

1995 年度 神奈川県総合理学研究所 共同研究成果報告 プロジェクト C-1

1. 研究テーマ

細菌と高等植物における細胞分裂の制御機構の分子遺伝学的解析

2. 代表者名

応用生物科学科 助手 安積良隆

3. 研究プロジェクトメンバー

学内：神奈川県	理学部	応用生物科学科	助手	安積良隆
神奈川県	理学部	応用生物科学科	教授	鈴木秀穂
学外：横浜市立大学	木原生物学研究所	遺伝進化学部門	助手	川上直人

4. 研究期間

1995年4月～1996年3月

5. 研究の目的

生物の増殖や成長に細胞分裂は不可欠である。しかしこの細胞分裂は適した時期、適した環境下で行われなければ、その生物は重大な危機に瀕することになる。細胞分裂の開始や休止を制御しているしくみを明らかにすることは生命現象を理解する上で非常に重要な意義を持つ。(計画1)細菌類も栄養条件などの環境の変化に対応するため細胞分裂の休止や再開を行うが比較的、細胞の構成が単純であるにもかかわらず、この現象がどのような遺伝子によって制御されているか明らかにされていない。この現象に関わる遺伝子を突然変異体を作成することによって単離する。(計画2)真核生物では酵母で多くの研究が行われているが、高等植物では細胞周期に関する研究者も少なく、研究は進んでいない。特に減数分裂は材料の調達が難しいため減数分裂誘導のしくみはほとんど何もわかっていない。そこで変異体の作成、変異遺伝子の同定が容易な植物シロイヌナズナを用いることにより卵の形成時に起こる減数分裂の誘導機構を分子遺伝学の手法を用いて解明する。(計画3)受粉後、胚形成を行った穂は季節が来るまで休眠に入る。そして環境が整うと発芽し発生を開始する。この休眠と発芽を支配している遺伝子を解析する。

6. 成果

計画1に関しては、大腸菌 W3110 株を用いて増殖期から休止期への移行（細胞分裂の休止）と休止期から増殖期への移行（細胞分裂の再開）の制御機構を調べた。まず休止期から抜け出せない（増殖期への移行に必要な遺伝子の）変異体を作成するため W3110 をニトロソグアニジンで処理し、制限温度下で増殖できない温度感受性突然変異体を得た。これらは単に制限温度下では細胞分裂できないものと休止期から増殖期へ移行できないものを含んでいると考えられる。それで得られた変異体を許容温度で培養し増殖期に入った後、温度を制限温度に上げた。増殖が停止するものは一般的な細胞分裂の変異体で、影響を受けないものは増殖への移行に変異があるものと考えられる。繰り返し確認の実験を行い、TSG111がそのような変異体であることを確認した。また休止期に移行できない変異体を単離するため、増殖期に入れない変異体TSG111を利用することにした。TSG111にトランスポゾンTn10を導入し突然変異を誘発した後、休止期に入るまで増殖させ制限温度下に移してプレート上で培養した。休止期には行ったTSG111は増殖期に入れないのでコロニーを形成できない。コロニーを形成するものはTn10の挿入により休止期に移行できなくなった変異体であると考えられる。このような変異体TIM1、TIM2、TIM3、TIM4を得た。これらの変異体は長期間培養したとき生存率が野生型に比べ著しく低下する。これは休止期に入れず細胞が休止期の細胞が持つ耐性を獲得することができなかつたためと考えられる。今後はこれらのTSG111、TIM1、TIM2、TIM3、TIM4の変異した遺伝子の同定を行い、その遺伝子の機能を探る予定である。

計画2ではシロイヌナズナを用いて高等真核生物における体細胞分裂から減数分裂への転換の機構を調べる。このために減数分裂への移行に関する突然変異体を作成し、その変異した遺伝子を単離し解析することによって、減数分裂への細胞分裂様式の転換期には細胞内での様なことが起こり、それがどの様に調節されているかを明らかにする。この計画の第一段階として卵で発現する遺伝子を単離することにした。この目的でディファレンシャルディスプレイ法を行った。まず、シロイヌナズナの葉と開花後の花全体と開花前の若いつぼみから摘出した雌しべからRNAを抽出した。3種類の1次プライマーを用いて、それぞれのRNAから逆転写を行いPCRの鋳型を用意した。これらの鋳型をもとに3種類の1次プライマーと16種類の2次プライマーの48種類の組み合わせでPCR反応を行った。これらのPCR産物をシークエンスゲル電気泳動によって分離しそれぞれのPCR産物の組織特異性を調べてみた。最初のディファレンシャルディスプレイで全部で2582の産物を確認することができたが、その中で若い雌しべに特異的と考えられるものは242個であった。これらの産物の組織特異性を確認するために82個を選抜し、ディファレンシャルサザンハイブリダイゼーションを行った。82個のうち有力と考えられるもの10個について、さらに組織特異性を確認するためにノーザンハイブリダイゼーションの実験を行った。このうち5個の産物に関しては雌しべのみに特異的であることが確認された。残りの5個のものに関してはノーザンハイブリダイゼーションの感度以下で確認することができなかった。以上の結果から雌しべで特異的に発現する遺伝子のPCR産物を得ることができたので、今後はこれらの遺伝子が発現する細胞の特異性を決定し、卵で特異的に発現する遺伝子を同定する。この遺伝子の発現調節領域をGUS遺伝子のようなリポーター遺伝子と組み合わせ、卵のマーカー遺伝子を作製する。計画2の第二段階としてはこの卵のマーカー遺伝子の発現の有無を

