

「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、細胞分裂における“染色体分配”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、コムギ、トレニアおよびカヤツリグサからセントロメアに局在する反復配列を単離し、その一次構造を明らかにした。また、シロイヌナズナで発見されたミニ染色体について、セントロメア構造を解析し、その機能単位が1Mbほどであると推定した。今後は、このミニ染色体を遺伝子工学的手法により改変し、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、セントロメアDNAに特異的に結合するタンパク質の同定を進め、植物と他の真核生物に共通するセントロメアの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

これまでの研究から、ランズバーグ株の第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染色体よりも短いことが示唆されている。今回は、元株（ランズバーグ）に5代にわたりコロンビア株を戻し交雑して育成した系統(Tr4SCo5)を用い、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）により、ミニ染色体のセントロメアサイズを推定した。その結果、起源した第4染色体のセントロメアよりもかなり短く、約1Mbと推定された。ただ、交配過程でコロンビア株との間に組換えが起こっていたため、今後、さらなる解析が必要であることがわかった。

(2) ミニ染色体のタギング

ミニ染色体4Sのサイズをさらに短縮化する目的で、シロイヌナズナのテロメアDNA（約350bp）をTr4SCo5系統に導入した。得られた数百個体の形質転換体について、FISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）法により、ミニ染色体への挿入をスクリーニングしたところ、1個体の4Sにカナマイシン耐性遺伝子の挿入が確認された。しかし、他の部位に

も挿入が起こっているため、後代で分離した個体をスクリーニングする必要がある。また、4S染色体はヘテロクロマチン化しているため、ジーンサイレングが起きていることも予想された。

(3) 長鎖セントロメア反復配列クローンの構築

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直接関わっていると考えられるが、この長い反復配列をクローニングすると大腸菌の中で不安定となる。そこで、安定な長鎖180-bpクラスターを得るため、ロングPCRを行い、約9kbの配列をBACにクローン化した。これを元に増幅を繰り返し、約100kbを安定に保持するBACクローンを得ることに成功した。現在、これを植物に導入している。

(4) シロイヌナズナのセントロメアDNA結合タンパク質の解析

セントロメアDNAに結合するタンパク質としては、ヒストンH3変異体（CENP-Aなど）が知られているだけである。そこで、シロイヌナズナの180-bpファミリーに特異的に結合するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーにより探索した。その結果、数種のタンパク質が回収され、現在、ゲルシフトアッセイによる特異性確認と、種類の特定を急いでいる。また、Biacore法にも改良を加え、効率的な解析が可能となった。

(5) ムギ類セントロメア部位における構造異常染色体の単離

オオムギ染色体一対がコムギゲノムに添加された系統を材料とし、セントロメア領域の構造異常を誘発した。その結果、既知のセントロメア特異的反復配列を持たないが、後代に安定的に伝達するロバートソン型転座染色体や同腕染色体を保持する個体を発見した。また、スクリーニングの過程で、後代に安定的に伝達するダイセントリック（二動原体）染色体系統も単離した。この染色体上の二つのセントロメアについて、現在、微小管の付着や機能タンパク質の局在を調べている。

(6) コムギMAD2遺伝子の単離

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コムギホモログを単離した。6倍性コムギで同遺伝子は、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が明らかとなった。RT-PCRとPCR-RFLPを組み合わせた解析から、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。推定アミノ酸配列に基づき作成したペプチド抗体を用いたウエスタンブロッティングでは、大腸菌で発現したコムギMAD2タンパク質と反応した。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。

(7) セントロメア結合性タンパク質CENP-Aのコムギホモログの単離

ヒトなどの解析から、キネトコア構成タンパク質のうち、ヒストンH3の変異型であるCENP-Aがセントロメア特異的なヌクレオソーム構造の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。そこで、コムギヒストンH3配列の相同配列をコムギのESTデータベースより抽出したところ、N末配列が明らかにヒストンH3と異なる7配列を得た。既知のシロイヌナズナ、トウモロコシ、酵母のCENP-Aのアミノ酸配列を含めたクラスター分

