

〔生物工学会誌 第76巻 第5号 205-216. 1998〕

総 合 論 文

クロレラ染色体基本構造ユニットの解析と
その再構成による人工染色体のモデル化

(平成9年度 日本生物工学会斎藤賞受賞)

山 田 隆

Molecular Characterization of the Structural Elements of *Chlorella* Chromosomes:
Modeling of Plant Artificial Chromosomes —Monograph—TAKASHI YAMADA (Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, 1-4-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8527) Seibutsu-kogaku **76**: 205-216, 1998.

The future growth of plant biotechnology will be built upon a better understanding of complex, multigene traits, including the pathways of natural-product biosynthesis and the mechanisms of resistance against environmental stresses, along with a better integration of biochemistry, physiology, genetics, and developmental and cellular biology. Development of new tools and methods for the transfer of multiple genes (sometimes in the order of a hundred) to plants will be required for various purposes. The plant artificial chromosome (PAC) promises to be a powerful candidate as a next-generation vector in plant transformation. Learning from the success of YACs (yeast artificial chromosomes) in the cloning of huge human DNAs, it is clear that a minimum of three types of chromosome elements are needed to construct a linear, mitotically stable artificial chromosome: a centromere, telomeres, and origins of replication. The natures of the corresponding elements in plant chromosomes are, however, less well understood. To obtain an experimental model for molecular and structural analyses, we screened a variety of organisms by pulsed-field gel electrophoresis for the smallest plant-type chromosome. Species of the unicellular green alga *Chlorella* were found to contain very small genomes of approximately 39 Mbp, almost a quarter the size of the *Arabidopsis* genome. In the case of *Chlorella vulgaris* C-169, 16 chromosomes ranging from 980 Kbp to 4.0 Mbp in size could be resolved by CHEF gel electrophoresis under ordinary conditions. The smallest chromosome of this strain (chromosome I, 980 Kbp) would serve as an excellent experimental subject for structural analysis because it can be routinely isolated easily and in quantity. With this chromosomal DNA, a set of overlapping cosmid clones (a contig) has been established. Telomeres obtained from this chromosome consist of 5'-TTTAGGG repeats running from the centromere toward the termini, a sequence identical to that reported for higher plants. Putative replication origins and centromeric components isolated as curved DNA from C-169 chromosome I were characterized by sequencing and localizing on the chromosome. By combining the *Chlorella* chromosomal structural elements thus obtained, various forms of artificial chromosomes can be now designed to be introduced and stably maintained in plants.

[Key words: *Chlorella*, molecular karyotype, telomere, centromere, replication origin, bent DNA, artificial chromosome]

は じ め に

巨大ゲノムを有する植物を対象として、細胞増殖、発生分化、形態形成、物質生産などの研究を分子レベルで

遂行するうえで、大量の遺伝子群を扱う必要が多々生ずる。さらに、現在シロイヌナズナやイネなどについてゲノムプロジェクトが進展しており、近い将来有用形質に関する膨大な量の遺伝情報が得られると予想される。こ

著者紹介 1977年大阪大学大学院工学研究科博士(前期)課程修了 広島大学工学部第三類化学系発酵工学講座 教授

〒739-8527 東広島市鏡山1-4-1 TEL. 0824-24-7752 FAX. 0824-24-7752

E-mail: tayamad@ipc.hiroshima-u.ac.jp http://www.hiroshima-u.ac.jp/~mbiotech

これらの情報は最大限に活用されねばならない。そのためには、遺伝情報のクローニング化、ライブラリー化、形質転換のステップでの許容量が圧倒的に大きいベクターが必要となる。酵母人工染色体 (YAC) が種々のゲノムプロジェクトで威力を発揮したように、植物においても人工染色体が開発されたならば、上記目的におけるその有用性には計り知れないものがある。植物人工染色体 (Plant artificial chromosome: PAC) をモデル化する素材としては、実験上の便宜さから染色体基本構造ユニットを完備した最小ゲノムが理想的である。一般に巨大な高等植物染色体は物理的単離が技術的に困難であり、分子構造解析の対象として向かない。そこで種々の単細胞緑藻類に着目し、最適な染色体のスクリーニングと構造解析を行った。以下に述べるように、クロレラに見いだされた最小染色体は、高等植物に共通した染色体基本構造ユニットを有しており、素材としての条件を満足する。

1. 植物型最小ゲノム

植物の核ゲノムの大きさは、種によって大きく異なっている。被子植物では、最小の部類とされるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のハプロイド核 145 Mbp から最大と見なされているユリ科植物の 15,800 Mbp まで100倍以上の差が見られる。¹⁾ すべての植物において基本的な必須遺伝子量に大差はなく、このゲノム量の差は主として非遺伝子領域の反復配列の量に起因すると考えられている。これらの反復配列は、ヘテロクロマチン領域、セントロメア、テロメアなどの特定染色体部位に局在する場合が多く、染色体の構造保持、再編成、進化などに重要な役割を担っていると思われる。²⁾ 分化全能性や環境に対する高度な適応性などの植物の特性は、ゲノムの可塑性と関係が深く、植物ゲノムの基本的な成り立ちに大きな興味を持たれる。

1.1 パルスフィールド電気泳動法による核型解析

核型 (karyotype) とは、細胞の核分裂中期の染色体の数および各染色体の詳細な形態をイデオグラムで示したものであり、生物種に固有でその種を規定するものと考えられている。各生物種の分類学上の類縁関係や進化に伴うゲノムの変遷を明らかにするのみでなく、遺伝学において各遺伝子の連鎖を染色体に対応づけることと、変異と染色体の動態の相関を知るうえで非常に重要な指標となってきた。高等動植物においては、各種分染法が開発されており、顕微鏡観察に基づいて詳細なデータが蓄積されている。ところが、最近の分子生物学が主に対象とするモデル生物は一般にゲノムが小さく、多くの場合

染色体の顕微鏡観察が難しい。古典的核型解析に加えて新たに登場したのが、比較的大型の DNA 分子を物理的に分離できるパルスフィールド電気泳動法を用いた、いわゆる電気泳動的核型 (分子核型) 解析法である。³⁾ この方法を用いて、出芽酵母 ($n=16$)、分裂酵母 ($n=3$)、コウジカビ ($n=8$)、アカパンカビ ($n=7$) やその他菌類、原生動物などの核型が決定されている。我々は、植物 (真核光合成生物) 型の最小ゲノムと最小染色体を求めて種々の生物を対象にパルスフィールド電気泳動解析を行った。その結果、単細胞緑藻クロレラの各種が通常の泳動条件で容易に分離できる染色体群を有することを見いだした。

1.2 クロレラの電気泳動的核型：2種の染色体長多型 (Chromosome length polymorphism; CLP) 群

Fig. 1 にクロレラ 4 種計 7 株の染色体 DNA を CHEF 電気泳動法で分離したパターンを示す。⁴⁾ ここでは、電気泳動条件を比較的小さい DNA 分子を分離する条件に設定してある (パルス時間 7.5 分、電圧 3.3 V/cm、泳動時間 72 h、13°C)。一見して、2 種の分離パターンの存在に気づく。たとえば *Chlorella ellipsoidea* C-87、*Chlorella vulgaris* C-135、C-150、211-11b 株では、染色体 DNA は大き過ぎて分離できず、サンプル孔近傍に凝集する。一方、*C. vulgaris* C-169、*Chlorella saccharophila* C-211、*Chlorella* sp. NC64A 株では、1 Mbp-数 Mbp の領域でサイズの異なる染色体バンドが多数分離し、個々のバンドの単離と回収が可能である。このように、調べたクロレラ株間には、

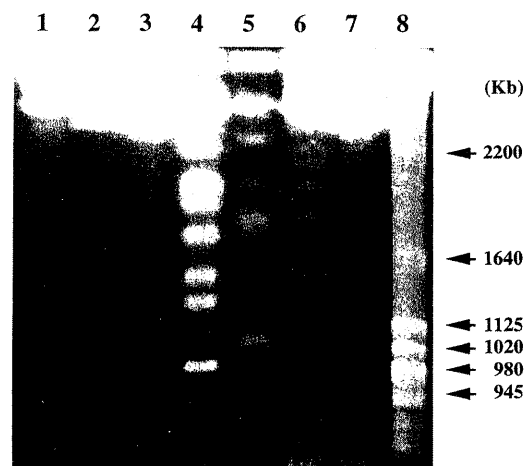


Fig. 1. Separation of chromosomal DNAs of *Chlorella* strains by CHEF gel electrophoresis. CHEF gel electrophoresis was carried out with a switching interval of 7.5 min at 3.3 V/cm for 72 h. Lanes: 1, *C. ellipsoidea* C-87; 2, *C. vulgaris* C-135; 3, *C. vulgaris* C-150; 4, *C. vulgaris* C-169; 5, *C. saccharophila* C-211; 6, *Chlorella* sp. NC64A; 7, *C. vulgaris* 211-11b; 8, *S. cerevisiae* (size markers).

