板の上に、+電極緩衝液 I に浸した濾紙 2 枚を置き、その上に +電極緩衝液 II に浸した濾紙 1 枚を置き、さらにその上にイモビロン-P メンブレンを置いた。メンブレンの上に電気泳動後のゲルを置き、次いで、-電極緩衝液に浸した濾紙 3 枚を置き、密着させ余分な空気を除いた後、通電 (2 mA/cm²、30V、60 分、Power Station 1000VC AE-8450、アトー株式会社) することでタンパク質をメンブレンに転写した。転写後のメンブレンをタッパーウェアに移し、2% (w/v) ブロッキング剤 [ECL Prime Blocking Agent (GE Healthcare) を終濃度 2% (w/v) になるように超純水を加え調製] をメンブレンが浸るぐらい加え、1 時間室温で穏やかに振とうした。洗浄緩衝液 [メタノール 50 ml、Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (和光純薬工業株式会社) 1 ml と 1×TBS (125 mM NaCl, 20 mM Tris, pH7.6) を 1 l になるように加え、メスアップを行い十分に攪拌] で 2 回軽く洗い、2% ブロッキング剤 10 ml に対して 1 次抗体 (抗 HA 抗体、16B12, COVANCE) 1 µl を加え、1 時間室温で穏やかに振とうし、洗浄緩衝液で 3 回軽く洗った後、5 分間室温で激しく振とうし、これを 6 回繰り返し洗浄した。2% ブロッキング剤 10 ml に対して 2 次抗体 (NA931VS, Batch) 2 µl を加え、1 時間室

温で穏やかに振とうし、洗浄緩衝液で 3 回軽く洗った後、5 分間室温で激しく振とうし、これを 6 回繰り返して洗浄した。メンブレンをメンブレンバッグに入れ Solution A と Solution B (GE Healthcare) を 3.5 ml ずつ混合した液を加え、メンブレンバッグをシールし、25 °C で 5 分間反応させた。メンブレンを新しいメンブレンバッグに移し、メンブレンの入ったバッグを増感スクリーン付きカセットに固定し X 線フィルム (Kodak Diagnostic Film X-Omat AR: Eastman Kodak Company, Rochester, NY, U.S.A.) を入れ室温で感光させた。X 線フィルムを現像液 [脱イオン水を 21X 線フィルム用液体現像液 (レンドール: フジフィルム株式会社) 1 l を加え、均一になるまで十分に攪拌] に浸け現像した後、停止液 [0.3% (v/v) 酢酸水溶液] に 1 分間浸け現像を停止し、定着液 [X-線フィルム用液体定着液 (レンフィックス: フジフィルム株式会社) を 1.7 l 加え、脱イオン水で 5 l になるようにメスアップし、十分に攪拌した] に浸け定着させた後、水洗いして乾燥させた。

2.12 菌株の作製

Cse4p に HA タグを付加するために、プラスミド pFA6a-3HA-kanMX6⁴⁸⁾を使用した (高木博史教授より分譲)。pFA6a-3HA-kanMX6 を鋳型とし CSE4HAF2 と CSE4HAR1 のプライマーを使用した PCR による増幅 DNA を YCD101 株由来の生存細胞 (YSC1) のクローン 5 とクローン 14、および YCD401 株由来の生存細胞 (YSC4) のクローン 11 とクローン 13 に形質転換法で導入した。第 XI 番染色体上の *CSE4* 遺伝子との相同組換え⁵¹⁾によって *CSE4* 遺伝子に *3HA* が付加される。

第3節 結果

第2章で YCD101 株を SGal プレートに広げ培養したとき、僅かな数のコロニーが出現した。生存率をさらに低下させる方法を考案するために、生存細胞が出現する原因を検討することにした。まず、一倍体細胞 (YCD101 株) を SGal プレートで培養した時に出現した 5 株の生存細胞クローンについて解析した (YSC1 株のシリーズとし、各生存細胞クローンをクローン番号で表す)。最初の解析として、レコンビナーゼ発現プラスミドの機能について検討した (Fig. 3-1)。生存細胞に、pHM209 (*TRP1* マーカー) と選択マーカーが異なるレコンビナーゼ発現プラスミドの pHM153 (*LEU2* マーカー) を導入して得られる形質転換体において細胞死が起こるか (Fig. 3-1A) と生存細胞から回収した pHM209 を、RS を持つ株 (*CEN4* が RS-*CEN4-HIS3*-RS に置換、YCD100 株) に導入して得られる形質転換体において細胞死が起こるか (Fig. 3-1B) を調べた。レコンビナーゼ発現プラスミドが機能を有している場合、A の実験では細胞死が起こらず、B の実験で細胞死が起こると考えられる。また、レコンビナーゼ発現プラスミドが機能していない場合は、その逆の結果が得られると考えられる。実験の結果、生存細胞に pHM153 を導入しても全ての生存細胞クローンで細胞死は起こらなかった (Table 3-4)。しかし、生存細胞から回収した pHM209 を YCD100 株に導入すると全ての生存細胞クローンで細胞死が起こった。したがって、5 株の生存細胞クローンの全てにおいてレコンビナーゼ発現プラスミドは機能しており、染色体に原因があると考えられた。次に、第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しが起こっているかを検討するために、生存細胞クローンのゲノム DNA を鋳型とし、また CEN4Hpa と CEN4Pvu をプライマーとしたセントロメア領域の PCR 解析を行った。RS を挿入した株では、3.0 kb の DNA が増幅され、もし、セントロメア DNA の切り出しが起こったならば、増幅 DNA のサイズは 0.8 kb と小さくなる (Fig. 3-2A)。クローン 1~4 では、3.0 kb の DNA が増幅され、クローン 5 では 0.8 kb の DNA が増幅された (Fig. 3-2B)。これらの結果から、クローン 5 では切り出しが起こり、クローン 1~4 では切り出しが起こっていないことが示される。また、*CEN4* の centromere DNA element (CDE) の両端部分をプライマー (CEN4CDERC と CEN4CDELIC) として PCR を行った結果、クローン 1~4 では、約 130 bp の DNA が増幅されたが、クローン 5 では増幅されなかつ

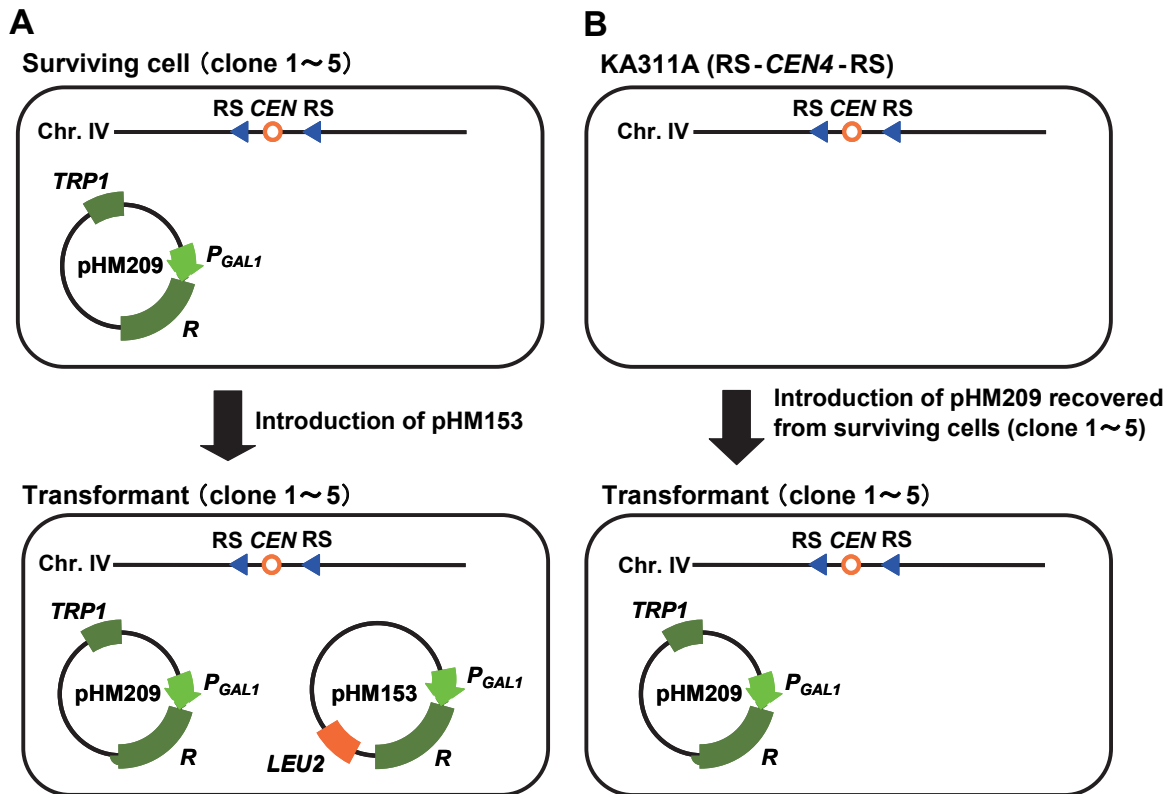


Fig. 3-1 レコンビナーゼプラスミドの機能解析。生存細胞に、pHM209 (*TRP1* マーカー) と選択マーカーが異なるレコンビナーゼ発現プラスミドの pHM153 (*LEU2* マーカー) を導入して得られる形質転換体で細胞死が起こるか (A) と生存細胞から回収した pHM209 を RS を持つ株 (*CEN4* が RS-*CEN4*-*HIS3*-RS に置換、YCD100 株) に導入して得られた形質転換体で細胞死が起こるか (B) を調べる。レコンビナーゼ発現プラスミドが機能を有している場合、A の実験で細胞死が起こらず、B の実験で起こると考えられる。また、機能していない場合は、その逆の結果が得られると考えられる。

Table 3-4 Functional analysis of *R* - expression plasmid in the surviving cells

Clone of surviving cells	Viability (Gal plate / Glc plate)		
	Surviving cells	Surviving cells [pHM153]	KA311A [RS - <i>CEN4</i> - RS, pHM209 recovered from surviving cells]
Clone 1	1.0 ± 0	1.0 ± 0.1	1.6 x 10 ⁻⁵ ± 0.6 x 10 ⁻⁵
Clone 2	1.0 ± 0	1.0 ± 0.1	1.3 x 10 ⁻⁵ ± 0.1 x 10 ⁻⁵
Clone 3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	2.4 x 10 ⁻⁵ ± 0.8 x 10 ⁻⁵
Clone 4	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2	2.4 x 10 ⁻⁵ ± 1.2 x 10 ⁻⁵
Clone 5	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0	1.7 x 10 ⁻⁵ ± 0.7 x 10 ⁻⁵

Viabilities were represented as means ± SD ($n \geq 3$).

