

絞り花アサガオから単離
された転移調節因子の解析

稲垣善茂

①

博士学位論文

絞り花アサガオから単離
された転移調節因子の解析

平成4年度入学 稲垣善茂
指 導 教 官 井上圭三

CONTENTS

	ページ
第1章 序 論	2
第2章 色素生成系遺伝子 DFR に見い出された新トランスボゾン <i>Tpn 1</i> の同定と絞り模様形成への関与	18
第3章 アントシアニン色素生成系遺伝子 DFR の構造と機能	41
第4章 絞り花アサガオから単離された新トランスボゾン <i>Tpn 1</i> の構造解析	65
第5章 今後の展望	76
第6章 謝 辞	82

第1章

序 論

ページ

1-1. 論文の要旨	2
1-2. General Abstract	6
1-3. イントロダクション	8
1-4. 参考文献	15

1-1. 論文の要旨

【序論】

現在、遺伝子発現の制御に関する研究はそのほとんどが遺伝子のプロモーター領域の解析などの転写調節機構の解明を目的とした研究である。しかしながら、遺伝子発現の制御は転写以外にも種々のレベルで行われており、本研究のようなDNAレベルでの制御、すなわちDNA再編成による遺伝子発現の制御に関する研究は近年注目を集めている。

私は絞り花（キメラ斑）を咲かせるアサガオにおいてこの絞り模様形成が遺伝的要因によっているにも関わらず絞り模様の形成（頻度やパターン）が偶然性に支配されていること、また絞り花から2～5%の頻度で全色花（fully colored flowers）を咲かせる復帰変異体（revertants）が得られることなどからDNA再編成、特にトランスポゾンにより色素生合成系遺伝子の発現制御が行われた結果ではないかと考え、その機構の解明を試みた。

アサガオ（*Pharbitis nil*）は、奈良時代に薬用植物（牽牛子）として渡来し、江戸時代になると花色や花・葉などの形態に関する種々の変異体が園芸品種として数多く作出されている。また、その古典遺伝学的研究も昭和初期に日本人研究者により势力的に行われ、詳細な遺伝学的連鎖地図も作成されている。本研究で用いた白地に紫条のキメラ斑を生じる絞り花アサガオは、歴史的には1762年に平賀源内の「物類品鑑」に記述され、Imai（1931, 1934, 1938）により遺伝学的研究が成された系統である。また、その原因である易変性遺伝子 $a-3^f$ の座位は第5染色体上に置かれていることが知られている。なお、本実験には青色の花を咲かせる野生型アサガオを対照として用いた。

【方法及び結果】

1) アントシアニン色素生合成系遺伝子DFR中に見い出された新トランスポゾンTpn 1の同定・単離と絞り模様形成への関与

絞り花の白地部分の簡単な色素化学分析の結果、アントシアニン色素生合成経路

のうち、DFR (Dihydroflavonol-4-reductase)、AS (Anthocyanidin synthase) 及びUF3GT (UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase) 遺伝子のうちのどれかに変異が起きていることが予想された。そこで既に他の植物から単離されている各遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーション法により、それぞれのゲノミック遺伝子の構造について解析を行った。その結果、野生型と比較して絞り花アサガオのDFR遺伝子領域内には 6.4 kb のDNA配列が挿入していることが明らかとなった。そこで野生型と絞り花アサガオの両者のDFR遺伝子領域をクローン化してその構造を解析したところ、アサガオゲノム中には3コピーのDFR遺伝子 (DFR-A,-B,-C) が存在することが分かり、そのうちのDFR-B遺伝子内に6.4kbのトランスポゾンが挿入していることが明らかになった。即ち、この6.4 kb のDNA配列の末端領域には、1) トウモロコシのトランスポゾン *Spm/En*様の末端逆反復配列 (28bp) が存在し、2) 因子の両外側には、*Spm/En*が転移・挿入する際と同様の 3 bp の順繰り返し配列 (標的重複) が存在し、3) 植物のトランスポゾンにだけ特徴的に見られる、転移・脱離に伴う小さなDNA再編成 (Empty Donor Sequences) も観察された。以上から、この6.4kbのDNA配列はアサガオより初めて単離された *Spm/En*様のトランスポゾンであるので、*Tpn1* (Transposon *Pharbitis nil One*) と名付けた。

しかしながら、アサガオゲノム中にはベチュニアのDFRcDNAの5' 側にホモログをもつ領域が3コピー (DFR-A,-B,-C) 同一領域中に存在していることが分かった。そこで、DFR-B遺伝子が花卉で発現し、絞り花アサガオのDFR-B遺伝子中に挿入されていたトランスポゾン *Tpn1* が本当に絞り模様形成の原因となっているの否か検討を試みた。

まず、絞り花アサガオより2~5%の頻度で得られ、紫の全色花 (fully colored flowers) を咲かせる生殖細胞復帰変異体 (germinal revertants) を得る。次いでこれを自殖し、その次世代における絞り花アサガオの分離 (表現型) とDFR遺伝子領域の構造 (遺伝子型) を比較検討した。これらのDFR遺伝子の構造 (遺伝子型) 解析については、ベチュニアDFRをプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション法によった。もしトランスポゾン *Tpn1* が絞り模様形成の原因となっているのならば、全色花を咲かせる生殖細胞復帰変異体では、一対のDFR遺伝子のうち、一方には *Tpn1* が存在し、他方は *Tpn1* が脱離したヘテロ接合体であろう。また、それらを自家受精させた後の次世代絞り花アサガオの場合には、DFR遺伝子は共に *Tpn1* が存在するホモ接合体であるのに対して、全色花のアサガオの場合は復帰変異体と同じヘテロ接合体か、両方のDFR遺伝子中に *Tpn1* が存在しないホモ接合体であろうと考えられる。

この表現型と遺伝子型を比較した結果は上記の仮説通りとなっており、絞り花アサガオにおいては、花卉形成時に少なくとも一方の染色体上の *Tpn1* が、DFR-B遺伝子中から転移・脱離することがDFR遺伝子の再活性化のために必要であること、即ち、*Tpn1* が絞り模様形成の原因となっていることが明らかとなった。さらに、このことは、DFR-B遺伝子が花卉で発現するDFR遺伝子であることも同時に証明したと考えられる。

2) アントシアニン色素生合成系遺伝子DFRの構造と機能

アントシアニン色素は広範囲の高等植物において花色を決定する要因となっており、フラボノイド生合成経路により生合成される。このフラボノイド生合成経路の遺伝子群の多くは、トランスポゾン・タグgingにより同定・単離されている。

また、私が単離した *Tpn 1* がアントシアニン色素生合成のためのフラボノイド生合成経路の遺伝子群の一つDFR-B遺伝子内に挿入されていたことから、アサガオのDFR遺伝子について、その構造や発現様式を解析する必要があると考えた。なお、DFR遺伝子について詳しい解析が為されているものは、現在、トウモロコシとペチュニア、キンギョソウだけである。

まず、アサガオゲノム中にタンデムに並んだ3つの遺伝子 DFR-A、-B、-C 及び花卉より得られたDFR cDNAについて構造解析を試みた。その結果、DFR-B遺伝子についてはゲノミックと cDNAの両者の塩基配列の比較から、6つのエキソンが存在し、さらにプロモーター領域、ターミネーター領域と考えられる配列も見い出された。また、DFR-B遺伝子をプローブに用いた花卉のトータルRNAに対するノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、そのシグナルがシングルバンドであったことやシグナルの大きさなどから、DFR-B遺伝子だけが花卉で主に発現していることが分かった。また、絞り花アサガオにおいてシグナルが検出されなかったことから、*Tpn 1* の転移によりDFR-B遺伝子の発現が制御されていることも確認された。

なお、DFR-A 及び DFR-C 遺伝子については、残念ながらこれらに対応するcDNA は検出できなかった。さらに、DFR-C 遺伝子のエキソンと考えられる領域は5' 側の3つしか検出されず、しかもこれらの領域内には2箇所フレーム・シフト変異が見いだされたので、偽遺伝子である可能性が高いと考えられた。また、DFR-A 遺伝子の構造上の特徴についてはゲノミックの塩基配列の比較から、DFR-A遺伝子には6つのエキソンが存在し、さらにプロモーター領域、ターミネーター領域と考えられる配列も見い出された。しかしながら、DFR-A 遺伝子の潜在的機能や発現様式については今後さらに検討を試みたい。

3) 絞り花アサガオから単離された新しいトランスポゾン *Tpn 1* の構造解析

一般に、高等植物のDNA型トランスポゾンは末端逆反復配列や標的重複の塩基数などからAc/Ds系とEn/Spm系に大別できるが、この *Tpn 1* はEn/Spm系の因子であった。このEn/Spm系のトランスポゾンには、特徴的な転移酵素の作用する Subterminal repetitive regions (SRR) が存在し、転移能や植物遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしていることが知られている。また、トランスポゾンの内部には転移に必要な転移酵素をコードし、自ら転移できる自律性の因子と、転移酵素がトランスに作用したときだけ転移できる非自律性の因子に大別できる。そこで、アサガオから単離されたトランスポゾン *Tpn 1* のSRRの構造やその因子の内部構造について解析する目的で全塩基配列を決定した。

その結果、この *Tpn 1* は、全長6412 bpで、*Tpn 1* の末端近傍領域には転移酵素が認識す

と考えられるシス領域が末端から各々 650 bp と 800 bp にわたって存在しており、*En/Spm*類縁因子中最も長く、かつ、最も複雑な構造であることが明らかになった。また、*En/Spm*やその類縁のキンギョソウの *Tam 1* などの自律性の因子では、内部にコードされる転移酵素遺伝子中に特徴的な 2 ~ 3 kb の Open Reading Frame が存在していることが知られているので、*Tpn 1* 内部の Open Reading Frame を検索したところ、250 bp 以上の Open Reading Frame は因子中に3つしか存在しなかった。従って、*Tpn 1* は自ら転移することはできない非自律性の転移因子であって、アサガオゲノム中のどこかに存在する自律性因子の産出する転移酵素の作用により転移すると考えられた。

【結論と考察】

今回私が解明したのは以下の3点である。1) 絞り花アサガオの絞り模様形成の原因は、花卉での色素生合成に関与する遺伝子の一つ DFR-B 中にトランスポゾン *Tpn 1* が挿入され、不活性化されていた構造から、花卉形成時にトランスポゾン *Tpn 1* が転移・脱離することにより DFR-B 遺伝子の再活性化が行われた結果である。2) アサガオのアントシアニン色素生合成遺伝子 DFR はタンデムに3つ (DFR-A, B, C) 並んでおり、その内の DFR-B 遺伝子だけが花卉で特異的に発現していることが分かった。3) 転移能と遺伝子の発現制御能を持つトランスポゾン *Tpn 1* は 6412 bp で、自ら転移することはできない非自律性の転移因子であって、アサガオゲノム中のどこかに存在する自律性因子から産出される転移酵素の作用により転移すると考えられた。

今後、さらに絞り模様形成の制御機構、特にトランスポゾンの転移の頻度やタイピングについてのメカニズムを解明するためには、DFR-B 遺伝子や *Tpn 1* の構造と機能を明らかにすることのみならず、未知の自律性因子を単離し、その自律性因子の側からの詳しい解析が行われる必要があろう。

1-2. General Abstract

Isolation and Characterization of a New Transposable Element from Japanese Morning Glory

(1) Isolation of an *Suppressor-mutator/Enhancer*-like Transposable Element, *Tpn1*, from Japanese Morning Glory Bearing Variegated Flowers.