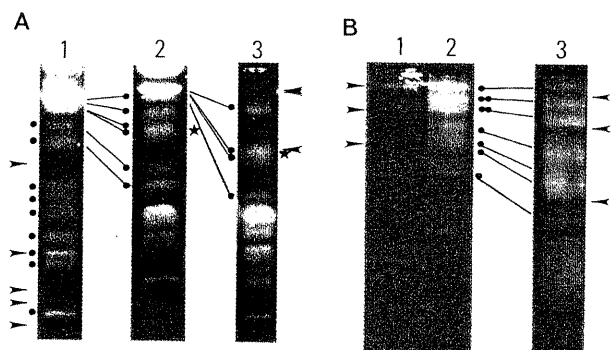


Fig. 2. Electrophoretic karyotypes of *C. vulgaris* C-169 (A) and *C. ellipsoidea* C-87 (B).⁴⁾ The chromosomal DNA molecules of strain C-169 (A) were separated by CHEF gel electrophoresis under three different conditions: a combination of a 5 min switching interval at 3.3 V/cm for 24 h, a 7 min interval at 3 V/cm for 24 h, and a 8 min interval at 2.6 V/cm for 24 h (lane 1); a 12 min switching interval at 2 V/cm for 4 d (lane 2); a switching interval of 25 min at 1.6 V/cm for 3 d and then with a 20 min interval at 2 V/cm for 2 d (lane 3). The C-87 chromosomal DNAs (B) were separated similarly with a switching interval of 60 min at 2 V/cm for 4 d and successively with a 90 min interval at 1.3 V/cm for 4 d (lane 2) or a 90 min interval at 1.3 V/cm for 14 d (lane 3). Dots indicate individual chromosomal DNA bands. Corresponding DNA bands at the higher size range in different lanes are connected by lines. Arrowheads indicate the positions of size markers of *S. cerevisiae* chromosomes (A) and *S. pombe* chromosomes (B).

(i) 大型染色体長多型群と (ii) 小型染色体長多型群の2タイプが見られた。各タイプの代表株として (i) 型の C-87 株, (ii) 型の C-169 株をさらに詳しく検討した。Fig. 2(A) に C-169 株の染色体を異なる三つの CHEF 泳動条件で分離したパターンを示してある。それぞれの条件で、分離染色体サイズ領域が異なっており、レーン1の条件では2 Mbp以下の染色体9本が分離しているが、それ以上大きい染色体は上部で重なってしまっている。この重なりは、分離領域を大きくしたレーン2の条件で分離でき、さらに最大染色体部分はレーン3の2.5 Mbp以上を分離する条件で完全に解析できた。この結果、図の各バンドの対応付けが示すように、C-169 株のゲノムは全16本の染色体バンドとして分離され、分子量マーカーとの比較から各染色体のサイズと分布(分子核型)が確定できた。ここに、各染色体のサイズの総和は38.8 Mbpとなった。一方、さらに大きな分離サイズ領域のCHEF電気泳動条件でC-87株の染色体を解析すると、Fig. 2(B)に示すように計9本に分離できた。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の3本の染色体(3.5 Mbp, 4.6 Mbp, 5.7 Mbp)との移動度の比較から、それらのサイズは2.5,

2.9, 3.0, 4.0, 4.7 (2本), 5.2 (2本), 6.5 Mbpとなり、総和は38.7 MbpとC-169株の場合とほぼ一致した。⁴⁾最近、オレゴン州立大学の Meints のグループが *Chlorella* sp. N1a 株 (NC64A 株と同一と言われている) の分子核型を同様に解析した。その結果、この株では1.1から6.5 Mbpの領域に13本の染色体が分離でき、ゲノムの総和は39-45 Mbpとなり、上記2株とほぼ一致した。⁵⁾このゲノムサイズは、酵母菌の約3倍であり、シロイヌナズナの4分の1、イネの11分の1に相当する。もちろん植物型ゲノムでは最小の部類に入る。ところで、核型は“種”を規定する重要な指標のはずであるが、クロレラに関しては9本、13本、16本と株によって染色体数が異なる。9(C-87株)と16(C-169株)の差は尋常ではない。この2群はとても同一の“種”に属するとは考えにくい。クロレラの分類については多くの問題があり、議論が絶えないが、⁶⁾分子レベルの情報が増えるに従い、この属の再々整理を余儀なくされるであろう。

1.3 *C. vulgaris* C-169 株の染色体マッピング クロレラには有性世代がなく、多くの突然変異株が得られているにもかかわらず、その遺伝解析ができなかった。今回、CHEF電気泳動法によってゲノムを染色体の物理単位に分離することができたことから、各染色体上へ個々の遺伝子を位置づけること(マッピング)が可能となった。すなわち、プロット法(Southern blot)を用いて、クローニングされた遺伝子の位置を個別染色体あるいは、個別染色体個別制限酵素断片へ特定できるようになった。その例をFig. 3に示してある。ここでは、ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase 小サブユニット(*rbcS*), 光化学系IIクロロフィル結合タンパク質(*cabII*), ヒートショックタンパク質(*hsp70*), α -チューブリン(*tubA*), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(*gdh*), リボゾームRNA(*rnn*)の各遺伝子をC-169株個別染色体上に位置づけてある。さらに各染色体の細かい制限酵素物理地図と合わせて、もっと詳しい位置づけが可能である。原理的には、プローブとして利用できる遺伝子であればあまねく染色体上へマッピングできるようになった。ところで、前節で述べたクロレラの2種の染色体長多型(CLP)群間の各染色体同士の対応は遺伝子地図の上からどのように理解できるのであろうか? C-169株の第I番染色体(最小染色体)に特異的な3種のDNAプローブを用いて、C-87株の染色体分離パターンとサザン解析を行うと、それぞれのプローブは異なる染色体とハイブリダイズした。たとえば、*tubA* 遺伝子は最長染色体に位置づけられた。このように、染色体間の対応はモザイク状である。

CLP 群を生じる要因の究明は、各染色体の詳細な遺伝子地図と物理地図を比較検討して初めて可能となろう。

2. クロレラ第 I 番染色体の分子構造解析

Fig. 3 に示したように、*C. vulgaris* C-169 株のゲノム 38.8 Mbp は計16本の染色体から成っている。各染色体はそれぞれ独自の機能を持つとともに、全体一セットとして挙動を共にし、親から子に伝わらねばならない。その維持と制御に必要な基本的構造・機能要素はどの染色体にも共通するはずである。染色体基本構造ユニットを分子レベルで究明するためには、最小染色体、すなわち C-169 株では第 I 番染色体 (980 Kbp) を対象とするのがもっとも賢明である。第 I 番染色体は、一晚の CHEF 電気泳動で効率良く他の染色体から分離できるし、圧倒的に少数のクローンでライブラリーをカバーできる。