た。したがって、クローン 5 では *CEN4* が存在しないと考えられた。さらに、セントロメア DNA の両側に存在する RS のシーケンス解析を行った結果、クローン 1~4 では 2 個の RS のうち一方が第 IV 番染色体から欠失しており、クローン 5 では 2 個の RS 間の組換えによって正確に切り出しが起こっていることが明らかとなった (Fig. 3-3A)。したがって、クローン 1~4 では第 IV 番染色体からの RS の欠失によって切り出しが起こらなかった。驚くことに、4 株のクローンとも同じ塩基配列が欠失していた (Fig. 3-3B、2 個の 5'-TCGA-3' 配列で挟まれた領域)。欠失配列から、RS の両側に存在する共通配列の 5'-TCGA-3' 配列の間での組換えによって RS が欠失したと推察できる。したがって、染色体から 5'-TCGA-3' 配列を欠失したり、5'-TCGA-3' 配列を異なる塩基配列に換えることで RS の欠失を抑制することが可能であると考えられる。さらに、生存細胞クローンの出現割合の精度を高めるため、46 株の生存細胞クローンについて 5 個の生存細胞クローンと同様の解析を行った。この結果を含め合計 51 個のクローンの解析結果をまとめた (Table 3-6)。5 株の生存細胞クローンの解析の場合と同様に、最も多数を占める生存細胞クローンは、RS の欠失によって切り出しが起こらなかったクローンであった。このクローンは 38 株で 74.5% を占めた。これらの全てのクローンで 2 個の RS のうち一方が染色体から欠失していた。また、欠失は全てのクローンにおいて同じ領域で起こっていた。すなわち、RS の両端に存在する共通配列の 5'-TCGA-3' 配列で挟まれた領域が欠失していた。これらの生存細胞クローンの他に切り出しの起こっていないクローンが 10 株存在し (全生存細胞クローンの中の 19.6% を占める)、これらのクローンは他の原因で切り出しが起こらなかったと考えられる。それらのうち 5 株 (全生存細胞クローンの中の 9.8% を占める) は、RS のシーケンス解析から RS に点突然変異が導入されていることが判明した。しかし、それら点突然変異が、切り出しが起こらなかったことの原因であるかは不明である。また、2 株 (全生存細胞クローンの中の 3.9% を占める) は、レコンビナーゼ発現プラスミドの機能の解析からレコンビナーゼの発現が抑制されている可能性が考えられる。レコンビナーゼの発現抑制の可能性は、RT-PCR 法などでレコンビナーゼの発現を調べて確認する必要がある。さらに、3 株の生存細胞クローン (全体の 5.9%) では、セントロメア DNA の切り出しが起こっていなかった。これら 3 株のクローン (クローン 5、クローン 14、クローン 15) の染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法によって解析した (Fig. 3-4 と Fig. 3-5)。

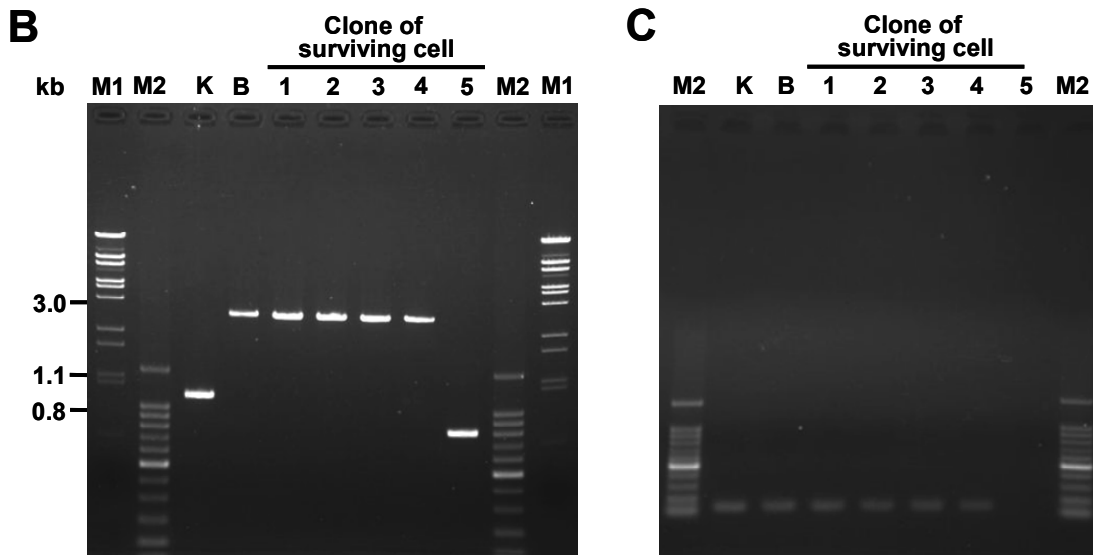
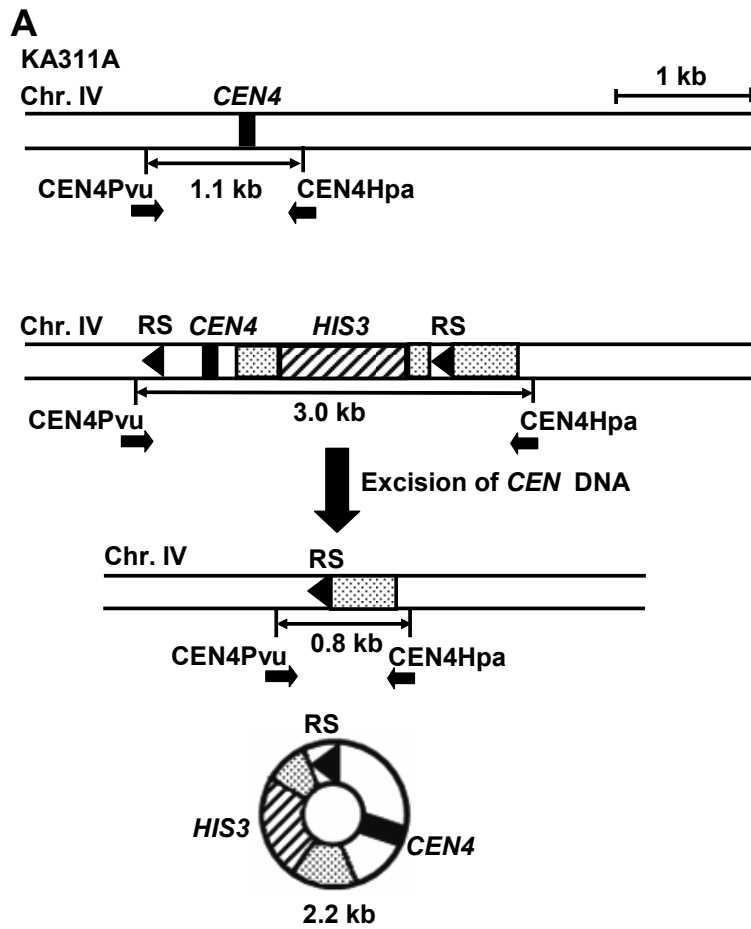


Fig. 3-2 生存細胞の染色体 DNA の PCR 解析 (レジェンドは次ページ)

Fig. 3-2 生存細胞の染色体 DNA の PCR 解析 (前ページの図)

A. YCD101 細胞における第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しのストラテジー。YCD101 細胞は、*CEN4* DNA を RS-*CEN4-HIS3*-RS DNA に置換し、さらに *R* 発現プラスミド pHM209 を導入することにより作製された。*R* レコンビナーゼの働きによってセントロメア DNA は第 IV 番染色体から 2.2 kb の環状 DNA の形で切り出される。プライマーとして CEN4Pvu と CEN4Hpa を使用しゲノム DNA を鋳型とした PCR で増幅される DNA のサイズは、セントロメア DNA の切り出しによって 3.0 kb から 0.8 kb へと小さくなる。矢印は RS を表す。CH、CP と示した小さな矢は、それぞれ PCR 解析に使用したオリゴヌクレオチドプライマーの CEN4Pvu と CEN4Hpa の位置を表す。B. 生存細胞においてセントロメア DNA の切り出しを検出するための染色体 DNA の PCR 解析。酵母 KA311A 細胞 (K)、YCD101 株の切り出し誘導前の細胞 (B)、5 個の生存細胞クローン (1~5) の細胞からゲノム DNA を調製した。これらのゲノム DNA を鋳型として、またプライマーとして CEN4Pvu と CEN4Hpa を使用して PCR 解析を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、臭化エチジウムで染色した。M1; λ -*Bst*PI 消化 DNA. M2; 100 bp DNA ラダー (東洋紡株式会社) C. CDE 領域の PCR 解析 酵母 KA311A 細胞 (K)、YCD101 株の切り出し誘導前の細胞 (B)、5 個の生存細胞クローン (1~5) の細胞のゲノム DNA を鋳型として、またプライマーとして CEN4CDERC と CEN4CDELIC を使用して CDE 領域の PCR 解析を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、臭化エチジウムで染色した。

