

博士論文

マウス MHC クラス II 領域 における減数分裂期組換えのホットスポットの遺伝学的解析

磯部拓

総合研究大学院大学

生命科学研究科

遺伝学専攻

平成 11 年

目次

序論

第1章 マウス MHC クラス II 領域内 *Pb* ホットスポットの遺伝的構造の解析

1-1 序論

1-2 材料と方法

1-3 実験結果

1-4 考察

第2章 減数分裂期染色体高次構造（シナプトネマ複合体）上におけるホットスポットの 空間配置の解析

2-1 序論

2-2 材料と方法

2-3 実験結果

2-4 考察

総合考察

謝辞

文献

図表

序論

生物は、卵や精子のような配偶子の形成の際に、両親由来のゲノムを混ぜ合わせて、新しいゲノムを作り出し、多様性を生み出す。また、他方では DNA が放射線の照射や薬剤によって受ける傷害に対応して、様々な修復機能を備え、遺伝情報の安定な維持を行う。この対照的な二つの機能の中心を担っているのが組換え反応である。

相同組換えは、同じ塩基配列を持った 2 分子の DNA の間で起こる反応である。大腸菌、出芽酵母、分裂酵母、マウスなどの相同組換え体の解析は、DNA 上に組換えが高頻度で起こる領域のあることを示した。この領域を組換えのホットスポットと呼ぶ。

このホットスポットが観察される理由として、次の 3 点が考えられる。(i) 組換え酵素が、DNA あるいは、染色体の特定の構造を認識して、組換えを開始する場合。(ii) 第一減数分裂期では染色体の特徴的な構造変化が観察されているが、その中でもパキテン期からディプロテン期に観察されるキアズマは、相同染色体の対合が、まさに分離する点として知られており、その分離点である場合。(iii) 減数分裂期の相同染色体対合で生じる高次構造（特にシナプトネマ複合体）によって組換え点が規定されるなどである。

大腸菌では、二重鎖切断の 5' 端から RecBCD による消化が *chi* 配列近傍で高頻度に生じることが示されている (Anderson et al. 1997)。また、分裂酵母では、*ade6* 遺伝子上に 1 塩基の変異が生じた *M26* が高頻度の組換え体が生じることから解析が進み、*M26* 変異を含む 6 塩基からなる配列が、組換え頻度の上昇に関与していることが示された (Zahn-Zabal et al. 1995)。最近この配列は、転写因子 Mts1, Mts2 の結合配列であることが分かった (Wahls et al. 1994)。

一方、出芽酵母の減数分裂期組換えのホットスポットには、このような決まった配列が検出されていないが、ホットスポットに二重鎖切断が形成され (Sun et al. 1989; Cao et al. 1990)、その領域が球菌エンドヌクレアーゼに感受性であることから、組換えのホットスポットはヌクレオソームを形成しない領域にあることが示された (K. Ohta, 1998)。

これらの結果は、出芽酵母の組換えのホットスポットは、二重鎖切断による組換え開始領域であるが、分裂酵母では、組換え中間体の解離の位置である可能性も残っている事を示している。最近、分裂酵母でも減数分裂期に Spo11 依存の二重鎖切断が生じることが分かったが、その切断が *M26* 変異領域には、観察されていないのでこの変異領域での組換え頻度の上昇は、組換え中間体の解離に関与した領域であるか、他の理由で上昇した可能性が高い。(iii) の可能性については、積極的に支持するデータは、これまで得

られていない。しかし減数分裂期では、シナプトネマ複合体 (Synaptonemal Complex; SC) と呼ばれる高次構造が出現し、この構造体の形成を通して相同染色体の対合と組換えが進行すると考えられている。したがってこの過程に組換えの位置を限定するような特異的な構造がある可能性も考えられる。

現在までのところ、哺乳動物における減数分裂期の組換えのホットスポットに関してもっともよく解析されている染色体領域は、マウス第 17 染色体上の主要組織適合抗原複合体 (Major Histocompatibility Complex; MHC) のクラス II 領域である。この領域は、約 400kb の長さの DNA 断片の中に、細胞表面抗原の提示に関与する遺伝子がクラスターをなして存在している。そしてここには、組換えが頻発する 4 つのホットスポットが知られている (図 1)。また、クラス II 領域に隣接し、抗原提示に直接関係ないと言われているクラス III 領域にも組換えのホットスポットが見いだされ (Snoek et al. 1998)、ホットスポットは合計 5 か所検出された。これらのホットスポットに共通する特徴は、第一に、ホットスポットになる要因は、MHC ハプロタイプに依存する (Shiroishi et al. 1993)。第二に、ホットスポットは数 kb というせまい領域にある (Steinmetz et al. 1982)。第三に、性に依存したホットスポットがあり、雌の減数分裂期で特異的に高頻度の組換えが起こることである (Shiroishi et al. 1991)。

現在までに、クラス II 領域の *Lmp2*、*Eb*、*Ea* 遺伝子近傍にあるホットスポット及びクラス III ホットスポットは、塩基配列が決定されていて、ホットスポット間で比較されている。しかし、クラス II 領域内の *Pb* 遺伝子近傍にあるホットスポットについては、組換えが高頻度にかかるという結果はあるが、組換え部位の決定やその分布を明らかにする近傍の塩基配列は決定されていない。

本研究では、まず、第一に、この *Pb* 遺伝子近傍にある組換え点の分布を詳細に解析した。さらに組換え切断点が集中している領域、すなわち、ホットスポット近傍の塩基配列を決定した。これらのデータと、すでに解析が進んでいる他のホットスポットの塩基配列の特徴について、その一次構造を体系的に比較解析し、ホットスポットを構成する塩基配列の検出を試みた。さらに、昨年発表されたヒト MHC の 3Mb、マウス MHC の 1.4Mb の塩基配列データを使って、ヒト及びマウスの MHC 領域にある、ホットスポットに共通な一次配列があるかどうかを解析した。最後に、染色体構造との関連を検討するために、シナプトネマ複合体 (SC) 上に組換えのホットスポット領域を検出し、その空間的配置を解析した。以上の解析結果をもとに、マウスにおける減数分裂期組換えの機構について考察した。

第1章 マウス MHC 領域内 *Pb* ホットスポットの遺伝的構造の解析

1-1 序論

マウス MHC のクラス II 領域には、液性、及び、細胞性免疫反応を制御する多数の重要な遺伝子がクラスターを成して存在し、多数の組換え型染色体が作製されてきた。また、分子遺伝学的手法が最も早く用いられた領域でもあり、1982 年にはコスミドクローンによる染色体ウォーキング法を用いて、その構造解析が進められ (Steinmetz et al. 1982, 1996) (図 1)、減数分裂期における組換え体の組換え点が詳細に調べられてきた。その結果、哺乳類の組換えの終結点は、染色体上にランダムに存在するのではなく、特定の狭い領域に限定されることが明らかになった。クラス II 領域には、組換え終結点が集中するホットスポットが 4 カ所報告されている。どのホットスポットで組換えが生じるかは、実験交配に用いたマウス系統の MHC ハプロタイプ (特定のマウス系統の MHC 領域上の一連の対立遺伝子のセットをハプロタイプと呼んでいる) に依存している。例えば、*Eb* 遺伝子内にある組換えのホットスポットは、多くの場合、標準的な実験用近交系マウスの *k*, *b*, *d* ハプロタイプを含む交配で観察されるが (Zimmerer et al. 1991; Bryda et al. 1992)、*Lmp2* ホットスポットでの組換えは、ほとんどの場合 *CAS3* や *wm7* と名付けられた野生マウス由来の MHC ハプロタイプを持つマウス系統との交配でのみ観察された (Shiroishi et al. 1993; Yoshino et al. 1994)。また、*Pb* ホットスポットは、*CAS4* と名付けられた野生マウス由来のハプロタイプを含む交配でのみ検出されている (Yoshino et al. 1994)。組換えは、交配の一方の親が上述した MHC ハプロタイプを持てば、特定のホットスポットで生ずる。即ち、ホットスポットを示す形質は、遺伝学的に優性表現型として現れる。また、両親ともホットスポットを示すようなハプロタイプを持つ場合は、どちらのホットスポットでの組換えも同等に観察される (Yoshino et al. 1994)。したがって、その性質は共優性 (Co-dominant) であると言える。

現在、*Lmp2*、*Eb*、*Ea* 遺伝子近傍にあるホットスポットについては、組換え部位の詳細な分布から近傍領域の塩基配列までが決定されており、それらの構造が比較検討されている。これに対し、*Pb* 遺伝子近傍にあるホットスポットについては、この周辺の組換えが *Pb* 遺伝子近傍に限定されるということがわかっているだけで、その詳細は不明である (Yoshino et al. 1994)。また、国立遺伝学研究所においても、*CAS4* と *wm7* ハプロタイプの間での交配によって得られた約 600 個体の戻し交配個体から、この周辺に組換え部位を持つ 6 個の組換え体を得られており、それらの組換え部位が *Pb* を含む約 15kb

の DNA 断片中に収まることが明らかになっているが(Yoshino et al. 1994)、それ以上の解析は行われていない。

Pb 遺伝子近傍にあるホットスポットの詳細な解析を行うことは、現在知られている MHC クラス II 領域内の全てのホットスポットについての情報を得ることになり、それらのホットスポットの DNA の一次構造を比較することにより、ホットスポットに共通する塩基配列の探索が初めて可能になると考えられる。また、近年、マウス全 MHC クラス II 領域とクラス III の一部の塩基配列が決定され、データベース上に公開された (Rowen et al. Unpublished)。本研究では、まずはじめに、*Pb* 遺伝子近傍のホットスポットの DNA 一次構造を決定し、解析し、次に、MHC 領域の塩基配列のデータベースを用いて、各々のホットスポット間、あるいは、それ以外の領域の塩基配列と比較を含めて解析し、全てのホットスポットに共通する DNA 一次構造上の特徴を明らかにした。

1-2 材料と方法

(1).マウス :

B10.CAS4 (R28)/Kfl は、Texas Southwestern Medical Center にあるテキサス大学の Kirsten Fischer Lindahl 博士によって確立された。このマウス系統は、1991 年に国立遺伝学研究所に分与され、その後系統維持されている。このマウス系統は、*Pb* ホットスポットでの組換えを誘導する CAS4 ハプロタイプを持っている。B10.A (R209) は、国立遺伝学研究所で確立され、維持されている。K303、K305、K306、K307、K313 及び K501 は、B10.CAS4(R28) 系統と B10.A(R209) 系統間の交配によって得られ、MHC 領域の両端の遺伝子である H2K と H2D 遺伝子座間での組換え系統である (Yoshino et al. 1994)。その組換え切断点は、全て、*Pb* 遺伝子の近傍にマップされた。全ての組換え系統は、国立遺伝学研究所で確立され維持されている。

(2).CAS4 ハプロタイプを含んだ交配で得られた他の組換え型 DNA :

CAS4/*k*, CAS4/CAS3, CAS4/*b* の各々のハプロタイプ間の交配から作製された組換え系統から抽出したゲノム DNA は、テキサス大学の Kirsten Fischer Lindahl 博士から分与を受けた。これらは、H2K – H2D 間の組換え体として作製されたものである。

(3).プラスミドクローンと制限酵素地図の作製 :

クローン KX10 は、コスミドクローン II10.6 (Steinmetz et al. 1986) を KpnI と XhoI で切断した後、pBluescript II KS (+) のマルチクローニングサイトにサブクローニングした。クローン X5.0 は、同様にコスミドクローン II10.6 を XhoI で切断した後、DNA 断片を pBluescript II KS (+) にサブクローニングした (図 2 A)。

(4).PCR の条件 :

全ての PCR 反応は、GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystem, CT, USA) で反応を行った。反応は、プライマーに Takara EX Taq Buffer (Takara, 日本) 800 μ mol, dNTP 0.04 μ M, Takara EX Taq DNA polymerase を 1.5 units 加えた。テンプレートとして、0.3 μ g のゲノム DNA を加えた。プライマーペアを含め、総容量 20 μ l で反応を行った。条件は、pre-denature が 94°C で 3 分、続いて denature を 94°C で 1 分、annealing を 55°C で 1 分、この denature から annealing 間での過程を 35 サイクル行った。elongation を 72°C で 1 分、そして最後に extension を 72°C で 10 分行った。

組換え部位のマッピングに使用したプライマーペアの塩基配列を以下に示す。

P1-F、5' -AACCCACAACATTGGCAAGTCC-3'

P1-R、5' -CAGCTGCAGAGAGCCCTAGC-3'

P2-F、5' -GTGTCCTATTCCTGTTGTGG-3'

P2-R、5' -TCTTTCACCTCCTGTACTGG -3'

P3-F、5' -CGAGGCCTTGAACCTGCGAC-3'

P3-R、5' -AGACACCAGCCTAGGTCTAC-3

P4-F、5' -CTGCTGTCCCATCCTCTGGC-3'

P4-R、5' -CTCCATAGATACAGGGATTC-3'

P5-F、5' -CGCTCACAATCTGTAACTCC-3'

P5-R、5' -TAGGTCCCAAACACAGCTCC-3'

(5).PCR 産物の多型：

KX10 と X5.0 クローン領域における、組換え系統の親系統のハプロタイプである *wm7* と *CAS4* の多型を解析するために、KX10 は、EcoRI で切断し、X5.0 は、BamHI で切断した。得られた全ての DNA 断片を pBluescript II KS(+) にサブクローニングし、次にそれぞれの DNA 断片の両端を、M13-20 プライマーと Reverse プライマー(Stratagene)を用いて塩基配列を決定した。その両端の塩基配列の決定によって、デザインされた多型マーカーを作製した。それらの DNA 上の位置は図 2 A に示してある。PCR 産物の多型解析は、Single Strand Conformational Polymorphism PCR (SSCP-PCR)法、あるいは、塩基配列の決定により行った。

(6).DNA 塩基配列の決定：

塩基配列決定のための反応には、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用いた。反応産物の電気泳動を含む一連の解析には、ABI377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems、CT)、Sequencing Analysis version 3.0、AutoAssembler version 1.4.0 (ABI PRISM) と DNASIS version 3.7 (HITACHI Software、Japan)を用いた。得られた DNA 塩基配列のホモロジーサーチは、National Center for Biotechnology Information (BLAST network service)を利用して行った。

(7).ノーザンブロット解析：

いくつかの組織から液相分離を用いた方法で ISOGEN (NIPPON GENE, 東京) を使用し、調整した 20 μ g の RNA を 1.2%ホルムアルデヒドを含むアガロースゲルで定法に従って泳動した(Molecular Cloning second edition, Cold Spring Harbar, 1989)。そのアガロースゲルを Hybond-N' nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) と数時間、常温で接触させて、RNA をトランスファーした。ハイブリダイゼーションは、[32P]-labeled DNA 断片 (図 1A) をプローブとして行った。プローブに用いた DNA 断片は、あらかじめ図 1A の適当な制限酵素で切断し、0.7%アガロースゲル泳動後、抽出した。ハイブリダイゼーション後は常温で 2x SSC、0.5%SDS 溶液に対して、1 時間洗浄した後、オートラジオグラフィーによって検出した。

1-3 実験結果

(1).CAS4/wm7 の交配由来の *Pb* ホットスポット近傍に生じた組換え部位の同定：

CAS4/wm7 の交配から得られた 6 つの組換え体の組換え部位は、*Pb* 遺伝子の近傍の 15kb の DNA 断片に含まれる(Yoshino et al. 1996)。これらの組換え部位を DNA 上に決定するため、BALB/c 系統ゲノム由来のコスミドクローン II10.6 を用いて 15kbDNA 断片の制限酵素地図を作製した。さらに、この制限酵素地図を基に 15kb 内にほぼ均等になるようにプライマーペアーを 5 カ所 (P1~P5) に設定した(図 2 A)。それらのプライマーペアーを用いた PCR 産物から、親系統である CAS4-wm7 ハプロタイプ間の多型を検索した。親系統の PCR 産物の多型は、Single Strand Conformational polymorphism (SSCP)-PCR 法を主に用い、一部は塩基配列を決定した。組換え部位の決定は、各々のプライマーペアーの領域内で、組換え体がどちらの親系統の多型を持っているかを調べることにより行った。全ての組換え体に対して同様の解析を行った結果、6 つの組換え体のうち 5 つの組換え部位が、プライマーペアー P2 と P3 の間の 2.4kb の DNA 断片中に含まれていた(図 2 A)。もう一つの組換え部位は、P3 と P4 の間にある 2.9kb の DNA 断片中に存在した。

(2).wm7 以外のハプロタイプと CAS4 との交配で得られた組換え体の組換え部位のマッピング：

CAS4 ハプロタイプと wm7 以外の他の 3 つの親系統のハプロタイプの組み合わせから得られた組換え体を同様の方法で、組換え部位を調べた。これらの結果を、まとめて図 2 の B に示した。wm7 由来以外の組換え体の組換え部位は、wm7 由来の組換え体より広範な領域に分布した。これらの組換え体の中で 2 つの組換え部位は、wm7 ハプロタイプとの組換えによって得られた組換え部位が集中している 2.4kb 断片内に存在した。

