

「植物の機能と制御」

平成 12 年度採択研究代表者

村田 稔

(岡山大学資源生物科学研究所 教授)

「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」

1. 研究実施の概要

植物の染色体は、3つの機能要素(セントロメア、テロメア、複製起点)によって維持されている。本研究では、最も重要な機能要素、セントロメアについて、その DNA 構造とタンパク質との相互作用を解析し、“分配”という機能がどのように制御されているかを解明する。現在まで、シロイヌナズナにおいて、数メガ塩基対(Mb)のミニ染色体を発見し、そのセントロメアが予想されるより格段に短いことを明らかにした。今後は、このミニ染色体のセントロメア構造を明らかにするとともに、遺伝子工学的手法によりこれを改変し、新たな巨大 DNA クローニングベクターとなる“植物人工染色体”の構築をめざす。また、他の植物においてもセントロメアを解析し、共通する高次構造を明らかにする。

2. 研究実施内容

(1) シロイヌナズナのミニ染色体の構造解析

【研究目的】これまでの研究から、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の第4染色体短腕に由来するミニ染色体は、6Mb ほどのサイズで、セントロメアに局在する 180-bp 反復配列のクラスターが正常の第4染色体よりもかなり短いことが示めされた。この染色体の次代への伝達率は比較的高く(約 30%)、減数分裂においても、セントロメアの機能は正常であると考えられる。そこで、このユニークなミニ染色体のセントロメア領域の詳細な解析を試みるとともに、安定性についても調べた。【方法】ゲノム配列解析を基本とした方法により、コロンビア株の4番染色体セントロメアの構造解析を行うとともに、ミニ染色体4Sに特異的なDNAマーカーを探した。また、このミニ染色体4Sを保持するランズバーグ株には、花成早化や低形質転換率などの欠点があるため、5代にわたりコロンビア株に戻し交雑を行い、ミニ染色体の伝達率を調べた。【結果】ゲノムウォーキングにより第4染色体セントロメア領域のBACクローンをあらたに分離し、約100kbの塩基配列を決定した。その結果、このセントロメア領域は、ゲノムプロジェクトの報告より3Mb以上も長いことが示された。さらに、ランズバーグ株由来4Sミニ染色体のセントロメア領域に特異的なマーカー(CAPS, SSLP)を同定した。ランズバーグ株でのミニ染色体の伝達は、主に雌性側に限られていたが、コロンビア株に移した場合、自殖個体の50%以上にミニ染色体が伝達された。また、ミニ染色体を2つ保持する個体(5%ほど)も出現したことから、花粉からの伝達を回復させる遺伝的要因が存在することが示唆された。こ

の戻し交雑系統においては、ミニ染色体は起源した第4染色体と対合しないことが減数分裂の観察から明らかとなったが、ミニ染色体どうしの対合については現在解析中である。もし対合するようであれば、 $2n=12$ の系統を育成できることになる。

(2) ミニ染色体の短縮化とタギング

【研究目的】ミニ染色体には、18S-25S リボソーム RNA 遺伝子のクラスターがほぼ全域座乗しているが、形態的な異常は特に観察されない。しかし、このリボソーム遺伝子のクラスターは 3Mb にも及ぶと推定されており、これらの領域を切除することは、このミニ染色体を解析する上で重要である。そこで、外来テロメアを挿入することにより、染色体の切断を試みた。【方法】シロイヌナズナのテロメア DNA (約 350bp) をバイナリーベクターに挿入し、アグロバクテリウムを介して Tr4SCo5 系統に導入した。導入された染色体部位は、FISH (蛍光 in situ ハイブルダイゼーション) 法により決定した。【結果】バキューム in planta 形質転換法を用いて、ミニ染色体を保持する個体の形質転換を行った。現在まで、百数個体の形質転換体を得ているが、まだ、ミニ染色体にカナマイシン耐性遺伝子が挿入された個体は見つかっていない。染色体のサイズから、ミニ染色体に挿入される確率は、1%ほどと計算されるが、(1) で見つかったダブルミニ染色体系統を利用すれば、確率を倍にすることができる。ミニ染色体保持系統は、正常系統と形態的な違いが全く見られないため、マーカー遺伝子によってタグされた系統は、今後非常に優れた実験材料となると考えられる。

(3) セントロメア反復配列(180-bp)の導入

【研究目的】シロイヌナズナのセントロメアに局在する 180-bp ファミリーは、セントロメアの機能に重要な役割を果たしていると考えられるが、大腸菌やアグロバクテリウム中では、長鎖の反復配列は不安定となり、直接細胞に導入することが難しい。そこで、長い 180-bp クラスターを安定に保持する BAC クローンを選抜した。【方法と結果】シロイヌナズナのゲノム DNA から、PCR により約 6kb の 180-bp クラスターを増幅し、pBeloBac11 にクローニングした。このクローンから、再度 PCR により 6kb 断片を得、それを同クローンに挿入し、12kb のインサートを持つクローンを得た。この操作を繰り返し、現在では、約 30kb の 180-bp クラスターを安定に保持するクローンを得ている。今後は、60kb までインサートを増長させ、マーカー遺伝子とともに細胞に導入する予定である。

(4) シロイヌナズナ近縁種のセントロメア DNA 比較と結合タンパク質の解析

セントロメア DNA は、他のゲノム領域に比べて非常に速く進化していると言われている。しかし、機能的に重要なタンパク質の結合部位では、その進化は遅いことが推定される。そこで、シロイヌナズナの近縁種 *A. griffithiana* と *A. pumila* から、セントロメア DNA を単離し、その塩基配列を決定した。これらをシロイヌナズナ、*A. arenosa* のセントロメア DNA 配列と比較したところ、特定の部位が非常に保存されていることが明らかとなった。この結果は、我々のゲルシフト分析の結果ともよく一致し、特定のタンパク質が、セントロメア DNA の特定の部位に結合していることを示唆する。現在、Biacore 装置を用いることにより、詳細な解析を進めるとともに、この保存された領域に結合するタンパク質を探索している。

