

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

岡山大学資源生物科学研究所 教授 村田 稔

1 研究実施の概要

【目的】

本プロジェクトでは、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“植物人工染色体”の構築を目指す。

【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、連続した一本の二本鎖 DNA から成っており、この中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。しかし、以前から多くの種で、一次狭窄(セントロメア)の領域に異質染色質が分布していることが知られており、近年になって、特定の反復配列がセントロメアに局在していることが示されるようになった。

我々は、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 α 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。シロイヌナズナではゲノムプロジェクトが2000年暮れに完了したが、反復配列からなるセントロメア領域については、まだ多くの問題が残されている。第4染色体は、最も解析が進んでいる染色体であるが、我々は、この第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、起源した第4染色体のクラスターよりかなり短いことがわかった。つまり、この染色体は、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%であることから、有糸分裂、減数分裂においても、セントロメアはほぼ正常に機能していると思われる。当初、このセントロメアに局在する 180-bp のクラスターサイズは 100 kb ほどであると推定されていたが、詳細な構造解析から、実際は 1 Mb 近くあることが明らかとなった。このサイズは、正常な染色体の3分の1ほどであり、減数分裂を経て安定に伝達されるには、このサイズが必要であると考えられた。培養細胞では、さらに短いクラスターを持ったミニ染色体が観察されることから、有糸分裂では減数分裂ほど大きなサイズのセントロメア DNA を必要としない可能性もある。

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。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。

もう一つのミニ染色体 2S-D には、T-DNA の挿入が見られなかったが、興味あることに、この染色体は環状であり、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、これを詳細に解析することにより、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。

【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、シロイヌナズナ1種の研究結果だけでは、セントロメアの DNA 配列と機能との関係を明らかにすることは難しい。そこで、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、この植物種のセントロメアについても、特異的な DNA 配列を探索することとした。

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唆されており、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。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。今後、どのような DNA がセントロメア機能を与えているのか、明らかにする必要がある。

一方で、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、ライコ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が認められた。

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。今後は、セントロメア局在タンパク質からのアプローチが必要である。タバコは、プロトプラストからの再分化が容易で、巨大 DNA を直接導入できるメリットをもつ。トレンニアからは、セントロメア特異的な縦列型反復配列が単離された。

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 *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。しかし、クローニングされた DNA が、セントロメア配列である証明はできていない。そのため、セントロメアタンパク質からのアプローチが必要となった。

【セントロメアに局在するタンパク質】

セントロメアの研究が困難である理由は、これまでに詳細に調べられたセントロメアの DNA 配列にほとんど保存性がないことである。“分配”という機能を、異なった DNA 配列が如何にやりくりしているのか？このパラドックスに対する答えは、セントロメア DNA に結合するタンパク質の研究から求められると思われる。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。それ故、本研究では、シロイヌナズ

ナやコムギなどから、ヒトや酵母で見ついている 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、解析することとした。

まず、シロイヌナズナのデータベースをサーチし、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た。これらを用いた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。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。ヒトの CENP-A や C などのタンパク質は、活性のあるセントロメアにしか存在しないため、シロイヌナズナでも、同様のことが起きていると思われる。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。

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が明らかとなった。

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。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 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。

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 (CENP-A のホモログ、CENH3 とも言う) は、セントロメアの機能に重要なキータンパク質である。これまでシロイヌナズナをはじめ、イネなどからもその cDNA がクローン化されてきたが、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。本研究では、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となった。

【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。本プロジェクトでは、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。

一方で、セントロメアに局在する 180-bp ファミリーの長鎖 DNA を直接植物細胞に導入する試みを続けてきた。その結果、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。現在では、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。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

セントロメア(動原体)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、機能をもつ DNA 配列はまだ単離されていない。しかし、以前から多くの種で、一次狭窄(セントロメア)の領域に異質染色質が分布していることが知られており、近年になって、特定の反復配列がセントロメアに局在していることが示されるようになった。モデル植物であるシロイヌナズナでも、セントロメア領域に局在する反復配列が同定され(Maluszynska and Heslop-Harrison 1991, Murata et al. 1994)、セントロメアの機能との関連が示唆されるようになった。この反復配列は、約 180 bp(厳密には、178 bp)を基本単位とし、縦列して非常に大きなクラスターを形成している。シロイヌナズナでは、2000 年暮れにゲノムプロジェクトが終了したが、反復配列からなるセントロメア領域については、ほとんど解析されなかった。そのようなおり、我々は第4染色体の短腕に由来するミニ染色体を発見しその構造を解析した。その結果、このミニ染色体のセントロメアに局在する 180-bp 反復配列は、起源した第4染色体のクラスターよりもかなり短いことがわかった。つまり、この染色体は、第4染色体のセントロメア領域の長い 180-bp クラスター中で切断され、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%であり、有糸分裂、減数分裂においても、セントロメアはほぼ正常に機能していると思われたため、このミニ染色体をさらに短縮化する計画を立てた。つまり、このミニ染色体のセントロメアを詳細に解析することにより、植物セントロメアの機能配列を特定できると考えたのである。また当時、かずさ DNA 研究所では、シロイヌナズナのセントロメア解析進行中であったため、小谷一博室長に、ミニ染色体4Sのセントロメア解析をお願いすることにした。

しかしながら、セントロメアの DNA 配列は、種によって大きく異なっており、シロイヌナズナ1種の研究結果だけでは、セントロメアの DNA 配列と機能との関係を明らかにすることは難しいと思われた。そこで、本プロジェクトでは、遠藤隆教授(京都大学大学院農学研究科)と辻本壽教授(当時横浜市立大学木原生物学研究所、現鳥取大学)のグループに参加頂き、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ことにした。植物の場合、ほとんどの種が局在型セントロメア(染色体の1カ所にのみセントロメアがある)を持っているが、一部、カヤツリグサ科やイグサ科の植物は、分散型のセントロメア(染色体全体にセントロメアが分散)を持っていることが知られていた。そこで、星野卓二教授(岡山理科大学総合情報学部)に加わってもらい、これら植物種についても、セントロメア特異的 DNA の探索を行うこととした。

酵母や哺乳動物のセントロメア研究では、セントロメアの活性検定は、セントロメアに特異的に局在するタンパク質の有無を指標として行われてきた。しかし、当時、植物においては、セントロメアに局在するタンパク質(CENP)はほとんど調べられていなかった。それ故、シロイヌナズナやコムギなどから CENP 遺伝子のホモログを同定する必要性を感じた。そこで、当時共同研究を行っていた J. S. Heslop-Harrison 教授(当時連合王国 John Innes Centre, 現レスター大学)へ参加を要請した。そして、セントロメアの DNA 配列内に存在すると考えられる特定タンパク質の結合部位についても調査することにした。

平成 12-13 年度では、主にセントロメア DNA の一次構造の解析を行うよう計画した。シロイヌナズナでは、すでにマクロ構造が解析されているので、ミニ染色体(第4染色体の短腕から由来)のサイズと 180-bp クラスターの長さ構造をパルスフィールドゲル電気泳動法、DNA ファイバー法から解析することにした。しかしながら、この 180-bp クラスターのサイズは、予想よりもかなり大きく、かずさ DNA 研究所での結果も、岡山大学と異なるものとなった。それ故、パキテーン FISH 法から最終的な結果を導いたが、そのセントロメアサイズは 0.96Mb ほどにもなった(Murata et al., in press)。このミニ染色体をさらに小型化するために、テロメア DNA 配列を導入することとしたが、200 数十個体の形質転換中、1個体のミニ染色体にのみ、T-DNA の挿入が認められた。しかし、挿入されたテロメア配列による切断は生じず、サイズの減少も認められな

かった。ただ、この形質転換体では、ミニ染色体にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されているため、染色体チェックなしで、ミニ染色体の存在が確認できるようになった。興味深いことに、ミニ染色体4S は、当初のランズバーグ(エレクト)バックグラウンドでは、30%ほどの伝達率であったのに対し、コロンビア株に移した場合、60%近い伝達率を示した。この原因はまだ確認されていないが、2つの株(エコタイプ)間に存在する逆位による可能性もある。結果として、コロンビア株で染色体数が12本のシロイヌナズナ系統を育成することに成功した。

コムギでは、セントロメアに局在するDNA反復配列が数種同定されたが、ナス科やカヤツリグサ科の植物では、セントロメア特異的なDNA配列は同定できなかった。それ故、トレンニアなどの他の植物種でも探索を行うこととした。

トウモロコシでは、ヒトのCENP-Cタンパク質のホモログが同定され、その局在解析が行われていたが(Dawe et al. 1999)、シロイヌナズナでは、まだ何れのタンパク質についても、解析が進んでいなかった。そこで、トウモロコシのZmCENP-Cアミノ酸配列から、シロイヌナズナのAtCENP-Cを特定した。推定アミノ酸をもとにペプチド抗体を作製し、間接免疫抗体染色から、このタンパク質の局在を確認した(Ogura et al., 2004)。

14-15年度では、シロイヌナズナから機能を有するセントロメアDNA配列をクローン化する予定であったが、ミニ染色体4S上の180-bpクラスターのサイズが予想以上に長かったため、他のミニ染色体を探索した。幸いなことに、ミニ染色体4SへのT-DNAタグライン作製過程で、新たなミニ染色体(2S-A, -D)を発見した。これらは、セントロメア領域にT-DNAが挿入され、セントロメアに切断が起きたことによって誘発されたと考えられた。そこで、これらのミニ染色体のセントロメアを引き続き解析することとした。また、並行的に180-bp反復配列の長鎖DNAをクローン化し、アグロバクテリウム法等により植物へ導入する実験も始めた。しかし、現在に至るまで、この実験系の有効性は確認されていない。

セントロメアタンパク質については、CENP様遺伝子をGFP融合発現ベクターにクローン化し、タンパク質を発現させ、セントロメアへの局在を確認する系を確立することとした。確認されたタンパク質については、抗体を作製しセントロメアへの局在性を確認することも必要であった。結果、AtMIS12やCHZなどのタンパク質を同定することに成功した(Sato et al. 2005)。また、コムギでもMAD2やHP1などのホモログが同定された。

16-17年度では、シロイヌナズナにおいては、セントロメアの機能に直接結びつくDNA領域の解析が行われた。これには、CENP-Aホモログタンパク質(シロイヌナズナではHTR12という)の抗体が有効であった。このタンパク質は、我々のグループで遺伝子を特定、解析を進めていたが、米国のハワードヒューズ癌研究センターのS. Henikoffらのグループに先んじられた(Talbert et al. 2002)。しかし、彼らから抗体の分与を受け(岡山大学でも作製した)、シロイヌナズナの180-bpクラスターのうち、一部にこのタンパク質が集まっていることを明らかにした(Shibata and Murata 2004)。さらに、ミニ染色体4S、2S-Aと2S-Dの短い180-bpクラスターにも、このタンパク質が局在していることを突き止めた(Murata et al., in press)。特に、ミニ染色体2S-Dの180-bpクラスターは、500 kb以下とこれまでの中で最も短いため、今後、このクラスターを詳細に解析することにより、セントロメア機能単位を特定できる可能性が高い。

一方コムギでは、コムギ中に存在するオオムギの7HS染色体の解析が進み、これまで知られているセントロメア配列が存在しないという事実が明らかとなった(Nasuda et al. 2005)。これは、ヒトなどで見ついている“ネオセントロメア”の植物で初めての例であると考えられる。どのようなDNA配列が、セントロメアとして機能しているか興味あるところであり、現在クロマチン免疫沈降法等で解析が進められている。

分散型セントロメアについては、Ty3/gypsy型のレトロエレメントが、穀類のセントロメアのように局在せず、散在することが示されたが、セントロメアDNAである証拠は得られていない。しかし、岡山大学のグループは、ルズラ(*Luzula nivea*)から、CENP-Aホモログ(LnCenH3)遺伝子を特定し、そのcDNAをクローニングすることに成功した。さらに、推定アミノ酸配列から作製した抗体を用いることにより、植物では初めて、分散型のセントロメアを可視化し、その形状が染

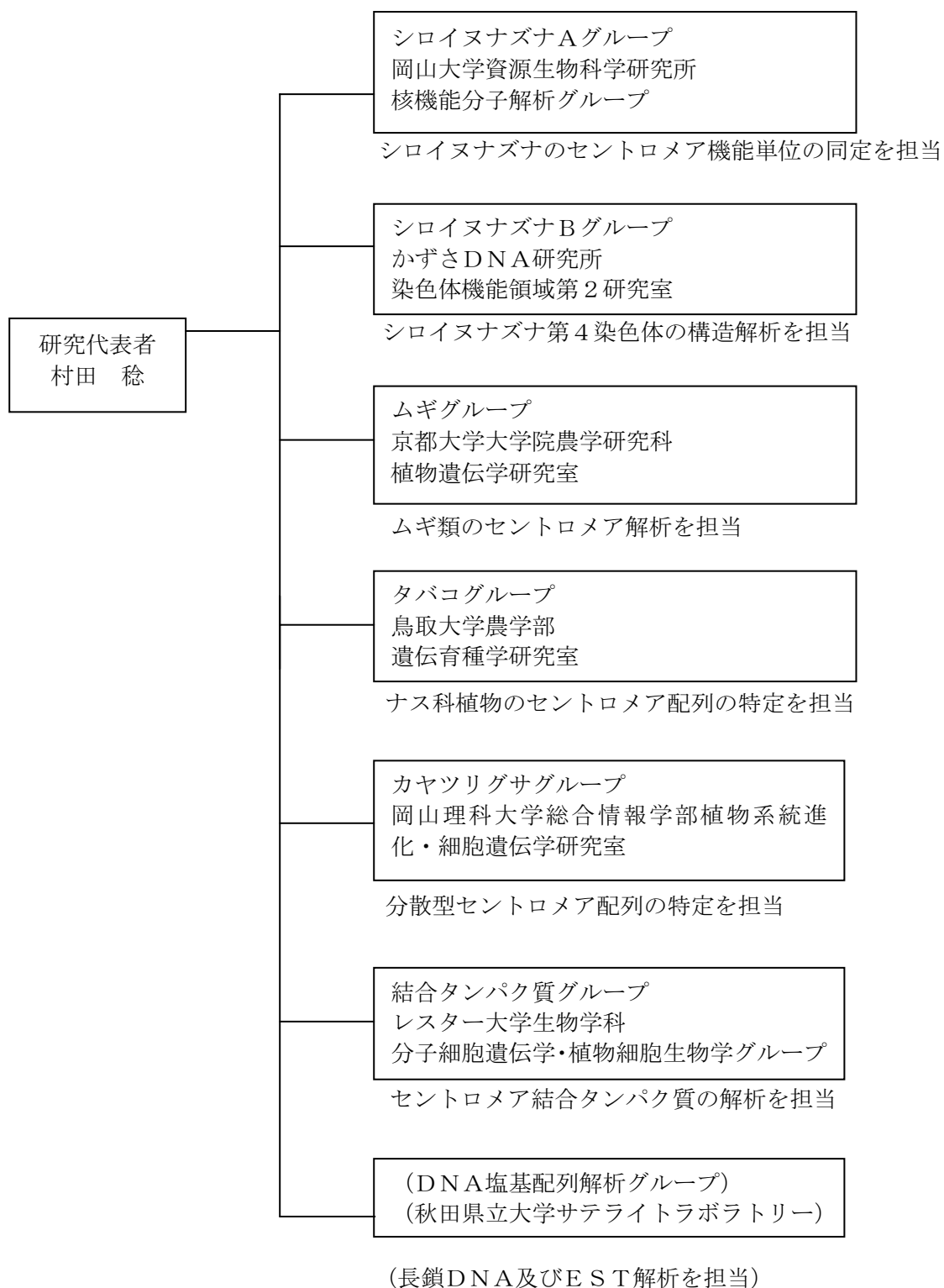
染色体に沿った線状であることを示した(Nagaki et al. 2005)。

以上のように、この5年間の間に、植物種の多くから、セントロメアの機能に関連する DNA 配列を特定することができ、さらには、局在するタンパク質の同定にも成功した。残された研究テーマはまだ多いが、基礎的な解析方法と実験系は確立できたと思われる。今後は、これらの成果を踏まえ、人工染色体の構築を急ぎたい。

各グループの研究内容と相互の関連

- **岡山大学、かずさDNA研究所、秋田県立大学サテライトラボ:**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:**双子葉植物のセントロメア構造を解明するため、タバコやトレンニ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:**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、岡山大学:**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、岡山大学:**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。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 シロイヌナズナセントロメアの構造解析(岡山大学 シロイヌナズナ A グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本グループでは、シロイヌナズナを主たる実験材料とし、そのセントロメア構造と機能単位(機能を付与する最小限の DNA 配列)を解析した。また、機能単位を特定するため、セントロメアに局在する構成タンパク質のcDNA クローニングと局在解析を行った。さらには、分散型セントロメアを持つ植物ルズラからセントロメア特異的ヒストン H3(LnCenH3)のcDNA を単離し、その推定アミノ酸配列からこのタンパク質を認識する抗体を作製した。このことにより、植物では初めて、分散型セントロメアを可視化することに成功した。各研究の内容と成果は、以下の通りである。

① シロイヌナズナの第4染色体短腕に由来するミニ染色体の分子構造

シロイヌナズナの Tr1A トリソーム系統(ランズバーグ・エレクトラ株)後代から、非常に小型の染色体を同定した(図 1)。このミニ染色体には、18S-5.8S-25S と 5S の rDNA が座乗しており、第4染色体の短腕に由来していることが明らかとなった。セントロメアに局在する 180-bp 配列のクラスターサイズを減数分裂パキテーン期で、180-bp をプローブとした FISH により計測したところ、約 0.96 Mb であることが示された(表1)。これは正常な第4染色体上のクラスターに比べて約 1/3 である。しかし、この領域には、セントロメア特異的なヒストン H3(HTR12、CENP-A ホモログ)タンパク質が局在しており、セントロメアとしての機能が維持されていることがわかった。ランズバーグ株では、この染色体の次代への伝達率は、約 34%で、三染色体植物(トリソーム)での過剰第4染色体の伝達率とほぼ同じである。しかし、これをコロンビア株に移した場合、伝達率が大幅に上昇した(58%)。この原因には、2つの株の第4染色体短腕間に存在する逆位(図 2)が考えられた。

