

ジェミニウイルスベクターを用いた DNA トランス ポゾン切り出しの検出系の構築

東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻 資源生物創成学分野
平成16年度 修士課程入学 川島 佑介
指導教官 東京大学教授 宇垣 正志

目次

第 1 章	序論	4
1.	転移因子の多様性	4
2.	トウモロコシの自立的転位因子 <i>Activator</i> (<i>Ac</i>)	6
3.	<i>Activator</i> とジェミニウイルス	13
4.	本研究の目的	14
第 2 章	材料と方法	16
1.	供試ジェミニウイルスベクター	16
2.	<i>Ac/Ds</i> を導入したジェミニウイルスベクターの構築	18
3.	イネプロトプラスト内での一過的発現ベクターの構築	23
4.	ジェミニウイルスベクターのイネプロトプラストへの導入	28
5.	イネ培養細胞内でのジェミニウイルスベクターの蓄積量の 解析	31
6.	イネプロトプラスト内での <i>Ac/Ds</i> 転移の解析	33
7.	イネプロトプラストから大腸菌へのプラスミドレスキュー	34
8	<i>Ac</i> transposase の単離	36
9	Beet curly top virus の感染性クローンの作成	40
第 3 章	結果	48
1.	イネプロトプラスト核内への DNA 導入と pWI ベクターの 地積	48
2.	pWI-32, pWI-33 からの <i>Ac/Ds</i> の転移	50
3.	イネプロトプラストから大腸菌へのプラスミドレスキュー	53
4.	<i>DslacZ</i> が抜けた空の pWI ベクターにおけるフットプリン トの解析	56
5	<i>Ac</i> transposase の発現	58
6	感染性 BCTV クローンの作製	61

第 4 章	考察	65
1.	イネプロトプラストへのジェミニウイルスベクターの導入 と複製	65
2.	Ac transposase の供給による Ac/Ds のジェミニウイルス ベクターからの切り出し	66
3	プラスミドレスキューとフットプリント解析	67
4	Ac transposase の発現と精製	71
5	BCTV のとシロイロナズナを用いた Ac/Ds 切り出し機能解 析系の構築	71
第 5 章	摘要	73
第 6 章	引用文献	76
謝辞		84

第1章 序論

1.1. 転移因子の多様性

現在までに様々な生物のゲノム解析が行われ、原核生物から高等真核生物にいたるあらゆる生物に転移因子が存在していることが明らかとなった。高等真核生物では、生物種間で差はあるものの、ゲノムのうち転移因子とその派生物が高い割合を占めている。例えばヒトでは、全ゲノムのうち 45 %が転移因子由来の配列である。またトウモロコシでも全ゲノム中 50 %以上が転移因子とその派生物であると予測されている。転移因子とその派生物は selfish DNA や junk DNA とも考えられる。しかし、転移因子の中には、宿主遺伝子の活性化や不活性化を行うもの、テロメアの伸長によるゲノムの維持を行うもの等、宿主の生命維持に重要な役割を果たしているものがあり、また、宿主遺伝子の転移や、より大規模なゲノムの再編を行う可能性を生じさせ、ゲノムの進化に大きく関わると考えられているものも存在している。

転移因子は、転移の様式と自身がコードしている転移に必要な酵素 (transposase)の性質によって分類されている。

転移形式による分類では、大きく 2 つのクラスが存在している。クラス 1 は RNA を介した転移を行い、reverse transcriptase をコードしている。代表的なものとして short interspersed elements (*SINES*)と long interspersed elements (*LINES*)などからなる retrotransposon があり、多くの高等動植物において最も

多く見られる転移因子である。また RNA を介するために元の転移因子の配列は動かず、転移が起きるたびにその転移因子の数は増えていく copy & paste 様式で転移する。クラス 2 は RNA を介さず、DNA の状態で転移する転移因子、DNA transposon である。転移の様式としてはクラス 1 と同様に copy & paste 様式と、転位因子の全配列が transposase によって切り出され、標的配列へそのまま組み込まれる cut & paste 様式がある。これらは転移機構によってさらに細かく分類されている。

一方、転位因子は transposase の機能と転移反応の活性中心ドメインによって分類される。活性中心に 2 つのアスパラギン酸(D)とグルタミン酸(E)を持つ DDE-transposase family、チロシン(Y)を 1 つ持つ Y-transposase family、チロシン 2 つを持つ Y2-transposase family、セリンを 1 つ持つ S-transposase family、さらに transposase が reverse transcriptase と endonuclease の機能を持つ RT/En family の 5 つに大きく分類されている。しかし同じ family で transposase の反応部位に類似性が見られてもその転移様式は全く違ったものになりうる。例えば DDE-transposase family の中には cut & past により転移を行う DNA transposon と、RNA を介して copy & past により転移する retrotransposon の両方が含まれている。

このように様々な生物のゲノム解析が進んだ結果、多種多様な転位因子の存在が明らかとなった。しかし、それら多様な転移因子の構造と機能の解析は、未だごく一部についてなされているにすぎない。どのような進化の道筋を辿って現在の様な多様性を獲得したのかという過程もはっきりとは解っていない。

1.2 トウモロコシの自律的転位因子 *Activator*

トウモロコシの DNA トランスポゾン *Activator* (*Ac*)は、初めてその存在が証明された転移因子であり、今から約半世紀前に Barbara McClintock がトウモロコシ種皮に斑入りをもたらす変異の原因因子として遺伝学的解析により見出した。また *Ac* から派生した非自律性の *Dissociation* (*Ds*)も *Ac* の transposase のトランスな供給により転移することが知られている。トウモロコシには *Ac* の他に *Enhancer/Suppressor-Mutator* (*En/Spm*)や *Mutator* (*Mu*)といった 10 種類以上の DNA 転位因子のファミリーがあり、転位因子関連配列の大部分は *Ds* の様な自律性 DNA 転位因子から派生した非自律性転位因子である。例えば *Ac* はトウモロコシゲノムに *Ac7* と *Ac9* の 2 コピーしか存在しないのに対して、*Ds* を含む *Ac* 派生物は 100 コピー以上存在している。またトウモロコシの DNA 転位因子は RNA を介して転移するレトロトランスポゾンとは違い、cut & past 形式で転移するため、転移の際に転位因子の複製は行われない。

Ac/Ds は *hAT* スーパーファミリーに属する転位因子である。*hAT* スーパーファミリーは DDE-transposase ファミリーに属し、キイロショウジョウバエの *hobo*、トウモロコシの *Activator*、キンギョソウの *Tam3* の頭文字を取り名付けられた、真菌から脊椎動物にいたる真核生物で広く見出されている DNA 転位因子である。*hAT* スーパーファミリーの転位因子の transposase には 3 箇所の保存性の高いモチーフ(motif 1~3)が存在し、そのうち motif 3 が最も高い保存性を持っていて *hAT* ドメインと呼ばれている (図 1.1a, b)。また 8 塩基の標的配列を認識し、転移して切り出される際に標的配列の重複が起きる。さらに転

位因子の内部両末端には短い逆位反復繰り返し配列 (terminal inverted repeats: TIRs)を持っている。

Acは全長が4565塩基対であり、両末端に11塩基対のTIRsを持ち、約3.5 kbの mRNA 上の5つのエクソンに807アミノ酸の transposase をコードしている(図1.2a)。Ac transposase は、植物ゲノム DNA 複製時に Ac の両末端に結合し、TIRs の部分で Ac を切り出し、さらに転移先のゲノム DNA を切断して Ac を挿入する (cut & past) 機能を持つ。また Ac は複製する植物ゲノム DNA のみならず、植物の核内で複製する DNA ウイルスであるジェミニウイルス科ウイルスの DNA から転移することがすでに *Maize streak virus* (MSV) およびオギ条斑ウイルス (*Miscanthus streak virus*: MiSV) を用いた研究で報告されている。Ac transposase は N 末端側に核移行シグナル(NLS)を持ち、さらにその内側の109から129アミノ残基間はプロリンとグルタミンの10回繰り返し(PQ)₁₀ という特徴的な配列となっている(図1.2b)。さらに内側には2つのNLSとDNA結合ドメインが存在する。一方のC末端側の hAT ドメインに当たる配列には二量体化部位が存在している。このほかにも転移に不可欠な配列はいくつか解明されているが、DNA の切断を行う触媒ドメインなど transposase の機能にとって不可欠なドメインがどの位置にあるのかは未だにはっきりと解っていない。

しかし近年、イエバエの hAT スーパーファミリーの転移因子である *Hermes* を用いて、その転移の分子機構が *in vitro* で解析された。その結果、*Hermes* は転移の際、DNA にニックを生じさせ、エステル転位により周辺の配列にヘアピン構造を形成しながら転位因子を切り出していることが明らかとなった(図1.3b)。さらにそのDNA切断とエステル転位を行っているドメインが hAT スー

パーファミリー内で保存されている離れた DDE ドメインであることが判明した (図 1.3a)。この研究から、Ac においても DDE ドメインが転位の中心となる DNA 切断触媒ドメインと考えられるようになり、今後さらなる研究の発展が期待されている。

図 1.1 (a)

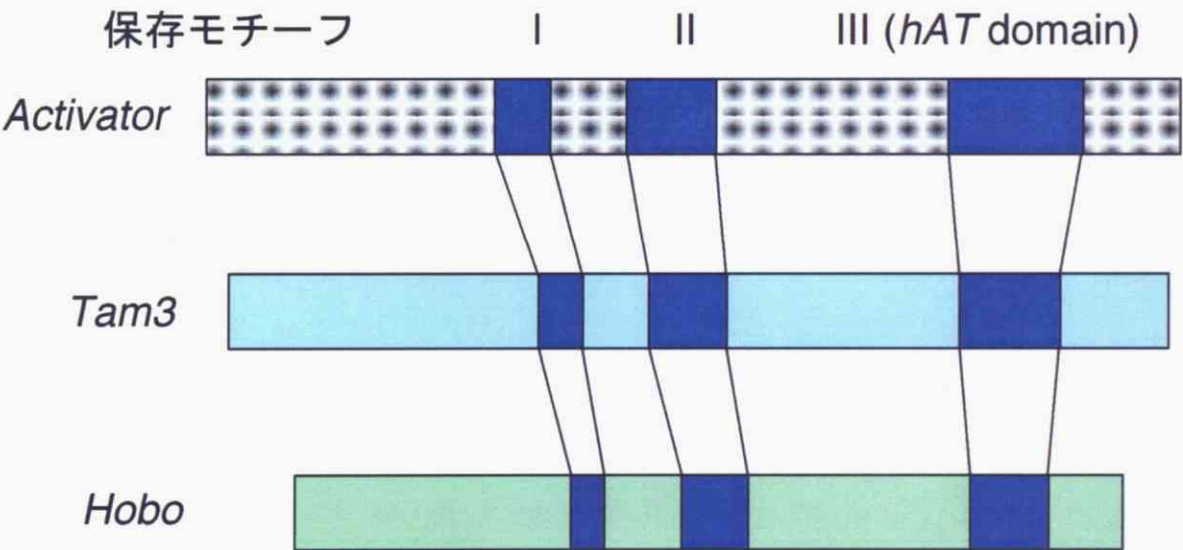


図 1.1 (a) *hAT*スーパーファミリーアライメント内で保存されている3つの保存領域
(b) *hAT*スーパーファミリーの代表的な3つのアミノ酸配列アライメント

Ac 1 MTPPVGNPPSGSAIRLAKLMSTRAPSTRKTSVFSNYAQGLERKADSSSRIGNVRARARPCPCORTSPSSSTAEER
Tam1 1 -----MDTSNIQPAETEDYIHNFMGQVFSVNDTTLGIOPHVONTQEHVFPQVQSPNNNPVAVELPHVQ
Hobo 1 -----MAPYIMIVEFLCLMSVSAVNCPPVFYDITSLQFSIINKPKVKVTINAEADPVKNNKI

Ac 161 YVQVNHCHNFPNKKANTRAECHHDSOFNHLRTSHSLVKGOCLKSEKHOKNDINLEPYKVDDEVSLKKHLATIME
Tam1 139 TGSNNAQC--LLEPTRIHSHTGCGDTLTRELTAHKHED---NDAPDMQRPDQTMARNDONTMRICAAQFIVONE
Hobo 92 VLDQNLFRQCCKVLNLENN---ISNLRAHKCLTLRPTETKIVSENDKKVAIEKCTQMVVODCRPFSAYTORGFNL

Ac 241 YEFNIVEHYVEFVK-SLRPFPIKSRV RNYINDLHLEKEKYOLNDVQSRFSTIMOMTSCQNKs-YNCVIEW
Tam1 213 LPFSFAQNEHFNLOKAQCKFKKISRAT FRDGVKQENETIVRNEFNPNFNCRISLSDNMOOSGSYN-FSCITAM
Hobo 169 VKFLOIGATYGHVD--VDDLLDPPTLS KAKSDAEKRSLSISSEIKAVDSCRASATVMMMDQYVORNELOIGFHY

Ac 319 IDDDWCLOKRIVGF HVEGRHTGRLSQTTAINVKMNIKKLPALSLONASANEVAVHDIIEDLQDTSNWCDGAPFH
Tam3 292 IDKQIMMKRIIEF IQLDSPNDQCIRDATMSSLNYMCKDKINSISLONASINVNNAIKSLKPAMN-----ILGOLFH
Hobo 247 EKEFKLCDMILGLK MNFQKSTAEINILMKIKOLFSEFIVENIDNVKFVTDGRGNKKALEONTLN-----CSSH

Ac 399 VRCACHILNVAKDGLAVTGTETKIKAVLAVKSSPLQNEEDMKCASECDLDKSNHSHSYDSTRWNSTYLNDRD LLYTK
Tam1 367 VRCACHILNVAKQDLSVLTQSDIRIVCLSHINRYPRVQAFNTVCEHOMP-IXENYLOWPFRWNTYKILIEKPTYS
Hobo 317 LLSNVLEKSFNEANELKKIKVSKCKIKVYCKKSNLOETLETTKSAQPRWNSNYHMKKSILDN-MESVDKTLQEDTHV

Ac 479 PALIRLKTSDFRYDAICPKHEEKKNALTFKLEKKFQDLTELSQTOYSTANLFYKQCFEIKDLIDMCVHEKFVHRM
Tam3 446 EPIT--FFCHRSIDGPSILADDNNICDILVPLVYVEEFKINSSCYTPSINIMLLYNVSVVRLFEHRNNTAKN--I
Hobo 396 DFNKSSSLKVVDILQDFERIFKKLOTSSSPSIFVLPSISKIELCEPHILDLSAALLKERTLENIRKIWNHLSNHHK

Ac 559 NVAISERFENYNNVSNIALAVACFLDPRIKKLIEFYMKKFEQDSYKHVDDFVR--VIRKVFQFVSSCSFSAFKTKTTT
Tam3 521 IKENKKKWHYTKVPNVCLSSSLDPVRLIGLELLEKVESALNNVYNGNEERNRILQLVSLVONYAPSTMDDESPN
Hobo 476 DAFLLYPPAAHLOEEDLEIKVFIISOIQVPSYTLSESTETPRTPETPETPETPETPETPETPETPETPETPETPESLESP

Ac 637 NDSNDDTLNENEDDEFQNYLHELKDYDQVESNLDKYMSEPLL--KSGQFDILSKWRGRVAETPILTQIARDVLATQVS
Tam3 601 NASRGSGFSIFDELLSN---QQSNQPSVQNYTHLFLVQKPPR--KDKDFQILKWRQNESITPPVARIARDLLSSNS
Hobo 556 NLFPPKKNKTASSNENETFFPKPVTESNWFNESPDEIERYIRQVPSONFEVTEKNKNNANLYPOLSKLALKLSTPAS

Ac 715 TVASESFSAGGVVDPYRNRLQSEIV ALICTKQVVAASRKGATYFTPMIGDLEVLDSVIAAATNHNHVDQEDAEF
Tam3 676 TVASERAFSAGRVLTDAHRLKPGSV FCMINQDMLDQDYNEKTLR-----KVETVLANDGEEDNEDATFYPTFMH-
Hobo 636 SAEKKECFP-----

9

図1.2 (a)

Ac transposon (4565bp)

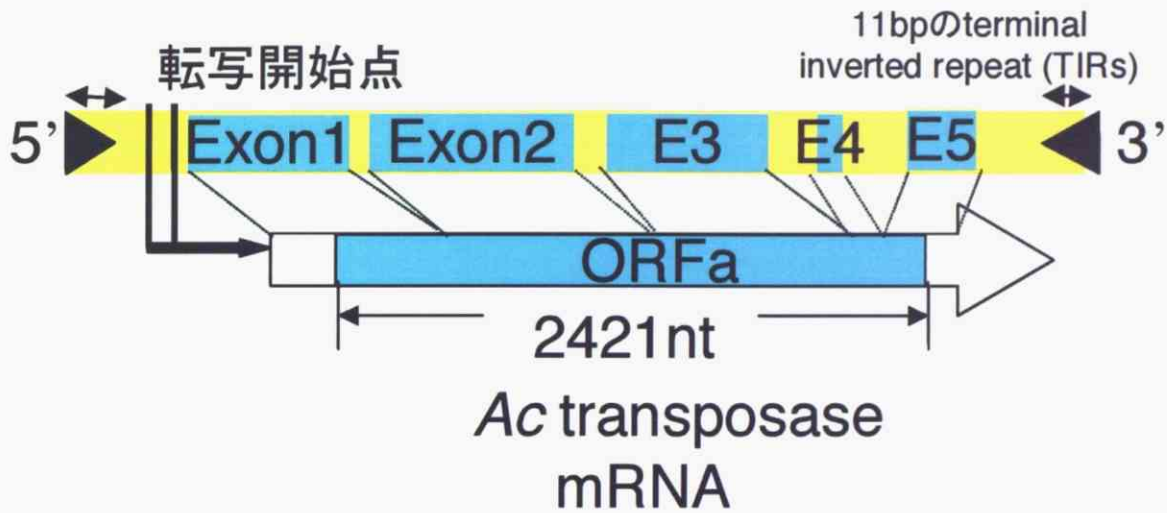


図 1.2 (b)

Ac transposase (807amino acid)