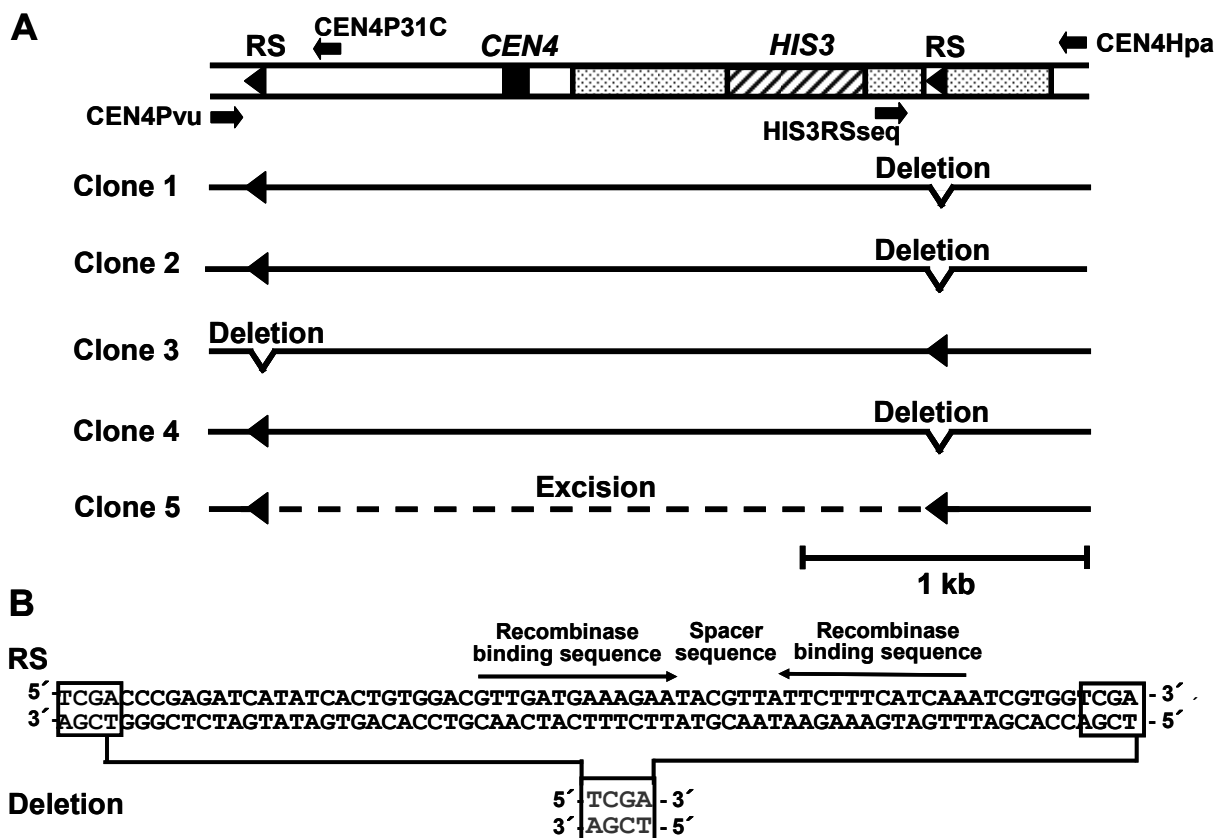


Fig. 3-3 生存細胞における第 IV 番染色体からの RS の欠失。A. 第 IV 番染色体における RS-*CEN4*-*HIS3*-RS 領域の図と 5 個の生存細胞クローンにおいて *CEN4Hpa*、*HIS3RSseq*、*CEN4Pvu*、および *CEN4P31C* のプライマーを使用した RS の DNA シーケンス解析の結果。シーケンス解析の結果、クローン 1~4 において 2 個の RS のうち 1 個が第 IV 番染色体から欠失し (“Deletion”で示す)、クローン 5 では切り出しが正確に起こっていた (“Excision”で示す)。CH、HR、CP、および C3 と付した小さな矢印は、それぞれシーケンス解析に使用したオリゴヌクレオチドプライマーの *CEN4Hpa*、*HIS3RSseq*、*CEN4Pvu*、および *CEN4P31C* の位置を表す。B. 元の RS 断片とクローン 1~4 で生じた欠失を持つ RS 断片の塩基配列。矢印は、R レコンビナーゼの結合配列を表す。

エチジウムブロマイド染色では、クローン 5 は、切り出し前の株と比べ染色体パターンに大きな差は認められなかった。また、クローン 14 とクローン 15 は、染色体パターンが非常に類似していた。さらに、これらのクローンでは、第 III 番染色体のバンドが消失し、第 XV 番染色体と第 VII 番染色体が重なったバンドと第 XVI 番染色体のバンドの間に新たなバンドが出現した。次に、*CEN4* DNA をプローブとしてサザン解析を行った結果、3 株のクローン全てにおいてシグナルが観察されなかった。セントロメア領域の PCR 解析や RS のシーケンス解析から切り出しが起こったと考えられるので *CEN4* DNA は第 IV 番染色体から切り出された後、消失したと考えられる。この結論は、クローン 5 の *CEN4* の CDE の両端部分をプライマーとして PCR を行った結果 (Fig. 3-2 C) から考えられる結論と一致する。さらに、第 IV 番染色体の右腕に存在する *SSD1* 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った結果、切り出し前の第 IV 番染色体と同じ位置のバンドにシグナルが認められ、このバンドが第 IV 番染色体であることが確認できた。第 IV 番染色体からセントロメア DNA が切り出された後、この染色体が内部で他の染色体と融合した場合、染色体末端の一方がなくなると考えられる。そこで、第 IV 番染色体の左腕のテロメア近傍の *PHO13* 遺伝子および右腕のテロメア近傍の *HSP31* 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った (Fig. 3-5)。その結果、3 株のクローン全てで *PHO13* プローブと *HSP31* プローブの両方で第 IV 番染色体にシグナルが認められ (クローン 15 の結果は省略)、第 IV 番染色体の右腕と左腕のテロメア近傍はセントロメア DNA の切り出しが起こった後も維持されていると考えられる。したがって、他の染色体と融合している可能性は低いと考えられる。*S. cerevisiae* において Cse4p の過剰発現によって染色体上のセントロメア様領域 (*CLR*) が染色体の正確な分配を促進することが報告されている⁵²⁾。Cse4p は、ヒストン H3 のバリエーションで、キネトコアのうちコアセントロメアの構成タンパク質の一つである⁵³⁾。また、Cse4p は、キネトコアが正確に機能するために必要であり、*CSE4* における変異によって、染色体の不分離の頻度が高くなる⁵⁴⁾。*CEN3* の機能を低下させると第 III 番染色体をもつ細胞の割合が低下するが、この時 Cse4p を過剰発現させると第 III 番染色体をもつ細胞の割合が上昇する。そこで、セントロメアの切り出しが起こった生存細胞において Cse4p の発現量が上昇していないかを検討した。YCD101 株由来の生存細胞のクローン 5 とクローン 14 において *CSE4* 遺伝子に *3HA* DNA を付加し、3HA タグで標識された Cse4p を発現させた。

Table 3-5 Analysis of the reason for the appearance of surviving cell

Phenomenon	Numbers of clones of surviving cells	Percentage (%)
No excision of the centromeric DNA	48	94.1
Deletion of an RS from the chromosome	38	74.5
RS in left arm only	12	51.0
RS in right arm only	26	23.5
Both RSs	0	0.0
No deletion of an RS from the chromosome	10	19.6
Point mutation in RS	5	9.8
Non-function of <i>R</i>-expression plasmid	2	3.9
Unknown	3	5.9
Excision of the centromeric DNA	3	5.9

We examined 51 clones of surviving cells appeared in the plate assay.

Table 3-6 PCR analysis of chromosomal DNA of centromeric region and sequencing analysis of RSs in the surviving cells

No.	PCR analysis (kb)	DNA sequencing analysis			No.	PCR analysis (kb)	DNA sequencing analysis		
		Excision	Deletion of RS				Excision	Deletion of RS	
			Left arm	Right arm				Left arm	Right arm
1	3.0	—	+	—	27	3.0	—	+	+
2	3.0	—	+	—	28	3.0	—	+	—
3	3.0	—	—	+	29	3.0	—	+	—
4	3.0	—	+	—	30	3.0	—	+	+
5	0.8	+	Excision		31	3.0	—	+	—
6	3.0	—	+	+	32	3.0	—	+	—
7	3.0	—	—	+	33	3.0	—	+	—
8	3.0	—	+	—	34	3.0	—	+	—
9	3.0	—	—	+	35	3.0	—	+	—
10	3.0	—	—	+	36	3.0	—	+	—
11	3.0	—	—	+	37	3.0	—	+	—
12	3.0	—	+	—	38	3.0	—	—	+
13	3.0	—	+	—	39	3.0	—	—	+
14	0.8	+	Excision		40	3.0	—	+	—
15	0.8	+	Excision		41	3.0	—	+	—
16	3.0	—	+	—	42	3.0	—	+	+
17	3.0	—	—	+	43	3.0	—	+	+
18	3.0	—	+	+	44	3.0	—	+	—
19	3.0	—	+	+	45	3.0	—	+	—
20	3.0	—	+	—	46	3.0	—	+	—
21	3.0	—	+	—	47	3.0	—	+	+
22	3.0	—	—	+	48	3.0	—	+	—
23	3.0	—	—	+	49	3.0	—	—	+
24	3.0	—	+	+	50	3.0	—	—	+
25	3.0	—	+	—	51	3.0	—	+	+
26	3.0	—	+	—					

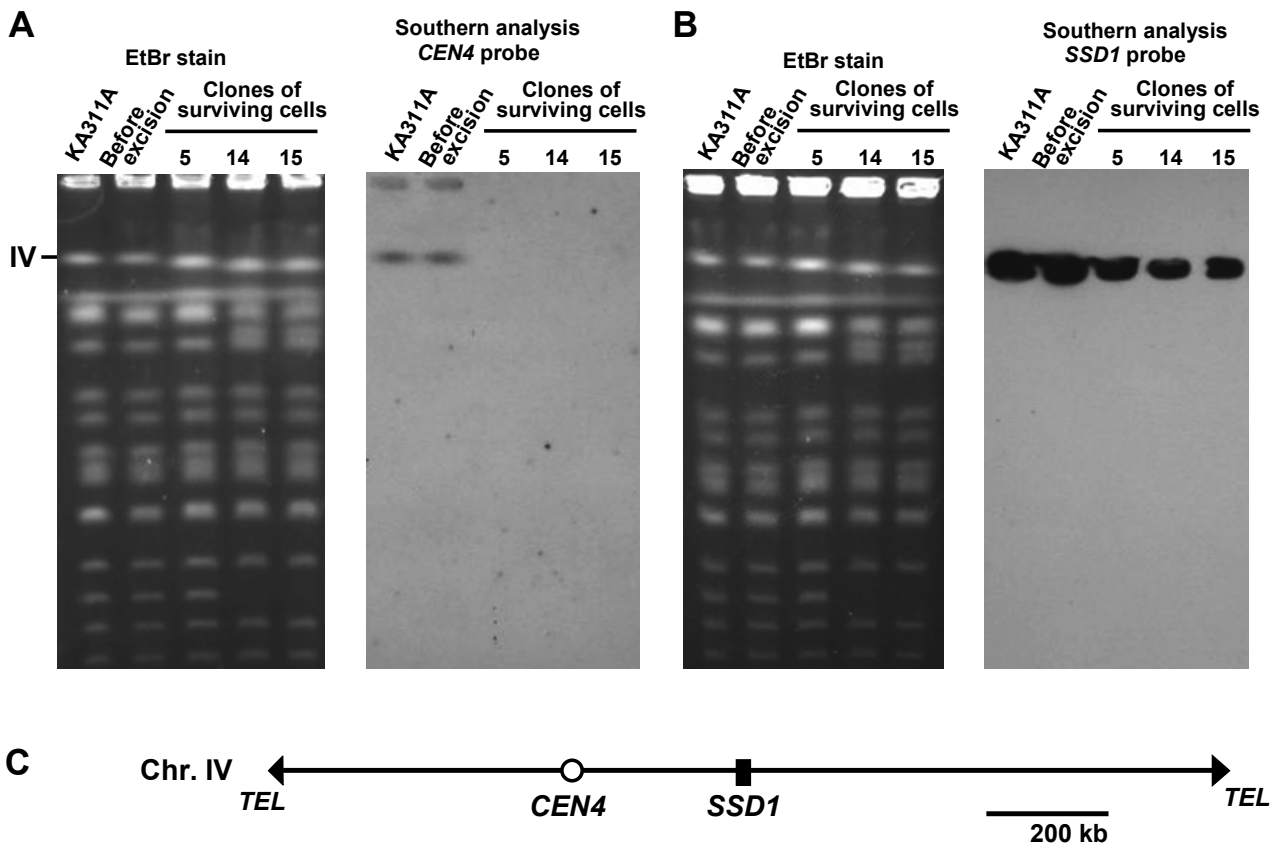


Fig. 3-4 パルスフィールドゲル電気泳動法による生存細胞クローンの染色体 DNA の解析。酵母 KA311A 細胞 (KA311A)、YCD101 株の切り出し誘導前の細胞 (Before excision)、および 3 株の生存細胞クローン (YSC1 株のクローン 5、14、15) の細胞から調製した染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法で分離した後、臭化エチジウムで染色した (A と B の左側のパネル)。DNA をナイロンメンブレンに移した後、DIG 標識した *CEN4* DNA (A の右側のパネル) および *SSD1* DNA (B の右側のパネル) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。*CEN4* と *SSD1* の第 IV 番染色体上での位置は、C に示した。

