

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「植物における染色体機能要素の分子的解析と人工染色体の構築」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

村田 稔 (岡山大学資源生物科学研究所 教授)

主たる研究代表者

小谷博一 (かずさDNA研究所 室長(平成13年10月～))

遠藤 隆 (京都大学大学院農学研究科 教授(平成12年12月～))

辻本 壽 (鳥取大学農学部 教授(平成12年12月～))

星野 徹二 (岡山理科大学総合情報学部 教授(平成12年12月～))

赤木 宏守 (秋田県立大学生物資源科学部 助教授(平成13年10月～))

Heslop-Harrison, J.S. (レスター大学生物学科 教授(平成13年4月～))

3. 研究内容及び成果

### 3-1. 研究課題全体の研究内容

植物染色体の機能要素のうち最も重要な“セントロメア(動原体)”について、その DNA とタンパク質との相互作用を解析し、細胞分裂における“染色体分配”の機能がどのように制御されているかを解明する。さらに、これらの研究成果をもとに“人工染色体”の構築を目指した。なお各グループの研究課題は以下のとおり。

\* 岡山大学シロイヌナズナAグループ、かずさDNA研究所シロイヌナズナBグループ、秋田県立大学 DNA 塩基配列解析グループ:機能を持つセントロメア DNA 配列を特定するため、シロイヌナズナの Tr4S 系統に存在するミニ染色体(4S)及び2Sのセントロメアの構造を解析し、機能を持つ DNA 断片をクローニングする。この DNA の塩基配列を決定し、セントロメアに機能を付与できる最小単位を決定する。また、人工染色体のシーズとなる長鎖セントロメアDNAのクローニングを行う。

\* 鳥取大学タバコグループ:双子葉植物のセントロメア構造を解明するため、タバコやトレンシアなどのセントロメアに局在する反復配列を単離し、その分子構造を解析する。

\* 京都大学ムギグループ:単子葉植物のセントロメア構造を解明するため、ムギ類(特にコムギとオオムギ)のセントロメアに局在する反復配列を単離、解析し、その分子構造を解析する。また、コムギ-オオムギ間染色体転座系統を育成し、機能単位を特定する。

\* 岡山理科大学カヤツリグサグループ、岡山大学シロイヌナズナAグループ:イグサ科やカヤツリグサ科植物の分散型セントロメアの構造解析を行い、局在型セントロ

メアとの違いを明らかにする。

\*レスター大学結合タンパク質グループ、岡山大学シロイヌナズナAグループ:シロイヌナズナの染色体セントロメアDNAに特異的に結合するタンパク質を同定し、その構造と機能を解析する。また、近縁種のセントロメアDNAを単離、解析し、保存性の高い配列を特定する。

以下本研究により得られた主要成果を述べる。

### 3-2. 研究成果

#### 【セントロメアの機能を付与する DNA】

植物の染色体は、他の真核生物の染色体と同様に、染色体として機能するための要素(複製起点、テロメア、セントロメア)が含まれている。これら3機能要素のうち、セントロメアは、染色体の分配を司る重要な機能要素であるが、植物ではまだ、機能を直接付与するDNA配列は単離されていない。

- モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、染色体の分子構造を解析し、セントロメア領域に局在する反復配列を同定した。この反復配列は、約 180 bp を基本とし、縦列して 50 ~1200 kb にも及ぶクラスターを形成している。マクロ構造は、ヒトのセントロメアに局在する  $\alpha$  サテライトに類似するが、塩基配列にはほとんど類似性はない(岡山大学シロイヌナズナAグループ、かずさDNA研究所シロイヌナズナBグループ、秋田県立大学DNA塩基配列解析グループ)。
- 第4染色体の短腕に由来するミニ染色体(4S)を発見し、FISH(蛍光 in situ ハイブリダイゼーション)によりその構造を解析した。サイズは、第4染色体の4分の1ほどで、18S-5.8S-25S rDNA と 5S rDNA のクラスターをほぼ全域含んでいる。このミニ染色体の180-bp 反復配列を調べてみると、第4染色体のセントロメア領域に切断が起き、生じたものであると考えられた。この過剰染色体の次代への伝達率は、約 30%であった。セントロメアに局在する180-bp のクラスターサイズは1 Mb 近くあった(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。
- ミニ染色体 4S を過剰に持つ植物体は、表現型が野生型と大きく違わないため、ミニ染色体の存在を確認するには、個体ごとに染色体を調べる必要があった。そこで、この染色体にマーカー遺伝子(カナマイシン耐性遺伝子)を導入することを試み、ミニ染色体 4S(+Kan)を1対余分にもつ  $2n=12$  系統を育成することに成功した。また、この形質転換実験において、新たなミニ染色体(2S-A と 2S-D)と他の異常染色体(2S/1 と 2L)を発見した(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。
- これらの異常染色体は第2染色体に由来しており、ミニ染色体 2S-A の180-bp クラスターには、GFP とカナマイシン耐性両遺伝子が2コピー以上挿入されていた。このことから、挿入された遺伝子の発現がセントロメアのクロマチン構造を変化させ、切断が起きたと考えられた。このミニ染色体 2S のサイズは、ミニ染色体 4S とほぼ同じ 7.5 Mb と推定されたが、180-bp のクラスターサイズは、約 700 kb と、ミニ染色体4S よりも短いことがわかった(岡山

大学シロイヌナズナAグループ)。

- もう一つのミニ染色体2S-D は環状であり、二つのセントロメアを持っていることが明らかとなった。二つのセントロメアは同じ起源で、ともに活性があるにもかかわらず、2S-D 染色体は安定に次代に伝達される。個々のセントロメア(180-bp)サイズは約 500 kb と、これまでのミニ染色体の中で最も短い。二つのセントロメア間の距離が短いため(≈2 Mb)、安定化しているとも考えられる。これらの系統は、ミニ染色体を安定に保持し、その伝達率も比較的高い。セントロメアの機能を有する 500 kb の 180-bp クラスターは、YAC ベクターにクローン化できるサイズであり、シロイヌナズナのセントロメア機能配列を決定できる可能性が極めて高くなった。また、これらのミニ染色体系統は、今後、人工染色体を構築する際、非常に優れた基礎材料となる(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。

#### 【種に特異的なセントロメア DNA】

セントロメアの DNA 配列は、種ごとに大きく異なっており、本研究では、コムギなどの単子葉植物、タバコなどの双子葉植物についても、セントロメア DNA の一次構造を解析するよう計画した。また、カヤツリグサ科などの植物は、分散型の特徴的なセントロメアを持っていることから、この植物種についても解析することとした。

- ムギ類のセントロメア DNA 解析は、コムギのオオムギ染色体添加系統において染色体突然変異を誘発し、コムギ・オオムギ染色体がセントロメア領域で転座した系統を複数育成し検討した。コムギ、オオムギそれぞれに特異的な反復配列を両方持つ染色体ばかりでなく、両反復配列を持たない染色体も確認された。この結果は、既報の反復配列がムギ類のセントロメア機能に重要な役割を果たしているという説に大きな疑問を投げかけることとなった。既知のセントロメア配列が見つからないオオムギの片腕染色体(7HS-86telo)には、複数のキネトコアタンパク質の局在が確認されたことから、ヒトなどで見つかっている”ネオセントロメア(セントロメア特異的 DNA 配列がないのにもかかわらず、セントロメアとして機能する領域)”である可能性もある(京都大学ムギグループ)。
- コムギの A、Bゲノム染色体及びライムギ染色体のセントロメアに局在する新規の反復配列をクローニングした。コムギの D-ゲノムやオオムギ染色体には、ほとんど存在しないが、中にマイクロサテライトを含む 300 塩基対とマイクロサテライトを含まない 250 塩基対を単位とするものが存在し、後者は縦列型、前者は散在型であることが示された。また、これまで報告されている Ty3/ gypsy レトロトランスポゾンと一部アミノ酸レベルで相同性が認められた(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。
- タバコにおいてもセントロメア特異的な反復配列の同定を試みてきたが、まだ成功していない。トレニアからは、セントロメア特異的な縦列型反復配列が単離された(鳥取大学タバコグループ)。
- スゲ属(ツクシミノボロスゲ、ケタガネソウ)およびハリイ属植物(ヌマハリイ)の3種よりセントロメアに局在すると考えられる Ty3/ gypsy 型レトロトランスポゾンを PCR 法により単離した。これら3種の Ty3/ gypsy 配列はイネやシロイヌナズナのレトロトランスポゾンのアミノ酸配列