(3).*Pb* ホットスポットの塩基配列の決定：

組換え部位が最も集中する 2.4kb DNA 断片を用いて、この領域の塩基配列を決定した。まず、サブクローニングの完了している BALB/c 系統のプラスミドクローン 2.4kbDNA 断片に対し、Kilo-sequence Deletion Kit (TaKaRa)を用いて、数 100bp 単位の欠失変異クローンを作成した。2.4kb 断片内に約 400bp おきにプライマーを設定し、それらのプライマーを使って増幅した PCR 産物から、組換え体の親系統である wm7、及び、CAS4 のゲノムの塩基配列を決定したところ、2.4kb 内にあった全ての組換え切断点が 341bp

内にあることが分かった (図 2 B)。次に、このマウスホットスポット領域に対して、データベースの BLAST プログラムを用いて、相同性検索を行った。その結果、唯一ラットの *Pb* 遺伝子の一部が高い相同性を持つことが分かった。すなわち、*wm7/CAS4* における *Pb* 遺伝子のホットスポット領域には、ラット *Pb* 遺伝子の exon 4 (110bp) の 3'側にある 63bp と 88%の相同性があること、また、*Pb* 遺伝子の intron 4 (386bp) の中の 59bp に 84%の相同性があることを見いだした (図 3)。ラット *Pb* 遺伝子の exon 4 は、膜貫通ドメインをコードしており、5 アミノ酸残基が細胞内に突出している (Schopfer et al. 1987)。また、限定されたホットスポット領域 341bp に対して、ORF 解析アルゴリズムである Grailv1.3 を用いて調べたところ、ORF は検出されなかった。また、真核生物の Pol II プロモーター配列とのホモロジーからプロモーターを予測するアルゴリズムである BIMAS を用いて検索したところ、プロモーターと考えられる配列は検出されなかった。

さらに、*Pb* 遺伝子のホットスポット領域には、今まで他のホットスポット領域に見つかった中程度の反復配列である MT-ファミリー、オクタマー転写因子結合配列 (Oモチーフ)、同じく転写因子の結合配列である Bモチーフ、さらに、TCTG、CCTG の 4塩基の繰り返し配列 (Ling et al. 1993; Shiroishi et al. 1990) が見いだされた。これらモチーフの詳細な位置関係と方向は図 4 に示した。

(4).ホットスポット領域の転写産物の同定：

ホットスポット領域に転写因子結合配列が見いだされたことから、遺伝子が減数分裂期の精巣で実際に転写されているか否かを解析した。このため、組換え体の親系統である *CAS4* の精巣から mRNA を抽出しノーザンブロッティング法で解析した。プローブとして、図 2 A に示した F1 から F4 の DNA 断片を用いた。ポジティブコントロールに、マウス細胞質内 β アクチンの mRNA の塩基配列をプローブとして用いた。その結果、 β アクチンの転写産物は検出されたが、F1 から F4 までの DNA プローブによる転写産物は検出されなかった。(Data not shown)。これは、ホットスポット領域に存在するマウス *Pb* 遺伝子は、減数分裂期に殆ど発現していない事を示唆している。同様な実験を肝臓、脾臓などの組織から調整した mRNA で行ったところ、やはり検出できなかった (Data not shown)、*Pb* 遺伝子が偽遺伝子である可能性も考えられる。

(5).MHC クラス II 領域内の他のホットスポット領域の構造解析：

マウス MHC クラス II 領域内における *Pb* ホットスポットを含む 4 つのホットスポッ

トと、その近傍の遺伝子との相対的な位置関係を解析した。この結果、*Ea*、*Eb*、*Pb* ホットスポットは、各々の遺伝子、及び、偽遺伝子の intron 内に存在した、一方、*Lmp2* は遺伝子の 3'側に位置していた（図 4）。

次に、特異的な塩基配列がホットスポットの位置の決定に一義的に働いているか否かを検討するため、マウス MHC クラス II 領域内のホットスポット、及び、その周辺の DNA 領域に共通な塩基配列があるかどうかを調べた。このため、4 つのホットスポット間の配列を比較した。この解析では、塩基配列の詳細な部分までドットプロットすることができるプログラム“Dotter”を用いた。さらに、Clustal W プログラムを用いて各々のホットスポット領域を広げ、全ての塩基配列を総当たりで、1 対 1 でアライメントして比較した。その結果として、全てのホットスポットに完全に共通する塩基配列は得られなかった。

(6).MHC クラス II 全領域の塩基配列データベースを用いたモチーフの検索：

これまで複数のグループの研究は、マウス MHC クラス II 領域内のホットスポットに、ある種の保存された塩基配列があることを示した。これらをモチーフと呼ぶ。それらのモチーフは、MT-ファミリー配列、Oモチーフ、Bモチーフ様配列、TCTG、あるいは、CCTG の 4 塩基の繰り返し配列などである。これらの配列が組換えのホットスポット領域とどのような関連をもつか知るために、その配置を MHC クラス II の全領域で解析した。その結果、MT ファミリー配列は、*Eb*、*Lmp2*、*Pb* の 3 つのホットスポット領域内に存在したが、他の 2 つのホットスポットを含む広い領域内には存在しなかった。また、Oモチーフ、Bモチーフ様配列、4 塩基の繰り返し配列は、全てのホットスポットに存在していた。*Pb*、*Eb*、*Ea*、*Lmp2* で発見された Oモチーフは、ATTTCAT、ATTTTCAT、GTTTCAT、GTTTG CAT である。同様に Bモチーフ様配列は、GGGTCTGACC、GGGATTCCCC、GGGATTATCC、GGGAACTCTCC である(図.5 A)。4 塩基の繰り返し配列については、*Pb* ホットスポットに、2 つの (CCTG) が存在し、*Eb*、*Ea* 及び *Lmp2* ホットスポットには、それぞれ、5 つの (CAGG)、2 つの (CCAG)、4 つの (CAGA) が存在した(図.5 A)。また、これらのモチーフと組換え部位の相対的な位置と、モチーフの方向性には共通の特徴が見いだされた。即ち、Oモチーフと Bモチーフ様配列の間隔は 300bp 以内にあり、その方向は互いに逆向きであった。4 塩基の繰り返し配列は、Oモチーフ、Bモチーフ様配列を含め、1200bp 以内（図 5 B）に存在した。

次に、これらのモチーフが、マウス MHC クラス II 領域にどのような頻度で現れるのか、また、どのような配置で存在するかを調べるため、データベースに登録されている MHC

クラスII領域の全塩基配列について解析した。最初に、全領域にわたってOモチーフとBモチーフ様配列の全てを抽出した。次に、塩基配列の一方の端から、各々のモチーフが逆向きをしているものを抽出した。その抽出したモチーフ全てに対して、モチーフ間の距離を測り、同時に、Oモチーフ、Bモチーフ様配列を含め、1200bp以内に存在する4塩基の繰り返し配列についても調べた。結果は表1に示した。

最近、転写因子NF- κ Bが結合できるBモチーフのコンセンサス配列は、*in vitro*の結合性の解析によりGGGANNNNCCと報告された（Nはどのヌクレオチドでも良い）（Zabel et al. 1991）。その後、Bモチーフに結合する蛋白質の詳細な構造解析から、Bモチーフのコンセンサス配列が、GGGRNYYYCC（Rはpurine、Yはpyrimidine、Nはどのヌクレオチドでも良い）であることが、報告された（Chen et al. 1998）。そこで、Bモチーフ様配列について、幾通りかのRNYの塩基を入れた配列を使って抽出した。まず、GGGRNYYYCCをBモチーフとして使用したとき、RNYのRにA、Nに[CTG]（[]の中はどのヌクレオチドを1つ用いても良い）を挿入すると、*Ea*と*Pb*ホットスポット内のBモチーフ様配列は、GGGNNNNNCCに相当していたが、GGGRNYYYCCはコンセンサス配列として、抽出されなかった。また、GGGA[CTG]Y[CAT]YCC（*Pb*ホットスポット内のBモチーフに似た配列は含まない）や、全てのホットスポットに共通する配列であるGGG[AT][CTG]YN[CTA]CCについても解析した。これらの結果を表1にまとめた。まず、Bモチーフの配列をどのように変化させても、O-Bモチーフの間の距離を短くすると、MHCクラスII全領域にわたってこれら2つのモチーフが揃って出現する頻度は低くなったが、ホットスポット内での頻度に対しては変化がなかった。特に、BモチーフとしてGGGA[CTG]Y[CAT]YCCを用いた場合には、このモチーフがMHCクラスII領域に3カ所存在したが、全てがホットスポット領域内に位置していた。ホットスポットには、O-Bモチーフが短い距離間隔で存在することに加えて、MT-ファミリー配列や4塩基の繰り返し配列が検出された。

次に、これらのモチーフの存在と位置を、マウスのMHCクラスIII領域内に存在するホットスポットや、ヒトMHC領域内の*Tap2*遺伝子近傍に見いだされるホットスポットについても検索した、いずれのホットスポットにもこれらのモチーフが存在し、しかもO-B間の距離が同様に短いことがわかった（図5）。

(7).組換えを誘発する MHC クラス II ハプロタイプと誘発しないハプロタイプの染色体上におけるモチーフの比較：

Pb ホットスポットの組換え誘発系統である R28 系統と、組換え非誘発系統でホット

スポット、及び、その周囲の塩基配列を比べたところ、いずれにも O モチーフ、B モチーフ様配列、TCTG、CCTG の 4 塩基の繰り返し配列が含まれており（図 6）、また、塩基配列にも相違は認められなかった。

(1). *Pb* ホットスポットにおける組換え部位の分布：

本研究によって、*Pb* ホットスポットでは *CAS4/wm7* のハプロタイプの交配の場合、組換え部位は、そのほとんどが 341bp 以内という限られた DNA 断片内に含まれることが分かった。一方、*CAS4* と他ハプロタイプとの組み合わせでは、約 6kbp の中に組換え部位が分散した（図 2 B）。このように、交配相手のハプロタイプによって組換え部位の分布の幅が変化することは、*Lmp2* 遺伝子近傍のホットスポットの他、全てのホットスポットにおいて観察されている（Bryda et al. 1991; Snoek et al. 1998; Khambata et al. 1996; Yoshino et al. 1995）（図 4）。この性質は、特定のハプロタイプの組み合わせで組換え部位が集中している領域の塩基配列を比較した時、系統間で塩基配列に大きな違いがなかったので（Shiroishi et al. 1993）、恐らくホットスポットの外側にある DNA 一次構造上の違いによって決められる染色体構造によるものと考えられる。また、*Pb* ホットスポットに限らず、他のホットスポットにおいても、マウスでは全体的に組換えはホットスポットの中央でその頻度が高く、両端へ行くに従って低下するという対称性をもって分布している。これに対して、ホットスポットが DNA 二重鎖切断（DSBs）による組換えの開始点である出芽酵母では、頻度のピークが遺伝子の 5'側から 3'側に向かって漸次低下するという極性を示す。このような結果は、マウスのホットスポット領域が組換えの開始である DSBs が起こる構造とは、関連していないように見える。

(2). MHC クラス II 領域内のホットスポットとその近傍にある遺伝子との位置関係：

今回の研究で *Pb* ホットスポットのマッピングが行われたことにより、MHC クラス II 領域に存在する 4 カ所全てのホットスポットについての一次構造が初めて明らかになった。それらをまとめると、複数のホットスポットに共通する特徴として、ホットスポットがその近傍の遺伝子のイントロン内に存在するか（*Eb*, *Ea* 遺伝子）、または、遺伝子の 3'側に存在する（*Pb*, *Lmp2* 遺伝子）ということである。この点は、出芽酵母で報告されているホットスポットのほとんどが、遺伝子の 5'側のプロモーターに見いだされるのと対照的である。

最近の出芽酵母の研究からは、遺伝子発現が必ずしもホットスポットに必要では無いことが証明されつつある（Nicolas et al. 1989; Schultes et al. 1991）。確かに、組換えの促進にクロマチン構造がオープンになることは必要であるかもしれないが、DNA の転写が必須であるかどうかは明らかではない。組換え関連蛋白質群が染色体上の特定の部位

に接近し易くなる様に、転写因子のあるものが結合することがむしろ重要と考えられる (Gross et al. 1988)。では、マウスと出芽酵母において、ホットスポットと近傍の遺伝子との相対的な位置関係に見られる顕著な相違は、どのように説明されるであろうか。まず第一に、組換え反応機構自体が大きく異なるということが考えられる。しかし、現在まで発見されている哺乳動物における組換え関連蛋白質の多くは、出芽酵母の組換え蛋白質と相同性が高く、減数分裂期の染色体上におけるそれらの蛋白質の局在の仕方もよく似ている。したがって、本質的に異なった組換え機構があるとは考えにくい。

次に、出芽酵母のホットスポットが二重鎖切断(DSBs)による組換えの開始点を指すのに対し、マウス MHC クラス II 領域でのホットスポットでは組換え体形成の終結点によって検出されているため、両者のホットスポットの位置が異なっている可能性が上げられる。出芽酵母の減数分裂期組換えは、まず DSBs により開始し、お互いの DNA 鎖の相同領域を検索し、次に DNA 鎖交換反応が起こる。引き続いて DNA 分子を交換した組換え中間体は、組換えの開始点から分岐点移動(ブランチマイグレーション)しながら、最初に消化されたギャップを修復し、組換え中間体であるホリディ構造ができる。この構造体は、最終的に DNA 鎖の切断によって解離し組換え体が形成される。出芽酵母では、この一連の反応の過程で DSBs の形成によりホットスポットの部位特異性が決定され、組換え頻度が遺伝子の 5'側で高く、3'側に向かって低くなることが観察されている。一方、マウスを含む哺乳動物では減数分裂期組換えが DSBs によって開始されることの証明はまだ無い。

マウス MHC クラス II 領域内のホットスポットの位置は、組換えの最終産物である組換え体の組換え部位を親系統の DNA 多型を基に調べている。したがって、減数分裂期に観察される相同染色体のトランジェントな対合から組換え開始反応、組換え終結までの全過程において、ホットスポットの位置となる可能性がある。マウスでは、出芽酵母の場合のように組換え反応開始領域がホットスポットの位置である可能性は比較的薄いと考えられる。つまり、マウス MHC クラス II 領域内の全てのホットスポットにおいて減数分裂時に近傍の遺伝子の転写活性が見られないという結果と、マウス MHC クラス II 領域内のホットスポットにおいて DNaseI 高感受性部位が検出されないなどの報告 (Mizuno et al, 1996) がこれを支持している。

(4).マウス MHC クラス II 領域のホットスポットに共通なモチーフ：

マウスの *Pb* ホットスポット領域は、ラットの *Pb* 遺伝子との相同領域が見つかったが、これは Exon のごく一部であり、Grail プログラムなどを用いた解析結果を見ても

転写がホットスポットとなる可能性はほとんどない。実際に、今回の研究において、減数分裂期のマウス精巣を材料にしてノーザンブロッディング法で解析しても、*Pb* 遺伝子の転写産物は検出できなかった。

Pb ホットスポット近傍の塩基配列の検索の結果、中程度の反復配列である MT ファミリー配列、また、オクタマー転写因子結合配列や同様に転写因子結合配列である B モチーフ様配列、さらに、TCTG あるいは CCTG の 4 塩基からなる繰り返し配列が検出された。これらのモチーフの中で、MT-ファミリー配列は、*Lmp2*、*Eb*、*Pb* に共通に存在した。また、オクタマー転写因子結合配列、B モチーフ様配列、TCTG (CCTG) の 4 塩基の繰り返し配列に関しては、全てのホットスポットに共通して存在した。MT-ファミリー配列は、マウスやラットのゲノムに約 10^4 から 10^5 コピー散在する反復配列であり、その 1 部は脳で転写されている (Heinlein et al. 1986)。オクタマー転写因子結合配列は、免疫系の B-細胞特異的遺伝子といくつかの B-細胞非特異的遺伝子の発現を調節するコンセンサス配列である (Maeda et al. 1987)。B モチーフ様配列も、免疫系の B-細胞特異的に様々な遺伝子の転写を調節していると考えられている。これらの配列に各々異なるトランス因子が結合して各々の遺伝子の発現を制御している。因みに B モチーフ様配列に結合する蛋白質である NF- κ B は、マウス H2K クラス I 遺伝子の発現を正に制御していることが分かっている。この遺伝子の発現は、ほとんど全ての細胞系譜で検出されている。