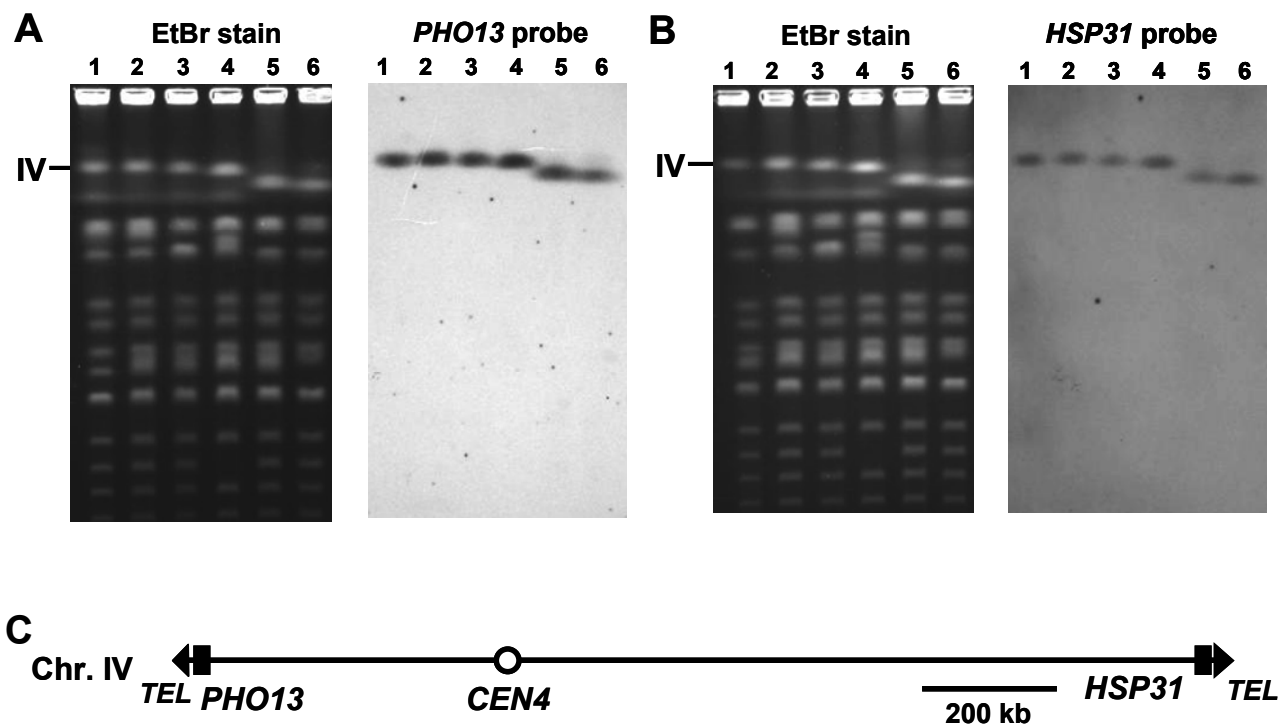
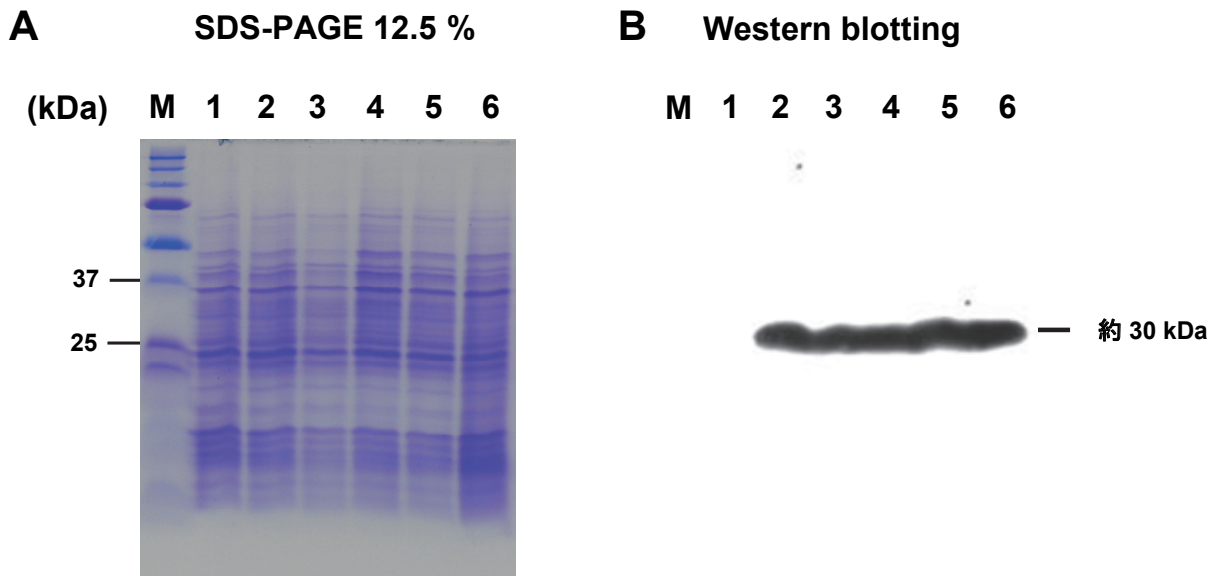


Fig. 3-5 パルスフィールドゲル電気泳動法による生存細胞クローンの染色体 DNA の解析 酵母 KA311A 細胞 (レーン 1)、YCD101 株の切り出し誘導前の細胞 (レーン 2)、4 株の生存細胞クローン (YSC1 株のクローン 5 と 14、および YSC4 株のクローン 11 と 13; レーン 3~6) の細胞から調製した染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法で分離した後、臭化エチジウムで染色した (A と B の左側のパネル)。DNA をナイロンメンブレンに移した後、DIG 標識した *PHO13* DNA (A の右側のパネル) および *HSP31* DNA (B の右側のパネル) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。*PHO13* と *HSP31* の第 IV 番染色体上における位置は、C に示した。

これらの細胞の全タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、抗 HA 抗体を使用してウェスタンブロット法で発現を調べた。その結果、生存細胞のクローン 5 とクローン 14 のシグナルの強度はコントロールの KA311A 野生株とほとんど同じであった。したがって、これらの生存細胞では、Cse4p の発現量は上昇しておらず、CLR の作用によって正確な分配が促進されているという可能性は考えられない。クローン 5 とクローン 14 では、第 IV 番染色体からセントロメア DNA の切り出しが起こった後、新しいセントロメア（ネオセントロメア）が形成されたか、他の染色体のセントロメア DNA が組み込まれた可能性が考えられる。これらの可能性については、切り出し後の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の染色体上における位置と塩基配列を決定することが重要である。その方法の一つとして ChIP-Seq 解析⁵⁹⁾を利用することが考えられる。すなわち、キネトコア構成タンパク質に対するクロマチン免疫沈降の産物から DNA を精製し、その DNA の塩基配列を解読して、得られた塩基配列をゲノムデータベースの塩基配列と比較し、第 IV 番染色体上における位置と塩基配列を決定する。セントロメア DNA の切り出しが起こった生存細胞においてキネトコアタンパク質の一つである Cse4p にタグを付加したタンパク質を発現する菌株を作製し、ChIP-Seq 解析を行い、検討するところである。

第4節 考察

一倍体細胞と二倍体細胞の両方で、染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を起こすことが可能である。セントロメア DNA の切り出しを誘導した時、生存率は大きく低下するが、生存細胞が僅か出現する。一倍体細胞のプレート培養で第 IV 番染色体からセントロメア DNA を切り出した時の生存率は、 1.4×10^{-5} であった。実用化に向け、できる限り低下させた方がよい。そこで、生存細胞が出現する仕組みを解析した。51 株の生存細胞クローンを解析した結果、主な仕組みは、2 個の RS のうち一方が染色体から欠失し、セントロメア DNA の切り出しが起こらなかったことである（全生存細胞クローン中で 74.5%を占める）。また、その他の仕組みでセントロメア DNA の切り出しが起こらなかったクローンも出現した。これらのクローンの中には、レコンビナーゼ発現プラスミドが機能していないクローンや RS に点突然変異が導入されていたクローンが存在した。さらに、セントロメア DNA の切り出しが起こったクローンが出現し、ネオセントロメアが形成されたか、または他の染色体のセントロメア DNA が組み込まれた可能性が考えられた。また、*Schizosaccharomyces pombe* では、一倍体細胞で染色体からセントロメア DNA を切り出し、セントロメア機能を喪失させることで、テロメア付近に新たなセントロメアが形成されたり、セントロメア DNA を失った染色体が他の染色体と融合する現象が観察されている⁵⁶⁾。*S. cerevisiae* と *S. pombe*（の間でセントロメア DNA の構造は大きく異なるので、*S. cerevisiae* でネオセントロメア形成が起こる場合、*S. pombe* と異なる仕組みで起こった可能性がある。*S. cerevisiae*での現象は、核型進化の研究分野において興味深い知見であり、核型進化の研究の進展に大いに貢献できると考えられる。また、*Candida albicans*でもネオセントロメアの形成が観察されている⁵⁷⁾。一方、*S. pombe*の実験では、セントロメア DNA の切り出しが起こった細胞だけを選択して解析しているので、染色体からの RS DNA の欠失は観察できず、これらの現象が *S. pombe* で起こるかは不明である。本研究の細胞死の誘導システムは、レコンビナーゼ発現プラスミドのプロモーターに野外環境条件に適切に応答して発現するプロモーターを利用することで遺伝子組換え生物の拡散防止に実用化できる。実用化のためにさらに生存率を低下できるとよい。生存細胞が出現した主な原因は染色体から RS が 1 個欠失して切り出しが起こらなかったことであり、全生存細胞ク