と高い相同性を示した。単離された Ty3/ gypsy をプローブとしてケタガネソウとヌマハリイの染色体に FISH を行なったところ、体細胞分裂および減数分裂中期染色体の全長にわたって顆粒状に連続したシグナルが見られた(岡山理科大学カヤツリグサグループ)。

#### 【セントロメアに局在するタンパク質】

酵母では、60種以上のタンパク質がセントロメアに局在していることが知られているが、植物では、ほとんど調べられていない。本研究では、シロイヌナズナやコムギなどから、ヒトや酵母で見つかっている CENP(セントロメアタンパク質) 遺伝子のホモログを探索、単離、解析した。

- シロイヌナズナのデータベースから、ヒトの CENP-A と CENP-C に対するホモログを同定し、推定されたアミノ酸配列をもとに抗体を作成し、間接免疫抗体法から、両タンパク質とも、セントロメア特異的 180-bp 反復配列と共局在することが示された(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。
- これらのタンパク質が、180-bp クラスターの全領域には存在せず、一部にのみ存在していることが、新たに開発したクロマチンファイバー法により明らかとなった。セントロメアタンパク質を集めうる 180-bp の特異性を決定することは、今後の大きな課題である(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。
- これらのセントロメアタンパク質以外に、シロイヌナズナでは、分裂酵母 Mis12 のホモログ AtMIS12 と出芽酵母 Cpf1 のホモログ CHZ を同定し、cDNA をクローン化した。また、AtMIS12 については、推定されるアミノ酸配列をもとにペプチド抗体を作製した。間接免疫抗体法と GFP 融合法により、両タンパク質とも、セントロメアに局在する 180-bp 反復配列と共局在することを明らかにした(岡山大学シロイヌナズナAグループ、レスター大学結合タンパク質グループ)。
- コムギからは、紡錘体形成チェックポイントタンパク質 MAD2 をコードする遺伝子のホモログを単離した。6 倍性コムギでは、少なくとも 3 コピー存在し、第 2 群染色体に座乗することを明らかにした。3 コピーともに細胞分裂の盛んな組織(幼穂、根端)で発現しているが、分裂の乏しい緑葉では発現していないことも明らかとなった。分裂期の細胞内局在を間接蛍光抗体法で調べると、体細胞分裂中期のコムギ染色体のセントロメア部位にシグナルが観察されたが、分裂後期、終期には見出されなかった。
- また、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の相同配列をコムギの EST データベースの検索により抽出し、完全長 cDNA 配列を単離し、そのゲノム配列も同定した。このコムギホモログをシロイヌナズナの LHP1 と比較したところ、コムギでは全てのイントロンが失われていることが明らかとなった(京都大学ムギグループ)。
- 分散型セントロメアをもつルズラ( *Luzula nivea*)から、ヒストン H3 変異体(CENP-A のホモログ、CENH3 とも言う)タンパク質をコードする遺伝子の全長cDNA をクローニングすることに成功した。推定アミノ酸配列をもとに作製したペプチド抗体の間接免疫抗体染色により、分散型セントロメアが植物で初めて可視化され、その動的な変化も明らかにした(岡山

大学シロイヌナズナAグループ)。

#### 【人工染色体構築の試み】

ヒト人工染色体の構築には、既存の染色体を加工し、小型化するトップダウン法とクローン化したセントロメア DNA を直接細胞に導入するボトムアップ法が試みられてきた。しかし、植物ではどちらの方法も実用化されていない。

○シロイヌナズナにおいて、数種のミニ染色体を発見、創出した。これらのうち、サイズ約4 Mb のミニ2S-D は、ダイセントリック(二動原体型)環状染色体でありながら、安定に伝達されるので、今後、トップダウン方式による人工染色体構築に利用できる(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。