Shenkar らは、*Eb* ホットスポットに見いだされたオクタマー転写因子結合配列や B モチーフ様配列に結合する蛋白質がリンパ腫細胞など核抽出液に存在することを、Gel Retardation 解析により明らかにした (Shenkar et al. 1991)。これらの結果は、少なくとも *Eb* ホットスポットが生体内で何らかの蛋白質と結合する可能性を示している。したがって、これらのモチーフに転写因子が結合する事によるクロマチン構造の変化が、組換え体形成を促進するという可能性が考えられる。

先に述べた分裂酵母の *ada6* 遺伝子のホットスポットでは、*M26* 突然変異体のヘプタマー配列が組換えのホットスポットに重要な役割を果たすが、この配列の内、1 塩基でも置換すると組換えホットスポットとしての活性を失う。また、*M26* 突然変異体のヘプタマー配列に、Mts1、Mts2 の二つの蛋白質が結合することにより、クロマチンのリモデリングが起こることが示された (Mizuno et al. 1997)。同じように、マウス MHC クラス II 領域のホットスポットに共通に存在する転写のモチーフに、蛋白質が結合することにより、染色体のクロマチン構造が変化するのかもしれない。次に組換え部位の決定にこれらのモチーフに関わるかについて調べた。まず、*Pb* や *Lmp2* ホットスポッ

ト領域に対して、塩基配列の解析を行ったところ、組換えを起こすハプロタイプと、起こさないハプロタイプのモチーフに違いがなかった（図 6）。

一方、MHC クラス II 全領域に存在するオクタマー転写因子結合配列や B モチーフ様配列、さらには 4 塩基の繰り返し配列は、ホットスポットでは一定の距離間隔を持って存在し、また、オクタマー転写因子結合配列と B モチーフ様配列の方向が逆向きであることがホットスポットに必要である可能性が示された。

第2章 減数分裂期染色体高次構造（シナプトネマ複合体）上におけるホットスポットの空間配置の解析

2-1 序論

マウスの MHC クラス II 領域は 4 個の組換えのホットスポットを持っている。これらのホットスポットは、遺伝子のイントロン内か、あるいは、遺伝子の 3' 側に存在した。また、ホットスポット領域は、必ずしも DNA ヌクレアーゼに対して高感受性を示すクロマチン領域ではなかった (Mizuno et al. 1996)。また、これらのホットスポット領域には、オクタマー転写因子結合配列や、B モチーフ様配列、および、MT ファミリー配列が、比較的狭い DNA 領域に存在することが見い出された (本研究)。これらの結果は、出芽酵母の第 3 番染色体上に 6-7 個存在するホットスポットの性質、つまり、全てのホットスポットが遺伝子の 5' 側のプロモーター領域にあり、その領域がヌクレアーゼに対して非常に高い感受性を示すことや、いかなる共通配列もない、という性質と大きく異なっている。

真核生物の減数分裂期では、染色体構造の劇的な変化が観察されている。減数分裂期に入ると、両親由来の染色体は、先ず一度複製し 2 価染色体を作る。これらの 2 価染色体はその後より合わさって、あたかも一本の染色体の様に振る舞う (レプトテン期)。その後、相同染色体は対合を始め (ザイゴテン期)、そして、完了する (パキテン期)。このパキテン期の染色体を特にシナプトネマ複合体と呼ぶ。

組換えの中心的な反応、相同塩基配列の認識と DNA 鎖移行反応を行う Rad51 や Dmc1 蛋白質のマウス減数分裂期染色体上での分布を調べると、Rad51 も Dmc1 もレプトテン期からパキテン期の染色体上に観察された (Ikeya et al. 1997)。また、SC から染色体が 2 本に分離する過程 (ディプロテン期) に相同染色体が一点で結合しているのが観察されるが、これをキアズマと呼ぶ。ザイゴテン期の染色体上には初期組換えノジュールと呼ばれる構造体が、2 本のラテラルエレメント (SC コア) の内側に観察され、パキテン期には後期組換えノジュールと呼ばれるより大きな蛋白質に富んだ構造体が SC の中央に観察されている。そして、後期組換えノジュールの数とキアズマの数がほぼ同じことから、後期組換えノジュールは染色体組換えの解離点と考えられるようになった。

これらのノジュールに Rad51 の局在が観察されたことから、これらのノジュールが組換えを行っている領域であることがほぼ確実と考えられている。Rad51 蛋白質はザイゴテン期の染色体が対合しつつあるところに多く存在し、この時期に DNA 上の組換えが盛んに起こり、しかも組換えが染色体の対合と連動して起こると考えられる。一方、パキテン期染色体上では、その局在の仕方がザイゴテン期と異なっていた。そして、Rad51

は最終的にキアズマ上に存在した。

種々の保存された塩基配列が、組換えの頻度を上昇させる役割を担っていると示唆するいくつかの例が報告されている。例えば、黄色ショウジョウバエ (*D. melanogaster*) のパキテン期に生じる XY 染色体の相同領域の対合と分離には、これらの染色体のヘテロクロマチン領域にある rDNA の縦列反復配列が関与していることが報告されている (McKee, 1996; Ren et al. 1997)。さらに、rDNA の繰り返し配列を導入したトランスジェニック・ハエでは、この繰り返し配列の間にあるスペーサー-240bp を含む配列を欠失させると、相同染色体の rDNA 領域の対合ができなくなることが報告された (Ren et al. 1997)。また、雄の黄色ショウジョウバエの減数分裂期のパキテン期では、2 番染色体のユークロマチン上に染色体を対合させる能力を持った特定の DNA 領域が分布していることが報告された。これらの結果は、少なくとも相同染色体の対合に関与する特殊な DNA 配列の存在を示唆している。もし、これらの特殊な領域が相同染色体の対合の開始に関与するならば、これらの配列を持つ領域が組換えのホットスポットになる可能性がある。

もし、マウスの組換えのホットスポットが出芽酵母と異なり、DNA 2 重鎖切断領域ではなく、相同染色体の対合を開始する領域であるとすれば、ホットスポット部位は減数分裂期のパキテン期の染色体のコアに近い所に位置すると考えられる。そこで、私は、シナプトネマ複合体のコアを、それらを構成する蛋白質の抗体で染色し、さらに、ホットスポットをその領域の DNA をプローブに用いて、FISH を行い、抗体で染色したコア領域にシグナルが重なるかどうかを調べた。

その結果、マウスの MHC クラス II のホットスポットのシグナルは、ホットスポット以外のシグナルより、コアに近い位置にあることがわかった。これらの結果は、ホットスポットの役割が、相同染色体の対合を開始する部位である可能性を示唆している。

(1).マウス：

雄においても *Lmp2* ホットスポットで高い組換え活性を示す B10.A (R209) については、第一章の材料の項で説明した。B10.A/SgSn は、日本 SLC (東京) から購入した。C57BL/10SnSlc 系統は、日本 SLC から購入し、国立遺伝学研究所で維持している系統である。

(2).DNA プローブ：

ΔK は、*Lmp2* ホットスポットを含む 25kb 長の DNA 断片を持つコスミドクローンである。このクローンは、B10.MOL-SGR のゲノム DNA のコスミドライブラリーから得たクローン S31 を、Deletion サブクロニング法により作製した (Shiroishi et al. 1990)。MHC クラス II 内にあって組換えを起こさない領域 (コールドリージョン) の 150kb を含む BAC クローン B516 は、Research Genetics 社のマウス BAC ライブラリーを *Pb* 遺伝子近傍にある P3 プライマーペアー (図 2 A) を用いて増幅して単離した。BAC クローン B516 は、*Lmp2*、及び、*H2K* 遺伝子をプローブとして用いたサザンブロッティングでは、シグナルが検出できなかったが、プライマーペアー P3 では、バンドが検出できた。これらのプローブは、FISH による解析に対して、ユニークなプローブであることを確認した (図 9、図 10)。

(3).抗体：

1 次抗体のラビット抗ハムスター SC 抗体 (ポリクローナル) は、カナダ York University の Moens 博士から分与を受けた (Moens PB, 1995)。このポリクローナル抗体は、“B”抗体と呼ばれていて、SC コアのラテラルエレメント Cor1 とセントラルエレメント Syn1 の両方に対する抗体が含まれている。2 次抗体である FITC-labelled goat 抗ラビット

G 抗体は BIO SOURCE 社 (USA) から購入した。

(4).染色体標本の作製：

染色体標本を作製するスライドガラスは、シランコーティング、または、ポリ-L-リジンコーティングを施してあるものを購入した (MUTO-GLASS)。これらのコーティングしていないスライドガラスにはほとんど核を吸着できないが、コーティングしてあるス

ライドグラスは、FISH 法で用いられる過酷な条件でも、核がライドグラスからはずれることはほとんどなかった。

マウスの染色体標本の作製にはサーフェイス-スプレディング法を改良して用いた (Choo, K. H. Andy 1994)。4 週齢の雄マウスを解剖し、精巣を取り出し、可能な限り脂肪を取り除いたのち、その精巣を MEM 溶液の入った 10ml ビーカー中でピンセットでつまみながら洗い、別の MEM 溶液中でほぐした。次に、この試料溶液を 2-3 分間静置して組織片を沈殿させ、その上層を 5 分間 700r.p.m で遠心して沈殿した精巣細胞を集めた。それをピペッティングにより浮遊させ、直径 3cm のディッシュに氷冷した 0.05%食塩水を表面張力で盛り上がる程度まで入れた表面に静かに展開した。その展開した精巣細胞をライドグラスで慎重にすくい、そのライドグラスを直ちに、0.03%SDS/1%パラフォルムアルデヒドを含む氷冷した MEM 溶液に 3 分間浸した。引き続き下記の順序で精巣細胞を固定した。

1. Cold 1%パラフォルムアルデヒド MEM 溶液中で 3 分間浸す。
2. Cold 0.1%Photo-Flo MEM 溶液に 1 分間浸す。
3. Cold 0.1%Photo-Flo MEM 溶液に 1 分間浸す。
4. RT Cold 0.1%Photo-Flo MEM 溶液に 1 分間浸す。
5. 空気中で乾燥させた後、-80℃で少なくとも 2 日間保存。

(5).抗体染色法：

上記の方法で固定したライドグラスを以下の手順で洗浄した。

1. PBS+10% adb 10 分。
2. PBS+10% adb 10 分 + 0.05%TritonX10 分。
3. PBS+10% adb 10 分。

(adb：10% v/v Triton X in PBS、抗体の希釈に用いた緩衝液)

ライドグラスを洗浄後、一次抗体を adb 溶液で 1/500 になるように希釈し、その 100-150 μ l をスライドに滴下した。スライドグラスをパラフィルムでカバーして 4℃の湿潤箱中で一晩インキュベートした。後、以下の手順でライドグラスを洗浄した。

1. PBS+10% adb+0.2% Photo-Fro 10 分。
2. PBS+10% adb 10 分。
3. PBS+10% adb10 分+0.05%TritonX 10 分。
4. PBS+10% adb 10 分。

(Photo-Flo 600 solution, Kodak U.S.A、Triton X と同様の界面活性剤)

洗浄後、完全に遮光した条件で二次抗体を加えた。二次抗体は、abd 溶液で 1/500 に希釈し、100-150 μ l をスライド上のサンプルに滴下し、パラフィルムで覆った後、4 $^{\circ}$ C の湿潤箱中で 3-4 時間インキュベートした。その後、4 $^{\circ}$ C で以下の順序でスライドガラスを洗浄した。

1. PBS+0.2% Photo-Fro 10 分。
2. PBS+0.05% TritonX 10 分。
3. 蒸留水+0.2% Photo-Fro 5 分。
4. 蒸留水+0.2% Photo-Fro 5 分。
5. 4 $^{\circ}$ C で空気中で乾燥。
6. -80 $^{\circ}$ C で少なくとも 2 日間保存。

(6).抗体染色法後の FISH :

(a). 標識された DNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液の作成

DNA プローブの標識は、ニクトランスレーションキットと DIG ニクトランスレーションミックス (Boehringer Mannheim, ドイツ) を用いて、行った (方法の詳細は、キットに付属する説明書に準じた)。標識の時間は、16 $^{\circ}$ C で 90 分とした。プローブは、DIG -11-dUTP または、biotin-16 -dUTP により標識した。65 $^{\circ}$ C で 10 分間処理で酵素を失活し、室温に放置によって冷やした。つぎに、標識したプローブ DNA 溶液 20 μ l に、E.coli 由来の tRNA (10mg/ml) を含む変性サケ精子 DNA (10mg/ml) 2 μ l、マウス Cot-1DNA 1 μ l/ml 2.5 μ l (GIBCO BRL)、4M NH_4OAc 3 μ l、100%エタノール 56 μ l を加えてよく混和し、-80 $^{\circ}$ C で 20-30 分精置したのち、4 $^{\circ}$ C で 15000r.p.m10 分間遠心後、ピペットで上層を除き、沈殿を軽く乾燥した。20 μ l のホルムアミド ultra PURE (GIBCO BRL) を加え、ペレットをピペッティングにより完全に溶かした。75 $^{\circ}$ C で 10 分間処理して DNA を変性し、続いて水中に 10 分間放置した。この液に等量のハイブリダイゼーション液を加えて混和した。(ハイブリダイゼーション液 : 20 \times SSC 液 20 μ l、BSA (Boehringer Mannheim, ドイツ) 20 μ l、50%デキストラン硫酸/4 \times SSC40 μ l、蒸留水 20 μ l、総量 100 μ l)

(b). ハイブリダイゼーション

以下の操作は、全て完全に遮光した条件のもとで行った。抗体染色を終え-80℃で保存してある染色体標本を、55℃で55分間固定し、65℃の70%ホルムアミド/2×SSC液に2分間浸し、次に、氷冷70%エタノール/2×SSC液に5分間浸してホルムアミドを除いた。さらに室温で100%エタノールに5分間浸した後、スライドを風乾した。作成したスライドグラスに、(1).で作成したハイブリダイゼーション液を滴下してパラフィルムで覆い、しばらくハイブリダイゼーション液が自然に広がるのを待ち、その後、37℃の湿潤箱中で15-24時間インキュベートした。その後、以下の順序でスライドグラスを洗浄した。

1.37℃50%ホルムアルデヒド 2×SSCで15分。

2.室温の2×SSCで15分。

3.室温の1×SSCで15分。

4.室温の4×SSCで10分。

次に、500μlの1%BSA/4×SSCにローダミン抗DIG抗体(200μg/ml)とアビジンFITC(5mg/ml)を加えて混和し、その混合液100μlをスライドグラスに滴下した。パラフィルムで覆った後に、37℃の湿潤箱中で45-60分インキュベートした後、以下の順序でスライドグラスを洗浄した。

1.4×SSCに移し、激しく10分間振盪。

2.4×SSC+0.1%TritonX-100、激しく10分間振盪。

3.4×SSCで、激しく10分間振盪。

4.2×SSCで、軽くリンス。

直ぐにDAPI溶液50μlを滴下し、続いて蛍光退色を防ぐためPPD溶液を20μl滴下してカバーグラスをかぶせ、4℃で30分放置(FISH実験プロトコル参照)した。(DAPI溶液:DAPI100μg、DABCO 1.0g、PBS(-)10mlを溶解し、90mlのグリセロールと混和; PPD溶液:PPD(和光)100mg、PBS(-)10mlを溶解しグリセロールを加え総容量100mlとした)

(7).蛍光顕微鏡による観察:

ツァイスの蛍光顕微鏡(AXIOPLAN)を用いた。IP Lab3.2.4アプリケーションを立ち上げ、UVフィルター、FITC専用フィルターで、パキテン中期からパキテン後期特有の染色体核板を低倍率で探した。その中から、赤のシグナル(コスミドクローン、ΔK)

と緑のシグナル（BAC クローン B516）が近くに存在するものを、 $63 \times 10 \times 1.6$ 倍で拡大し、IP Lab3.2.4 アプリケーションを使って UV フィルター、FITC 専用フィルター、Cy3 専用フィルターを用いた 3 色のデジタル写真を撮り PICT で保存した(図 11)。

(8).プロット：

パキテン中期とパキテン後期の染色体の中で、赤のシグナルと緑のシグナルが近くに存在する試料を選び、Photoshop5.0 アプリケーションによって FISH のシグナルと SC コアのシグナルとの間の最短距離を計測した。ここで、最短距離とは、プローブのシグナルから SC コアの線分に対して垂直に降ろした線分が SC コア中央部に交叉するまでの長さである。この距離は、Photoshop5.0 における画面上の情報ウィンドウに表示される絶対値から算出した。0.01mm オブジェクティブマイクロメーター(OLYMPUS)の目盛りを、同様の方法でデジタル画面に取り込み計算したところ、絶対値 1 が $1.7\mu\text{m}$ に相当することがわかった。ホットスポットのシグナルとコールドリージョンのシグナルの距離を統計解析用ソフト (KaleidaGraph) を用いて解析した。同じアプリケーションを用いて、累積ヒストグラムを作成した。