ミニ染色体4S を保持する個体の表現型は、通常の二倍体植物と変わらない。そのため、絶えず、染色体を観察することが必要となる。そこで、選抜を容易にするため、カナマイシン耐性遺伝子(*NptII*)や GFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子を *in planta* 法で導入した。百数十の形質転換体をスクリーニングした結果、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1個体得られた。この個体の自殖後代から、2つのミニ染色体を安定に保持する $2n=12$ の系統が育成された。この系統の染色体は、比較的安定している。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、新規のミニ染色体が得られ、GFP 遺伝子の挿入が認められた。

変異染色体を用いたセントロメア機能解析は、他の植物(トウモロコシ、イネ)でも進められている。特に、米国ミシガン大学 Birchler とウイスコンシン大学の Jiang のグループからは、優れた成果が出ている。今のところ、両材料とも約 700 kb のセントロメア DNA 配列が必要であるとされているが、シロイヌナズナとは構造が大きく異なるため、一概には比較できない。今後、双子葉と単子葉植物の比較も重要であろう。

表1. ミニ染色体のセントロメアサイズと活性

ミニ染色体	起源	染色体サイズ	形状	セントロメア	
				サイズ	活性
4S	第4染色体短腕	8 Mb	線状	1.0 Mb	+
2S-A	第2染色体短腕	7.5 Mb	線状	0.7 Mb	+
2S-D	第2染色体短腕	4 Mb	環状	0.5x2 Mb	+
2S-B/1	第2染色体短腕	?	線状	0.3 Mb	-
	(第1染色体短腕に転座)				

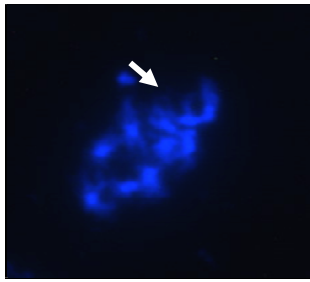


図1. シロイヌナズナに見出されたミニ染色体(矢印)。

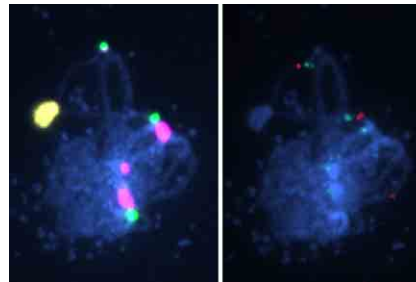


図2. パキテーン FISH。コロンビア株由来の第4染色体とミニ染色体 4S の間に逆位が存在する。

② T-DNA 挿入によるセントロメアの切断と新規ミニ染色体の創出

ミニ染色体 4S を保持する植物体を、バイナリーベクター pGF101(pBI101+GFP) で形質転換したところ、新たな染色体変異数種が出現した。この原因とその誘発機構を明らかにするために、T-DNA 挿入部位の解析と変異染色体の同定を行った。

rDNA と BAC クローンをプローブとした FISH により変異した染色体を解析したところ、すべてが第2染色体由来であることがわかった。これらのうち、2つのミニ染色体(2S-A、2S-D)について詳細な解析を行った。ミニ 2S-A には、第2染色体の短腕ほぼ全域が含まれていたが、そのセントロメア領域(180-bp 反復配列)は、約 700 kb のサイズであることがわかった(表1)。このサイズは、先のミニ4S 染色体よりもさらに短い。また、この 180-bp クラスター内には、T-DNA が2コピー逆向きに挿入されており(図3)、この染色体を保持した系統では、自殖後代にジーンサイレンシングが多発した。以上のことから、セントロメア内に挿入された T-DNA がセントロメアの切断を引き起こした可能性が高い。また、切断の原因は、挿入された遺伝子の強制発現によってクロマチン構造が変化したためと考えられる。

もう一つのミニ染色体 2S-D には、T-DNA の挿入が認められなかったが、第2染色体の短腕に由来し、約 5Mb のサイズであることが BAC クローンをプローブとした FISH から明らかとなった。減数分裂を観察したところ、パキテーン期において環状であることが確認された。また、セントロメアに特異的な 180-bp 反復配列をプローブとした FISH とパルスフィールドゲル電気泳動から、このミニ染色体は 2 つのセントロメアを持ち、それぞれが約 500 kb であることもわかった(表1)。これらの領域には、機能的セントロメアに特異的なタンパク質 HTR12(CENP-A ホモログ)が認められたので、両セントロメアとも正常に機能していると考えられた。体細胞及び減数分裂後期で、時折観察される染色体橋もこの事実を裏付けている。また、BAC をプローブとした FISH から、この染色体の切断点を推定したところ、セントロメアの内部と F3C11 の内部で切断が起き、融合したことがわかった。プローブのシグナルは、それぞれ 2 コピー検出され、逆向きであることから、この 2S-D 染色体は、第2染色体短腕の切断、融合、組換えを経て生じたと考えられる(図4)。このダイセントリック環状染色体は、自殖後代の約 3割に伝達し、数代を経ても安定に維持されるため、今後、染色体ベクターとしての利用も考えられる。

環状のダイセントリック染色体は、トウモロコシでも古くから観察されているが、一般的に非常に不安定で、次代には伝達されない。しかし、本研究で創出された環状染色体は、次代に伝達され、比較的安定である。また、この 2S-D 染色体の 180-bp クラスターのサイズは、これまで知られているセントロメアで最も短いものである(表1)。

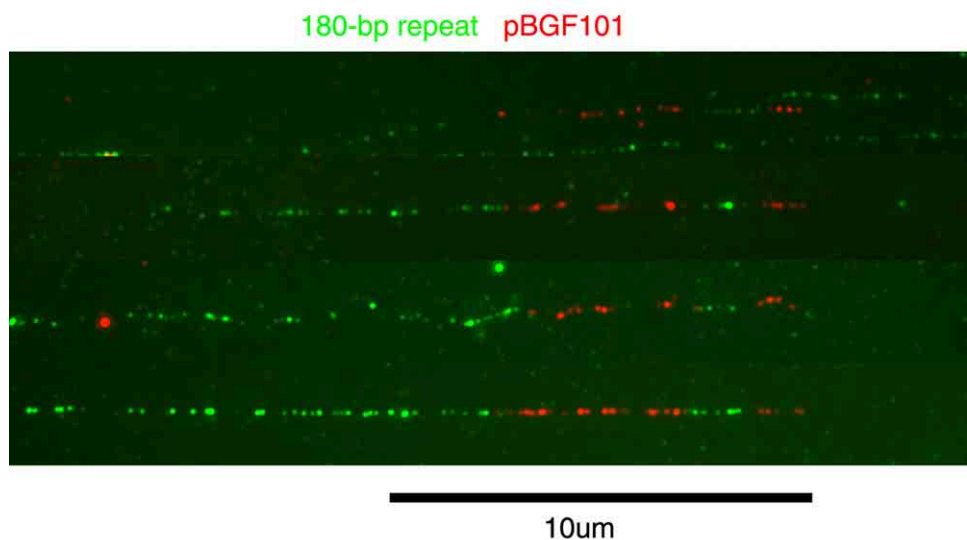


図3. ミニ染色体 2S-A を保持する植物における pBGF101 (緑) と 180-bp (赤) をプローブとした DNA ファイバー-FISH。

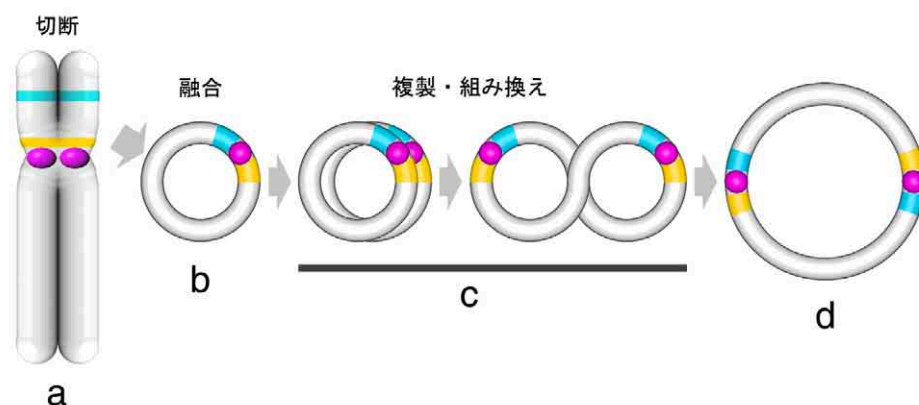


図4. ダイセントリック環状染色体の形成過程。第2染色体短腕セントロメアの内部と F3C11 の内部で切断が生じ(a)、切断部同士が融合し、モノセントリック環状染色体が形成された(b)。さらに複製の際、姉妹染色体分体交換がおき(c)、環状ダイセントリック染色体が形成されたと考えられる(d)。

③ シロイヌナズナのセントロメアおよびセントロメア周辺における DNA とヒストンのメチル化
シロイヌナズナのセントロメアは 180-bp ファミリーと呼ばれる反復配列から構成されており、その配列中のシトシン残基は高度にメチル化されていると報告されている。本研究では、抗メチル化シトシン抗体と抗メチル化ヒストン H3(K9)抗体を用い、シロイヌナズナのセントロメアおよびその周辺領域での DNA とヒストンのメチル化状態を解析した。

体細胞染色体のヒストン H3(K9)のメチル化は、セントロメアのコア部分とその周辺のヘテロクロマチン領域に観察された。しかし、セントロメアを構成する 180-bp ファミリー-DNA のメチル化は非常に弱く、一方で、180-bp ファミリークラスターを取り囲む部分では非常に強いメチル化が起きていた。また、DAPI 染色したパキテーン期の染色体では、180-bp 領域のヘテロクロマチン化は観察されず、ヘテロクロマチン化と DNA のメチル化の程度に関連が認められた(図5)。セントロメアのコア部分は、ヒストン H3(K9)のメチル化が高く DNA のメチル化は低いのに対し、セントロメア周辺のヘテロクロマチン領域は、DNA のメチル化の度合いが高い。このことがセントロメアの位置を決めるのに重要であると思われる。

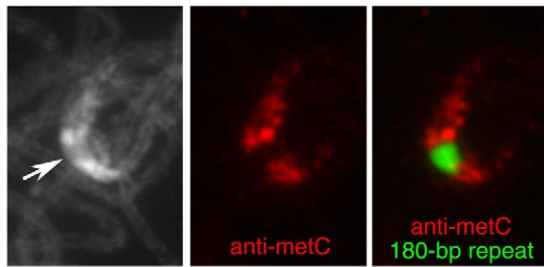


図5. シロイヌナズナのパキテン期染色体。矢印はセントロメアを示す。抗メチルシチジン抗体のシグナルを赤、180-bp配列の FISH シグナルを緑で示している。

④ シロイヌナズナにおける CENP-C と Mis12 ホモログの解析

セントロメア/キネトコアは染色体の正確な分配に必要な DNA タンパク質複合体である。哺乳動物や酵母等ではセントロメアに局在するタンパク質が数多く同定され、それらの機能の解析が進められている。本研究はゲノム構造が判明しているモデル植物のシロイヌナズナにおいて他生物のセントロメアに局在するタンパク質と類似した配列を持つタンパク質の機能を明らかにすることを目的として、ヒト CENP-C ホモログ及び分裂酵母 Mis12 ホモログの発現及び局在性の解析を行った。

CENP-C ホモログ、Mis12 ホモログとも RT-PCR 及び RACE によりコード領域の全長を含む cDNA クローンが得られ、それぞれ AtCENP-C、AtMIS12 と名付けた。次にこれらの配列を元にそれぞれの抗ペプチド抗体を作製し、シロイヌナズナの核抽出物を用いたウェスタンブロット解析を行い、発現を確認した。また、免疫蛍光染色法及び蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた観察で、AtCENP-C のシグナル、AtMIS12 のシグナルともセントロメア領域に特異的な 180-bp 反復配列のシグナルと重なり、シロイヌナズナのセントロメア特異的ヒストン H3 タンパク質である HTR12 のシグナルとほぼ一致したことから(図6)、これらは細胞周期を通じてセントロメアに局在することが示され、セントロメアの機能にも関与していると考えられた。

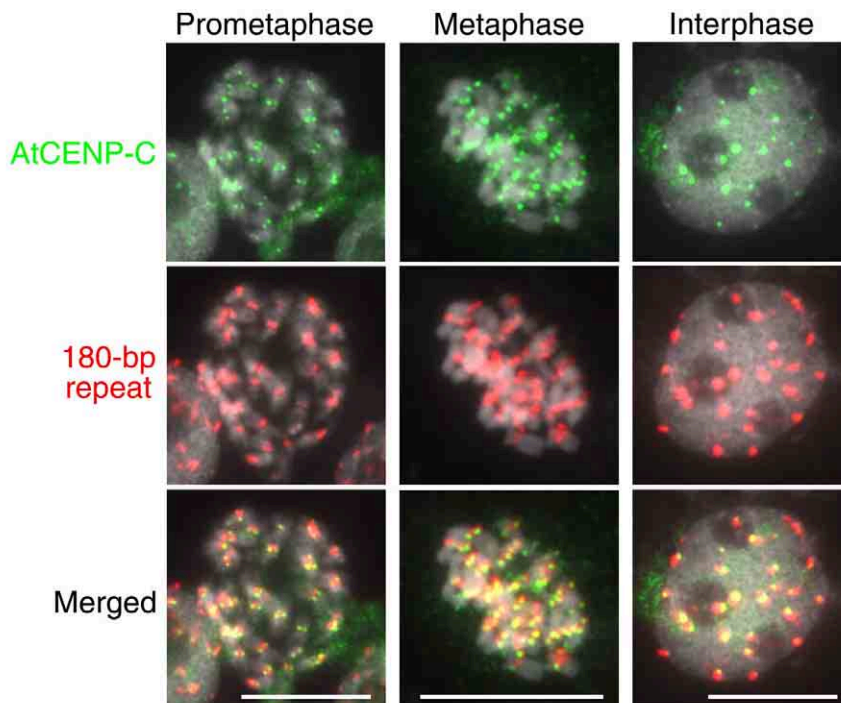


図6. 抗 AtCENP-C 抗体を用いた間接免疫蛍光染色と 180-bp をプローブとした FISH。

⑤ シロイヌナズナにおける Cpf1(Centromere promoter factor 1) ホモログの解析

シロイヌナズナのセントロメアには、180-bp ファミリーと呼ばれる反復配列が存在しているが、近年、この配列中に、出芽酵母の CDE I(Centromere DNA element I) に類似した配列が存在することが示唆された。CDEI には Cpf1(または Cbf1 と呼ばれる)タンパク質が結合することから、シロイヌナズナにも同様のタンパク質が存在する可能性がある。そこで、本研究では、この Cpf1 と相同なタンパク質の探索をおこなった。

シロイヌナズナデータベースをサーチし、bHLH(basic helix-loop-helix)ファミリーに属する複数のタンパク質がヒットした。このうち、最も類似性が高いと考えられる候補を5種選び出し、それらcDNA の GFP 融合コンストラクトを作成した。これらをバイナリーベクターに移し、アグロバクテリウムを介して、シロイヌナズナの培養細胞に導入したところ、4種については、核内の局在は観察されたが、セントロメア DNA との共局在は、確認されなかった。しかし、CHZ と名付けたタンパク質は、セントロメアに局在する DNA やタンパク質との共局在を示し(図7)、酵母の Cpf1 タンパク質のホモログであることが示唆された。

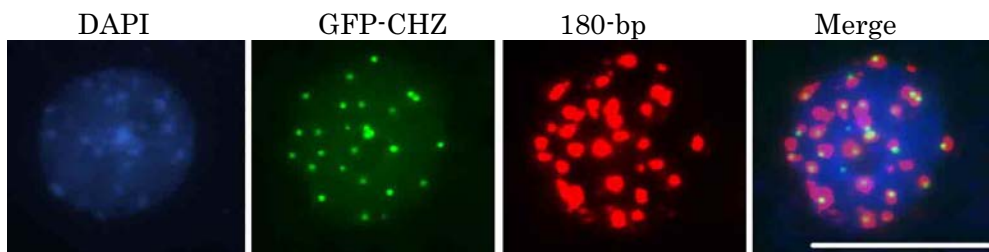


図7. GFP 融合 CHZ タンパク質と 180-bp 反復配列の共局在。

⑥ セントロメア特異的ヒストン H3 を用いたルズラ分散型セントロメアの分子解析

セントロメアは、染色体を娘細胞へ正確に伝達するために必須な領域であり、通常、一カ所に局在している。しかし、少数ではあるが染色体全体にセントロメアが分散している種が存在し、その様なセントロメアは「分散型セントロメア」と呼ばれている。以前から、ルズラは、この「分散型セントロメア」をもつことが知られていたが、その詳細は不明であった。本研究では、ルズラのセントロメア特異的タンパク質を用いて、ルズラの分散型セントロメアの構造解析を試みた。

我々は今回、ルズラからセントロメア特異的ヒストン H3(LnCENH3)をコードする cDNA の一部を RT-PCR 法により増幅することに成功し、その塩基配列情報をもとに、RACE 法により、その cDNA の完全長配列を決定した。さらに、この DNA 配列から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、免疫染色によって解析したところ、ルズラのセントロメアが線状であることをつきとめた(図8)。また、このセントロメア特異的ヒストン H3 の量は、間期核で最も少なく、細胞周期が進むにつれて増加し、中期で最高となり、後期、終期では、再び減少していた。