○大腸菌中での不安定性を克服し、比較的安定な長鎖 180-bp クラスター(約 100 kb)を BiBAC ベクターにクローン化することに成功した。しかし、アグロバクテリウムを介した導入法では、再現性のある結果を得ることができなかった。今後、セントロメア活性を付与できる 500 kb の 180-bp クラスターがミニ 2S-D 染色体上に同定されているので、これを YAC や BAC ベクターに移すことにより、ボトムアップ法による人工染色体の構築が現実的なものになってきている(岡山大学シロイヌナズナAグループ)。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待:口頭		ポスター		報道	特許
国内	国外	国内	国外	国内	国外		
6	26	64	11	21	11	2	11

○幾つかの重要な論文は出ているが、全体としてはやや不足の感はゆがめない。とくに、本研究が目標としている人工染色体の構築やその基盤となるセントロメアに関する成果論文が多くはない。現在進行中の成果を纏められることを期待する。

○もともと本研究課題は工業的所有権とはほとんど関係のないところでなされた研究である。こうした基礎的なところでも、染色体解析方法、染色体動態解析方法などで出願(11件)していることは評価したい。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、最終目標とした植物の人工染色体の構築は狙ったターゲットが大きいとはいえず残念ながら達成されなかった。もし、この研究目標がセントロメアの構造に特化したものであったとしたなら、新しい知見も得られているのでその評価は自ずと違ったものとなる。例えば、シロイヌナズナのミニ染色体のセントロメア構造解析とともに他種植物のセントロメア構造の解析およびセントロメア結合タンパク質の解析が進展したことは評価されるべき成果である。特に、コムギの大麦染色体添加系統の解析から、コムギ・オオムギに特異的

反復配列をもたない染色体を見出したことは、麦類のセントロメア機能における反復配列の役割を考える上で重要な発見であるといえる。

○科学技術の貢献に関しては、植物のセントロメア構造の理解は進んだと言えるが、本研究の当初の目標、人工染色体の構築からすると未だ道半ばである。セントロメア構造とそれに結合するクロマチンたんぱく質に関する研究成果にしても、動植物全体を通してクロマチン構造として見たときのセントロメア構造について更なる展開が欲しい。一方、複数のチームが協力して多種類のセントロメア構造の解析に取り組み、植物のセントロメアの多様性を明らかにしてきたことは評価でき、今後の研究に貢献するものと考えられる。植物の人工染色体の構築に関しては、国際的に競争の激しい分野であるが、未だ差をつけたあるいは逆に差を付けられた状況にはなく、今後の展開に期待するところ大である。このような研究開発は何処かで誰かがする必要があり、かつこれからの植物科学の進展にとって重要な研究テーマであることには間違いないのだから。

○今後の展開としては、既に述べたように、本研究プロジェクトによって植物の人工染色体の構築に向けての基礎的知見の集積はあったものの、実用化に向けては道半ばの感である。研究代表者等はこのプロジェクト終了後も、重要ではあるが極めて難しい本研究課題をどのような戦略で攻めるのか、CRESTでの成果を基礎にして努力して欲しい。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○受賞歴として、日本遺伝学会奨励賞(2001)(坂本 亘);日本遺伝学会ベストペーパー賞(2005)(横田悦子、柴田洋、村田稔);日本遺伝学会奨励賞(2005)(那須田周平);日本遺伝学会ベストペーパー賞(2005)(芦田安代、松岡由浩、那須田周平、遠藤隆);Faculty of 1000(2005)(長岐清孝、柏原壱成、村田稔);Faculty of 1000(2005)(佐藤、柴田洋、村田稔)以上6件。

○本プロジェクトは、今後植物科学がゲノム情報を利用した分子育種を進める上で解決しなければならない技術である。このプロジェクトが目指した課題は極めて重要であり、かつ困難なものであることを改めてここで特記しておきたい。このようなチャレンジングな課題をCRESTのような大型のプロジェクトで果敢に取り上げていくことは必要と考える。