(1).MHC 特異的プローブの検定：

Δk は、C57BL/10J マウス系統の体細胞の分裂中期核の第 17 染色体上の MHC 領域以外にハイブリダイズしないこと、また、いずれのプローブもマウス MHC 領域が存在する 17 番染色体以外の染色体にはシグナルが観察されないことからユニークなプローブであることを確認した(図 10)。まず、最初にホットスポットを含む DNA 断片であるコスミドクローン ΔK と、そのコントロールとして組換えを起こさない領域の BAC クローン B516 を用いてパキテン期の染色体 DNA とハイブリダイズした (図 11)。

(2).SC における BAC クローン B516 の位置の決定：

次に、MHC クラス II 領域に存在する長さが既知の BAC クローン DNA をプローブに用いて、パキテン期染色体上でのシグナルの物理距離と、塩基対数の関係について調べた。*Lmp2* ホットスポットに高頻度で組換えを誘発する(C57BL/10J x B10.A(R209))F1 マウスの精巣から調製した減数分裂期細胞核を 150kb 長の BAC クローン B516 (図 9) を用いて、ハイブリダイゼーションを行った。次に Photoshop5.0 アプリケーションプログラムを用いてモニター画面上で BAC クローン B516DNA をプローブとして得られる連続したシグナルの長さを計測した(材料と方法参照)。その長さの最大値(4.59)、平均値(2.19)、中央値(2.02)から長さを算出すると、1kb あたり、最大値は 52nm、平均値は 25nm、中央値は 23nm となった。また、マウス第 17 染色体の SC の長軸方向の長さを算定すると、平均値が 5.7μm となった(表 2)。一方、SC コアからループ上にある BAC クローン B516 の塩基対数を調べるため、SC コアの中央から BAC クローン B516 シグナルまでの距離の最大値を算出した。まず、BAC クローン B516 の長さの実測値と塩基対数の関係を、DNA プローブのシグナルと SC コアの中央部との間の長さ、それらの最大値(5.83)、平均値(1.25)、中央値(1.01)を基準として、SC コアの中央部から一番遠いところにある BAC クローン B516 シグナルの距離を塩基対数に換算した。その結果 150kb の BAC クローン B516 は、最も遠いものでも 250kb から 400kb の間に位置する結果を得た。以上の結果から、BAC クローン B516 を含む MHC 領域は、SC のループ上に存在することが示唆された。

(3).SC コアに対するホットスポットのシグナルとコールド領域のシグナルの空間的配置：

(C57BL/10J x B10.A(R209))F1 マウスの精巣から調製したパキテン期の核の中から、SC コアにある蛋白質に対する抗体により SC コアを染色し、プローブ ΔK と BAC クローン B516 のシグナルが互いに近いものを選んだ(図 11)。この SC コアとそれぞれの FISH のシグナルとの最短距離を Photoshop5.0 アプリケーションプログラムを用いてモニター画面上で計測した。この計測をおこなう際に、ホットスポットを含むプローブ ΔK のシグナルがないものは測定する試料から除いた。プローブ ΔK のシグナルの数は、最小値が 1、最大値が 4、平均値が 2.3 となった(表 3)。また、マウス *cot-1* DNA 断片により繰り返し配列をマスクした BAC クローン B516 プローブのシグナルを数えた。その結果、最小値が 8、最大値が 58、平均値が 27.5、標準偏差が 12.2 となった。25kb の Δk プローブのシグナル数の平均を 2.3 として、150kb の BAC クローン B516 のシグナル数を単純に計算すると 6 から 12 のシグナルが観察されるはずである。しかし、実際は、それより多いシグナル数が観察された。この原因として、*cot-1* によってマスクされた BAC クローン B516 クローン中にある繰り返し配列が FISH シグナルを不均一に分断している事が考えられる。

次に、両 DNA プローブで得られた FISH シグナルと、SC コア中央部との最短距離を比較した。コールドリージョンに対応する BAC クローン B516 DNA のシグナルと、ホットスポットを含むプローブ ΔK でのシグナルを用いて得られた値を累積ヒストグラムで示したものが図 12 にまとめてある。BAC クローン B516 のシグナルは、最小値が $0\mu\text{m}$ で、最大値は $9.9\mu\text{m}$ であった。また、平均値は $2.1\mu\text{m}$ 、中央値が $1.7\mu\text{m}$ 、標準偏差が $1.9\mu\text{m}$ であった。これに対し、 ΔK のシグナルと、SC コアとの最短距離は、最小値が $0\mu\text{m}$ 、最大値が $8.7\mu\text{m}$ 、平均値が $1.6\mu\text{m}$ 、中央値が $1.1\mu\text{m}$ 、標準偏差が $1.4\mu\text{m}$ であった(表 3)。 Δk と BAC クローン B516 のシグナルと SC コア間の距離の平均値(1.25 と 0.93)に対して t 検定を行ったところ、 Δk シグナルと SC コア間の距離の平均値が BAC クローン B516 シグナルと SC コア間の距離の平均値より有意 ($P < 0.05$) に小さいことがわかった。さらに、この距離の分散について F 検定を行ったところ、ホットスポット Δk に対するシグナルと SC コアまでの距離の分散がコールドリージョン BAC クローン B516 のシグナルと SC コア間の距離の分散よりもより有意 ($P < 0.005$) に小さいことが分かった(表 4)。以上の結果は、ホットスポット *Lmp2* がクロマチンループ上に存在するのではなく、SC コアに含まれるかそれに非常に近い位置にあることを示した。

パキテン期において、SC コアからループアウトしている DNA 分子の長さ (SC コアからクロマチンループが一番離れている所までの距離)は、マウスやラットの場合、平均値が $3\mu\text{m}$ と算定されている (Moens and Pearlman 1989)。また、テロメア近傍のクロマチンループの長さは、その他の領域に比べ 2-3 倍短い、他の領域に関しては、およそ同じ距離であると報告されている (Heng et al. 1994)。本研究の結果では、マウス MHC 領域の SC コアからループアウトしている DNA の平均の長さは、約 $2\mu\text{m}$ と計算された。また、他の研究グループから、17 番染色体の SC コアの長軸方向の長さは平均 $6.3\mu\text{m}$ であり、標準偏差は $0.7\mu\text{m}$ と報告されている (Anderson LK, 1999)。これに対し、本研究で得られたその長さは、平均値が $5.7\mu\text{m}$ であった。これらのデータを比較すると、今回の実験で得られた SC コアのサイズや SC コアからのクロマチンループなどの長さが、従来の研究報告とほぼ一致している事が分かる。

Lmp2 ホットスポットとコールドリージョンに対応する DNA プローブで得られた FISH シグナルと SC コアとの間の距離は、ホットスポットがコールドリージョンに比較して SC コアにより近い位置に存在することを示した。ここで注目すべき点は、SC コアまでの距離の平均値について行った t 検定に加えて、距離の分散について F 検定を行った結果である。そのホットスポットと SC コアの間の距離の分散が、コールドリージョンからの距離の分散より有意 ($P < 0.005$) に小さいことを示した (表 4)。これらの結果は、パキテン期の核の調製の際に DNA ループが SC コアの周りを自由回転したとしても、*Lmp2* ホットスポットのシグナルが、常に SC コアに対してより近い距離に位置しているために、その分散の値が小さくなるという考えと矛盾しない。今回の研究では、*Lmp2* ホットスポットで組換えを高発する B10.A(R209)系統を含む単一のマウスの交配から得られた雄の減数分裂パキテン期細胞を用いて実験を行った。他のホットスポットで組換えを起こす MHC ハプロタイプを持つ系統を用いたマウスの交配においても、同様にホットスポット部位が、それ以外の DNA 領域より SC コアの近くに位置するかを今後調べる必要がある。本研究は、少なくともマウス減数分裂において、SC コアに対しホットスポットのシグナルが、DNA ループ上にランダムに配置するのではなく、ある特定の位置に配置している事を示した。これに関連して、マウス染色体に PBR322 などの微生物由来の外来 DNA を遺伝子導入した場合、その DNA がほとんど常にクロマチンループ上に配置するという報告がある (Heng et al. 1994)。この事実も、マウス減数分裂期の SC に位置する DNA 領域が、ランダムに配置しない事を示唆している。

従来から、SC が形成される前に、相同染色体のトランジェントな対合がタマネギ (*Allium cepa*) や出芽酵母の減数分裂期で観察されている。(Albini and Jones 1987; Kleckner and Weiner 1993)。このようなきわめて動的な DNA の対合や解離が、SC 形成以前に起こることは、染色体が凝集していく過程での DNA のもつれを解くのに役立っていると考えられる。つまり、この時期のトランジェントな染色体の対合や解離の繰り返しは、相同染色体が複数の部位で最終的に正しく対合を始めていく為にも必要であると考えられる(Roeder, 1997)。最近になり、ショウジョウバエの減数分裂期染色体における種々の DNA プローブを用いた FISH の解析は、相同染色体の対合を開始するサイトが数多くあることを示している(Weiner and Kleckner 1994)。それによると、減数分裂初期の染色体は、多くの相同領域で対合しているが、ある特定領域に注目すると、その領域が対合を開始した時に、そこから 150kb 離れた領域では、対合が起こっていないことを示した。出芽酵母では、この相同染色体の対合が起こるサイトが、全染色体上でおおよそ 190 ヲ所あると言われている(Weiner and Kleckner 1994)。つまり、約 65kb に 1 ヲ所の割合で染色体対合サイトが存在するという計算になる。一方、組換えは全染色体当たりおおよそ 260 ヲ所で起こり、平均して 82kb に 1 ヲ所の割合である。この染色体対合サイト数と組換え数が良く対応している事 (Weiner and Kleckner 1994; Kleckner 1996) は、染色体対合サイトが、最終的に組換え部位を決定する可能性があることを示唆している。また、マウス、ヒト、ユリなどにおいて、ザイゴテン期からパキテン期にかけて、大腸菌の相同組換えの相同領域の認識に働く RecA ホモログである Rad51 蛋白が SC コア上に局在する事実 (Ikeya et al, 1996)、さらに、組換え関連蛋白質の複合体であるリコンビネーションノジュールが SC コア上に局在しているという報告 (Plug AW et al, 1998) は、染色体対合サイトが SC コア上の組換え部位に移行する可能性を支持している。

以上の考察から、マウス MHC クラス II 領域内の組換えホットスポットの位置を決定している要因として、ホットスポットが相同染色体間の相同部位の検索に重要な働きをしており、言い換えると、染色体対合の特異部位として機能し、その部位がそのまま SC コア上に移行して最終的に組換え部位を決定するという魅力的なモデルを考えることができる。近年の分子遺伝学的研究は、出芽酵母と分裂酵母や、ショウジョウバエ、線虫の減数分裂期における SC 形成の過程が異なることを示した。例えば、ショウジョウバエでは、組換えの開始反応に出現すると考えられている DNA 二重鎖切断(DSBs) が相同染色体の対合の開始に使われておらず、組換え遺伝子の欠損であっても染色体対合や染色体分離が正常に進行するという報告がある (Haber JE, 1998)。このことは、高等真核

生物のいくつかのものでは、染色体上の特定の DNA 領域が、相同染色体の対合のランドマークになっていて、それがホットスポットの位置決定要因になる可能性があることを示している。もし、このような相同性検索のシステムが、マウスの減数分裂期の相同染色体組換えにも当てはまり、その過程でホットスポット部位が相同性検索のランドマークに利用されているとするならば、近傍の遺伝子に対する組換え部位の相対的位置や、組換え部位の分布が出芽酵母とマウス MHC クラス II 領域内のホットスポットで異なることも説明可能である。

もし、SC コア上で組換え反応が起こっているとするならば、ホットスポットは全て SC コア構造上に配置すべきである。しかし、本研究の結果をみると、ホットスポットは、確かに統計学上はコールドリージョンに比べて有意に SC コア構造上に位置するが、ホットスポットのシグナルが SC コア構造から少し離れて配置しているものもある。この理由は、まず、パキテン期において、SC コアに対して DNA ループが移動する可能性が考えられる。即ち、ホットスポットが SC コア上に来たときに組換え反応が生じたとしても、次ぎの瞬間、組換え部位が SC コアから移動してし、ホットスポットは最終的に SC コアから離れて位置する可能性である。しかし、前述のように、マウス染色体に外来 DNA を遺伝子導入したとき、その DNA 領域が SC コア上に来ないという報告や、DNA ループの大きさが染色体部位に依存して一定しているという観察結果 (Heng et al. 1994; 1996) は、少なくともパキテン期のホットスポット領域を含む DNA ループが SC コア上を大きく移動していると考えるのは、多少無理がある様に思える。次に、DNA ループと SC コアを構成している蛋白質との結合が、実験で用いた表面張力展開法 (サーフェイス・スプレッディング法) によって離脱してしまい、一部の DNA 断片が SC コアから離れて位置する可能性がある。表面張力展開法を用いた FISH と抗体染色による今回の実験法は、低調処理、界面活性剤及び熱処理などの過酷な条件下にサンプルをさらすことが避けられないが (方法参照)、Heng らは、全く同様な方法で SC の様々な位置の SC コア構造と DNA ループ構造を観察しており、SC の DNA ループ構造は、この方法によって大きく変わることがないことを示している (Heng et al. 1996)。しかし、実験操作によって、ある DNA 領域が SC コア構造上から離れる可能性は、彼女らのデータからは否定できない。

いずれにしても、ホットスポット領域が相同染色体の対合のランドマークになっていることを直接的に証明することが、今後の重要な課題である。

真核生物において、減数分裂期組換えのホットスポットの位置の決定とその役割がほぼ明らかにされているのは出芽酵母だけである。哺乳動物であるマウスの MHC クラス II 領域にホットスポットが 4 カ所見いだされてからすでに 15 年近くが経過した。しかし、その位置を決定している分子の基盤は未だに明らかにされていない。マウスのホットスポットの部位特異性の原因解明に必要なことは、より多くの情報と新しい実験手法の活用である。近年やっとその両方が揃ってきた。そこで、本研究では、マウス MHC クラス II 領域に見いだされているホットスポットの位置を決定し、ホットスポットが出芽酵母で言われるような組換えの開始反応に関わっているか、それ以外の因子が関わっているのか調べた。この問題の解析を通して高等真核生物における相同染色体間組換え機構を明らかにする糸口が得られると考えたからである。

その最初のステップとして、第 1 章においてマウス MHC クラス II 領域内で唯一分子レベルでの研究が遅れていた *Pb* ホットスポットの位置を DNA 上に決定した。さらに、*Pb* ホットスポットを含む、合計 4 カ所の全てのホットスポット部位の一次塩基配列の比較を行った。減数分裂期組換えのホットスポットの研究が最も進んでいる出芽酵母の場合、ホットスポットは、遺伝子の 5' 側に存在する。また、組換え頻度は、遺伝子の 5' 側から 3' 側に行くに従って徐々に低下する傾向にある (Detroff et al. 1992)。これに対して、マウス MHC クラス II 領域内のホットスポットは、遺伝子の 5' 側に来ることはことなく、イントロン内か若しくは遺伝子の 3' 側に位置することがわかった。また、ホットスポット内の組換え部位の分布の解析は、組換え点がホットスポットの中心から両端に向かって対称的にその頻度が低下することが分かった (図 4)。これらの結果により、マウス MHC クラス II ホットスポットは、出芽酵母のホットスポットと比べた時、遺伝子との相対的な位置やホットスポット内の組換え部位の分布などの点で異なる事がわかった。

次に DNA データベース上に登録されたマウス MHC クラス II 全領域の塩基配列情報を基にホットスポットの塩基配列に対して詳細な解析を行った。この結果、4 カ所全てのホットスポット部位に、オクタマー転写因子結合配列、B モチーフ様配列、TCTG あるいは CCTG の 4 塩基からなる繰り返し配列の存在を見いだした。これらの個々のモチーフは、MHC クラス II 領域に頻繁に出現するが、これらが一定の短い DNA 断片中に出現する頻度は、ホットスポット部位において高くなっていた。また、他のグループの研究によって、*Eb* ホットスポットではこれらモチーフが存在する DNA 断片に細胞核抽出液

中に存在するある種の蛋白質が特異的に結合することが報告されている (Shenkar et al. 1992)。したがって、*Eb* ホットスポットには、生体内においても何らかの蛋白質が結合する可能性がある。

減数分裂期においては、染色体は特異的な構造体であるシナプトネマ複合体 (SC) を作りながら、相同染色体間の相同領域の検索、対合、染色体分離を起こす。以前から、組換えに直接関係している蛋白質や蛋白質複合体が SC コア上に局在すること、マウスの DNA に原核生物の DNA を外から導入したところ、その外来 DNA が決して SC コアには位置しないことが報告されていた (Heng et al. 1994)。これらの知見から、SC コア上にはユニークな DNA 配列が局在し、その特異点で相同検索や染色体対合が起こり、次に DNA 交換反応へと進行すると考えられた。したがって、減数分裂期組換えのホットスポットは、SC コア上に局在して組換え部位の特異性を決定している可能性が考えられた。そこで、第2章では、ホットスポットと減数分裂期染色体の高次構造である SC 上における空間的配置について細胞遺伝学的解析を行った。FISH と抗 SC 抗体染色を用いた二重染色法による解析結果は、*Lmp2* ホットスポット領域が、その近傍に位置するコールドリージョンに比較して SC コアに対してより近位に分布していることが示された。

