

「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

シロイヌナズナの染色体DNAは、25～38Mbと推定されているが、我々は4番染色体の短腕に由来するミニ染色体4Sを発見し、そのサイズが7～8Mb、セントロメアに局在する180-bpファミリーのクラスターが1Mb程度であることを突き止めた。このセントロメアサイズは、当初の推定値よりもかなり大きい。減数分裂で安定に伝達されるには、このサイズのクラスターが必要であると考えられる。さらに、このミニ染色体にマーカー遺伝子(カナマイシン耐性遺伝子)を導入することに成功し、ミニ染色体4Sを1対余分にもつ2n=12系統を育成した。

(2) 新規ミニ染色体の創出

外来のマーカー遺伝子をセントロメア領域に挿入し、強制的に発現させると、セントロメア領域のクロマチン構造が変化し、“分配”機能が不全となることがわかった。この結果、挿入されたセントロメア領域に起源する新たなミニ染色体が二種創出されたことから、この方法を確立することにより、今後、人工染色体の基礎材料

となるミニ染色体を数多く、容易に創出できる可能性がある。新規のミニ染色体は、第2染色体の短腕に由来していたが、その1つ2S-Dは環状であり、2つのセントロメアを有しているにもかかわらず、次代に安定に伝達される。全長は4-5Mb、それぞれのセントロメアのサイズは約500kbと推定された。興味あることに、この染色体には、ミトコンドリアDNAが数百Kb挿入されており、これらをターゲットとした相同組み換えも可能であると考えられる。また、2S-Aは、2番染色体短腕の全領域を含んでおり、セントロメアのサイズは、1Mb弱であると推定された。

(3) 新規セントロメア特異的タンパク質の同定

シロイヌナズナのセントロメアタンパク質のうち、新たにMis12ホモログ (AtMis12) とCPF1ホモログ (CHZ) を同定し、それら遺伝子の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を合成し、抗体を作製した。間接免疫抗体法とGFP融合法により調べたところ、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が明らかとなった。さらに、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、クロマチンファイバー法によっても示された。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。

(4) 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染色体の解析により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した。この機能的セントロメアの由来に関して、①オオムギにおいて機能的セントロメア領域は一次狭窄の外縁 (ペリセントロメア領域) に位置する。②染色体構造異常で正常なセントロメア機能を失った染色体で、ペリセントロメリック領域が新規に動原体機能を獲得したとの2つの仮説が考えられる。この構造異常染色体のキネトコア下に存在する一時配列の特定が急務である。

(5) 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MAD 2のコムギホモログと反応するペプチド抗体を用いた間接蛍光抗体法でコムギMAD 2タンパク質の細胞内局在を調査した。同タンパク質は細胞周期依存的に局在パターンを変化させる。コルヒチン処理した根端分裂組織細胞の観察により、コムギMAD 2タンパク質が微小管の付着していないセントロメアに蓄積することを示した。本年は減数分裂細胞におけるMAD 2タンパク質の局在解析を試みたが、体細胞と同様にコルヒチン処理したサンプルでのみシグナルが検出された。紡錘体形成に異常が予測されるモノソミクスの解析においても、当該一価染色体にシグナルが観察されなかった。

(6) ヘテロクロマチンタンパク質HP-1のコムギホモログの細胞内局在

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。ヘテロクロマチン化はエピジェネティックな機構により調節されている。また、ヘテロクロマチンタンパク質HP-1が中心的な役割を担い、DNAのメチル化、ヒストンのメチ

ル化、さらにはヘテロクロマチン化をコントロールしていることが明らかになった。作成したペプチド抗体による間接蛍光抗体法により、同タンパク質が間期細胞核に局在することが明らかになった。また、体細胞分裂中期染色体の解析から、ムギ類の2倍体、4倍体ではセントロメア領域に、6倍体では染色体全体に局在することを明らかにした。この倍数体に伴う局在変化が単に遺伝子量効果で決定されているのではないことを様々な遺伝系統を用いて明らかにした。

(7) トレンニア種間雑種における動原体分離の細胞学的研究

トレンニア属の2種(*Torenia fournieri*と*T. bailonii*)より、種特異的反復配列をクローニングした。これらは、動原体に局在する縦列型反復配列であった。両種の雑種を作り、受精後、両種由来動原体の行動を3次元ホールマウントFISHで調査した。その結果、雑種核内における両種動原体は受精細胞のみならず、雑种植物の茎頂でも分離して位置していることが明らかになった。分裂過程の調査によって、分裂がこの動原体分離を起こす原因ではないことが明らかになった。

(8) 分散型セントロメアに局在するヒストンH3変異体の同定

真核生物染色体のセントロメアに局在するヒストンH3変異体(CENH3)は、セントロメアの機能に重要なキータンパク質であるが、これまで分散型セントロメアをもつ植物種では見つかってこなかった。今回我々(岡山大グループ)は、ルズラ(*Luzula nivea*)からこのタンパク質をコードする遺伝子の全長cDNAをクローニングし、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。間接免疫抗体法により、分散型セントロメアが可視化され(図1)、その動的な変化も明らかとなった。



図1. 蛍光間接免疫抗体法によるルズラのセントロメアヒストンH3(LnCENH3)の可視化。

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
 - Ogura, Y., Shibata, F., Sato, H., Murata, M. 2004. Characterization of a CENP-C homolog in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.* 79: 139-144.
 - Ito, H., Nasuda, S., Endo, T. R. 2004. A direct repeat sequence associated with the centromeric retrotransposons in wheat. *Genome.* 47(4): 747-756.
 - Kimbara, J., Endo, T. R., Nasuda, S. 2004. Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chromosome Res.* 12(7): 703-714.
 - Kikuchi, S., Kishii, M., Shimizu, M., Tsujimoto, H. 2004. Centromere-specific repetitive sequence from *Torenia fournieri*, a model plant for fertilization, and whole-mount FISH of its embryo sac cells, *Cytogenetic and Genome Research* 109:228-235.
 - Tani, A., Murata, M. 2005. Alternative splicing of *POT1*-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Genet. Syst.* 80:41-48.
 - Nagaki, K., Murata, M. 2005. Characterization of CENH3 and centromere-associated DNA sequences in sugarcane. *Chromosome Res.* 13(2):195-203.
 - Kawabe, A., Nasuda, S. 2005. Structure and genomic organization of centromeric repeats in *Arabidopsis* species. *Mol. Genet. Genomics.* 272(6):

593-602.

(2) 特許出願

平成16年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：11件）