Japanese morning glory has an extensive history of genetic studies. Many mutants in the colors and shapes of its flowers and leaves have been isolated since the 17th century, and more than 200 genetic loci have been localized for the 10 linkage groups. They include over 20 mutable loci several with variegated flower phenotypes. In a line of Japanese morning glory bearing variegated flowers called *flecked*, a transposable element of 6.4 kb, termed *Tpn1*, was found within one of the anthocyanin biosynthesis genes encoding dihydroflavonol-4-reductase (DFR). The 6.4-kb element carries 28-bp perfect terminal inverted repeats, the outer 13 bp being identical to those of the maize transposable element *Suppressor-mutator/Enhancer* (*En/Spm*). It is flanked by 3-bp direct repeats within the second intron of the *DFR* gene, 9-bp upstream of the third exon. When somatic and germinal excision occurs it produces excision sequences characteristic of plant transposable elements. Cosegregation data of the variegated flower phenotype and the *DFR* gene carrying *Tpn1* indicate that the mutable phenotype is due to excision of *Tpn1* from the *DFR* gene. Sequences homologous to *Tpn1* are present in multiple copies in the genome of Japanese morning glory.

(2) Structural analysis of the DFR region of Japanese morning glory.

Anthocyanins are the most important group of water-soluble pigments in the higher plants and a wealth of knowledge concerning the structure, function and regulation of the genes for pigment biosynthesis has been rapidly accumulating. Various genes for anthocyanin pigmentation were identified and isolated by transposon tagging.

In the chapter, I described that the mutable allele *a-3^{flecked}* was identified to be the DFR-B gene carrying the 6.4 kb transposable element *Tpn1* belonging to the *En/Spm* family in the line of Japanese morning glory (*Pharbitis nil*) bearing white flowers with normal colored flecks and sectors. The flower variegation is due to frequent somatic excision of *Tpn1* from the DFR-B gene restoring its function. The DFR gene encoding for dihydroflavonol-4-reductase is one of the genes

involving anthocyanin pigment biosynthesis, and the genome of Japanese morning glory contains three copies of the DFR genes termed DFR-A, DFR-B and DFR-C in a row. Since the variegated pigmentation occurs not only in flowers but also in leaves and stems, the DFR-B gene must be expressed in these organs.

In this chapter, I described my results of characterizing the DFR genes in Japanese morning glory. Physical analysis revealed that three copies of the DFR genes, DFR-A, DFR-B and DFR-C, reside tandemly and that the rightmost gene, DFR-C, appears to be a pseudogene. Only the 5' part of the DFR sequence of the DFR-C gene seems to be present in the genome, and two frameshift mutations were detected in the putative exon regions of the DFR-C gene.

Comparison of the genomic DNA sequences in both DFR-A and DFR-B genes with the known DFR cDNA sequences of various plants indicates both DFR-A and DFR-B genes contain six exons. DFR cDNA obtained from flowers of Japanese morning glory confirms the notion that the DFR-B gene is predominantly expressed in the flowers and that it indeed consists of six exons. No cDNA sequence corresponding to the DFR-A or DFR-C gene was found. I also described the structural features of the regulatory regions of the DFR-B gene.

(3) Structural Analysis of *Tpn1*, a Transposable Element Isolated from Japanese Morning Glory Bearing Variegated Flowers

The 6.4 kb transposable element *Tpn1* belonging to the *En/Spm* family was found within one of the DFR (dihydroflavonol-4-reductase) genes for anthocyanin biosynthesis in the line of Japanese morning glory (*Pharbitis nil*) bearing variegated flowers. Sequencing of the *Tpn1* element revealed that it is 6412 bp long and carries 28 bp perfect terminal inverted repeats. Its subterminal repetitive regions, believed to be the *cis*-acting sequences for transposition, carry striking structural features. Twenty two copies of the 10 bp motif sequence GACAACGGTT can be found as direct or inverted repeats within the 650 bp of the 5' end of the element and 33 copies of the motif sequence within 800 bp of the 3' terminus. All these 22 copies of the motif sequence near the 5' terminus and 30 copies in the 3' end are arranged as inverted repeats and 3-8 bp AT-rich sequences are detected between these inverted repeats. In addition, 4 copies of 122 bp tandem repeats and 6 copies of 104 bp tandem repeats are present at the 5' and 3' subterminal repetitive regions, respectively. No large open reading frame characteristic of autonomous elements of *En/Spm* family can be detected within the element, suggesting that transposition of *Tpn1* appears to be mediated by an unidentified autonomous element in the genome of Japanese morning glory.

1-3. イントロダクション

現在、遺伝子発現の制御に関する研究はそのほとんどが遺伝子のプロモーター領域の解析などの転写調節機構の解明を目的とした研究である。しかしながら、遺伝子発現の制御は転写以外にも種々のレベルで行われており、本研究のような DNA レベルでの制御、すなわち DNA 再編成（非相同性の組換え）による遺伝子発現の制御は近年注目を集めている。DNA 再編成には種々の遺伝的組換え系が関与することが知られているが、それらの中で比較的によく研究されているものにトランスポゾン（転移因子）の関与する組換えがある¹⁻⁷⁾。トランスポゾンとはゲノム上を“転移”して染色体上の座位を変えうる遺伝因子の総称で、原核生物から真核生物に至る種々の生物種で見出され¹⁻³⁾、植物においてはトウモロコシ (*Zea mays*) やキンギョソウ (*Antirrhinum majus*) のアントシアニン色素合成系の遺伝子の発現を制御して絞り模様の形成に関与する転移調節因子がよく知られている^{2,4-6)}。事実、トランスポゾンは高等植物で最初に発見され、1940年代末に Barbara McClintock により、トウモロコシの穀粒 (Kernel) などで発現する遺伝子の発現を調節して、遺伝的斑入りを起こすいわゆる“調節因子” (Controlling elements) が染色体上を転移する因子として提唱された⁷⁾。

このトランスポゾンに関する分子遺伝学的研究は、先ほど述べた豊富な遺伝学的知見が累積していたトウモロコシとキンギョソウで 1980 年初頭より始められ^{5,6)}、1983年にトウモロコシ穀粒のモチ性を支配する Wx 遺伝子に挿入されていたトランスポゾン Ac 及び Ds が単離され⁸⁾、また 1984 年にキンギョソウのアントシアニン色素合成系遺伝子 Nivea に挿入されていた Tam 1 が単離されて以来⁹⁾、多数のトランスポゾンが同定・単離され、それらの構造も明らかにされた (表 1) ^{4,10-12)}。

トランスポゾンの転移機構は、因子が挿入部位から脱離し新たな部位へと再挿入する保存的転移 (conservative transposition) と、因子が脱離することなく転移に伴って新たな部位へと挿入し、重複する複製的転移 (duplicative transposition) に大別される (図 1) ^{4,10)}。トウモロコシの Ac-Ds 系、En/Spm 系やキンギョソウの Tam 系など DNA 型トランスポゾンは前者と考えられているが、中間体として RNA を介し、逆転写酵素の作用で生ずる cDNA が新たな部位へ挿入するレトロトランスポゾンは後者である^{4,10)}。

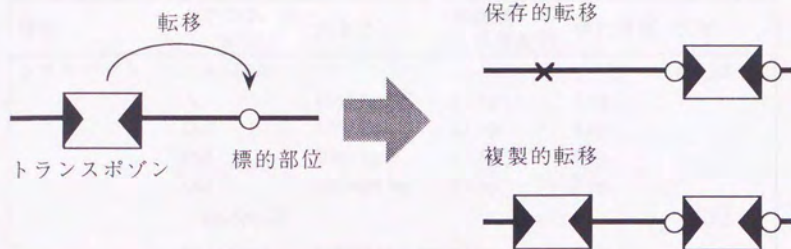


図1 保存的転移と複製的転移

植物に限らず一般にトランスポゾンとは新たに転移した部位に標的重複(target duplications)を起こす。また、植物の DNA 型トランスポゾンは転移・脱離の際、小さな DNA 再編成 (数 bp の塩基の挿入や欠失などのことで、Empty Donor Sequences, もしくは Footprints という) を引き起こす (図 2 a)。

植物	トランス ポゾン	大きさ	末端逆 反復配列	標的重複	文献
トウモロコシ	<i>Ac-Ds</i> 系				4,5,12
	<i>Ac</i>	4565 bp	11 bp	8 bp	
	<i>Ds9</i>	4369 bp	11 bp	8 bp	
	<i>Ds6</i>	2040 bp	11 bp	8 bp	
	<i>Ds1</i>	405/409 bp	11 bp	8 bp	
	<i>En/Spm</i> 系				4,5,12
	<i>En1 (Spm)</i>	8287(8283) bp	13 bp	3 bp	
	<i>Spm-s</i>	8283 bp	13 bp	3 bp	
	<i>Spm-w</i>	6.6 kb	13 bp	3 bp	
	<i>dSpm-I8</i>	2242 bp	13 bp	3 bp	
	<i>dSpm-I6078</i>	2242 bp	13 bp	3 bp	
	<i>dSpm-I5719</i>	789 bp	13 bp	3 bp	
	<i>Mu</i> 系				4,5,12
	<i>Mu1</i>	1367 bp	213/215 bp	9 bp	
	<i>Mu1.7</i>	1745 bp	0.2 kb	9 bp	
	<i>Mu7</i>	2199 bp	0.2 kb	9 bp	
	<i>Mu9</i>	4942 bp	215 bp	9 bp	13
	<i>MuA2</i>	4.8 bp	210 bp	9 bp	14
	<i>Bg-rBg</i> 系				15
	<i>Bg</i>	4869 bp	5 bp	8 bp	
	<i>rBg</i>	4.5 bp	5 bp	8 bp	
	<i>Dt-rDt</i> 系				12,16
	<i>rDt</i>	704 bp	14 bp	8 bp	
キンギョソウ	<i>Tam1</i> 系				4,6,9,12
	<i>Tam1</i>	15164 bp	13 bp	3 bp	
	<i>Tam2</i>	5 kb	14 bp	3 bp	
	<i>Tam3</i> 系				4,6,12,
	<i>Tam3</i>	3629 bp	12 bp	5/8 bp	17
ダイズ	<i>Tgm1</i>	3550 bp	13 bp	3 bp	4,12,18,19
バセリ	<i>Tpc1</i>	927 bp	15/16 bp	8 bp	12,20
エンドウ	<i>Pis1</i>	2.5 kb	12 bp	3 bp	4,12,21
	<i>lps-r</i>	0.8 kb	12 bp	8 bp	12,22
ポテト	<i>Tst1</i>	736 bp	11 bp	8 bp	23,24
アラビドプシス	<i>Tat1</i>	431 bp	13 bp	5 bp	25
	<i>Tag1</i>	3.3 kb	22 bp	8 bp	26
ペチュニア	<i>dTph1</i>	283 bp	12 bp	8 bp	27