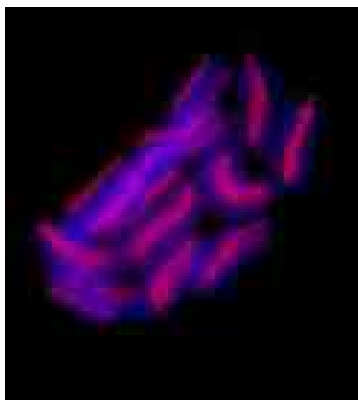


図8. 抗 LnCENH3 抗体を用いた間接蛍光免疫染色。青:DAPI 染色された染色体、赤:LnCENH3 シグナル。

⑦長鎖セントロメア反復配列のクローニングと植物への導入

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 PCR 等により増幅し、その約 100 kb を安定に保持する BAC クローンを得た。これを BiBAC ベクターに移し、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入したが、再現性のある結果を得るには至っていない。増幅した 180-bp の配列がセントロメアタンパク質を集めることができるかが重要であり、現在、ミニ染色体由来のクラスターをクローン化中である。また、植物細胞への導入法も検討する必要がある、シロイヌナズナのプロトプラスト培養についても検討したい。

モデル植物であるシロイヌナズナのミニ染色体については、今まで報告例がなく、その創出とそれに関わる研究は、国内外を問わず、当研究室でのみ行われている。それ故、今後さらに継続して行うことにより、世界に先駆けて植物人工染色体を創出できる可能性が高い。シロイヌナズナのセントロメア解析を行っている研究者は、国内では申請者のグループ以外にはないが、米国に数グループがある。米国シカゴ大学の D. Preuss らは、シロイヌナズナのセントロメア DNA の一次構造を解析している。同グループはまた、人工染色体の構築にも興味を持っており、かなり積極的に研究を行っているが、まだ信頼のおける結果は出ていない。シロイヌナズナ以外では、G. Moore のグループ (英国ジョンインネスセンター) が、穀類セントロメアの構造解析を進めている。また、J. Jiang (米国ウイスコンシン大学) はイネのセントロメア、J. Bircher (ミズリー大学)、K. Dawe (ジョージア大学) らはトウモロコシのセントロメア構造について研究している。彼らも、最終的に人工染色体の構築を目指しているが、現時点で、これといった突破口は開けていない。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究プロジェクトの最終目的は、植物で最初となる人工染色体を構築し、新たな植物創出にも利用可能なベクターとすることである。現時点では、シロイヌナズナで数種ミニ染色体を創出することに成功し、そのうちの最小のものは 4 Mb であった。この染色体のユニークな点は、数百 kb にも及ぶミトコンドリア DNA を含んでいることであり、ジーンターゲットングの良いモデルとなる。ターゲットングが可能となれば、任意の遺伝子やそれらを含む長鎖 DNA を組込むことも可能であろう。これらが完成した暁には、多くの利用法が考えられる。例えば、植物が生産する二次代謝物質には多くの遺伝子産物が関わっているため、遺伝子組換えで二次産物を生産させるためには関連の遺伝子を数種同時に導入しなければならない。人工染色体が利用できれば、一連の生体反応に関わる遺伝子群を一度に導入することも可能となる。また、現在、真核生物の遺伝子発現は、クロマチンの構造によってかなりを制御されていることがわかっている。それ故、人工染色体を用いれば、従来の方法で問題となっているジーンサイレンシングも解決できよう。このようなトップダウン的なアプローチに対し、ボトムアップ的なアプローチも視野に入った。つまり、このミニ染色体に含まれる約 500 kb のセントロメア配列をクローン化することにより、直接植物にセントロメア DNA を導入できる道が開けるのである。これまで、シロイヌナズナでは、セントロメアに局在する 180-bp 反復配列が機能に関与すると考えられていた。しかし、我々の研究から、これら反復配列の一部に、セントロメアのタンパク質を集める能力があることがわかった。この違いが何であるのか、今のところまだ不明であるが、この 500 kb を詳細に解析することによって解答が得られるであろう。

植物の人工染色体は、現時点でまだ作出されていない。それ故、もし作出された場合、国際的な特許の対象となる。さらには、その研究も植物科学の分野だけでなく、細胞学、遺伝学の分野で、多くの科学者の注意を引くことになるため、レベルの高い雑誌への論文投稿が可能であろう。動物や酵母での人工染色体でも同様のことが言えるが、人工染色体の構成要素の中で、セントロメアの DNA 配列は、種特異的であり、どの種の細胞中でも染色体として機能する人工染色体は存在していない。シロイヌナズナにおいて機能する人工染

色体は、近縁のアブラナ科植物で機能する可能性はあるが、イネやコムギでは、まず機能しない。そこで、それぞれの植物種で人工染色体を構築する必要が出てくるが、その際、一般的な方法が確立できれば、作製に要する時間が短縮できると考えられる。

従来の形質転換法に対して、人工染色体による遺伝子導入には、いくつかの利点がある。現時点では、アグロバクテリウムやパーティクルガンによる方法が一般的であるが、これらの方法では、今のところ、導入しようとする遺伝子の数や挿入部位を特定できず、遺伝子の発現も制御することが難しい。人工染色体に挿入した遺伝子については、その発現をクロマチンレベルで制御できる利点があり、複数の遺伝子や長いゲノム DNA を組み込むことも可能である。

組換え作物に対する拒否反応は、世界的なものである。減農薬や低除草剤の作物が育成できるなど、多くの利点もあるが、消費者はその使用に対して過敏となっている。人工染色体の構築と利用は、これらの問題を回避できる可能性がある。そのひとつは、体細胞分裂でのみ伝達するが、減数分裂を経ては伝わらない人工染色体の作出である。減数分裂を経て安定に次世代に伝わる染色体には、かなり長いセントロメア反復配列が必要であることがわかってきている。そこで、この反復配列の長さを調節することにより、その伝達率をコントロールすれば、植物体それ自身は、人工染色体を保持し、その中の遺伝子（例えば、病原抵抗性遺伝子など）が発現する。しかし、次世代には伝わらないため、種子を食料とする穀類などでは、その中に組換え遺伝子は含まれないことになる。ミニ染色体は、正常な染色体よりも一般的に不安定であり、染色体のクロマチンリモデリング遺伝子の突然変異によっても、細胞から欠落することがある。これらの突然変異体を積極的に利用することによっても、ミニ染色体の利用は広がってくるものと思われる。これらのことから、本研究課題である“ミニ染色体と人工染色体の創出”研究は、今後、植物科学だけでなく、農学、経済分野へもインパクトを与えることは間違いない。

3.2 シロイヌナズナ第4染色体の構造解析(かずさDNA研究所シロイヌナズナBグループ)

(1) 研究実施内容及び成果

シロイヌナズナゲノムは高度反復配列領域(テロメア, Ribosomal DNA クラスター, 5S rDNA クラスター, セントロメア領域等)を除いて解析が終わっている。我々は、染色体全体のゲノム構成を明らかにする目的で、シロイヌナズナ5番染色体セントロメア領域の解析を進め、その構造を明らかにした。本研究では、シロイヌナズナのセントロメア領域の基本的構造を明らかにする目的で4番染色体セントロメアの詳細な構造解析を行った。

4番染色体長腕側セントロメア領域のゲノムウォーキングによりBAC 2クローンを分離し、約 100 kb の領域の配列を解析した。4番染色体長腕側セントロメア領域約 150 kb は 180-bp 反復配列は4つの *Athila* レトロトランスポソンで分断された構造を示し、この結果は、5番染色体と同様であった(図9)。

残りの領域の構造を推定するため、ランズバーグ株(*Ler*)、ランズバーグ由来 Tr4S ミニ染色体を保有するコロンビア株(*Col+tr4s*)、Tr4S のセントロメア領域がコロンビア株4番染色体セントロメア領域と置き換わった組換え体(*Colcent4Ler*)及びコロンビア株(*Col*)を用い、各々の株についてパルスフィールド電気泳動解析(*Apa I*, *Pme I*)を行った。*Ler* 株及び *Col* 株4番染色体セントロメア領域での切断パターンに明確な差が認められ、この事は4番染色体セントロメア領域へ転移した *Athila retrotransposon* の種類及び転移部位が *Ler* 株と *Col* 株によって異なる事を示している。更に *Col* 株4番染色体セントロメア領域を2次元パルスフィールド電気泳動(*Bam HI*)により解析したところ、1400, 600, 500 kb の *Apa I* 断片が *Bam HI* により、それぞれ(2 x 700 kb), (300, 200, ~80 kb), (180, 100 kb and several short fragments) に切断された(図10)。これらの結果に基づき、*Col* 株4番染色体セントロメア領域は2個の 700 kb に渡る巨大な 180 bp 反復配列を中心に

Athila retrotransposon により分断されたさまざまなサイズの 180 bp 反復配列により構成されていることが示された。以上の結果より、この構造は基本的に5番染色体セントロメアと同様であり、シロイヌナズナセントロメアの基本的な構造であると考えられる。

Characterization of Centromeric Region of Chromosome 4

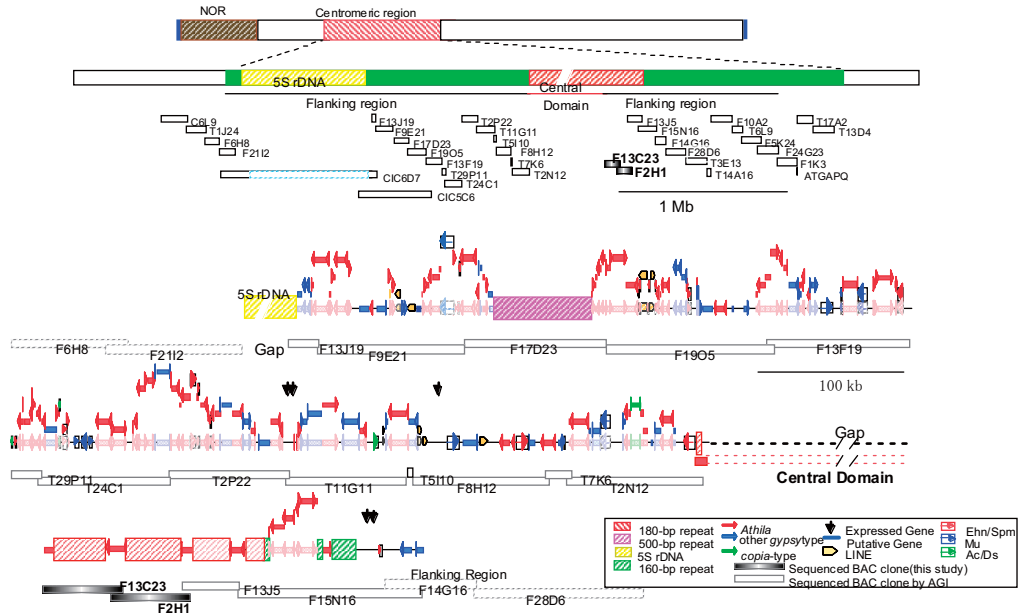


図9. シロイヌナズナ4番染色体セントロメア領域の物理地図。

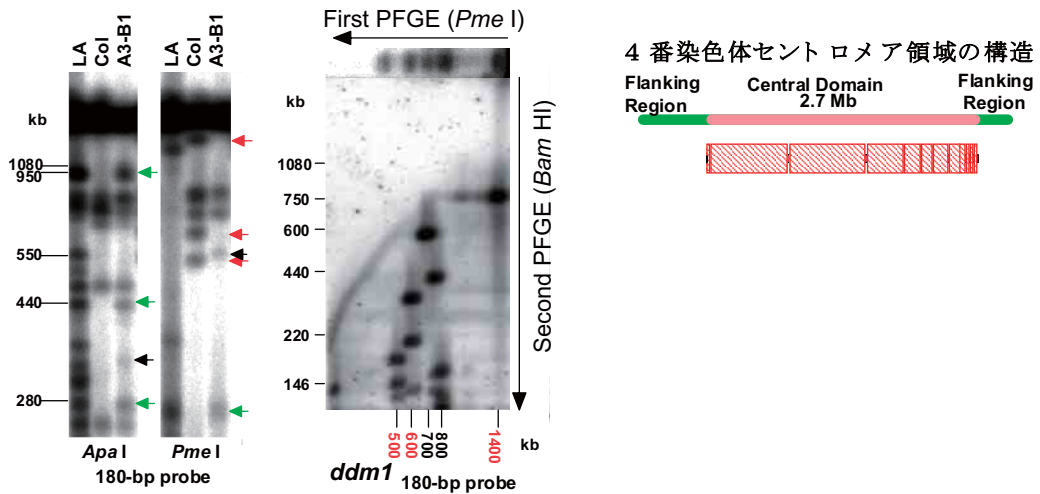


図10. 一次元及び2次元電気泳動によるシロイヌナズナセントロメア領域の解析。

(2) 研究成果の今後期待される効果

2000年暮れに、シロイヌナズナのゲノムプロジェクトが一応完了し、その成果が Nature に発表された。しかし、縦列型反復配列を多く含むセントロメア領域については、ほとんどカバーされなかった。本研究グループでは、この点を重視し、シロイヌナズナのセントロメア

全領域の解析を進めてきた。今回は、第4染色体のセントロメア領域を、二次元パルスフィールド電気泳動法を駆使して、解析した。これらの成果は、今後、シロイヌナズナのセントロメア構造理解に役立つだけでなく、植物の人工染色体構築に大きく貢献するものである。

3.3 ムギ類セントロメアの構造解析(京都大学 ムギグループ)

(1) 研究実施内容及び成果

単子葉植物であるコムギ、オオムギのセントロメア構造の解析を行った。コムギゲノム中に存在する染色体に対し構造異常を誘発する配偶子致死システムを利用して、セントロメア領域に構造異常を持つ系統の選抜・単離を行った。これらの系統と分子遺伝学・分子細胞遺伝学的解析を組み合わせることにより、ムギ類のセントロメア構造の解析を行った。主な成果としては、次のようなものがある。

①コムギ特異的なセントロメア反復配列の単離

この配列はセントロメア特異的レトロトランスポゾン(CR)の LTR 領域に存在する同方向反復配列であった。既にコムギのセントロメア領域に局在する Ty3/gypsy 型のレトロトランスポゾンは報告されており、コムギのセントロメア反復配列の単離としては世界に先駆けるものではない。しかし、我々の単離した配列はすべてのコムギ染色体のセントロメア領域に存在し、近縁のオオムギ・ライムギには存在しない。実際に、この配列をプローブとした *in situ* hybridization 法で異種染色体間のロバートソン型転座染色体がコムギのセントロメア領域を保持しているかを判別できることを示した。

②コムギ“ネオセントロメア”の同定と解析

コムギゲノム中に導入されたオオムギ 7H 染色体に構造異常を誘発し、セントロメア領域に切断点を持つ系統を選抜した。それらのうち 2 種の端部セントロメア染色体(7HS*と7HS**)を分子細胞遺伝学的に解析し、これらの染色体は既報のセントロメア反復配列(AGGGAG マイクロサテライトと cereba レトロトランスポゾン)を欠いていることを明らかにした。体細胞分裂においても減数分裂においてもこれらのセントロメア領域に構造以上を持つ染色体は安定的に伝達することから、機能的なセントロメアが形成されていることは明らかである。また、間接蛍光抗体法により、これらのセントロメア部位には機能的セントロメアに必須のキネトコアタンパク質が局在していることを明らかにした。以上の結果は高等植物のセントロメア領域に反復配列が必須であるとの定説を否定する。以上の結果は、植物においてもセントロメア領域は可塑的であり、新規にセントロメアが形成された可能性を示唆する結果として関連する総説に取り上げられた。

③コムギ MAD2 タンパク質の解析

コムギから細胞周期の分裂期におけるスピンドルチェックポイントの鍵タンパク質で、セントロメア領域への局在が予想される MAD2 タンパク質をコードする遺伝子を単離した。コムギにおいて MAD2 タンパク質は細胞分裂の盛んな根端と幼穂において発現しており、分裂のあまり盛んでない成葉では発現が認められなかった。また、コムギ MAD2 タンパク質に対する抗体を作成し、同タンパク質が細胞周期依存的に細胞内局在を変化させることを明らかにした。紡錘糸形成阻害剤であるコルヒチン処理により、MAD2 タンパク質のキネトコアへの局在はスピンドル形成に支配されていることを明らかにした(図11)。動物・酵母では多数の報告があるが、高等植物の MAD2 タンパク質の機能解析としては世界で 2 例目であり、植物においてもスピンドルチェックポイントの機構に MAD2 タンパク質が関与していることを示す結果となった。

④コムギのヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の同定と解析

コムギからヘテロクロマチン形成の鍵タンパク質である HP1 をコードする遺伝子ホモログを単離し、HP1 タンパク質の細胞内局在を調査した。コムギの HP1 ホモログ遺伝子は第 7 群染色体に座乗する同祖遺伝子により支配されており、近縁のイネ科植物の配列と比較してイントロンを欠くという特徴をもっていた。HP1 ホモログ遺伝子は恒常的に発現していた。根端細胞の免疫染色により、HP1 タンパク質は間期には細胞核全体に存在し、体細胞分裂中期において染色体に局在することが明らかになった。中期染色体上での局在パターンは倍数性依存的であり、オオムギ・ライムギ・コムギ祖先野生種などの 2 倍体とその他の 4 倍体コムギではセントロメアに局在し、6 倍体では染色体全体に分布することを明らかにした。局在の違いが遺伝子量効果によらないことをバンコムギの異数体系統を用いて明らかにした。また、合成コムギを用いることにより局在の変化が 3 倍体コムギから 6 倍体が生じた時点で起こることを示した。植物におけるヘテロクロマチン形成の分子機構ははまだ解明されておらず、この分野の端緒となる研究である。