析から候補を絞り込み、遺伝子の全長の単離を試みている。

(8) コムギのセントロメア反復配列の解析

コムギのセントロメア縦列型反復配列が、オオハマニンニクの末端ヘテロクロマチン配列と同一であることを見出した。そこで、オオハマニンニクの末端ヘテロクロマチン配列にセントロメアとしての機能があるかを調べるため、オオハマニンニクの染色体添加コムギ系統に重イオンビームを照射し、染色体切断系統を育成した。現在、後代への伝達とセントロメア配列の関係を調査している。また、オオハマニンニクの染色体末端のヘテロクロマチンの染色体対合に及ぼす影響を調査したところ、ヘテロクロマチンは対合に全く関与しておらず、対合開始点はヘテロクロマチンの内側であることが明らかとなった。

(9) トレニアのセントロメア反復配列のクローニングと胚嚢細胞への3次元FISH

トレニア (*Torenia fournieri*) から、セントロメアに局在する52bpの縦列型配列を同定した。パキテン分析の結果、この配列がヘテロクロマチンだけでなくセントロメアそのものに存在することが明らかとなった。同様の配列はトレニア属の別種や別属の種にも存在したが、近縁の *T. baironii* には別型の反復配列が存在した。現在、雑種におけるこれら反復配列の動態を調べている。

(10) コムギとトウモロコシの雑種におけるセントロメアの機能不全の解析

コムギの卵細胞とトウモロコシの精細胞との受精において両方の核が融合することを、GISH法により明らかにした。共焦点顕微鏡による解析では、トウモロコシ染色体は前期において、染色体の赤道板への移動が遅れ、接合子の第一分裂において、極に移動せず赤道板に取り残され、娘細胞には入らないことがわかった。この原因は、紡錘糸がセントロメアに付着しないためであることが、免疫抗体染色法により明らかになった。

(11) 分散型セントロメアの構造解析

*gypsy*型のレトロトランスポゾンが、高等植物のセントロメア領域に局在することが確認されている。そこで、この *gypsy* が分散型動原体を持つカヤツリグサ科植物の染色体に存在するかを調べた。オオムギの *gypsy* 配列をもとにプライマーを設計し、カヤツリグサ科植物のレトロトランスポゾンをクローニング後、塩基配列を決定した。本年度新たに、カヤツリグサ科4属4種と大型の染色体を持つ *Luzula elegans* の *gypsy* 遺伝子を決定した。アミノ酸の相同性を比較した結果、種間で高い値が得られた。これらのことから、非局在型動原体染色体も局在型と同様な *gypsy* 型レトロトランスポゾンが存在することが推定された。さらに、ササノハスゲの *gypsy* をプローブとしてケタガネソウ、ヌマハリイ、*Luzula elegans* にFISHを行なったところ、染色体全長にわたって顆粒状のシグナルが観察され、セントロメアの分布との関連が示唆された。

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（鳥取大学農学部、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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Murata, M. 2002. Telomeres and centromeres in plants. *Current Genomics* 3(6):527-538.
- Kishii, M., Tsujimoto, H. 2002. Genus-specific localization of the Tail family of tandem-repetitive sequences in either the centromeric or subtelomeric regions in Triticeae species (Poaceae) and its evolution in wheat. *Genome*. 45(5):946-55.
- Schwarzacher, T. 2003. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescence *in situ* hybridization data in plants. *J. Exp. Bot.* 54:11-23.
- Heslop-Harrison, J. S., Brandes, A., Schwarzacher, T. 2003. Tandemly repeated DNA sequences and centromeric chromosomal regions of *Arabidopsis* species *Chromosome Res.* 11(3):241-253.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数 4（CREST研究期間累積件数 8）