以上の研究結果を総合すると、マウス MHC クラス II 領域内の組換えのホットスポットは、出芽酵母の実験系で明らかになってきたような遺伝子の DSBs 形成を含む組換え反応の特異性に依存しているのではなく、父母双方からの相同染色体が対合する減数分裂パキテン期に特異的な SC 構造に依存している可能性が高いと考えられる。このことから、図 13 に示すようなモデルを提唱したい。減数分裂初期のマウスの相同染色体対合において、オクタマー転写因子結合配列、B モチーフ様配列、TCTG あるいは CCTG の 4 塩基からなる繰り返し配列などが特定の蛋白質を介して相同染色体上の相同領域の検索に使われる。当初、その対合サイトは Axial element 上に存在し、パキテン期には SC コア上に配置するようになる。これらの部位は潜在的に組換え部位となる可能性を持っている。その幾つかに RAD51 などの組換え特異的蛋白質が結合しリコンビネーションノジュールが形成されることによって組換え反応が開始される。この相同性検索に使われる対合サイトが MHC クラス II 領域内のホットスポットとなっている。ホットスポット内における組換え部位の分布は、組換えの終結反応であるホリデージャンクション (Holliday junctions) の分岐点移動がある範囲内に分散して生ずるためと考えられる。全ての MHC クラス II ホットスポット領域が、*Lmp2* ホットスポットと同じように SC コア構造上の近くに配置するかどうかについては、他のホットスポット領域のデータが必要

であり今後に残された課題である。また、マウスの MHC ハプロタイプに依存して組換えホットスポットの位置が異なることが、MHC 領域内組換えの特徴の一つであるが、この点に関しては、本研究で見いだしたモチーフとは別の因子が各 MHC ハプロタイプ特異的に働いていると考えられ今後の研究が必要である。このモデルの検証のためには、他のホットスポットを含めた細胞遺伝学的研究とモチーフにどのような蛋白質群が結合するのかを明らかにするためにの生化学的研究を押し進めなければならない。

謝辞

本研究を進める上で、有益な指導と助言を与えて下さった国立遺伝学研究所教授城石俊彦博士に深く感謝の意を表します。実験の技法及び、適切な指導と助言を与えて下さった国立遺伝学研究所教授小川智子博士、同教授五條堀孝博士、北海道大学教授松田洋一博士、理化学研究所ゲノム科学総合研究センター研究員吉野正康博士、理化学研究所基礎科学特別研究員水野健一博士、Western Australia 大学 Silvana Gaudieri 博士に深く感謝の意を表します。また DNA プローブおよび、ゲノム DNA サンプル、抗体を分与して下さい下さった、Hoffman La Roche (社) 中央研究所の Steinmetz M. 博士、Texas 大学 Fischer Lindahl K. 博士、York 大学 Moens P.B. 博士に謝意を表します。マウス系統維持に協力して下さい下さった国立遺伝学研究所系統生物研究センターのマウス飼育舎の方々、有益な議論をして下さった国立遺伝学研究所哺乳動物遺伝研究室、同細胞遺伝研究室、同微生物遺伝研究室の御理解と御協力に深く感謝いたします。

文献

Albini, S.M. and G.H. Jones. 1987. Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum*. I. The initiation and sequence of pairing. *Chromosoma* **95**; 324–338.

Anderson DG, Churchill JJ, Kowalczykowski SC. 1997. Chi-activated RecBCD enzyme possesses 5'→3' nucleolytic activity, but RecBC enzyme does not: evidence suggesting that the alteration induced by Chi is not simply ejection of the RecD subunit. *Genes Cells* **2**; 117-128

Anderson LK, Reeves A, Webb LM, Ashley T. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* **151**;1569-1579.

Bryda EC, DePari JA, Sant'Angelo DB, Murphy DB, Passmore HC. 1992. Multiple sites of crossing over within the *Eb* recombinational hotspot in the mouse. *Mamm Genome* **2**;123-129.

Cao L, Alani E, Kleckner N. 1990. A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* **61**; 1089-1101

Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. 1998. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature*. **391**;410-413.

Detloff P, White MA, Petes TD. 1992. Analysis of a gene conversion gradient at the HIS4 locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **32**; 113-23

de Vries SS, Baart EB, Dekker M, Siezen A, de Rooij DG, de Boer P, te Riele H. 1999. Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev.* **13**; 523-531.

Eggleston AK, West SC. 1997. Recombination initiation: easy as A, B, C, D... chi? *Curr.*

Biol. **7**; 745-749.

Gross DS, Garrard WT. 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **57**; 159-197.

Haber JE. 1998. Meiosis. Searching for a partner. *Science* **279**; 823-824.

Heinlein UA, Lange-Sablitzky R, Schaal H, Wille W. 1986. Molecular characterization of the MT-family of dispersed middle-repetitive DNA in rodent genomes. *Nucleic Acids Res* **26**; 6403-6416.

Heng, H.H.Q., L.-C. Tsui, and P.B. Moens. 1994. Organization of heterologous DNA inserts on the mouse meiotic chromosome core. *Chromosoma* **103**; 401-407.

Heng HH, Chamberlain JW, Shi XM, Spyropoulos B, Tsui LC, Moens PB. 1996. Regulation of meiotic chromatin loop size by chromosomal position. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**; 2795-2800.

Heng HH, Tsui LC, Moens PB. 1994. Organization of heterologous DNA inserts on the mouse meiotic chromosome core. *Chromosoma* **103**;401-407

Ikeya T, Shinohara A, Sato S, Tabata S, Ogawa T. 1996. Localization of mouse Rad51 and Lim15 proteins on meiotic chromosomes at late stages of prophase 1. *Genes Cells* **1**; 379-389.

Khambata S, Mody J, Modzelewski A, Heine D, Passmore HC. 1996. Ea recombinational hot spot in the mouse major histocompatibility complex maps to the fourth intron of the *Ea gene*. *Genome Res.* **6**; 195-201.

Kleckner N, Weiner BM. 1993. Potential advantages of unstable interactions for pairing of chromosomes in meiotic, somatic, and premeiotic cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **58**; 553-565.

- Ling X, Shenkar R, Sakai D, Arnheim N. 1993. The mouse *Eb* meiotic recombination hotspot contains a tissue-specific transcriptional enhancer. *Immunogenetics*. **37**; 331-336.
- Maeda H, Araki K, Kitamura D, Wang J, Watanabe T. 1987. Nuclear factors binding to the human immunoglobulin heavy-chain gene enhancer. *Nucleic Acids Res.* **15**; 2851-3369.
- Maguire MP. 1986. The pattern of pairing that is effective for crossing over in complex B-A chromosome rearrangements in maize. III. Possible evidence for pairing centers. *Chromosoma* **94**; 71-85.
- McKee, B.D. 1996. The license to pair: Identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. *Chromosoma* **105**; 135-141.
- McKim KS, Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, Chin G, Steinberg C, Khodosh R, Hawley RS. 1998. Meiotic synapsis in the absence of recombination. *science* **279**; 876-878.
- Mizuno K, Koide T, Sagai T, Moriwaki K, Shiroishi T. 1996. Molecular analysis of a recombinational hotspot adjacent to *Lmp2* gene in the mouse MHC: fine location and chromatin structure. *Mamm. Genome* **7**; 490-496.
- Mizuno K, Emura Y, Baur M, Kohli J, Ohta K, Shibata T. 1997. The meiotic recombination hot spot created by the single-base substitution ade6-M26 results in remodeling of chromatin structure in fission yeast. *Genes Dev.* **11**; 876-886.
- Moens, P.B. and R.E. Pearlman. 1988. Chromatin organization at meiosis. *BioEssays* **9**; 151–153.
- Moens, P. B. & Pearlman, R. E. 1989. Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids. *Chromosoma*. **98**; 287-294.

Moens PB, Pearlman RE. 1990. Telomere and centromere DNA are associated with the cores of meiotic prophase chromosomes. *Chromosoma* **100**; 8-14.

Moens PB, Spyropoulos B. 1995. Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. *Chromosoma*. **104**;175-182.

Nicolas A, Treco D, Schultes NP, Szostak JW. 1989. An initiation site for meiotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **338**; 35-39.

Ohta K, Nicolas A, Furuse M, Nabetani A, Ogawa H, Shibata T. 1998. Mutations in the MRE11, RAD50, XRS2, and MRE2 genes alter chromatin configuration at meiotic DNA double-stranded break sites in premeiotic and meiotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**; 646-651

Pearlman RE, Tsao N, Moens PB. 1992. Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)_n and LINE/SINE sequences. *Genetics* **130**; 865-872.

Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T. 1998. Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J. Cell Sci*; 111; 413-423.

Ren X, Eisenhour L, Hong C, Lee Y, McKee BD. 1997 Roles of rDNA spacer and transcription unit-sequences in X-Y meiotic chromosome pairing in *Drosophila melanogaster* males. *Chromosoma* **106**;29-36

Roeder GS. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* **15**; 2600-2621.

Rowen, L., Qin, S., Madan ,A., Loretz, C., James, R., Dors, M., Mix, L., Hall, J., Lasky, S. and Hood, L. Unpublished. Sequence of the mouse major histocompatibility locus class II region.

Schopfer R, Figueroa F, Nizetic D, Nevo E, Klein J. 1987. Evolutionary diversification of class II P loci in the Mhc of the mole-rat *Spalax ehrenbergi*. *Mol. Biol. Evol.* **4**; 287-299.

Schultes NP, Szostak JW. 1991 A poly(dA.dT) tract is a component of the recombination initiation site at the ARG4 locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **11**; 322-328.

Shenkar R, Shen MH, Arnheim N. 1991. DNase I-hypersensitive sites and transcription factor-binding motifs within the mouse E beta meiotic recombination hot spot. *Mol. Cell Biol.* **11**; 1813-1819.

Shiroishi T, Hanzawa N, Sagai T, Ishiura M, Gojobori T, Steinmetz M, Moriwaki K. 1990. Recombinational hotspot specific to female meiosis in the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **31**; 79-88.

Shiroishi T, Sagai T, Hanzawa N, Gotoh H, Moriwaki K. 1991. Genetic control of sex-dependent meiotic recombination in the major histocompatibility complex of the mouse. *EMBO J* **10**; 681-686

Shiroishi T, Sagai T, Moriwaki K. 1993. Hotspots of meiotic recombination in the mouse major histocompatibility complex. *Genetica* **88**; 187-196.

Snoek M, Teuscher C, van Vugt H. 1998. Molecular analysis of the major MHC recombinational hot spot located within the G7c gene of the murine class III region that is involved in disease susceptibility. *Immunol.* **160**; 266-272.

Sonnhammer, E.L.L., and R. Durbin. 1996. A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. *Gene* **167**; 1-10.

Steinmetz M, Minard K, Horvath S, McNicholas J, Srelinger J, Wake C, Long E, Mach B, Hood L. 1982. A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature* **300**; 35-42

- Steinmetz M, Malissen M, Hood L, Orn A, Maki RA, Dastoornikoo GR, Stephan D, Gibb E, Romaniuk R. 1984. Tracts of high or low sequence divergence in the mouse major histocompatibility complex. *EMBO. J.* **3**; 2995-3003.
- Steinmetz M, Stephan D, Fischer Lindahl K. 1986. Gene organization and recombinational hotspots in the murine major histocompatibility complex. *Cell* **44**; 895-904.
- Sun H, Treco D, Schultes NP, Szostak JW. 1989. Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* **338**; 87-90
- Wahls WP, Smith GR. 1994. A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev* **15**; 1693-1702
- Weiner BM, Kleckner N. 1994. Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* **77**; 977-991.
- Widera G, Flavell RA. 1985. The I region of the C57BL/10 mouse; characterization and physical linkage to H-2K of an SB beta-like class II pseudogene, psi A beta 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**; 5500-5504.
- Yoshino M, Sagai T, Lindahl KF, Toyoda Y, Shiroishi T, Moriwaki K. 1994. No dosage effect of recombinational hotspot in the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **39**; 381-389.
- Yoshino M, Sagai T, Lindahl KF, Toyoda Y, Moriwaki K, Shiroishi T. 1995. Allele-dependent recombination frequency: homology requirement in meiotic recombination at the hot spot in the mouse major histocompatibility complex. *Genomics* **27**; 298-305.
- Yoshino M, Sagai T, Moriwaki K, Shiroishi T. 1996. Meiotic recombination at the *Lmp2*

hotspot tolerates minor sequence divergence between homologous chromosomes. *Immunogenetics* **43**; 80-82.

Zabel U, Schreck R, Baeuerle PA 1991 DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity, Zn²⁺ dependence, and differential half-site recognition. *Biol Chem* **266**; 252-60

Zahn-Zabal M, Lehmann E, Kohli J. 1995. Hot spots of recombination in fission yeast: inactivation of the M26 hot spot by deletion of the ade6 promoter and the novel hotspot ura4-aim. *Genetics* **140**; 469-78

Zimmerer EJ, Passmore HC. 1991. Structural and genetic properties of the *Eb* recombinational hotspot in the mouse. *Immunogenetics* **33**; 132-140.

*In situ hybridization protocols / edited by K. H. Andy Choo.

Totowa, NJ : Humana Press, c Methods in molecular biology / John M. Walker, series editor ; 33)

NOTE: Includes bibliographical references and index

AL: Choo, K. H. Andy

SH: In situ hybridization -- Laboratory manuals (surface _spreading 法のオリジナル)
131-139

*FISH 実験プロトコール.1994.ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで、東京：秀潤社, 8 (細胞工学 ; ; 別冊. 実験プロトコールシリーズ) 注記: 監修:松原謙一 吉川寛

表1 組換えホットスポットに、O、Bモチーフ及び4塩基繰返し配列が出現する相対頻度
(ホットスポットに出現する頻度/ MHCクラスII領域に出現する頻度)

O-B間の距離 (bp)	典型的なBモチーフ配列		典型的なBモチーフからはずれた配列	
	<i>Pb</i> 、 <i>Ea</i> を含まない		<i>Lmp2</i> 、 <i>Eb</i> 、 <i>Ea</i>	全てのクラスII
	GGGRNYYYCC	GGGA[CTG]YYYCC	ホットスポット	ホットスポットを含む
0-200	2/4	2/3	3/3	4/9
0-300	2/8	2/5	3/6	4/14
0-400	2/8	2/5	3/6	4/18

全てOBモチーフには1200bp以内に4塩基繰返し配列がふくまれている。

[]内はどのヌクレオチドを選んでも良い

表2 シナプトネマルコンプレックスにおける
BACクローン516DNA断片及びSC coreの長さ

BACクローン516DNA断片の長さ		17番染色体のSC coreの長さ	
最小	0.67	最小	1.57
最大	4.59	最大	5.65
合計	28.47	合計	50.6
平均	2.19	平均	3.37
中央値	2.02	中央値	2.98
標準偏差	1.03	標準偏差	1.14

SCコア中央部とFISHシグナルとの距離、BACクローン516の長さ及び17番染色体のSCの長軸方向の長さは、全て、photoshop5.0画面上の絶対的距離によって測られた数値である（方法参照）。

表3 SC coreに対するDNA probe シグナルとの距離と、DNA probeシグナルの数

	SC coreとDNA probeシグナルとの距離		DNA probe シグナルの数	
	BAC516	ΔK	BAC516	ΔK
最小	0	0	8	1
最大	5.83	5.14	58	4
合計	581.01	80.17	467	35
平均	1.25	0.93	27.5	2.3
中央値	1.0	0.65	25	2
標準偏差	1.09	0.85	12.2	1.2

表4 SCコアに対するDNAプローブシグナルの距離の統計

	度数	平均値	分散	標準偏差	標準誤差
BAC516	464	1.252	1.187	1.089	.051
Δk	86	.932	.718	.847	.091

これら2つの距離に関して、仮説平均値の差= 0とし、対応のないt検定（対応なし）を行った結果：平均値の差は0.320、自由度は548、t値は2.582、p値は、.0101となった。また、これら2つの分散に対し仮説分散比= 1としF検定を行った結果：分散比は1.653、分子自由度は463、F値は1.653。P値は0.0032となった。

