
環境変異への適応に及ぼすヘテロクロマチンの量的変動の効果

The effects of the variation in heterochromatin content on adaptation to the changing environments

- 代表研究者 国立遺伝学研究所細胞遺伝部研究員 山本雅敏
Res. Assoc., Dept. of Cytogenetics, National Inst. of Genetics.
Masatoshi YAMAMOTO
- 共同研究者 国立遺伝学研究所細胞遺伝部室長 森脇和郎
Head of Lab., Dept. of Cytogenetics, National Inst. of Genetics.
Kazuo MORIWAKI
- 共同研究者 国立遺伝学研究所実験生物保存研究施設研究員 楠田潤
Res. Assoc., Genetics Stock Center, National Inst. of Genetics.
Jun KUSUDA

The genetic recombination is generally accepted as a long-term evolutionary advantage through generations of genetic variability in natural populations which responds to immediate demands for adaptation. Recombination rates are usually persisted at constant level on each chromosome in a given species. It is thus quite beneficial for organisms if they are able to change the amount of recombination without any expenses like gene mutations or chromosomal aberrations.

Heterochromatin is a widely found nuclear entity among almost all eukaryotic organisms. It is genetically inert and thus dispensable for an individual. The inert genetic material showed extensive variations in the amount, DNA sequences and chromosomal localities both within and between species.

Drosophila melanogaster possesses heterochromatin almost exclusively in the procentric regions of the all chromosomes. Various chromosomes carrying heterochromatin at different positions, for example, at the telomeric and at the interstitial in addition to the centromeric regions, and also almost totally heterochromatic free chromosomes similar to B-chromosomes were synthesized by X-ray irradiation. Every type of chromosome found in other organisms were thus genetically synthesized. Having manipulated these wide varieties of chromosomal aberrations in order to elucidate the functions of heterochromatin, we examined the effect of every possible heterochromatic rearrangements and came to the conclusion that heterochromatin can regulate the amount of recombination with the specific fashion depending on where the heterochromatin locates and how large it is. If the amount or the locality of heterochromatin was changed strong influence is exerted on the frequency of crossing-over not only on the same chromosome it exists, but also on the other chromosomes. The effect is over and above genic regulations. The most important finding is that the degree of the heterochromatic effect on the recombination frequency is clearly correlated with its content, namely larger extent of changes in the heterochromatin gives stronger impact to the alteration in the frequency of recombination.

What is the mechanism with which a chromosome can alter the heterochromatin content? The *unequal sister chromatid exchanges* (USCE) are the most potential mechanism to induce gradual increase or decrease in the size of heterochromatin. Genetic estimate of the spontaneous occurrence of USCEs is about the order of 10^{-4} . This frequency was measured in a small specific genic locus in the euchromatin. Being quite different from euchromatic DNA, heterochromatin is mostly consisted of highly *repetitive* DNA. It is thus reasonable to assume that the frequency

of USCE should be significantly higher in heterochromatin. Molecular analysis also confirmed the event of USCEs in the $z Dp(1;1)w^{+201c10}$ chromosome.

This series of experiments revealed that an organism may use the genetically inert heterochromatin to produce higher or lower genetic variabilities through changing the amount of heterochromatin which leads to alter the frequency and the position of recombination. Since heterochromatin is genetically inactive either a drastic or a minor change in the DNA content seems not to cause any serious problems to the organisms.

研究目的

自然環境の漸次変化して行くなかで、生物は“適応”という手段で生命体ならびに種を継続してゆく。この適応は1世代で獲得されるものではなく、世代を通じてしかも集団のレベルで獲得される現象である。その最も有効な生物学的手段としては、生物集団中に幅広い遺伝子構成の変異が維持され、必要な遺伝子の集団内への効果的な拡大によるものと考えられる。このような遺伝的変異の拡大の機構としては、染色体上における遺伝子組換えが最も重要なものであり、環境に適応してゆく能力を決定づける因子として遺伝子組換の“頻度”が重要であると信じられている。

生物は、一般に遺伝子組換の機構を持っており上記の要因を既に備えているわけであるが、この内在性の遺伝子組換の機構を調節し、より有効な変異を集団内に生み出す機構を当研究において明らかにし、考察を試みる。ある生物の遺伝子組換の頻度と、組換の生じる位置は種特有のパターンをもっており、この組換の分布パターンは、キイロショウジョウバエに限らずあらゆる生物種でその種特有のかなり固定された分布パターンを持っている。生物の適応はこの固定した組換位置を条件により変動可能な状態に変化させ、さらに頻度をも変動させるメカニズムがより有効なものとなり得る。

ほとんどの真核生物の染色体には、固体の生存と生殖に必要な情報を提供するDNAに加えて、全く遺伝子を含まない不活性なDNAが存在する。細胞学的にはヘテロクロマチン、分子生物学的にはサテライトDNAまたは高度反復DNAと呼ばれる。この種のヘテロクロマチンDNAは生物の生存にはあってもなくてもよく、全く役に

立たないDNAの一つであるとも考えられていた。

以前からヘテロクロマチンの機能として自然発生的に生じるヘテロクロマチンDNA量の変動に伴い遺伝子組換え頻度に影響を及ぼしているとの仮説もあり、従来さまざまな研究が行われて来た。用いられた材料は自然集団にヘテロクロマチン量における多型として存在している染色体やB-染色体を用いたものが多く、遺伝学的にコントロールされた系でないためその仮説が確認されるまでに至っていなかった。

①ヘテロクロマチンDNAは遺伝子の組換え機構の調節に重要な役割を果たしているのか?