表1 植物のDNA型トランスポゾン

表中、下線を引いたものが自律性因子、他は非自律性因子である。ここには挙げていないトランスポゾンも多数分離されつつある。

また、図2aに示すように gene X のコード領域中にトランスポゾンが転移・挿入したとすると gene X はその機能を失い、不活性化することになる。逆にトランスポゾンにより不活性化されていた遺伝子からトランスポゾンが転移・脱離した場合には、必ずとは限らないが、不活性化されていた遺伝子は再び活性化し得ることになる。即ち、DNA 型の植物のトランスポゾンには脱離の際に小さな DNA 再編成を引き起こすことが知られている (図2a)。この因子の脱離後の塩基配列を Empty Donor Sequences あるいは Footprints というが、この性質のため、植物遺伝子の不活性化がトランスポソンのコード領域への挿入が原因である場合には、トランスポゾンが不活性化された遺伝子内から転移・脱離してもその遺伝子は完全な野生型には戻らず、新しい形質を賦与する変異 (例えば発現が弱くなったり null type であったり) が固定化されることがしばしばある。この様な現象はトウモロコシやキンギョソウにおいて観察されており、トランスポゾンによる遺伝子の発現調節機構は、因子の種類や因子の遺伝子内の挿入位置や方向などにより一様ではない^{5,28)}。

また、トランスポゾン内部に活性ある転移酵素 (transposase) 遺伝子を持ち、自ら転移できるものを自律性因子 (autonomous elements)、転移酵素遺伝子を欠損したために自らは転移できないが、自律性因子が共存してその転移酵素がトランスに作用すれば転移できる因子を非自律性因子 (non-autonomous elements) という (図2b)。Ac-Ds 系における Ac は自律性因子であり、Ds は非自律性因子で、同様に En/Spm 系における En1 (Spm) もまた自律性因子であり、1/dSpm は非自律性因子である (表1)。



図2a 植物のトランスポソンの転移とそれに伴う小さなDNAの再編成

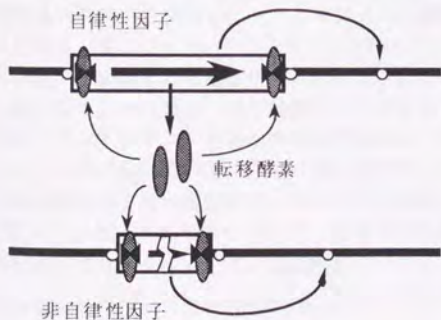


図2b 自律性因子と非自律性因子

このトウモロコシのトランスポゾン *Ac* は植物のトランスポゾン中では解析が進んでおり、その全長は 4565 bp で 11 bp の末端逆繰り返し配列 (terminal inverted repeats) を持ち (表 1)、807 アミノ酸の転移酵素をコードする転移酵素遺伝子は 5 つのエクソンと 4 つのイントロンよりなる。*Ac* の転移酵素遺伝子の 5' 側には発現制御に関与していると思われる約 650 bp の GC 含量の多い非翻訳領域がある。*Ac* の非自律性因子である *Ds* には *Ds1* のように両末端の 11 bp の逆繰り返し配列以外は相同性のないものもあるが、大部分 (例えば *Ds6* の様に) は *Ac* の転移酵素遺伝子領域の内部欠失変異体である (図 3) ^{4,5,29,30}。

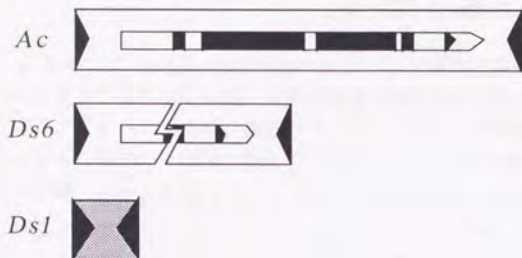


図 3 トウモロコシのトランスポゾン *Ac/Ds*

また、*En1* (もしくは *Spm*) は 8287 (8283) bp の自律性因子であり、その非自律性因子 *1/dSpm* は *En1* (*Spm*) の内部欠失変異体である ^{4,5,10-12}。

植物の DNA 型トランスポゾンはその末端逆反復配列の相同性や標的重複の塩基数などから大きく 2 つのカテゴリーに分けられる。トウモロコシのトランスポゾン *Ac* 類縁の因子と *Spm* 類縁の因子である。例えば、キンギョソウのトランスポゾン *Tam1* 系はトウモロコシの *En/Spm* 系類縁因子であり ^{4,6,9,31}、*Tam3* は *Ac* と類縁であると考えられている ^{4,6,32} (表 1 参照)。

このようなトランスポゾンが転移することにより、トランスポゾンの挿入により起こる植物遺伝子の不活性化と、トランスポゾンが脱離されて起こる植物遺伝子の再活性化が考えられる (図 2 a)。トランスポゾンの挿入により不活性化された植物遺伝子からトランスポゾンが脱離すると遺伝子は再活性化される。これが遺伝的不安定性もしくは易変性の一因であり、その結果、遺伝的絞り入りが形成されと考えられている。即ち、この転移に伴うアントシアニン色素合成系の遺伝子の再活性化が花卉の形成過程で起こったとすると、花卉の細胞群 (○で示す) は不活性化されている遺伝子しか持たぬ細胞と再活性化された遺伝子を持つ細胞のキメラとなり、結果、全体として遺伝的絞り模様形成される (図 4)。図 4 から明かなように、転移が花卉形成の早い時期に起これば、遺伝子が再活性化されて色素を生成している細胞群よりなるセクターは大きくなり、転移が高頻度で起こればそれだけセクターの数も増える ^{4,10,33}。

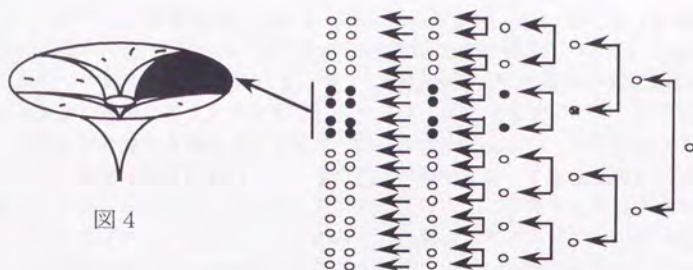


図 4

Ac あるいは *En/Spm* などトランスポゾンの構造や機能が分かり始めると、ゲノム DNA 上を転移しうるトランスポゾンの性質を有用な遺伝子のタグgingに利用できないかということが考えられ始めた。遺伝子タグgingとは、既知の DNA 断片を未知の遺伝子内に挿入させて既知の DNA 断片をプローブとして未知遺伝子を単離・同定する方法であり^{10,34-38}、転移能を持つトランスポゾンをこの既知 DNA 断片として用いることができるのではないかと考えられたのである。このトランスポゾンを用いた遺伝子のタグging法をトランスポゾン・タグgingと言う。事実、トウモロコシ穀粒のモチ性を支配する *Wx* 遺伝子内に挿入されていたトランスポゾン Ac が分離されると⁸⁾、この単離された Ac の塩基配列をプローブとして、Ac が遺伝子内に挿入されていることが既に遺伝学的に明らかにされていたアントシアニン色素合成系の遺伝子の一つ *Bz* 遺伝子⁹⁾がその翌年にはこの方法で単離された¹³⁾。これが、トランスポゾン・タグgingにより有用遺伝子が単離された最初の成功例である。ある遺伝子の産生物の機能や発現のタイミングの違いなどから有用遺伝子を単離する従来の単離法以外のこの新しい単離法、即ちトランスポゾン・タグgingは生成物の機能が不明な遺伝子を変異形質を指標として同定できるが故に、未知有用遺伝子の単離法として、また単離法の手段としてのトランスポゾンやそのトランスポゾンの転移機構も含めて近年注目されている^{10,34-38}。最近では、これらのトウモロコシ由来のトランスポゾン Ac や *En/Spm* を異種植物中（アラビドプシス、ペチュニア）に導入し、この異種植物中においてこれらのトランスポゾンを可動させることにより易変性変異体を分離し、そこから未知の有用な遺伝子（根や根毛の形成に関わる *Drl1* 遺伝子、離ずいの稔性に関わる *Ms2* 遺伝子、花色に関わる *Ph6* 遺伝子）を単離することに成功し始めた（表 2）³⁹⁻⁴¹。

トランスポゾン	導入された異種植物	単離された遺伝子	文献
Ac	ペチュニア	<i>Ph6</i>	39
Ac, Ds	アラビドプシス	<i>Drl1</i>	40
<i>En1 (Spm)</i> , <i>I (dSpm)</i>	アラビドプシス	<i>Ms2</i>	41

表 2 異種植物におけるトランスポゾン・タグging

このように、高等植物におけるトランスポゾン、1) どのようなメカニズムによりDNA配列が可動するのか(特にその転移機構と制御機構について)というトランスポゾン自身への興味においても、2) また、DNAレベルでの遺伝子発現調節を行うということ(遺伝子発現のスイッチングとして)、3) そしてすでにアントシアニン色素合成系の花色などに関する遺伝子や花形成に関わる遺伝子などいくつか重要なものが単離されているが、同種植物中においても、また異種植物中においても未知の有用遺伝子を単離する道具(トランスポゾン・タグging)として使うことができるという点からも、最近非常に注目をあびているものの一つであろう。植物のトランスポゾンの分子生物学的・分子遺伝学的研究が始まって約10年、トランスポゾンについて解決しなければならない問題はまだまだ数多く存在しているのが現状である。