(5) コムギ・オオムギ染色体間のセントロメア転座系統の作製

ムギ類のセントロメア DNA は、複雑な構造をしていることが示されており、機能に直接結びつく

DNA 配列は同定されていない。そこで、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た。これらの染色体が既知のセントロメア特異的の反復配列を持つのかを検証したところ、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。現在、さらに多くの安定的に伝達するダイセントリック(二動原体)染色体系統の単離を進めている。また、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。この配列は、ライムギの染色体を解析している際、コムギの近縁種クサビコムギに同定されたものである。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を示した。

(6) コムギ MAD2 遺伝子の単離

セントロメアの最も重要な役割の一つは、細胞分裂において正常に微小管(紡錘糸)と結合し、紡錘体を形成することにある。広く真核生物においては、正常な紡錘糸付着は MAD2 と呼ばれるチェックポイントタンパク質によって監視されている。紡錘糸の正常付着を分子レベルで記述する事を目的とし、我々はコムギのMAD2 遺伝子を単離した。その結果、コムギでは複数のMAD2 遺伝子が発現しており、それらはアミノ酸レベルでトウモロコシ、アラビドプシスの配列と高い相同性を持つことが判明した。

(7) ナス科植物セントロメア配列の探索と、長鎖 DNA 配列形質転換系の確立

シロイヌナズナ、ムギ類以外には、セントロメア DNA の解析は進んでいない。そこで、プロトプラストによる形質転換が容易なナス科(特にタバコ)のセントロメア DNA を特定する試みを行っている。まず、ペチュニアのBACライブラリーから、最近見つかったセントロメア特異的配列(低頻度反復配列)をプローブにして 68 個のクローンを選抜した。これらクローンを制限酵素で切断し、複数の新規反復配列をサブクローニングした。現在これら配列の染色体上の位置を決定するためFISHを行っているが、セントロメアに局在するものも見つかった。

(8) 樹脂包埋組織切片に対する蛍光 *in situ* hybridization 法の開発

特定 DNA 配列の細胞内での機能を調べるためには、細胞内での染色体の行動と配列の関係を調べなければならない。しかし、従来の方法では、組織の形状を保つことが難しく、信頼性の高いデータを得ることが困難であった。そこで今回、分裂組織を親水性の樹脂で包埋することにより、解像度の高い蛍光 *in situ* hybridization 法を開発した。

(9) 分散型セントロメアの構造解析

多くの植物種のセントロメアは局在型であり、染色体の1カ所に局在している。それに対し、セントロメアが染色体上に多数分散しているものも少数種存在しているが、これらのセントロメア構造については、まだほとんど研究されていない。そこで、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 gypsy 型レトロトランスポゾン PCR 法により単離した。これら3種の gypsy 配列はイネやアラビドプシス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 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。このことから、クローニングされた DNA は、染色体上に散在しているセントロメア配列であることが推定された。

3. 研究実施体制

(1) シロイヌナズナ A グループ

- ① 研究分担グループ長名: 村田 稔(岡山大学資源生物科学研究所、教授)
- ② 研究項目: シロイヌナズナのセントロメア解析

(2) シロイヌナズナ B グループ

- ① 研究分担グループ長名: 小谷博一(かずさDNA研究所、室長)
- ② 研究項目: シロイヌナズナ第4染色体セントロメアの解析

(3) タバコグループ

- ① 研究分担グループ長名: 辻本 壽(横浜市立大学木原生物学研究所、助教授)
- ② 研究項目: ナス科植物のセントロメア配列の特定

(4) ムギグループ

- ① 研究グループ長名: 遠藤 隆(京都大学大学院農学研究科、教授)
- ② 研究項目: ムギ類のセントロメア解析

(5) カヤツリグサグループ

- ① 研究分担グループ長名: 星野卓二(岡山理科大学総合情報学部、教授)
- ② 研究項目: 分散型セントロメア配列の特定

(6) 結合タンパク質グループ

- ① 研究分担グループ長名: Heslop-Harrison, J. S. (レスター大学生物学科、教授)
- ② 研究項目: セントロメア結合タンパク質の解析

(7) DNA 塩基配列解析グループ

- ① 研究分担グループ長名: 赤木宏守(秋田県立大学生物資源科学部、助教授)
- ② 研究項目: 長鎖 DNA 及び EST の解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Mochida, K, Tsujimoto, H. 2001. Development of a genomic *in situ* hybridization method using Technovit 7100 sections of early wheat embryo. *Biotechnic and Histochemistry* 76:257-260.
- Kagawa, N., Nagaki, K., Tsujimoto, H. 2002. Tetrad-FISH analysis reveals recombination suppression by interstitial heterochromatin sequences in rye, *Secale cereale*. *Mol. Genet.*

Genomics. 267:10-15.

- Serizawa, N., Nasuda, N., Shi, F., Endo, T. R., Prodanovic, S., Schubert, I., Kunzel, G. 2001. Deletion-based physical mapping of barley chromosome 7H. *Theor. Appl. Genet.* 103: 827-834
- Cheng, Z-J., Murata, M. 2002. Loss of chromosomes 2R and 5RS in octoploid triticales selected for agronomic traits. *Genes Genet. Syst.* 77:23-29.

(2) 特許出願

1. 国内出願 4件
2. 外国出願 なし