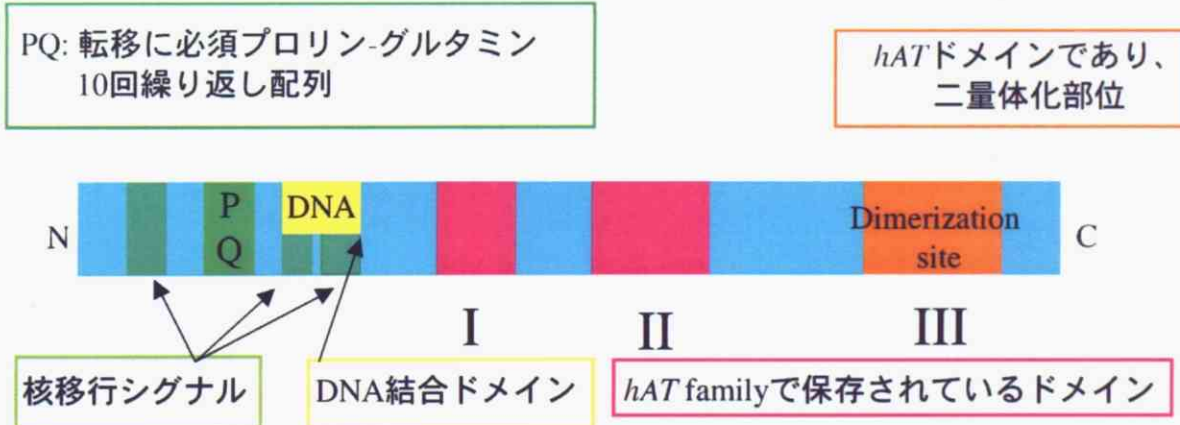


図 1.2 (a) Ac transposonの遺伝子構造

(b) Ac transposaseの機能ドメイン及び保存領域

图 1.3 (a)

```

Ac      1  MTPPVGNMPPSSGSAIRLANLMSTTRAPSTRKTNVSFSAQAQLKRAEASSSRIQNVRRARGHCCORTSPSSSTAEAE
Hermes  1  .....

Ac      81  HFIQSVSSSNANGTATDPSQDDMAIVHEPQPQPQPEPQPQPQPEPEEEAPQKRAKCTSDVWQHFTKKEIENEVDGKK
Hermes  1  .....MQKMONLEVKAKINQGLYKITPRHKG.....TSFINVVLADIQKEDDT....

Ac      161  YQVVGHCNFPNCKAKYRAEGHGTSGFRNELRTSHSLVKGQCLKSEKDHGKDNLIETPKYDEVVSLKKHLAIIMHE
Hermes  44  LVEQNVFGRKCEKVLKNTTR---QSNLCREKCCASLKQSREKTVSADCKEAEKCAQWVVRDCRPFSAVSGSGFIDM
                                           Ac: D300

Ac      241  YPENVVEHEYFVEFPKSLRPHFPIKSRVTANKYINDLYLEEKENLYONLKDVSQRFSTHDMWISQNMIS-YNCTIEMI
Hermes  121  IKFPIKVKAEYGEHVN-VEELLESPITLSRNVTSDAKEKKALISREINSAVEKDQASATLMDNYIENRFLQVLEHYH
                                           Ac: D366Hermes: D180

Ac      320  DDDWCLQKRIVGFFHVEGRHTQRLSQTFTTMMVKNNEK-KLFALSLNANASANEVAVHDIEDLQDTSNLYCDGAFPH
Hermes  200  ENNELRDILGLKSLDFERSTAEINIKKLRKPSQFNVEDSSIKFVTIRQANVVKSLANNIRIN-----
                                           Hermes: D248

Ac      399  VRCACHINLVAKDGLAVIAGTIEKIKAVLAVKSSPLQWEELMKCASECDLQKSKQISTDVSIRWNSTTLNLRDAITYK
Hermes  265  --CSSHLSNVLEN-----SFETPELNMPIACKNIVKYFKKANLQHRIRSS--LKSECPTRNSTYTLRSILDNW

Ac      479  PALRLKTSOPPRYDAICPKAEZWKMALTFKCLKKFDLTTELLSGTOYSTANLKYKGFCEIKDLIDQWCVEHKFVIRRM
Hermes  334  ESVQILSEAGETQRIVHINKSIIQTMVNLDFERIISKELQCS----SPSLCFVVP SILKVKEICSPDQGDVADIAKL

Ac      559  AVANSEKFEKYKVSN--IALAVACLDPRYKKILIEFYMKFPHGDSYKVHVDDFVRVIRKLYQFYSSCSPSAPKTKTTT
Hermes  410  KNIKKNVRIIEENLSIWHYTAFFFTYPALHMQQEKVAQIEFCLSKMEDLELINMSSFNLSATQLNQSNSHNSI

Ac      637  NDSMDDTLMENEDDEFQNYLHELKDIDQVESNELDKYMSEPLLKHSQQFDILSMWRGRVAEYPIETQIARDVBAQVSTV
Hermes  490  DLTSHSKDISTTSFFFPOLTONNSREPPVCPSEDEFYRKEIVILSEDFKVMEMNLNSKNYKSKLALSLSPASSA
Ac: E719

Ac      717  ASESAFSAGQGVDPYRNRQSEIHEALICTKDWVAASRGATYFPTMIGDLEVLDVIAAATNHNHNDEDEDAIEFSK
Hermes  570  ASERTFSLACNIITEKRRRIQOQTWDSLFLNSFYKNFCLDI-----
Hermes: E572

Ac      797  NNEDVASGSSP
Hermes  .....

```

図 1.3 (b)

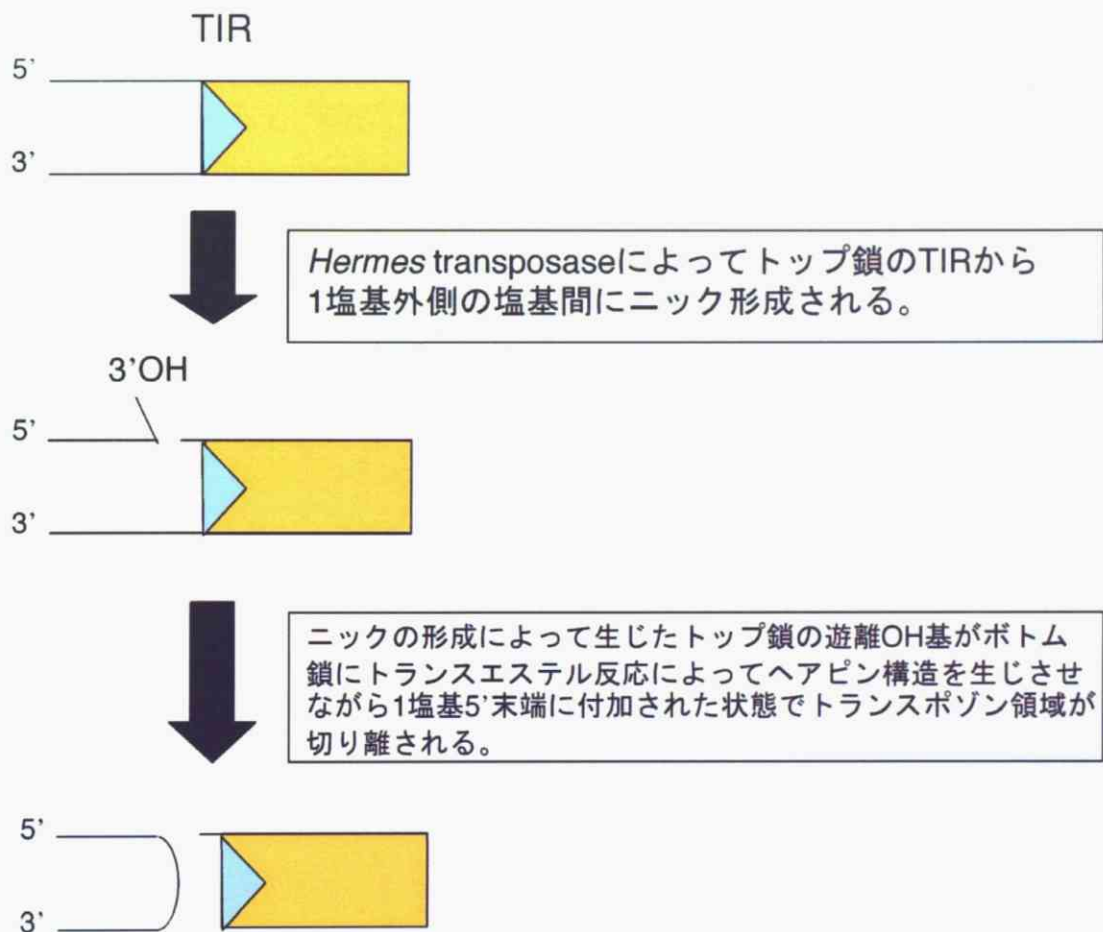


図 1.3 (a) *Ac* transposaseと *Hermes* transposaseのアミノ酸残基アライメントとモチーフ
(b) *Hermes* のトランスポゾン配列切り出し機構

1.3 Activator とジェミニウイルス

ジェミニウイルス科ウイルス（以下、ジェミニウイルス）は 1 本鎖環状 DNA をゲノムとして持つ多様な植物ウイルスであり、ゲノム構造、感染宿主域、媒介昆虫等から、*Mastrevirus*、*Curtovirus*、*Topocuvirus*、*Begomovirus* の 4 つの属に分類さる。すべてのウイルス群のうちで唯一、ウイルス粒子が 2 つの二十面体が結合した特徴的な形態を取っていることから gemini- (双子)と名付けられた。

約 2.5-3.0 kb のゲノム上には、ウイルス鎖 DNA の複製開始点 (ori)となる、全てのジェミニウイルスで保存された 5'-TAATATTAC-3'という配列を含む遺伝子間領域 (intergenic region: IR)といくつかのウイルスタンパク質がコードされている。ori のウイルス鎖に 1 本鎖切断 (ニック)を形成しゲノム DNA のローリングサークル型複製を開始させる replication initiation protein (Rep)、粒子を形成する外被タンパク質であり、ゲノム DNA の核内の輸送に関わると推測される coat protein (CP)、細胞間移行タンパク質である movement protein (MP)、および感染細胞が分裂を終えた G1 期の細胞であっても S 期特異的遺伝子群、DNA 合成に必須な遺伝子群の発現を誘導するタンパク質(Egelkrout *et al.*, 2001)、は全ての属に見られるタンパク質である。

ジェミニウイルスに *Ac* を組み込み、宿主に感染させると *Ac* の転移が起こることが *Mastrevirus* の *Maize streak virus* およびオギ条斑ウイルス (*Miscanthus streak virus*: MiSV)などで確認されている(Laufs *et al.*, 1990, Shen and Hohn 1992)。また *Ds* を組み込んだ場合も *Ac* transposase の trans な供給によって

転移することが知られている。これは *Ac* transposase が、植物ゲノム DNA に組み込まれている *Ac/Ds* と同様に環状 1 本鎖 DNA ゲノムであるジェミニウイルス DNA に組み込まれている *Ac/Ds* をも認識し、転移を誘導することを意味する。この系を利用して、*Ds* 内に薬剤耐性遺伝子を組み込み、変異を導入した transposase を trans に発現させて *Ds* を植物ゲノムに転移させ、薬剤耐性を持った組み換え細胞が生じる頻度を確認することで、transposase の転移に必要なアミノ酸が同定されてきた(Sugimoto *et al.*, 1994)。

1.4 本研究の目的

Ac が属する *hAT* スーパーファミリーは、イエバエの *Hermes* の DNA 切り出し機構の解析によって多くの知見が得られた。その結果、切り出しに関わる *Hermes* transposase の活性中心は *hAT* スーパーファミリー内で保存されている離れた DDE モチーフであった。この保存された DDE モチーフは *Ac* transposase にも存在しているが、現在まで *Ac* transposase の DNA 切り出しに関する詳細な機構と活性中心は明らかになっていない。そこで本研究では *Ac* とその派生物である *Ds* が植物細胞内でジェミニウイルスベクター上から転移することを利用し、新規な *in vivo* での *Ac* transposase 切り出し能解析法を構築し、*Ac* transposase の切り出しに関わる活性を解析することを目的とした。その結果、本研究では、植物細胞で複製し、かつ大腸菌にレスキュー可能なジェミニウイルスシャトルベクターを用い、大腸菌の blue/white selection を可能にする *lacZ* 遺伝子を組み込んだ *Ds* をシャトルベクターに挿入して、イネ培養

細胞に導入し、Ds が切り出されたベクターをレスキューする系を構築した。

そのフットプリントの解析結果も報告する。

この系が確立されれば、従来不明であった Ac transposase の機能の詳細な説明が期待される。

また、Ac transposase の機能を *in vitro* で解析するために Ac transposase の大腸菌での発現・精製を試み、さらに、双子葉植物での Ac transposase の機能を解析するために、新たなジェミニウイルスシャトルベクターの構築の基礎として、beet curly top virus の感染性クローンの構築も行った。

第2章 材料と方法

2.1 ジェミニウイルスシャトルベクター

ジェミニウイルスに由来する植物／大腸菌シャトルベクターとして当研究室が保有する pWI-11 (Ugaki *et al.* 1991)を用いた。pWI-11 は、ジェミニウイルス科 *Mastrevirus* 属の *Wheat dwarf virus* (WDV)に由来する、植物細胞内での複製に必要な配列と、大腸菌プラスミドに由来する大腸菌内での複製に必要な配列を持つ(図 2.1)。WDV はコムギ (*Triticum aestivum*) を自然宿主として単離されたウイルスで、約 2.8 kbp の環状 1 本鎖ゲノムのウイルス鎖に CP、MP、相補鎖に Rep、RepA 各遺伝子を持ち、2 つの遺伝子間領域 LIR、SIR を持つ (図 2.1a)。pWI-11 はこのうち複製に必要な最小限の配列、すなわち Rep、RepA 各遺伝子、LIR、SIR を持ち、さらに大腸菌内プラスミド p15A の複製開始点(origin of replication: ori)とカナマイシン耐性遺伝子(neomycin phosphotransferase II: NPTII)を持つ (図 2.1b)。pWI-11 は単一植物細胞の核内で複製するが、細胞間移行に必要な MP と CP を持たないため、隣接する細胞に移行することはできない。

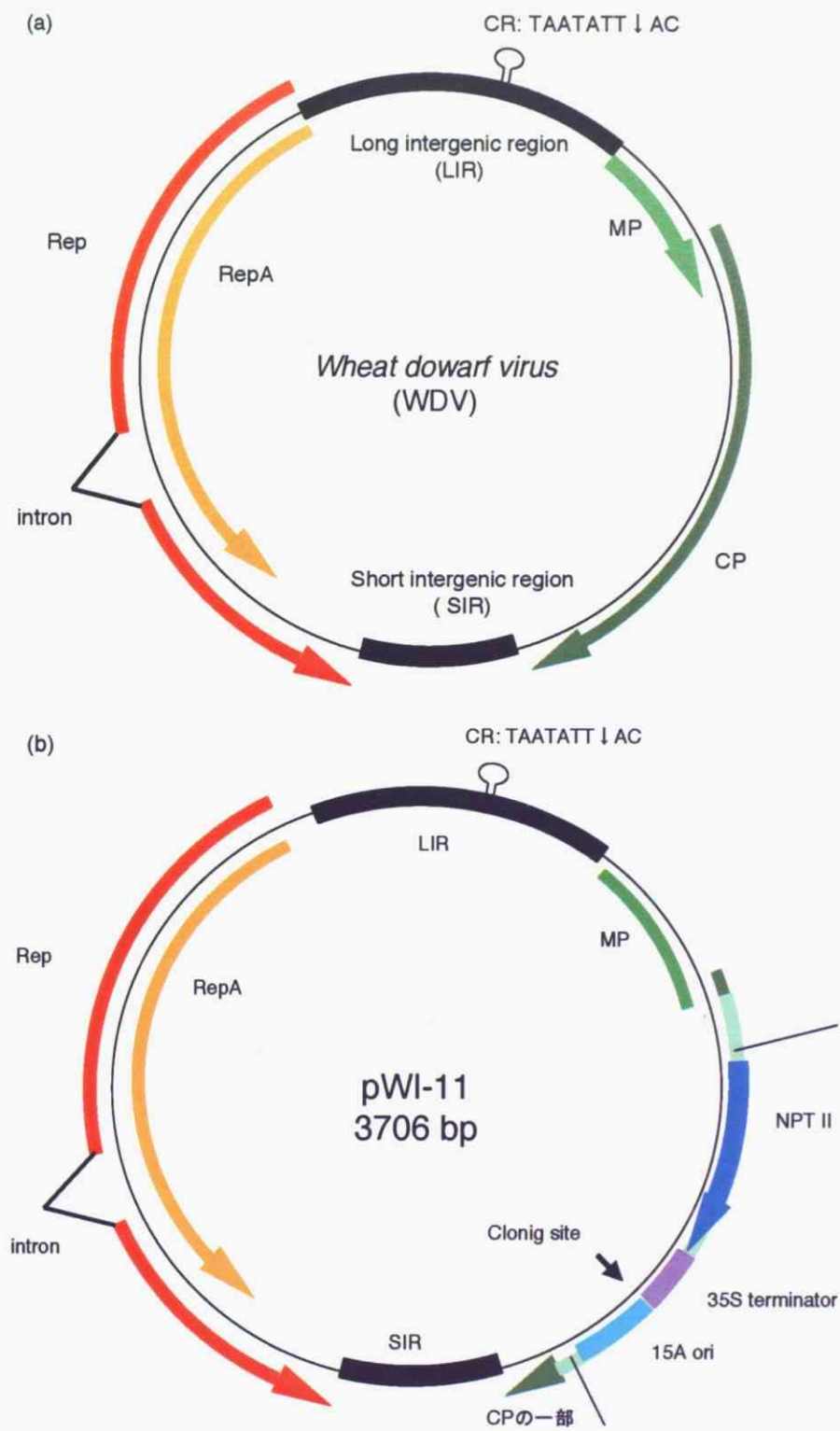


図 2.1 (a) WDVのゲノム構造
(b) pWI-11の構造

2.2 Ac/Ds を導入したジェミニウイルスシャトルベクターの構築

Ac を導入したジェミニウイルスシャトルベクターの構築

全ての分子生物学的手法は特に断らない限り Molecular Cloning (Sambrook *et al.* 1989)に従った。

まず、pWI-11 の NPTII 遺伝子の 35S ターミネータと p15A ori の間のユニークな *Bam*HI サイトを *Kpn*I サイトに変換し、pWI-31 を構築した。構築手順は以下の通りである。pWI-11 を *Bam*HI で切断し、T4 DNA polymerase (Wako NIPPON GENE)で平滑化し、*Kpn*I linker (TAKARA)を Ligation Pack (Wako NIPPON GENE)によりライゲーションし、*Kpn*I で消化し、再度ライゲーションし、産物を *Bam*HI 消化後に大腸菌 DH5 α 株のコンピテントセル 100 μ l と混合し、氷上で 30 分間静置し、42°C、1 分間の熱ショックを与え、10 分間氷上で静置後、SOC 培地 (2% Bacto-tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.05% NaCl および 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂)で 37°C、1 時間前培養を行ったのち LB/Km プレートに塗布して 37°Cで培養した。生えたコロニーを 2×YT/Km 液体培地で 10～16 時間振盪培養(Bio-Shaker BR-300LF (TAITEC))後、DNA 自動分離装置 (KURABO)によりプラスミドを精製した。プラスミドを 50 μ l の 0.1×TE に溶解後、*Bam*HI で消化されず *Kpn*I で消化されるクローンを選んで pWI-31 とした。