1-4. 参考文献

- 1) Mobile Genetic Elements (ed. shapiro, J.A.) Academic Press, New York. (1983).
- 2) Mobile DNA (eds. Berg, D.E., Howe, M.M.) American Society for Microbiology, Washington, D.C.(1989).
- 3) Campbell, A., Berg, D., Botstein, D., Lederberg, E., Novick, R., Starlinger, P., Szybalski, W.: in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes, Nomenclature of transposable elements in prokaryotes. (eds. Bukhari, A.I., Shapiro, J.A., Adhya, S.L.), P.15-22, Cold Spring Harbar Lab., Cold Spring Harbor, New York (1977).
- 4) 飯田 滋・町田泰則: (シリーズ分子生物学の進歩 13) 高等植物の情報発現と制御 日本分子生物学会編(岡田・池田編) pp.9-56. 丸善 東京 (1990).
- 5) Fedoroff, N.V. (1989): Maize transposable elements., 文献 2) pp.375-411.
- 6) Coen, E.S., Robbins, T.P., Almeida, J., Hudson, A., Carpenter, R. (1989):Consequences and mechanisms of transposition in *Antirrhinum majus*., 文献 4) pp.413-436.
- 7) McClintock, B.: Mutable loci in maize., Carnegie Inst. Wash. Year Book, 48, 142-154 (1949).
- 8) Fedoroff, N., Wessler, S., Shure, M.: Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*., Cell, 35, 235-242 (1983).
- 9) Bonas, U., Sommer, H., Harrison, B.J., Saedler, H.: The transposable element *Tam1* of *Antirrhinum majus* is 17 kb long., Mol. Gen. Genet., 194, 138-143 (1984).
- 10) 飯田 滋・稲垣善茂・島本 功: 「植物の転移因子とトランスポゾンタギング」 蛋白質 核酸 酵素 37, 695-709 共立出版 (1992).
- 11) 大坪久子: 「トランスポゾンによるゲノムの再編成」 細胞工学 臨時増刊 10 Suppl.1 51-71. (1991).
- 12) 大坪久子: 「植物のトランスポゾン」 蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊 37, 1047-1059 共立出版 (1992).
- 13) Hershberger, R.J., Warren, C.A. and Walbot, V.: Mutator activity in maize correlates with the presence and expression of the *Mu* transposable element *Mu9*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10198-10202 (1991).
- 14) Qin, M., Robertson, D.S. and Ellingboe, A.H.: Cloning of the Mutator transposable element *MuA2*, a putative regulator of somatic mutability of the *a1-Mum2* allele in maize., Genetics, 129, 845-854 (1991).
- 15) Hartings, H., Spilmont, C., Lazzaroni, N., Rossi, V., Salamini, F., Thompson, R.D., Motto, M.: Molecular analysis of the *Bg-rBg* transposable element system of *Zea mays* L., Mol. Gen. Genet., 227, 91-96 (1991).

- 16) Brown, J.J., Mattes, M.G., O'Reilly, C., and Shepherd, N.S.: Molecular characterization of *rDt*, a maize transposon of the "Dotted" controlling element system., *Mol. Gen. Genet.*, 215, 239-244 (1989).
- 17) Sommer, H., Carpenter, R., Harrison, B.J. and Saedler, H. (1985): The transposable element *Tam3* of *Antirrhinum majus* generates a novel type of sequence alterations upon excision., *Mol. Gen. Genet.*, 199, 225-231.
- 18) Rhodes, P.R., Vodkin, L.O.: Highly structured sequence homology between an insertion element and the gene in which it resides., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 493-497 (1985).
- 19) Rhodes, P.R., Vodkin, L.O.: Organization of the *Tgm* family of transposable elements in soybean., *Genetics*, 120, 597-604 (1988).
- 20) Herrmann, A., Schulz, W., and Hahlbrock, K.: Two alleles of the single-copy chalcone synthase gene in parsley differ by a transposon-like element., *Mol. Gen. Genet.*, 212, 93-98 (1988).
- 21) Shirsat, A.H.: A transposon-like structure in the 5' flanking sequence of a legumin gene from *Pisum sativum*., *Mol. Gen. Genet.*, 212, 129-133 (1988).
- 22) Bhattacharyya, M.K., Smith, A.M., Noel Ellis, T.H., Hedley, C., and Martin, C.: The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme., *Cell*, 60, 115-122 (1990).
- 23) Koster-Topfer, M., Frommer, W.B., Rocha-Sosa, M., and Willmitzer, L.: Presence of a transposon-like element in the promoter region of an inactive patatin gene in *Solanum tuberosum*., *Plant Mol. Biol.*, 14, 239-247 (1990).
- 24) Kikuchi, S., Liu, X., Frommer, W.B., Koster-Topfer, M. and Willmitzer, L.: Identification and structural characterization of further DNA elements in the potato and pepper genomes homologous to the transposable element-like insertion *Tst1*., *Mol. Gen. Genet.*, 230, 494-498 (1991).
- 25) Peleman, J., Cottyn, B., Van Camp, W., Van Montagu, M., and Inze, D.: Transient occurrence of extrachromosomal DNA of an *Arabidopsis thaliana* transposon-like element, *Tat1*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3618-3622 (1991).
- 26) Tsay, Y.-F., Frank, M.J., Page, T., Dean, C. and Crawford, N.M.: Identification of a mobile endogenous transposon in *Arabidopsis thaliana*., *Science*, 260, 342-344 (1993).
- 27) Gerats, A.G.M., Huits, H., Vrijlandt, E., Marana, C., Souer, E., and Beld, M.: Molecular characterization of a nonautonomous transposable element (*dTph1*) of petunia., *Plant Cell*, 2, 1121-1128 (1990).
- 28) Weil, C.F., Wessler, S.R.: The effects of plant transposable element insertion on transcription initiation and RNA processing., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41, 527-552 (1990).
- 29) Kunze, R., Stochaj, U., Laufs, J., Starlinger, P.: Transcription of transposable element *Activator (Ac)* of *Zea mays* L., *EMBO J.*, 6, 1555-1563 (1987).

- 30) Coupland, G., Baker, B., Schell, J., Starlinger, P.: Characterization of the maize transposable element *Ac* by internal deletions., *EMBO J.*, 7, 3653-3659 (1988).
- 31) Nacken, W.K.F., Piotrowiak, R., Saedler, H., Sommer, H.: The transposable element *Tam1* from *Antirrhinum majus* shows structural homology to the maize transposon *En/Spm* and has no sequence specificity of insertion., *Mol. Gen. Genet.*, 228, 201-208 (1991).
- 32) Hehl, R., Nacken, W.K.F., Krause, A., Saedler, H., Sommer, H.: Structural analysis of *Tam3*, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveals homologies to the *Ac* element from maize., *Plant Mol. Biol.*, 16, 369-371 (1991).
- 33) 飯田 滋, 稲垣善茂, 久富恵世, 星野 敦: 「アサガオの花色とトランスポゾン」 化学と生物, 31, 492-494 (1993). 日本農芸化学会編, 学会出版センター刊
- 34) Wienand, U., Saedler, H.: in *Plant DNA Infections Agents, Plant transposable element: unique structures for gene tagging and gene cloning.*, (eds. Hohn, T.H., Schell, J.) pp.205-227 Springer-Verlag, Wien (1987).
- 35) Shepherd, N.S.: in *Plant Molecular Biology, A Practical Approach, Transposable elements and gene-tagging.*, (ed. Shaw, C.H.) pp.187-220, IRL Press, Oxford (1988).
- 36) Balcells, L., Swinburne, J., Coupland, G.: Transposons as tools for the isolation of plant genes., *Trends in Biotech.*, 9, 31-37 (1991).
- 37) 平山隆志・岡穆宏: 蛋白質 核酸 酵素 35, 2457-2467 共立出版 (1990).
- 38) 岡田吉美・飯田滋: 「遺伝子工学的分子育種技術の現状と将来」 現代化学増刊 20 植物バイオテクノロジーII (山田・岡田編) P.233-264 (1991).
- 39) Chuck, G., Robbins, T., Nijjar, C., Ralston, E., Courtney-Gutterson, N. and Dooner, H.K.: Tagging and cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element *Activator*., *Plant Cell*, 5, 371-378 (1993).
- 40) Bancroft, I., Jones, J.D.G. and Dean, C.: Heterologous transposon tagging of the *DRL1* locus in *Arabidopsis*., *Plant Cell*, 5, 631-638 (1993).
- 41) Aarts, M.G.M., Dirkse, W.G., Stiekema, W.J. and Pereira, A.: Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*., *Nature*, 363, 715-717 (1993).

色素合成系遺伝子 (DFR) に見い出された新しいトランスボゾン *Tpn 1* の同定と紋り模様形成への関与

2-1. 序論	18
2-2. 実験方法及び材料	21
2-3. 結果	23
2-4. 結論と考察	35
2-5. 参考文献	37

2-1. 序論

数多くの高等植物のアントシアニン色素合成経路に関する易変性変異体が分離されているにもかかわらず¹⁾、その易変性の表現型がトランスボゾンによっていることが分子遺伝学的に詳しく解析をされているものは、現在のところトウモロコシとキンギョソウしかない²⁻⁵⁾。これらの既に分子遺伝学的に解析されている易変性変異体のうち、最も易変性が起こっている頻度の高い遺伝子の一つが dihydroflavonol-4-reductase (DFR、トウモロコシでは *Al* キンギョソウでは *pallida*) である⁶⁻⁹⁾。このDFR遺伝子中で見つかったトランスボゾンには、トウモロコシでは、自律性因子の *En/Spm* や非自律性因子の *I/dSpm* が、またキンギョソウでは自律性因子 *Tam3* がある。さらに、ペチュニアのDFR-C遺伝子においては、非自律性因子 *dTph1* が見つかった¹⁰⁾。これらの因子のすべてにおいて、トランスボゾンの特徴である末端逆反復配列や標的重複、そして転移・脱離した証拠といえる小さなDNA再編成 (Empty Donor Sequences) も見つかった。トランスボゾンにより不活性化されたDFR遺伝子の発現様式はその挿入しているトランスボゾンの位置や方向により左右されていることが知られている。

アサガオ (牽牛子) (Japanese morning glory, 学名 *Pharbitis nil*) は日本では伝統的な園芸品種であり、生理学的かつ遺伝学的知見が数多く蓄積している植物の一つである¹¹⁾。1930年代には、既に約 200 以上の遺伝子座が 10 の連鎖群にまとめられた連鎖地図も作成されている¹²⁻¹⁴⁾。その中には紋り模様の花を咲かせる易変性変異体が存在しており¹⁵⁾、その内の一つが歴史的には1762年に平賀源内の「物類品隣」¹⁶⁾に記述され、Imaiによりその遺伝学的研究が成された品種である^{12,15,17)}。その易変性変異遺伝子 *a-3^f*¹³⁾ はアントシアニン色素合成系遺伝子 *A-3* が易変性 (*flecked*) になったもの (Imai はこれを *w2b^f* とした¹²⁾) で、座位が第5染色体上に置かれている白地に紫のスポットやセクターのキメラ斑を生じる紋り花アサガオである (図1B, C, D)^{13,14)}。この表現型は

花卉や茎、葉脈のアントシアニン色素生成に関して劣性で、それゆえこの絞り模様は白色の劣性から有色の優勢が高頻度に出る体細胞変異と考えられた。

アサガオの花の花卉の着色は、第1相で非常に濃く、第2相で薄く、そして第3相ではほとんど見えないくらい薄く着色する。なお、茎は第2相が茎の着色を決定している^{17,18}。従って、この絞り花からは、第1相あるいは第2相だけが一部分だけ着色するメリクリナル・キメラ¹⁹ (mericlinal chimera) (図1 D, E, F) や第1相あるいは第2相あるいはその両方がすべて着色するペリクリナル・キメラ¹⁹ (periclinal chimera) のような花も咲かせる(図1 G, H)。この内、第2相のペリクリナル・キメラとなった花の次世代にだけ全色花 (fully colored flowers)、いわゆるリバータント (生殖細胞復帰変異体) が生じ、この頻度は2~5%の頻度であることが知られている^{15,17}。