図1

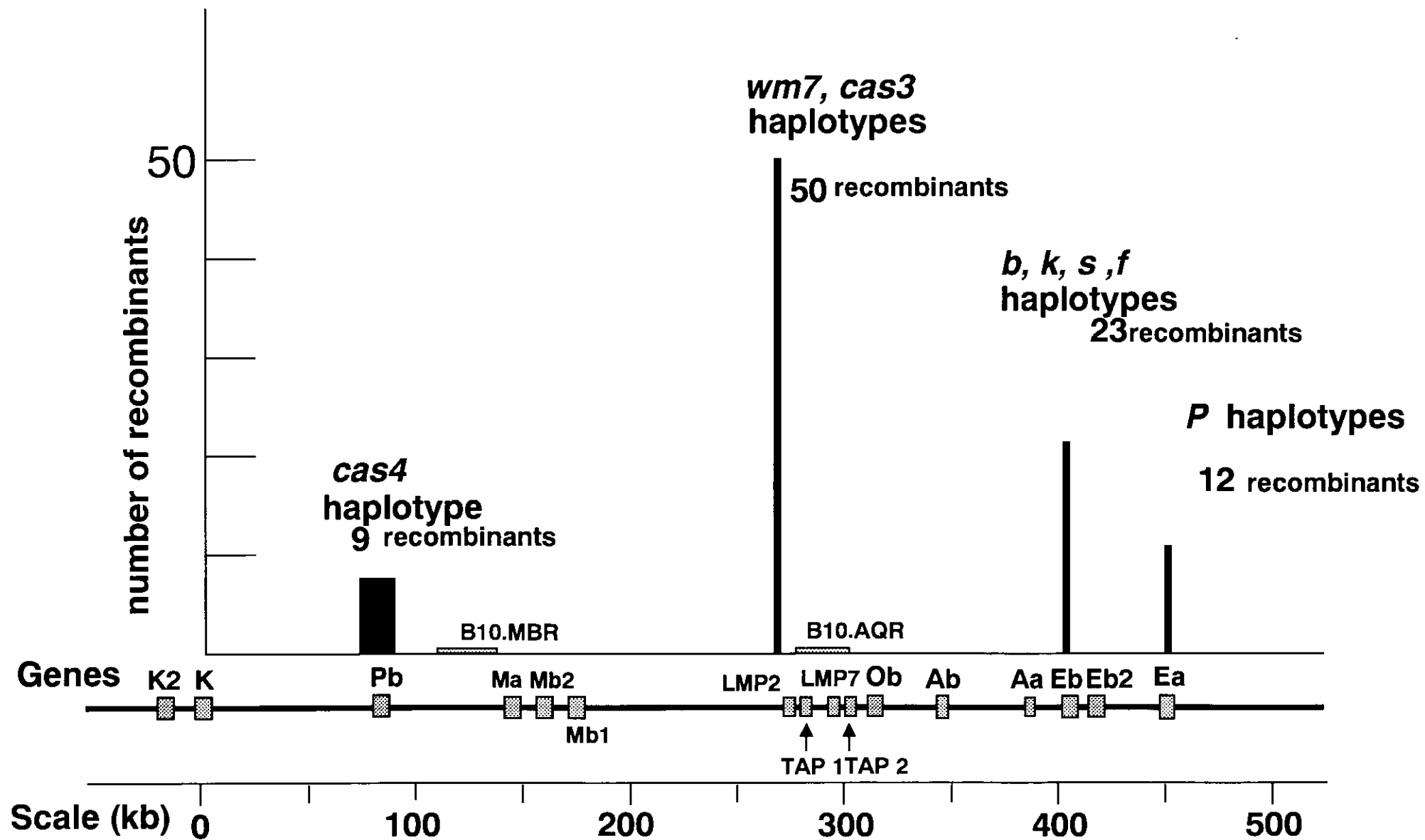


図1 MHC クラスII領域における4カ所の組換えのホットスポット。

縦軸にそれぞれのホットスポットでの組換え個体数を示す。横軸上の灰色の長方形は、左から右方向にセントロメアからテロメアに向かってのMHCクラスII領域における遺伝子を示している。各バーの横軸上での長さがホットスポットの長さに対応する。4カ所のホットスポットは、縦軸方向に黒いバーで示してあり各ホットスポットでの組換えを誘発するMHCハプロタイプを記した(本文参照)。また、バーの横に書いた数字は、組換え個体数である。

図2

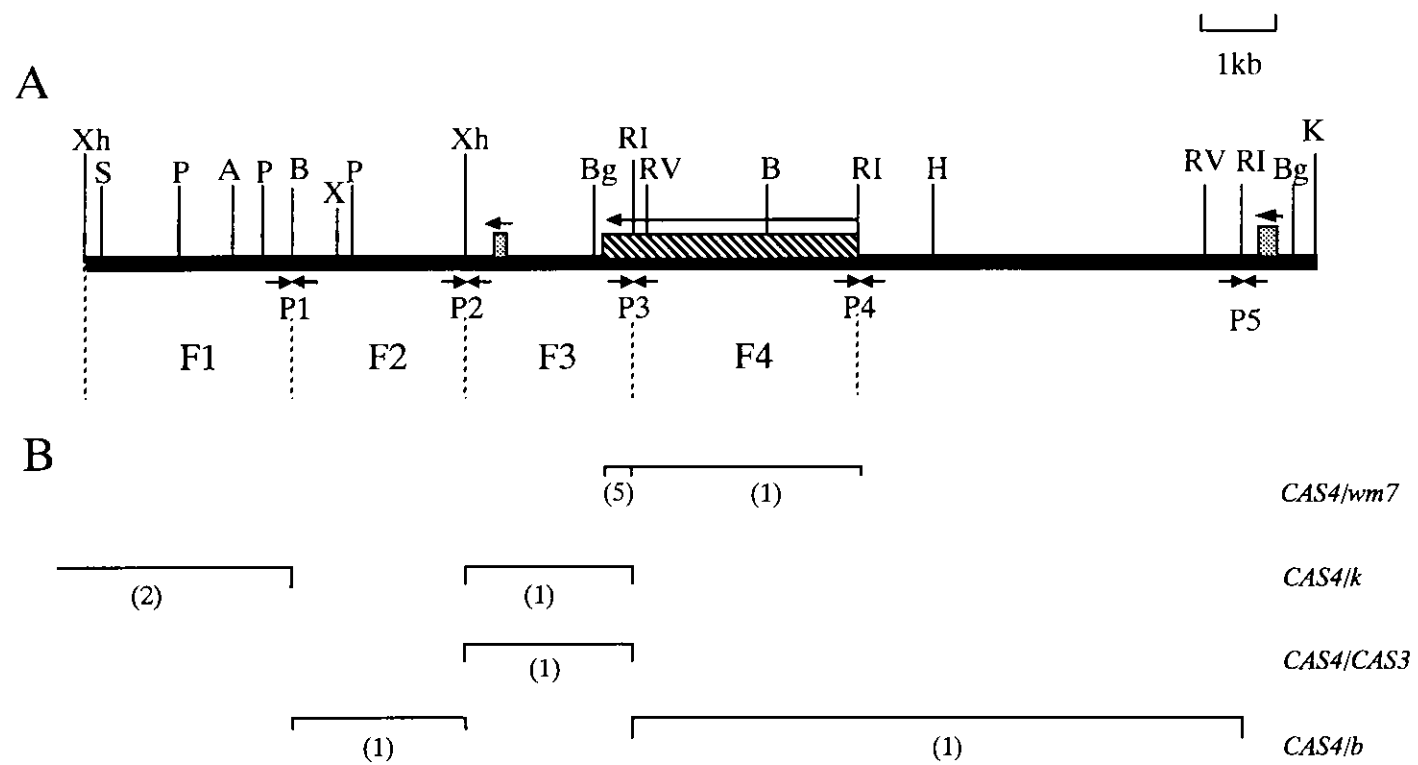


図2 *Pb* 遺伝子近傍の組換え部位とその分子マッピングに用いたプライマーペア。

太い水平線は 15kb のコスミドクローンを示す。Dotted Box は、MT ファミリー配列を示している。斜線 Box は、*Pb* 偽遺伝子を示し、それぞれの Box 上の矢印は、転写方向を示している。制限酵素サイト(Apa I (A)、Bam HI (B)、Bgl I (Bg)、Eco RI (RI)、Eco RV (RV)、Hind III (H)、Kpn I (K)、Pst I (P)、Sac I (S)、Xba I (X)、Xho I (Xh))は、垂直線で示している。プライマーペアは、P1、P2、P3、P4 と P5 で示す(矢印)。F1 から F4 は、ノーザンブロッディング法で用いたプラスミドプローブ断片である。B. 括弧で囲まれた数字は、境界線で示された領域内に組換え部位を持つ組換え体の数を示している。組換え体の親系統のハプロタイプは、それぞれのラインの右端に表示している。

図3

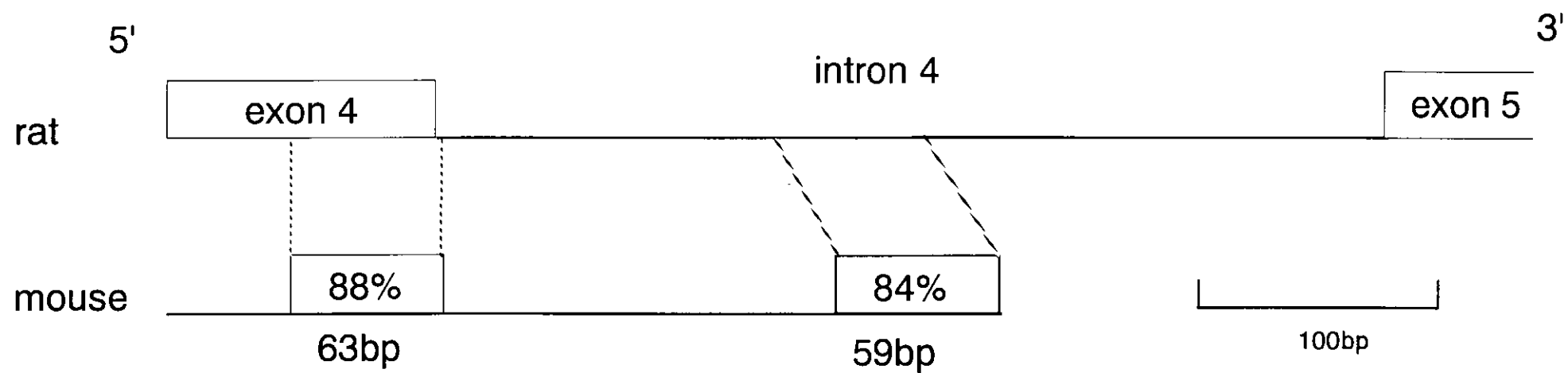
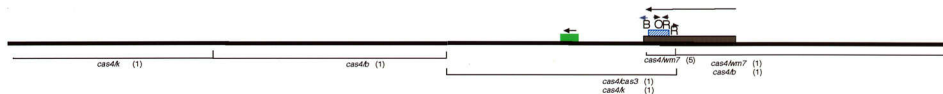
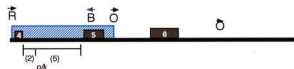


図3 ホットスポット領域におけるラットとマウスの *Pb* 遺伝子のホモロジー

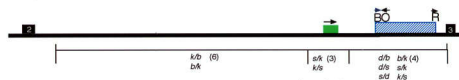
Pb



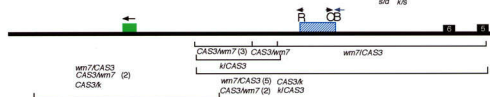
Ea



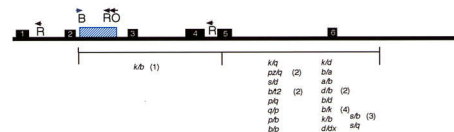
Eb



Lmp2



ClassIII



human Tap 2



図4 マウス MHC クラス II, III 領域及びヒト MHC クラス II 領域内に発見された各ホットスポットの一次構造。

太字の水平線は、左から右方向にセントロメアからテロメアへ向かってのデータベース(Genbank)から得られた染色体領域の塩基配列を示している。Black Box は、それぞれの遺伝子のエクソンを示す。斜線の Box は、偽遺伝子または偽遺伝子のエクソンを表している。それぞれの Box 中の数は、エクソンの数を示す。文字の上に書かれた矢印は、モチーフの方向を表している。水平線の下に囲みとそこにある文字は、それぞれの組換え体の領域と組換え体の親系統の MHC ハプロタイプを示している。括弧内は各組換え体の数を示す。緑の Box は、MT ファミリー配列を表している。オクタマー転写因子結合配列、B モチーフ様配列及び TCTG あるいは CCTG の 4 塩基の繰り返し配列モチーフの位置は、それぞれ、O、B and R と表記しており、それらが含まれる最小 DNA 断片を青斜線の Box で表示した。

A

	hotspot region	octamer like sequence	B motif	tetramer repetetive sequence
mouseMHC	<i>Lmp2</i>	GTTTGCAT	GGGACTCTCC	(CCAG) ₂
	<i>Eb</i>	A***T***	****T**C**	(CAGA) ₄
	<i>Ea</i>	****_***	****T**C**	(CAGG) ₅
	<i>Pb</i>	A***_***	***TC*GA**	(CAGG) ₂ (CAGG) ₂
	<i>Class III</i>	A*****	****GCT***	(CAGA) ₂ (CAGG) ₂ (CAGG) ₂
humanMHC	human <i>Tap 2</i>	A***_***	***GAG****	(CAGA) ₂

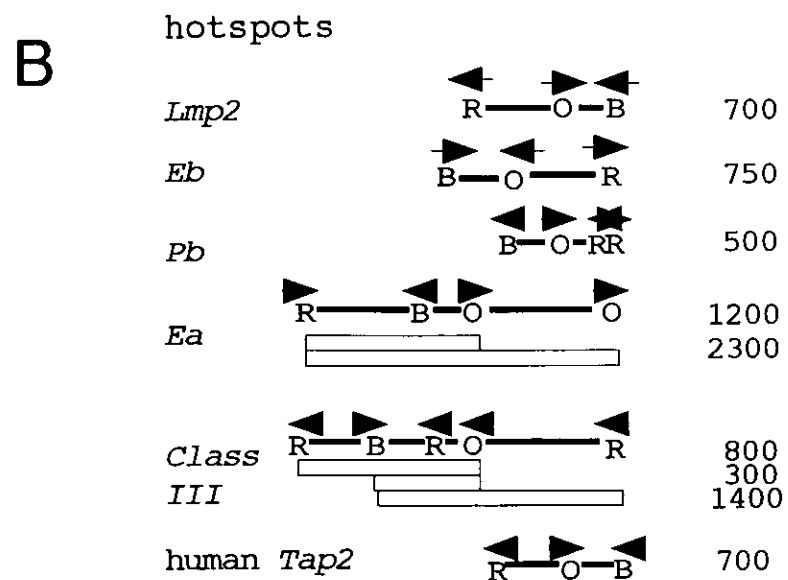


図 5 マウス及びヒト MHC 領域内の組換えのホットスポット近傍におけるオクタマー転写因子結合配列、B モチーフ様配列、TCTG あるいは CCTG の 4 塩基の繰り返し配列。

A. モチーフの塩基配列。配列星印は、一番上の配列と一致している事を示す。ハイフンは、そのヌクレオチドが欠失していることを表している。括弧外の数字は、4 塩基の繰り返し配列の反復数を示している。

B. モチーフが含まれる DNA 断片のサイズ。オクタマー転写因子結合配列、B モチーフ様配列、TCTG あるいは CCTG の 4 塩基の繰り返し配列は、各々 O、B、R で表している。各ラインの右に、各モチーフが含まれる最小の塩基対数を概数で示した。

图6

↓

wm7	1857	CTCACCCACAGAAGCCTGGGAACCTGGGGACCTTGTAGTCTAATGGTCAGACCCCTGGCT	1916
R209	1861	CTCACCCACAGAAGCCTGGGAACCTGGGGACCTTGTAGTCTAATGGTCAGACCCCTGGCT	1920
CAS4	1834	CTCACCCACAGAAGCCTGGGAACCTGGGGACCTTGTAGCCTAATGGTCAGACCCCTGGCT	1893
129	1857	CTCACCCACAGAAGCCTGGGAACCTGGGGACCTTGTAGTCTAATGGTCAGACCCCTGGCT	1916

wm7	1917	GGGGCTTCTTCTCTTCTATAGGACAGCTTTGCTCCGACACTGGTTCAGTGGCTTCTAG	1976
R209	1921	GGGGCTTCTTCTCTTCTATAGGACAGCTTTGCTCCGACACTGGTTCAGTGGCTTCTAG	1980
CAS4	1894	GGGGCTTCTTCTCTTCTATAGGACAGCTTTGCTCCGACACTGGTTCAGTGGCTTCTAG	1953
129	1917	GGGGCTTCTTCTCTTCTATAGGACAGCTTTGCTCCGACACTGGTTCAGTGGCTTCTAG	1976

wm7	1977	AACTCTCTAGCATTACCTTTCTGCCTTAGACCCTTCTGTGGACAGGAGAGCTTATCGAGG	2036
R209	1981	AACTCTCTAGCATTACCTTTCTGCCTTAGACCCTTCTGTGGACAGGAGAGCTTATCGAGG	2040
CAS4	1954	AACTCTCTAGCATTACCTTTCTGCCTTAGACCCTTCTGTGGACAGGAGAGCTTATCGAGG	2013
129	1977	AACTCTCTAGCATTACCTTTCTGCCTTAGACCCTTCTGTGGACAGGAGAGCTTATCGAGG	2036

wm7	2037	AAATGCTAGCCCCAGCCACCTGCCAGGATTCTCTATTTCATATCTTTGATGCCTGGGCTG	2096
R209	2041	AAATGCTAGCCCCAGCCACCTGCCAGGATTCTCTATTTCATATCTTTGATGCCTGGGCTG	2100
CAS4	2014	AAATGCTAGCCCCAGCCACCTGCCAGGATTCTCTATTTCATATCTTTGATGCCTGGGCTG	2073
129	2037	AAATGCTAGCCCCAGCCACCTGCCAGGATTCTCTATTTCATATCTTTGATGCCTGGGCTG	2096