手がかりに、卵の減数分裂への移行に関する突然変異体を選抜する。そして最終段階では変異体の変異した遺伝子を同定し、その機能や発現調節の機構を明らかにすることにより、減数分裂がどのように誘導されその細胞内では何が起きているかを明らかにする。

計画3では、休眠をする正常な系統の小麦と休眠をしない小麦の突然変異株を用いて、休眠している細胞が再び活発に細胞活動を活性化し、細胞分裂を再開するしくみを調べた。完熟時の種子で発現する遺伝子にこれらの小麦の間で差異が認められるかどうかを、無細胞翻訳系を用いてmRNAからタンパク質を合成し2次元電気泳動によって分析したところ、変異体では種子の完熟時に蓄積しないタンパク質が存在することが確認された。このタンパク質が休眠を引き起こす可能性が考えられる。このタンパク質の遺伝子をディファレンシャルスクリーニング法を用いることによってクローニングすることに成功した。このクローンを用いてこの遺伝子のmRNAの蓄積量の経時的变化を調べてみたところ、この遺伝子のmRNAは正常な小麦では種が熟するにつれて蓄積量が増加していたが、休眠しない変異株ではやはり蓄積が認められなかった。今後はこの遺伝子産物の働きを解明して行こうと考えている。

7. 成果発表

学会発表

第18回日本分子生物学会

1995年12月6日～9日、名古屋、名古屋国際会議場

3P-135

Differential Display 法によるシロイヌナズナの雌しべ特異遺伝子のクローニング

○小柴邦宏、高師知紀、安積良隆、鈴木秀徳
(神奈川大・理・応用生物)

Cloning of Pistil-Specific genes of *Arabidopsis thaliana* by Differential Display

Ok. Koshihara, T. Takasi, Y. Azumi, H. Suzuki
(Dept. of Biol. Sci., Kanagawa Univ.)

本大会での当グループのもう一つの演題(高師ら、神奈川大・理・応用生物)と同じ目的で、雌しべ特異遺伝子の単離を別の方法で試みた。まずシロイヌナズナの雌しべ(開花前の若いつぼみから雌しべのみを抽出したもの)、花(開花後の花全体)、及び葉から total RNA を準備した。これらのRNAを鋳型とし、市販のキット(RNA image™ Kit; GenHunter社)を用いてDifferential Displayを行った。その結果、雌しべのみに、あるいは雌しべに多量に存在すると考えられるmRNAのPCR産物のバンドが多数確認された。それらのバンド部分のDNAを再増幅し、雌しべ、花、及び葉からのtotal RNAをもとにして作製したプローブをハイブリダイズさせる、Differential Southern Hybridizationを行った。さらに確認のため、再増幅産物からプローブを調製して雌しべ、花、及び葉のRNAに対してNorthern Hybridizationを行ったが、これらの産物は高師らによって得られたクローンの遺伝子よりも若い雌しべで発現する遺伝子に由来するものと考えられる。

日本植物生理学会1996年度年会

1996年3月27日~29日、鹿児島、鹿児島大学教養部

1aH01

シロイヌナズナの雌しべ特異遺伝子の解析

安積良隆、高師知紀、小柴邦宏、鈴木秀徳
(神奈川大・理・応用生物)

我々は高等植物の雌性配偶子である卵の形成過程に興味を持ち、この過程に関わる遺伝子をシロイヌナズナよりクローン化し、その性質を明らかにすることにした。そのために二つの方法を採用した。一つはサブトラクション法による雌しべ特異遺伝子が濃縮されたcDNAライブラリーの作製で、雌しべのcDNAより葉でも発現している遺伝子のcDNAを除いた。このライブラリーよりディファレンシャルスクリーニングによって雌しべ特異遺伝子を選抜する。もう一つの方法はディファレンシャルディスプレイ法による区画化されたcDNAの比較である。この方法では、蕾中の若い雌しべ、開花後の花全体、および葉からRNAを抽出し比較を行った。これら二つの方法によって得られたcDNAの遺伝子の発現の特異性をノーザンハイブリダイゼーションによって調べたところ、6つのcDNAは若い雌しべでのみ発現している遺伝子に由来していることが確かめられた。今後これらの遺伝子の発現の細胞特異性をin situ hybridization法によって解析する。

1pH02

コムギ種子発達過程における休眠関連遺伝子の発現

川上直人、野田和彦¹(横浜市大・木原生研、¹岡山大・資生研)

休眠を持つ正常系統のコムギ種子胚には存在するが、完熟時に休眠を示さない突然変異体の種子胚には蓄積しないタンパク質、“ポリペプチドe”を見いだした。種子発達過程におけるポリペプチドe遺伝子の発現様式を調べるため、ポリペプチドeの完全長cDNAを単離した。スクリーニングの過程で、ポリペプチドecDNAと70%程度の相同性を持つ2種のcDNAも得た。ポリペプチドe遺伝子の発現は胚の形態形成終了後、水分の減少とともに明らかとなり、成熟過程で増加した後減少した。この発現量の変化は、胚におけるABA量の経時的变化と一致する。ところが、ポリペプチドeのmRNA量は胚をABAで処理しても増加せず、未熟種子および一度吸水した休眠種子を乾燥させると増加した。低湿度下で成熟したコムギ種子は、高湿度下で成熟した種子よりも強い休眠性を示すことが知られている。したがって、ポリペプチドeが種子の休眠性に役割を担っている可能性がある。