②その調節はどのように行なわれているのか?

③その最も基本的な機構は何なのか?

④そしてさらに実験室で実験的にコントロールされた環境への適応能力とその戦略を上記の仮説をもとにしてさぐるという大きな四つの問題の解明が目的であった。

研究経過と結果

1. ヘテロクロマチンの量的変動の組換え頻度への効果

ヘテロクロマチンDNA量とその組換えに及ぼす影響に関しては大別して二つの実験系から成る。

①遺伝子組換えの変動の様式とヘテロクロマチンDNA量との関係

②DNA量の変動を生じるメカニズム

ヘテロクロマチンは遺伝的に不活性であることを反映して、核内での存在様式、すなわち染色体上に占める位置またその量並びにDNA塩基配列は生物種を通じて一定しておらず、唯一の共通の見解としては、変異性が高いということと高度反

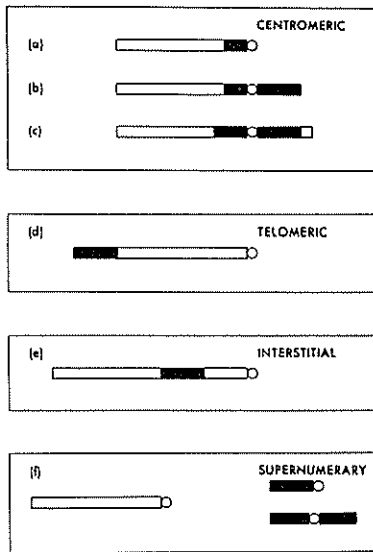


図 1. 染色体上に存在するヘテロクロマチンの例
(a)～(c) 動原体部位ヘテロクロマチン
(d)
(e) 中間部介在ヘテロクロマチン
(f) 完全にヘテロクロマチン化した過剰染色体

復 DNA から成るといふ 2 点である。この変異性の高いヘテロクロマチンを特定の試験システムを組み、ヘテロクロマチンの持つ変異性の何が生物学的に機能しているのかを解明するのがこの試験系の目的である。

研究方法としては、キイロシヨウジヨウバエの染色体を X 線というハサミで切り、ランダムに修復結合されたものの中から目的の染色体異常を捜し出すという研究材料の作成から開始した。既に存在している染色体異常を用いたり、ある染色体異常から目的の染色体異常を作成した。遺伝子の組換え頻度に関する研究に用いられた染色体異常の代表例を図 1 に示した。正常なシヨウジヨウバエの X 染色体は動原体の部分に全体の約半分を占めるヘテロクロマチンのブロックがある。残りはユウクロマチンで遺伝的に活性な領域であり、遺伝子の組換えはこの部分でのみ生じる。ヘテロクロマチンは還元分裂における組換えはほぼ完全に欠如している。合成された染色体はヘテロクロマチンの量、位置そして質すなわち DNA 塩基配列、などが異なったものであるが各システムにお

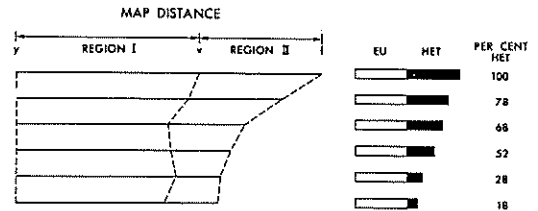


図 2. 動原体部位ヘテロクロマチンの欠失と組換え頻度の変化。欠失の増大と組換え率の減少に強い相関がある

いてさらにヘテロクロマチンの量的変動を持った染色体異常を合成した。

すべての実験例において X 染色体以外の染色体構成は同じものとし、遺伝的背景は 6 回以上の戻し交配で理論的には同一のものとした。また組換え頻度を求めるために用いた標識遺伝子をもつ染色体もすべて対照群と同じものとした。組換え頻度への影響があるとしたならばヘテロクロマチンの位置的または量的変化によってのみ生じるという実験条件を整えた上で以下に述べる研究は行なわれた。

A) Intra-chromosomal Effects

a) ヘテロクロマチンの位置との関係

1) 動原体部位ヘテロクロマチン

図 1 (a) に示されるような動原体部位に存在するヘテロクロマチンの量が変化することによって引き起こされるユウクロマチン領域における組換え頻度の変化を調べた。その結果は図 2 に示されているように、正常な染色体と比較してヘテロクロマチンの欠失した X 染色体では左側半分はほとんど変化がないのに比べユウクロマチンの動原体側において著しい組換えの減少が観察される。しかもその組換え率の減少と、組換え位置の分布の変化は動原体部位ヘテロクロマチン量の減少と強い相関が見られる。ヘテロクロマチンの“量”に組換え頻度は依存していると考えられる。この点を確認するために図 3 に示されるような研究を行なった。すなわちヘテロクロマチンの“量”は同じなのに対して“質”が変化した場合に組換え率はどうなるかを調べたものである。実験に用いられた 2 本の X 染色体は細胞学的にはヘテロクロマチン領域の長さが同じであるが、ヘテロクロマチ

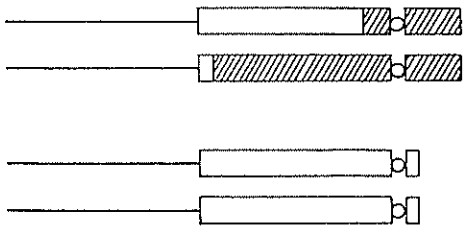


図 3. 動原体部位ヘテロクロマチンの“質的変化”と組換え率の関係を調べた染色体。斜線部はY染色体由来であることを示す。下の2本は野生型メスのX染色体の構成である。