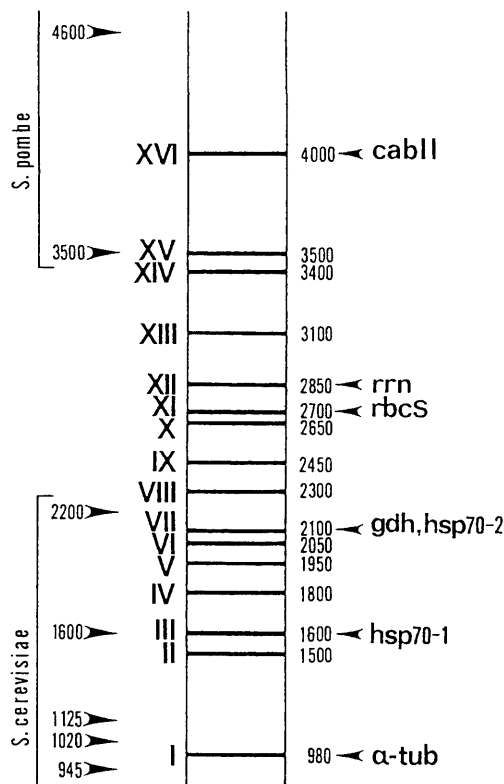


Fig. 3. Schematic representation of the *C. vulgaris* C-169 karyotype. The chromosomal DNAs indicated by bars are numbered from I to XVI in order of size. Arrowheads on the right side indicate the chromosomes where the specific genes were mapped by Southern blot. Genes: *cabII*, chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II; *rrn*, ribosomal RNAs; *rbcS*, small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; *gdh*, NADP-specific glutamate dehydrogenase; *hsp70*, heat-shock protein 70; α -tub, α -tubulin. Size is shown in kilobase pairs.

2.1 制限酵素マッピング 低沸点アガロースゲルを用いた CHEF 電気泳動によって分離した第 I 番染色体をゲルから切り出し、プロテアーゼ・PMSF 処理後、各種制限酵素で切断することができる。980 Kbp の DNA の制限酵素地図を作成するためには、なるべく切断部位の少ない制限酵素を選択する必要がある。レアカッター酵素のうち *NotI* が 6 本のバンド (440, 220 (2 本), 70, 30, 9 Kbp) を生じることを見いだした (Fig. 4)。ゲル内に DNA を包埋した状態での制限酵素処理では部分分解が容易であり、各断片を CHEF 電気泳動法で分離したパターンと第 I 番染色体特異的 DNA クローンをプローブとしてのサザンブロット法を組み合わせ、*NotI* サイト地図を一義的に決定できた (Fig. 4)。⁷⁾ ここで α -チューブリン遺伝子は最長の 440 Kbp 断片上に位置づけられた。

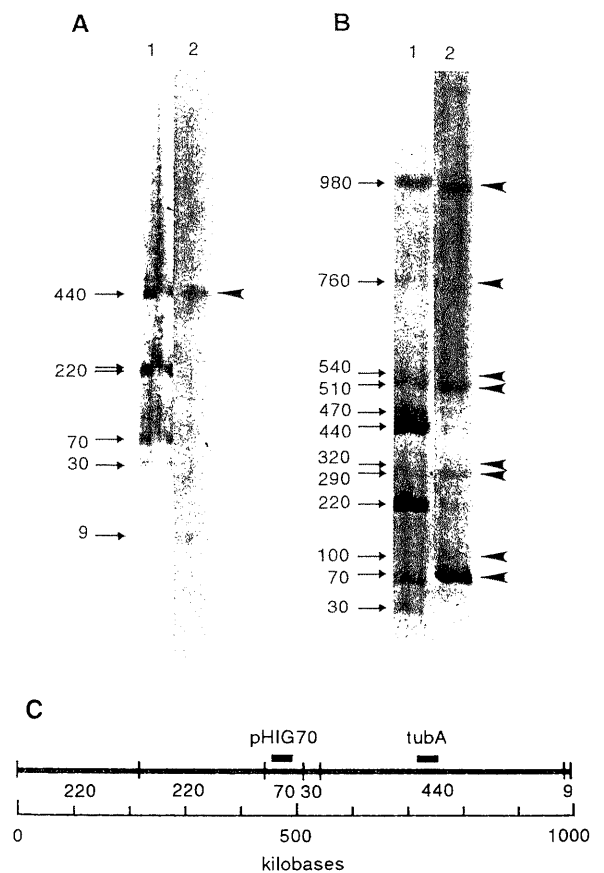


Fig. 4. Physical mapping of *C. vulgaris* C-169 chromosome I. (A) C-169 chromosome I DNA isolated from CHEF gel electrophoresis was completely digested with *NotI*. (B) C-169 chromosome I DNA was partially digested with *NotI*, size separated by CHEF gel electrophoresis, and hybridized with probe of total chromosome I (lane 1) and a specific clone pHIG70.⁷⁾ (C) *NotI* restriction map of C-169 chromosome I. Size is shown in kilobase pairs.

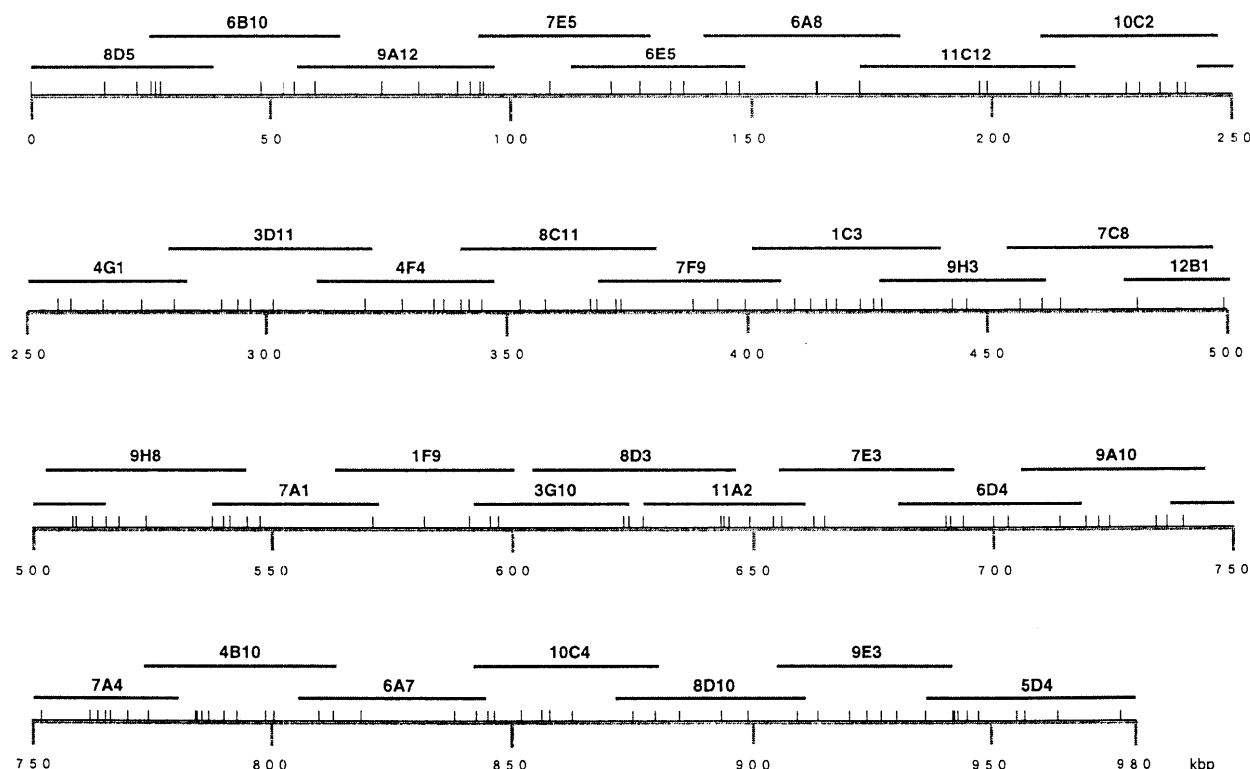


Fig. 5. Contig map of *C. vulgaris* C-169 chromosome I. The colinearity of the contig was confirmed by *NotI* sites and some landmark genes (α -tubulin etc, arrowhead).