M : プレシジョン Plus プロテインプレス Cse4p-HA tag : 30.2 kDa
 ティンドスタンダード

1: KA311A

2: KA311A *cse4-3HA*

3: YCD101 *s5cse4-3HA*

4: YCD101 *s14cse4-3HA*

5: YCD401 *s11cse4-3HA*

6: YCD401 *s13cse4-3HA*

Fig. 3-6 ウェスタンブロット法による生存細胞における Cse4p の発現量の解析。
 YCD101 株由来の生存細胞のクローン 5 とクローン 14 および YCD401 株由来の生存細胞のクローン 11 とクローン 13 において *CSE4* 遺伝子に *3HA* DNA を付加し、*3HA* タグで標識された Cse4p を発現させた。これらの細胞の全タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し(A)、抗 HA 抗体を使用してウェスタンブロット法で発現を調べた(B)。その結果、全ての生存細胞クローンのシグナルの強度はコントロールの KA311A 野生株とほとんど同じであった。M1: 分子量マーカー (プレシジョン Plus プロテイン™ プレスティンドスタンダード (バイオ・ラッド))、1: KA311A 株、2: KA311A (*CSE4-3HA*) 株、3: YSC1 クローン 5 (*CSE4-3HA*) 株、4: YSC1 クローン 14 (*CSE4-3HA*) 株、5: YSC4 クローン 11 (*CSE4-3HA*) 株、6: YSC4 クローン 13 (*CSE4-3HA*) 株。

ローン中の 74.5%を占めた。このクローンの出現を完全に抑制できれば、生存率は 25.4%まで、すなわち 3.6×10^{-6} まで低下できると予想される。これは、滅菌における無菌保証水準である 1×10^{-6} ぐらいまで低下できることになり、この抑制は実用化に大きな効果がある。RS の欠失は、全て RS の両端に存在する 5'-TCGA-3'配列で挟まれた領域で起こっていた。5'-TCGA-3'配列は、ランダムな塩基配列の DNA では理論上 256 bp ごとに 1 回出現すると考えられる。染色体上には 5'-TCGA-3'配列多数存在するはずであるが、今回観察されたような染色体変化は一般には認められない。したがって、RS の欠失は部位特異的組換えが関与して 5'-TCGA-3'配列の何らかの構造的特徴に基づいて起こった可能性が考えられる。RS の両端にある 5'-TCGA-3'配列 1 個を他の塩基配列に改変することで欠失を抑制できる可能性がある。生存細胞が出現する他の原因について詳細な仕組みが解明され、生存細胞の出現を抑制できれば、生存率を一層低下できることが期待される。

第4章 セントロメア DNA の切り出しによる細胞死誘導の効率の改善

第1節 緒言

第2章で出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換え系を利用して染色体からセントロメア DNA を切り出すことによって、細胞死を誘導するシステムを確立した。一倍体細胞では染色体 1 本からセントロメア DNA を切り出すことで、また二倍体細胞では相同染色体の両方からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導できる。しかし、セントロメア DNA の切り出しで細胞死を誘導している時に生存細胞が出現した。すなわち、YCD101 株を SGal プレートに広げ培養した時、生存率は 1.4×10^{-5} と大幅に低下するが、コロニーが僅か出現した。また、SGal 液体培地で培養した時、培養 50 時間ごろから増殖速度が上昇し始めた。実用化に際して、細胞死の誘導効率を改善して生存率をできる限り下げることが重要である。そこで、第3章でそれらの生存細胞が出現する原因の解明を目指した。その結果、生存細胞が出現した主な原因は染色体から RS が 1 個欠失して切り出しが起こらなかったことであり、全生存細胞クローン中の 74.5% を占めることが明らかとなった。このクローンの出現を完全に抑制できれば、生存率は 3.6×10^{-6} まで低下できると予想される。これは、滅菌における無菌保証水準である 1×10^{-6} ぐらいまで低下できることになり、この抑制は実用化に大きな効果がある。RS の欠失は、全て RS の両端に存在する 5'-TCGA-3' 配列で挟まれた領域で起こっており、5'-TCGA-3' 配列を介して起こっていると考えられる。この 5'-TCGA-3' 配列 1 個を他の塩基配列に改変することで欠失を抑制して、生存率を低下できる可能性がある。そこで、第4章では RS の両端にある 5'-TCGA-3' 配列のうち 1 個を 5'-TA-3' 配列に置換して生存率を低下させることを検討した。その結果、生存率は 2.3×10^{-6} まで低下し、ほぼ無菌保証水準まで低下させることを達成できた。この時、染色体からの RS の欠失が抑制されていることを確認した。この改変 RS を使用することによって細胞死の誘導効率を改善できた。この改善システムを利用することで実用化が期待できる。

第2節 材料および方法

2.1 使用菌株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチド

本研究で使用した酵母 *S. cerevisiae* 株を Table 4-1 に、プラスミドを Table 4-2 に、オリゴヌクレオチドを Table 4-3 に示す。また、プラスミド作製の宿主として *Escherichia coli* DH5 α [F⁻ ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk^-, mk^-) *supE44* λ -*thi-1 gyrA relA1*] ²⁴⁾を使用した。

Table 4-1 Strains used in this study

Strain	Description	Reference
YCD100	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV(RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS)	This study
YCD101	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV(RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS) [pHM209]	This study
YCD103	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV(<i>CEN4</i>) [pHM209]	This study
YCD400	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV(RSM- <i>CEN4-HIS3</i> -RSM)	This study
YCD401	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i> Chr. IV(RSM- <i>CEN4-HIS3</i> -RSM) [pHM209]	This study
YSC4 series	Surviving cell clone derived from YCD401 (clone 1, clone 51)	This study
YSC5 series	Transformant of YCD401 with plasmid pHM153 DNA	This study

Table 4-2 Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Reference
pHM209	<i>P_{GALI}-R 2μm DNA-ARS STB TRP1 Amp^r ori</i>	25
pHM153	<i>P_{GALI}-R 2μm DNA-ARS STB LEU2 Amp^r ori</i>	12
pHM409	RS- <i>CEN4-HIS3</i> -RS <i>Amp^r ori</i>	This study

Table 4-3 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence
CEN4P51	5'-AACTGTGACGATAAAACCGG-3'
CEN4P31	5'-TGTATGTCCATGATTCGCCG-3'
CEN4Hpa	5'-TACTCCAGGTACAGTCCTCT-3'
CEN4Pvu	5'-GTGGTCAGAACCACAGTTAG-3'
HIS3RSseq	5'-CCTCCACCAAAGGTGTTCTT-3'
CEN4P31C	5'-CGGCGAATCATGGACATACA-3'
CRSDEL1	5'-GCATGCCTGCAGGTACCACGATTTGATG-3'
CRSDEL2	5'-CATCAAATCGTGGTACCTGCAGGCATGC-3'
CRSDEL3	5'-TTTTTCTCTTGA ACTACCACGATTTGATGA-3'
CRSDEL4	5'-TCATCAAATCGTGGTAGTTCAAGAGAAAAA-3'
CRSDEL5N	5'-AAGGATCCCACTTTTCGAAGAGCTTGTG-3'
CRSDEL6	5'-TTGAATTCAGGCCTCCGTTCTTATGGTT-3'

2.2 使用培地

酵母用培地

酵母用培地は、YPAD 培地、SGlc 培地、SGal 培地、および SRaf 培地を使用した。各培地の組成は第 2 章に記載した。

大腸菌用培地

大腸菌用培地は、LB 培地を使用した。LB 培地の組成は第 2 章に記載した。

2.3 滅菌および培養

培地は、全てオートクレーブ (1kgf/cm²、10 分間) で滅菌して使用した。酵母は、28 °C で静置培養または振とう培養を行った。大腸菌は、37 °C で静置培養または振とう培養を行った。

2.4 DNA の操作

DNA の精製、DNA の調製、形質転換法、DNA の酵素処理、アガロースゲル電気泳動、DNA 断片の回収は、第 2 章に記載した。

2.5 生存細胞の解析

生存細胞を解析するためのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導(プレート培養)、PCR 法、DNA のシーケンシング、パルスフィールドゲル電気泳動法による染色体 DNA の構造の解析、レコンビナーゼ発現プラスミドの機能の解析は、第 3 章に記載した方法で行った。

2.6 プラスミドの作製

RS の両端にある 5'-TCGA-3'配列の一方を 5'-TA-3'配列に置換した改変 RS (RSM) を作製した。まず、pHM409 プラスミド DNA を鋳型として、CRSDEL5N プライマーと CRSDEL2 プライマー、CRSDEL6 プライマーと CRSDEL1 プライマーの組合せで PCR 法を

行い、一方の 5'-TCGA-3'配列が 5'-TA-3'配列に置換された DNA を増幅した。2 種類の組合せで行った PCR の増幅産物を混合し、さらに CRSDEL5N プライマーと CRSDEL6 プライマーを加え、PCR 法を行って RSM-*CEN4-HIS3*-RS DNA を増幅した（一方の 5'-TCGA-3'配列が 5'-TA-3'配列に置換された改変 RS を RSM と表す）。この DNA を *Bam*HI と *Eco*RI で切断した後、pUC118 プラスミドのマルチクローニングサイトの *Bam*HI 部位と *Eco*RI 部位の間に連結して pAM1 プラスミドを作製した。一方、pHM409 プラスミド DNA を鋳型として CRSDEL6 プライマーと CRSDEL3 プライマー、CRSDEL5N プライマーと CRSDEL4 プライマーの組合せで PCR 法を行い、一方の 5'-TCGA-3'配列が 5'-TA-3'配列に置換された DNA を増幅した。2 種類の組合せで行った PCR の増幅産物を混合し、さらに CRSDEL5N プライマーと CRSDEL6 プライマーを加え、PCR 法を行って RS-*CEN4-HIS3*-RSM DNA を増幅した。この DNA を *Bam*HI と *Eco*RI で切断した後、pUC118 プラスミドのマルチクローニングサイトの *Bam*HI 部位と *Eco*RI 部位の間に連結して pAM2 プラスミドを作製した。pAM1 の 1.9 kb *Bam*HI-*Nde*I 断片 (RSM を持つ) と pAM2 の 4.9 kb *Bam*HI-*Nde*I 断片 (RSM を持つ) を連結して pAM3 を作製した。pAM3 を *Eco*RI と *Bam*HI で切断することにより RSM-*CEN4-HIS3*-RSM DNA を得ることができる。この RSM-*CEN4-HIS3*-RSM DNA で YCD103 株を形質転換し、YCD401 株を作製した。YCD401 株では、相同組換により *CEN4* DNA が RSM-*CEN4-HIS3*-RSM DNA で置き換えられている。