ン DNA の塩基配列に差がある。もしヘテロクロマチンの“質”が組換え率に影響を与えるならば、これら2本の染色体間で組換え頻度に差が生じるはずである。結果は両者の間でほとんど組換え率に差がない。このことからヘテロクロマチン DNA の塩基配列そのものは組換え頻度の調節に重要な意味を持たず、ヘテロクロマチンという特異な染色体部分のサイズが機能的に重要であると結論できる。

2) 染色体末端部ヘテロクロマチンの効果

動植物の染色体の形態、すなわち核型の研究から、自然界に存在する染色体は動原体部位にヘテロクロマチンを持つとは限らず図1に示されるようにヘテロクロマチンは染色体のいろんな部位に位置している。上記のような動原体部位ヘテロクロマチンで得られた結論が、他のヘテロクロマチンの存在様式にも共通のものであるかどうかを調べた。

初めに末端部にヘテロクロマチンを持つ染色体の場合、組換え頻度に与える影響は動原体部位ヘテロクロマチンとは逆に、染色体末端部における組換えを減少させる働きが観察された。今回の研究では末端部ヘテロクロマチンのサイズが異なったX染色体を得ることができなかったため量的変異との関係は明らかにできなかったが、後で述べる染色体間効果 (inter-chromosomal effect) に特に大きな影響を与える染色体異常である。

3) 染色体中間部介在ヘテロクロマチンの効果

染色体の中間部にヘテロクロマチンを持つ生物種は、比較的その数は少ない。しかしほ乳動物においてはクジラ・イルカなど海洋ほ乳類で広く見

られ、昆虫にもその例が知られているし、植物においてはかなりの例がある。自然界の動植物における例数を問題にするよりも、この種の染色体異常はヘテロクロマチンの機能を探る上で重要な意味を持っている。というのは、染色体末端部には末端部としての特殊性 (telomere effect と呼ばれる作用) があり、また動原体部位ヘテロクロマチンの機能は動原体そのものの作用と完全に切り離して考えることが実験条件として困難であった。しかしながら、ヘテロクロマチンそのものを染色体の中央部に置き、ヘテロクロマチンのユウクロマチンに及ぼす効果を調べることで、より明確にヘテロクロマチンそのものの効果を知ることができる。ヘテロクロマチンの組換え頻度に及ぼす影響とその効果を明らかにする上で最も重要な研究条件がこの染色体中間部介在ヘテロクロマチンを持つ染色体により満たされることになる。

染色体中間部介在ヘテロクロマチンを持つ染色体はX線照射によりX-Y 転座染色体から得られた。X-Y 転座はXとY染色体間で各々1か所の切断により、Xの断片とYの断片がランダムに結合して生じたもので、ここで用いたX-Y 転座はX染色体が転座により2本の染色体に分断されていながら、それを持つ個体は正常に発生し、しかも捻性もあるというものをを用いた。

X染色体上の切断点が明らかなX-Y 転座を用いて図4に示されているようにY染色体 (ほとん

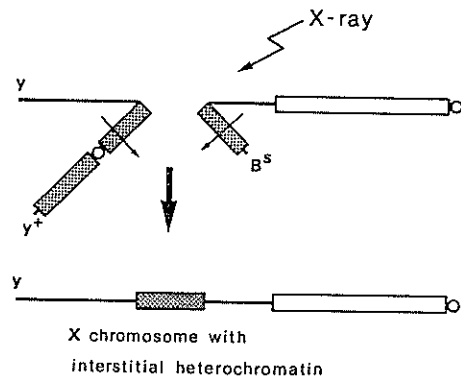


図 4. 中間部介在ヘテロクロマチンを T (X; Y) の転座染色体から X 染色体照射により作成する方法。

ど完全にヘテロクロマチンから成っている)の部位で切断されたものどうしが結合して生じる染色体を選び系統とした。これが中間部介在ヘテロクロマチンを持つ染色体である。この実験システムの特徴はX染色体上での切断点が全く同じでヘテロクロマチンのサイズだけが異なる染色体を作製することができた点である。

得られた染色体は合計 18 本で、唾腺染色体地図上 3C にヘテロクロマチンを持つもの 1 本, 7C に持つもの 8 本, 11A に持つもの 1 本, そして 12F に持つもの 8 本であった。以上の染色体を用いて得られた結果の要約を以下に示す。中間部介在ヘテロクロマチンが挿入された位置と組換えの生じる位置の分布がどのような関係にあるかを調べた。用いた染色体は唾腺染色体上, 3C, 7C, 12F に挿入された染色体である。ヘテロ接合体の場合特に挿入部位の近傍で組換え率の減少が著しく, 約 80-90% もの減少が見られた。ヘテロクロマチンから遠ざかるに従い正常な組換え率を回復し, 特に末端側に挿入された染色体 (AK-3, AK-7) では動原体に近いユウクロマチンで正常値の 2 倍近く組換え頻度が上昇している。さらに 2 本の中間部介在ヘテロクロマチンを持つ染色体 (AK 3 と AK12, AK7 と AK12) がヘテロな状態では組換えはさらに抑制され, 正常な X 染色体全体における組換え率約 66% に比べ, わずか約 6% にまで減少する。(図 5)