Activator (Ac)クローンとして、米国 Rutgers University の Joachim Messing 博士から分譲された pAcK3 を用いた。これは Ac クローンのひとつ Ac9 の

terminal inverted repeats (TIRs)の直上流と直下流に *KpnI* サイトを付加し、pUC118 にクローニングしたものである。pAcK3 の Ac を pWI-31 にクローニングした。pAcK3 を制限酵素 *KpnI* で消化し、アガロースゲル電気泳動によって分離した Ac のバンドを切り出し GENE CLEAN III kit (Qbiogene, Inc)を用いて精製した。pWI-31 を *KpnI* で切断し、calf intestinal alkaline phosphatase (TAKARA)で脱リン酸化した。両 DNA をライゲーションし、大腸菌 DH5 α 株に electroporation 法によって形質転換し、LB/Km プレートに塗布して 37°Cで培養した。生えてきたコロニーを 2 \times YT/Km 液体培地で振盪培養し、プラスミドを精製した。プラスミドを 50 μ l の 0.1 \times TE に溶解後、1 μ l をアガロースゲルで電気泳動し、Ac が挿入されたとと思われる大きさのプラスミドをシーケンスサンプルとした。

これらのサンプルを以下の表 2.1 のプライマーを用いてシーケンスを行った。シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequence Kit v3.0 (Applied Biosystems)を用いて dideoxy 法により行い、検出には ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いた。得られた塩基配列は DNA 解析ソフト DNASIS-Mac ver. 3.7 (日立ソフト開発エンジニアリング)を使用して解析し塩基配列を確認して pWI-32 とした。なお、原因は不明であるが、pWI-32 構築の際、大腸菌への形質転換は electroporation 法でないと、pWI-32 を保持した大腸菌は得られた無かったことを付記する。

表 2.1 シーケンスに用いたプライマーの配列

名前	配列 (5'---3')
pWI-F	AGATAAGGGAATTAGGGTTCCTATA
Ac-F-0	GGGATGATCCCGTTTCGTTACC
Ac-F-01	AGACGCCGCCATCCACGG
Ac-F-02	CAGCACCATTGCACCAAGCTGTT
Ac-F-1	CATATGACGCCTCCGGTTGGAAATAATC
Ac-F-2	GAATGTACGTGCACGTGCG
Ac-F-3	CAAGCGGATTTTCGAAATCACTTGAG
Ac-F-4	GGATATGTGGACATCTTGTCAAATAA
Ac-F-5	GCAGGAACAATTGAGAAAATCAAAGCG
Ac-PacI	GGATTTTATCTATGTTTAATTAAGACTTGTG
pWI-R	TTATCCGGTAACTATCGTCTTGA
Ac-R-0	GAAATCGGACGGGAACCGG
Ac-R-1	CTCGAGTGGAGAGGAGCCACTTGCTACA
Ac-R-2	ATATGATTCTCATGATTTGTTGCAGCAG
Ac-R-3	AGACTCAGAAGCAACAGTTGACACT
Ac-R-4	ACCTAGGGTCAAGGAAGCATGCTA
Ac-R-5	CGGCTTTAGGACAAATTGCATCG
Ac-R-6	GCGGATTTTCGAAATCACTTGAG

Ds を導入したジェミニウイルスシャトルベクターの構築

pAck3 から *Ac* 内部の 4573bp の配列を制限酵素 *SphI* と *NspV* で取り除き、T4 DNA polymerase により平滑末端化し、脱リン酸化した。pUC118 から *lacZ* 遺伝子を含む *HaeII* 断片を単離し、平滑末端化した。両者をゲル精製、ライゲーションの後、大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、100 mM IPTG 50 μ l, 20 mg/ml X-gal 50 μ l を塗布した LB/Km プレートに塗布し、青色コロニーを選択することにより、欠損 *Ac* (以降 *Ds* と呼ぶ)の内部に *lacZ* 遺伝子を持つプラスミド pDslacZ を得た。

pDslacZ から *lacZ* 遺伝子を含む *Ds* を *KpnI* 部分消化で切り出し、*KpnI* サイトで切断後脱リン酸化した pWI-31 に導入することにより、*lacZ* 遺伝子で標識された *Ds* を持つジェミニウイルスシャトルベクター pWI-33 を構築した(図 2.2)。

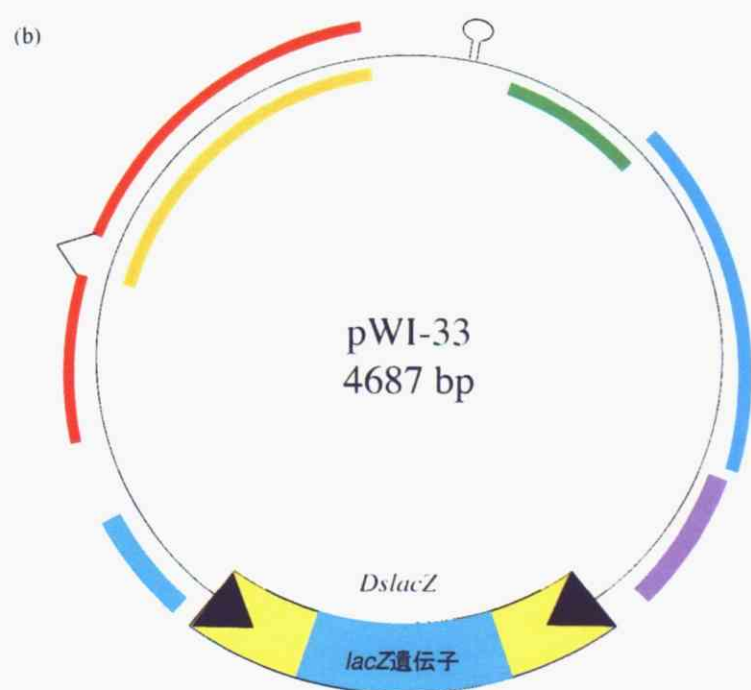
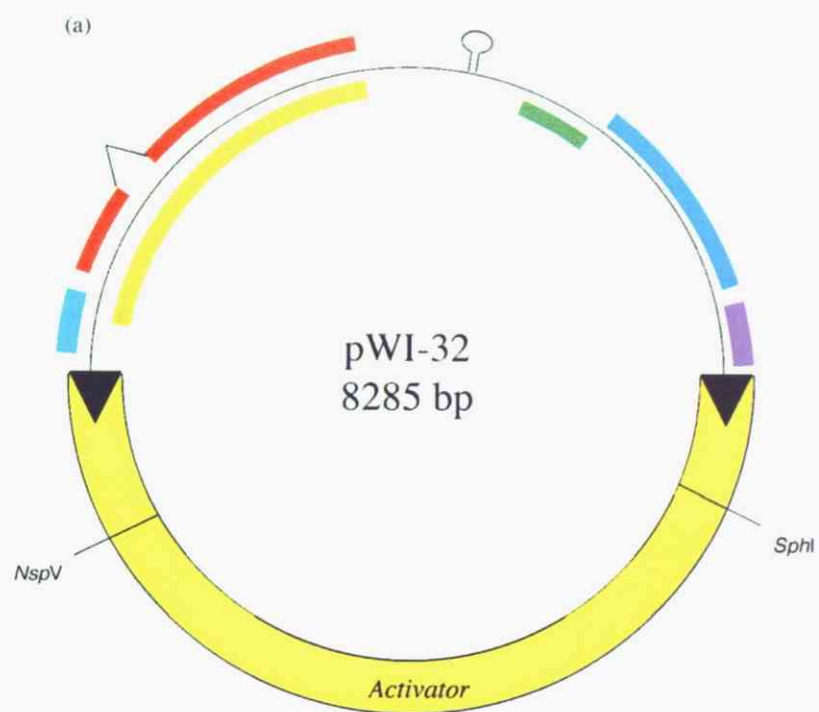


図 2.2 (a) pWI-32の構造
(b) pWI-33の構造

2.3 イネプロトプラスト内での一過的発現ベクターの作製

Ac transposase 発現ベクター構築

イネ (*Oryza sativa*)プロトプラスト内で特定のタンパク質を一過的に過剰発現させるための発現ベクターとして、Timmermans *et al.* (1990)により作製された pFF19G を改変して用いた。pFF19G は、エンハンサー領域を重複した *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)由来の 35S プロモーター、大腸菌の β グルクロニダーゼ (GUS)遺伝子、および CaMV 由来の 35S ターミネーターを pUC19 プラスミドに導入したものである。pFF19G を *SphI* で消化後 T4 DNA polymerase で平滑化し、さらに *Bam*H で消化して GUS 遺伝子を除いた。pAcK3 を *KpnI* で消化後平滑化し、さらに *Bam*HI で消化して Ac transposase のコーディング領域を含む 4383 bp 断片を切り出した。この両者をライゲーションすることで、イネプロトプラスト内で Ac transposase を一過的に高発現するベクターpFF-Ac を構築した(図 2.3)。

Ac transposase 変異体発現ベクターの構築

pFF-Ac をもとに、Ac transposase 遺伝子に変異を導入したプラスミドを作製した。

Ac transposase の 1 から 103 アミノ残基を欠失させた欠失変異体は、Ds を転移させる活性が上昇するという報告がある(Houba-Herlin *et al.* 1990)ことから、

そのような変異体を構築した。Ac transposase の 104 番目のアミノ酸残基以降を表 2.2 に表記したプライマーAcEnhance F と表 2.1 のプライマーAcR4 を用いて pAcK3 から PCR (polymerase chain reaction)増幅した。

表 2.2

名前	配列 (5' ----- 3')
AcEnhance_F	ATGGCTATTGTTTCATGAACCACAACC
D300_F	AGTACAACCTATGGcTATGTGGACATCT
D300_R	AGATGTCCACATAcCATAGTTGTACT
D366_F	GCCTTGTCTTTGGcTAATGCTAGTG
D366_R	CACTAGCATTcGCCAAAGACAAGGC
E719_F	CTGTTGCTTCTGcGTCTGCGTT
E719_R	AACGCAGACgCAGAAGCAACAG

小文字は、変異導入する塩基を示す。

PCR 反応液の組成を以下に記す。

pAcK3 DNA	1 μ l (100ng)
PrimerAcEnhance F (20 μ M)	1 μ l
PrimerAcR4 (20 μ M)	1 μ l
10 \times Pyrobest buffer (TAKARA)	5 μ l
2.5 mM each dNTP	5 μ l

Pyrobest DNA polymerase (TAKARA)

1 μ l

final volume to 50 μ l with dH₂O

サーマルサイクラー (Applied Biosystems Model 2700)による PCR 条件を以下に記す。

94°C 5 分・・・1cycle

94°C 30 秒→55°C 30 秒→72°C 2 分・・・30cycles

68°C 7 分・・・1cycle

4°C ∞

反応後、PCR 増幅産物をフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行ったのち *Bsp*T104I で消化し、アガロースゲル電気泳動によって目的のバンドを切り出し GENE CLEAN III kit を用いて精製した。この DNA 断片を *Sma*I と *Bsp*T104I で消化し、ゲル精製を行った pFF-Ac に導入することにより、pFF-En を構築した。Ac transposase 部分の塩基配列をシーケンスして確認した。

Ac transposase の第 300 番アミノ残基のアスパラギン酸、第 366 番アミノ残基のアスパラギン酸、および第 719 番アミノ残基のグルタミン酸、をそれぞれアラニンに点変異させるためのプライマー (表 2.2)を合成し、Pyrobest DNA polymerase を用いて recombinant PCR を行い、PCR 産物を pFF-Ac の対応する領域と制限酵素サイトを利用して組み換えることによって pFF-D300A、

pFF-D366A、pFF-E719A を構築した (図 2.3)。第 1 PCR では pFF-Ac を鋳型 DNA としプライマーはそれぞれ、pFF-D300A では AcF2 と D300AR 及び D300AF と AcR0 で、pFF-D366A では AcF2 と D366AR 及び D366AF と AcR0 で、pFF-E719A では AcF2 と E719AR 及び E719AF と AcR0 で反応を行った。PCR 産物をゲル精製した後、2 つの PCR 産物 (pFF-D300A では AcF2-D300AR の PCR 産物と D300AF-AcR0 の PCR 産物、pFF-D366A では AcF2-D366AR の PCR 産物と D366AF-AcR0 の PCR 産物、pFF-E719A では AcF2-E719AR の PCR 産物と E719AF-AcR0 の PCR 産物)を それぞれ鋳型 DNA とし、AcF2 と AcR0 で Pyrobest DNA polymerase によって第 2 PCR 増幅させた。この PCR 産物を D300A と D366A では制限酵素 *Bsp104I* と *BsrGI* で、E719A では制限酵素 *BsrGI* と *PacI* で消化してゲル精製したのちに、同じ 2 つの制限酵素で消化、精製した pFF-Ac に組み換えた。構築したコンストラクトはシーケンスして点変異を導入した箇所に変異が導入されていることと、それ以外に変異が無いことを確認した。

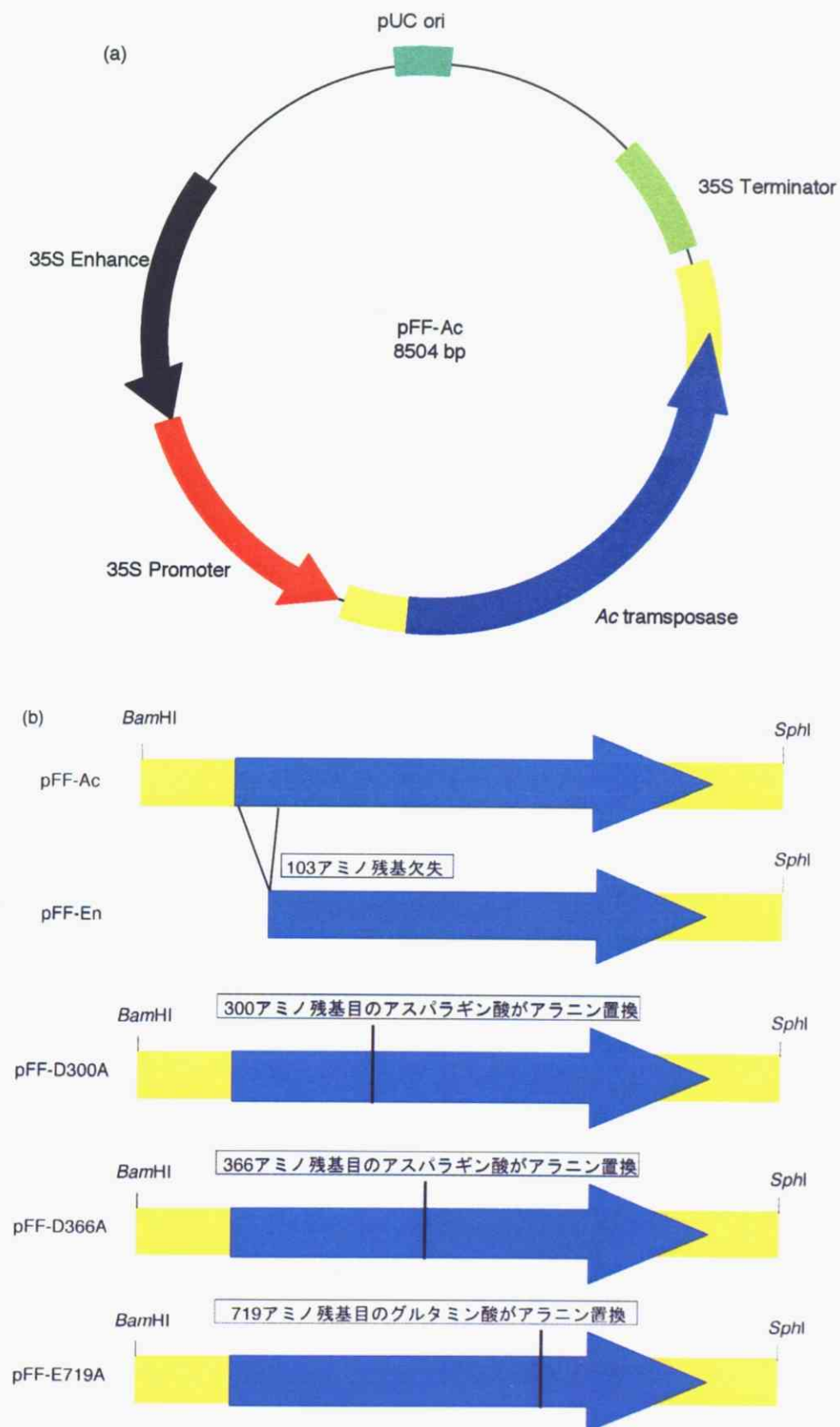


図 2.3 (a) pFF-Acの構造
(b) pFF-Ac変異体

2.4 ジェミニウイルスシャトルベクターのイネプロトプラストへの導入

イネ培養細胞

供試イネ (*Oryza sativa*)培養細胞として、独立行政法人農業生物資源研究所・南栄一博士から分譲していただいた、日本晴の完熟種子胚からオーキシンによって誘導されたカルスに由来する培養細胞を用いた (Otsuki 1990)。イネ培養細胞は、N6D 液体培地で 1 週間ごとに全体の 2 %の細胞を新しい培地に植え継いで維持した。培養の過程で、細胞塊が徐々に大きくなるので、2 週間に一回 1.0 mm の金属製篩にかけ細胞塊の大きさを小さく保った。

N6D 培地は、下記のストック溶液を作製し、そこから希釈した。

〈N6D stock solution〉

50x Macro	g/L	100x Ca	g/L
KNO ₃	141.5	CaCl ₂ ·2H ₂ O	16.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	23.2		
KH ₂ PO ₄	20.0		
100x Mg	g/L	100x Fe-EDTA	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	18.5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78
		Na ₂ EDTA	3.73

1000x Micro	g/L	1000x Vitamin	g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	glycine	2.0
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	nicotinic acid	0.5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	pyridoxine HCl	0.5
KI	0.80	thiamine HCl	1.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.50		
H ₃ BO ₃	1.60	1000x 2,4-D	g/L
MnSO ₄ ·7H ₂ O	4.40	2,4-D	3.0

以上のストック溶液をもとに、sucrose 30 g, myo-inositol 0.1 g, casamino acid 0.3 g, proline 2.88 g, 50 × macro 20 ml, 100xCa 10 ml, 100xMg 10 ml, 1000xMicro 1 ml, 100xFe-EDTA 10 ml, 1000x vitamins 1 ml 1000x 2,4-D 1 ml を超純水に溶かし、1M NaOH で pH 5.8 にしたのち超純水で 1L にして、オートクレーブで滅菌して、N6D 培地とした。