2.2 コスミド Contig 整列化 C-169 第 I 番染色体の基本構造ユニットの分子構造解析に先立って、この染色体 DNA のライブラリーを作製し、さらに Contig の整列化を行う必要がある。ポアソン分布によれば、第 I 番染色体 980 Kbp を約 30 Kbp のコスミドクローンで 99% 以上カバーするには、148 個のクローンがあればよいことになる。第 I 番染色体を *Sau3AI* を用いて部分分解し、SuperCos1 (Stratagene) の *BamHI* のサイトに連結し、*Escherichia coli* XL1-Blue MR に導入して約 20,000 個のクローンを得た。うち 1,200 個をベースにして Contig map を作成した。別途クローニングした両末端部分（後述）を加えて 980 Kbp 全域にわたる完全なオーバーラップ Contig が得られた (Fig. 5)。現在、この Contig を用いて詳細な制限酵素地図を作成しており、さらにゲノムプロジェクトを進めている。

3. クロレラ C-169 第 I 番染色体基本構造エレメント

酵母人工染色体に倣えば、染色体構造の最小限エレメントは、末端保護に機能するテロメアと染色体全域にはば等間隔に存在する複製開始点 (ORI) と染色体の分配に働く動原体（セントロメア）の三つである。酵母については、これらの分子構造は詳細に解明されているが、⁸⁾

他の生物種での情報に乏しく、その構造上の共通性は明らかでない。植物では、2-3 の例においてテロメア配列がクローニングされ、その基本反復配列 5'-TTTAGGG が示されている。⁹⁾ *C. vulgaris* C-169 第 I 番染色体について、これら基本構造のクローニングと分子構造解析を行った。

3.1 テロメア (telomere) の構造 染色体末端のテロメア構造は、(1) 他の染色体との癒合を防ぐキャップとして、あるいは (2) 複製の度ごとに失われる最末端 RNA プライマー部分の補充や (3) 核内での染色体の立体的配置付けなどにおいて重要な機能を果たす。¹⁰⁾ 一般には、テロメラーゼという特殊な酵素によってテロメア構造は付加的に構築される。テロメラーゼは種特異的な鋳型 RNA を含む逆転写酵素の一種である。高等植物では、シロイヌナズナ、トウモロコシ、トマトなどで、この鋳型 RNA に対応するテロメア反復配列が、5'-TTTAGGG であることが報告されている。⁹⁾ 染色体両末端の構造は特殊であり、そのクローニングは容易ではない。*C. vulgaris* C-169 株の第 I 番染色体を CHEF 電気泳動法により単離後、*Bal31* エキソヌクレアーゼ処理によって最末端を平滑化し、引き続いて *HindIII* で小断片化して pUC19 の *SmaI/HindIII* サイトに結合し、*E. coli* に

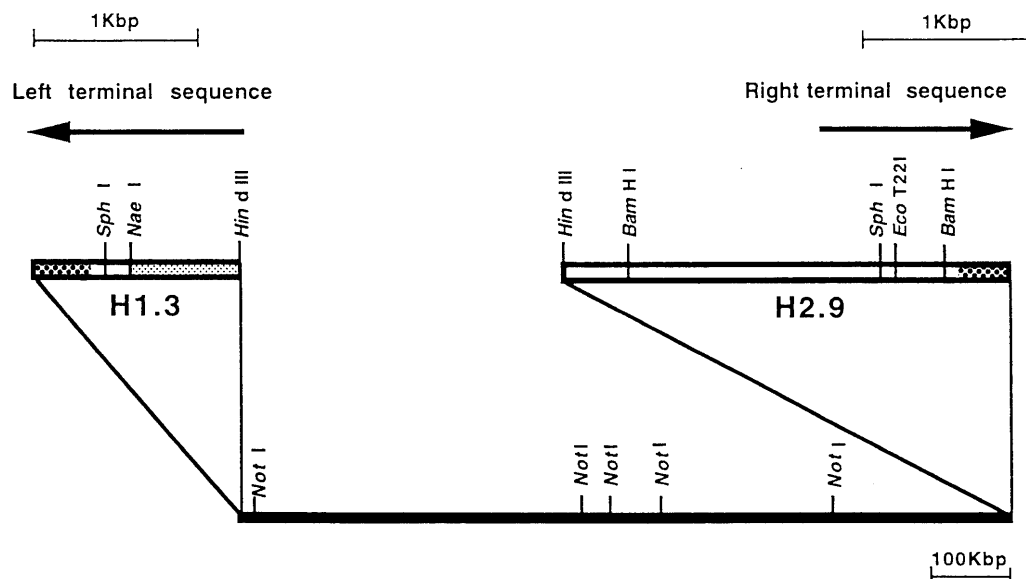


Fig. 6. Restriction map of the 1.3 Kbp (H1.3) and 2.9 Kbp (H2.9) Hind III fragments derived from the chromosome I termini. Shaded parts represent the telomeric repeats.

導入した。多数の形質転換コロニーより、合成テロメア DNA をプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法によってポジティブクローンを得た。それらは 1.3 Kbp (H1.3) と 2.9 Kbp (H2.9) の 2 種に分類できた。平滑末端側から塩基配列を決定すると、両クローンにおいて 5'-TTTAGGG の繰り返しが約 400 bp 連続しており、その後ランダムな配列へと変化していた。H1.3DNA のランダム配列部分をプローブとした第 I 番染色体 *NotI* 断片とのサザン解析では、左端の 9.0 Kbp 断片と結合した。一方、H2.9 のユニーク部分は、*NotI* 400 Kbp の断片と結合した。この結果、H1.3 と H2.9 の DNA 断片は Fig. 6 に示すようにそれぞれ左右両末端に由来すると結論された。⁷⁾ここで、第 I 番染色体を *HindIII* で切断したパターンと 5'-TTTAGGG の反復配列部分をハイブリダイズさせると、ほぼ 1.3 Kbp と 2.9 Kbp の 2 本のシグナルが検出された。すなわち、クローニング過程における *Bal31* 末端消化はごくわずかであり、テロメア反復配列は約 400 bp、つまり 7b の配列が 55-60 回繰り返していることが判明した。ここで注目すべきは、クロレラのテロメア反復配列が高等植物のそれと完全に一致した点である。これはとりも直さずテロメアを合成するテロメラーゼの高い類似性を意味するもので、クロレラ染色体のモデルとしての価値の一つの保証となる。このテロメア反復配列は、C-169 株全染色体はもとより、他の株の染色体ともハイブリダイズした。

3.2 ARS と湾曲 DNA の構造 染色体の DNA 情報を親から子に伝えるためには、正確な DNA の複製が

重要である。組換え DNA 技術と酵母の形質転換系を用いて真核生物の DNA 複製開始点を含むと考えられる DNA 断片 (Autonomously replicating sequence; ARS) をクローニングする方法が確立されている。¹¹⁾常法に従い、C-169 第 I 染色体 DNA 断片をベクター YIp5 に連結し、酵母 YNN27 株に導入して形質転換体を得た。得られたクローン、たとえば pCA-1 は ARS 機能を有する 466 bp の断片を含んでおり、その塩基配列中に Broach の共通配列が存在した。この DNA 断片が確かにクロレラ染色体の複製開始点として機能するかは、実験的にクロレラ細胞内で調べる必要がある。一方、実際の複製開始点としての機能に付随した DNA 塩基配列の特徴に、DNA 湾曲構造 (bent DNA あるいは curved DNA) が知られている。¹²⁾DNA 湾曲性が DNA 結合タンパク質に認識され、DNA 複製開始、遺伝子転写、ヘテロクロマチン形成などをすると考えられる。湾曲 DNA は低温下 (20°C 以下) のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PADE) で移動度が高温 (50°C 以上) の場合より著しく低下することから、容易に検出できる。C-169 株の染色体 DNA を複数の制限酵素の組み合わせ、たとえば *MspI/TaqI*, *SphI/NspI*, *PstI/EcoT22I*, *Sau3AI/MboI*, *XbaI/NheI/SpeI/StyI* など寸断し、温度差二次元 PAGE で分離後、対角線から外れる (低温条件で遅れる) 部分を切り出して、それぞれ pUC19 の *AccI*, *SphI*, *PstI*, *BamHI*, *XbaI* サイトに結合して湾曲 DNA ライブラリー (pBENT シリーズ) を作製した (Fig. 7)。得られたクローンについては、温度差電気泳動によって湾曲度を検定し、顕著なものを各