以上のことから, ヘテロクロマチンはその存在する染色体上の近傍において著しく組換えを阻害し, 特に染色体中央部においてはその効果が X 染色体の全領域に及ぶ。挿入された部位における減少とは逆に, その部位から遠ざかった領域で組換え率が上昇する inter-chromosomal effect が生じた。

b) ヘテロクロマチンの量との関係

ヘテロクロマチンの組換えに及ぼす機能として同一染色体上においては組換え頻度を低下させ, 特にヘテロクロマチンの近傍においてその効果が顕著であった。特にヘテロ接合体においてその効果が強く, ホモ接合体では著しい組換え率の現象は見られなかった。次に適応の戦略を考える上で

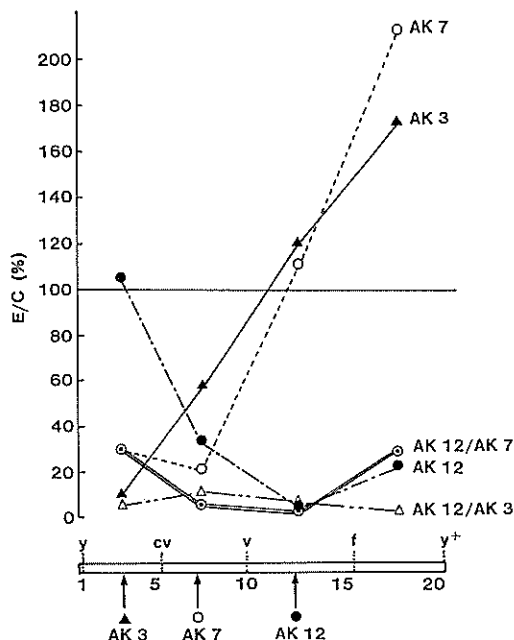


図 5. 中間部介在ヘテロクロマチンを持つ X 染色体のヘテロ接合体における組換え率の変化。矢印はヘテロクロマチンが挿入されている位置を示す。

重要な点は, ヘテロクロマチンの量と組換え頻度との関係である。言い換えれば, ヘテロクロマチンの量にかかわらずある量が存在することにより一定の効果を示すのか, あるいはヘテロクロマチンの大きさが組換え率を決定する重要な意味を持つのかという点である。この問題の解明が本研究の重要な課題であり, 上記各染色体異常とさらに独立したヘテロクロマチンだけから成る染色体の持つ効果も併せて研究した。

1) 動原体部位ヘテロクロマチン

図 2 にまとめて示されているように, 正常な X 染色体のヘテロクロマチンに対してヘテロクロマチンの量が減少するのに強く相関して, X 染色体上の組換え頻度が減少する。特にその効果は動原体に近い部分において生じ, 末端側での変化は小さい。この機構としては, 従来考えられている組換えへの動原体効果に対してヘテロクロマチンが緩衝剤として働き, 動原体の組換えを低下させる働きを阻害するためと考えられる。ヘテロクロマチン自体は中間部介在ヘテロクロマチンで明らか

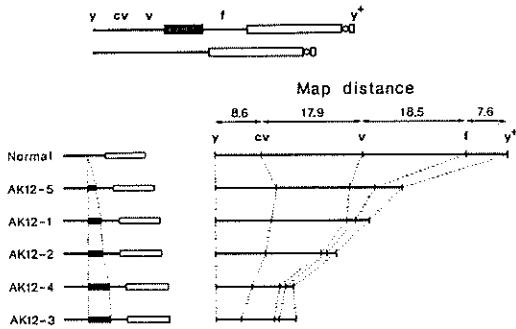


図 6. 中間部介在ヘテロクロマチンのサイズとヘテロ接合体メスにおける組換え率の変化。組換え率の減少率はヘテロクロマチンの大きさと強い相関を示す。

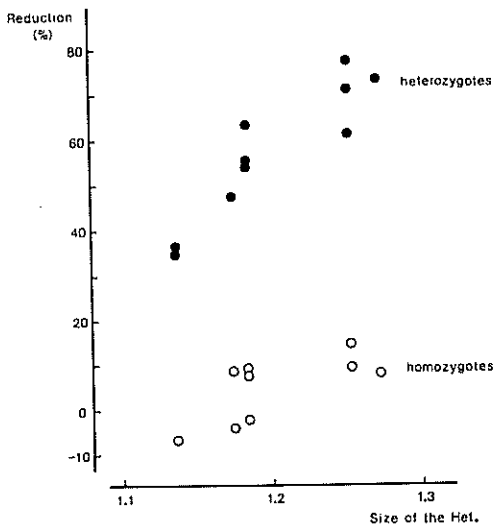
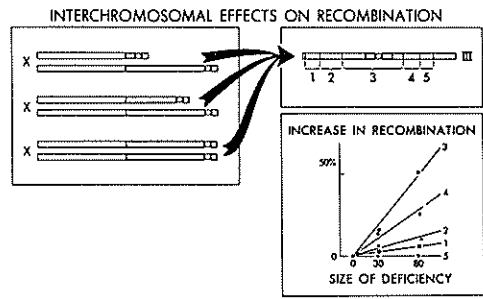


図 7. X 染色体に挿入されたヘテロクロマチンの大きさと組換え率の減少度との相関関係。ヘテロ接合体は黒丸、ホモ接合体は白丸で示した。

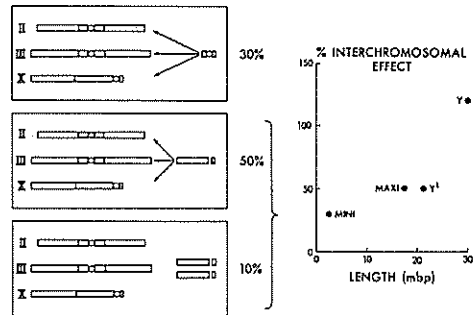
なように、組換えを減少させる働きがあるのに対して、ここでは逆の現象を上記の複合的な結果として観察しているということになる。