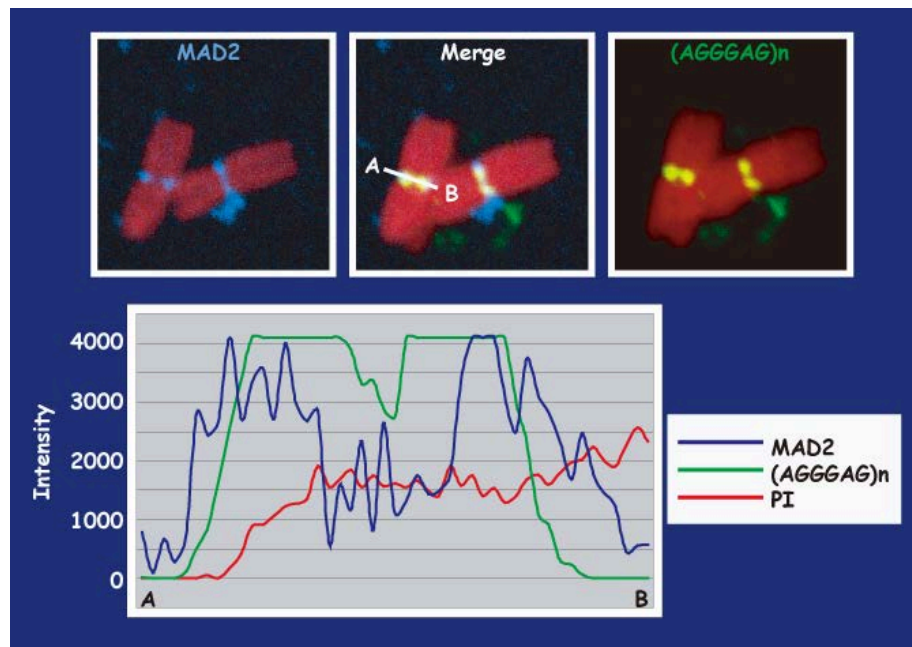


図 11. オオムギ染色体において MAD2 タンパク質は AGGGAG マイクロサテライトと共局在する。抗 MAD2 抗体による免疫染色像(上段左、青色)と AGGGAG 配列による FISH 像(上段右、緑色)、およびにそれらの重ね合わせ像(上段中)を示す。MAD2 シグナルは AGGGAG シグナルとよく一致している(上段中、白色)。上段中央の線分 A-B の各色のシグナル強度を測定すると MAD2 シグナルは AGGGAG シグナルのより外側(紡錘糸付着側)に位置していることが分かる(下段)。

⑤3 倍体コムギにおける配偶子形成過程の解析

ヒストン H3 のセリン 10 残基のリン酸化を指標として 3 倍体コムギにおける配偶子形成過程を解析した。リン酸化ヒストン H3S10 は減数分裂の第一分裂と第二分裂で染色体上での局在部位を変えることが知られている。第二分裂中期から後期にかけてリン酸化ヒストン H3S10 はパラセントロメア領域に局在する。そして、局在変化はクロマチンの凝縮に関与しているといわれている。高等植物においてリン酸化ヒストン H3S10 の局在はシロイヌナズナとムギ類で報告されている。我々が3倍体コムギが非還元配偶子を形成する特異な細胞分

裂(一回の複製と一回の細胞分裂のみの細胞分裂)に関し、リン酸化ヒストン H3S10 の局在を調査したところ、一価染色体が赤道面に配位されるまでは減数分裂第一分裂型(染色体全体に存在)を示し、姉妹染色分体の分離が始まる後期において減数分裂第二分裂型(セントロメア領域に局在)に変化することがわかった(図12)。この結果は一回の細胞分裂の途中で分裂型が変化することを意味する。非還元配偶子形成のメカニズムについては今まで分子的な解析は全く行われておらず、相同染色体の対合が全く欠如した3倍体コムギにおいて、生殖細胞が減数分裂の途中で分裂型を変えているという新しい知見をもたらした。

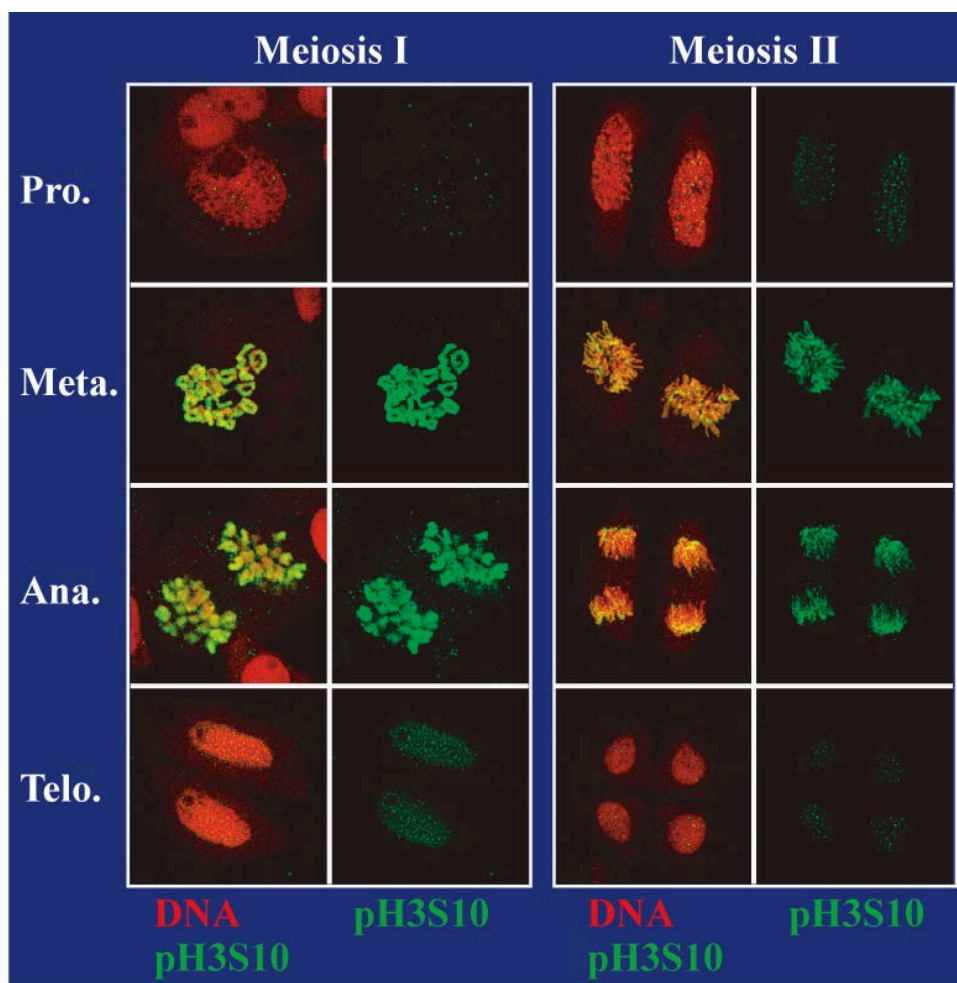


図12. 6倍体コムギの減数分裂期におけるリン酸化ヒストン H3 セリン 10 の局在。リン酸化ヒストン H3 セリン 10 (pH3S10) を緑色、DNA を赤色で示す。減数分裂第一分裂(左、Meiosis I)と第二分裂(右、Meiosis II)の前期(Pro.)、中期(Meta.)、後期(Ana.)、終期(Telo.)の細胞を示す。pH3S10 のシグナルは第一分裂中期から後期にかけて染色体全体に、第二分裂中期から後期にかけてパラセントロメア領域に見られる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

セントロメア領域は染色体の分配に必須であるためその機能を失った突然変異体は原理的に育成不能である。遺伝的に染色体切断を誘発する配偶子致死システムをオオムギ

染色体に適用して既知のセントロメア配列を欠如した染色体を得た。これはセントロメア領域が遺伝的にだけでなくエピジェネティックに規定されているということを示唆する結果である。この構造異常染色体のセントロメア領域が本当に新規に獲得されたセントロメア(ネオセントロメア)なのかは、そこに存在する DNA 配列を単離し、正常なオオムギ染色体でその DNA 配列がセントロメア機能を担っていないことを検証しなければならない。植物において厳密な定義に従ったネオセントロメアはまだ報告されておらず、今後の研究によって構造異常染色体のセントロメアがネオセントロメアであることが判明すればセントロメアに関する理解は深まる。比較対象として正常なオオムギ染色体の機能的セントロメア配列をしておく必要があるが、我々はオオムギの AGGGAG 配列が機能的セントロメアマーカーである MAD2 タンパク質と共局在するという知見を得ている(後述)。この結果はセントロメアにおいてヌクレオソームを構成している CenH3 (CENP-A)タンパク質によるクロマチン免疫沈降法の結果と一致する。正常オオムギ染色体と構造異常 7HS*染色体でセントロメアを構成している配列を比較することにより、機能的セントロメアの構成要因を明らかにできるものと考えている。

MAD2 タンパク質に関しては、同タンパク質がキネトコアの外側である紡錘糸付着面に位置することを示した。また、偽二動原体染色体の解析により MAD2 タンパク質は機能的セントロメアにのみ局在することを明らかにした。MAD2 タンパク質は分裂中期染色体において比較的狭い領域にしか存在しない。正常オオムギ染色体において MAD2 のシグナルは AGGGAG マイクロサテライトとよく共局在し、cereba レトロトランスポゾン的大部分とは共局在しない。これは正常オオムギ染色体において少なくとも紡錘糸の付着には AGGGAG 反復配列が関与していることを示唆する。我々の開発した抗コムギ MAD2 抗体は少なくともムギ類には交差性を示しムギ類における機能的セントロメアのよいマーカーとして使用できる。抗 MAD2 抗体がコルヒチン処理した細胞でのみセントロメア領域にシグナルを生じる理由はいまだ明らかでない。近年、動物において紡錘糸形成阻害剤で処理した染色体が特異なクロマチン構造をとることが報じられている。植物ではまだ報告がないが、コルヒチン処理により分裂期染色体が特異なクロマチン構造をとっているのを反映しているのかもしれない。

HP1 タンパク質に関しては研究が始まったばかりであり、解決すべき問題は山積している。まず、植物において HP1 タンパク質の局在が何によって規定されているかが全く分かっていない。酵母や動物等の解析から HP1 タンパク質の局在が DNA のメチル化とメチル化ヒストン H3K9 の局在に規定されていることが示唆されているが、我々の実験では HP1 タンパク質の局在を直接説明しうる修飾ヒストンは見つかっていない。この結果は、ヘテロクロマチンの成り立ちが動物と植物で異なることを示唆する。今後、抗 HP1 タンパク質抗体を用いた免疫沈降法などで HP1 タンパク質と相互作用するタンパク質群を同定する必要がある。また、HP1 タンパク質の倍数性依存的局在変化に関してはその生物学的意味を明らかにする必要がある。倍数体においてはエピジェネティックな機構により重複した遺伝子の発現調節が行われていることが報告されている。HP1 タンパク質がクロマチン構造を変化させることにより重複遺伝子の発現調節に関与しているかを明らかにする必要がある。

巨大で複雑なゲノムを持つムギ類は分子生物学的研究に向かないと従来思われてきた。反面、巨大な染色体は細胞遺伝学的研究を比較的容易にしている。昨今のゲノミクスの進展によりムギ類においてもセントロメアを初めとしたクロマチン構成に関与する遺伝子・タンパク質の同定と特徴付けが可能になってきた。ムギ類のセントロメア構造に関してはいまだその一次構造としての DNA 配列が同定されていないなど、まだ端緒に着いたばかりである。主要作物としてのムギ類のもつ社会的・経済的重要性は大きい。ムギ類の育種には交雑と選抜が不可欠である。交雑によってもたらされた異種染色体がムギ類のゲノム中で安定的に子孫に伝わるにはその異種染色体のセントロメアが正常に機能することが必須である。今後、遠縁交雑などの系を用いて異種染色体のセントロメア機能の解析を進めていく必要がある。

3. 4 タバコ、トレニア及びムギ類のセントロメア構造とその機能(鳥取大学、タバコグループ)

(1)研究実施内容及び成果

本研究の目的は、反復配列の研究が進んでいるムギ類、および形質転換が容易で細胞学工学的研究が可能なタバコ(ナス科)を用いて、植物のセントロメアの構造と機能を明らかにすることである。プロジェクトの途中で、受精のモデル生物でもあるトレニアも研究材料に加え、雑種におけるセントロメアの研究も追加した。なお、トレニアはナス科に近縁のゴマノハグサ科に属し、タバコ同様形質転換が容易である。研究内容を大別すると、次の4課題になる。

①タバコのセントロメア構造解析

本小課題では、タバコのセントロメアに局在する反復配列を得て、これをタバコ細胞へ形質転換することで、人工染色体を作成することを目指した。まず、タバコの長鎖ゲノムDNAを含むライブラリーを作成した。ベクターとしては *Agrobacterium* による形質転換能をもつ大腸菌人工染色体(BIBAC)を用いた。ペチュニア(ナス科)のセントロメア特異的反復配列(666bp 配列)をプローブとして、市販のペチュニア BIBAC ライブラリーから 1000 クローンをスクリーニングして反復配列をもつ 68 クローンを選抜した。これら反復配列の染色体座位を蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)によって調査した。しかし、いずれもセントロメアには局在しなかった。

② トレニア種間雑種のセントロメア構造および機能解析

種間雑種において、しばしば一方の種のセントロメアが機能を失い、脱落する現象が報告されている。そこで、植物受精のモデルであるトレニア(*Torenia fournieri*)を材料として用いた。まず、トレニアからセントロメア特異的反復配列を同定、クローニングして、TCEN 配列と名付けた。またトレニアと同属異種のバイロニ(*T. bailonii*)からもセントロメア特異的反復配列を見出し BCEN 配列とした。両者はともに、52bp の単位長の反復配列であり、両配列間の相同性は 52% である。減数分裂パキテーン期の伸張した染色体への FISH から、これら配列がセントロメアそのものに存在することを明らかにした(図13A)。

次に、トレニアとバイロニの種間雑種を育成した。TCEN および BCEN 配列をプローブとすることによって両親種由来のセントロメアを識別することができた(図13B)。三次元FISH法によって、種間交雑過程や体細胞におけるセントロメアの行動を解析した。その結果、受精細胞で見られるセントロメアの核内配置の分離は、幼植物や花卉細胞でも見られることを明らかにした(図13C)。しかし、細胞分裂が停止している細胞では、両親種由来のセントロメアは混合していた。さらに、雑種の減数分裂におけるセントロメアの行動を観察したところ、トレニア(2n=18)およびバイロニ(2n=16)は、ゲノム基本数もセントロメア配列も異なるにもかかわらず、トレニアの 1 染色体以外の全染色体は完全な染色体対合を示すことが明らかとなった(図13D,E)。前期の早いステージで、両種の全セントロメアが集合し、その後、相同染色体のセントロメアが確認されることが観察された(図13F)。これは、減数分裂前期の相同染色体の認識にセントロメアが重要な機能も持つことを示唆している。

③コムギのセントロメアの構造および機能不全の解析

ムギ類では、セントロメアに局在する反復配列が複数報告されているが、これらは全て散在型反復配列である。私達は先にオオハマニンニク染色体の末端部に局在するヘテロクロマチン構成縦列型反復配列(TaiI)を見いだしたが、これがコムギにおいてはセントロメアに局在することを見いだした(図14A)。染色体が伸長した前中期の染色体を用い、散在型反復配列である Tai3/gypsy 配列と位置の比較した結果、両配列は極めて近接した位置に存在することを明らかにした。TaiI 配列は、種によって染色体末端もしくはセントロメアに

あり、セントロメアと末端部の構造の類似性を明らかにした。オオハマニンニクの類縁種ハマニンニクの染色体末端部は **TaiI** 配列をもたない。オオハマニンニクとハマニンニクの雑種を作り、減数分裂時の染色体行動を観察したところ、完全な二価染色体が出現し、末端ヘテロクロマチンは対合には関与していないことを明らかにした(図14B)。トレニアと同様、染色体対合には、セントロメアが重要な機能をもつ可能性がある。

次に、私達はコムギとトウモロコシの交配における、染色体脱落を調査した。三次元 **FISH** 法により、コムギの卵細胞がトウモロコシの精細胞と受精し、両核の融合および染色体脱落過程を観察した。その結果、トウモロコシ染色体は **DNA** 複製後の第一分裂において、極に移動せず赤道板に取り残され、紡錘糸がセントロメアに付着しないことが原因であることを明らかにした(図14C-E)。トウモロコシのセントロメアはくびれて形態上の変化はないので、キネトコアの外側のセントロメアタンパク質が欠如しているのではないかと思われる。

次に、ライムギの **B** 染色体の研究を行った。**B** 染色体は配偶子形成過程の体細胞分裂の中期で姉妹染色分体のセントロメア部分が付着し、後期で不分離を起こす。これはセントロメアの異常であり、これに関与する要因を明らかにすることによって、セントロメア本来の機能因子を調査できると考えた。そこで、まず、**B** 染色体をコムギに導入し、さらに染色体切断を誘発するコムギの **Gc** 遺伝子を働かせて、**B** 染色体に欠失を持つ個体を育成した。その結果、**B** 染色体長腕末端部に不分離に関与する遺伝子が座乗し、それがセントロメア両側の付着点に作用して分離を阻害することが明らかとなった。