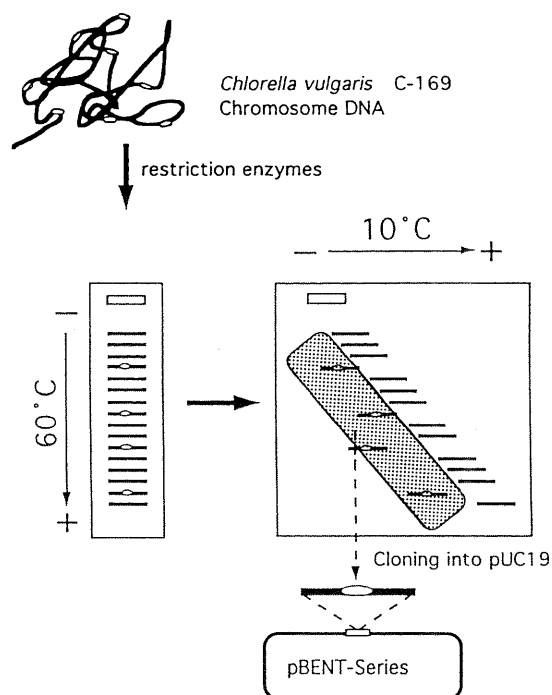


Fig. 7. Strategy for cloning bent DNA fragments from C-169 chromosomes. After digestion with restriction enzymes, DNA fragments were separated by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) running at different temperatures, 60°C (first dimension) and 10°C (second dimension). A fraction delayed at 10°C was cut out from the gel and ligated to pUC19 for cloning.

ライブラリーより計200種選択した。¹³⁾ その一例を Fig. 8 に示す。次にゲノムサザン法によって C-169 株の16本の染色体上での分布様式、第 I 番染色体上での分布様式を調べた。さらに塩基配列の相同性を加味して以下の5つのグループに分類した (Table 1)。

- (A) 2DA-4 型：厳しい条件下で C-169 全染色体とハイブリダイズする。高度に保存された約 200 bp の共通配列を有する。第 I 番染色体では *NotI* 220 Kbp 断片のみに結合する (セントロメア型)。
- (B) 2DX-14 型：厳しい条件下で C-169 全染色体にハ

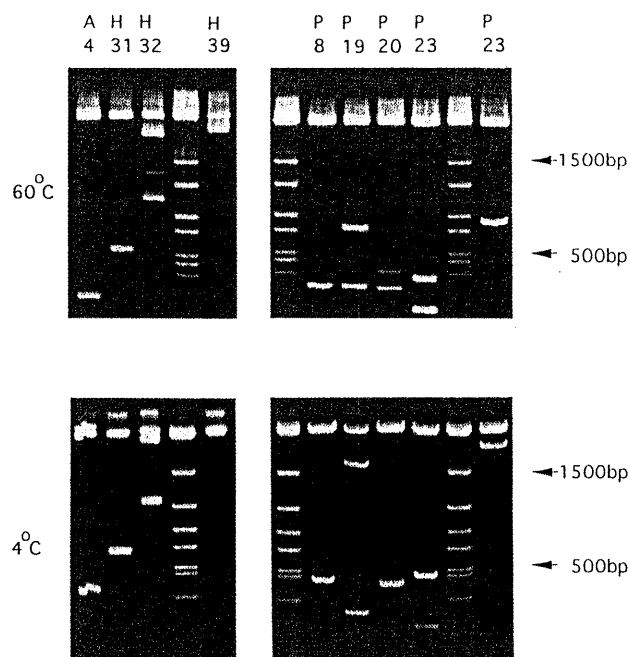


Fig. 8. Bent DNA clones screened from the C-169 chromosome DNA library. Digested with restriction enzymes, inserted DNA fragments were compared by differential PAGE; PAGEs at 60°C (upper panel) and 4°C (lower panel). Note that each insert DNA decreased its mobility at 4°C. Symbols: A, clones from C-169 chromosome DNA digested with *MspI* and *TaqI* and ligated to *AccI* site of pUC19; H, clones from *SphI/NspI* digestion; P, clones from *PstI/EcoT22I* digestion. The molecular markers were pUC19 DNA digested with *MspI*.

イブリダイズする。レトロポゾン Zepp (後述) の配列の一部 (Zepp 型)。第 I 番染色体上では *NotI* 9 Kbp 断片に結合する。

- (C) 2DS-41 型：緩い条件下でのみ全染色体とハイブリダイズする。特徴的な GGN の反復配列を含む。第 I 番染色体上では、*NotI* 440 Kbp 断片に結合する。
- (D) 2DP-84 型：厳しい条件下で C-169 全染色体とハイブリダイズする。第 I 番染色体で

Table 1. Classification of bent DNA clones.

Type	Representative clone	Hybridization with C-169 chromosomes	Hybridization with C-169 chromosome I	Expected type
A	DA-4	All(S)*	<i>NotI</i> -220 kb	Centromere
B	DX-14	All(S)	<i>NotI</i> -9 kb	<i>Zepp</i>
C	DS-41	All(W)**	<i>NotI</i> -440 kb	Centromere
D	DP-84	All(S)	<i>NotI</i> -220	Centromere
E	DH-31	All(W)	All	Replication origins

* (S): Strong signals in high stringency. ** (W): Hybridize in only lower stringency.

は *NotI* 220 Kbp 断片と結合し、最低 2 コピー存在する(セントロメア型)。

(E) 2DH-31 型: 緩い条件でのみ C-169 全染色体とハイブリダイズする。第 I 番染色体上多数のコピーが存在する(複製開始点型)。

ここで、セントロメア型の分布をするクローンが得られたことは、分裂酵母におけるセントロメア湾曲 DNA 構造との関連において興味深い。¹⁴⁾ これらの配列はすでに C-169 第 I 番染色体 Contig クローンに正確に位置づけてあり、その機能の証明が待たれる。もちろん、これらは人工染色体の構造エレメントとしての有力な候補である。

3.3 特異的反復配列 高等生物のゲノム上には、多種多様な反復配列が存在する。¹⁵⁾ それらの機能として一般的に、(1) 染色体構造保持、(2) DNA 複製への関与、(3) 染色体対合や組換えの促進、(4) 遺伝子発現の調節、(5) 成熟 mRNA 形成の調節などが提唱されている。後述する C-169 株の Zepp などのレトロポゾンがこれら反復配列の要因となる場合が多い。反復配列の存在は、ゲノム DNA を制限酵素で切断した場合、ゲル電気泳動パターンに明瞭なバンドが出現することで認識できる。たとえば、*C. ellipsoidea* C-87 株のゲノム DNA を *Bst*UI や *Acc*II で切断した場合、130, 200, 400, 720, 870, 940, 1,100 bp の位置にバンドがラダーとなって見られる。¹⁶⁾ これらの DNA 断片をクローニングして塩基配列を決定したところ、二つの相同性グループが検出された。両者には 15 bp の共通配列が存在し、お互いの関連性が示唆された。Fig. 2(B) の C-87 染色体分離パターンとのサザン解析では、この配列は全9本の染色体へほぼ等価にハイブリダイズした。rDNA との相対値から約50コピーが全ゲノム上に反復していると計算された。ゲノム上でこれら配列がどのような構造をしているのか、またその機能に興味を持たれる。