イネ培養細胞のプロトプラスト化

イネ培養細胞のプロトプラスト化は Otsuki (1990) の手法を改変した以下の手法を用いた。植え継ぎ 3 日目に培養細胞を 50 ml 滅菌ファルコンチューブに滅菌済み駒込ピペットで移し、細胞塊を沈殿させ、培地を取り除いた後に、5 ml の Cell wall lysis buffer (0.05 % Pectolyase Y-23, Cellulase Onozuka RS 2 %, CaCl₂·2H₂O 0.01 %, K-dextran sulfate 0.1 %, Mannitol 0.36 M, pH 5.6) に静かに

懸濁し、再び遠心することで一度洗浄した。次に Cell wall lysis buffer の 25 ml を細胞に加えてシャーレに移しパラフィルムでシールし、30℃、50 rpm で 4 時間振盪した。細胞を 30 μ m の滅菌済みナイロンメッシュ (PP-30N 共進理工) で濾過したのち 20 ml の氷上で冷やした Electroporation buffer (0.5 mM MES, 70 mM KCl, CaCl_2 , 0.36 M Mannitol) で一度洗浄した。血球計算盤を用いて細胞数を算定し、プロトプラスト濃度を Electroporation buffer 中 2×10^6 個/ml に調整した。

イネプロトプラストへの DNA 導入

導入する DNA 10 μ g と carrier DNA として 10 μ g の sonicated salmon sperm DNA をチューブ内で混ぜ、プロトプラスト懸濁液 500 μ l (細胞 1×10^6 個) を加え、氷上で冷やした電極間隔 0.4 cm のキュベットに移して Gene Pulser II (BIO-RAD) を用いて、電気容量 250 μ F、電圧 0.25 kV、抵抗値 200 Ω の条件でエレクトロポレーションを行った。プロトプラストを氷上に 30 分間静置した後、4℃、800 rpm、5 分間で遠心収集し、上清を吸引除去、5 ml のプロトプラスト培養液 (0.36 M Mannitol 入り N6D 培地) で 1 回洗浄し、10 ml のプロトプラスト培養液に懸濁して 30℃ のインキュベータ中で静置培養した。

2.5. プロトプラスト内でのジェミニウイルスシャトルベクターの複製の解析

イネプロトプラスト内での GUS 遺伝子発現の発色基質による検出

イネプロトプラストへのジェミニウイルスシャトルベクターの導入に検討した条件により、ベクターがプロトプラストの核内に導入されているか(感染率)を測定するため、 β -glucuronidase (GUS)遺伝子を持つジェミニウイルスシャトルベクター pWI-GUS (Ugaki *et al.* 1991)をプロトプラストに導入し、発色基質 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc)を用いて、発現した GUS の活性を Steffen *et al.* (1994)の手法を改変して検出した。イネプロトプラスト 1 ml を 2 日間静置培養した後に 4°C、800 rpm、5 分間で遠心収集し上清を吸引除去した。細胞に GUS 染色 buffer (0.36M mannitol, 10mM EDTA, 0.5mM K-ferricyanide, 0.5mM K-ferrocyanide, 2mM X-Gluc, N6D 培地)を加えて再び 30°C のインキュベータ中で静置培養した。2 日後にプロトプラストをスライドグラスに取り、顕微鏡 (OLYMPUS BX-60)で白色光により観察した。

イネプロトプラスト内での GUS 遺伝子発現の蛍光基質による定量

イネプロトプラスト内でのジェミニウイルスシャトルベクターの複製および遺伝子の発現量を検出するため、pWI-GUS、pFF-Ac、pWI-GUS-Repmutant をプロトプラストに導入し、一定時間後に GUS 遺伝子の発現を、蛍光基質 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)を用い、Kosugi *et al.* (1990) の方法

に準じて測定した。pWI-GUS-Repmutant は Rep 遺伝子内の制限酵素 *Nde*I と *Hind*III で消化、平滑末端化後にアガロースゲルから 3168 bp のバンドを切り出し精製し、セルフライゲーションして作製した。DNA をエレクトロポレーションしたイネプロトプラストを 4 °C, 800 rpm, 5 分間で遠心収集し、上清を吸引除去し、液体窒素で瞬間凍結した。凍結したプロトプラストに対して 150 μ l の GUS lysis buffer (50 mM Na phosphate buffer, 10 mM EDTA pH 7.0, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 0.1 % (w/v) Sarkosyl, 2 mM beta-mercaptoethanol)を加えた後、超音波破碎機(GE-100 sonicator) を用いて氷冷しながら超音波破碎した。破碎後 15 000rpm, 4 °C, 10 分間遠心分離し、上清 50 μ l を新しいチューブに移し、70 μ l の GUS lysis buffer、40 μ l の 5 mM MUG、40 μ l のメタノールを加え 37 °C でインキュベートした。10 分後と 30 分後、にそれぞれ 1 ml の 0.2 M Na₂CO₃を加えて反応を止めたのち反応開始 10 分後と 30 分後の 4-MU 量の差を蛍光分光光度計 (Hitachi F-2500)を用いて、励起波長を 365 nm、蛍光波長を 455 nm で測定した。

2.6 イネプロトプラスト内での *Ac/Ds* 切り出しの解析

イネプロトプラストからの DNA 抽出

イネプロトプラストからの DNA 抽出は、イネプロトプラストを 4°C, 800 rpm, 5 分間で遠心収集し上清を吸引除去し、Rice PP wash buffer (10 mM CaCl₂, 0.2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 1 mM KNO₃, 0.65 M mannitol) 500 µl で 2 回洗浄した後、液体窒素で瞬間凍結した。340 µl の Extraction buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH 8.0), 500 mM NaCl, 10 mM beta--mercaptoethanol) を加え、プラスチック状のホモジナイザーで細胞を潰し、49 µl の 10% SDS を加え、激しく攪拌した後に 65 °C, 10 分間インキュベートした。340 µl の 5M 酢酸カリウムを加えて激しく攪拌し氷上で 20 分間冷却した後 15 000 rpm、4 °C、20 min 遠心分離した。その上清に対してイソプロパノール沈殿を行い、沈殿を 10 µl の TE buffer (pH 8.0)に溶かした。

Polymerase chain reaction (PCR)による切り出し解析

Ac あるいは *DslacZ* をクローニングしたジェミニウイルスシャトルベクターから、イネプロトプラスト内で *Ac/DslacZ* の切り出しが起きたかを確認するため、*Ac/lacZ* の両外側のベクター配列、および *Ac* 内部のプライマーを用いて PCR によって確認した。プライマーは以下の表 2.1 の pWI-F, pWI-R, Ac-PacI を用い、PCR 反応液の組成は以下の通りであった。

<PCR 反応>

template DNA	1 μ l (100 ng)
Forward primer (pWI-F; 20 μ M)	0.5 μ l
Reverse primer (pWi-R または AcR6; 20 μ M)	0.2 μ l
10 \times PCR buffer	2 μ l
2.5 mM each dNTP	2 μ l
rTaq DNA polymerase	0.3 μ l
final volume to 50 μ l with dH ₂ O	

上記を混合して以下のような cycle で反応させた。

94°C 5 分間 $\cdot \cdot$ 1cycle

94°C 30 秒間 \rightarrow 55°C 30 秒間 \rightarrow 72°C 30 秒または 2 分間 $\cdot \cdot$ 25cycles

68°C 7 分間 $\cdot \cdot$ 1cycle

4°C ∞

PCR 反応後は、アガロースゲル電気泳動で増幅産物を検出し、その長さから切り出しの有無を確認した。

2.7 イネプロトプラストから大腸菌へのプラスミドレスキュー

大腸菌 DH5 α 株(遺伝子型 F⁻, ϕ 80 *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *rec1*, *endA1*, *hsdR17*(*r_K*⁻, *m_K*⁺), *hoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyr96*, *relA1*)および

DH10B 株(遺伝子型 F-, ϕ 80 *lacZ*ΔM15, *deoR* *rec1*, *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)*D lacX74*, *araD139*, Δ(*ara leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA*, *nupG*, λ)を用いて electroporation 用のコンピテントセルを作製した。大腸菌を LB 培地 4 ml で 37°C, 12 時間前培養し、400 ml の SOB に前培養液を全量入れ 37°C で O.D.₆₀₀=0.6 に成るまで培養する。培養液が終了したら、氷上に 15 分間置いた後、菌体を 4000rpm, 4°C, 10 分間遠心分離して集菌した。上清を取り除いた後 200ml の 4°C 滅菌水で懸濁した後 4000rpm, 4°C, 10 分間遠心分離して集菌し上清を取り除くことで菌体を洗浄した。その後、菌体を 4°C 滅菌水 100 ml, 8 ml で 2 回洗浄した。計 3 回 4°C 滅菌蒸留水で洗浄したペレット状の菌体に対して、4°C 滅菌蒸留水 2.4 ml、50% グリセロール溶液 0.63 ml 加え緩やかに懸濁したのち 40 μ l ずつに分注し、-80°C で凍結保存した。

プラスミドレスキュー

エレクトロポレーションによってジェミニウイルスベクターを導入したイネのプロトプラストから、全 DNA を 2 日後に抽出した。DH10B への形質転換はエレクトロポレーションによりおこない、pWI-33 とそこから *Ds lacZ* が切り出して抜けた空の pWI ベクターを見分けるために X-Gal と IPTG が入った LB/Km 選択培地プレートに塗布して blue-white selection を行った(図 2.4)。

フットプリントの解析

プラスミドレスキューから blue-white selection によって得られる白色コロニーは pWI-33 から *DslacZ* が切り出されたものであると考えられるので、そこからプラスミドを抽出してシーケンスを行い *Ac/Ds* 切り出しの際に生じるフットプリントの解析を行った。白色コロニーを 2×YT/Km 液体培地で 10~16 時間浸透培養したのち、DNA 自動分離装置 (KURABO) によりミニプレップを行い、プラスミドを精製しシーケンス解析を行った。

2.8 *Ac* transposase の大腸菌での発現

Ac transposase とその変異体の作製

Ac transposase の *in vitro* での機能を解析するために *Ac* transposase の cDNA の構築をした。*Ac* transposase には 5 つのエクソンがあるため、組み換え PCR によって *Ac* transposase の全長 cDNA クローンを得た。組み換え PCR には以下の表 2.3 に示すプライマーを用い、Pyrobest DNA polymerase によって増幅した。

表 2.3

Ac-F-11	ATGACGCCTCCGGTTGGAAATAATC
Ac-R-11	ATCGTCGACTGGAGAGGAGCCACTTGCTACA
Ac-Re-F1	TCCGTATTCTCTGCATATGCTCAAGGGTTGAAAAGAA
Ac-Re-R1	AGAGGCTTCAGCTTTTCTTTTCAACCctTGAGCATATGCA
Ac-Re-F2	GGCTTAAAACAAGTGATCCTCGCagGTACGATGCA
Ac-Re-R2	TCGGCTTTAGGACAAATTGCATCGTACctGCGAGGATCA
Ac-Re-F3	AGATTGGGTAGCAGCATCTAGAAAagGTGCTACATAT
Ac-Re-R3	CCAATCATTGTTGGAAAATATGTAGCACctTTTCTAGATGCTGC
Ac-Re-F4	GCAACAAATCATGAGAATCATATGGATGagGATGAAGACGCAA
Ac-Re-R4	TATTCTTAGAAAATTCTATTGCGTCTTCATCctCATCCATATGAT

組み換え PCR によって得られた *Ac* mRNA cDNA クローンは R11 のプライマー上に設計した *Sal*I サイトで消化し、制限酵素 *Nde*I (T4 DNA polymerase で平滑末端化), *Xho*I で消化した pET30a にクローニングした後シーケンスによって PCR に由来する変異が導入されていないことを確認して *Ac* transposase 発現ベクター pET-AcTPase を構築した。また pET-AcTPase をもとに 1-103 アミノ酸残基が欠失して切り出し能を活性化する変異体を表 2.1 の AcEnhanceF と Ac-R-11 で増幅させ、pET-AcEnhance を構築した。さらに表 2.2 の点変異を誘導するプライマーを用いて pET-AcD300A, pET-AcD366A, pET-AcE719A を構築した。

それぞれの発現ベクターを大腸菌 BL21 codon plus コンピテントセルに形質

転換し LB/ kanamycin 寒天培地に接種し、37°Cで一晩静置してコロニーを得た。

発現誘導

pET-AcTPase とその変異体の形質転換体を、それぞれ LB/ kanamycin 液体培地 5 ml に接種し、37°Cで一晩振盪培養した。得られた培養液をそれぞれ 500 ml の LB/ kanamycin 液体培地に加え、37°Cで振盪培養した。O.D.₆₀₀=0.5 になるまで培養した後、IPTG を終濃度 1 mM になるように加え、タンパク質発現を誘導した。誘導後の温度条件を幾つか設定して 3 時間培養し、培養液を回収した。

SDS-PAGE

ミニスラブゲル作製 kit (ATTO)を使用してゲルを作製した。まず組み立てたゲル板に running ゲル (12% acrylamide stock, 373 mM Tris-HCl (pH 8.8) , 0.1% SDS) を流し入れ、1-水飽和ブタノールを上にも重層して 20 分間室温に静置した。ゲルが固まったことを確認した後、超純水にて水飽和ブタノールを洗い流し Stacking ゲル (4.5 % acrylamide stock, 124 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 0.1% SDS) を流してコームを差し固めた。なお、ゲルの作製に使用したポリアクリルアミドは、30% acrylamide stock (0.8% (w/v) *N,N'*-methylenebisacrylamide, 29.2% (w/v) acrylamide monomer) を使用した。いずれのゲルも、ゲル調製液を脱気した後に終濃度がそれぞれ 0.1%(w/v)となるように APS および TEMED を加えてアクリルアミドのラジカル重合を開始させた後にゲル板に流した。

stacking ゲルが固まったことを確認、ゲルのウェルを洗浄した後、ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO) にゲルを設置した。

ゲル 1 レーンあたり 20 μ l のサンプルをロードした。電気泳動は、約 15-20 V/cm となるよう 25 mA/ゲルの固定電圧で 65-90 分行った。泳動時間の目安として、BPB (bromophenol blue) がゲルの陽極端に来る程度までとした。泳動 buffer として 25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.1% SDS を、分子マーカーとして、Unstained SDS-PAGE Standards (BIO-RAD) を用いた。

Ac transposase とその変異タンパク質の精製

IPTG により発現誘導した大腸菌形質転換体の集菌ペレットを、集菌前の培養液の 10 分の 1 倍容量の binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9, 5 mM imidazole) で懸濁し、氷冷しながら超音波破碎した。破碎した後、遠心 (12,000 \times g, 4°Cで 15 min) し、上清を可溶性画分 (上清) とした。沈殿を Denature binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9, 5 mM imidazole, 6M Urea) 5 ml に懸濁し、氷上に 1 時間放置した。15 ml 容のカラム (Novagen) に、50%スラリーの His-tag bind resin (Novagen) を 2 ml 入れ、カラムを作製した。樹脂を樹脂容量 (1 ml) の 3 倍量 (3 ml) の滅菌水で洗浄した。樹脂容量の 5 倍量の charge buffer (50 mM NiSO₄) をカラムにアプライし、樹脂にニッケルイオンを結合させた後、樹脂容量の 3 倍量の binding buffer をアプライしてカラムを平衡化した。平衡化したカラムに、調製済の可溶性画分のタンパク質溶液をアプライした。樹脂容量の 10 倍量の denature

binding buffer をアプライした後、樹脂容量の 6 倍量の denature wash buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9, 60 mM imidazole, 6M Urea) をアプライしてカラムを洗浄した。樹脂容量の 6 倍量の denature elute buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.9, 1M imidazole, 6M Urea) をアプライして His-tag が付加されたタンパク質を溶出した。SDS-PAGE により、溶出された画分における Ac transposase 及びその変異体の精製度を確認した。

2.9 *Beet curly top virus* (BCTV)感染系の構築

供試 BCTV

ジェミニウイルス科 Curtovirus 属のタイプ種である *Beet curly top virus* (BCTV)は、米国 United States Department of Agriculture, Agricultural Research Group の J.E. Duffus 博士から American Type Culture Collection (ATCC)を介して分譲していただいた(Stenger, *et al.*, 1990)。BCTV は自然宿主としてテンサイ (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*)に感染し、テンサイの他にも多様な双子葉植物に感染することが知られている。ゲノム構造としては、相補鎖に IR にニックを形成することで複製に関わる C1 タンパク質(Rep)、ウイルス鎖遺伝子の転写活性化に関わる C2 タンパク質、宿主細胞の DNA 合成活性を高めゲノム DNA の複製を活性化する C3 タンパク質(replication enhancer: REn)、病徴決定因子である C4 タンパク質がコードされている。またウイルス鎖には細胞間移

行に必須な movement protein (MP)、外被タンパク質である coat protein (CP)、さらに機能未知な V2 がコードされている(図 2.4)。Rep と MP の中間(上流)に、複製開始点を含む遺伝子間領域 (intergenic region: IR)がある。