このアサガオの絞り花において、未知のトランスポゾンが花卉のアントシアニン色素生成系の遺伝子の発現を調節している可能性を検討し、色素生成に関与する DFR 遺伝子内にトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* 類縁の因子で、6.4 kb の新転移調節因子 *Tpn 1* (Transposable element *Pharbitis nil 1*) が挿入していることを見い出した。また、この *Tpn 1* がDFR遺伝子の発現を制御しており、絞り模様形成の原因となっていることも分子遺伝学的実験の結果から確認された。

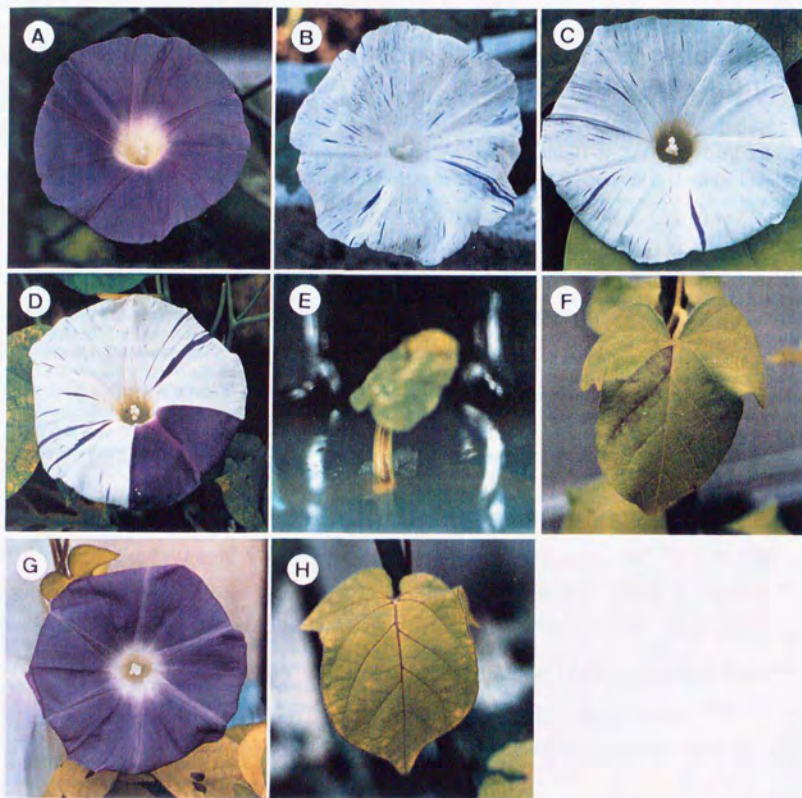


図1 絞り花アサガオの表現型

(A) 全色花アサガオ KK/ZSK-2, (B) 絞り花アサガオ KK/SSB-3, (C) and (D) 絞り花アサガオ KK/SSB-3, (E) and (F) 絞り花アサガオ KK/SSB-3, (G) and (H) KK/SSB-3 由来のジャーミナル・リバータント (生殖細胞復帰変異体)

2-2. 実験方法及び材料

アサガオ (*Pharbitis nil*) の系統について

本研究で用いた絞り花アサガオの2系統 (KK/SSB-3, KK/SSB-4) は遺伝学的には雀斑 (そばかす/flecked)、園芸上は時雨絞りと呼ばれるもので、その遺伝子名を $a-3^f$ あるいは $w2b^f$ と呼び、江戸時代に分離され、昭和 10 年代に詳細な遺伝学的研究の行われた系統である¹²⁻¹⁵⁾ (図 1 B, C, D)。また、原種に近いと考えられており、青色の花を咲かせる中国産のアサガオの一系統 (KK/ZSK-2) を、対照の全色花として用いた (図 1 A)。これら3つの系統は笠原氏の個人的なコレクションから分与された。なお、KK/SSB-3 には洲浜 (*reracted*) といわれる変異が入っており、これは子葉や葉の形態が丸みを帯び、花卉が大きくなり、曜の数は5以上になる¹²⁾ (図 1 B, E, F, G, H)。KK/SSB-3, KK/SSB-4 の両方には黄葉 (*yellow*) の変異も入っており、個体全体が、黄緑がかった色になっている¹²⁾ (図 1 E, F, H)。

アサガオの染色体DNAの単離と分析

アサガオの染色体DNAを分離するために、アサガオは無菌状態がグリーン・ハウスで育てた。アサガオのDNAは葉から hexadecyltrimethylammonium bromide 法²⁰⁾により分離した。DNA gel blot hybridization は $10\mu\text{g}$ のDNAを制限酵素で処理し、0.8%のアガロース gel で電気泳動し、Molecular Cloning^{21,22)} によりサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブは3種類、パチュニア dihydroflavonol-4-reductase (DFR)-A cDNA 1.5 kb²³⁾、キンギョソウ Anthocyanidin synthase (AS) cDNA 1.3 kb、(遺伝子座名: *Candi*)²⁴⁾、トウモロコシ UDP-glucose : Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (UF3GT) Genomic DNA 2.2 kb、(遺伝子座名: *Bzl*)²⁵⁾を用いた。

クローニング

一般的な genomic DNA のクローニングはMolecular Cloning²¹⁾に記載された方法に従って行った。各々 $100\mu\text{g}$ の Plant DNA を完全に *Bgl*II と *Bam*HI で処理し、ショ糖濃度勾配によりその大きさを分画した。全色花 A-3 由来のアサガオ (KK/ZSK-2) のDFR遺伝子領域を含む 17.3 kb の *Bgl*II 断片を λ GEM11 (Promega) の *Bam*HI site にクローニングし、 λ GEM11-DFRwt5141 と命名した。これについては pUC7 プラスミドにサブクローニングを行った。絞り花 $a-3^f$ 由来のアサガオ (KK/SSB-4) のトランスポゾン *Tpn 1* を含む 18.6 kb の *Bam*HI 断片を λ GEM11 (Promega) の *Bam*HI site にクローニングし、 λ GEM11-DFRf611 と命名した。これについては pBluescript SK⁻ プラスミド (Stratagene)

にサブクローンを行った。これらのサブクローンは適当な長さのDNA断片として pBluescript SK⁺ プラスミドに入れ、必要に応じてそれぞれDNAシーケンシングを行った。

PCR (Polymerase Chain Reaction) によるDNA増幅とDNAシーケンシング

Tpn 1 が転移・脱離した跡にできる小さなDNAの再編成 (Empty Donor Sequences) について解析を行うつもりで、PCR (Polymerase Chain Reaction) のためのプライマーを図Xに示すようにデザインした。これらのプライマーの配列は以下の通りである。

DI2: 5'-GAGGGGATCCGCTATGAGTAAAC-3'

DE3: 5'-CGTTGAGGATCCCGGCAGAGG-3'

TE1: 5'-CCATTCGGAACACCACACCG-3'

TE5: 5'-CTACGTTTGATGTGATGAGC-3'

DI2 と DE3 のプライマー中にはアンダーラインで示したように *Bam*HI site を人工的に作り、サブクローニングをしやすいようにした。プライマー DI2 と DE3 を用いた *Tpn 1* が転移・脱離した跡にできる小さなDNAの再編成 (Empty Donor Sequences) についてのPCR解析は、40サイクル、94℃30秒、61℃1分、72℃1分で行った。KK/SSB-3 における *Tpn 1* と DFR-B遺伝子とのジャンクションについてのPCR解析は、プライマー DI2 と TE1 を用いたPCRが40サイクル、94℃40秒、54℃1.5分、72℃3.5分で、また、プライマー TE5 と DE3 を用いたPCRが40サイクル、94℃40秒、56℃1.5分、72℃3.5分で行った。なお、DNAシーケンシングはサンガー法に従った²⁶⁾。

2-3. 結果

絞り花及び金色花アサガオのDFR遺伝子領域の構造

絞り花アサガオの2系統はその絞りの頻度に違いがある。どちらも大きなセクターが形成されているにも関わらず(図1D)、KK/SSB-3に比べて、KK/SSB-4は明らかにその絞りの頻度やジャーミナル・リパータントの出現する頻度が低かった(図1B, C)。また、青色花を咲かせるKK/ZSK-2を、対照の金色花として用いた(図1A)。なお、KK/SSB-3に関しては、KK/SSB-4に比べて子葉や葉の形態、花の曜の数について変異が入っている(実験方法及び材料を参照)。絞り花においては、花卉だけでなく幼軸、茎、葉脈にも絞りは見られる(図1E, F)。その絞り花由来のジャーミナル・リパータントにおいては、花卉だけでなく葉脈についても金色(fully colored)となる(図1G, H)。

図2には、簡略化したアントシアニン色素合成系経路を示す^{27, 28)}。絞り花の花卉の白色部分について簡単な色素分析をしたところ、フラボノールが検出された²⁹⁾(斎藤：私信)。従って、カルコン・シンターゼ(chalcone synthase; CHS)や、カルコン・イソメラーゼ(chalcone isomerase; CHI)や、フラボン-3-ヒドロキシラーゼ(flavanone-3-hydroxylase; F3H)はすべて活性があり、ジヒドロフラボノール-4-レダクターゼか、アントシアニン・シンターゼ(Anthocyanidin synthase; AS キングヨソウでは遺伝子座名 *Candi*)か、UDP-グルコース・フラボノイド・グリコシルトランスフェラーゼ(UDP-glucose : flavonoid glucosyltransferase; UF3GT トウモロコシでは遺伝子座名 *Bz1*)が $a-3^f$ の原因遺伝子である可能性が高いと考えられた(図2)。なお、*Candi* 遺伝子はジオキシゲナーゼ(dioxygenase)をコードしていると考えられている²⁸⁾。

アサガオの genomic DNA は2系統の絞り花アサガオ(KK/SSB-3 と KK/SSB-4)と1系統の金色花アサガオ(KK/ZSK-2)の葉から抽出し、ペチュニアのDFR cDNA²³⁾をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。この結果を、図3Aに示す。金色花アサガオ(A-3)では12.2 kbであった *Bam*HI 断片が、2つの系統の絞り花アサガオ($a-3^f$)の両方とも18.6 kbの位置にバンドがシフトしていた。このことは両方の絞り花アサガオの両方ともにDFR遺伝子領域に6.4 kbのDNA断片が挿入していることを意味している。また、*Bgl*IIで処理したときには、絞り花アサガオでは13.7 kbと8.8 kbになるのに対して、金色花アサガオでは17.3 kbになる。それゆえ、挿入DNA配列は *Bam*HI siteは持っていないが、*Bgl*II siteは少なくとも2か所以上持っていると考えられた。

2系統の絞り花アサガオ(KK/SSB-3 と KK/SSB-4)のサザンハイブリダイゼーションの結果はうっすらと現われるフェイント・バンドの濃さ以外は一致している。このフェイント・バンドは、金色花アサガオ(A-3)ではっきりと見られる12.2 kbの *Bam*HI のバンドと17.3 kbの *Bgl*II のバンドと一致する。この結果を長時間焼き付けるとこのフェイント・バンドはKK/SSB-4よりもKK/SSB-3の方が濃く現われることが分かった(データは示さず)。従って、この結果が示しているのは、この金色花アサガオ(A-3)ではっきりと見られる12.2 kbの *Bam*HI のバンドと17.3 kbの *Bgl*II のバンドと一致するフェイント・バンドは体細胞上での6.4 kbのトランスポゾンの転移を示していると考え