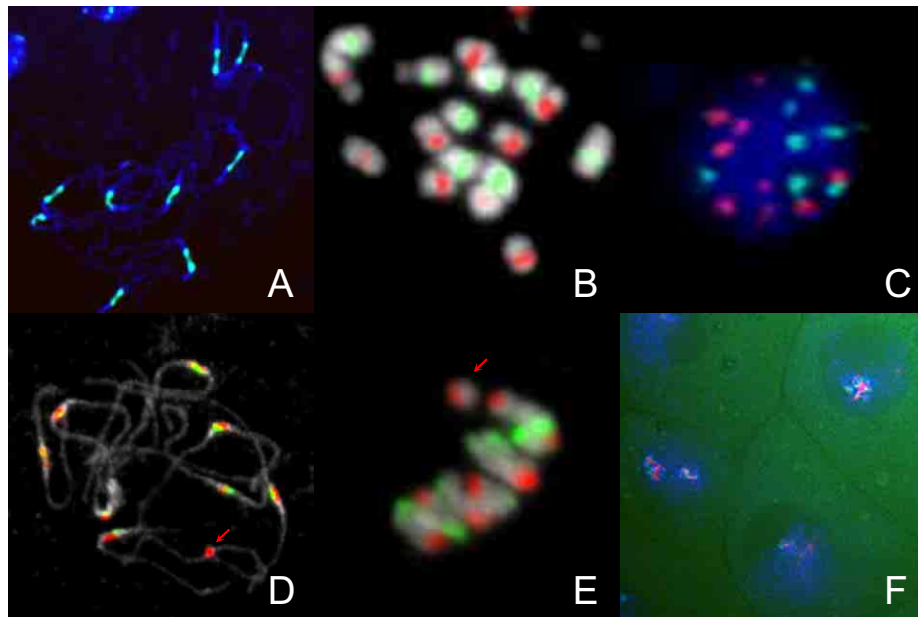


図13. トレニア種間雑種におけるセントロメアの挙動。赤:TCEN 配列。緑:BCEN 配列。A:トレニアのパキテーン染色体上へのTCEN配列の検出。TCEN配列がセントロメア近傍のヘテロクロマチン領域とともに、コア領域にも存在することがわかる。B:トレニア種間雑種染色体へのTCEN、BCEN配列の検出。両親種由来の染色体を識別することが可能になった。C:雑種細胞核へのTCEN、BCEN配列の検出。両親種由来染色体は核内で分離していることが立体観察された。D、E:雑種パキテーン染色体、第一分裂中期染色体へのTCEN、BCEN配列の検出。異種染色体間の二価染色体の形成と、トレニア由来の一価染色体(赤矢印)が観察された。F:ザイゴテン期の細胞におけるTCEN、BCEN配列の立体観察。体細胞で分離していた異種セントロメアが(C)、集合しているのがわかる。

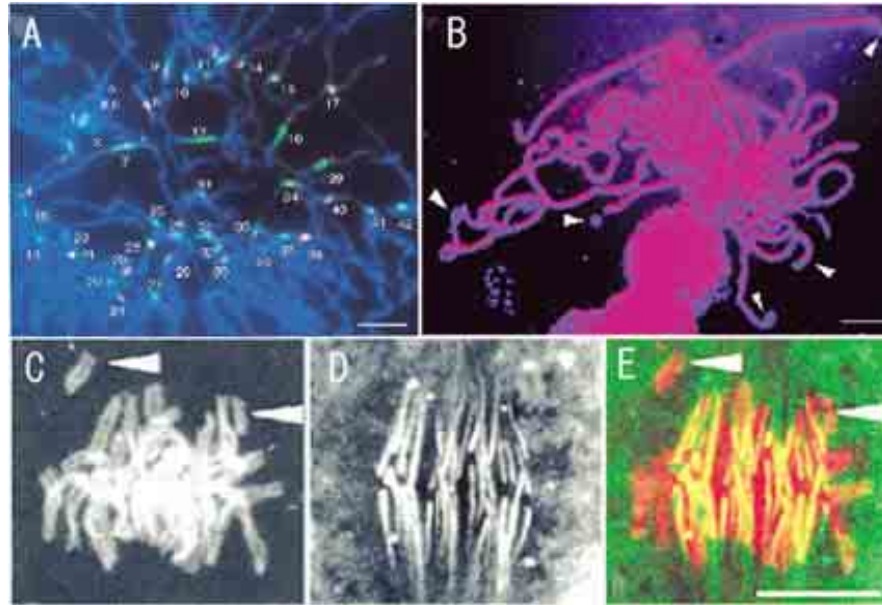


図14. A:コムギセントロメアに存在する縦列型反復配列 TaiI。前中期染色体へのFISH。赤シグナルは TaiI 配列、緑シグナルは Ty3/Gypsy 配列で、TaiI 配列はセントロメアに局在する (Kishii et al. 2001)。B:ハマニンニクとオオハマニンニクの雑種減数分裂パキテーン期における染色体対合。プローブは、ハマニンニクのゲノム DNA。GISH (赤) によって、二価染色体の相同染色体を識別した。オオハマニンニクの末端ヘテロクロマチン (矢印) は染色体対合に関与していない (Kishii et al. 2003)。C-E:コムギ×トウモロコシの受精卵の第一分裂におけるトウモロコシ脱落染色体への紡錘系の関与。C、蛍光染色、D、チューブリン抗体による紡錘系の配向。E、C と D を重ね合わせ画像。脱落染色体 (矢印) のセントロメアには紡錘系が付着

④ セントロメア研究技術の開発

1) 長鎖 DNA のタバコ細胞への導入法開発の試み

BIBAC によって長い DNA 断片が安定的に導入されるか否かに関しては、条件検討が必要なところであったので、タバコおよびペチュニアゲノムの長鎖 DNA を含む BIBAC をタバコに形質転換させて、方法の検討を行った。様々な工夫を行ったが、期待される形質転換体を得ることができなかった。

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

染色体の行動を立体的にとらえセントロメアの機能を明らかにするため、組織を樹脂包埋して切片を作り、FISH する方法を開発した (図15A)。さらに、細胞をポリアクリルアミドに封埋し、FISH する方法もトレニアの胚嚢細胞に適用した。この手法は、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にも有効であった

3) 連鎖地図において機能的セントロメアの位置を決定する Tetrad-Fish 法の開発

セントロメアは反復配列からなる複雑な構造をしているために、連鎖地図上にマッピングするのは困難である。アカパンカビや酵母において機能的セントロメアを同定する方法として用いられている四分子分析と FISH を組み合わせ、セントロメアの位置決定を行う方法を開発した (図15B)。

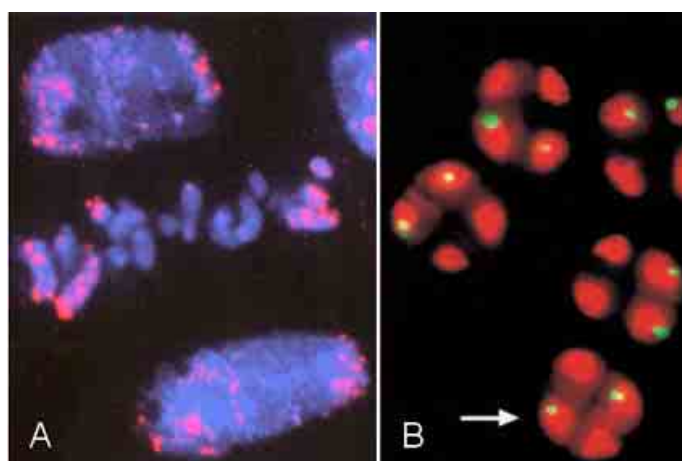


図15. A: テクノビット7100樹脂封埋切片に対するGISH。オオハマニンニクとコムギの雑種細胞におけるオオハマニンニク染色体の識別(赤)(Mochida and Tsujimoto 2001)。B: Tetrads-FISH法による機能的セントロメア部位の同定。矢印で示した花粉四分子(Tetrad)は、シグナルが対角位の細胞に出現しており、これはこのプローブの位置と機能的セントロメアの間で染色体の乗換えが起こったことを示している(Kagawa et al. 2002)。

2) 研究成果の今後期待される効果

これまでの研究で、セントロメアの機能を研究するための研究手法および基盤の整備を行った。トネリアでは、セントロメア反復配列をクローニングしたので、今後、これを形質転換することによって人工染色体作成のためのセントロメアとして用いることができるかもしれない。しかし、DNAレベルの研究のみでは不十分であり、セントロメアを構成するタンパク質の研究が不可欠である。その際、本研究で開発した細胞の三次元観察法が有用となる。また、セントロメアの機能因子を解明するためにはセントロメアが働かなくなる実験系を確立し、証明する必要がある。コムギ×トウモロコシの雑種における染色体脱落は、これに適した実験系である。最近では、セントロメアが減数分裂での相同染色体対合に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。減数分裂の相同染色体認識については不明な点が多く、この機能でのセントロメアの研究が強く望まれる。そのためには、減数分裂の観察が難しい哺乳類ではなく、植物が好適な実験系となる。

3. 5 分散型セントロメアの特異的DNAの解析(岡山理科大学 カヤツリグサグループ)

(1) 研究実施内容及び成果

ほとんどの高等生物のセントロメアは染色体の1カ所に局在している。しかし、カヤツリグサ科植物はセントロメアが染色体全体に分散する非局在型セントロメアを有する。このタイプの染色体は染色体の小型断片が生じてもセントロメアを持っているため染色体の機能を失わず遺伝子は正常に両極に分配される。このような非局在型セントロメアの機能を解析することにより、人工染色体作出に対する重要な知見が得られるものと考えられる。

本研究では、高等植物で分散型セントロメアを持つカヤツリグサ科植物とイグサ科植物を対象として、セントロメア、テロメア、リボゾーム遺伝子の局在部位を明らかにすることを目的とした。また、コムギなどでは、そのセントロメア近傍に多コピーのgypsy様レトロトランスポ

ンが挿入されている。分散型セントロメアを持つカヤツリグサ科においても、同様なレトロポゾンの組み込みが見られるかを明らかにし、局在セントロメア染色体と比較することを目的とした。

カヤツリグサ科植物スゲ属のササノハスゲやケタガネソウ、およびイグサ科植物スズメノヤリ属の *Luzula elegans* において、テロメア遺伝子と核リボゾーム遺伝子を用いた FISH 法によりその局在部位を明らかにした。テロメア遺伝子は、シロイヌナズナの pAtT4 をプローブとして FISH を行なった結果、すべての染色体の端部にシグナルが現れた。また、5SrDNA と 18SrDNA のシグナルは染色体の端部または介在部に局在していた。このことから、非局在型セントロメア染色体は、テロメア遺伝子と核リボゾーム遺伝子は局在しているが、セントロメア構造は染色体上に分散していることが明らかになった(図16)。

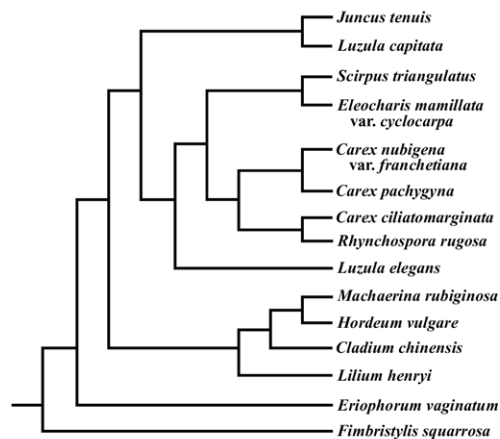


図 16. Gypsy 配列に基づいた最節約法による分子系統樹。

ほとんどの生物は、セントロメアが1カ所に局在する局在型セントロメアを持っている。局在型セントロメア染色体のテロメアや核リボゾーム遺伝子の局在部位に関しては多数の種で詳細な解析が行なわれている。しかし、非局在型セントロメアに関しては明瞭な結果は得られていない。本研究ではカヤツリグサ科植物の rDNA をクローニングしプローブとすることにより、明瞭なシグナルが観察され、その局在部位を明らかにすることができた。

また、カヤツリグサ科植物に X 線照射を行ない、染色体断片を作出した。その断片は切断部位に新たにテロメアが再生され、2年を経ても消失せず、生き残ることを明らかにした。セントロメア構造が染色体上に分散しており、断片化してもその断片がセントロメアを持っていることから後代に正常に分配されるものと考えられる。

単子葉植物のセントロメア領域に *Ty3/Gypsy* 型のレトロトランスポゾンのインテグラーゼ領域が存在することが明らかにされている。そこで、分散型セントロメアを持つカヤツリグサ科とイグサ科植物におけるレトロトランスポゾンの局在部位を明らかにするために、今まで高等植物で発表されたレトロトランスポゾンの配列を参考にプライマーを設計し、PCR 法により増殖した後クローニングし塩基配列を決定した。カヤツリグサ科 10 種、イグサ科 3 種で *Ty3/Gypsy* 型のレトロトランスポゾン遺伝子を決定した。アミノ酸の相同性を比較したところ、種間で高い値が得られた。非局在型セントロメア染色体の *Ty3/Gypsy* 型レトロトランスポゾン遺伝子は、本研究で初めて明らかにしたものである。高等植物の動原体近傍には多コピーの *Ty3/Gypsy* 型レトロトランスポゾンが挿入されていることが知られている。そこで、分散型動原体を持つカヤツリグサ科植物とイグサ科植物の *Ty3/Gypsy* 型レトロトランスポゾン(インテグラーゼ領域)の塩基配列を種間で比較しその系統関係を調べた。その結果、スゲ属植物は単系統を示し、イグサ科植物は側系統となった。しかし、局在型動原体を持

つイネ科やユリ科植物はカヤツリグサ科のクレードに含まれ、それぞれ単系統を示さなかった。このことから、単子葉植物の進化の過程で *Gypsy* 遺伝子に挿入、欠失が頻繁に生じているものと考えられる(図17)。

さらに、この遺伝子をプローブとしてカヤツリグサ科植物に FISH を行ない、染色体全長にわたって顆粒状のシグナルが存在することが明らかになった。このことから、非局在型セントロメアは染色体上に連続して存在するのではなく、顆粒状に分散する多セントロメアであると推定された。

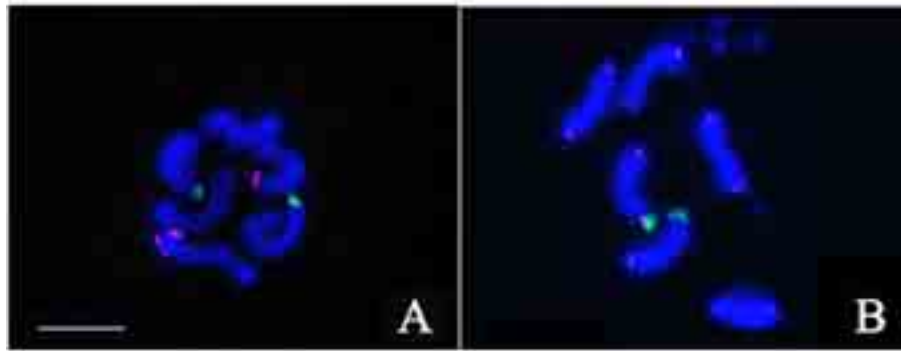


図17. *Luzula elegans* におけるrDNAとテロメアDNAのFISH像。A. 緑のシグナルは pCp18S(18S rDNA)、赤のシグナルは pCp5S(5S rDNA)。B. 緑のシグナルは pCp18S(18S rDNA)、赤のシグナルは pAtT4(telomere)。Bar=10 μ m。

(2) 研究成果の今後期待される効果

セントロメアが分散しているという特異な構造を持つ染色体を解析し、テロメアや核リボソーム遺伝子などは一般的な局在型セントロメア染色体と変わらないことが明らかになった。X線照射などにより作出された染色体の小型断片は、セントロメアを持っていることから正常に細胞分裂の際両極に分配されることがわかった。このような染色体断片で、特に小型のものを選別できれば人工染色体として利用可能となる。

高等植物で分散型セントロメア染色体を持つものは、単子葉植物ではカヤツリグサ科、イグサ科およびユリ科の一部である。また、双子葉植物ではモウセンゴケ属のみが分散型セントロメアを持っている。このように、高等植物の中でセントロメア構造が分散するという特異な現象は進化の過程で突然出現しており、分散型セントロメアの遺伝子解析は生物の染色体進化を解明する点からも重要である。本研究で新たに見いだした分散型セントロメアの *Ty3/Gypsy* 型のレトロトランスポゾン遺伝子は他の高等植物と相同性が高いことが明らかになった。今後、他の生物種でレトロトランスポゾンを解析し、その遺伝子を種間で比較することにより染色体の進化に関する新しい知見が得られるものと考えられる。

3. 6 セントロメアの機能構造(レスター大学、結合タンパク質グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

① シロイヌナズナのセントロメアDNAの構造

プロジェクト開始時に、すでに我々の研究からシロイヌナズナセントロメアにおける180-bp配列の重要性が指摘されていた。このプロジェクトではこの180-bp配列について、計算機を用いたさらに詳細な解析を行った。セントロメアのDNAは他の配列のヌクレオソームへのパッケージングのルールには従わないと考えられる。そこで、DNAのフォールデ

イングについての解析を行い、この配列の特定の領域が(ねじ曲がった)kink 構造をとることがわかった(図18、19)。

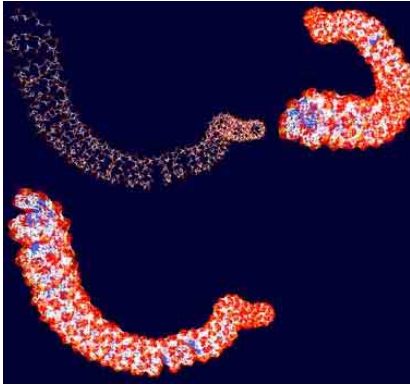


図18. シロイヌナズナにおけるセントロメア特異的 180-bp 反復配列予測される DNA 彎曲構造。異なる角度から見た分子構造モデルで、180-bp 基本単位 DNA は *Hind*III サイトに向かったやや鋭角な逆向きのターンはあるものの、全体的に均等な彎曲を示す。