第3節 結果

第2章において一倍体 YCD101 株でセントロメア DNA の切り出しを誘導した時に生存細胞が出現する主な原因は、染色体から RS が 1 個欠失して切り出しが起こらなかったことであることが明らかとなった。RS の欠失は、全て RS の両端に存在する 5'-TCGA-3' 配列で挟まれた領域で起こっており、5'-TCGA-3' 配列を介して起こっていると考えられる。この 5'-TCGA-3' 配列 1 個を他の塩基配列に改変することで欠失を抑制して、生存率を低下できる可能性がある。そこで、RS の両端に存在する 5'-TCGA-3' 配列の一方を 5'-TA-3' 配列に置換した改変 RS (RSM) を作製し、この改変 RSM を持つ RSM-*CEN4*-*HIS3*-RSM 構造 DNA を導入した YCD401 株を作製した (Fig. 4-1)。すなわち、YCD401 株は、YCD101 株のセントロメア DNA の両側にある RS の両方が改変 RS (RSM) に置換されていることになる。YCD401 株における生存率をプレート培養で調べた結果、生存率は $2.3 \times 10^{-6} \pm 1.3 \times 10^{-6}$ ($n = 3$) まで低下し、YCD101 株における生存率の約 6 分の 1 となった。次に、出現した生存細胞クローン (YSC4 株) 20 株について、生存細胞が出現した原因を解析した。解析は、YCD101 株でセントロメア DNA の切り出しを誘導した時に出現した生存細胞と同様に、PCR 法によるセントロメア領域の構造の解析、RS 領域の DNA シークエンシング、パルスフィールドゲル電気泳動法による染色体 DNA の構造の解析、レコンビナーゼ発現プラスミドの機能の解析などを行った。その結果から、原因を整理した (Table 4-4, Fig. 4-2)。染色体からの RS の欠失によりセントロメア DNA の切り出しが起こらなかった生存細胞クローンは 4 株で、20%を占めた。これは、YCD101 株 (74.5%) に比べ約 4 分の 1 に抑制されたが、完全には抑制されなかった。また、RS の欠失は 4 株全て 5'-TCGA-3' 配列と 5'-TA-3' 配列に挟まれた領域で起こり、欠失後の連結部位は 5'-TCGA-3' 配列となっていた。5'-TCGA-3' 配列と 5'-TA-3' 配列の間でも欠失が生じることから、相同組換えによって起こっているのではなく、部位特異的組換えが関与して 5'-TCGA-3' 配列の何らかの構造的特徴に基づいて起こった可能性が考えられる。これらの生存細胞クローンの他に切り出しの起こっていないクローンは 14 株存在し (全生存細胞クローンの中の 70%を占める)、これらのクローンは他の原因で切り出しが起こらなかったと考えられる。それらのうち、3

株（全生存細胞クローンの中の 15%を占める）は、レコンビナーゼ発現プラスミドの機能の解析からレコンビナーゼの発現が抑制されている可能性が考えられる。さらに、2株の生存細胞クローン（全体の 10%）では、セントロメア DNA の切り出しが起こっていなかった。これら 2株のクローン（クローン 11 とクローン 13）の染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法によって解析した（Fig. 3-5、Fig. 4-3）。エチジウムブロマイド染色の結果、クローン 11 とクローン 13 は染色体パターンが非常に類似しており、切り出し前の株と比べ第 IV 番染色体のバンドのサイズが少し小さくなっていた。次に、*CEN4* DNA をプローブとしてサザン解析を行った結果、両方の生存細胞クローンでシグナルが観察されなかった。セントロメア領域の PCR 解析や RS のシーケンス解析から切り出しが起こったと考えられるので *CEN4* DNA は第 IV 番染色体から切り出された後、消失したと考えられる。さらに、第 IV 番染色体の左腕のテロメア近傍の *PHO13* 遺伝子および右腕のテロメア近傍の *HSP31* 遺伝子をプローブとしたサザン解析の結果（Fig. 3-5）から、第 IV 番染色体の右腕と左腕のテロメア近傍はセントロメア DNA の切り出しが起こった後も維持されていると考えられた。したがって、これらのクローンでは、第 IV 番染色体からセントロメア DNA の切り出しが起こった後、新しいセントロメア（ネオセントロメア）が形成されたか、他の染色体のセントロメア DNA が組み込まれた可能性が考えられる。RS の欠失以外の原因は、YCD101 株に比べ割合が上昇しており、RS の欠失の割合が減少したためであると考えられる。このように、改変 RS を使用することで、生存率を約 6 分の 1 に低下でき、細胞死の誘導効率を改善できた。

第 4 節 考察

RS の両端にある 5'-TCGA-3'配列のうち 1 個を 5'-TA-3'配列に置換して生存率を低下させることを検討した。その結果、生存率は 2.3×10^{-6} まで低下でき、YCD101 株の約 6 分の 1 となった。染色体からの RS の欠失により切り出しが起こらなかったクローンの割合は、YCD101 株の生存細胞で 74.5%を占めていたのが、YCD401 株の生存細胞で 20%と抑制され、これによって YCD401 株の生存率が YCD101 株に比べ、低下したと考えられる。YCD101 株で RS の欠失を完全に抑制した場合、生存率は 25.4%まで、すなわち 3.6×10^{-6} まで低下できると予想されるので、YCD401 株では、予想以上に生存率が低下したことに

なる。RS の両端にある 5'-TCGA-3'配列を両方とも 5'-TA-3'配列に置換することによって生存率をさらに低下できると考えられる。

YCD401 株の生存率は、滅菌における無菌保証水準 (10^{-6}) ぐらいまで低下させることを達成できた。したがって、この細胞死の誘導システムは、条件致死性質の付与に有効であり、この改善システムを利用することで実用化が期待できる。

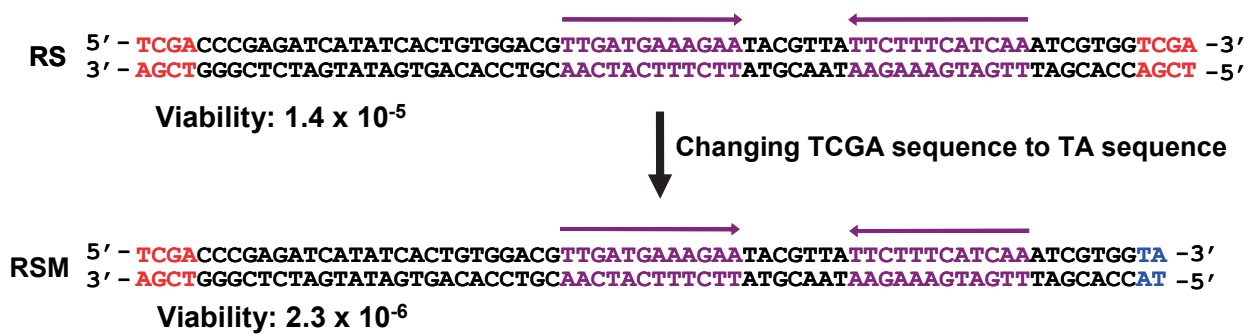


Fig. 4-1 改変 RS を使用した細胞死の誘導。RS の両端にある 5'-TCGA-3' 配列のうち 1 個を 5'-TA-3' 配列に置換することにより、生存率は 2.3×10^{-6} まで低下した。

Table 4-4 Analysis of the reason for the appearance of surviving cell

Phenomenon	Numbers of clones of surviving cells	Percentage (%)
No excision of the centromeric DNA	18	90.0
Deletion of an RS from the chromosome	4	20.0
RS in left arm only	4	20.0
RS in right arm only	0	0.0
Both RSs	0	0.0
No deletion of an RS from the chromosome	14	70.0
Point mutation in RS	5	25.0
Non-function of <i>R</i>-expression plasmid	3	15.0
Unknown	6	30.0
Excision of the centromeric DNA	2	10.0

We examined 20 clones of surviving cells appeared in the plate assay.

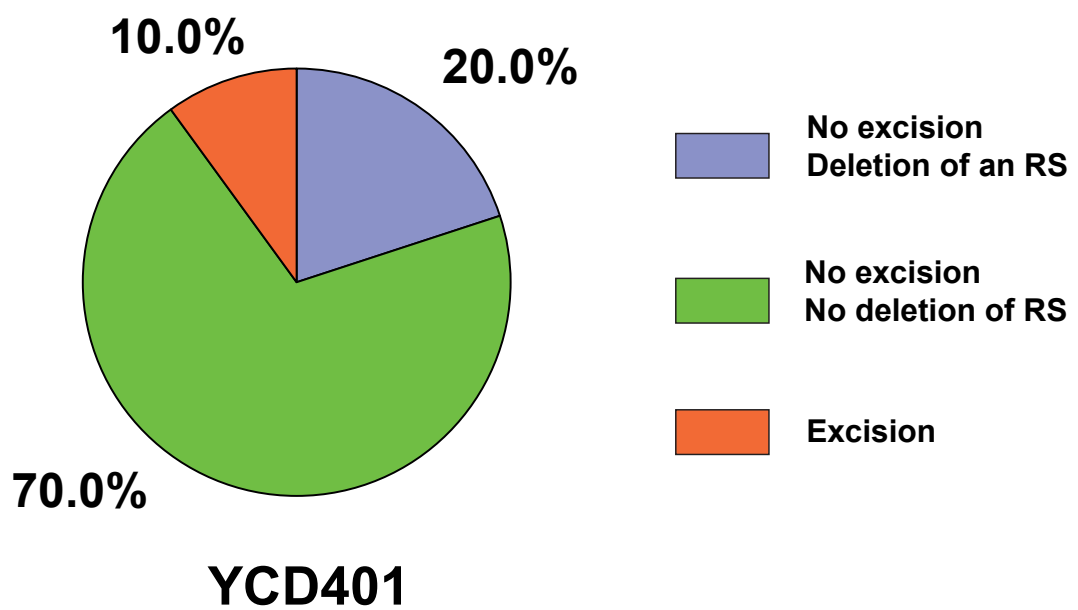
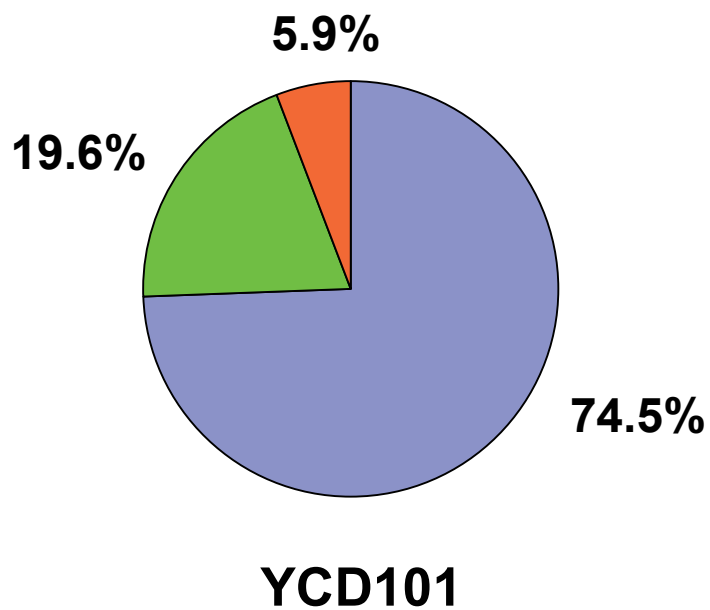