4. クロレラのレトロポゾン Zepp

高等植物のゲノムは、シロイヌナズナの 145 Mbp からタマネギの 15,797 Mbp まで 10^2 オーダーのサイズの開きがある。DNA 再会合 Cot 解析によると、各ゲノムにおいて遺伝子をコードする部分にはさほど量的差はなく、ただ大小さまざまな反復配列の量によって、このゲノム量の差が生じるという。¹⁷⁾ そして反復配列の主たる部分がレトロポゾンに由来するという報告が最近相次いでいる。たとえば、トウモロコシの *Adh1* 遺伝子の近傍

280 Kbp の領域には、10種のレトロ因子が組み込まれており全域の60%以上を占めている。さらに、ゲノム全体においても50%以上がこれら因子から成っているという。¹⁸⁾ これらレトロポゾンは、従来は junk DNA と考えられてきたが、現在では(1) 染色体の高次構造形成、(2) DNA の再編成、(3) 遺伝子変異、(4) 染色体修復・保護などに深く関わり、ゲノムの進化に重要な役割を果たしてきたと認識されている。クロレラの染色体にも以下に示すようにレトロポゾンが見いだされ、特にゲノム末端の維持と修復に重要な働きをすることが判明した。

4.1 レトロポゾン Zepp の特徴 C-169 株の第 I 番染色体の末端テロメア構造解析の途上、左腕テロメア反復配列に隣接して A の並びが15連続するのを見いだした。この polyA を含む約 800 bp の配列をプローブとしたサザン解析の結果、第 I 番染色体上に 6 コピー、他の15本の染色体にも計約130コピーこの配列が重複していることが判明した。⁷⁾ C-169 全染色体 DNA ライブラリーから取り出した全長クローン(ZA-1)の約 10 Kbp の塩基配列を決定し、このエレメントの以下の特徴が明らかとなった(Fig. 9)。¹⁹⁾ (i) 全長 8,930 bp 中に二つの ORF を含み、下流 ORF は逆転写酵素をコードする *pol* 遺伝子と高い相同性を示す。(ii) 3' 末に polyA 配列を有することから LINE (long interspersed DNA element) 型のレトロポゾンである。(iii) 3' 末の非コード領域が 3 Kbp もあり、ショウジョウバエの HeT-A 型である。トランスポゾンには、慣例的に「飛ぶ」、「跳ぶ」、や「移る」のイメージを持つ名前が付けられている。クロレラのこのトランスポゾンには飛行船 Zeppelin に由来する [Zepp] の名を付けた。第 I 番染色体左腕の 13 Kbp の塩基配列を決定し、全長クローン(ZA-1)の配列と比較することにより、この染色体上での各コピーの関係が分かった。Figs. 10, 11 に示すように、Zepp は Zepp 自体の配列を認識して入り込み、「入れ子」構造を成していた。²⁰⁾

4.2 Zepp の分布 LINE 型のレトロポゾンにはその転移機構に不明な点が多いが、基本的には親コピーか

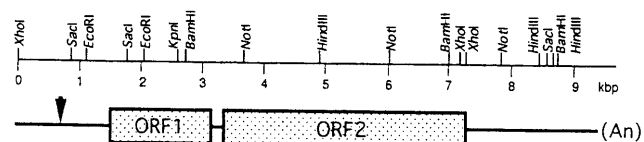


Fig. 9. Schematic representation of the entire Zepp structure (ZA-1). ORF2 corresponds to *pol* gene and encodes reverse transcriptase. The 3'-end is associated with polyA.

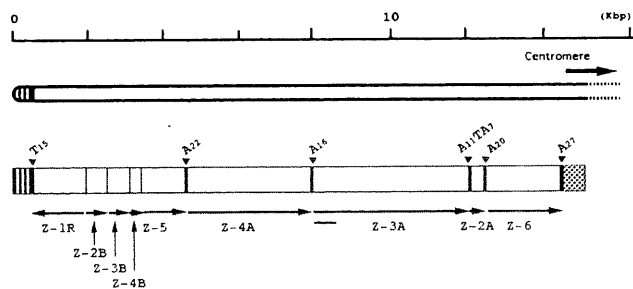


Fig. 10. Composite structure of *Zepp* elements on the left arm of *C. vulgaris* C-169 chromosome I. The boxes represent individual *Zepp* copies with polyA tail at the 3'-end (vertical lines). Arrow indicates the length and orientation of each element.²⁰⁾

らの転写産物 (polyA 付き mRNA 形) が逆転写酵素により DNA に変換されて、標的部位の DNA ギャップ部分に入り込む。²¹⁾ 一連のステップの中で、転写、逆転写の段階あるいは RNA-DNA 対合の段階で転移したコピーの多くは 5' 欠失型となる。Zepp の 3'-末側の短い領域をプローブとしたサザン解析では、C-169 ゲノム中に約130コピーの存在が推定されたが、全長コピー (ZA-1) の各部分を用いた解析でその詳しい分布が判明した。3' 末端部分は全染色体にはほぼ均等に検出されるが、5' 側の ORF 部分は、3-4 本の個別染色体に限定される。ZA-1 は第 V 番染色体に特定された。第 I 番染色体と同様に、他の染色体上でも Zepp が Zepp に組み込まれる「入れ子」構造をなしていた。

4.3 Zepp の機能 C-169 株の全染色体 DNA をエキソヌクレアーゼ *Bal31* で経時的に処理後、*HincII* で断片化し電気泳動で分離したバンドパターンを、Zepp 配列をプローブとしてサザン解析した結果を Fig. 12 に示す。ここに、明らかに少なくとも 2 本のバンドが *Bal31*

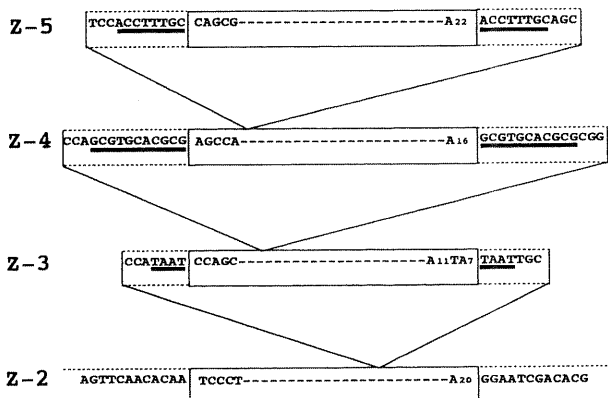


Fig. 11. Nested structure of *Zepp* elements on the left arm of C-169 chromosome I. Target site duplications flanking each copies are underlined. Note that *Zepp* elements integrated into the *Zepp* sequence itself as a target.²⁰⁾

Nuclear DNA /*Bal31* → *HincII*

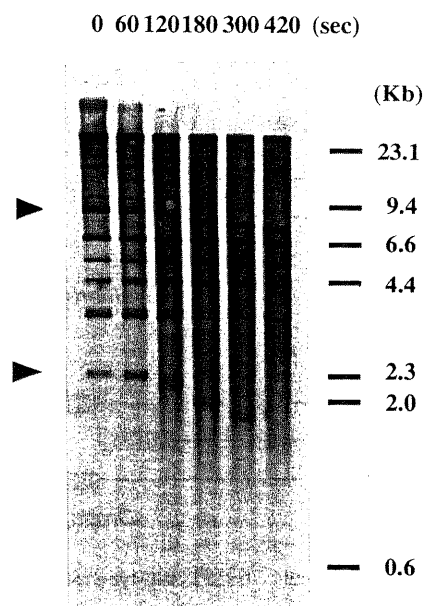


Fig. 12. *Zepp* clusters are at the termini of *Chlorella* chromosomes at least in two cases. Before Southern blot analysis, total genomic DNA was digested with *Bal31* for various periods and then with *HincII*. Size-separated bands were hybridized with a 3'-portion of *Zepp* as probe. Two bands indicated by arrows were gradually degraded by extended *Bal31* digestion, indicating that they were derived from chromosomal termini. The larger band corresponded to the chromosome I fragment. The smaller band did not hybridize with telomeric repeats and was shown to be consisted of *Zepp* copies only.²⁰⁾

