

## 2S22 次世代型形質転換ベクター(シャトルYAC)の開発に関する研究

(広大院・先端研・生命機能) ○山田 隆

[目的] 現在、ゲノムプロジェクトが種々の動植物・微生物を対象として進展しており、ごく近い将来、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。この情報を最大限活用するためには、遺伝情報のクローン化、ライブラリー化、再構成、並びに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。加えて、世代にわたる安定性、ユニットの高度な制御性、他の形質への影響の低さ、等の理由から染色体レベルでの細胞間移動の技術が注目される。ここでは、酵母と藻類細胞を染色体再構成のin vivo工場として利用し、YAC(酵母人工染色体)を母体とした各種染色体構造の縦横無尽な構築と細胞融合による異種細胞間の移動技術の開発を目的とする。染色体を構成する基本構造要素、セントロメア、テロメア、複製起点等については、酵母はもちろんのことヒトをはじめとする動物、イネ、シロイヌナズナなどの植物、種々の微生物でそのクローニングと分子構造解析がなされている。さらに、遺伝子発現に影響する染色体高次構造要素MAR,SAR、湾曲因子、レトロトランスポゾン等々に関する情報も蓄積している。これらの組み合わせによって目的に応じた染色体をモデル化し、酵母細胞と対象生物細胞間を往復させ(シャトルYAC)情報のフィードバックと構造改良を行う。

[方法及び結果] ここではモデル系として単細胞緑藻*Chlorella vulgaris* C169の第I番染色体の操作について紹介する。この染色体は、サイズが980 kbpと小さく、パルスフィールド電気泳動法によって容易に分離回収できる。これまでにコスミドクローン33個による全長contigをもとに物理地図を完成し、計16個のcDNAを位置づけてある。この染色体のテロメアは、反復配列TTTAGGGから成る典型的な植物型である。全染色体共通配列として同定したクローン6E5(35 kbp領域)は、2つの構成要素から成り、その一つはレトロトランスポゾン様配列であった。電子線照射により生じたミニ染色体の全てに、この6E5配列が保持されており、セントロメアと同定した。6E5の35 kbp断片をpYAC5に結合し、酵母*S. cerevisiae* AB1380に導入したところ、多数の形質転換体を得られた。YACに保持されている配列の解析から以下の事実が判明した。(1)6E5には酵母内でセントロメアとして作用する配列を含む。(2)クロレラセントロメアは酵母セントロメアと拮抗的に相互作用する。(3)クロレラセントロメアは酵母内で比較的安定である。今後、各種生物の染色体基本構造因子(セントロメア、テロメア、複製開始点)をそれぞれセットにして、YACに組み込みミニ染色体原型とする。これを細胞融合・リポフェクション法などによって異種細胞間移動し、導入染色体の保持・安定性とマーカー遺伝子の発現を検討する。

[Key Words] Artificial chromosomes, Retrofitting, Chromosome structural elements, Shuttle YAC