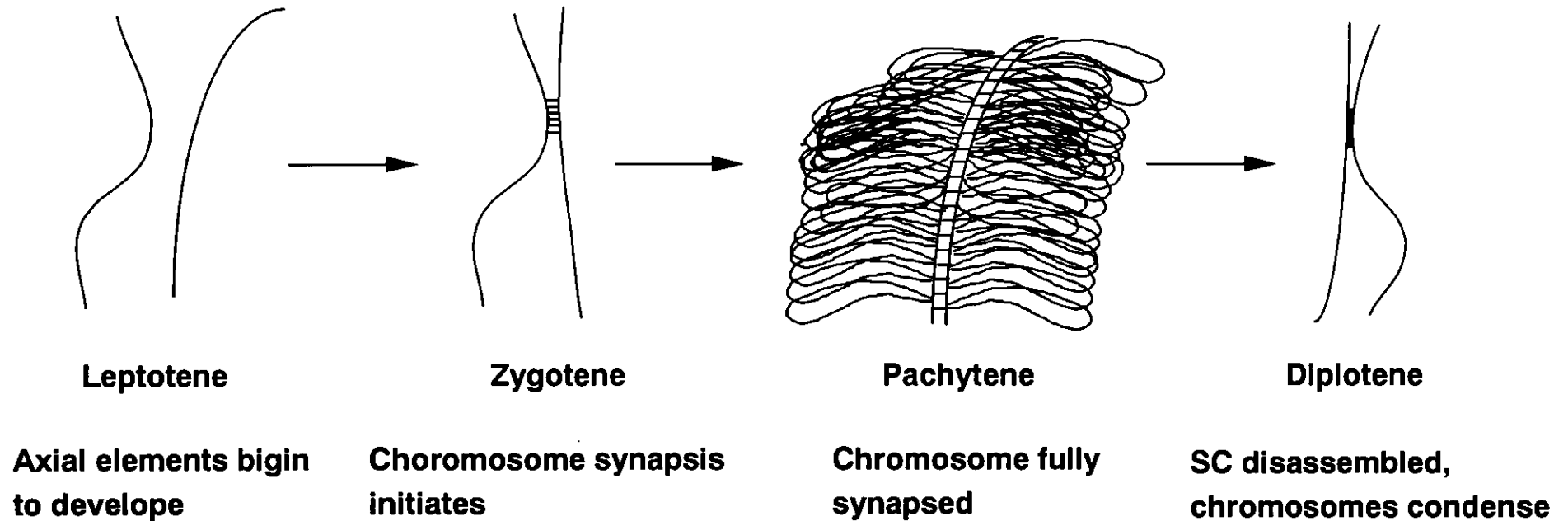
wm7	2097	TGTGTAGTTTGGGACGCTTGAACCTGCGACCTTGGGCTGTGCTGGAGTTGGAGGCT	2156
R209	2101	TGTGTAGTTTGGGACGCTTGAACCTGCGACCTTGGGCTGTGCTGGAGTTGGAGGCT	2160
CAS4	2074	TGTGTAGTTTGGGACGCTTGAACCTGCGACCTTGGGCTGTGCTGGAGTTGGAGGCT	2133
129	2097	TGTGTAGTTTGGGACGCTTGAACCTGCGACCTTGGGCTGTGCTGGAGTTGGAGGCT	2156

図 6 *Pb* ホットスポットにおいて組換えを誘発する MHC ハプロタイプと誘発しないハプロタイプ間の塩基配列の比較。

組み換えを誘発する CAS4 ハプロタイプと誘発しない wm7, R209, 129 ハプロタイプのホットスポット領域の塩基配列を比較した。黒い四角で囲まれた領域は、B モチーフ様配列、斜線で示した部分は、オクタマー転写因子結合配列、TCTG あるいは CCTG の 4 塩基の繰り返し配列は、点々で覆われた Box で示している。各塩基配列の横に、ハプロタイプ名が書かれている。矢印から最後のヌクレオチドまでがホットスポット領域である。

图7

SC morphology of different stages in meiotic prophase



In Yeast

DSBs appear

DSBs disappear

**double Holliday junctions
mature recombination**

In many metazoa

Early nodules

Early nodules

Late nodules

Chiasmata

図 7 減数分裂期組換え初期の染色体構造。

各染色体像において、パキテン期を除きクロマチンループ構造は省略している。
nodules は、リコンビネーションノジュールを指す。

Diagram of Synaptonemal complex (SC)

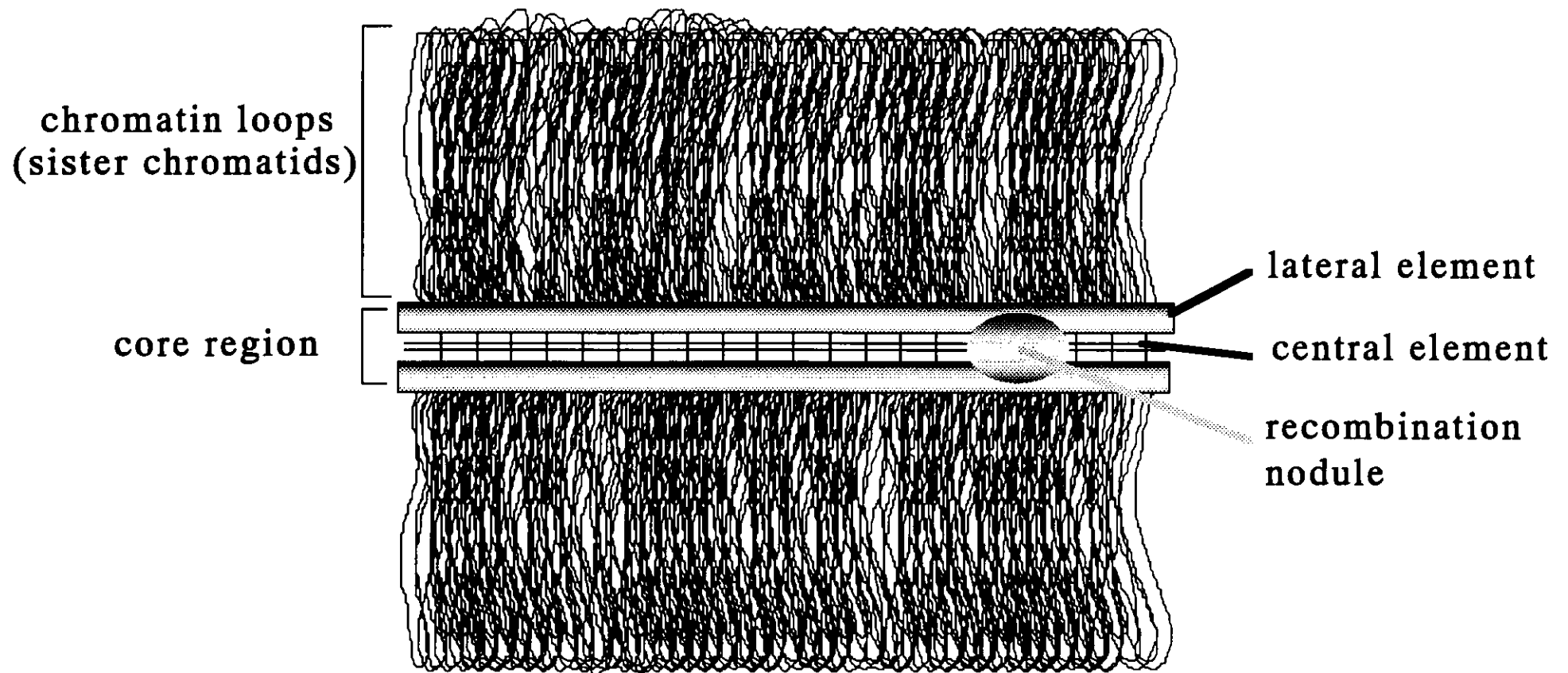


図 8 減数分裂パキテン期に特異的なシナプトネマ複合体 (SC) の微細構造。

图9

The probes for FISH in the MHC class II

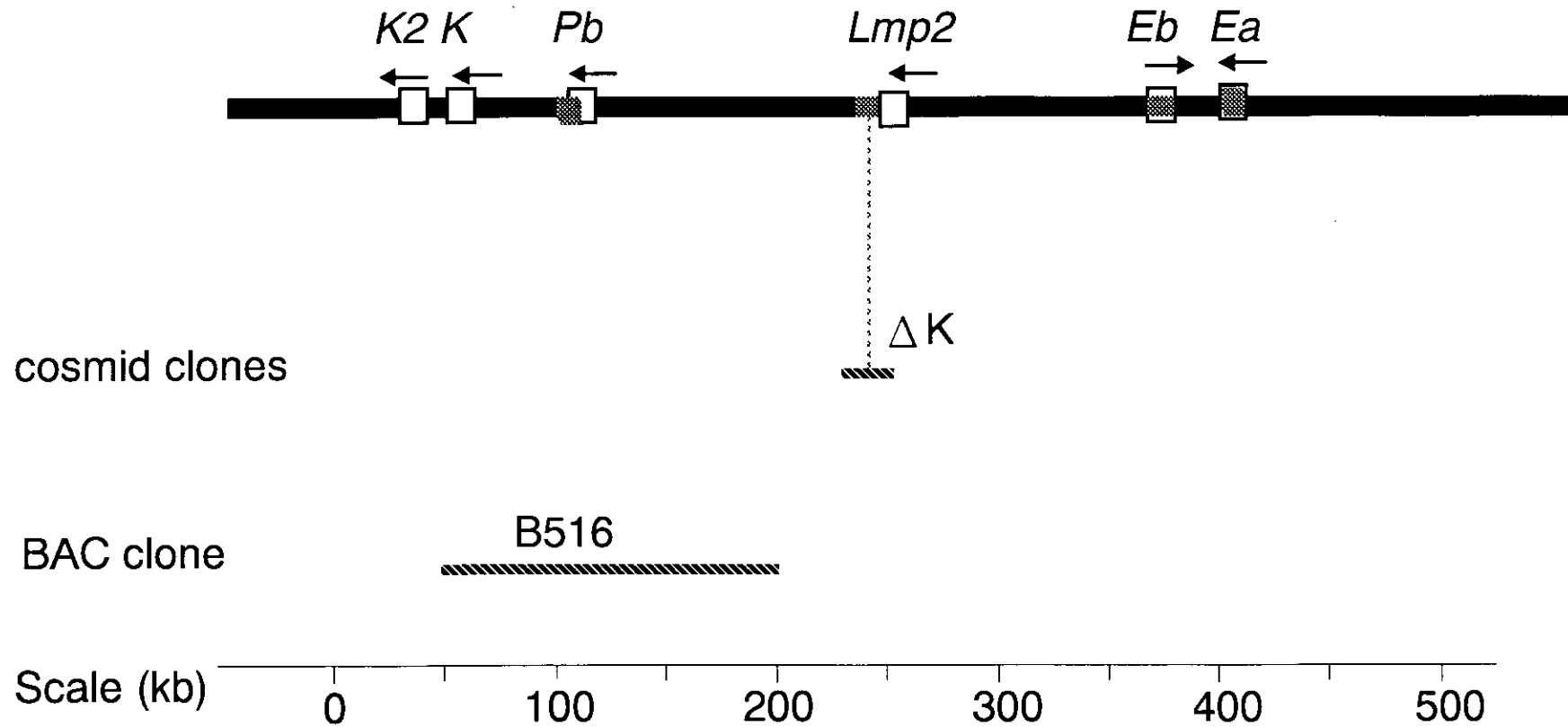


図9 FISH解析に用いたMHCクラスII領域特異的なDNAプローブ。

水平線の黒いバーは、左側から右側にセントロメアからテロメアの向きでマウスMHCクラスII領域のゲノムDNAを示している。白抜きのBoxは遺伝子を示している。各Box上の矢印は遺伝子の転写方向を示している。遺伝子名はBox上に書いてある。点々で囲まれた領域は、ホットスポット領域である。黒いバーの下にある斜線のバーは、FISH解析で用いたプローブである。ΔKは、*Lmp2*ホットスポットを含む25kbのコスミドクローンである。BACクローンBACクローンB516は、*Pb*ホットスポット領域を含むBACクローンである。