2) 中間部介在ヘテロクロマチン

図 6 に 5 種類の大きさの異なる中間部介在ヘテロクロマチンの組換えに及ぼす影響を示した。ヘテロ接合体の場合、ヘテロクロマチンの大きさと組換え頻度の減少との関係は明らかであり、大きければ大きいほど組換え率は減少している。ホモ接合体の場合、その組換えに及ぼす影響は顕著で



(a)



(b)

図 8. ヘテロクロマチン量に変動を生じた染色体が他の染色体上の組換えに及ぼす影響。(a) 動原体部位ヘテロクロマチンの第 3 染色体上に及ぼす影響。(b) B-染色体と類似のほぼ完全にヘテロクロマチンからだけなる染色体の第 2 染色体に及ぼす影響。

はないが、やはりその傾向は明らかである。(図 7 参照)

いずれの場合においても、組換え頻度の多様な変化にヘテロクロマチンの量的変動が重要であることは明確である。

B) Inter-chromosomal effects

染色体上のある部位に存在しているヘテロクロマチンは、それが存在する染色体上での組換えに効果を及ぼすだけでなく、他の染色体における組換えにも大きな影響を及ぼす。各染色体異常における効果の詳細はここでは省略し、図 8 にまとめて代表例を示したのでそれを参照していただきたい。これら一連の染色体間効果 (Inter-chromosomal effect) の研究の結果として、やはりヘテロクロマチンの量とその効果の強さに相関が見いだされた。その上通常の組換え率の変動には比

較的敏感でない染色体部位、主に染色体末端部と動原体周辺に特に大きな効果が見られた。

以上全てに共通した知見として、ヘテロクロマチンの量的変動は、核内遺伝子構成を多様に変化させるメカニズムのひとつである組換えに強い効果を及ぼすという点が重要である。

2. ヘテロクロマチンの量的変動の機構に関する研究

ヘテロクロマチンが染色体上に存在する位置によりその染色体上での組換えの分布が大きく変化する。また問題としている染色体上だけでなく、他の染色体における組換えも影響をうける。さらに存在するヘテロクロマチンの量が変化することにより、その量の変動に比例して組換え率が減少あるいは増大することが明らかとなった。

自然界において同一生物種の同じ染色体にも固体や集団レベルでかなり大きさの差があることはよく知られている。この染色体の多型現象を説明するためにはヘテロクロマチンなどの DNA 量は常に一定に保たれているのではなく、常に変化し得るものであることが証明されなければならない。しかも burst 的に生じるものではなく漸次変化する機構を備えている必要がある。同様な知見はヘテロクロマチン DNA に限らず他の反復配列を持つ DNA にも同様な例が観察されている。

DNA の量的変動を生物はいかなる機構で作り上げ結果的に生物学的に意義あるものとして利用しているのか。ヘテロクロマチン量による組換え頻度の調節の現象をさらに解明するため、次に DNA 量の変化のメカニズムを研究した。

ヘテロクロマチン量のゆるやかな変異を生じる機構に関する仮説としては、何らかの不等染色体交換 (unequal chromosomal exchanges) が考えられる。この染色体交換のなかには、

①体細胞における不等交叉 (unequal somatic exchanges)

②還元分裂過程における不等交叉 (unequal meiotic exchanges)

③姉妹染色分体間における不等交叉 (unequal sisterchromatid exchanges)

が考えられる。ただし DNA 量に変化した染色体は、その効果を集団に及ぼすためには、生殖細胞中で発生したものでなければならない。この条件を考えると、体細胞中での不等交叉はそれが自然発生的に生じるものであっても、その染色体はその個体の死とともに消滅し集団への影響はない。よって①の可能性は考えにくい。

次に生殖細胞における還元分裂過程に発生する不等交叉には、二つの問題がある。それは、ヘテロクロマチンでは組換えはほぼ完全に欠如している点と X や Y 染色体また B-染色体のように通常 1 本で存在し、組換えのパートナーを持たない点である。しかも DNA 量の変化が特に顕著に見られるのはヘテロクロマチン、Y 染色体そして B-染色体であることを考えると、還元分裂過程における相同染色体間の不等交叉が原因であるとは考えられない。

最後に姉妹染色分体交換 (SCE) を考えてみる。これは組換えの相手が相同染色体でなく染色分体である点が特徴である。これまで不等姉妹染色分体交換 (USCE) はパン酵母などの体細胞分裂時の研究はあったものの生殖細胞における検出例はなかった。キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) においても特殊な DNA (例えばトランスポゾンなど) を含んだ遺伝子座における変異が不等姉妹染色分体交換と考えられなくもないが、あくまで正常に近い染色体を用いての実験例はなかった。そこで遺伝学的方法で生殖細胞における自然発生的不等姉妹染色分体交換の検出を行ない、さらに分子生物学的に確認した。

1) 自然発生的不等姉妹染色分体交換の遺伝学的検出

姉妹染色分体は、1 本の染色分体の完全なコピーであるため染色分体間の交換を遺伝学的に検出することはほぼ不可能である。しかし不等な交換であれば、それが不等であるがゆえに生じる表現形の変化をモニターすることによって、その発生と頻度を求めることが可能である。図 9 に示したモデルでは、 w 遺伝子座の一部に重複を持つ染色体がその重複部位を欠失する頻度を求める方法である。ここで生じた欠失が不等姉妹染色分体交