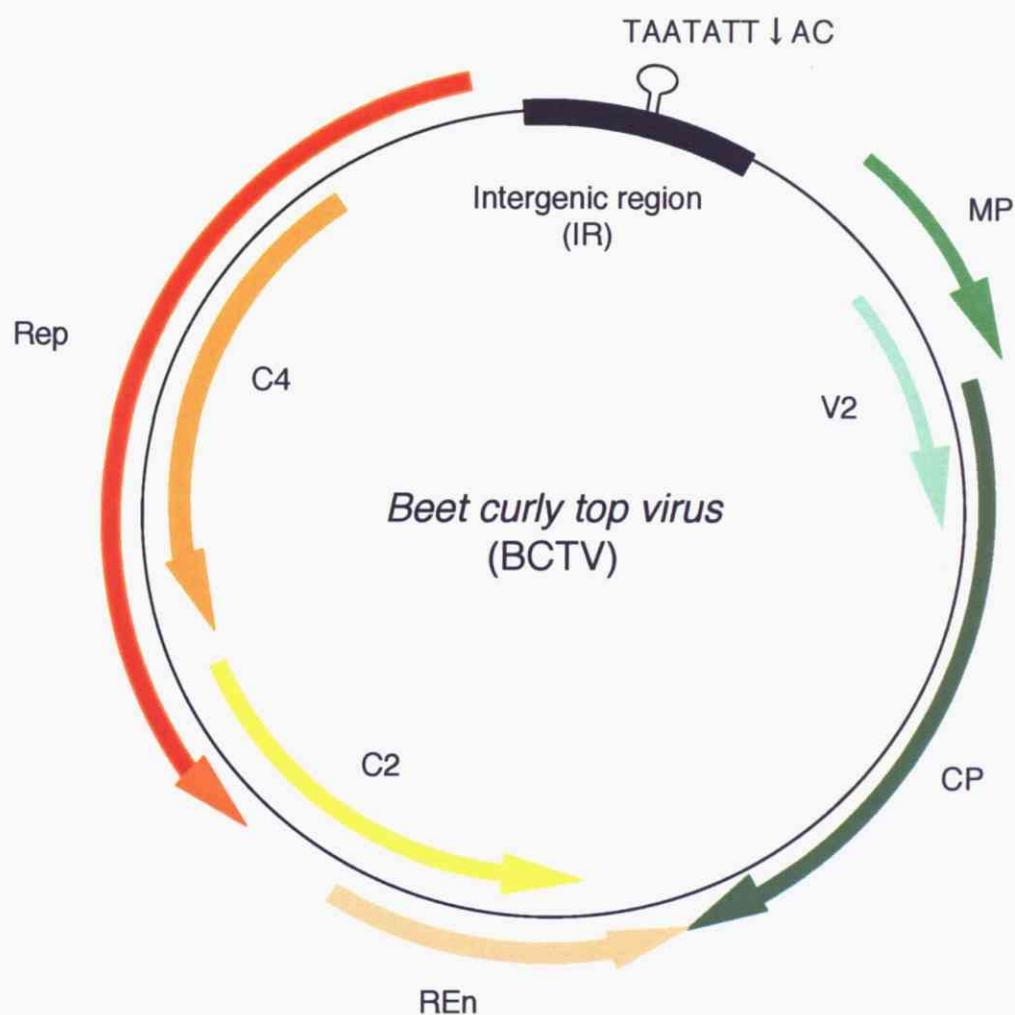


図 2.4 *Beet curly top virus*のゲノム構造

感染葉からの DNA 抽出

ウイルス感染葉から CTAB 法により DNA を抽出した。乳鉢と乳棒を用いて感染葉 0.01g を液体窒素中で磨砕し、900 μ l の CTAB buffer (NaCl 1.4M, PVP (Polybiny-Pyrrolidone, Av.M.W10,000) 1%, CTAB (Hexadecyl-trimethyl-ammonium Bromide) 2%, Tris-HCl (pH 8.0) 0.1M, EDTA (pH 8.0) 20mM) と 2 μ l の 2-メルカプトエタノールを加え、さらに磨砕後 65°C, 30 分間インキュベートした。15,000 rpm, 5 室温で遠心した後上清を等量のクロロホルム/イソアミルアルコール抽出、イソプロパノール沈殿をしてタンパク質を除去した。イソプロパノール沈殿によって生じた沈殿に対して 400 μ l の TE に溶かし RNase 処理、フェノール抽出、エタノール沈殿を行って RNA を除去して 50 μ l の TE に溶かして DNA サンプルとした。

クローニング

感染葉から抽出した DNA サンプルを PCR によって増幅した。用いた primer はゲノム DNA に 1 箇所しかない制限酵素サイトを調べて合成した。これらのうち、IR 以外の部分に位置する *Eco*RI を選んだ。2 つのプライマーの配列内には *Eco*RI 認識配列およびその 5'末端側には 5 塩基を付加した。これらのプライマーを用いた PCR によりその場所から両側に伸び、ゲノム DNA 全長が増幅されることが予想された。なお、 T_m 値は Current Protocols in Molecular Biology に準拠した式で計算し、約 58°C となるようにした (BCTV-F, BCTV-R)。

BCTV-F: 5'- agtcaGAATTCcataccggtggacttg -3'

BCTV-R: 5'- agtcaGAATTCgtcgcttgttgcagcg -3'

(大文字が *EcoRI* 部位)

この様にして設計したクローニング用プライマーと KOD Plus DNA polymerase (TOYOBO) を用いてサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems) で PCR を行い BCTV の全長を得た。PCR の反応液組成と PCR の反応条件は以下の通りである。

〈PCR 反応液〉

10xBuffer	2.5 μ l
25 mM MgSO ₄	1 μ l
2.5mM dNTP	2.5 μ l
primer-F(5 μ M)	0.75 μ l
primer-R(5 μ M)	0.75 μ l
total DNA	1 μ l
KOD-Plus	1 μ l
DW	15.5 μ l
合計	25 μ l

《反応条件》

94°C 2min

94°C 15 sec ▾
55°C 30 sec | 35 cycles
68°C 3 min ▾
72°C 4min
4°C

PCR 産物を *EcoRI* で処理し、予め脱リン酸化処理を行ったベクター *pUC18* の *EcoRI* サイトにクローニングした。得られたクローンのシーケンスを行い、PCR による変異が最も少ないものを選び *pUC-BCTV* として以下の実験に用いた。シーケンスには BCTV-F と BCTV-R および T7 プライマー-SP6 プライマーと BCTV-s1 (5'- TTATA CTATT ATATC TATAA GGCC -3'), BCTV-s2 (5'- TTCTC CTTCA CGTCT TCATAC -3')を用いて行った。

1.5 コピー感染性クローンの構築

pUC18 にクローニングされた BCTV 全長（1 コピー）を用いて、以下の手順により IR を 2 つ持つ 1.5 コピーのクローンを作製した(図 2.5)。 *pUC--BCTV* を *EcoRI* および *NsiI* で処理(1)と *EcoRI* および *SpeI* で処理(2)した 2 つを用意してこれらをゲル精製し、1 で得られた 2.2 kbp の断片と 2 で得られた 2.6 kbp の断片を *NsiI*, *SpeI* で処理したベクター *pSL1180* に導入した(*pSL-BCTV1.5*)。 *pSL-BCTV1.5* を *XbaI*, *HindIII* で処理し、バイナリーベクター *pCAMBIA2300* に導入し感染性クローン *pCAMBIA-BCTV1.5* を作製した。

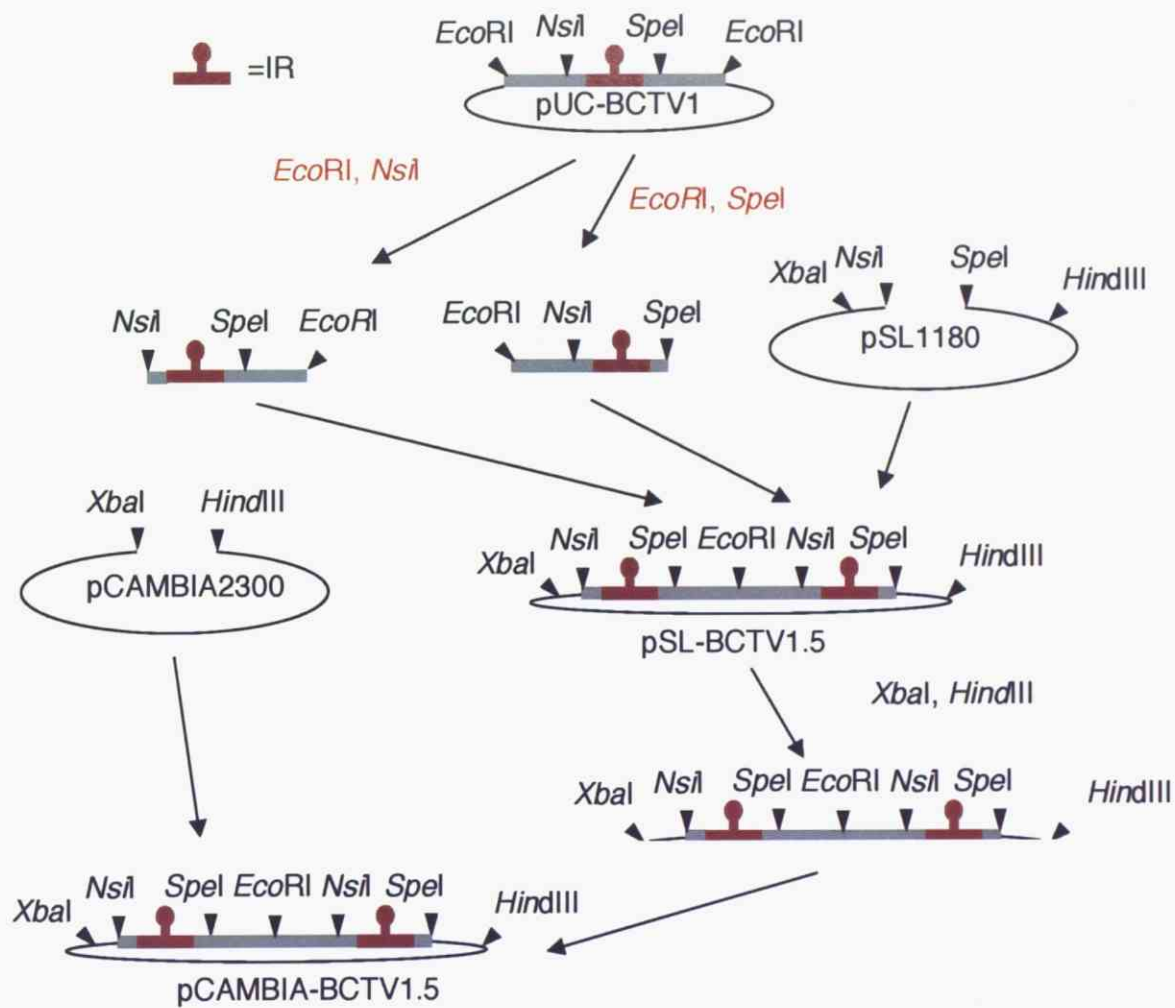


図2.5 BCTV 1.5コピー感染性クローンの作製法

アグロバクテリウムへの形質転換

アグロバクテリウム (根頭癌腫病菌: *Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 株は米国 ProliGen 社の Elizabeth Hood 博士より分与していただいた。EHA105 を LB/Cm プレートでシングルコロニーを作り、そこから 2×YT/Cm 液体培地で $O.D._{600}=0.5$ になるまで培養した。次いで氷上に 10 分間清置した後遠心管に移して 3000 rpm で 5 分間遠心分離をして集菌した。上清を取り除き、5 ml の 20 mM $CaCl_2$ で一度洗浄した後 500 μ l の 20mM $CaCl_2$ で懸濁して 100 μ l ずつ分注して -80 °C で保存した。

作製したコンピテントセルを用いて pCAMBIA-TYDV1.5 を形質転換した。形質転換は、コンピテントセルを氷上で溶かしそこへ約 500 ng の pCAMBIA2300-TYDV1.5 を加え液体窒素に 1 分間つけて凍結させ、その後 SOC を加えて 28 °C、3 時間浸透培養した後 LB/Km 培地に塗布して 28 °C、二日間培養した。

接種植物

接種植物はシロイヌナズナのエコタイプ、コロンビア(Col-0)を用いた。シロイヌナズナはチャンバー内で 23 °C、一日明期 12 時間暗期 12 時間で、ロゼット葉が大きく育つ条件で育てた。アグロバクテリウムで接種を行うシロイヌナズナは主茎が 2~3 cm に伸びるまで育て接種に用いた。

アグロインフィルトレーション

pCAMBI-BCTV1.5 を形質転換したアグロバクテリウムをシロイヌナズナに感染させる方法としてアグロインフィルトレーション法を用いた。シングルコロニーから 5 ml の 2×YT 培地で 28°C で振盪培養した。O.D.₆₀₀=0.6 になるまで培養した後集菌し、上清を捨てて O.D.₆₀₀=0.5 になるように agro-infiltration buffer で懸濁し、常温暗所でインキュベートした。2~6 時間インキュベートしたのち 1 ml の注射器をもちいてシロイヌナズナのロゼット葉の裏に懸濁液が葉全体に行き渡るようにしみ込ませた。このとき 2~3 cm 伸びたシロイヌナズナの主茎をはさみ等で必ず切った。

BCTV ウイルス DNA 蓄積の確認

BCTV をアグロインフィルトレーションさせた後、病徴が生じたシロイヌナズナから DNA を CTAB 法によって抽出し、BCTV-F, BCTV-R を用いて PCR を行って BCTV DNA が蓄積しているかを確認した。

第3章 結果

3.1 イネプロトプラスト核内への DNA 導入と pWI ベクターの蓄積

ジェミニウイルスは DNA ウィルスであり、複製に植物核内の DNA 合成マシナリーを利用する。通常のジェミニウイルスは CP がウイルス核酸を核内に輸送するが、本研究で用いたジェミニウイルスシャトルベクターである pWI ベクターには CP 遺伝子はなく、複製に最低限必要な配列しかない。そのためエレクトロポレーションによるプロトプラストへの導入の際には、直接核に DNA を入れる必要がある。そこで pWI ベクターに β -glucuronidase (GUS) レポーター遺伝子を接続した pWI-GUS を用いて pWI-GUS DNA をイネプロトプラスト内に導入後、発色基質 X-gluc を用いて GUS 遺伝子が発現する細胞が観察されることを確認した(図 3.1)。

また pWI ベクターは、ベクターの元である WDV の自然宿主であるコムギの他にも単子葉植物の培養細胞内で増殖することが知られている。例えばトウモロコシの培養細胞を用いて GUS 活性の増加によって pWI ベクター (pWI-GUS) の増幅が確認されている (Ugaki *et al.*, 1991)。そこで、GUS 遺伝子を pWI ベクターに接続した pWI-GUS と pUC ベクターに接続した pFF-G をイネプロトプラストにエレクトロポレーションにより導入し、経時的に GUS 活性を測定し、pWI ベクターの複製を確認した。その結果、pFF-G を導入した細胞の活性は導入後徐々に減少したのに対し、pWI-GUS を導入した細胞では導入後から

徐々に活性の上昇がみられた。また pWI-GUS の複製に必須な Rep 遺伝子に欠失を生じさせて植物細胞内で複製できなくなる pWI-GUS-Repmutant の GUS 測定を行ったところ、pFF-G と同様であった (図 3.2)。

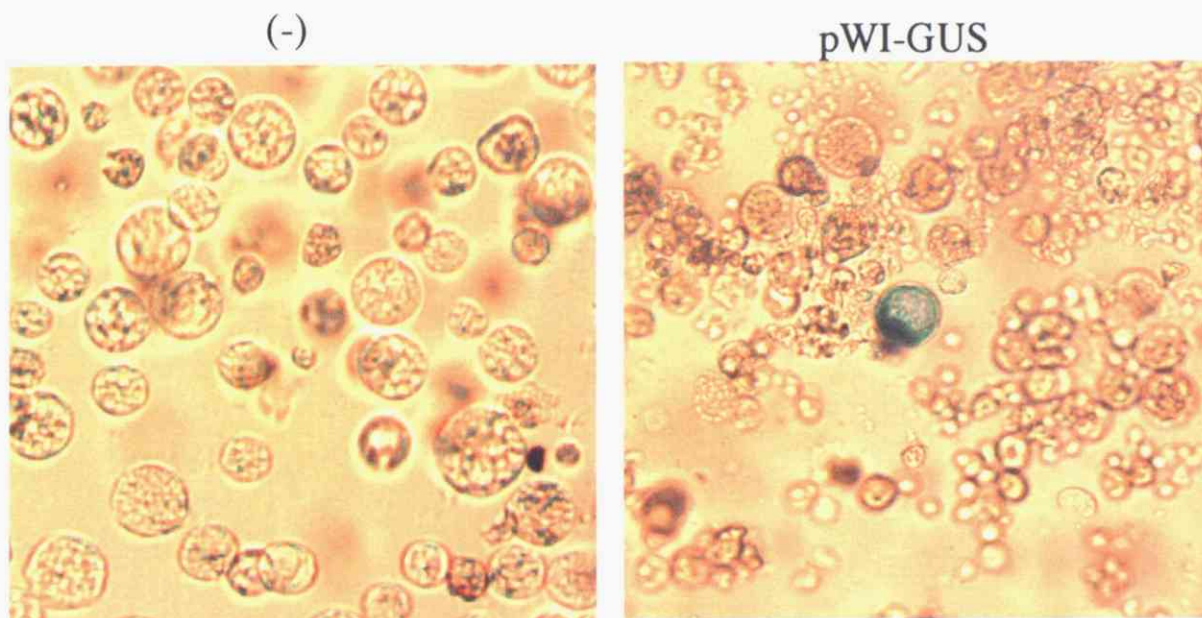


図 3.1 pWI-GUSを導入したイネプロトプラストのGUS染色

(-)はキャリアDNA (10 μ g)のみをイネプロトプラストにエレクトロポレーションした。(pWI-GUS)はキャリアDNAとともにpWI-GUS (それぞれ10 μ g)を導入した。共にエレクトロポレーションから二日後に染色を開始し、さらに二日後に顕微鏡観察した。

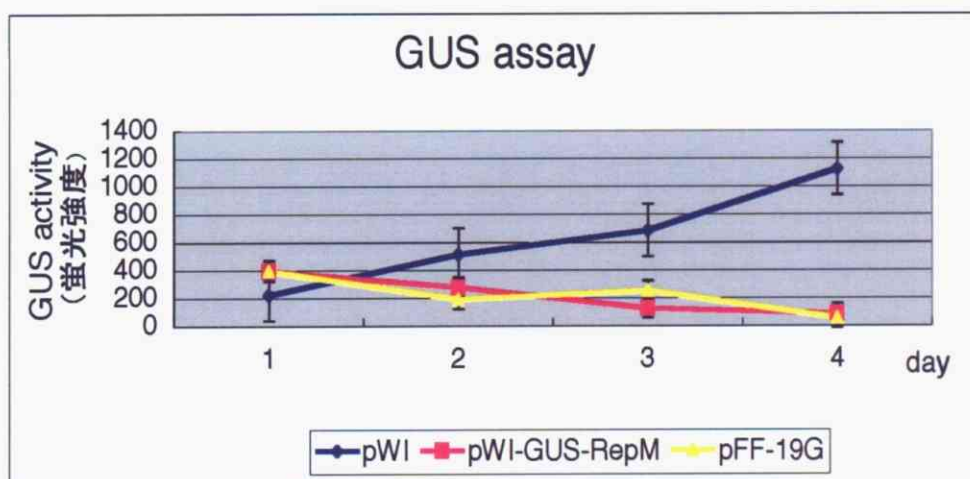


図 3.2 GUS測定

イネプロトプラストにGUS遺伝子を発現するpWI-GUS, pFF-G, pWI-GUS-Repmutantを導入し、経時的にGUS活性を測定した。

3.2 pWI-32, pWI-33 からの Ac/Ds の切り出し

pWI ベクターからの Ac の切り出し

イネプロトプラスト内で *Ac/Ds* がジェミニウイルスベクターから転移することは WDV と同じ *Mastrevirus* 属に属するオギ条斑ウイルス(*Miscanthus streak virus* : MiSV)をベクターに用いた実験で明らかとなっている (Sugimoto *et al.*, 1994)。本実験では pWI-32 および pWI-33 を用いてイネプロトプラスト内での *Ac/Ds* の切り出しを PCR で検出した。