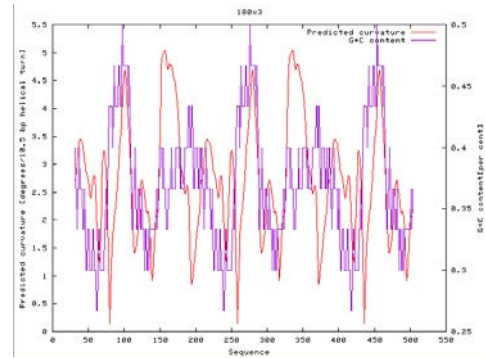


図19. シロイヌナズナ 180-bp 反復配列の基本単位約3つからなる配列の GC 含量(紫)および(予想される)DNA の彎曲度(赤)。一般的に GC 含量の高い領域や AT 含量の高い領域は彎曲構造をとることが多いが、図1の kink 構造領域では低い GC 含量を示す。

Arabidopsis 属、*Brassica* 属、テンサイ(*Beta vulgaris*) およびバナナ(*Musa spp*)の配列から、セントロメアの縦列型反復配列に類似した分散型の配列(図20では対角線に平行でないギャップ)を探した。様々なクラスの gypsy 型レトロトランスポゾンが存在しており、このクラスの因子のあるものは *in situ* ハイブリダイゼーションでも見られるようにセントロメアに数多く存在するが、別のものはセントロメアには存在していなかった。また、セントロメアに特異的な反復配列に類似した構造を持つレトロトランスポゾン様配列は見つからなかった。

バイオインフォマティクスの研究により、セントロメアにない縦列型反復配列(特に穀類の pSs119.2)やレトロトランスポゾンの DNA 配列とは異なる特徴が、セントロメアの縦列型反復配列で数多く明らかになった。しかし、これらの特徴が機能的に意味があるかどうかは、はっきりしない。

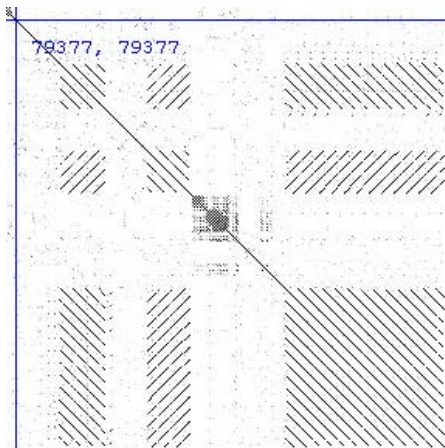


図20. BAC クローン AC004483 の配列の一部の自身に対するドットプロット。縦軸と横軸で 70%以上の塩基配列が一致する場合にドットを表示するので、180-bp 縦列配列は対角線と平行な線として現れる。この配列には3つの反復配列のブロックがあり、真ん中のブロックでは反復配列の向きが他のブロックのものと逆になっている。これらのブロックの間にはユニークな DNA 配列があるが、そのうちの GC 含量の高いある領域では対角線付近の短い線からなる複雑なパターンが見られる。

②シロイヌナズナセントロメア特異的 DNA 配列と核タンパク質の相互作用の解析

我々は、表面プラズモン共鳴測定装置を用いてシロイヌナズナのセントロメア特異的

180-bp 配列と核タンパク質の特異的相互作用を調べた。基質に結合した分子の質量は、光学現象を利用して測定された。ビオチンで末端標識した DNA は、センサーチップ上に固定されたstreptavidin(基質)に結合した。核タンパク質の結合量はヒストグラムで示された。

我々はシロイヌナズナのセントロメア特異的 180-bp 配列、アブラナのセントロメア配列、コムギ反復配列を用い、核タンパク質結合量を比較した。DNA を結合させず、ビオチンのみで飽和させたセンサーチップを用いたコントロール実験では、タンパク質を流してもベースラインが変わらなかったことから、非特異的なタンパク質の結合はなく、以後の実験ではこのコントロール実験は不要と考えられた。

センサーチップに結合させた DNA が、タンパク質と相互作用する現象は再現性よく示された。シロイヌナズナの配列が他の種類のタンパク質よりシロイヌナズナのタンパク質によく結合するといった差異は認められず、また、アブラナやコムギでも同様の結果だった。それぞれのタンパク質で、用いた3種類全ての DNA との相互作用で同じような特徴的な結合プロファイル(センサーグラム)が再現性よく得られた(図21)。DNA タンパク質相互作用の特異性に影響する重要なファクターの一つは相互作用の時間の長さであろう。フローセルでは 10 μ g のタンパク質が数 μ l/min の速度で 10 分間 DNA と相互作用できる。そこで我々はstreptavidinチップに添加する前に DNA とタンパク質が相互作用できるよう 30-40 分間のプレインキュベーションを行った。この条件下ではシロイヌナズナ DNA は、シロイヌナズナタンパク質により高い効率で結合し、コムギタンパク質はシロイヌナズナ DNA よりコムギ DNA と強く相互作用した。タンパク質とセントロメア DNA の相互作用時間が重要だったので、これを変えて実験を行った。その結果、反応は 30 分必要ないこと、予備的な結果では DNA とタンパク質の相対濃度により 1 分から 5 分が必要であることが示唆された。この実験は、ビオチン化プライマーを使用した PCR で得られた2本鎖 DNA を用いて行われ、また平行して行われたゲルシフト実験でも特異的 DNA タンパク質相互作用には 2-3 分かかることが示された。我々は塩基配列とタンパク質と同様に反応時間を考慮することで結果を解釈しなおした。このように表面プラズモン共鳴実験とゲルシフト実験で、特に DNA とタンパク質の反応時間が重要であることが理解でき進展がみられた。さらなる研究でセントロメアの配列の進化と多様性、この配列に含まれるレトロトランスポソンの関係について示される可能性がある。

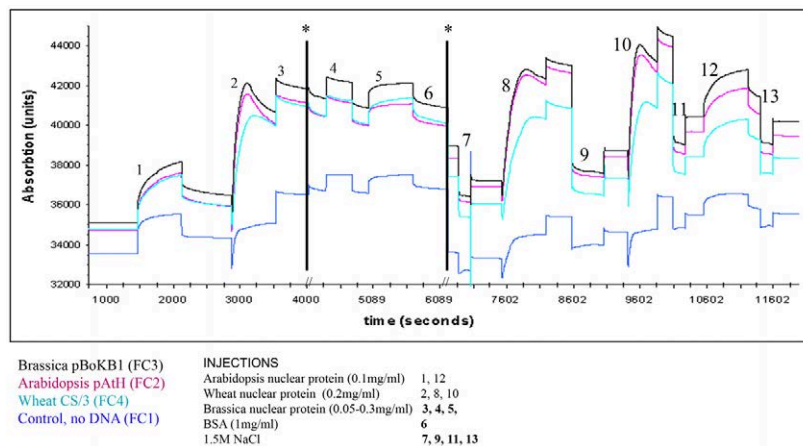


図21. 表面プラズモン共鳴測定装置によるセントロメア DNA とタンパク質の相互作用。ビオチン化したアブラナ属植物、シロイヌナズナ、コムギの DNA を、それぞれ異なるセンサーチップに固定化した。タンパク質の添加は、4つ全てのフローセルに対して行ない、特徴的な結合プロファイル(センサーグラム)を示した。バッファーの濃度の違いによりタンパク質添加の始めと終わりでグラフがシフトしている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

我々の目的は、染色体のセントロメア DNA の塩基配列についての理解を深めること、すなわち、その塩基配列の中にセントロメアに必須のモチーフが存在するかどうかを明らかにすること、DNA の構造の面、保存性と進化を検証すること、セントロメア配列に特異的なヒストンタンパク質の種類とそれらの修飾、塩基配列と核タンパク質群との相互作用を調べることであった。これらにより機能的 DNA 配列の定義付けがなされることになる。我々は、シロイヌナズナ属の中のいくつかの近縁種や、進化的に遠い生物種(コムギ、ライムギ、テンサイやウシにいたるまで)、さらに種間雑種間での比較という手法を用いて、セントロメアの機能や制御のモデルをつくり出すことを目標とした。これらのモデルは植物および雑種での染色体の安定性の制御に役立つだけでなく、人工的に作られた機能性セントロメアすなわち人工染色体の構築に役立つ。我々の研究はセントロメア配列とそれと相互作用するタンパク質の特徴や特異性を明らかにした。DNA 塩基配列それ自体はセントロメア機能に必要なが、それだけでは十分ではないと思われる。

4 研究参加者

①シロイヌナズナ A グループ(シロイヌナズナ セントロメアの研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
村田 稔	岡山大学資源生物科学研究所	教授	研究統括	平成 12 年 11 月～平成 18 年 3 月
小倉 豊	岡山大学資源生物科学研究所	助手	CENP ホモログの同定	平成 12 年 11 月～平成 18 年 3 月
長岐 清孝	岡山大学資源生物科学研究所	助手	セントロメア DNA とタンパク質解析	平成 16 年 1 月～平成 18 年 3 月
柏原 壱成	岡山大学資源生物科学研究所	技術員	一般事務、技術補助	平成 16 年 4 月～平成 18 年 3 月
谷 明憲	岡山大学資源生物科学研究所	大学院生	テロメアの機能解析	平成 13 年 4 月～平成 18 年 3 月
宮迫 聡	岡山大学資源生物科学研究所	大学院生	CENP 遺伝子の解析	平成 13 年 4 月～平成 18 年 3 月
脇本 宗徳	岡山大学資源生物科学研究所	大学院生	CENP 遺伝子の解析	平成 17 年 4 月～平成 18 年 3 月
Jaudal, Mauren, C.	岡山大学資源生物科学研究所	大学院生	CENP 遺伝子の解析	平成 17 年 4 月～平成 18 年 3 月
柴田 洋	岡山大学資源生物科学研究所	CREST 研究員	セントロメア配列の機能解析	平成 14 年 4 月～平成 18 年 3 月
佐藤 浩	岡山大学資源生物科学研究所	非常勤研究員／CREST 研究員	セントロメア結合タンパク質の同定	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月 平成 16 年 4 月～平成 16 年 9 月
早崎 美華子	岡山大学資源生物科学研究所	CREST 研究員	ミニ染色体の構造解析	平成 13 年 4 月～平成 14 年 2 月
程 治軍	岡山大学資源生物科学研究所	CREST 研究員	セントロメア反復配列の形質転換	平成 13 年 11 月～平成 16 年 3 月
横田 悦子	岡山大学資源生物科学研究所	研究補助員	染色体解析等	平成 13 年 4 月～平成 18 年 3 月
川西 史恵	岡山大学資源生物科学研究所	研究補助員	タンパク質解析	平成 13 年 4 月～平成 13 年 7 月、平成 14 年 4 月～平成 14 年 8 月
耳田 直純	岡山大学資源生物科学研究所	研究補助員	塩基配列解析等	平成 14 年 4 月～平成 14 年 8 月
藤井 美穂子	岡山大学資源生物科学研究所	研究補助員	植物形質転換等	平成 14 年 9 月～平成 15 年 3 月
永尾 清子	岡山大学資源生物科学研究所	研究補助員	一般事務	平成 13 年 1 月～平成 15 年 9 月
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	(助)教授	GFP による CENP タンパクの可視化	平成 12 年 11 月～平成 16 年 3 月

②シロイヌナズナ B グループ(シロイヌナズナ 第4染色体の研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
小谷 博一	かずさDNA研究所	室長	シロイヌナズナ第4染色体の構造解析	平成13年10月～平成18年3月

③ムギグループ(コムギ セントロメアの研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
遠藤 隆	京都大学大学院農学研究科	教授	系統の育成・細胞遺伝学的解析	平成12年11月～平成18年3月
那須田 周平	京都大学大学院農学研究科	助手	コムギ特異的セントロメア配列の単離	平成12年11月～平成18年3月
奥田 充顕	京都大学大学院農学研究科	大学院生	コムギの CENP-A 遺伝子の単離	平成15年4月～平成18年3月
金原 淳司	京都大学大学院農学研究科	大学院生	局在タンパク質の細胞遺伝学的解析	平成15年4月～平成16年3月
吉野 満昭	京都大学大学院農学研究科	研究補助員	染色体解析等	平成13年5月～平成13年12月

④ タバコ(トレニア)グループ(タバコ・トレニア セントロメアの研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
辻本 壽	鳥取大学農学部(横浜市立大学)	教授(助教授)	セントロメアクロソームのFISH分析	平成12年11月～平成18年3月
菊地 真司	鳥取大学大学院	大学院生	トレニアセントロメアの行動解析	平成15年4月～平成18年3月
城野 浩希	農学研究科 鳥取大学大学院	大学院生	トレニアセントロメアの行動解析	平成16年4月～平成18年3月
富田 因則	農学研究科 鳥取大学農学部	助教授	セントロメア特異的 DNA の解析	平成14年4月～平成17年3月
岸井 正浩	鳥取大学農学部	日本学術振興会特別研究員	セントロメア配列の解析	平成13年9月～平成16年9月
長岐 清孝	横浜市立大学木原生物研究所	助手	DNAライブラリーの作成と選抜	平成12年11月～平成13年10月
持田 恵一	横浜市立大学木原生物研究所	大学院生	染色体の行動分析	平成13年9月～平成14年3月
山田 豊美	横浜市立大学木原生物研究所	研究補助員	植物材料管理等	平成13年5月～平成14年7月

⑤カヤツリグサグループ(カヤツリグサ科植物 セントロメアの研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
星野 徹二	岡山理科大学 総合情報学部	教授	FISH による染色体解析	平成 12 年 11 月～平成 18 年 3 月
池田正五	岡山理科大学 総合情報学部	教授	セントロメア配列の解析	平成 13 年 10 月～平成 18 年 3 月
古田 和久	岡山理科大学 総合情報学部	大学院生	セントロメア特異的の特定	平成 12 年 11 月～平成 13 年 9 月
正木 智美	岡山理科大学 総合情報学部	研究補助員	DNA 塩基配列解析等	平成 13 年 4 月～平成 16 年 3 月

⑥結合タンパク質グループ (セントロメア結合タンパク質の研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
Heslop-Harrison, J. S.	レスター大学 生物学科	教授	セントロメア結合タンパク質の同定	平成 13 年 4 月～平成 18 年 3 月
Schwarzacher, T.	レスター大学 生物学科	講師B(準教授相当)	セントロメア結合タンパク質の局在性解析	平成 13 年 4 月～平成 18 年 3 月

⑦DNA 塩基配列解析グループ(セントロメア DNA・タンパク質の研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
赤木 宏守	秋田県立大学生 物資源科学部	助教授	長鎖DNAの解析	平成 13 年 10 月～平成 18 年 3 月
渡辺 明夫	秋田県立大学生 物資源科学部	助手	ESTクローンの解析	平成 13 年 10 月～平成 18 年 3 月

5 成果発表等

(1)論文発表 (国内 6 件、海外 26 件)

- 1) Kishii, M., Nagaki, K., Tsujimoto, H. A tandem repetitive sequence located in the centromeric region of common wheat (*Triticum aestivum*) chromosomes. *Chromosome Res.* 9:417-428, 2001.
- 2) 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, 2001.
- 3) Mochida, K., Tsujimoto, H. Development of a genomic *in situ* hybridization method using Technovit 7100 sections of early wheat embryo. *Biotechnic and Histochemistry* 76:257-260, 2001.
- 4) Kagawa, N., Nagaki, K., Tsujimoto, H. Tetrad-FISH analysis reveals recombination suppression by interstitial heterochromatin sequences in rye, *Secale cereale*. *Mol. Genet. Genomics* 267:10-15, 2002.
- 5) Cheng, Z.-J., Murata, M. Loss of chromosomes 2R and 5RS in octoploid triticale selected for agronomic traits. *Genes Genet. Syst.* 77:23-29, 2002.
- 6) Murata, M. Telomeres and centromeres in plants. *Current Genomics* 3: 527-538, 2002.
- 7) Kishii, M., Tsujimoto, H. 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* 45:946-55, 2002.
- 8) Schwarzacher, T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescence *in situ* hybridization data in plants. *J. Exp. Bot.* 54:11-23, 2003.
- 9) Heslop-Harrison, J. S., Brandes, A., Schwarzacher, T. Tandemly repeated DNA sequences and centromeric chromosomal regions of *Arabidopsis* species. *Chromosome Res.* 11:241-253, 2003.
- 10) Cheng, Z. J., Murata, M. A centromeric tandem repeat family originating from a part of *Ty3/gypsy*-retroelement in wheat and its relatives. *Genetics* 164:665-72, 2003.
- 11) Heslop-Harrison, J. S. Planning for remodelling: nuclear architecture, chromatin and chromosomes. *Trends Plant Sci.* 8:195-7, 2003.
- 12) Kishii, M., Wang, R. R.-C., Tsujimoto, H. Characterization and behavior of chromosomes of *Leymus mollis* and *L. racemosus* (Triticeae, Poaceae) during mitosis and meiosis. *Chromosome Res.* 11:741-748, 2003.
- 13) Chaves, R., Adegá, F., Wienberg, J., Guedes-Pinto, H., Heslop-Harrison, J. S. Molecular cytogenetic analysis and centromeric satellite organization of a novel 8;11 translocation in sheep: a possible intermediate in banded chromosome evolution. *Mammalian Genome* 14: 706-710.
- 14) Chaves, R., Adegá, F., Heslop-Harrison, J. S., Guedes-Pinto, H., Wienberg, J. Complex satellite DNA reshuffling in the polymorphic t(1;29) Robertsonian translocation and evolutionarily derived chromosomes in cattle. *Chromosome Res.* 11: 641-648, 2003.