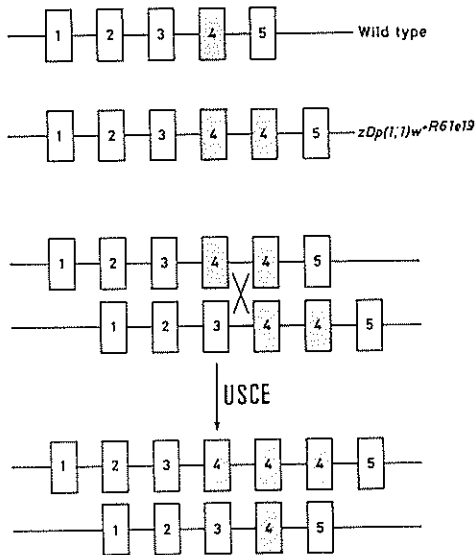


図 9. 不等姉妹染色分体交換 (USCE) が $z Dp(1;1)W^{+R61e19}$ 染色体上で発生した場合の染色体構造の変化のモデル。 $z Dp(1;1)W^{+R61e19}$ の重複部位を編みかけで示した。結果として野生型と同じ構造の染色体が出現する。

換に由来するものかどうかは、分子生物学的研究や欠失の発生頻度から推定することができる。また相同染色体間の不等交叉ではなく姉妹染色分体間の不等交叉であることの確認は、X染色体が常に1本で相同染色体を持たない雄の細胞を用いることで可能である。

実際に姉妹染色分体間での不等交叉が図9のモデルのように発生した場合、遺伝学的に次のようにして検出できる。重複を持つ染色体 $z Dp(1;1)w^{+R61e19}$ の表現形はレモン色の眼色を呈し、その染色体の w 遺伝子座において不等交叉により欠失が生じると表現形はレモン色眼色から野生型の眼色である赤褐色に変化する。すなわち赤褐色の眼色を呈する個体の出現頻度を求めることで、自然発生的不等姉妹染色分体交換の発生頻度を求めることができる。

得られた結果を表に示した。不等姉妹染色分体交換の結果生じた個体は21個体で発生頻度は 1.4×10^{-4} と推定される。ただし不等姉妹染色分体交換の“event”としては2回だけであるが、生殖細胞中の spermatogonia cell で生じたため、

多数の個体が出現したものである。姉妹染色分体交換は生殖細胞に関しては meiotic cell では起こらず gonial cell で生じるといふ他の細胞学的知見とも一致している。この頻度は、自然発生的に生じる w 領域の欠失としてはあまりに高く、この可能性は完全に排除できる。また z 遺伝子の突然変異が生じた結果であったとしても 10^{-4} の値は高すぎる。この後者の可能性は遺伝学的に否定された。なぜなら得られた赤褐色の眼色を呈する個体は z 突然変異体を持つ他の X 染色体とヘテロにすると z の表現型を現すからである。

2) 不等姉妹染色分体交換の分子生物学的研究

自然発生的不等姉妹染色分体交換が遺伝学的にほぼ確認されたわけであるが、実際に重複していた部位に欠失が生じたのか、また w 遺伝子座の重複はどれぐらいの大きさで、欠失はそれのどの範囲で生じたものなのかを分子生物学的に検討した。

まずキイロシヨウジヨウバエの w 遺伝子 DNA をプローブとして Southern hybridization 法を用いて $z Dp(1;1)w^{+R61e19}$ 染色体の w 遺伝子座の解析を行ない制限酵素断片地図を決定した。キイロシヨウジヨウバエの分子生物学や遺伝学でよく用いられる野生型の代表である Oregon-R と Canton-S の制限酵素断片地図も図10に示した。これらを比較すると、 $z Dp(1;1)w^{+R61e19}$ は w 遺伝子の構造遺伝子領域の右側で約12がタンデムに重複していることがわかる。他の w 遺伝子の研究と考え合わせると、この重複を持った染色体はプロモーターとスペーサー領域の重複であることが判明した。

上に述べた遺伝学的方法で不等姉妹染色分体交換の結果得られたと考えられるハエ ($z w^{*TOSH}$) の w 遺伝子座の DNA 構造を同様に調べた。図10に Southern hybridization の結果 (b) と、それに基づいて作成した $z w^{*TOSH}$ の w 遺伝子座の制限酵素断片地図 (a) を示した。詳細な説明は省くが、図10(b)では野生型の Canton-S のバンドパターンと $z w^{*TOSH}$ のそれとが非常によく似ており、もとの $z w^{+R61e19}$ 染色体からほとんど野生型に変化したことがわかる。 $z w^{*TOSH}$ が