処理時間に応じてサイズを減少させているのが見て取れる。つまり、16本の染色体の32ある末端のうち少なくとも2つにおいて Zepp が位置していることになる。第 I 番染色体の左腕がその一つである。この場合は、Zepp の外側にテロメア配列が存在している。Fig. 12 で約 9.0 Kbp のバンドがこれに該当する。Fig. 12 の同じパターンをテロメア配列をプローブとしてサザン解析した結果では、もう一つの 2.3 Kbp のバンドはハイブリダイズしなかった。すなわちこの末端部分には、テロメア配列がなく Zepp が露出しているということになる。事実この末端 DNA をクローニングして Zepp 配列が反復していることを確認した。²⁰⁾ 染色体維持にテロメアが重要であることは、すでに述べたとおりである。では、このような異常な構造は何を意味するのであろうか？ 最近、ショウジョウバエの染色体末端において Zepp によく似たレトロトランスポゾンがテロメア配列にとって代わって働いていることが明らかとなった。HeT-A と TART と呼ばれるこれらレトロポゾンは、次々に染色

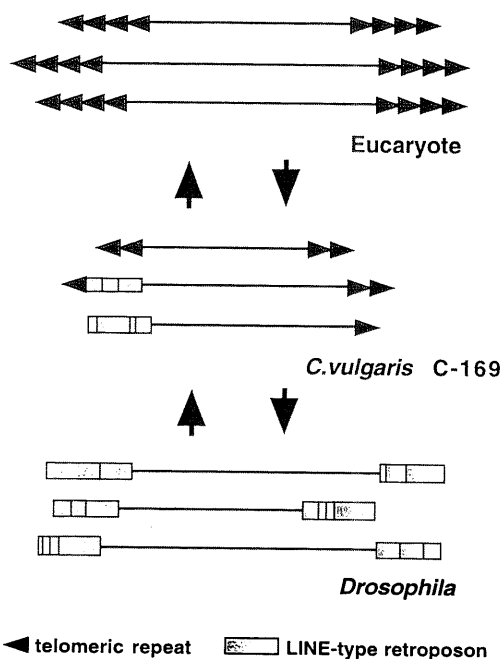


Fig. 13. The *Chlorella* chromosomes can be regarded as an intermediate state changing from canonical telomere structures to the *Drosophila* retroposon structure. The *Chlorella*-Zepp system offers an opportunity to understand how retroposons take over the telomerase-telomere system.

体末端に付加してゆき、複製によるDNAの欠損とのバランスをとっているという。²²⁾ 転移の機構やゲノム上の分布動態は異なるものの、染色体末端におけるZeppとHeT-A, TARTの構造と機能は注目に値する。一般真核生物のテロメラーゼによるテロメア構造とショウジョウバエのレトロポゾンによる染色体末端構造とはどのような相関性があるのだろうか。クロレラのZeppはちょうどこの両者の溝を埋める位置にあると言える。すなわち、C-169株の染色体にはその末端構造として、典型的テロメアとショウジョウバエ型末端とZeppにテロメア反復配列が付加した構造の3種の形態が存在している (Fig. 13)。これは、一方から他方への移行の過渡的段階と見なすことができる。その動的変化を考えるうえで、C-169第I番染色体末端の成り立ちのプロセスを推察することは、意味深いであろう。これまでの情報をすべて加味して、矛盾なくC-169第I番染色体末端構造を説明できる模式をFig. 14に示す。Zeppは、Z-6, Z-2, Z-3, Z-4, Z-5, Z-1Rの順に組み込まれている。途中、テロメア配列とZeppの一部が何かの理由 (ストレス?) で損傷を受け欠失し、Zeppが最末端に露出している。現にこのような構造の末端が少なくとも一つ確認された (前述)。他とは配向が逆のZ-1Rの付加によって、テロメラーゼ

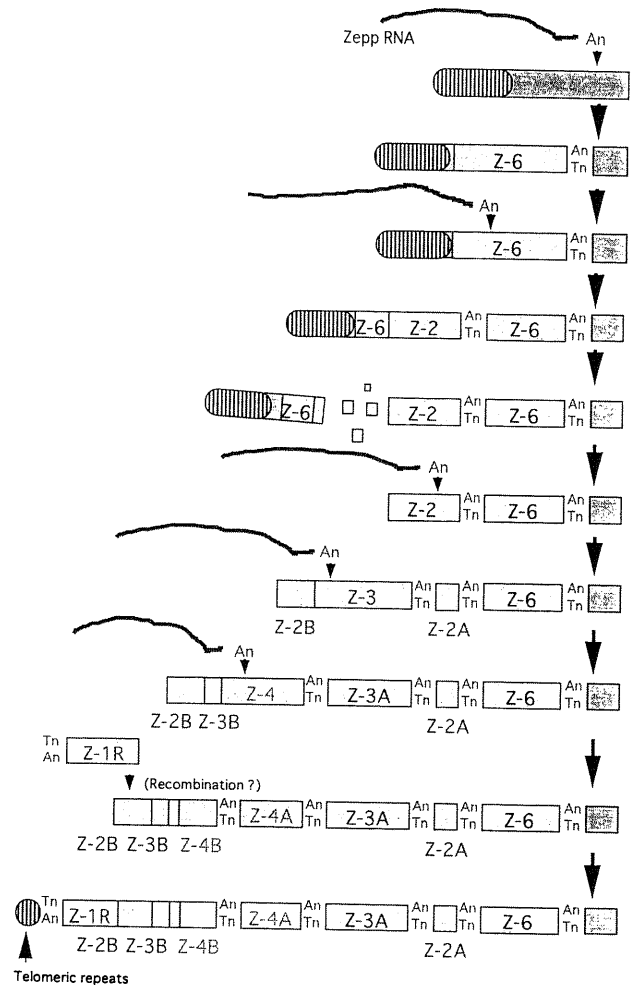


Fig. 14. A model for the mechanism of repeated integration of Zepp elements into the subtelomeric region of *Chlorella* chromosome I. Zepp copies (open boxes) with polyA tails were integrated successively via an RNA intermediate (winding line).²⁰⁾

の基質として再び認識され最終的に現在の形になったと思える。ここで、染色体に生じた損傷を応急的に処置する役目としてのレトロポゾンが注目される。テロメラーゼ活性が極端に低下してしまう結果がショウジョウバエ型への移行と説明できる。ちなみに、Zepp RNAの発現は、ヒートショック (37°C, 5分) により誘導されることが証明されている。²⁰⁾

5. 植物人工染色体 (PAC) のモデル化

トウモロコシやライ麦で、通常染色体 (A染色体) に加えて1-数本の過剰染色体 (B染色体) が知られている。B染色体は、その大部分がヘテロクロマチンから成り、意味のある遺伝子はほとんど存在しないと考えられている。このB染色体の挙動の解析から、染色体構造

の動的変化の解析と構造要素の特定が試みられてきた。その中でセントロメア領域の B レピート構造が判明し、セントロメア機能を保持したままでそのサイズを減少できることが示された。²³⁾ これは、B 染色体を機能的な人工染色体の素材とする一つの道を示す。一方、モロコシの BAC クローンから種を越えてセントロメア領域とハイブリダイズする配列が得られた。²⁴⁾ これはセントロメアの部品としてきわめて有望である。また、最近の染色体レーザー顕微加工技術を用いて各種エレメントのマイクロクロニングも検討されている。²⁵⁾ しかし、いずれにしても分子レベルで染色体を操作するうえで、物理的に容易に単離できる染色体素材がなければ話にならない。クロレラ C-169 第 I 番染色体はそのまま植物人工染色体の素材となりうるものである。

5.1 植物人工染色体構築 酵母の人工染色体 (YAC) が実用化され、特にヒトをはじめとする高等生物の膨大な DNA 情報のライブラリー化において絶大な威力を発揮している。この事実、同様な戦略が高等植物の人工染色体モデル化にも適用できる可能性を示している。すなわち、最低限の基本構造ユニットつまりテロメア、セントロメア、複製開始点を再構成することである。ともかくも一つの完全な染色体からこれらユニットを同定し、その構造上の特徴を明らかにすることが先決となる。物理的単離が容易なクロレラ C-169 第 I 番染色体の Contig を完成し、さらにテロメアをは