Fig. 4-2 YCD101 株と YCD401 株においてセントロメア DNA の切り出しを誘導した時に出現する生存細胞の出現原因。

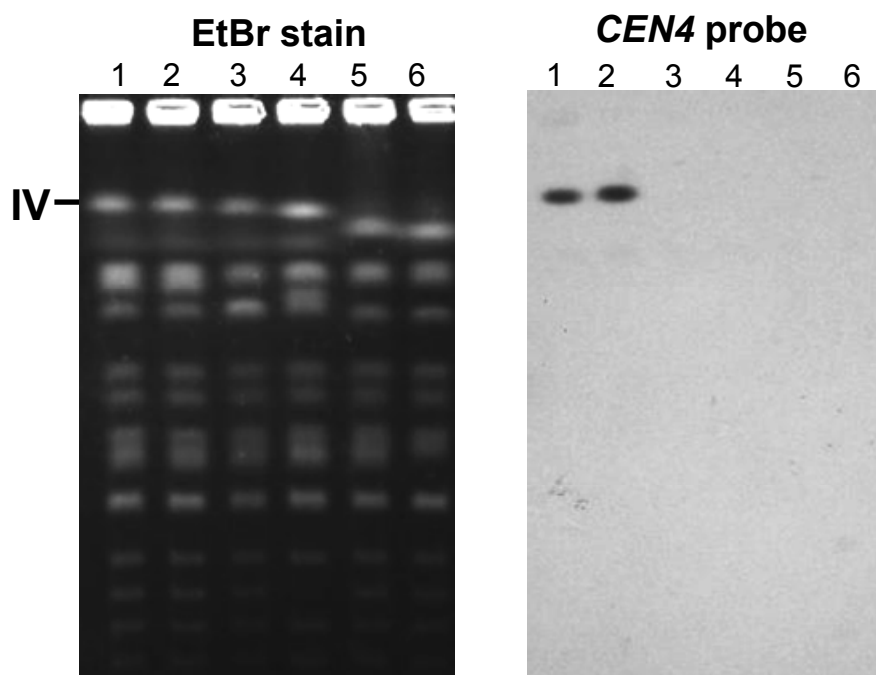


Fig. 4-3 パルスフィールドゲル電気泳動法による生存細胞クローンの染色体 DNA の解析 酵母 KA311A 株 (レーン 1)、YCD101 の切り出し誘導前の株 (レーン 2)、4 株の生存細胞クローン (YSC1 株のクローン 5 と 14、および YSC4 株のクローン 11 と 13 ; レーン 3~6) の細胞から調製した染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法で分離した後、臭化エチジウムで染色した (左側のパネル)。DNA をナイロンメンブレンに移した後、DIG 標識した *CEN4* DNA (右側のパネル) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

第 5 章 総合考察

遺伝子組換え技術は、食糧危機や環境問題など問題を解決する糸口として期待されている技術の一つである。組換え微生物では、医薬品や酵素製剤の大量生産が可能となり、組換え植物は数十年かかる作物の品種改良の期間を大幅に短縮させ、有用な形質を持たせることで付加価値を付与した。しかし、組換え生物が野外環境へ拡散した場合、生態系の変化をもたらす可能性がある。そこで、バイオセーフティの考え方から本研究では、出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として、酵母 *Z. rouxii* 由来の pSR1 プラスミドに備わっている部位特異的組換え系を利用して、染色体からセントロメア DNA を切り出し、染色体の分配機能を欠損させて細胞死を誘導するシステムの開発を目指した。

第 2 章では、染色体からセントロメア DNA を切り出すことによって細胞死を誘導するシステムの確立を目指した。まず、一倍体細胞における細胞死の誘導を検討するため、一倍体細胞の第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に RS を同じ方向に挿入した後、この細胞に *GAL1* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子が発現するプラスミドを導入し、ガラクトースにより第 IV 番染色体のセントロメア DNA の切り出しが誘導される株を作製した。次に、この細胞をガラクトースプレートで培養した結果、生存率は 1.4×10^{-5} となり、大幅に低下した。また、ガラクトース液体培地でも生存率は培養時間に伴い経時的に低下した。また、二倍体細胞において第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導することで細胞死を起こすことができた。一倍体細胞と二倍体細胞の両方で生存細胞が出現し、さらに、二倍体細胞では一倍体細胞と比べ生存率が高くなることが明らかとなった。そこで、二倍体細胞において、第 IV 番相同染色体に加え、第 V 番相同染色体からもセントロメア DNA の切り出しを誘導した結果、生存率が一倍体と同程度まで低下し、複数の染色体からのセントロメア DNA の切り出しが有効であることが示された。一倍体細胞と二倍体細胞で切り出しの誘導により細胞死を起こすことができ、細胞死の誘導システムを確立できた。また、不稔性質を付与するために、レコンビナーゼ遺伝子のプロモーターを孢子形成時に誘導するプロモーターに置き換え、孢子形成時に第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア DNA の切り出しを誘導したが、孢子の生存率はあまり低下しないことが示され、さらに改良すべきであることが分かった。

第 3 章では、セントロメア DNA を切り出しても生存細胞が僅かに出現するので、一倍体細胞で生存細胞が出現する仕組みを検討した。プレート培養で第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現した生存細胞クローン 51 株についてセントロメア DNA 近傍の PCR 解析、RS 領域のシーケンス解析、染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動解析、およびレコンビナーゼ発現プラスミドの機能の解析などを行った。その結果、38 株 (74.5%) のクローンが 2 個の RS のうち片方が染色体から欠失しており、これが原因で切り出しが起こらなかったことが示唆された。RS の欠失は全て RS の両端にある共通の配列 (5'-TCGA-3' 配列) で挟まれた領域で起こっていた。また、3 株 (5.9%) のクローンで切り出しが起こっていた。3 株の全てで第 IV 番染色体上には *CEN4* は存在しておらず、左腕のテロメア近傍や右腕のテロメア近傍の遺伝子は存在することが分かった。これらの生存細胞クローンでは切り出しが起こった後、セントロメアが新規に形成 (ネオセントロメア形成) されたか、他の染色体のセントロメアが挿入された可能性が示唆された。さらに、残りの生存クローンは RS の欠失以外の原因で切り出しが起こらなかったと考えられた。したがって、生存細胞が出現する主な仕組みは、染色体から RS が 1 個欠失してセントロメア DNA の切り出しが起こらなかったことであることが明らかとなった。

第 4 章では、セントロメア DNA の切り出しによる細胞死誘導の効率を改善することを検討した。第 3 章の解析結果から、RS の欠失が主な原因であったため RS の欠失を抑制することを検討した。一倍体細胞において RS の両端にある 2 個の共通した配列の間で欠失が起きていることが示唆されたため、一方の配列を改変することで生存率を 2.3×10^{-6} まで低下させることができた。また、この配列の改変により染色体からの RS の欠失が抑制されていることを確認した。

本研究で確立した細胞死の誘導システムは、第 4 章で述べているシステムの改善により、生存率を 1×10^{-6} 程度まで低下させることが可能となった。これは、滅菌の基準の 1 つである無菌保証水準 (Sterility assurance level: SAL) をほぼ達成できている。二倍体細胞の生存率は一倍体細胞よりも高い。しかし、複数の染色体からセントロメア DNA を切り出すこと (第 IV 番染色体と第 V 番染色体) が二倍体細胞で生存率を低下させることに効果的であった。したがって、二倍体細胞でも、改変 RS を使用して複数の染色体からセントロメア DNA を切り出すことによって生存率を 1×10^{-6} 程度まで低下させることが可能である

と考えられる。植物などの高等生物は二倍体が多く、本システムは実用化においても十分な効果を発揮し、遺伝子組換え生物の野外への拡散防止策として利用することが可能であると考えている。

遺伝子組換え微生物は、屋内においてタンクで培養されている。災害などによって施設が破損すると遺伝子組換え微生物が野外に漏れ出て野外で拡散する可能性がある。この場合、屋内の環境と野外環境とでは、さまざまな環境因子で違いがある（光（太陽光）、風、温度、湿度、土壌（成分）など）。この違いを生物が認識して、野外環境で発現する遺伝子が存在すれば、この遺伝子のプロモーターを使用してレコンビナーゼを発現させることで、遺伝子組換え微生物が野外へ漏れ出た場合に細胞死を誘導させて、野外での拡散を防止することが可能となる。適切なプロモーターの探索により遺伝子組換え生物の拡散防止への実用化が可能となることが期待される。植物では遺伝子工学の技術を利用して花粉形成に関与する遺伝子の発現を抑制することにより不稔性質を付与している^{58, 59)}。本研究の細胞死誘導システムが減数分裂期で効率良く機能すれば、不稔性質を付与する方法を多数導入でき、不稔性質がより厳密になると考えられる。

R レコンビナーゼの部位特異的組換えは植物細胞でも機能する^{15, 16)}。また、*S. cerevisiae* において、R レコンビナーゼによる部位特異的組換えを利用して染色体 DNA からの 180 kb の DNA の欠失を起こすことが可能であった。植物セントロメアは巨大であるが、本研究で確立した細胞死の誘導システムを植物でも利用することが可能であると思われる。植物では、おそらく、ジーンターゲットイングによってセントロメアの近傍に RS 断片を 1 個正確に導入できる。ジーンターゲットイングを繰り返すことによって染色体上のセントロメアの両側に順次 RS を組み込むことができる。さらに、植物で機能する誘導型プロモーターの中から適切なプロモーターを選択し、レコンビナーゼを発現させることで、細胞死が起こると考えられる。*S. cerevisiae* のセントロメア DNA のサイズは非常に小さく（約 125 bp）²²⁾、セントロメアの機能は、誘導性の *GAL1* プロモーターのすぐ下流にセントロメア DNA を置くことによって ON、OFF できる⁶⁰⁾。しかしながら、この方法は植物セントロメアのように巨大なセントロメアには適さないと考えられる。本研究で確立した細胞死の誘導システムは、セントロメアの両側に RS を組み込む方法があり、レコンビナーゼを発現させる適切なプロモーターがあれば、どのような生物でも利用可能である。したがって、この

システムは、さまざまな生物で GMO の拡散防止に役立つであろう。また、pSR1 の部位特異的組換え以外に大腸菌ファージ P1 の Cre-*lox* 部位特異的組換え^{61, 62)}や *S. cerevisiae* の 2 μm DNA の部位特異的組換え⁶³⁻⁶⁵⁾を利用することも可能であると考えられる。

また、セントロメア DNA の切り出しで出現した生存細胞クローンの解析において、ネオセントロメア形成が生じた可能性が示唆され、今後の核型進化の研究分野に興味深い知見を提供できると考えられる。特に、*S. cerevisiae* のセントロメア DNA は、*S. pombe* と異なっており、全く新規のネオセントロメア形成のメカニズムが発見できるかもしれない。