検出の PCR に用いるプライマーは pWI ベクターのクローニングサイトの両側にアニールする pWI-F と pWI-R を用いた。pWI-11 を用いて PCR を行うと 514 bp、pWI-32 では 4941 bp、pWI-33 では 1443 bp の断片が増幅される。また pWI-R と *Ac-PacI* を用いても pWI-32 から *Ac* が切り出されずに残っているものがあることを確認した。すなわち、pWI-32 を用いて pWI-R と *Ac-PacI* で PCR を行うと 593 bp のバンドが生じ、切り出された形である空の pWI-31 (empty ベクター) では DNA の増幅は生じなくなる。

pWI-32 をイネプロトプラストに導入し 2 日間プロトプラスト培養液で静置培養したものをサンプルとして DNA 抽出を行い、pWI-F, pWI-R および pWI-R, *AcReF2* で検出 PCR を行った。プロトプラスト抽出サンプルの増幅断片の長さの比較として pWI-32 から *Ac* が切り出された empty ベクター pWI-31 と、導入に用いた pWI-32 も PCR の鋳型として用いた (図 3.3)。

その結果、イネプロトプラストに導入、抽出した pWI-32 を pWI-F, pWI-R で増幅させると pWI-31 の PCR 産物と同じ位置に PCR 産物が増幅した。また pWI-R, *AcReF3* で PCR を行うと、プラスミドの pWI-32 の PCR 産物と同じ大

きさの PCR 産物が生じることから、この pWI-32 を導入して 2 日後のイネプロトプラストには Ac が切り出されずに残った pWI-32 と Ac が切り出された empty ベクターが存在している事が示唆された。

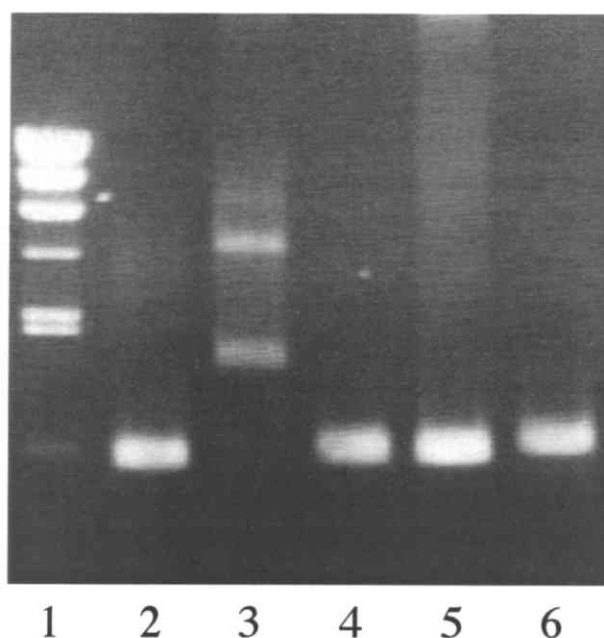


図 3.3 イネプロトプラスト内でのpWI-33からのAc切り出し

イネプロトプラストにpWI-33を導入した後2日後にDNA抽出を行い確認プライマーでPCRを行った。レーン1:マーカ(λ/HindIII)で、レーン2, 3, 4はプライマーpWI-F, pWI-RのPCR産物。レーン2はpWI-31、レーン 3は導入に用いたpWI-32、レーン4はイネプロトプラストに導入し2日後に抽出したpWI-32 (10μg)のPCR産物である。レーン5, 6はプライマーAc-PacI, pWI-RのPCR産物。レーン5は導入に用いたpWI-32、レーン6はレーン4同様イネプロトプラストに一旦導入した後2日後に抽出したpWI-32である。

トランスに供給される Ac transposase による pWI ベクターからの Ds の切り出し

次に pWI-33 を用いて *Ds*lacZ がイネプロトプラスト内で Ac transposase のトランスな供給によって切り出されるかを確認した。ここで Ac transposase の

トランスな供給源として pFF-Ac を用い、pWI-33 と同時にイネプロトプラストに導入した。DNA を遺伝子導入してから 2 日後、DNA を抽出し、PCR によって検出した。PCR の増幅配列の長さの比較として、pWI-33 から Ds 切り出された empty ベクターとほぼ同様の配列である pWI-31 と精製プラスミドの pWI-33 を鋳型として用いた。またトランスな Ac transposase の供給のネガティブコントロールとして、pWI-33 のみをプロトプラストに導入した (図 2.3)。

その結果、pWI-33 のみをイネプロトプラストに導入して DNA を抽出して検出 PCR 行った場合には pWI-33 と同じ大きさの PCR 産物しか生じなかったのに対して、pWI-33 と pFF-Ac を同時に感染させた後抽出した DNA サンプルの検出 PCR では pWI31 の PCR 産物と同じ大きさの PCR 産物が生じた(図 3.4)。

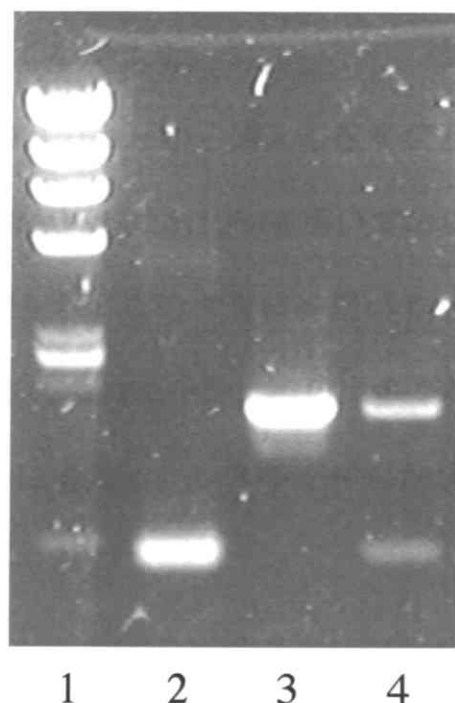


図 3.4 イネプロトプラスト内でのDs切り出し

イネプロトプラストにpWI-32を導入した後2日後にDNA抽出を行い確認プライマーでPCRを行った。レーン1:マーカ(λ/HindIII)で、レーン2, 3, 4はプライマーpWI-F, pWI-RのPCR産物。レーン2はpWI-31、レーン3はpWI-33 (10µg)のみをイネプロトプラストに導入し抽出したDNAのPCR産物、レーン4はイネプロトプラストにpWI-33とpFF-Ac (それぞれ10µg) を導入し二日後に抽出したDNAのPCR産物。

のみ、あるいは pWI-33 と pFF-Ac を同時

3.3 イネプロトプラストから大腸菌へのプラスミドレスキュー

イネプロトプラストに pWI-33 を導入し、プロトプラスト培養液で 2 日間培養した後 DNA を回収し、大腸菌 DH10B に形質転換してプラスミドレスキューを行った。方法で記述したとおり、blue/white selection を行うことにより *Ds lacZ* を保持したままの pWI-33 と *Ds lacZ* が切り出された empty ベクターを見分けることが可能である(図 3.5)。

実験では始め自分で作製した低効率の大腸菌コンピテントセルを用いてレスキューを行った(表 3.1)。ここで pFF-Ac を同時導入したサンプルでは白色コロニーが生じたのに対して、pWI-33 のみをエレクトロポレーションしたサンプルには白色コロニーが生じなかった。

そこで DH10B を別のメーカーから購入し直すこととし、大腸菌コンピテントセル (Invitrogen: Electro MAX DH10B)を用いてエレクトロポレーション用のコンピテントセルを作製した。この大腸菌を用いてプラスミドレスキューした(表 3.2)。その結果、生じたコロニー数は格段に多くなった。しかし pWI-33 のみをイネプロトプラストに導入し、レスキューしたサンプルからも白色コロニーが少数生じた。

導入 DNA	青色コロニー	白色コロニー	白色コロニー/全コロニー
pWI-33	34	0	0/34
	27	0	0/27

PWI-33+pFF-Ac	56	2	2/58
	18	0	0/18

表 3.1 形質転換効率の低いコンピテントセルによってレスキューされ得られたコロニー

導入 DNA	青色コロニー	白色コロニー	白色コロニー/全コロニー
pWI-33	216	1	1/217
	261	0	0/261
	342	1	1/343
	356	0	0/356
	684	0	0/684
pWI-33+pFF-Ac	74	1	1/75
	181	3	3/184
	303	7	7/310
	305	7	7/312
	1654	93	93/1747

表 3.2 形質転換効率の高いコンピテントセルによってレスキューされ得られたコロニー

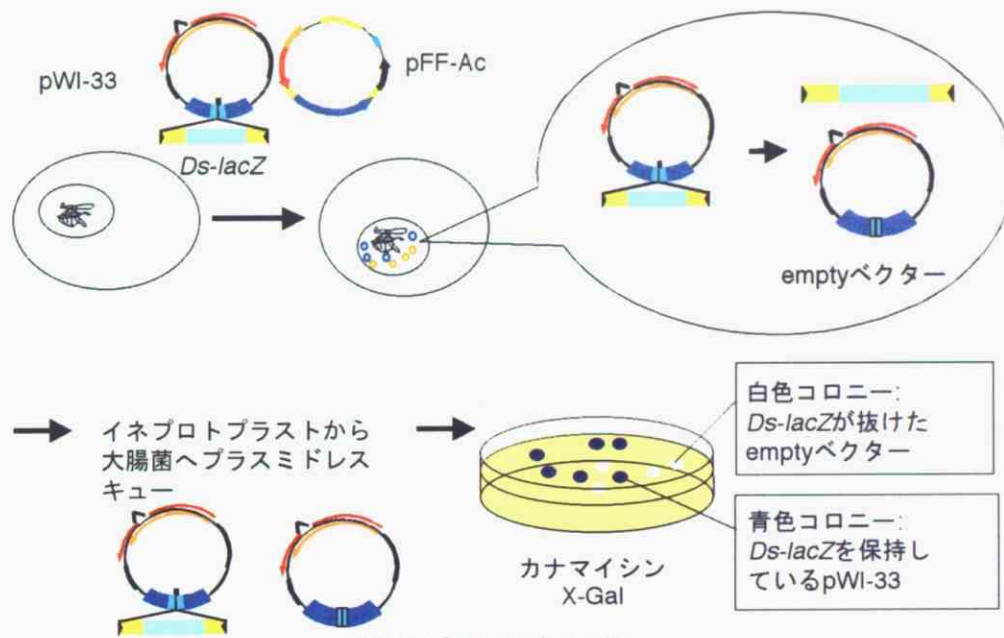


図 3.5 プラスミドレスキュー

Ac/Dsの転移切り出し能をイネプロトプラストから大腸菌(DH10B)へプラスミドレスキューを行うことによってモニタリングする系の構築を目指した。この系ではDs-lacZを持つpWI-33がイネプロトプラスト内でAc transposaseのトランスな供給によって転移し、lacZ遺伝子が欠失することにより、大腸菌へのプラスミドレスキュー後にBlue/White selectionで白色コロニーを生じるようになる。この白色コロニーの比率によりAc transposaseのAc/Ds切り出し活性をモニタリングすることが可能となる。

3.4 DslacZ が抜けた empty ベクターにおけるフットプリントの解析

Ac/Ds は転移の際 TIRs の端から切り出され、その周辺の組み込まれる際に重複したターゲットサイトが再び結合し、ターゲットサイトの重複が生じることが知られている。Ac transposase による切り出しに特徴的な現象として、ターゲットサイトが重複するだけではなく、Ac/Ds が抜けた位置に数塩基の付加または欠失が生じる。これがフットプリントと呼ばれる。ジェミニウイルス上からの Ac/Ds 転移でこのフットプリントが見られることが Sugimoto et al.,(1994)によって示されている。

プラスミドレスキューおよび blue/white selection により得られた白色コロニ

ーについて *DslacZ* が抜けた位置のシーケンスを行うことによってフットプリントを解析し、pWI-33 から *DslacZ* が *Ac* transposase の働きによって切り出されたか否かを調べた(図 3.6)。その結果、典型的なフットプリントとは異なる配列であった。すなわち、あらかじめ存在するターゲット重複配列ごと欠失していた。

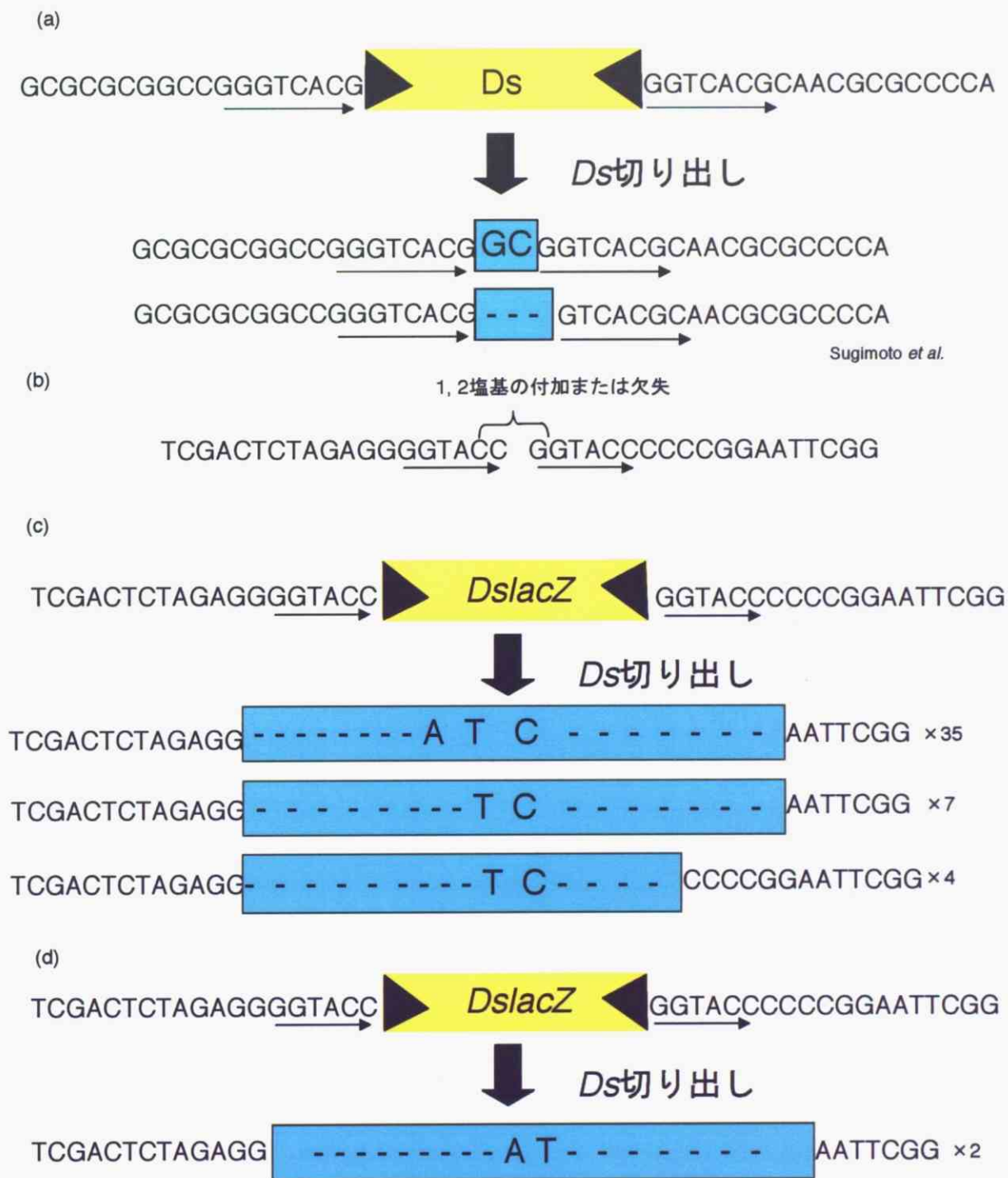


図 3.6 pWI-33 から *Ds-lacZ* が切り出されて生じるフットプリントの解析

- (a) Sugimoto *et al.*によって行われたジェミニウイルス *Mustrevirus* 属 *Miscanthus streak virus* のゲノム上からイネ内で *Ds* を切り出された時に生じた典型的なフットプリント。
- (b) 予想していた pWI-33 から *DslacZ* が切り出されたときのフットプリント。
- (c) 本実験でイネプロトプラストに pWI-33 と pFF-Ac を共感染してプラスミドレスキューによって得られた白色コロニーが保持していた空の pWI ベクターのフットプリント。
- (d) イネプロトプラストに pWI-33 のみを導入し、プラスミドレスキューした際に得られた白色コロニーが保持していた空の pWI ベクターのフットプリント。
- 配列したの矢印は順向き繰り返し配列 (direct repeat) を示し、- は塩基の欠失を示している。また配列横の (× 数字) はそのフットプリントが何クローン得られたかを示している。

3.5 Ac transposase の発現

Ac transposase の *in vitro* での解析を行う為に Ac transposase を大腸菌内で発現し、精製することを試みた。

Ac transposase の精製は Feldmar *et al.* (1991)や Essers *et al.* (2000)により精製され、*in vitro* で、Ac transposase の DNA 結合部位と二量体化部位のが解析された。近年 Zhou *et al.* (2004) により *hAT* スーパーファミリーに属するイエバエの *Hermes* transposase を用いた研究により、その transposon 切り出し機構の一部が明らかとなった。この研究により DNA 切断部位が DDE モチーフであることが示された。そこで Ac transposase においても DDE モチーフが切り出し活性の中心部位かどうか検証することを試みた。

pFF-Ac をもとに組換え PCR によって Ac transposase の cDNA クローンを作製し、大腸菌発現ベクターである pET-30a の *Nde*I, *Xho*I クローニング部位に導入することで発現ベクター pET-Ac を完成させた。また pET-Ac から Ac transposase の N 末端 103 アミノ酸残基欠失した pET-En、300 アミノ酸残基目のアスパラギン酸がアラニンに置換された pET-D300A、366 アミノ酸残基目のアスパラギン酸がアラニンに置換された pET-D366A、719 アミノ酸残基目のグルタミン酸がアラニンに置換された pET-E719A を構築した。

構築した発現ベクターのうち pET-Ac と pET-En を用いて発現チェックを行った。37 °C、3 時間の培養条件では発現は見られなかったので、培養温度条件を変えて (20 °C, 25 °C, 30 °C)十分な発現が見られる条件を検討した(図 3.7)。その結果、37 °C以外の条件では Ac transposase とその欠失変異体タンパク質