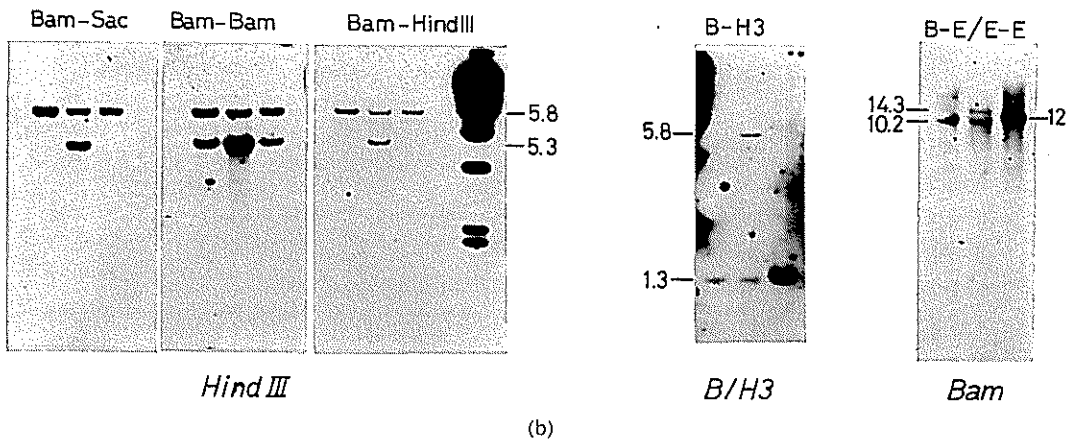
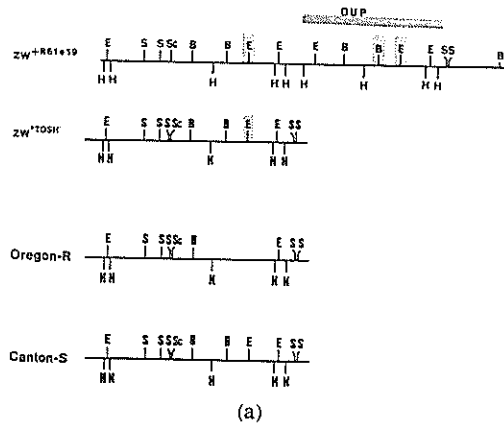


図 10. 不等姉妹染色体交換に用いた染色体の white 遺伝子領域の変化とその制限酵素断片地図。制限酵素認識部位は、B (BamH1) E (EcoR1), H (HindIII), S (Sall), Sc (Sacl) で示した。(a) 野生型 Canton-S・Oregon-R の制限酵素断片地図に異なっている部位を網かけで示した。zw⁺R61e10 とそれ由来の zw^{*}TOSH はその部位で入れ子構造になっていることに注意。(b) Southern hybridization: 電気泳動は各々左から Canton-S, zw⁺R61e10, zw^{*}TOSH の順である。数字は分子量を示し、上野制限酵素は用いたプローブ断片、下の制限酵素はゲノム DNA を切断するのに用いたものである。

zw⁺R61e10 由来であることは、上に述べた Canton-S と Oregon-R による制限酵素認識部位が異なる領域を入れ子構造に持っていた領域がそのまま残っていることから確認された。すなわち不等姉妹染色体交換により、w 遺伝子座の重複している部分はほぼ完全に欠失し、野生型のそれとほとんど同じ構造に変化したことが明らかである。残る問題はこの現象は染色体間でのみ起こるのか、同一染色体内で起こるのかという問題である。この研究は生物の適応といった応用分野だけでなく、細胞遺伝学的研究としてもかな

り重要なもので、染色体の変異を理解するのに意義のある発見と思われる。さらに不等姉妹染色体交換により生じた切断部位に各姉妹染色体交換毎に変異があるのか、zw^{*}TOSH 以外に得られた zw^{*}KOZ やモザイク個体として得られた zw^{*}MTF, zw^{*}SK において同様の研究を行なっている。

ヘテロクロマチンの量的変動の機構の研究対象として、ゆるやかな変化の機構を特に取り上げた。不等姉妹染色体交換は生殖細胞中においても発生し(頻度は 1.4×10^{-4})、集団への影響

を強く与え得る機構であることが判明した。特に生殖細胞の spermatogonia で発生し、還元分裂過程では起こらないことも確かめられた。分子生物学的にも、この変化は染色体の構造上の変化であり、遺伝子レベルの変化すなわち遺伝子の突然変異でないことも併せて確認できた。

今回の実験で得られた頻度は、ユウクロマチン内のほんの一部(約 10 kb)の重複部分で発生した現象であるので、ヘテロクロマチン DNA のように、何十万、何百万回と短い DNA 塩基配列が繰り返し反復している領域では、もっと高頻度で発生していることが考えられる。すなわちヘテロクロマチン領域での DNA の物理的な“長さ”は、かなりの高頻度で変化していることが予測できる。

3. 環境の変化に対応したヘテロクロマチンの量的変動

ヘテロクロマチンの量が変動する機構が明らかにされ、さらにその変動が、特定の染色体に限らずゲノム全体での組換え率、並びに組換えの位置をも変化させるものであることが判明した。環境への適応に必要な遺伝的変異には遺伝子の組換え頻度が重要な因子であることを考えると、環境の継続的な変化に対してヘテロクロマチンの量は変化し得るのかという問題が生じる。

この問題の解明に、キイロシヨウジヨウバエは材料としてはあまり適当ではない。なぜならばもしヘテロクロマチン量に変動があったとしても、それを正確に知る方法がないためである。細胞学的にヘテロクロマチンの大きさを測定するには誤差が大きすぎる心配がある。そのためにはもっと簡便で正確なヘテロクロマチンの変化を知る方法として B-染色体数の変化を調べることにした。世代の交代が速いシヨウジヨウバエのある種に B-染色体が存在すれば好都合である。世界各地から採集されたシヨウジヨウバエ属の系統から B-染色体を持つものを調査した結果、*Drosophila pseudo-ananassae nigrens*, *Drosophila malerkotliana malerkotliana* そして *Drosophila punjabiensis* の 3 種で B-染色体を発見した。*D. m. malerkotliana* では 32 の同一雌由来の系統中 8 系統においてか