参考文献

- 1) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P, Molecular biology of the cell, fifth ed., Garland science, New York (2008).
- 2) Nelson DL, and Cox MM, Lehninger Principles of Biochemistry, fifth ed., W.H.Freeman and Company, New York (2008).
- 3) Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, and Boyer HW, Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, *Science*, **198**, 1056-1063 (1977).
- 4) Hitzeman RA, Hagie FE, Levine HL, Goedde DV, Ammerer G, and Hall BD, Expression of a human gene for interferon in yeast, *Nature*, **293**, 717-722 (1981).
- 5) Riggs AD, Itakura K, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Goedde D, Kleid D, Yansura DG, Bolivar F, and Heyneker HL, Synthesis, cloning, and expression of hormone genes in *Escherichia coli*, *Recent Prog. Horm. Res.*, **36**, 261-276 (1980).
- 6) Cartagena Protocol on Biosafety (2000). (<http://www.biodiv.org/biosafety/protocol.asp>).
- 7) 平成 15 年法律第 97 号, 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (2003.6.18 公布、2004.2.19 施行).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/houreiList01.html>).
- 8) Araki H, Jearnpipatkul A, Tatsumi H, Sakurai T, Ushio K, Muta T, and Oshima Y, Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *Mol. J.Mol.Biol.*, **182**, 191-203 (1985).
- 9) Matsuzaki H, Araki H, and Oshima Y, Gene conversion associated with site-specific recombination in yeast plasmid pSR1, *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 955-962 (1988).
- 10) Olson MV, "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Volume 1 Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energenics," eds. Broach JR, Pringle JR, Jones EW, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 1-39 (1991).
- 11) Araki H, Nakanishi N, Evans BR, Matsuzaki H, Jayaram M, and Oshima Y,

- Site-specific recombinase, R, encoded by yeast plasmid pSR1. *J. Mol. Biol.*, **225**, 25-37 (1992).
- 12) Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J, Araki H, and Oshima Y. Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J. Bacteriol.*, **172**: 610-618 (1990).
 - 13) Oshima Y, Araki H, and Matsuzaki H, Chromosome engineering in yeast with a site-specific recombination system from a heterologous yeast plasmid, *Methods Mol. Biol.*, **53**, 217-225 (1996).
 - 14) Kawasaki H, Matsuzaki H, Nakajima R, and Oshima Y, The *PHO80/TUP7* locus in *Saccharomyces cerevisiae* is on the left arm of chromosome XV; mapping by chromosome engineering, *Yeast*, **7**, 859-865 (1991).
 - 15) Onouchi H, Yokoi K, Machida C, Matsuzaki H, Oshima Y, Matsuoka K, Nakamura K, and Machida Y, Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6373-6378 (1991).
 - 16) Toriyama K, Chiba A, and Nakagawa Y, Visualization of somatic deletions mediated by R/RS site-specific recombination and induction of germinal deletions caused by callus differentiation and regeneration in rice, *Plant Cell Rep.*, **21**, 605-610 (2003).
 - 17) Murray A and Szostak JW, Construction of artificial chromosomes, *Nature*, **305**, 189-193 (1983).
 - 18) Stinchcomb DT, Mamm C, and Davis RW, Centromeric DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **158**: 157-190 (1982).
 - 19) Hieter P, Pridmore D, Hegemann JH, Thomas M, Davis RW, and Philippsen P, Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA *Cell*, **42**, 913-921 (1985).
 - 20) Fleig U, Beinhauer JD, and Hegemann JH. Functional selection for the centromere DNA from yeast chromosome VIII. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 922-924 (1995).
 - 21) Torras-Llort M, Moreno-Moreno O, and Azorin F, Focus on the centre: the role of

- chromatin on the regulation of centromere identity and function *EMBO J*, **28**, 2337-2348 (2009).
- 22) Cottarel G, Shero JH, Hieter P, and Hegemann J, A 125-base-pair *CEN6* DNA fragment is sufficient for complete meiotic and mitotic centromere functions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3342-3349 (1989).
 - 23) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知, 滅菌バリデーション基準の制定について, 薬食監麻発 1218 第 4 号 (平成 26 年 12 月 18 日).
 - 24) Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
 - 25) Matsuzaki H, Yamane S, Hatano T, Oshima Y, and Fukui S, Simple monitoring system for R-mediated site-specific recombination on chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1632-1637 (1994).
 - 26) Yanamoto T, Miyamoto A, Ikeda K, Hatano T, and Matsuzaki H, The relationship between chromosomal positioning within the nucleus and the *SSD1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1713-1721 (2011).
 - 27) Sikorski RS, and Hieter PA, System of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27 (1989).
 - 28) Parent SA, Fenimore CM, and Bostian KA, Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **1**, 83-138 (1985).
 - 29) Birnboim HC, and Doly J, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523 (1979).
 - 30) Hereford L, Fahrner K., Woolford J, Rosbash M, and Kaback DB, Isolation of yeast histon genes H2A and H2B. *Cell* **18**, 1261-1271 (1979).
 - 31) Morrison DA, Transformation in *Escherichia coli* : cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**, 349-351 (1977).
 - 32) Ito H, Fukuda Y, Murata K, and Kimura A, Transformation of intact yeast cells

- treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168 (1983).
- 33) Tanaka T, and Weisblum B, Construction of a colicin El-R factor composite plasmid *in vitro*: means for amplification of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **121**, 354-362 (1975).
 - 34) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
 - 35) Sanger F, and Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, 441-448 (1975).
 - 36) McCombie WR, Heiner C, Kelley JM, Fitzgerald MG, and Gocayne JD, Rapid and reliable fluorescent cycle sequencing of double-stranded templates, *DNA seq* **2**, 289-296 (1992).
 - 37) Carle GF and Olson MV, An electrophoretic karyotype for yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3756-3760 (1985).
 - 38) Chu G, Vollrath D, and Davis RW, Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields, *Science*, **234**, 1582-1585 (1986).
 - 39) Southern EM, Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
 - 40) Cooper KF and Strich R, *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p is required for efficient induction and execution of meiotic development, *Eukaryot. Cell* **1**, 66-74 (2002).
 - 41) Rose MD, Winston F, and Hieter P, "Methods in Yeast Genetics, a Laboratory Course Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1990).
 - 42) Enyenihi AH and Saunders WS, Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **163**, 47-54 (2003).
 - 43) Percival-Smith A, and Segall J, Characterization and mutational analysis of a cluster of three genes expressed preferentially during sporulation of

- Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2443-2451 (1986).
- 44) Friesen H, Hepworth SR, and Segall J, An Ssn6-Tup1-dependent negative regulatory element controls sporulation-specific expression of *DIT1* and *DIT2* in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 123-134 (1997).
- 45) Briza P, Eckerstorfer M, and Breitenbach M, The sporulation-specific enzymes encoded by the *DIT1* and *DIT2* genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**,4524-4528 (1994).
- 46) Kupiec M, Byers B, Esposito RE, and Mitchell AP, Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*, in "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Volume 3 Cell Cycle and Cell Biology (ed. by Pringle, JR, Broach, JR., and Jones, EW.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 889-1036 (1997).
- 47) Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown OP, and Herskowitz I, The transcriptional program of sporulation in budding yeast, *Science*, **282**,699-705 (1998).
- 48) Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, and Pringle JR, Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **14**, 953-961 (1998).
- 49) Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 50) Burnette WN, "Western blotting",: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal. Biochem.*, **112**, 195-203 (1981)
- 51) Rothstein RJ, One-step gene disruption in yeast, *Methods enzymol.*, **101**, 202-211 (1983).
- 52) Lefrancois P, Auerbach RK, Yellman CM, Roeder GS, and Snyder M, Centromere-like regions in the budding yeast genome, *PLOS Genet*, **9**, e1003209

- (2013).
- 53) Meluh PB, Yang P, Glowczewski L, Koshland D, and Smith MM, Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell*, **94**, 607-613 (1998).
 - 54) Stoler S, Keith KC, Curnick KE, Fitzgerald-Hayes M, A mutation in *CSE4*, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis, *Genes Dev.*, **9**, 573-586 (1995).
 - 55) Lefrancois P, Euskirchen GM, Auerbach RK, Rozowsky J, Gibson T, Yellman CM, Gerstein M, and Snyder M, Efficient yeast ChIP-Seq using multiplex short-read DNA sequencing, *BMC Genomics*, **10**,37, 1471-2164 (2009)
 - 56) Ishii K, Ogiyama Y, Chikashige Y, Soejima S, Masuda F, Kakuma T, Hiraoka Y, and Takahashi K, Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction, *Science*, **321**, 1088-1091 (2008).
 - 57) Thakur J and Sanyal K, Efficient neocentromere formation is suppressed by gene conversion to maintain centromere function at native physical chromosomal loci in *Candida albicans*, *Genome Res.*, **23**, 638-652 (2013).
 - 58) Denis M, Delourme R, Gourret J-P, Mariani C, and Renard M, Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus* (genetics, morphology, cytology, and sensitivity to temperature), *Plant Physiol.*, **101**, 1295-1304 (1993).
 - 59) Engelke T, Hirsche J, and Roitsch T, Anther-specific carbohydrate supply and restoration of metabolically engineered male sterility, *J. Exp. Bot.*, **61**, 2693-2706 (2010).
 - 60) Hill A and Bloom K, Genetic manipulation of centromere function. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2397-2405 (1987).
 - 61) Sauer B and Henderson N, Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5166–5170 (1988).

- 62) Sauer B, Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2087-2096 (1987).
- 63) Golic KG and Lindquist S, The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome, *Cell*, **59**, 499-509 (1989).
- 64) Dymecki SM, FLP recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6191-6196 (1996).
- 65) Lyznik LA, Hirayama L, Rao KV, Abad A, Hodges TK, Heat-inducible expression of *FLP* gene in maize cells, *Plant J.*, **8**, 177-186 (1995).

公表論文

- 1) Miyamoto A, Yanamoto T, Matsumoto T, Hatano T, Matsuzaki H, Cell Death Caused by Excision of Centromeric DNA from a Chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1841-1847 (2013)

- 2) 出芽酵母において染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析, 宮本昭弘, 柳本敏彰, 秦野琢之, 松崎浩明, 福山大学生命工学部研究年報, **12**, 1-16 (2013).

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始適切なる御指導を賜りました福山大学生命工学部生物工学科 松崎浩明教授 に深く感謝致します。

また、本研究に対し、多くの御助言を頂きました福山大学生命工学部生物工学科 秦野琢之教授、久富泰資教授、福山大学薬学部 福長将仁教授、福山大学生命工学部 生命栄養科学科 菊田安至教授 に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、プラスミドを提供して下さいました奈良先端科学技術大学院大学 高木博史教授、大阪大学院 金子嘉信教授、信州大学 片岡正和准教授 に深く感謝致します。

また、本研究において御援助頂きました 松本雄太氏、柳本敏彰氏 に感謝致します。

最後に、常に勇気づけて下さった先輩ならびに後輩の皆様に感謝致します。