- 15) Shibata, F., Murata, M. Differential localization of the centromere-specific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Science* 117: 2963-2970, 2004.
- 16) Mochida K., Tsujimoto, H., Sasakuma, T. Confocal analysis of chromosome behavior in wheat x maize zygotes. *Genome* 47: 199-205, 2004.
- 17) Ogura, Y., Shibata, F., Sato, H., Murata, M. Characterization of a CENP-C homolog in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.* 79: 139-144, 2004.
- 18) Ito, H., Nasuda, S., Endo, T. R. A direct repeat sequence associated with the centromeric retrotransposons in wheat. *Genome*. 47: 747-756, 2004.
- 19) Kimbara, J., Endo, T. R., Nasuda, S. Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chromosome Res.* 12(7): 703-714, 2004.
- 20) Kikuchi, S., Kishii, M., Shimizu, M., Tsujimoto, H. Centromere-specific repetitive sequence from *Torenia fournieri*, a model plant for fertilization, and whole-mount FISH of its embryo sac cells. *Cytogenet. Genome Res.* 109:228-235, 2004.
- 21) Kishii, M., Yamada, T., Sasakuma, T., Tsujimoto, H. Production of wheat- *Leymus racemosus* chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.* 109:255-260, 2004.
- 22) Yano O., Katsuyama T., Tsubota H., Hoshino T. Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis*(Cyperaceae) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. *Journal of Plant Research* 117(5):409-419, 2004.
- 23) Kawabe, A., Nasuda, S. Structure and genomic organization of centromeric repeats in *Arabidopsis* species. *Mol. Genet. Genomics* 272: 593-602, 2005.
- 24) Tani, A., Murata, M. Alternative splicing of *POT1*-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.* 80:41-48, 2005.
- 25) Nagaki, K., Murata, M. Characterization of CENH3 and centromere-associated DNA sequences in sugarcane. *Chromosome Res.* 13:195-203, 2005.
- 26) Nasuda, S., Hudakova, S., Schubert, I., Houben, A., Endo, T. R. Stable barley chromosomes without centromeric repeats. *Proc. Nat. Sci. Acad. USA* 102: 9842-9847, 2005.
- 27) Nagaki, K., Kashiwara, I., Murata, M. Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*. *Plant Cell* 17:1886-1893, 2005.
- 28) Sato, H., Shibata, F., Murata, M. Characterization of a Mis12 homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* 13:827-834, 2005.
- 29) Yano O., Hoshino T. Molecular phylogeny and chromosome evolution of Japanese *Schoenoplectus*(Cyperaceae), based on ITS and ETS 1f sequences. *Acta Phytotax. Geobot.* 56(2):183-195, 2005.
- 30) Murata, M., Shibata, F., Yokota, E. The origin, meiotic behavior and transmission of a novel minichromosome in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* (in press)
- 31) Kawabe A, Nasuda S. Polymorphic chromosomal specificity of centromere satellite families in *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*. *Genetica*. (in press).

32) Nasuda S, Kikkawa Y, Ashida T, Rafiqul Islam AKM, Sato K, Endo TR. Chromosomal assignment and deletion mapping of barley EST markers. *Genes Genet. Syst.* (in press)

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待、口頭講演 (国内 64 件、海外 11 件)

〈海外〉

Murata M., Hayasaki, M. (Research Institute for Bioresources, Okayama University, CREST/JST) Origin and centromeres structure of a minichromosome in *Arabidopsis thaliana*. 14th International Chromosome Congress, Wurzburg, Germany, Sept. 5, 2001.

Kagawa, N., Nagaki, K., Tsujimoto, H. (Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University) Tetrad-FISH analysis: An efficient method to localize genes and the functional centromere regions in higher organisms. 14th International Chromosome Conference, Wurzburg, Germany, Sept. 5, 2001.

Endo, T. R. (Fac. Agriculture, Kyoto University), Molecular characterization of centromeres of wheat-barley Robertsonian translocation chromosomes. Plant, Animal & Microbe Genome X, San Diego, California, USA, Jan. 12-16, 2002.

Schwarzacher, T. (Univ. Leicester), Genome organisation in polyploidy plants. Polyploid Conference, London, UK, April 2003.

Heslop-Harrison, J. S. (Univ. Leicester) Chromosomes, Chromatin, Centromeres and Comparisons, European Cytogenetics Association Conference, Bologna, Italy, Sept. 2003.

Heslop-Harrison, J. S. Genome size, structure and evolution. Kew Genome Size conference, London, UK, Sept. 2003.

Schwarzacher, T. (Univ. Leicester) Polyploidy and plant breeding: banana and other species. Seminar organized by Malaysian Society for Molecular Biology and Biotechnology, Kuala Lumpur, Malaysia, Dec. 2003.

Heslop-Harrison, J. S. (Univ. Leicester), Chromatin and epigenetics: propagation, polyploids and parallels. Portuguese Genetics Society Meeting, Lisbon, Portugal, Feb., 2004.

Heslop-Harrison, J. S. (Univ. Leicester) Chromatin, polyploids and epigenetics. Seminar MRC Clinical Sciences Centre, London, UK, Feb., 2004.

Murata, M., Shibata, F., Sato, H. Differential localization of the centromere-specific proteins in *Arabidopsis thaliana*. 15th Internat. Chromosome Conference, Brunel Univ., West London, UK, Sept. 5-10, 2004.

Heslop-Harrison, J. S. (Univ. Leicester) Molecular Cytogenetics and Plant Genome Organization. 15th Internat. Chromosome Conference, Sept. 5-10, Brunel Univ., West London, UK, Sept. 5-10, 2004.

〈国内〉

小倉豊、村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナの CENP-B 様タンパク

- 質遺伝子の解析、日本遺伝学会第 72 回大会、京都、2000 年 11 月 3 日
- 伊藤秀臣、那須田周平、遠藤隆(京都大学大学院農学研究科)、コムギ特異的な動原体局在型反復配列の単離、日本遺伝学会第 72 回大会、京都、2000 年 11 月 3 日
- 遠藤隆、伊藤秀臣、那須田周平(京都大学大学院農学研究科)、オオムギ／パンコムギ染色体間のロバートソン型転座の分子細胞遺伝学的解析、日本遺伝学会第 72 回大会、京都、2000 年 11 月 3 日
- 岸井正浩、長岐清孝、辻本壽(横浜市立大学木原生物学研究所)、パンコムギの動原体領域に局在する縦列型反復配列の解析、日本遺伝学会第 72 回大会、京都大学、2000 年 11 月 3 日
- 古田和久、星野卓二(岡山理科大学総合情報学部)、カヤツリグサ科スゲ属における分子系統学的研究、日本遺伝学会第 72 回大会、京都大学農学部、2000 年 11 月 4 日
- 持田恵一、辻本壽(横浜市立大学木原生物学研究所)、コムギ×トウモロコシ雑種胚におけるトウモロコシ染色体の脱落過程、1. ホールマウント GISH 法による解析。育種学会第 99 回講演会、藤沢、2001 年 4 月 2 日
- 早崎美華子、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおけるミニ染色体セントロメア領域の解析、日本遺伝学会第 73 回大会、東京、2001 年 9 月 22 日
- 小倉豊、T. Schwarzacher、J. S. Heslop-Harrison、村田稔(岡山大学資源生物科学研究所、レスター大学)、シロイヌナズナのセントロメア領域の反復配列に特異的に結合する因子の解析、日本遺伝学会第 73 回大会、東京、2001 年 9 月 22 日
- 持田恵一、辻本壽(横浜市立大学木原生物学研究所)、コンフォーカルイメージングによるコムギ X トウモロコシ雑種初期胚における染色体脱落機構の解明、日本遺伝学会第 73 回大会、東京、2001 年 9 月 22 日
- 程治軍、村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、コムギ A、B ゲノム染色体のセントロメアに局在する新規反復配列。育種学会第 100 回後援会、福岡、2001 年 10 月 7 日
- 岸井正浩、辻本壽(横浜市立大学木原生物学研究所)、ハマニンク染色体添加コムギ系統の育成と同染色体の同定。育種学会第 100 回講演会、福岡、2001 年 10 月 8 日
- 持田恵一、辻本壽(横浜市立大学木原生物学研究所)、コムギ×トウモロコシ雑種胚におけるトウモロコシ染色体の脱落過程 2. 紡錘糸と染色体脱落の関係。育種学会第 100 回講演会、福岡、2001 年 10 月 8 日
- 辻本壽、岸井正浩、山田豊美(横浜市立大学木原生物学研究所)、コムギ連多年生植物 *Psathyrostachys huashanica* 染色体添加パンコムギ系統の育成。日本育種学会代 102 回講演会、帯広、2002 年 8 月 26-27 日
- 岸井正浩、辻本壽(横浜市立大学木原生物学研究所)、オオハマニンク(*Leymus racemosus*) 染色体添加パンコムギ系統の育成。2. 10 染色体添加系統の育成と携帯形質の評価。日本育種学会代 102 回講演会、帯広、2002 年 8 月 26-27 日

- 菊池真司、田中裕之、富田因則、辻本壽(横浜市立大学木原生物学研究所)、トレンニア (*Torenia fournieri*)における新規縦列型反復配列の解析. 日本育種学会代 102 回講演会、帯広、2002 年 8 月 26-27 日
- 程治軍、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける人工染色体構築の試みI. 長鎖セントロメア反復配列のクローニング. 日本遺伝学会第 74 回大会、福岡、2002 年 10 月 3-5 日
- 柴田洋、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナ培養細胞における染色体異常とセントロメア構造. 日本遺伝学会第 74 回大会、福岡、2002 年 10 月 3-5 日
- 谷明憲、村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける外部テロメアの挿入. 日本遺伝学会第 74 回大会、福岡、2002 年 10 月 3-5 日
- 村田稔、柴田洋(岡山大学資源生物科学研究所、科技団・CREST)、シロイヌナズナにおけるミニ染色体の安定性と減数分裂での挙動. 日本遺伝学会、74 回大会、福岡、2002 年 10 月 3-5 日
- 金原淳司、那須田周平、遠藤隆(京都大学大学院農学研究科)、コムギにおける細胞周期チェックポイントに関わる Mad2 遺伝子の単離. 日本遺伝学会第 74 回大会、福岡、2002 年 10 月 3-5 日
- 星野卓二、正木智美、池田正五(岡山理科大学総合情報学部)、非局在型動原体を持つカヤツリグサ科植物のレトロトランスポゾン遺伝子の解析. 日本遺伝学会第 74 回大会、福岡、2002 年 10 月 3-5 日
- 星野卓二、藤井和孝、正木智美(岡山理科大学総合情報学部)、ケタガネソウの減数分裂染色体におけるrDNA およびテロメア遺伝子の局在部位. 日本染色体学第 53 回大会、東大阪市、2002 年 10 月 12 日
- Shibata, F., Murata, M. Structure and function of minichromosomes in *Arabidopsis thaliana*. CREST Internat. Symp. "Structure and function of plant centromeres: a challenge to orthodoxy", Kurashiki, Nov. 14-15, 2002.
- Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T. *Arabidopsis* centromeric sequences: Conversion, variation and protein interactions. CREST Internat. Symp. "Structure and function of plant centromeres: a challenge to orthodoxy", Kurashiki, Nov. 14-15, 2002.
- Endo, T. R., Nasuda, S. Are centromeric repeats necessary for the function of barley chromosomes? CREST Internat. Symp. "Structure and function of plant centromeres: a challenge to orthodoxy", Kurashiki, Nov. 14-15, 2002.
- Hoshino, T., Masaki, T., Ikeda, S. A Ty3/gypsy retrotransposon localizes to the holocentric chromosomes of Cyperaceae. CREST Internat. Symp. "Structure and function of plant centromeres: a challenge to orthodoxy", Kurashiki, Nov. 14-15, 2002.
- Kotani, H. The size and genome organization of centromere of *Arabidopsis thaliana*. CREST Internat. Symp. "Structure and function of plant centromeres: a challenge to orthodoxy", Kurashiki, Nov. 14-15, 2002.
- Kishii, S., Tsujimoto, H. Similarity of centromere and subtelomere sequence. CREST

- Internat. Symp. "Structure and function of plant centromeres: a challenge to orthodoxy", Kurashiki, Nov. 14-15, 2002.
- 横田悦子、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおけるミニ染色体 T-DNA タグラインの作出。日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 24 日
- 柴田洋、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)。シロイヌナズナ培養細胞におけるセントロメア特異的タンパク質と 180-bp 反復配列の相互局在。日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 26 日
- 佐藤浩、柴田洋、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける CENP-A タンパク質のセントロメア反復配列への特異的結合。日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 26 日
- 小倉豊、柴田洋、佐藤浩、村田稔(岡山大学資源生物科学研究所、科技団・CREST)、シロイヌナズナの CENP-C ホモログの解析。日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 26 日
- 奥田充顕、金原淳司、遠藤隆、那須田周平(京都大学大学院農学研究科)、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 遺伝子ホモログの 6 倍体コムギからの単離。日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 26 日
- 金原淳司、那須田周平、遠藤隆(京都大学大学院農学研究科)、コムギ染色体における紡錘糸形成チェックポイントタンパク質 MAD2 の局在。日本遺伝学会第 75 回大会、仙台、2003 年 9 月 26 日
- 岸井正浩、辻本壽。(鳥取大学)、ハマニンニク属種間雑種における染色体対合の解析。日本育種学会第 104 回講演会、神戸、2003 年 9 月 19-20 日
- 菊池真司、岸井正浩、清水美幸、辻本壽。(鳥取大学)、トレニア種間雑種の染色体動態。1. トレニア雑種接合子における親由来動原体の空間分離。日本育種学会第 104 回講演会、神戸、2003 年 9 月 19-20 日
- 村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、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。第1回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2003 年 11 月 5 日
- 岸井正浩、辻本壽。(鳥取大学)、ハマニンニク属植物種染色体の多様性と染色体対合。染色体学会第 54 回講演会、東京、2003 年 10 月 11-12 日
- 矢野興一、坪田博美、勝山輝男、星野卓二(岡山理科大学)、カヤツリグサ科ハリイ属の系統と染色体進化、日本植物学会第 68 回大会、神奈川、2004 年 9 月 10-12 日
- 村田稔、横田悦子(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける新規ミニ染色体の同定、日本遺伝学会第 76 回大会、大阪、2004 年 9 月 27-29 日
- 柴田洋、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナのセントロメア領域における DNA のメチル化、日本遺伝学会第 76 回大会、大阪、2004 年 9 月

27-29 日

佐藤浩、柴田洋、村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける Mis12 ホモログの解析、日本遺伝学会第 76 回大会、大阪、2004 年 9 月 27-29 日

宮迫聡、村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナ CENP-C ホモログのセントロメア局在解析、日本遺伝学会第76回大会、大阪、2004 年 9 月 27-29 日

谷明憲、村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける Pot1 相同タンパクの解析、日本遺伝学会第 76 回大会、大阪、2004 年 9 月 27-29 日

金原淳司、遠藤隆、那須田周平(京都大学大学院農学研究科)、ムギ類染色体における動原体特異的反復配列、MAD2 タンパク質、リン酸化ヒストン H3 タンパク質の細胞学的局在解析、日本遺伝学会第 76 回大会、大阪、2004 年 9 月 27-29 日

奥田充顕、遠藤隆、那須田周平、金原淳司(京都大学大学院農学研究科)、ムギ類におけるヘテロクロマチン構成因子 HP1 タンパク質の局在解析、日本遺伝学会第 76 回大会、大阪、2004 年 9 月 27-29 日

遠藤隆、那須田周平(京都大学大学院農学研究科)、動原体特異的 DNA 反復配列は動原体の機能に不可欠か? 日本遺伝学会第 76 回大会、大阪、2004 年 9 月 27-29 日

Murata, M. Visualization of centromeric proteins/DNA in *Arabidopsis thaliana*. 5th Internat. Conference of Chromosome Research at the Nano-Era, "Nano and Visual Biology of Chromosome Dynamics", Kyoto, October 16-17, 2004.