なり高頻度に B-染色体が多型で存在していた。*D. punjabiensis* には B-染色体は存在していたがその頻度は低いものであった。

上記の目的の研究を進めるために環境の継続的な変化を与えるものとして DDT を用いて、DDT 抵抗性の獲得を環境への適応度の指標とした。DDT 抵抗性はキイロシヨウジヨウバエで古くから薬剤抵抗性に関する遺伝学的研究課題であり、遺伝学的には、ポリジーンによる支配を受けていることが知られている。集団中に多様な遺伝子を混在させ、組換え頻度の差により DDT 抵抗性が最も高くなるポリジーンの構成になる速度を決定することができる。この速度と B-染色体すなわちヘテロクロマチンの量との相関を調べるとというのがこの研究の目的である。

都立大学の戸張氏から譲渡された系統は *D. m. malerkotliana* 27 系統から雄と雌を 5 匹ずつ取り出しすべてを混合した集団を作成した。*D. m. malerkotliana* の 27 系統をすべて混合して作った集団における B-染色体の存在する頻度は 0-B が 66.7%, 1-B が 28.6% 2-B が 4.8% であった。B-染色体が維持されるかどうか心配されたがかなり高頻度に集団中に維持されていた。DDT の抵抗性は、DDT の濃度を 0.0125 mg/0.5 ml~0.125 mg/0.5 ml まで 5 段階の分け、それぞれの濃度をしみ込ませたる紙を飼育ビン中に置き、ハエと接触させた。各ビンに 100~300 匹のハエを入れその生存率を求めた。ED₅₀ 以上の濃度環境で生き残った個体群と、LD₅₀ 以上の濃度環境で生き残った個体群とを別々の飼育容器で継代飼育し、各世代ごとに同様に DDT 抵抗性を測定した。

キイロシヨウジヨウバエでは、野生集団から採集された、かなり大きな集団では、約 3 世代目から DDT 抵抗性を獲得してゆき 5~6 世代ではほぼそのピークに達する。しかし、同一雌由来の系統では野生型起源であっても抵抗性を獲得するに至らないことも報告されている。

本研究では、多数のハエを用いて ED₅₀ と ED₉₀ に分けて DDT に対する抵抗性を調べたが 5 世代後においても抵抗性を獲得しなかった。ヘテロク

ロマチンの量, すなわち B-染色体の数の変動にも大きな差がなく, 残念ながら途中で実験を断念せざるを得なかった。この原因としては用いた系統数 (27 系統) が母集団を構成するには少数であったためか, あるいは, *D. m. malerkotliana* として用いた 32 系統は同一種ではなく, 初めに作成した集団は, 実際はごく少数の系統から出発していたということが考えられる。

この点に関しては後ほど戸張氏から *D. m. malerkotliana* の分類は完成しているわけではなく, 非常に酷似しており, 分類されなかった近縁の種が初めの 32 系統中に混ざっていたかも知れないという報告もあり, 再検討する必要がある。32 系統すべてを混合して得られた B-染色体数の頻度が B-染色体を持つ系統のそれと同じであるという点も, 後者の可能性を示唆する。この研究により集団の適応にどれくらい組換え頻度が重要であるかを推定する予定であった。キイロショウジョウバエを用いて, DDT 抵抗性を獲得した集団中のハエはそうでないハエよりわずかながら高い頻度の組換え率を示す個体が多くなっているという報告も 1983 年に出されているおりでもあり, 遺伝学的に不活性な領域の機能を知る上で重要な研究であっただけに惜しまれる。海外から *D. m. malerkotliana* を採集し, 多数の系統を得ることができればこの生物学的適応というダイナミックな現象を実際に実験室でモニターしてその

機能をさぐることができると考えられる。研究の継続と発展が望まれる点である。

関連研究報告

山本雅敏: 構成ヘテロクロマチン. 蛋白質・核酸・酵素, 26, 694 (1981)

G.L.G. Miklos, A. C. Gill, 山本雅敏: 真核生物ゲノムにおける高度反復 DNA 塩基配列の分析. 蛋白質・核酸・酵素, 26, 726 (1981)

山本雅敏: ヘテロクロマチン (サテライト DNA) の機能に関する研究, 中間部介在ヘテロクロマチン (interstitial heterochromatin) と組換え頻度に及ぼす影響. 国立遺伝学研究所年報, 第 32 号, p. 26 (1982)

羽中田明子・山本雅敏: キイロショウジョウバエに於ける中間部介在ヘテロクロマチンの組換え頻度に及ぼす影響. 日本遺伝学雑誌, 57, 665 (1982)

Hanakata, A and M. Yamamoto: Supernumerary Y chromosomes and its polymorphism in *Drosophila punjabiensis*. *Natl. Inst. of Genet. Ann. Rep.*, 32, 73 (1982)

Yamamoto, M.: The effects of variation in heterochromatin content on recombination frequencies in *Drosophila melanogaster*. *ibid.*, 32, 80 (1982)

Hanakata, A and Yamamoto, M.: New series of segmental aneuploidy using transpositions between X and Y chromosomes, *ibid.*, 32, 74 (1982)

Yamamoto, M.: Genetic studies on spontaneous sisterchromatid exchanges in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*. *ibid.* in press

山本雅敏: 染色体操作法, 実験生物学講座, 第 13 巻, 遺伝 p. 155 (1984) 丸善出版

山本雅敏: 部分的異数性 昆虫のバイオテクノロジーマニユアル p. 183 (1984) 講談社サイエンティフィック