と思われる約 110 kDa, 約 95 kDa のタンパク質の発現が認められた。そこでニッケルカラムを用いて精製を試みた(図 3.8)。

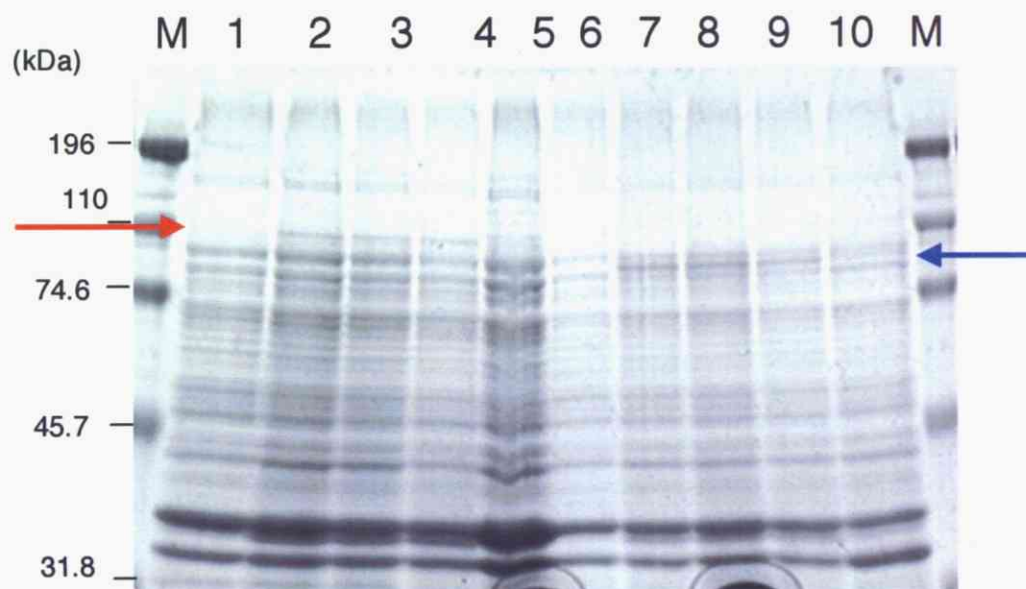


図 3.7 *Ac* transposase と欠失変異タンパク質の発現

タンパク質発現ベクターpET-AcとpET-EnからIPTGによって誘導をかけ*Ac* transposaseと1~103アミノ酸残基欠失した変異タンパク質を発現させた。誘導をかけた後培養条件37℃では発現が見られなかったので温度をふってタンパク質の誘導をおこした。レーン 1~5はレーン6~10はpET-Enを形質転換した大腸菌から不溶性画分を取りSDS-PAGE電気泳動を行った。レーン 1, 6はIPTG誘導をかける前に集菌したサンプルである。レーン2, 7はIPTG誘導後20℃、レーン3, 8は25℃、レーン4, 9は30℃、レーン5, 10は37℃で3時間培養した。赤い矢印は*Ac* transposase、青い矢印は欠失変異タンパク質である。

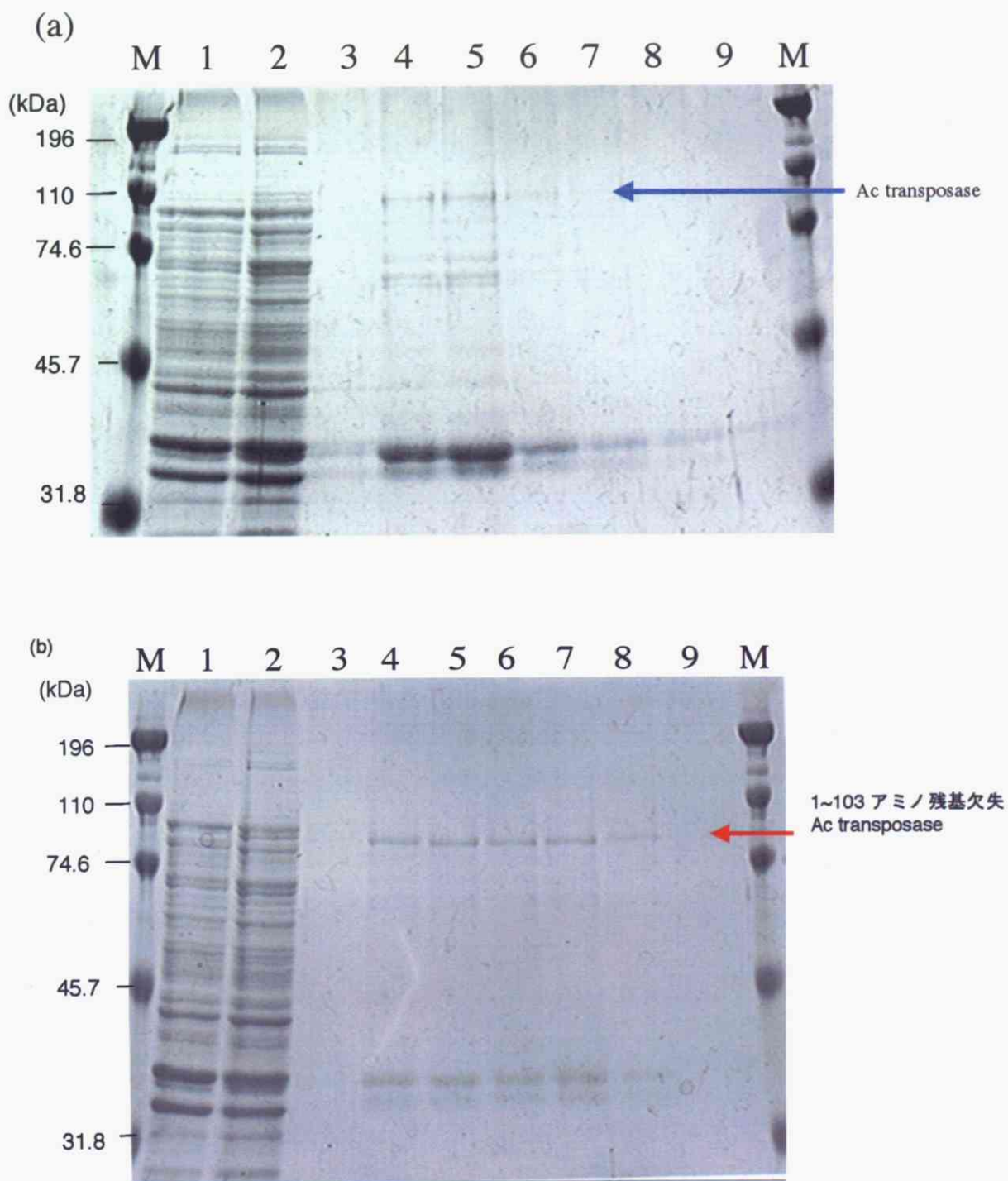


図 3.8 Ac transposaseとその変異タンパク質の精製

- (a) Ac transposaseの精製を行った。矢印部がAc transposaseであると考えられる。
 (b) Ac transposaseの1~103アミノ残基欠失した変異タンパク質の精製

(a), (b)共に1レーンはIPTG誘導をかける前のサンプルの不溶性画分、2レーンは誘導を後25°Cで3時間培養したサンプルの不溶性画分。3~9はレーン2のサンプルからHis-tag精製溶出液画分である。Mは分子量マーカー。

3.6 感染性 BCTV クローンの作製

シロイヌナズナに感染することが報告されているジェミニウイルス科 *Curtovirus* 属の *Beet curly top virus* (BCTV)の感染系を構築した。

BCTV の塩基配列

Curtovirus は近年、複数の種に再分類されつつある。ATCC から届いた書類のデータからはウイルスに関する情報の詳細が不明であったため、GenBank のデータベースを検索し、当初、*Beet mild curly top virus* (BMCTV, Acc.No. U56975) が一番近いのではないかと考えた。その全塩基配列をもとに、1 箇所しかない制限酵素サイト (*EcoRI*) を含む周辺の配列からクローニング用の PCR プライマーを設計し、PCR を行った。しかし、アニーリング温度を下げるなどの緩い条件下でも目的の DNA 断片はあまり増えなかったため (図 3.9)、再度データベースから別の *Curtovirus* の塩基配列を参考にすることとし、BCTV (Acc. No. M24597) を探した。その結果、BCTV (Acc. No. M24597) の全塩基配列をもとに、1 箇所しかない制限酵素サイト (*BglIII*) を含む周辺の配列からクローニング用の PCR プライマーを設計し、PCR を行った。この場合もあまり増えず、非特異なバンドが多く出た (図 3.9 b)。そこで U56975 用のプライマーおよび M24597 用のプライマーで増えた約 3 kbp のバンドを切り出し、ゲル精製し、pGEM-T Easy ベクター (Promega) にライゲーションした。大腸菌を形質転換し、インサートを持つと思われるクローンがいくつか得られた

ため、T7 および SP6 のプロモーター配列に由来するプライマーを用いてシーケンスを行った。BLAST 検索の結果、これらのクローンは Beet severe curly top virus (BSCTV, Acc.No. U02311) に最も近いことが明らかとなった。この配列より、EcoRI サイトを含むクローニング用プライマー (BCTV-F, BCTV-R) を設計し、PCR を行った (図 3.10)。この PCR 産物のダイレクトシーケンス、およびその配列をもとに作製したシーケンス用プライマーにより BCTV 全長の塩基配列を決定した。BSCTV (Acc. No. U02311) と比較したところ、全長は U02311 より 1 塩基少なく 2926 nt で、全塩基配列の相同性は 96.65% であった。なお、BSCTV には U02311 株の ORF R4 は存在しなかった。ATCC に BCTV を依頼し、届いたのは厳密には現在の分類では BCTSV に属するウイルスであったことになる。本研究では、従来通りの分類に従って BCTV と呼ぶこととする。

M 1 2 3 4 5 6

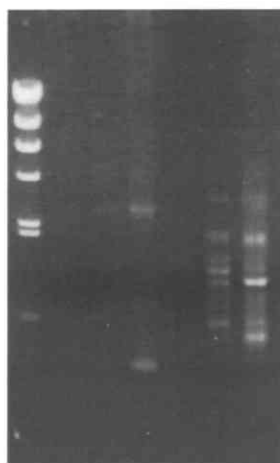


図 3.9 BCTVの全長PCR

BCTVの感染葉から抽出したDNAをデータベースを元に設計したプライマーをもちいて全長のPCRを行った。Mはマーカーの λ /HindIIIで、レーン1~3はU56975用のプライマーを用いて、レーン4~6はM24597用のプライマーを用いてPCRを行ってえたPCR産物。

シロイヌナズナへの感染系の確立

クローニングした BCTV をもとに IR が二つある 1.5 コピーのクローンを作製し、pCAMBIA2300 の T-DNA 領域に組換えた。ジェミニウイルスの感染性クローンを作製する場合は IR を二つ持つ 1.5 コピーにしないと、感染クローンが植物の核に導入されてもウイルスとして出現せず感染はしない。また pCAMBIA ベクターの様なバイナリーベクターの T-DNA 領域内にウイルスクローンを挿入し、アグロバクテリウムを用いることにより植物細胞の核内に効率よく輸送されに組み込まれ、高い感染率を示すようになる。

本研究で用いたアグロバクテリウムをもちいたアグロインフィルトレーションを行う際、初め主茎が伸びる前に行っていた。しかし病徴は現れず上葉におけるウイルス DNA の蓄積も観察できなかった。そこでアグロインフィルトレーションの時期を検討し、主茎が 2, 3cm 伸びたシロイヌナズナに対して、主茎を切断してからアグロインフィルトレーションを行ったところ高い割合で病徴が現れた(図 3.11)。病徴が現れた上葉から抽出した DNA を鋳型に PCR によって検出したところ、ウイルス DNA の蓄積が見られた(図 3.12)。以上より、BCTV の感染性クローンを構築し、シロイヌナズナへの感染系を確立した。

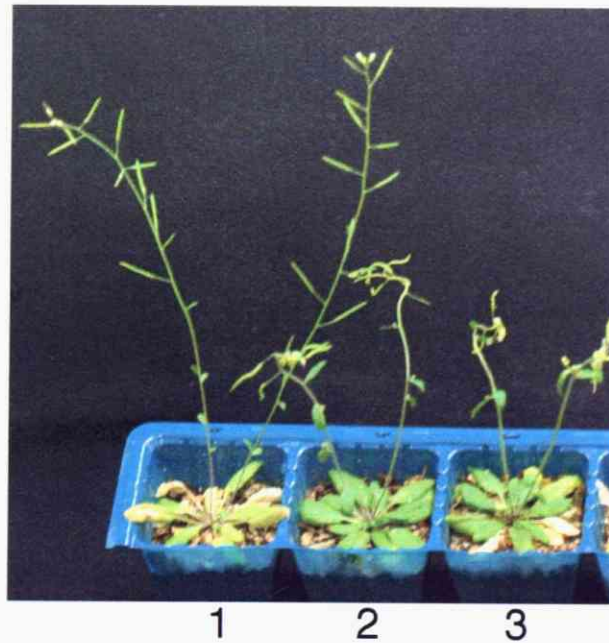


図 3.9 BCTV感染したシロイロナズナ(Col-0)

主茎が2~3 cmのびたシロイロナズナに対して、主茎を切断した後にpCAMBIA-BCTVを形質転換したアグロバクテリウムを用いてアグロインフィルトレーションにより感染させた。レーン1は主茎を切断してagro-infiltration bufferをインフィルトレーションし、レーン2、3はpCAMBIA-BCTVを形質転換したアグロバクテリウムインフィルトレーションした。



図 3.10 感染葉でのウイルスDNAの蓄積

BCTVに感染したシロイロナズナからDNAを抽出し、BCTVの全長を増幅するプライマー(BCTV-F, BCTV-R)を用いてPCRを行い感染葉でのウイルスの蓄積を確認した。

レーン1は λ /HindIII図 3.9で、レーン2はアグロバクテリウムをインフィルトレーションせず病徴が現れていない健全シロイロナズナ(図 3.9-2)から、レーン2,3は図 3.9 で病徴を示したBCTV感染シロイロナズナ(図 3.9-3,4)からそれぞれDNAを抽出しPCRを行った。

第4章 考察

4.1 イネプロトプラストへのジェミニウイルスシャトルベクターの導入と複製

イネプロトプラストへのジェミニウイルスシャトルベクターのエレクトロポレーションによる導入効率が1%以下であるということが、pWI-GUS 導入細胞の GUS 活性染色 (図 3.1) で明らかとなった。この導入効率はジェミニウイルスシャトルベクターが核の中に入らなくては複製およびコードしている遺伝子の発現が起こらないことに起因していると考えられる。

ひとたび核の中に入ったジェミニウイルスシャトルベクターは複製するのでコードしている遺伝子を発現し続けることができる。図 3. 2 より同じカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモータ支配下に GUS 遺伝子を共通して持つ pWI-GUS, pFF-G, pWI-GUS-Repmutant を導入すると、pFF-G, pWI-GUS-Repmutant は日経つに連れ GUS 活性が低下した。一方で pWI-GUS は日経つに連れて GUS 活性が上昇した。このことから、イネプロトプラスト内では、複製開始点を持たない pFF-G および複製に必須な Rep 遺伝子に変異を入れた pWI-GUS-Repmutant からはイネプロトプラスト内では GUS 活性が一過的にしか発現せず、pWI-GUS-Repmutant は複製しないことが示唆された。そして、ジェミニウイルスベクターである pWI-GUS はイネプロトプラスト内で複製することが強く示唆された。同じ pWI-GUS をトウモロコシの細胞に導入した文献では (Ugaki *et al.* 1991)、導入後 7 日目まで pWI-GUS の活性が上昇した。なお、pWI ベクターの完全な複製を証明には、植物の中で増えた分子を

導入した分子と区別可能なメチル化感受性の制限酵素を用いたサザン解析を行う必要がある。

4.2 *Ac* transposase の供給による *Ac/Ds* のジェミニウイルスシャトルベクターからの切り出し

Ac が組み込まれた pWI-32 をイネプロトプラストに導入し、*Ac* の組み込まれた両外側の pWI ベクター上のプライマー pWI-F, R で PCR を行った。その結果、pWI-32 から *Ac* が切り出された分子に相当する長さの PCR 産物が得られた (図 3.3)。 *Ac* が切り出されない pWI-32 分子に相当する 5 kb 以上のバンドは検出されなかったが、pWI ベクター上の pW-R と *Ac* 内部のプライマー AcPacI で PCR を行い約 600 bp の PCR 産物が得られたことから、pWI-32 も残っており、導入前に *Ac* が脱落したのではなく、プロトプラストでの pWI-32 の複製に伴って *Ac* が切り出されたと推察された。

次に *Ds/lacZ* が *Ac* transposase のトランスな供給によって切り出されるかを調べた。その結果、pFF-*Ac* を同時導入した pWI-33 では、*Ds/lacZ* が切り出されて生じる empty pWI ベクターからに相当するバンドが検出された。これらの結果から pFF-*Ac* 由来の *Ac* transposase のトランスな供給によって pWI-33 から *Ds/lacZ* が切り出されたことが示唆された。

4.3 プラスミドレスキューとフットプリント解析

PCR による確認より pWI-33 から *DslacZ* の切り出しが起きたことが示唆されたので、pFF-Ac とともにイネプロトプラストに導入した pWI-33 を大腸菌にプラスミドレスキューした。ここで最初、一般的なクローニングに用いられる大腸菌 DH5 α を用いて、形質転換効率にばらつきが生じないように electroporation 用のコンピテントセルを作製してプラスミドレスキューを行った。しかし、いくらプラスミドレスキューを試みてもコロニーは得られず、大腸菌へのレスキューは失敗が続いた。その理由は、レスキューする pWI-33 はイネプロトプラスト内で複製しているため、真核生物特有の DNA メチル化 (CG や CNG の配列を標的にしたメチル化) が起こっているためと推測された (McClelland et al., 1994)。通常クローニングで用いられる DH5 α や JM109 といった株は、真核生物特有のメチル化の起こった DNA を分解する酵素を持つため、プラスミドレスキューには適していないと判断した。そこで本研究では、この真核生物特有のメチル化を認識分解する酵素の遺伝子群(mcrA, mcrBC, mrr, hsdRMS)の大腸菌変異株 DH10B を用いてプラスミドレスキューを行った(Seth et al., 1990)。DH10B は TAKARA が販売している electroporation 用 (E. coli Electro-Cells)のコンピテントセルをもとにそこから自分でコンピテントセルを作製して行ったが、よい結果がえられなかったため、インビトロジェンの販売している DH10B のエレクトロポレーション用コンピテントセル (ElectroMAX DH10B)を購入しそれをもとにエレクトロポレーション用のコンピテントセルを作製したところ効率の非常に高いコンピテントセルを得ることができた。そ

の結果イネプロトプラストから抽出した pWI-33 ベクターを大腸菌にレスキューできるようにになった(表 3.2)。

レスキューされたコロニーからフットプリントを調べたが、予想されるのとは異なっていた。予想されたフットプリントとは *Ac transposase* により *Ac/Ds* が切り出されて切り出される際、*Ac/Ds* が抜けた後にターゲット重複と数塩基付加または欠失が生じた配列である(図 3. 6. (a))。pWI-33 と pFF-*Ac* を同時導入し、プラスミドレスキューにより得られた白色コロニーでは、*Ds-lacZ* が抜けた箇所のシーケンスは、予測されたフットプリントとは異なっていた(図 3.6 (c))。すなわち、多くが 8 塩基のターゲット配列よりも 6 塩基、12 塩基多く外側が欠失しており、2~3 塩基の付加が見られた。4 つは、両側が 6 塩基ずつ余分に欠失しており、2 塩基の付加が見られた。pWI-33 単独導入から得られた白色コロニーにも 6 塩基、12 塩基多く欠失し、2 塩基付加が見られた(図 3.6 (c))。