られた。なお、AS (キンギョソウの *Candi*) 遺伝子²⁴⁾や UF3GT (トウモロコシの *Bz1*) 遺伝子²⁵⁾をプロープに用いたサザンハイブリダイゼーションでは図3B に示すようにならん変化は見られなかった。

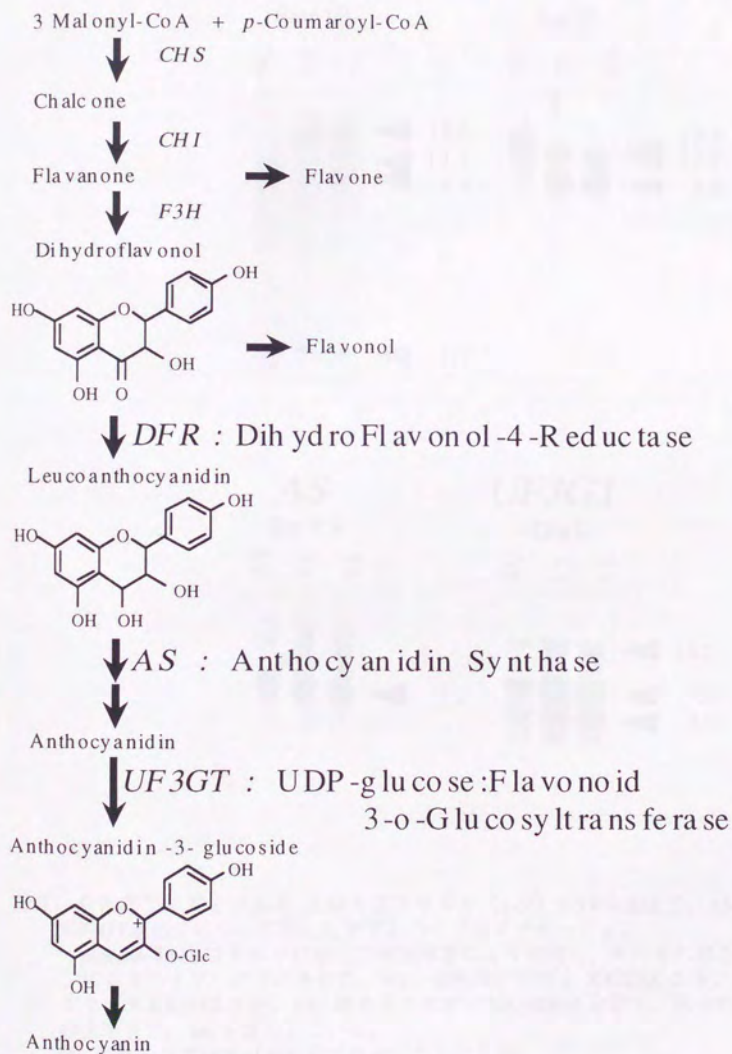


図2 アントシアニン色素生合成系経路

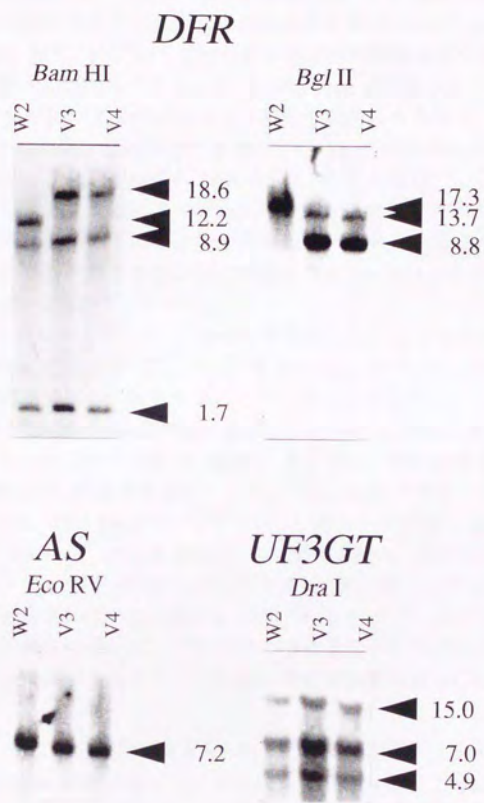


図3 全色花アサガオ (A-3) と絞り花アサガオ ($a-3^f$) のDFR遺伝子、AS遺伝子及びUF3GT遺伝子について行ったサザンハイブリダイゼーション

genomic DNA はそれぞれ示した制限酵素により処理し、それぞれ示されたプローブによりハイブリダイズさせた。W2: 全色花アサガオ KK/ZSK-2 を、V3: 絞り花アサガオ KK/SSB-3 を、V4: 絞り花アサガオ KK/SSB-4 を示す。図中の数はバンドの大きさで、kb を表わしている。

(A) ペチュニアDFR cDNA をプローブとしたとき。

(B) キンギョソウ AS 遺伝子(*Candi*)かまたはトウモロコシ UF3GT 遺伝子(*BzI*)をプローブとしたとき。

6.4 kb のトランスポゾン *Tpn1* をもつ DFR 遺伝子領域の構造解析

全色花アサガオ (A-3) と絞り花アサガオ (a-3^f) の DFR 遺伝子領域を解析するために、KK/ZSK-2 から 17.3 kb の *Bgl*III 断片を、また KK/SSB-4 からは 18.6 kb の *Bam*HI 断片をクローニングした (図 3 A 参照)。次いでこれらについて制限酵素地図を作成し、全色花アサガオの 17.3 kb の断片についてベチュニアの DFR cDNA の 5' 側 0.5 kb の DNA 断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行って DFR にホモロジーのある領域を検索した (図 4 A)。その結果、全色花アサガオの 17.3 kb の断片中には 3 か所に DFR ホモログが存在しており、これをそれぞれ DFR-A、-B、-C と名付けた。これらはさらに詳しく解析した結果、図に示す範囲にタンデムに存在していることが分かった (これについては次章で詳しく解析しているのでそこを参照してほしい)。また、図 1 のサザンハイブリダイゼーションから予想されたようにやはり 6.4 kb のトランスポゾンには *Bgl*III site が 2 つ、*Bam*HI site は存在しなかった。

図 3 A と図 4 A の結果を合わせて考えると *Bam*HI で処理したときに W2 に見られる 3 つのバンド、12.2 kb, 8.9 kb, 1.7 kb (ただし、V3, V4 では 12.2 kb のバンドが 18.6 kb にシフトしている) を制限酵素地図と一致させることができた。すなわち、12.2 kb (18.6 kb) には DFR-A 遺伝子の 3' 側の一部と DFR-B 遺伝子のすべてと DFR-C 遺伝子の 5' 側の一部が含まれていた。8.9 kb のバンドには DFR-C 遺伝子の一部分が含まれており、1.7 kb のバンドには、DFR-A の 5' 側が含まれていた。また、*Bgl*III で処理したときの V3, V4 のバンドのパターンでは、13.7 kb のバンドに DFR-A 遺伝子の全長と DFR-B 遺伝子の 5' 側が含まれており、8.8 kb に DFR-B 遺伝子の 3' 側と DFR-C 遺伝子が含まれていた。もちろん、クローニングした *Bgl*III で処理したときの W2 のバンド 17.3 kb には DFR-A、-B、-C のすべてが含まれている。図 3 A に示されるサザンハイブリダイゼーションのそれぞれのバンドの濃さの違いは、アサガオの DFR 遺伝子とベチュニアの DFR 遺伝子のそれぞれのエクソンにおけるホモロジーの違いや切断位置の違いに由来していると考えられた。

絞り花アサガオ (a-3^f) では、全色花アサガオ (A-3) DFR-B 遺伝子の *Eco*RV-*Pst*I 断片 (1.5 kb) 中に 6.4 kb の DNA 配列が挿入していることが分かった。この全色花アサガオの 1.5 kb 断片をベチュニアやキンギョソウの DFR cDNA の塩基配列と比較すると、この 1.5 kb 中に DFR 5' 側の 3 つのエキソンが存在していることが分かった (次章参照)。

この DFR-B 中に存在する 6.4 kb の DNA 配列がトランスポゾンであるのかどうか確かめるために、絞り花アサガオ (KK/SSB-4) における DFR-B 遺伝子と 6.4 kb の DNA 配列のジャンクションについて塩基配列を決定した (図 4 B)。6.4 kb の DNA 配列は外側 13 bp がトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* とまったく同じな 28 bp の末端逆反復配列 (Terminal Inverted Repeats, 表 1 参照) を持ち、DFR-B 遺伝子の第 3 エクソン 9 bp 上流第 2 イントロン中に 3 bp, AAA, をその因子の前後に重複させて挿入していた (図 4 B)。トウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* 類縁の因子はその挿入の際に 3 bp の標的重複を起こすことが知られている^{3,5)}。また、KK/SSB-3 における絞り花アサガオの DFR-B 遺伝子と 6.4 kb の DNA 配列のジャンクションについても PCR を用いて増幅し、KK/SSB-4

と同じであることを確認した。

さらに、DFR-B遺伝子中からこのトランスポゾンが体細胞的に転移・脱離した跡に残る小さなDNAの再編成 (Empty Donor Sequences) も得られている。これらは KK/SSB-4 から得られた 12.2 kb の DNA 断片中に存在していたものや、KK/SSB-3 や KK/SSB-4 より PCR により増幅された 0.25 kb の DNA 断片に見つかったもので、これらをまとめて表2に示した。

したがって、この 6.4 kb の DNA 配列はトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* 類縁のトランスポゾンであることが分かり、アサガオの新しいトランスポゾン (転移調節因子) ということで *Tpn1* (Transposable element *Pharbitis nil* 1) と命名した。

