

「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。これまで、シロイヌナズナ、コムギ、トレニアからセントロメアに局在するDNA反復配列を単離し、その一次構造を明らかにした。本年度は、シロイヌナズナとコムギから、セントロメアに特異的に局在するタンパク質を数種同定し、これらに対する抗体からそれらのセントロメア局在性を確認した。今後はこれらの抗体を用い、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。また、シロイヌナズナで発見されたミニ染色体について、マーカーとなる薬剤耐性遺伝子を導入することに成功した。このミニ染色体をさらに短縮化することにより、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”の構築が可能となると思われる。

### 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、シロイヌナズナのミニ染色体4Sでは、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。そこで、ランズバーグ由来の4S染色体を保有するコロンビア株Tr4SCo5において、4Sのセントロメア領域がコロンビア株第4染色体セントロメア領域と置き換わった組換え体を分離した。この株を用い、第4染色体セントロメア領域の構造をパルスフィールドゲル電気泳動により解析したところ、コロンビア株とは異なりランズバーグ株由来の切断パターンを示した。このことは、コロンビア株とランズバーグ株とではセントロメア内部でのレトロトランスポソンの分布が異なることを示唆している。また、切断パターンの解析により、Tr4S由来と考えられるセントロメア領域は少なくとも1.7メガベース以上と推定された。

#### (2) ミニ染色体のタグging

ミニ染色体4Sを解析するため、カナマイシン耐性遺伝子やGFP（緑色蛍光タンパク

質) 遺伝子を *in planta*法で導入した。その結果、カナマイシン耐性遺伝子をミニ4S内に取り込んだ形質転換体が一系統得られた。この系統では、自殖種子のほぼ全てが2つのミニ染色体を保持する ( $2n=12$ )。また、GFP遺伝子を導入した際、異常な染色体構成を示す個体が得られた。その後代では、新規のミニ染色体2S (第2染色体短腕由来) が得られ、GFP遺伝子の挿入が認められた。今後は、これらミニ染色体のさらなる短縮化を図る。

### (3) 長鎖セントロメア反復配列クローンの導入

シロイヌナズナのセントロメアに局在する180-bpファミリーを増幅し、その約100kbを安定に保持するBACクローンを得た。これを、アグロバクテリウムを介して、植物体に導入したところ、数個体の形質転換体を得られた。現在、これら形質転換体の詳細な解析を進めている。

### (4) セントロメア特異的タンパク質の可視化

シロイヌナズナのセントロメアタンパク質のうち、CENP-AホモログであるHTR12タンパク質とCENP-Cホモログ (AtCENP-Cと名付けた) の抗体を作成し、間接免疫抗体法により調べた。その結果、両タンパク質とも、セントロメアに局在する180-bp反復配列が存在する部位に可視化された。このことから、180-bpとセントロメア活性が直に関連していることが明らかとなった。さらには、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。

### (5) オオムギにおけるセントロメア領域構造異常染色体の解析

配偶子致死染色体により誘発したオオムギの構造異常7H染色体を分子細胞遺伝学的にスクリーニングして、セントロメア領域に構造異常を持つ片腕染色体 (7HS-86telo) を得た。この染色体は正常7H染色体が有する動原体特異的レトロトランスポゾンもマイクロサテライト配列も有しない。しかし、後代に安定して伝達し、機能的セントロメア領域に特異的なヒストンH3のリン酸化も起こっていることが明らかとなった。さらに、高等植物のキネトコアの内層に局在するとされるSkp1タンパク質も蛍光抗体法で確認された。以上の結果は、この構造異常染色体が正常なセントロメア機能を有することを意味し、既報の反復配列がセントロメア機能に必須でないことを示唆する。

### (6) コムギMAD2タンパク質の細胞内局在に関する解析

紡錘体形成チェックポイントタンパク質MAD2のコムギホモログ遺伝子を単離し、その推定アミノ酸配列からペプチド抗体を作成した。これを用いウエスタンブロットティング法で調べたところ、コムギ幼穂から抽出したタンパク質中に単一のバンドが確認された。また、間接蛍光抗体法では、細胞周期依存的に局在パターンが変化することが示された。これらの結果は、コムギMAD2タンパク質がこれまで報告された高等動物のホモログと同様の機能を担うことを示唆する。