長岐清孝・村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、サトウキビにおける動原体特異的ヒストンの解析および動原体 DNA の同定、日本育種学会第107・108回講演会、つくば市、2005 年 8 月 21 日

長岐清孝(岡山大学資源生物科学研究所)、セントロメアのパラドックス、第 34 回生物進化・細胞遺伝談話会、つくば市、2005 年 8 月 21 日

横田悦子・柴田洋・村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナに新規に見出されたダイセントリック環状染色体の解析、日本遺伝学会第77回大会、東京、2005 年 9 月 28 日

柴田洋・横田悦子・村田稔(科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナ形質転換体に見出された偽二動原体型染色体、日本遺伝学会第77回大会、東京、2005 年 9 月 27-29 日

長岐清孝・柏原壱成・村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、動原体特異的ヒストン H3 を用いたルズラ分散型動原体の分子解析、日本遺伝学会第77回大会、東京、2005 年 9 月 27-29 日

村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、植物セントロメアの機能構造: 変異性と保存性、日本遺伝学会第77回大会、ミニシンポジウム「染色体研究の新しい展開」、東京、2005 年 9 月 27-29 日

菊池真司、田中裕之、辻本壽(鳥取大学農学部)、トレニア属におけるゲノム基本数の進化—遺伝子数の少ない過剰染色体存在の可能性—、日本遺伝学会第 77 回大会、東京、2005 年 9 月 27-29 日

遠藤隆、Hudakova, S., Schubert, I., Houben, A., 那須田周平(京都大学大学院農学研究科、IPK)、動原体特異的の反復配列を失った安定したオオムギ染色体、日本遺伝学会第 77 回大会、ミニシンポジウム「染色体研究の新しい展開」、東京、2005 年 9 月 27-29 日

河邊昭、那須田周平、Charlesworth, D. (京都大学、エジンバラ大学)、Existence of multifamily centromeric satellite sequences with relation to evolution of centromeric histone H3 (HTR12) genes in *Arabidopsis halleri* and *lyrata*. 日本遺伝学会第 77 回大会、東京、2005 年 9 月 27-29 日

奥田充顕、那須田周平、遠藤隆(京都大学)、コムギ体細胞分裂中期染色体における修飾ヒストン局在領域の解析、日本遺伝学会第 77 回大会、東京、2005 年 9 月 27-29 日

芦田安代、松岡由浩、那須田周平、遠藤隆(京都大学、福井県立大学)、ヒストン H3 の S10 残基野リン酸化を指標とした、三倍体コムギの非還元配偶子形成につながる細胞分裂の解析、日本遺伝学会第 77 回大会、東京、2005 年 9 月 27-29 日

星野卓二・正木智美(岡山理科大学)、FISH 法を用いた分散型動原体を持つ植物染色体の分析、染色体学会、弘前、2005 年 10 月 9-10 日

村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、植物セントロメアの分子構造と人工染色体構築の可能性。第 14 回染色体コロキウム—植物学と染色体、神戸市、2005 年 12 月 4-5 日

長岐清孝(岡山大学資源生物科学研究所)、植物の動原体に局在するレトロトランスポゾン。第 28 回日本分子生物学会年会、福岡市、2005 年 12 月 7 日

村田稔(岡山大学資源生物科学研究所)、Analysis of plant centromeres for constructing plant artificial chromosomes (植物セントロメアの分子構造と人工染色体構築の可能性)、第 14 回染色体コロキウム、神戸、2005 年 12 月 4-5 日

菊池真司、辻本壽(鳥取大学農学部)、植物染色体の核内配置、第 14 回染色体コロキウム、神戸、2005 年 12 月 4-5 日

②ポスター発表 (国内 21 件、海外 11 件)

〈海外〉

Kishii, M., Nagaki, K., Tsujimoto, H. (Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University) Genera specific localization of Tail-family sequences in either centromere or subtelomere. 14th International Chromosome Conference, Wurzburg, Germany, Sept. 6, 2001.

Tsujimoto, H., Kishii, S. (Tottori Univ.) A new chromosomal relationship placed between 'homologous' and 'homoeologous' in Triticeae. Plant and Animal Genome XI Conference, San Diego, USA, Jan. 11, 2003

Tomita, Y., Yamamoto, M. (Tottori Univ.) mRNA structure and chromosomal dispersion of a

- new class of insertion sequence famili in Triticeae. Plant and animal Genome XI conference, San Diego, USA, Jan. 10-14, 2003.
- Shibata, F., Murata, M. (CREST/JST, Res. Institute Bioresources, Okayama Univ.), Differential localization of the centromeric histone H3 variant in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. Plant and Animal Genomes XII, San Diego, USA, Jan. 10-14, 2004.
- Kikuchi, S., Kishii, M., Shimizu, M., Tsujimoto H. (Tottori Univ.), Special separation of parental genomes in *Torenia* interspecific hybrid. Plant and Animal Genomes XII, San Diego, USA, Jan. 10-14, 2004.
- Shibata, F., Murata, M. (CREST/JST, Res. Institute Bioresources, Okayama Univ.), Histone H3 modifications in the centromeric regions of *Arabidopsis thaliana*. 15th Internat. Chromosome Conference, Brunel Univ., West London, UK, Sept. 5-10, 2004.
- Tani, A., Murata, M. (Res. Institute Bioresources, Okayama Univ.), Characterization of a telomere end binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. 15th Internat. Chromosome Conference, Brunel Univ., West London, UK., Sept. 5-10, 2004.
- Murata, M., Yokota, E., Shibata, F. (Res. Institute Bioresources, Okayama Univ., CREST/JST), Centromere breakage and gene silencing induced by T-DNA insertion in *Arabidopsis thaliana*. 17th Internat. Botanical Congress, Vienna, July 17-24, 2005.
- Yano O., Hoshino T. (Okayama Univ. of Sci.), Chromosomal evolution of the genus *Eleocharis*(Cyperaceae), based on molecular phylogeny and karyomorphological observations, 17th Internat. Botanical Congress, Vienna, July 17-24, 2005.
- Nasuda, S., Ashida, Y., Endo, T. R., Matsuoka, Y. (Kyoto Univ., Fukui Pref. Univ.) Single-division meiosis: atypical meiotic division producing unreduced gametes in triploid wheat. 6th Kyoto University International Symposium, Beijing, China, October 8-10, 2005
- Nagaki, K., Kashihara, K., Murata, M. (Res. Institute Bioresources, Okayama Univ.) Dynamic changes of centromere-specific histone H3 amount during mitosis in the holocentric plant *Luzula nivea*. Plant and Animal Genome XI V Conference, San Diego, USA, Jan. 14-18, 2006.

〈国内〉

- 柴田 洋、村田 稔 (岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナのセントロメアヒストン H3 は 180-bp 反復配列クラスターの一部にしか局在しない. 第1回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2003 年 11 月 5 日
- 久米川宣一、細内敦、窪岡久乃、村田稔、小谷博一(かずさDNA研究所、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナ4番染色体セントロメアの構造解析. 第1回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2003 年 11 月 5 日
- 遠藤 隆、那須田周平、伊藤秀臣、金原 淳司 (京都大学大学院農学研究科)、セントロメア領域に構造異常を持つオオムギ染色体の解析. 第1回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2003 年 11 月 5 日
- 辻本壽、富田因則、岸井正浩、菊池真司(鳥取大学農学部)、動原体機能不全およびヘテロクロマチン配列の解析による、動原体機能的要素の解明. 第1回公開シンポジウム

CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2003 年 11 月 5 日

星野卓二・正木智美・池田正五(岡山理大学総合情報学部)、カヤツリグサ科植物の分散型セントロメアの構造解析. 第1回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2003 年 11 月 5 日

Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T. (Univ. Leicester) 2004, Arabidopsis Centromeres: Functional Sequences and Related Proteins. Tokyo, Japan, CREST Symposium, Nov. 5, 2003.

菊池真司、岸井正浩、清水美幸、辻本壽. (鳥取大学農学部)、トレニア雑種接合子における異種ゲノムの空間分離. 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月 10-13 日

久米川宣一、細内敦、窪岡久乃、村田稔、小谷博一(かずさDNA研究所、岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナ 4 番染色体セントロメアの構造解析、第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月 10-13 日

下山泰明、村田稔 岡山大学資源生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける Cpf1 (Centromere promoter factor 1) ホモローグの解析、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月 8 日-10 日

村田 稔、柴田 洋、横田悦子(岡山大学資原生物科学研究所、科技団・CREST)、シロイヌナズナの第4染色体短腕に由来するミニ染色体の分子構造、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006 年 1 月 23 日

村田 稔、横田悦子、柴田 洋(岡山大学資原生物科学研究所、科技団・CREST)、T-DNA 挿入によるセントロメアの切断とジーンサイレンシング、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006 年 1 月 23 日

横田悦子、柴田 洋、村田 稔(科技団・CREST、岡山大学資原生物科学研究所)、シロイヌナズナに見出されたダイセントリック環状染色体の解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006 年 1 月 23 日

柴田 洋、村田 稔(科技団・CREST、岡山大学資原生物科学研究所)、シロイヌナズナのセントロメアおよびセントロメア周辺における DNA とヒストンのメチル化、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006 年 1 月 23 日

小倉豊、佐藤浩、柴田 洋、村田 稔(岡山大学資原生物科学研究所、科技団・CREST)、シロイヌナズナにおける CENP-C と Mis12 ホモローグの解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006 年 1 月 23 日

下山泰明、谷明憲、村田稔 (岡山大学資原生物科学研究所)、シロイヌナズナにおける Cpf1(Centromere promoter factor 1) ホモローグの解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006 年 1 月 23 日

長岐清孝、柏原壱成、村田稔(岡山大学資原生物科学研究所)、動原体特異的ヒストン H3 を用いたルズラ分散型動原体の分子解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006 年 1 月 23 日

小谷一博、村田稔(かずさDNA研究所、岡山大学資原生物科学研究所)、シロイヌナズナ4 番染色体セントロメアの構造解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の

機能と制御」、東京、2006年1月23日

芦田安代、遠藤隆、松岡由浩、那須田周平(京都大学大学院農学研究科、福井県立大学生物資源学部)、リン酸化ヒストン H3 の局在を指標とした 3 倍体コムギの非還元配偶子形成の解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006年1月23日

奥田充顕、金原淳司、遠藤隆、那須田周平(京都大学大学院農学研究科)、コムギのヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の局在解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006年1月23日

辻本壽、菊池真司(鳥取大学農学部)、間期核と減数分裂における動原体機能の解析、第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006年1月23日

Heslop-Harrison, J. S. (Pat), Schwarzacher, T. (University of Leicester), Arabidopsis Centromeres: Functional Sequences and Related Proteins, 第4回公開シンポジウム CREST 研究領域「植物の機能と制御」、東京、2006年1月23日

(3)特許出願

①国内出願 (11 件)

1. 発明の名称：遺伝子解析法、発明者：辻本壽、長岐清孝、村田稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 13 年 9 月 4 日、出願番号：特願 2001-268048
2. 発明の名称：コムギ由来セントロメア局在性反復配列、発明者：程治軍、村田稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 13 年 10 月 5 日、出願番号：特願 2001-400457
3. 発明の名称：染色体動態解析方法、発明者：辻本壽、持田恵一、村田稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 13 年 12 月 28 日、出願番号：特願 2001-310662
4. 発明の名称：シロイヌナズナ由来のミニ染色体保持系統、発明者：村田稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 14 年 2 月 20 日、出願番号：特願 2002-43779
5. 発明の名称：コムギ由来セントロメア局在性反復配列、発明者：程治軍、村田稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 14 年 10 月 2 日、出願番号：特願 2002-29207
6. 発明の名称：シロイヌナズナ由来のミニ染色体保持系統、発明者：村田 稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 14 年 10 月 2 日、出願番号：特願 2002-290429
7. 発明の名称：カヤツリグサ科植物のレトロトランスポゾン遺伝子発明者：星野卓二、池田正五、村田稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 15 年 3 月 5 日、出願番号：特願 2003-58938
8. 発明の名称：長鎖反復配列クラスターDNA、発明者：程治軍、村田稔、出願人：科学技術振興事業団、出願日：平成 15 年 3 月 19 日、出願番号：特願 2003-76551

9. 発明の名称：シロイヌナズナ由来のミニ染色体保持系統、発明者：村田 稔、横田悦子、出願人：科学技術振興機構、出願日：平成 16 年 8 月 31 日、出願番号：特願 2004-252039
10. 発明の名称：シロイヌナズナのセントロメアに特異的に存在する AtMIS12 タンパク質検出用抗体、発明者：村田 稔、佐藤浩、柴田洋、出願人：科学技術振興機構、出願日：平成 16 年 8 月 31 日、出願番号：特願 2004-251775
11. 発明の名称：コムギ等の HP1 タンパク質を特異的に検出する抗 HP1 抗体発明者：那須田周平、遠藤隆、村田稔、奥田充顕、出願人：科学技術振興機構、出願日：平成 16 年 8 月 31 日、出願番号 特願 2004-251763

その他 0 件

②海外出願 (0 件)

その他 0 件

(4)受賞等

①受賞

- ・ 2001 年度(第 74 回大会)日本遺伝学会奨励賞：坂本亘(岡山大学資源生物科学研究所)
- ・ 2005 年度(第77回大会)日本遺伝学会奨励賞：那須田周平(京都大学大学院農学研究科)
- ・ 2005 年度(第77回大会)日本遺伝学会ベストペーパー賞：シロイヌナズナに新規に見出されたダイセントリック環状染色体の解析(横田悦子、柴田洋、村田稔、科技団・CREST、岡山大学資源生物科学研究所)
- ・ 2005 年度(第77回大会)日本遺伝学会ベストペーパー賞：ヒストン H3 の S10 残基のリン酸化を指標とした、三倍体コムギの非還元配偶子形成につながる細胞分裂の解析(芦田安代、松岡由浩、那須田周平、遠藤隆(京都大学大学院農学研究科))

②新聞報道

- ・ 2001 年 8 月 21 日 山陽新聞「幻のヒルゼンスゲ確認」(絶滅危惧種に指定され岡山県蒜山地方にのみ生育するカヤツリグサ科のヒルゼンスゲを 16 年ぶりに確認した) 星野卓二ら (岡山理科大学)
- ・ 2004 年 2 月 11 日 読売新聞 “染色体のくびれ「動原体」”長岐清孝ら(岡山大学)

③その他

(5)その他特記事項

本プロジェクトの成果論文2報 (Nagaki, Kashihara & Murata *Plant Cell* 2005; Sato, Shibata & Murata *Chromosome Res.* 2005) が、Faculty of 1000 (<http://www.faculty1000.com>, Biology Reports Ltd)に取り上げられた。

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2001年1月 27日～28日	チーム内ミーティング	岡山大学資源生物科学研究所第1講義室	9名	各グループのセントロメア研究に関するこれまでの成果を紹介し、今後の研究の進め方について討議した。また、CRESTにおける予算執行等について説明を行った。
2001年9月 10日～11日	チーム内ミーティング	連 合 王 国 レスター大 学生物学科 会議室	15名	レスター大学、岡山大学、横浜市立大学におけるこれまでの研究進展状況について説明し、今後の計画等についての相談を行った。また、レスター大学教授 Dr. Ed Louis に「Telomeres of Yeasts」と題する講演を依頼し、相互に情報を交換した。
2001年9月 25日	チーム内ミーティング	科学技術振 興事業団 「植物の機 能と制御」 東京事務所 会議室	11名	各グループのこれまでの成果について紹介し、今後の研究の進め方について協議した。また、特許についての説明を受けた。
2002年11月 14～15日	国際シンポジウム ”Structure and function of plant centromeres: A challenge to the orthodoxy”	倉敷市立美 術館3階	約70名	海外から4名（内1名は班員）、国内から2名の関連研究者を招き、植物染色体のセントロメアに関する最近の成果について情報を交換した。
2002年11月 16～17日	チーム内ミーティング (海外招待研究者2名も 参加)	京都大学農 学部会議室	7名	新たな知見をふまえた上で、これからの研究計画について協議した。
2003年11月 5日	チーム内ミーティング	コクヨホー ル	8名	研究の推進状況説明と今後の進め方について協議した。
2003年11月 29日	チーム内ミーティング	京都大学農 学部・セミナ ー室	6名	研究の推進状況説明と今後の進め方(特にセントロメア局在タンパク質の抗体作製)について協議した。
2004年10月 29日	チーム内ミーティング	岡山大学資 源生物科学 研究所・セミ ナー室	6名	研究の推進状況説明と今後の進め方について協議した。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Paul Talbert (米国 HHMI-FHCRC、主任研究員)	国際シンポジウム参加のため	倉敷市、京都市	2002年11月13日～17日
Andreas Houben (ドイツ IPK、主任研究員)	国際シンポジウム参加のため	倉敷市、京都市	2002年11月13日～19日
R. Kelly Dawe (米国ジョージア大学、準教授)	国際シンポジウム参加のため	倉敷市	2002年11月13日～15日

7 結び

本研究の目的は、植物における染色体機能要素のうち、セントロメアについてその構造と機能を解析することであった。さらに、これらの成果をふまえ、植物で初めて人工染色体を構築することも目指した。最初の目的については、シロイヌナズナにおいて当初目指していたレベルをクリアしたように思われる。つまり、プロジェクト開始時点で、すでに発見していたミニ染色体4Sに加え、新たなミニ染色体を創出することができ、そのセントロメア機能サイズを500 kbまで狭めて決定できたからである。ミニ染色体 4S のセントロメアサイズは、起源した第4染色体のものよりかなり短かったが、1Mb というサイズを操作解析することは、容易ではなかった。第2染色体のセントロメア領域から由来した500kbの 180-bp クラスターは、今後、人工染色体の優れた基礎材料となることが期待される。また、セントロメア機能をタンパク質のレベルから決定できるようになったことも大きな進歩である。これで、酵母や哺乳動物で行われているセントロメア機能解析が、植物でも可能となった。このように、シロイヌナズナでは、人工染色体の構築が現実味を帯びてきたが、実現するまで、あと1-2年は必要であろう。

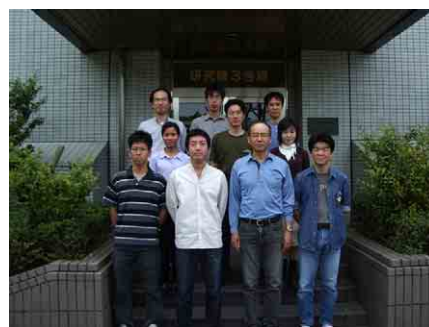
今回初めて、大型研究プロジェクトの代表者となった。時間的には、早く経過したように思うが、反省点も多い。本プロジェクトでは、自分が所属するグループをメインに、5つのサブグループを加えた。しかし、予算的にもグループが多すぎ、研究がやや散漫になったように思われる。また、外国のグループに参加をお願いしたが、予算年度が一致せず、研究補助員の雇用等に困難を生じた。本プロジェクトにおける研究員、研究補助員の給与が、一般のレベルよりかなり高額に設定されていることも、いろいろな意味で、問題となった。特に、研究員に対しては、最初の半年ほどトライアルの期間が欲しい。また、現在、研究員にとって、パーマネントな職を得ることは、容易ではない。給与が少し低額でも、より長い雇用を約束できることの方が望ましいのではないかと。



実験室全景



共焦点レーザー顕微鏡



研究室メンバー(2005年4月)