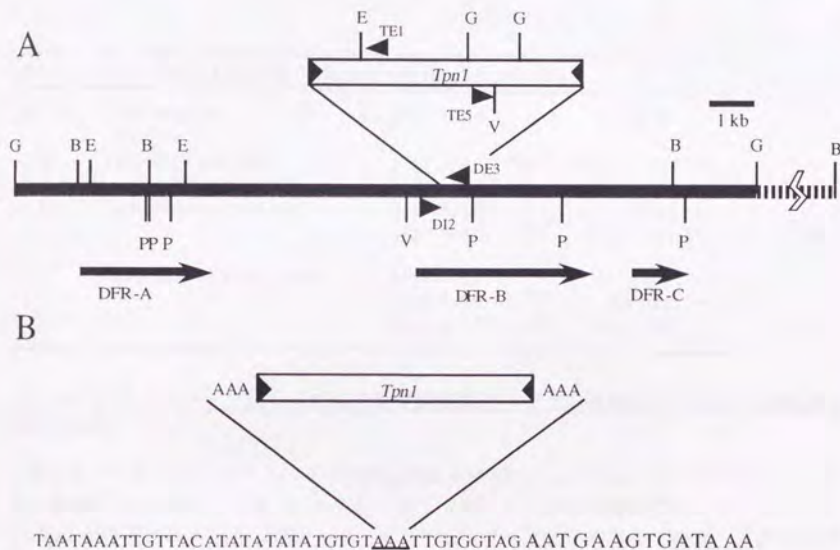


図4 アサガオ A-3 と a-3^f の DFR 遺伝子領域の構造

(A) A-3 の 17.3 kb の *Bgl*II 断片の制限酵素地図、a-3^f には *Tpn1* の挿入が見つかった。制限酵素切断部位は B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; G, *Bgl*II; P, *Pst*I; V, *Eco*RV である。太い黒線は 17.3 kb の *Bgl*II 断片を示している、太い点線はまだクローニングしていないが、図 3 A で示された 8.9 kb の *Bam*HI 断片を示している (スケールは合わせてない)。また、ペチュニアの 5' 側 0.5 kb 断片とホモログをもつ 3 つの領域について詳しく解析した結果 (詳細は次章)、太い矢印で示される方向とその長さで示される領域にそれぞれの DFR 遺伝子領域が存在していた。黒三角で示されたものは、PCR 増幅で用いたプライマーである (実験方法及び材料参照)。

(B) DFR-B 遺伝子における *Tpn1* が挿入されている近傍領域の塩基配列。太字はアサガオ DFR 遺伝子の第 3 エクソンを示す。また、*Tpn1* が挿入されている位置、AAA、を下線で示した。

表1. *En/Spm* 類縁因子の末端逆反復配列 (Terminal Inverted Repeats)

因子	長さ	TIRs	Sequence	標的重複	植物	文献
<i>Spm/En</i>	8283/8286 bp	13bp	CACTACAAGAAAAA --- TTTCTTGTAGTG	3bp	トウモロコシ	8,30)
<i>Tam1</i>	15164bp	13bp	CACTACAACAAAAA --- TTTGTTGTAGTG	3bp	キンギョソウ	31)
<i>Tam2</i>	5kb	14bp	CACTACAACAAAAA --- TTTTGTGTAGTG	3bp	キンギョソウ	32)
<i>Tam4</i>	4329bp	14bp	CACTACAACAAAAA --- TTTTGTGTAGTG	3bp	キンギョソウ	33)
<i>Tgm1</i> (<i>Tgm2</i>)	3.5 kb 12kb	13bp	CACTATTAGAAAAA --- TTTTGTAGTG	3bp	ダイズ	34)
<i>Pis1</i>	2.5 kb	12bp	CACTACGCCAAA --- TTTGGCGTAGTG	3bp	エンドウ	35)
<i>Tpn1</i>	6412 bp	28bp	CACTACAAGAAAAATGCACAATA --- ---GTTGCTATGTGCATTTTCTTGTAGTG	3bp	アサガオ	

表2. 小さなDNA再編成 (Empty Donor Sequences)

A-3	(wild type)	--- gtgt AAA	ttgt ---
a-3f	(flecked mutant)	--- gtgt AAA <i>Tpn1</i> AAA	ttgt ---
a-3+	(germinal excision)	--- gtgt AAA --- gtgt AAA TT	ttgt --- AAA ttgt ---
a-3f	(somatic excision)	--- gtgt AAA --- gtgt AAA TT	ttgt --- AA ttgt --- AAA ttgt ---

ジャーミナル・リバートント (生殖細胞復帰変異体) とその次世代アサガオのDFR-B遺伝子の構造

全色花アサガオにはベチュニアのDFR cDNA の5'側 0.5 kb のDNA断片にホモロジーのある領域が3か所 DFR-A, -B, -C と存在する。そのうちのDFR-B遺伝子中にトランスポゾン *Tpn1* が挿入されていた (図4A)。そこで、DFR-B遺伝子が花卉で発現し、絞り花アサガオのDFR-B遺伝子中に挿入されていたトランスポゾン *Tpn1* が本当に絞り模様形成の原因となっているのか否か検討を試みた。

まず、絞り花アサガオより2~5%の頻度で得られ、紫の全色花 (fully colored flowers) を咲かせる生殖細胞復帰変異体を得る。次いでこれを自家受精し、その次世代における絞り花アサガオの分離 (表現型; phenotype) とDFR遺伝子領域の構造 (遺伝子型; genotype) を比較検討した。もしトランスポゾン *Tpn1* が絞り模様形成の原因となっているのなら、全色花を咲かせる生殖細胞復帰変異体では、一対のDFR-B遺伝子のうち、一方には *Tpn1* が存在し、他方は *Tpn1* が脱離したヘテロ接合体であろう。また、それらを自家受精させた後の次世代絞り花アサガオの場合には、DFR-B遺伝子は共に *Tpn1* が存在するホモ接合体であるのに対して、全色花のアサガオの場合は復帰変異体と同じヘテロ接合体か、両方のDFR-B遺伝子中に *Tpn1* が存在しないホモ接合体であろうと考えられる (図5)。

これらのDFR-B遺伝子の構造（遺伝子型; genotype）解析については、ペチュニアDFRをプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション法によった。全色花アサガオ（A-3）のDFR遺伝子領域は *Bgl*II で処理すると、17.3 kb の一本のバンドを示すが、絞り花アサガオ（a-3^f）のように両方のDFR-B中に *Tpn*1 が挿入している場合には、*Tpn*1 中に *Bgl*II サイトをもつために 13.7 kb と 8.8 kb の2バンドに成る。これがヘテロサイガスに成っている場合は、バンドは3つとなり、それぞれのジャーミナル・リバータントや自家受精させた（自殖）次世代におけるDFR遺伝子領域の構造（遺伝子型; genotype）が識別できるようになっている（図6）。

これら表現型と遺伝子型を全部で4系統8個体のジャーミナル・リバータントとその8系統30個体の次世代アサガオについて検討し、比較した結果は上記の仮説通りとなっており（図7）、絞り花アサガオにおいては、花卉形成時に少なくとも一方の染色体上の *Tpn*1 が、DFR-B遺伝子中から転移・脱離することがDFR遺伝子の再活性化のために必要であること、即ち、*Tpn*1 が絞り模様形成の原因となっていることが明らかとなった。さらに、このことは、DFR-B遺伝子が花卉で発現するDFR遺伝子であることも同時に証明したと考えられる。

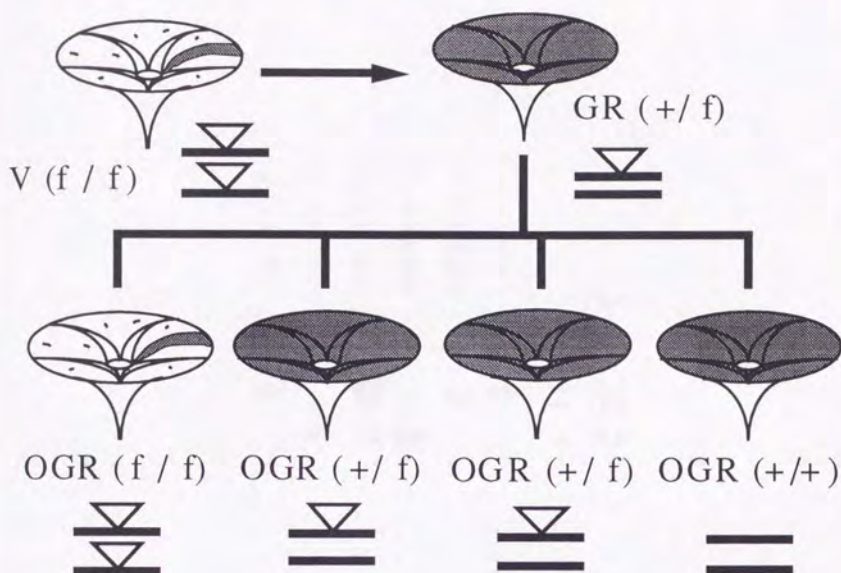


図5 絞り花アサガオの分離（表現型; phenotype）とDFR遺伝子領域の構造（遺伝子型; genotype）を比較した模式図

花はアサガオの表現型を示し、その下にはDFR-B遺伝子の遺伝子型を示した。太い黒線がDFR-B遺伝子でその上に乗っている三角がトランスポゾン *Tpn 1* を示している。W(+/+): 全色花アサガオ (homozygous), V(f/f): 絞り花アサガオ (homozygous), GR(+/f): ジャーミナル・リバータント (生殖細胞復帰変異体) (heterozygous), OGR(f/f): 復帰変異体の次世代絞り花アサガオ (homozygous), OGR(+/f): 復帰変異体の次世代全色花アサガオ (heterozygous), OGR(+/+): 復帰変異体の次世代全色花アサガオ (homozygous)。

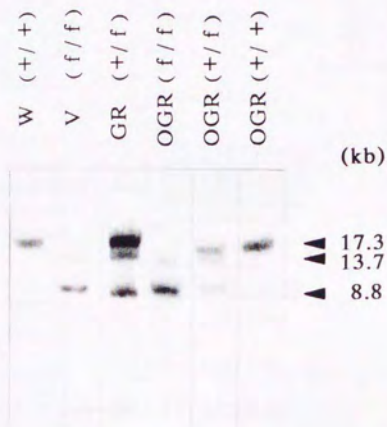


図6 絞り花アサガオとそのジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）のDFR遺伝子領域についてのサザンハイブリダイゼーション
genomic DNA は制限酵素 *Bgl*II で処理し、ペチュニアのDFR cDNA をプローブとしたハイブリダイゼーションを行った。個体の記号は図5を参照。数値はバンドの大きさをkbを示す。

(Exp. 1)

3-4: (f/f)
Mosaic (II)

II

f: (f/f)
Mosaic (N)

N

f-1: (+/+) Fully
f-2: (+/+) Fully
f-3: (+/+) Fully

f2-1: (+/+) Fully
f2-2: (+/+) Fully
f2-3: (+/+) Fully
f2-4: (+/+) Fully
f2-5: (+/+) Fully
f2-6: (+/+) Fully

(Exp. 2)

3-5: (f/f)
Mosaic (I+II)

II

i: (+/+) Fully
a: (+/+) Fully

i-1: (+/+) Total 9 Plants

a-1: (+/+) Fully
a-2: (+/+) Fully

f3-1: (+/+) Fully
f3-2: (+/+) Fully
f3-3: (f/f) Variegated
f3-4: (+/+) Fully
f3-5: (+/+) Fully
f3-6: (+/+) Fully

I

j: Variegated
k: Variegated
l: Mosaic (N+II)
m: Variegated
n: Variegated

II
I-1: Variegated
I-2: Fully
I-5: Fully
I-6: Mosaic(N)
I-7: Mosaic(II)
I-8: Mosaic(II)
I-9: Fully

(Exp. 3)

3-6: (f/f)
Mosaic (I+II)