### (7) ヘテロクロマチンタンパク質HP1のコムギホモログの単離

高等植物のセントロメア領域は高度にヘテロクロマチン化している。そこで、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データベース検索により抽出し、完全長cDNA配列をRACE法、RT-PCR法により単離し、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。推定アミノ酸配列に基づいて作成したペプチド抗体による間接蛍光抗体法により、同タンパク質が細胞核に局在することが明らかになったので、今後、ムギ類において染色体分染法で明らかにされたヘテロクロマチン領域との対応、メチル化DNAとメチル化ヒストンH3との共局在性の調査を行う予定である。

#### (8) 種属間交雑におけるトレニア染色体脱落とセントロメアの核内配置の解析

昨年度単離したトレニア (*Torenia fournieri*) のセントロメア局在反復配列と類似の配列をトレニア属の別種バイロニー (*T. bailonii*) においてクローニングした。両配列は、ともに52 bpを単位とする縦列型反復配列であったが、相同性が低く (52%)、互いに蛍光 *in situ* hybridization (FISH) 法によって区別することができた。これまでに開発した、3次元FISH法において、これら両配列をプローブに用いることにより、種間交雑の受精過程におけるセントロメアの行動を、立体的に解析することができた。そこで、実際に *T. fournieri* に *T. bailonii* を交雑し、雌雄配偶子由来のセントロメアの核内配置を調査した。その結果、受精細胞核において異種動原体が明瞭に分離していることを明らかにすることができた。さらに、異種セントロメアの核内分離はその後も続き、種子、およびそこから発芽して得られる個体の茎葉、花でも続くことが明らかになった。

#### (9) 染色体脱落を誘発するトレニア種間の発見

トレニアと同属別種および近縁異属種の交雑を大規模に行った。その結果、染色体脱落とそれに続く染色体の自然倍加を誘発する交雑組み合わせを発見した。両種の動原体は、異なる反復配列をもち、これらを用いて脱落の過程 (セントロメアの機能不全と思われる) を追跡することができる。

#### (10) セントロメアヘテロクロマチンの蛍光抗体染色法の開発

コムギ×トウモロコシや、トレニア異種間雑種で見られる染色体脱落現象は、異種間でのセントロメアタンパク質のミスマッチによって起こると思われる。これまでに、受精卵や受精初期胚の細胞を3次元観察する方法を開発してきた。この方法を、さらに改良し、間接蛍光抗体法でセントロメアタンパク質を観察するための方法を開発した。抗体として、広範囲の動植物共通のセントロメアマーカー (抗リン酸化ヒストン抗体および抗  $\alpha$  チューブリン抗体) を用いた。その結果、立体的な細胞のセントロメアにおいて明瞭なシグナルを観察することができた。現在、コムギのセントロメアタンパク質の抗体を作成しており、これらのタンパク質を解析することによって、脱落の原因を明らかにできると考えている。

#### (11) 分散型セントロメアの構造解析

RAPD法により、今回新たに同定された反復配列2種 (約2kb) をクローニングした。塩

基配列を決定したところ、Ty/copia型のレトロトランスポゾンと相同性が高かった。得られたクローンをプローブとしてFISHを行なったところ、すべての染色体に散在するシグナルが観察された。現在、他の配列との関連を調べている。

### 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

- Cheng, Z-J., Murata, M. 2003. A centromeric tandem repeat family originating from a part of Ty3/gypsy-retroelement in wheat and its relatives. *Genetics* 164:665-672.
- Kishii, M., Wang, R. R.-C., Tsujimoto, H 2003. Characterization and behavior of chromosomes of *Leymus mollis* and *L. racemosus* (Triticeae, Poaceae) during mitosis and meiosis. *Chromosome Research* 11:741-748.
- Chaves R, Adegas F, Wienberg J, Guedes-Pinto H, Heslop-Harrison JS. 2003.

Molecular cytogenetic analysis and centromeric satellite organization of a novel 8;11 translocation in sheep: a possible intermediate in biarmed chromosome evolution. *Mammalian Genome* 14: 706-710.

- Chaves R, Adegá F, Heslop-Harrison JS, Guedes-Pinto H, Wienberg J. 2003. Complex satellite DNA reshuffling in the polymorphic t(1;29) Robertsonian translocation and evolutionarily derived chromosomes in cattle. *Chromosome Research* 11: 641-648.
- Shibata, F., Murata, M. 2004. Differential localization of the centromere-specific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* 117: 2963-2970.
- Mochida K., Tsujimoto, H., Sasakuma, T. 2004. Confocal analysis of chromosome behavior in wheat x maize zygotes. *Genome* 47: 199-205.

(2) 特許出願

なし