図 10

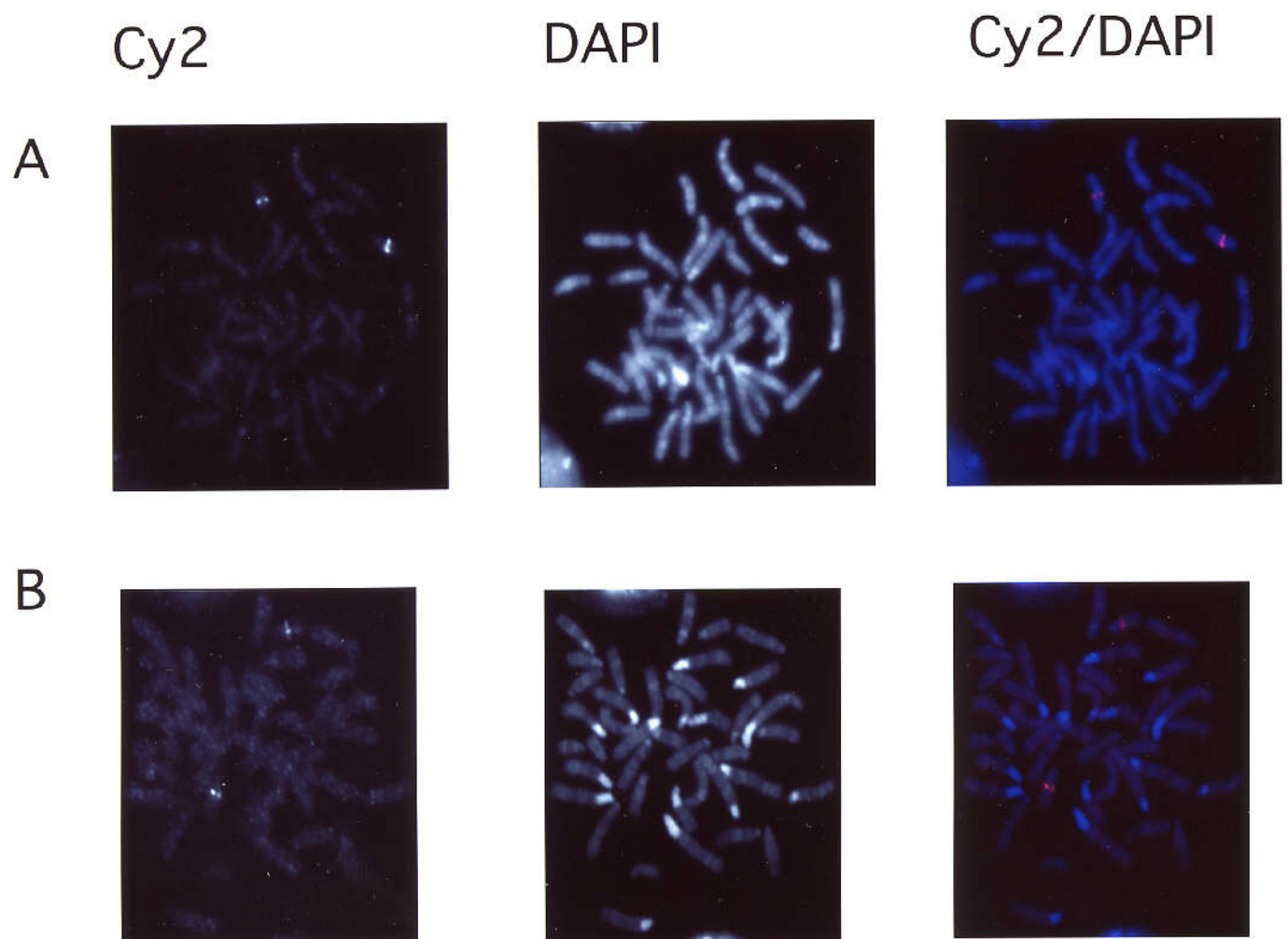
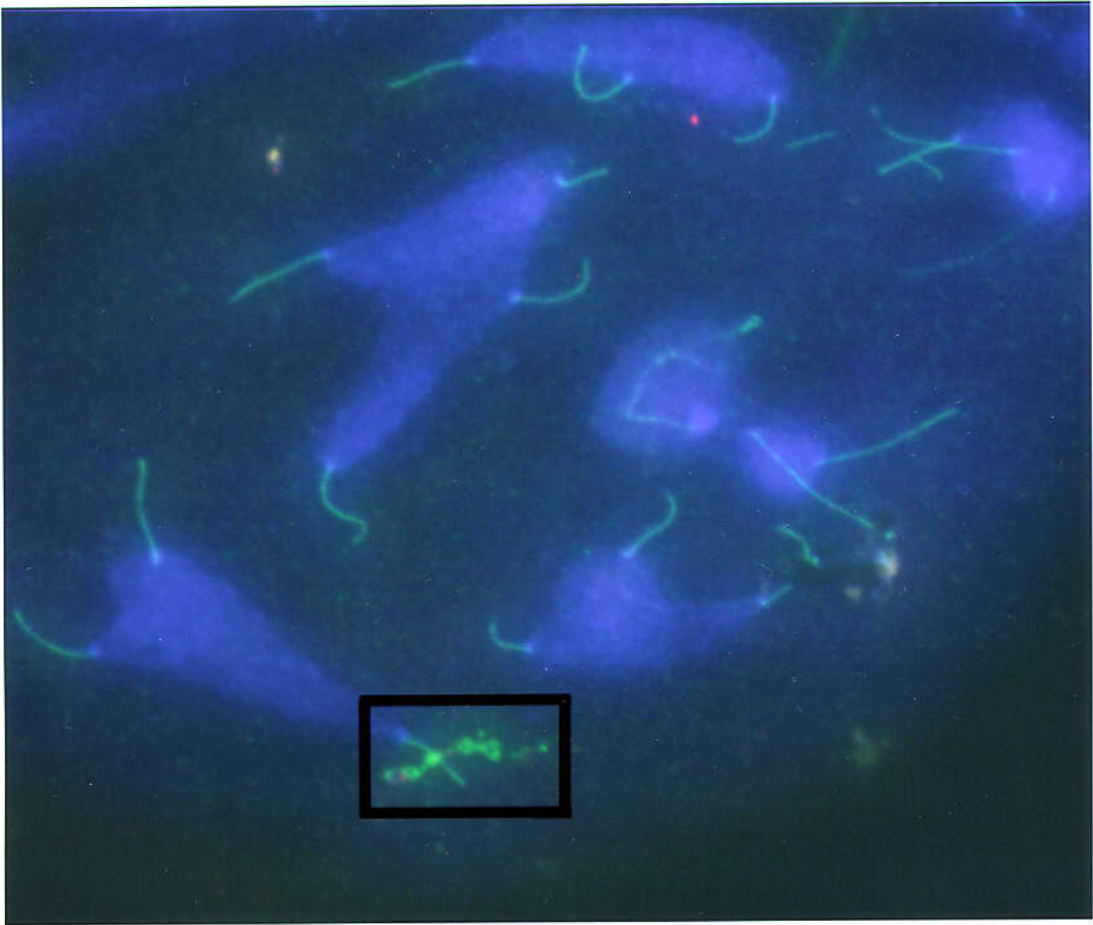


図 10 マウス体細胞中期染色体像における ΔK および BAC クローン B516 の FISH 解析。

各 DNA プローブがユニークであることを FISH 解析で確認した。A, ΔK ; B, BAC クローン B516。赤のシグナルは、ローダミンで DNA プローブを染めたもの。青は、DAPI でクロマチンをカウンター染色したもの。いずれも、MHC が存在する 17 番染色体のみにユニークなシグナルが観察された。

图 11

A



B

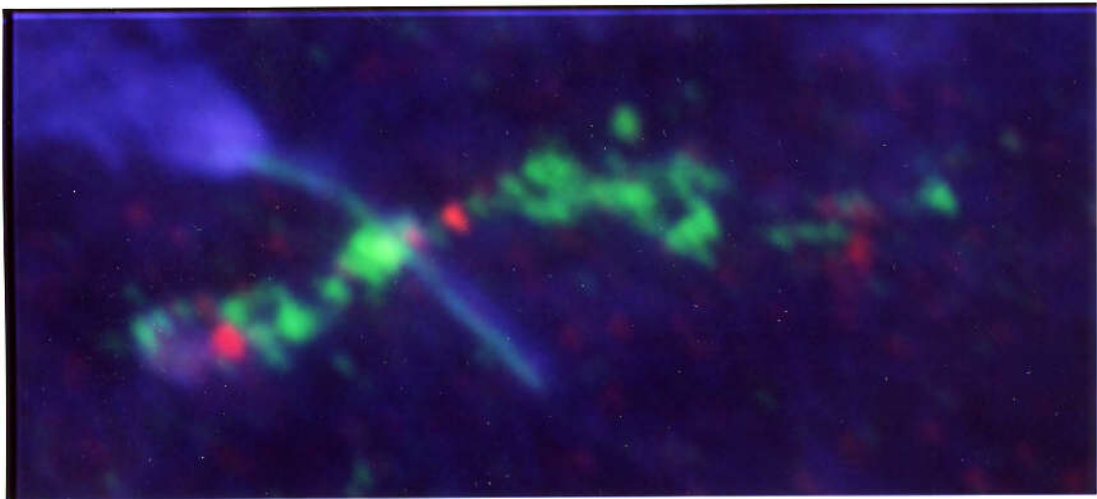


図 11 SC コアの抗体染色とホットスポット及びコールドリージョンに対する DNA プローブを用いた FISH 解析。

精巣におけるバキテン中期の染色体像の蛍光顕微鏡写真。緑のシグナル (FITC) は、SC コアとコールドリージョン (BAC クローン B516 プローブ) を示す。赤のシグナル (ローダミン) は、ホットスポット (ΔK プローブ) を染めたもの。青は、DAPI でクロマチンをカクンターステイニングしたもの。A, $40\times 10\times 1.25$ 倍。B, A の核版で囲われた部分を拡大したもの。 $63\times 10\times 1.6$ 倍

図12

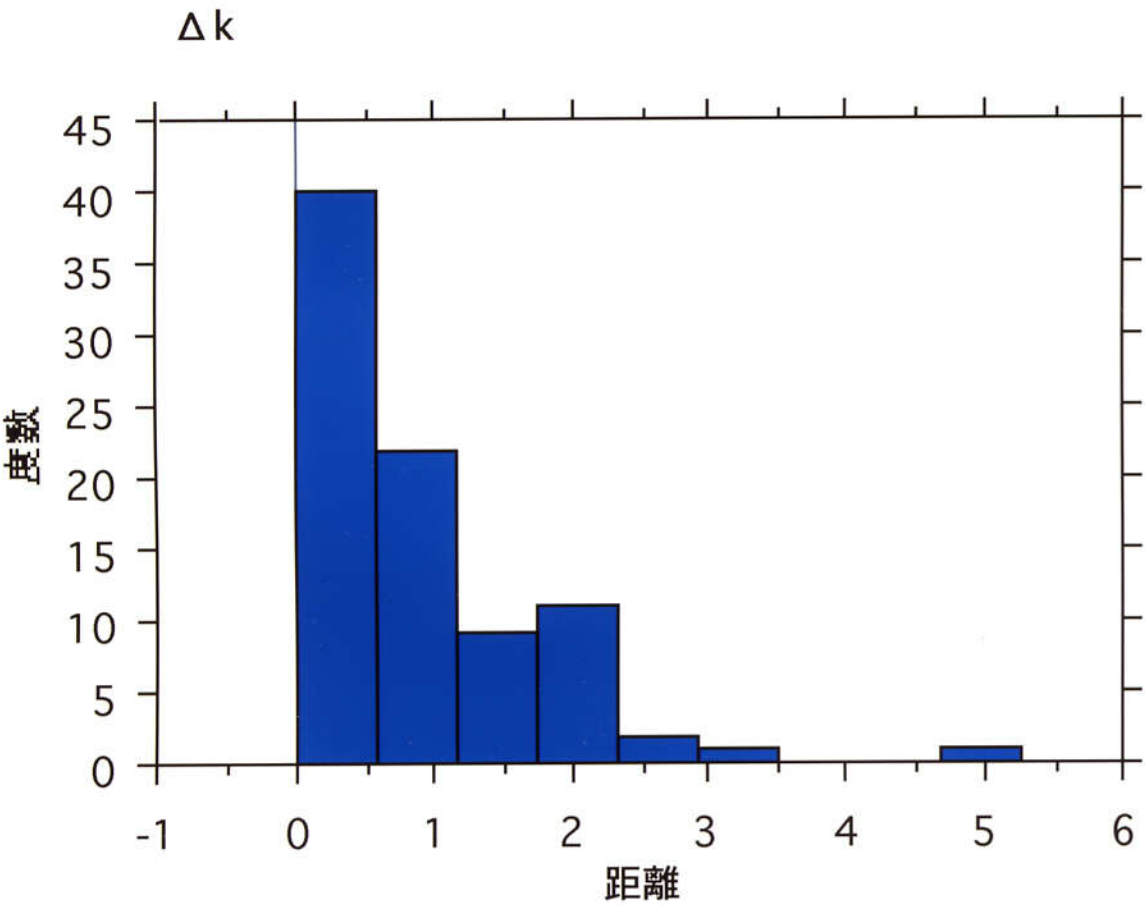
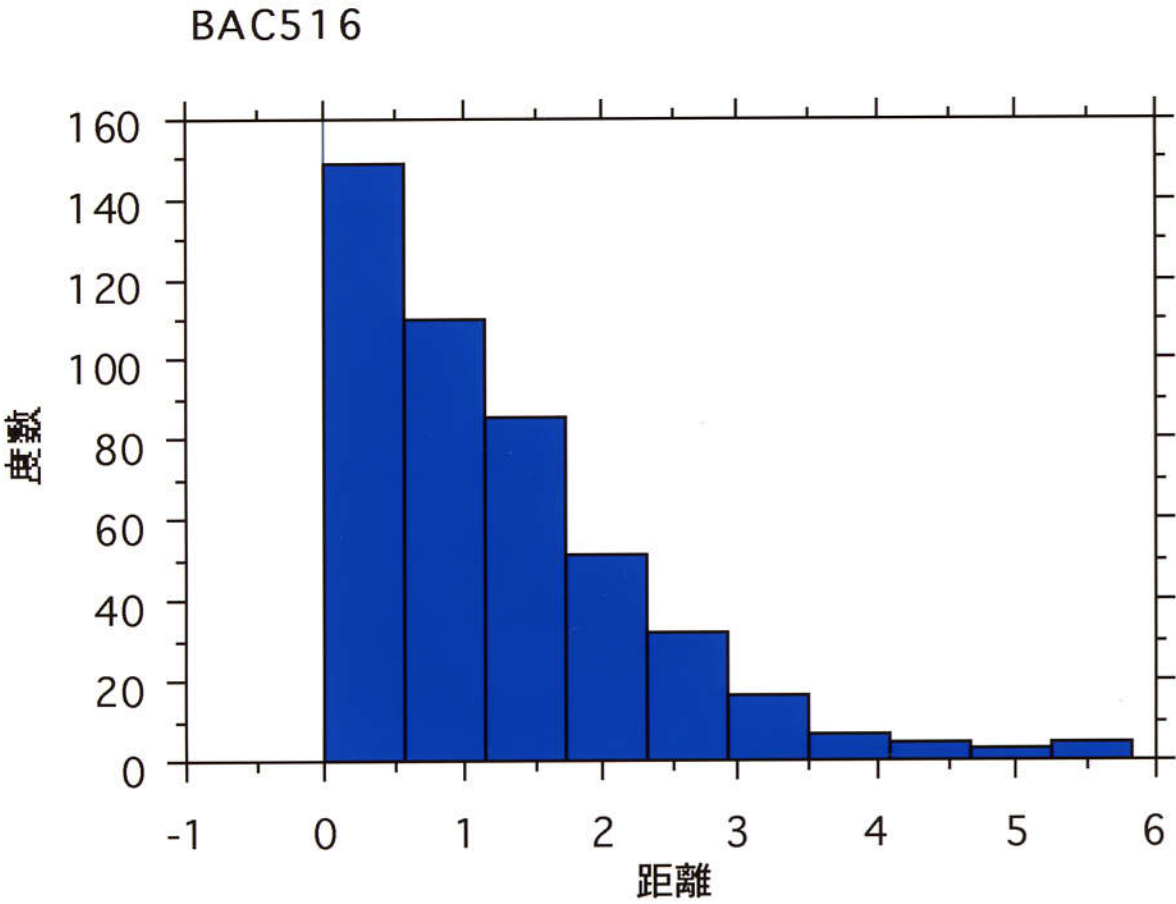


図 12 SC コアに対する BAC クローン B516 及び ΔK の距離のヒストグラム。

縦軸に各 DNA プローブによる FISH シグナルの数を示す。横軸に SC コアとプローブとの最短距離を示す。横軸の数値は、photoshop5.0 画面上の絶対的距離で示した（方法参照）。

図13

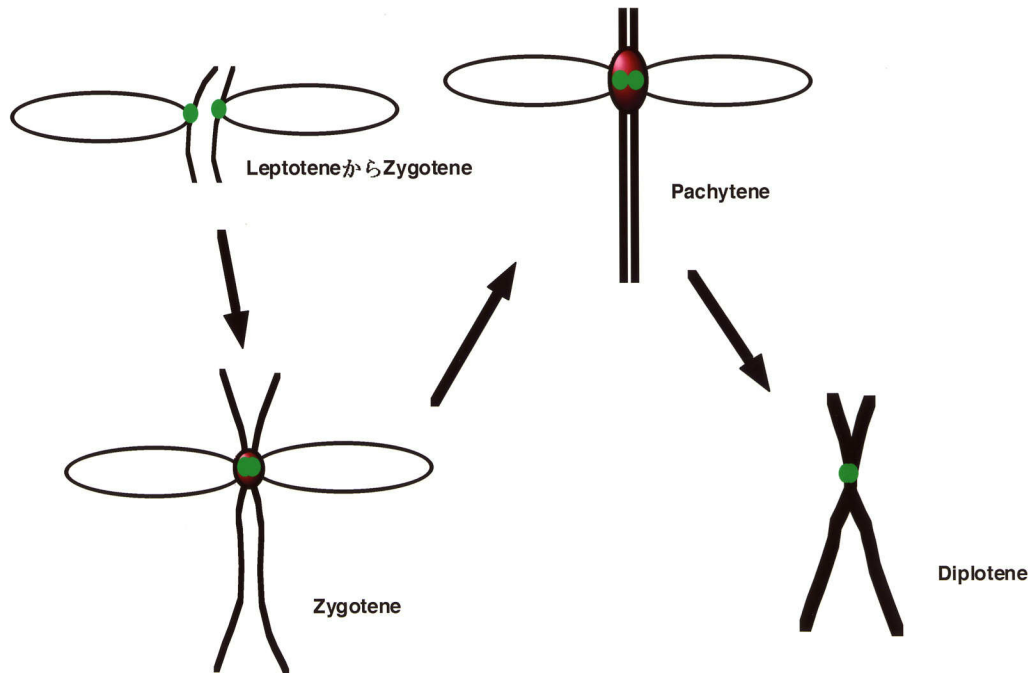


図 13 マウス MHC クラス II 領域内のホットスポットにおける組換え機構のモデル。

減数分裂期におけるシナプトネマ複合体の構造を示す。緑の丸、赤い丸は、それぞれ、染色体の相同領域認識サイト、リコンビネーションノジュールを表している。Leptotene 期から Zygotene 期において、オクタマー転写因子結合配列、B モチーフ様配列及び四塩基からなる繰り返し配列を含む相同認識領域が Axial element に特異的に結合する。Zygotene 期になると Axial element が SC コアを形成する過程で、相同認識領域どうしが幾つかの蛋白質や複合体を介して正確に相同染色体領域を認識し対合していく。Pachytene 期には、完全に対合した SC コアにリコンビネーションノジュールが表れ、その場で組換えの開始反応がおこる。これが組換えのホットスポットの位置を決めている。Diplotene 期になると、組換えの最終反応が起きブランチマイグレーションなどでホットスポット領域内において組換え切断点の位置が移動しキアズマを作り、最終的に染色体が分裂する。また、ブランチマイグレーションによって組換え部位が分散することになる。