

1996年度 神奈川大学総合理学研究所 共同研究成果報告

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 II

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：神奈川大学	理学部	応用生物科学科	助手	安積良隆
神奈川大学	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

1996年4月～1997年3月

5. 研究の目的

細胞分裂は生き物が成長あるいは増殖（単細胞生物の場合）をするのに必須のプロセスである。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、この目的を達成することはできず、むしろその個体は死に追いやられることになる。細胞分裂の開始や休止を制御しているしくみは非常に複雑なものであるがこれを明らかにすることは生命現象を理解する上で大きな進歩であり、かつまた非常に重要な意義を持つ。昨年度に引き続き、細胞分裂の制御が深く関与する3つの現象について研究を行った。（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のかあまり多くのことはわかっていない。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）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的手法を用いて解明する。（計画3）植物は受粉後、胚形成を行った後、種子と呼ばれる状態で季節が来るまで休眠に入

る。そして環境が整うと細胞分裂を始め、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、増殖期に入れたい変異体 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動してプレート上で培養した。休止期には行った TSG111 は増殖期に入れた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。これらの変異体の変異を起こした遺伝子を同定するため、変異体の染色体 DNA のライブラリーを作製し、これから Tn10 の配列をプローブとしてスクリーニングを行った。得られたクローン pH11 にはごく小さな断片であるが変異体の染色体断片が含まれていた。今度はこの断片の配列をプローブとし、野生型の W3110 の染色体 DNA に対してサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、この断片に相当する断片が野生型大腸菌に存在することが判明した。この領域に存在し、Tn10 によって破壊された遺伝子が休止期への移行に関与している可能性が非常に強い。

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。この中のA-10-1、A-13-2、C-1-6、C-9-1、C-12-1の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。先の5個に関してはそのPCR断片を pCR-script と呼ばれるプラスミドにクローニングするのに成功した。またこれらのPCR産物が由来したmRNAの完全長のcDNAを得るために、シロイヌナズナの花器官全てを含むcDNAライブラリーを作製した。このライブラリーのスクリーニングを行った結果、A-7-4 については約1300塩基対のcDNAを含むクローンを得ることができた。このクローンは雌しべ特異的と考えられ、これを解析することによって雌しべ形成過程の一端を知ることができると考えられる。そしてもしこれが卵で特異的に発現するものであれば当初の目的である卵の形成過程の減数分裂の機構を解明するに非常に役立つものと考えられる。

計画3では、休眠をする正常な系統の小麦と休眠をしなくなった突然変異株を用いて、休眠をするしくみについて調べている。休眠し完熟した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いくつか存在することが確認された。これらのタンパク質が休眠を引き起こすのに関係している可能性が考えられる。これら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。その1つを pE24 と名付けた。このクローンの由来した遺伝子のmRNAの蓄積量を経時的に調べてみたところ、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。このクローンの持つcDNAの大きさは約1000塩基対で、これにコードされているタンパク質の大きさは約32kDaであることがわかった。このクローンの塩基配列と似た配列が既知の遺伝子にないか調べてみたが相同生の高いものは存在しなかった。この遺伝子の機能を調べるためこの遺伝子をシロイヌナズナに形質導入してみたところ、多くの形質転換体で子葉といった種子中で見られる器官において異常が認められた。このことはこの遺伝子が種子形成に何らかの働きをしていることを示唆しているものと考えられる。

7. 成果発表

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

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

穂発芽研究会第2回ワークショップ

1997年1月27日～28日、北海道河西郡芽室町

種子休眠に関する分子生物学的アプローチ

川上直人