じめ各種構造エレメントをクロニングし構造を解明した。次の段階は、さまざまな形でのこれらの再構成である (Fig. 15)。高等植物を対象としては、種に応じた各パーツの組み合わせセットを準備する必要があると予想される。各種再構成人工染色体は適当なマーカー遺伝子を利用して、クロレラ細胞に戻し、あるいは YAC との複合体で酵母で増殖し、プロトプラスト融合法、またはマイクロマニピレーター・光ピンセットを用いた直接導入法などによって各種植物細胞に導入し、その安定性と挙動を調べることができよう。植物は、種内・系統内において倍数体・異数体を容易に生じ、時には生殖能力を保持できる。このような植物ゲノムの高い可塑性が染色体操作の基盤にある。

5.2 植物人工染色体の利用 現在の植物バイオテクノロジーにおいては、遺伝子操作はたかだか 2-3 の遺伝子の導入レベルに限界である。近年の分子遺伝学やゲノムプロジェクトの進展により、植物有用形質に関わる膨大な遺伝情報が得られつつある。たとえば発生分化調節遺伝子群、形態形成遺伝子群、環境応答遺伝子群、二次代謝物生合成遺伝子群等々である。当然、これらを改変するためには数十から数百の遺伝子の同時操作、あるいは特定染色体構造領域の増幅や変換・組換えなど大規模な操作が要求されることになる。これに対応できるベクターは、いかなる形にしる人工染色体を除いては考えられない。もちろんこのような応用目的を達成する前段階として、植物染色体の構造と機能そのもの、さらには分裂サイクルにおける動的変化の基盤などの深い理解が必要となる。各植物の染色体数を規定する機構は何なのか。巨大なゲノムサイズと可塑性の基盤は何なのか。遺伝子発現制御と染色体高次構造のダイナミックな変化との関係は。こうした基本的な問題を探る手だてとしても人工染色体は重要である。

おわりに

YAC をはじめとして BAC が開発され、ごく最近 MAC (mammalian artificial chromosome) の成功例が報告され脚光を浴びている。²⁶⁾ MAC の場合は、テロメアとセントロメアおよび適当なサイズの DNA を細胞に導入するだけで、新たな染色体構造が *in vivo* で構築できるという。植物の場合も案外簡単に「事は運ぶ」かもしれない。しかしその前段階としての、各パーツに対する確実な基礎情報が必要である。

本研究の構想の時点より、方向性に関する貴重な助言と指導を賜りました元三菱化成生命科学研究所微生物化学研究室室長 坂

Chlorella vulgaris C-169 chromosome I (980kbp)

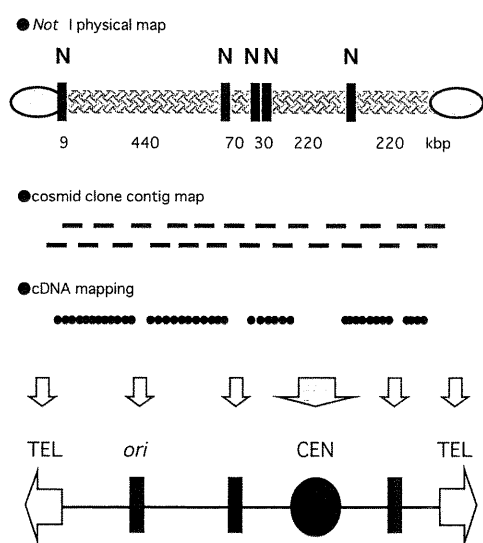


Fig. 15. Reconstruction of a plant artificial chromosome by combining the structural elements identified and isolated from *Chlorella* chromosome I. TEL, telomere; CEN, centromere; ori, replication origin.

口健二氏に感謝いたします。また、以下の諸氏；藤江 誠（染色体画像解析），東山隆信（電気泳動核型解析，Zepp 解析），会見忠則（反復配列解析），秋場美帆（湾曲 DNA 解析），能年義輝（Contig 整列化，Zepp 解析），の協力なくしては本研究の進展は不可能でした。本研究の一部は，中国電力株式会社技術研究センターとの共同研究として遂行されました。ここに，合わせて感謝の意を表します。

文 献

- 1) Arumaganathan, K. and Earle, E. D.: *Plant Mol. Biol.*, **9**, 208-218 (1991).
- 2) Flavell, R. B.: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 569-596 (1980).
- 3) Schwartz, D. C. and Cantor, C. R.: *Cell*, **37**, 67-75 (1984).
- 4) Higashiyama, T. and Yamada, T.: *Nucleic Acids. Res.*, **19**, 6191-6195 (1991).
- 5) McCluskey, K., Graves, M. V., Mills, D., and Meints, R. H.: *J. Phycol.*, **28**, 846-850 (1992).
- 6) Kessler, E.: *Plant Syst. Evol.*, **125**, 129-138 (1976).
- 7) Higashiyama, T., Maki, S., and Yamada, T.: *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 29-36 (1995).
- 8) Burke, D. T., Carlre, G. F., and Olson, M. V.: *Science*, **236**, 806-812 (1987).
- 9) Zakian, V. A.: *Science*, **270**, 1601-1607 (1995).
- 10) Blackburn, E. H.: *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 13-129 (1992).
- 11) Broach, J. R., Li, Y. Y., Feldman, J., Jayaram, M., Abraham, J., Nasmyth, K. A., and Hicks, J. B.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 1165-1173 (1982).
- 12) Synder, M., Buchman, A. R., and Nomura, M.: *Nature*, **324**, 87-89 (1986).
- 13) Akiba, M., Noutoshi, Y., Maki, S., Higashiyama, T., and Yamada, T.: *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **34**, 73-74 (1995).
- 14) Ueki, N., Momoi, H., Yamada, H., and Mizuno, T.: *Gene*, **132**, 247-250 (1993).
- 15) Walbot, V. and Callis, C. A.: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 367-397 (1985).
- 16) Aimi, T., Yamada, T., and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 333-335 (1993).
- 17) Walbot, V. and Goldberg, R.: *Nucleic Acids in Plants*, p. 3-40, CRC Press, Inc., USA (1979).
- 18) SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.-K., Motchoul-skaia, N., Zakharov, D., Malake-Berhan, A., Springer, P. S., Edwards, K. J., Lee, M., Abramova, Z., and Bennetzen, J. L.: *Science*, **274**, 765-768 (1996).
- 19) Noutoshi, Y., Higashiyama, T., Fujie, M., and Yamada, T.: *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 305-306 (1996).
- 20) Higashiyama, T., Noutoshi, Y., Fujie, M., and Yamada, T.: *EMBO J.*, **12**, 3715-3723 (1997).
- 21) Huchison, C. A., Hardies, S. C., Loeb, D. D., Shehee, W. R., and Bdgell, M.-H.: *Mobile DNA*, p. 594-617, American Society for Microbiology, Washington DC (1989).
- 22) Levis, R. W., Ganesan, R., Houtchens, K., Tolar, L. A., and Sheen, F.-M.: *Cell*, **75**, 1083-1093 (1993).
- 23) Kaszas, E. and Birchler, J. A.: *EMBO J.*, **15**, 5246-5255 (1996).
- 24) Jiang, J., Nasuda, S., Dong, F., Scherrer, C. W., Woo, S.-S., Wing, R. A., Gill, B. S., and Ward, D. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14210-14213 (1996).
- 25) Fukui, K., Minezawa, M., Kamisugi, Y., Ishikawa, M., Ohmido, N., Yanagisawa, T., Fujishita, M., and Sakai, F.: *Teor. Appl. Genet.*, **84**, 781-791 (1992).
- 26) Harrington, J. J., Bokkelen, G. V., Mays, R. W., Gustashaw, K., and Willard, H. F.: *Nature Genet.*, **15**, 345-355 (1997).