以上のことから、pWI-33 から *Ac transposase* のトランスな働きによって *Ds-lacZ* が切り出されて生じた empty ベクターは *Ac transposase* の作用で切り出されたのではない可能性が捨てきれない結果となった。イネゲノムの中にも活性のある DNA トランスポゾンやその派生物がある事が報告された(Jiang et al., 2003)。本実験では、それらによって切り出しされ、その *transposase* のフットプリントが検出されたという解釈も可能と判断された。あるいは後述する導入配列の特殊性から、イネプロトプラスト内で pWI-33 がリアレンジメントを受け、*Ds* 部分が脱落した可能性もある。pWI-33 を作製する際、クローニングに *KpnI* サイトを用いたために、結果的に *Ds-lacZ* の IRs の外側に *KpnI* サイト

が存在する。KpnI サイトは順向き繰り返し配列にも逆向き繰り返し配列にもなる。またさらにその外側の配列も逆向き繰り返し配列となっていたため、Ds-lacZ の周辺領域の逆向き繰り返し配列は、11 塩基対でなく、20 塩基対の逆向き繰り返し配列となっていた。この配列が影響して、Ac transposase によるフットプリントが既報と異なっていた可能性もある。いずれにせよ推測の域を出ず、Ac transposase を挿入した pWI-32 でのフットプリントや、周辺配列を MiSV と同じにする、周辺領域も植物ゲノム上からクローニングした配列にする等の追試が必要である。

現段階では、イネのプロトプラストと pWI ベクターの系では Ac transposase の切り出し活性を評価する実験系の確立は不完全であり、改善する必要があると判断された。従って、プラスミドレスキューによる切り出し検出系は、プロトタイプとしては構築できたと考えられるが、この系では Ac transposase の切り出し活性を評価する実験には進むことは出来ないと判断した。

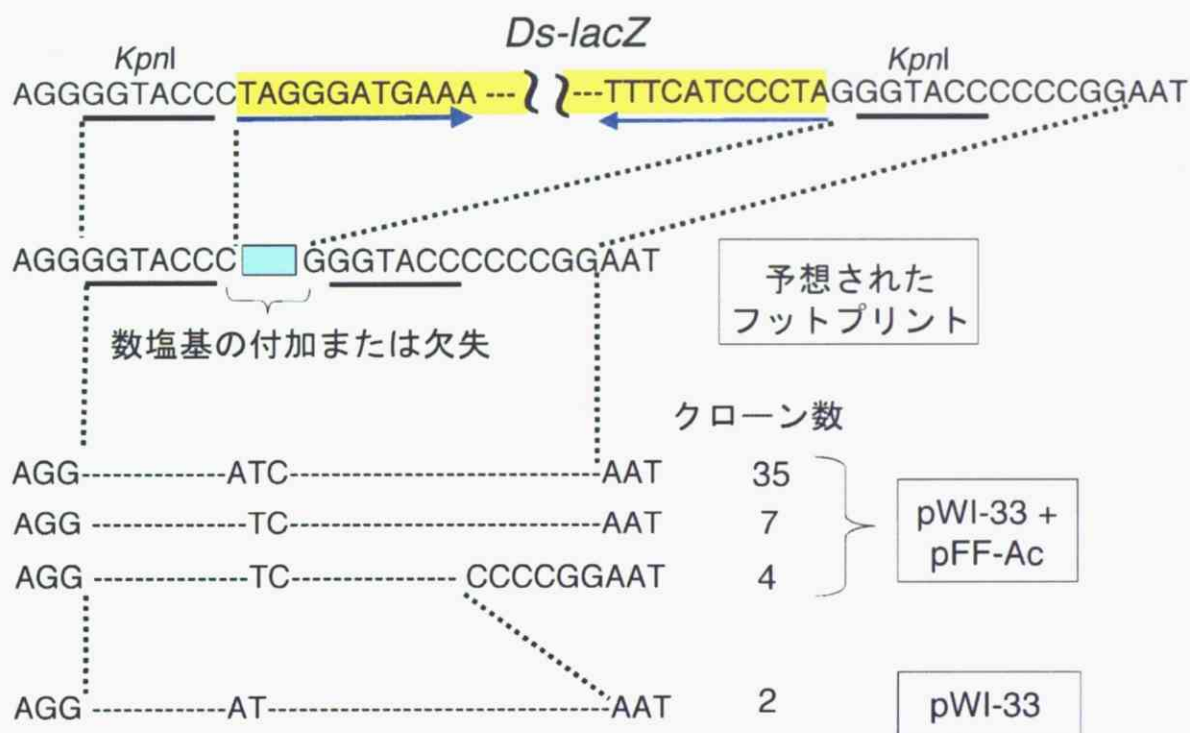


図 4.1 emptyベクターから得られたDs-lacZ切り出し後の配列

4.5 Ac transposase の発現と精製

Ac transposase 及びその欠失変異タンパク質は 37℃ではほとんど発現しないが、20~ 30 °C, 3 時間では発現することが判明した。また発現した Ac transposase とその欠失変異タンパク質は SDS-PAGE のバンドの位置から、計算上の分子量(Ac transposase: Mw=92 kDa, 欠失変異タンパク質 : 81 kDa)よりも大きく、Ac transposase で約 110 kDa、欠失変異体タンパク質で約 95 kDa の位置にバンドが検出された。Feldmar and Kunze (1991)より Ac transposase の 109~128 アミノ酸残基に存在する切り出し活性に不可欠な配列であるプロリンとグルタミンの 10 回繰り返し配列(PQ)の影響により、泳動度が遅くなる事

が報告されている。ニッケルカラムによる精製の結果、ほぼ目的のバンドが精製されることが示された。

今後はこのタンパク質を大量精製し、*in vitro*における *Ac* transposase の DNA 切断活性を測定する系を立ち上げることにより *in vitro* での切り出し活性測定系が構築できると考えられる。

4.6 BCTV とシロイヌナズナを用いた *Ac/Ds* 切り出し機能解析系の構築

シロイヌナズナへの BCTV の感染性クローンを作製し、感染系を確立した。このクローンを用いて、シロイヌナズナ細胞内と大腸菌内で増殖可能なシャトルベクターを構築できれば、さらに *Ac/Ds* を導入することによってシロイヌナズナで *Ac/Ds* 切り出し機能解析系を構築し、今回作製した *Ac* transposase の様々な変異体を一過的に発現する pFF-*Ac* derivative を用いた双子葉植物での *Ac* transposase の機能を解析することが期待される。特に、シロイヌナズナは全ゲノムのシーケンスが既知であり、種々の遺伝子の変異体が存在することから、切り出しに限らず、転移に関与する未知の因子の探索も可能かもしれない。

イネの系を改良し、イネでもシロイヌナズナでも評価できるれば、双子葉植物と単子葉植物での *Ac* transposase の機能の差異を評価したり、未知の transposase の機能解析につながることも期待される。違いと

第5章 摘要

DNA トランスポゾン *Activator* (*Ac*)は、トウモロコシの種皮に生じる斑入り
の原因因子の遺伝学的解析から、転移因子として初めてその存在が証明された。
Ac は内部に 807 アミノ酸残基の *transposase* をコードし、*hAT* スーパーファ
ミリーに属する。*Ac transposase* は、植物ゲノム DNA 複製時に *Ac* の両末端の
逆位反復配列(*IRs*)で *Ac* を切り出し、転移先のゲノム DNA を切断して *Ac* を挿
入する Cut & Paste 機能を持つ。*IRs* を持ち *transposase* 遺伝子を持たない非
自律性の *Dissociation* (*Ds*)も *Ac transposase* のトランスな供給により転移する。
Ac transposase の構造と機能について、DNA 結合部位や二量体化部位などの
知見はあるが、転移機能の中心となる転位因子切り出し能の活性中心は未だに
明らかにされていない。一方、*Ac/Ds* はトウモロコシのみでなくシロイヌナズ
ナ、イネなどの細胞内でも転移し、植物ゲノムからのみでなく DNA ウイルス
であるジェミニウイルスのゲノム上からも転移するという報告がある。そこで、
本研究では大腸菌にレスキューできるジェミニウイルスシャトルベクターを用
いて *in vivo* での *Ac transposase* の転位因子切り出し能を解析する系を構築し、
Ac transposase に関する更なる知見を得ることを目的とした。

ジェミニウイルス科 *Mastrevirus* 属に属する *Wheat dwarf virus* (*WDV*)ゲノム
DNA をもとに構築された、単子葉植物細胞と大腸菌とのシャトルベクターであ
る pWI ベクターに *Ac* を組み込み pWI-32 を作製した。これを electroporation
によってイネプロトプラストに導入し、2 日後に DNA を抽出して、*Ac* の両外
側の pWI ベクター上のプライマーを用いて PCR を行ったところ、pWI-32 から

Acが転移した(empty ベクター)に由来する PCR 産物を得た。

Ac の内部配列を欠失させ *lacZ* 遺伝子を導入した *DslacZ* を pWI ベクターに組み込み、pWI-33 を作製した。また Ac transposase 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター下流に組み込み、植物細胞内で Ac transposase を一過的に発現する pFF-Ac を作製した。両者を electroporation によってイネプロトプラストに同時導入し *DslacZ* の切り出しを PCR およびプラスミドレスキューにより検出した。PCR の結果、pWI-33 と pFF-Ac の共導入により、pWI-33 から *DslacZ* が切り出された empty ベクターに由来するバンドが検出された。プラスミドレスキューにおいても、Ac transposase の同時導入によって、pWI-33 から *DslacZ* が切り出された白色コロニーが得られた。しかし、pFF-Ac を同時導入せず pWI-33 のみを導入したイネ細胞からも、*DslacZ* が切り出された白色コロニーが少数得られた。白色コロニーのシーケンス解析を行ったところ、*DslacZ* が切り出された後の配列(フットプリント)は Ac transposase の発現の有無に関わらず解析したすべての白色コロニー間で良く似ており、すでに報告されている典型的な Ac/Ds のフットプリントとは異なっていた。しかし、pWI-33 の逆向き反復配列は 11 塩基ではなく 20 塩基になっており、得られた白色コロニーは、Ac transposase による異なった部位での切り出し、イネプロトプラスト内での pWI-33 のリアレンジメント、あるいはイネ内在性の未知の transposase による *DslacZ* の切り出し等の可能性が考えられた。

シロイヌナズナを宿主とするジェミニウイルスの感染クローンの構築を行った。シロイヌナズナに感染することが報告されているジェミニウイルス科

Curtovirus 属の *Beet curly top virus* (BCTV) の感染葉から、BCTV DNA を単離し、1.5 copy をアグロバクテリウムのバイナリーベクターに挿入した。このベクターを導入したアグロバクテリウムをシロイヌナズナのロゼット葉にインフイルトレーションすることにより、効率よく BCTV 特有の病徴が現れ、PCR とシーケンシングの結果、BCTV の感染が確認された。今後、この BCTV 感染性クローンをもとにシャトルベクターを構築することにより、Ac transposase の転位因子切り出し能を解析する新たな系を構築できる可能性がある。

第 6 章 参考文献

Altschul, S. E., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

Boehm, U., Heinlein, M., Behrens, U. and Kunze, R. (1995) One of three nuclear localization signals of maize *Activator* (*Ac*) transposase overlaps the DNA-binding domain. *Plant J.* 7: 441-451.

Boehm U., Heinlein M., Behrens U. Kunze R. Brandt, V. L. and Roth, D.B. (2004). V(D)J recombination: how to tame a transposase. *Immunol. Rev.* 200: 249-260.

Brian, R., Timothy, J. H., Seth, D. F. and William, M. G. (1991). Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3*. *Cell* 66: 465-471.

Bundock, P. and Hooykaas, P. (2005). An *Arabidopsis* *AT*-like transposase is essential for plant development. *Nature* 436: 282-284.

Curcio, M. J. and Derbyshire, K. M. (2003). The outs and ins of transposition: from Mu to Kangaroo. *Nature Rev.* 4: 1- 13.

Egelkrout, E.M., Mariconti, L., Cella, R., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. (2002). The activity of the proliferating cell nuclear antigen promoter is differentially regulated by two E2F elements during plant development. *Plant Cell* 14: 3225-3236.

Egelkrout, E.M., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. (2001). Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 13: 1437-1452.

Essers, L., Adolphs, R. H. and Kunze, R. (2000). A highly conserved domain of the maize *Activator* transposase is involved in dimerization. *Plant Cell* 12: 211-223.

Feldmar, S. and Kunze, R (1991) The ORFa protein, the putative transposase of maize transposable element *Ac*, has a basic DNA binding domain. *EMBO J.* 10: 4003-4010.

Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M., Sanz-Burgos, A. P., Luque, A. and Missich, R. (2004). Geminivirus DNA replication and cell cycle interaction. *Vet. Microbiol.* 98: 111-119.

Han, J. S., Szak, S. T. and Boeke J. D. (2004). Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 429: 268-274.

Henley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., and Robertson, D. (2004). Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol. Plant Pathol.* 5: 149-156.

Hickman, A.B., Perez, Z.N., Musingarimi, P., Fhirlando, R., Hinshaw, J.E., Crig, N.L. and Dyda, F. (2005). Molecular architecture of a eukaryotic DNA transposase. *Nat. Struc. Mol. Biol.* 12: 715-721.

Hiom, K., Melek, M. and Gellert, M. (1998). DNA transposition by the RAG1 and RAG2 protein: A possible source of oncogenic translocation. *Cell* 94: 463-470.

Houba-Herlin, N., Becker, D., Post, A., Larondelle, Y. and Starlinger, P. (1990). Excision of a *Ds*-like maize transposable element (*Ac delta*) in a transient assay in *Petunia* is enhanced by a truncated coding region of the transposable element *Ac*. *Mol. Gen. Genet.* 224: 17-23.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

Jiang, N., Bao, Z., Zhang, X., Hirochika, H., Eddy, S.R., McCouch, S.R. and Wessler, S.R. (2003). An active DNA transposon family in rice. *Nature* 421:163-167.

Kempken, F. and Windhofer, F. (2001). The *hAT* family: a versatile transposon group common to plants, fungi, animals, and man. *Chromosoma* 110: 1-9.

Kidwell, M. G. and Lisch, D. R. (2000). Transposable elements and host gene evolution. *Trends Ecol. Evol.* 15: 95-99.

Kim, D. R., Dai, Y., Mundy, C. L., Yang, W. and Oettinger, M.A. (1999). Mutations of acidic residues in RAG1 define the active site of the V(D)J recombinase. *Genes Dev.* 13: 3070-3080.

Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K. and Arai, Y. (1990). An improved assay for beta-glucuronidase in transformed-cells-methanol almost completely suppresses a putative endogenous beta-glucuronidase activity. *Plant Science* 70: 133-140.

Kunze, R. (1996). The maize transposable element *Activator* (*Ac*). *Curr Top Microbiol Immunol.* 204: 161-194.

Kunze, R., Behrens, U., Courage-Franzkowiak, U., Feldmar, S., Kuhn, S. and Lutticke, R. (1993). Dominant transposition-deficient mutants of maize *Activator* (*Ac*) transposase. *Proc. Natl. Sci. USA* 90: 7094-7098.

Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne, J., Puangsomlee, P. and Coupland, G. (1993). The maize transposable element system *Ac/Ds* as a mutagen in *Arabidopsis*: Identification of an albino mutation induced by *Ds* insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10370-10374.

Landree, M. A., Wibbenmeyer, J. A. and Roth, D. B. (1998). Mutational analysis of RAG1 and RAG2 identifies three catalytic amino acids in RAG1 critical for both cleavage steps of V(D)J recombination. *Genes Dev.* 13: 3059-3069.

Laufs, J., Wirtz, U., Kammann, M., Matzeit, V., Schaefer, S., Schell, J., Czernilofsky, A.P., Baker, B. and Gronenborn, B. (1990) Wheat dwarf virus *Ac/Ds* vectors: expression and excision of transposable elements introduced into various cereals by a viral replicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7752-7756.

Mack, A. M. and Crawford, N. M. (2001). The *Arabidopsis* TAG1 transposase has N-terminal zinc finger DNA binding domain that recognizes distinct subterminal

motifs. *Plant Cell* 13: 2319-2331.

McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M. and Oettinger, M. A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83: 387-395.

McClelland, M., Nelson, M. and Raschke, E. (1994). Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferase. *Nuc. Acid. Res.* 22: 3640-3659.

Michel, K. and Atkinson, P.W. (2003). Nuclear localization of the Hermes transposase depends on basic amino acid residues at the N-terminus of the protein. *J. Cell. Biochem.* 89: 778-790.

Otsuki, Y. (1990). A visual manual for the protoplast culture system of rice. Tokyo: Food and Agriculture Research Development Association.

Pallsbi, D. and Rodgers, K.K. (2004). Putting the pieces together: identification and characterization of structural domain in the V(D)J recombination protein RAG1. *Immunol. Rev.* 200: 70-82.

Perez, Z.N., Musingarimi, P., Craig, N. L., Dyda, F. and Hickman, A.B. (2005). Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the *Hermes* transposase. *Acta. Cryst.* F61: 587-590

Sabot, S., Simon, D. and Bernard, M. (2004). Plant transposable element, with an emphasis on grass species. *Euphytica*. 139: 227-247.

Shen, W. H. and Hohn, B. (1992). Excision of a transposable element from a viral vector introduced into maize plants by agroinfection. *Plant J.* 2: 35-42.

Steffen, A. and Athanasios, T. (1994) Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* 5: 421-427.

Stenger, D.C., Carbonaro, D. and Duffus, J. E. (1990). Genomic characterization of phenotype variants of beet curly top virus. *J. Gen. Virol.* 71: 2211-2215.

Sugimoto, K., Otsuki, Y., Saji, S. and Hirochika, H. (1994). Transposition of the maize *Ds* element from aviral vector to the rice genome. *Plant J.* 5: 863-871.

Timmermans, M. C. P., Maliga, P. and Messing, J. (1990). The pFF plasmids:

cassettes utilizing CaMV sequence for expression of foreign genes in plants. *J. Biotech.* 14: 333-344.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.

Ugaki, M., Ueda, T., Timmermans, C.P., Vieira, J., Elliston, J. and Messing, J. (1991). Replication of a geminivirus derived shuttle vector in maize endosperm cells. *Nucl. Acid. Res.* 19. 371-377.

Zhou, L., Mitra, R., Atkinson, P. W., Hickman, A. B., Dyda, F. and Craig, N. L. (2004). Transposition of *hAT* elements links transposable elements and V(D)J recombination. *Nature* 432: 995-1001.

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導、ご鞭撻を下さいました新領域創成科学研究科宇垣正志教授、同鈴木匡助教授に心から深く感謝致します。実験を行うにあたり直接ご指導下さり、研究生活を御支援いただいたを西川尚志博士、鍵和田聡博士、根津修氏、そして当研究生活を楽しく有意義なものにしてくださいました学生の皆様に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。