II

c: (+/+) Fully
d: (+/+) Fully

c-1: (+/+) Fully
c-3: (+/+) Fully
d-1: (+/+) Fully

I

o: Variegated
p: Variegated

(Exp. 4)

4-6: (f/f)
Mosaic (I+II)

II

e: (f/f) Variegated

e-1: (f/f) Variegated
e-2: (f/f) Variegated
e-3: (f/f) Mosaic (I)

e2-1: Variegated
e2-2: Variegated
e2-3: Fully
e2-4: Variegated
e2-5: White
e2-6: Mosaic (N)
e2-7: Variegated

I

h: (f/f) White
q: Variegated

h-1: (f/f) White
h-3: (f/f) Variegated
h-4: (f/f) Variegated
h-5: (f/f) White

(Exp. 5)

4-8: (f/f)
Mosaic (N)

N

g: (+/+) Fully

g-1: (+/+) Fully
g-2: (+/+) Fully
g-3: (f/f) Variegated
g-4: (+/+) Fully

g2-1: (f/f) Variegated
g2-7: (+/+) Fully
g2-8: (+/+) Fully

(Exp. 6)

4-12
Mosaic (II)

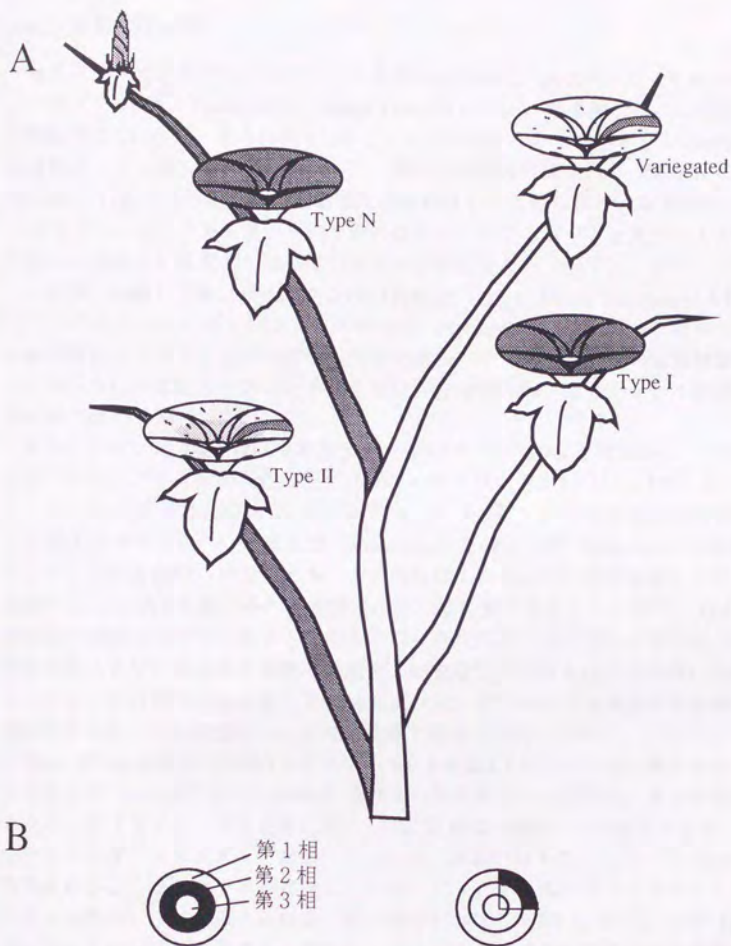
II

r: Variegated

図7 ジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）とその次世代アサガオについての表現型（phenotype）と遺伝子型（genotype）の比較

絞り花アサガオ（V3 及び V4）から得られた6個体のペリクリナル・キメラ由来のジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）をここに示す。影のついた四角はジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）で、type N か type II 由来のものしか得られていない。矢印は c から c-3 への部分以外はすべて自家受精を示しており、ローマ数字はその個体がどの種類のペリクリナル・キメラに属するかを示している。（+/-）などはそれぞれの個体の遺伝子型（genotype）を示す（詳細は図5参照）。

アサガオの花の花卉の着色は、第1相で非常に濃く（図8A; type I）、第2相で薄く（図8A; type II）、そして第3相ではほとんど見えないくらい薄く着色する。なお、第2相は茎の着色を決定し、この第2相が生殖細胞を作りだし遺伝形質を次世代へ受け継がせている^{17,18}。従って、この絞り花からは、第1相あるいは第2相だけが一部分だけ着色するメリクリナル・キメラ（mericlinal chimera）¹⁹（図1D, E, F、図8B）や第1相だけ（図8A; type I）あるいは第2相だけ（図8A,B; type II）あるいはその両方（図8A; type N）がすべて着色するペリクリナル・キメラ（periclinal chimera）¹⁹のような花も咲かせる（図1G, H、図8B）。この内、第2相がペリクリナル・キメラとなった花の次世代にだけ全色花（fully colored flowers）、いわゆるジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）が3/4の確率で、咲くことが知られている^{15,17}（1/4はDFR-B遺伝子が共に *Tpn 1* が存在するホモ接合体、すなわち絞り花となるはずである；図7 Exp.1, 4, 6）。したがって、図7で示されるジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）が得られるペリクリナル・キメラは type II か N からだけと考えられた。図7では全部で7つのジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）（影のついた四角で示される）が得られたが、その内の4つについてのみしか表現型（phenotype）と遺伝子型（genotype）の比較を行っていないが、実際に得られた結果はその通りであった（図7）。また、これらジャーミナル・リバータント（生殖細胞復帰変異体）の次世代のうち全色花でない、すなわち絞り花となった個体は f3-3 と g-3 と g2-1 の3つが存在している（図7）。これらはすべて遺伝子型が検討されており、どれもDFR-B遺伝子中に共に *Tpn 1* が存在するホモ接合体であった。



ベリクリナル・キメラ
(periclinal chimera) 19)

メリクリナル・キメラ
(mericlinal chimera) 19)

図8 A,B 絞り花アサガオ由来のベリクリナル・キメラの模式図

(A) アサガオの花弁の着色は、第1相で非常に濃く (type I)、第2相で薄く (type II)、そして第3相ではほとんど見えないうらい薄く着色する。第1相だけ (type I) あるいは第2相だけ (type II) あるいはその両方 (type N) がすべて着色するベリクリナル・キメラ (periclinal chimera) 19) をここには示した。このうち、第2相がベリクリナル・キメラ 19) となった花 (type II, type N) の次世代にだけ全色花 (fully colored flowers)、いわゆるジャーマナル・リバートント (生殖細胞復帰変異体) が咲く。(B) ベリクリナル・キメラ (periclinal chimera) 19) とメリクリナル・キメラ (mericlinal chimera) 19) の概念図

2-4. 結論及び考察

絞り花アサガオのアントシアニン色素生成系遺伝子DFR中から 6.4 kb の新しいトランスポゾン *Tpn1* (Transposable element *Pharbitis nil* One) を単離した。この因子の末端逆反復配列は 28 bp で、その外側 13 bp はトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* の末端逆反復配列と全く同じであった(表1)。標的重複配列の塩基数も *En/Spm* の標的重複配列と同じ 3 bp であった。この末端逆反復配列はすでに知られている *En/Spm* 類縁のトランスポゾンのなかで最も長いものでそのほかのトランスポゾンと比べてもそのように長く完全な末端逆反復配列を持っている因子は存在しない(表1)。また、トランスポゾンが転移・脱離した跡に残す小さなDNA再編成 (Empty Donor Sequences) も得られた(表2)。この 6.4 kb の新しいトランスポゾン *Tpn1* ははたして、自らを転移するのに必要な転移酵素をコードしている自律性因子であるのか、あるいはこの転移酵素がトランスに作用しなければ転移することができない非自律性の因子なのかという問題については第4章で改めて検討したい。

トランスポゾン *Tpn1* はDFR-B遺伝子の第3エキソン 9 bp 上流第2イントロン中に挿入されていた。アサガオの染色体上にはDFRのホモログが3コピー、DFR-A、-B、-C と存在していたので(図4A)、ジャーミナル・リバタント(生殖細胞復帰変異体)とその次世代アサガオについて表現型(phenotype)と遺伝子型(genotype)を比較することにより、花卉形成時に少なくとも一方の染色体上の *Tpn1* が、DFR-B遺伝子中から転移・脱離することがDFR遺伝子の再活性化のために必要であること、即ち、*Tpn1* が絞り模様形成の原因となっていることを明らかにした(図5、6、7)。さらに、このことは、DFR-B遺伝子が花卉や茎や葉脈で発現するDFR遺伝子であることも同時に証明したと考えられる。では残りのDFR遺伝子(DFR-A、-C)はどのような機能や発現様式を持った遺伝子なのか、この問題については第3章で改めて検討したい。

Tpn1 がDFR-B遺伝子の第3エキソン 9 bp 上流第2イントロン中に挿入されているにもかかわらず *Tpn1* がアサガオ DFR-B 遺伝子の発現を止める原因は、幾つか考えられるが、おそらくスプライシングが正常に起こらず、正確な mRNA を生成できなかったこと(スプライシング・メカニズムの破壊)によるか、あるいはトランスポゾン *Tpn1* 内部に転写を止めるようなシグナルが存在していること(トランスクリプション・ストップ・シグナルの存在)などが考えられる(第3章でもふれている)。もし、この *Tpn1* がもう少しイントロン内部よりであったなら、スプライシングされて遺伝子の発現に影響を及ぼさずこのような絞り模様を形成しなかった可能性もあろう。

これに対し、トウモロコシの *Wx* 遺伝子のイントロンに挿入されていたレトロトランスポゾン⁴⁾ やトランスポゾン *Bg*³⁶⁾、同じトウモロコシの *adh1* 遺伝子のイントロン内に挿入されていたトランスポゾン *Mu1*^{4,37)} などが、イントロン中にもかかわらず単離された例もある。しかし、*Bz1* 遺伝子のエキソンに挿入していたトランスポゾン *dSpm*^{3,4,38)} や、キンギョソウの *Nivea* 遺伝子のエキソンに挿入していたトランスポゾン *Tam4*³³⁾ など一般には、トランスポゾンがエクソン内に挿入されていた場合などで、表現型に変異が見られることにより見つかる場合が多い。

今回のようにエクソンとイントロンのボーダーにトランスポゾンが挿入している例としてはキンギョソウのトランスポゾン *Tam2*^{2,32,39}があげられる。トランスポゾンがスプライシングの認識サイト上にちょうど挿入しており、トランスポゾンの転移・脱離によりその認識サイトやエクソンの一部を破壊したり、あるいは *Tpn1* の場合と同じようにトランスポゾン内部に転写を止めるようなシグナルが存在していることにより安定な白色花や絞り模様の変異型が出てくることになる。この様にトランスポゾンの挿入位置が原因で、安定な白色花の変異型が得られることもあるが、この *Tpn1* の場合は挿入部位がイントロンとエクソンのボーダーから 9 bp と離れているので転移・脱離により大きな塩基欠失でも起こさない限りは安定な白色花の変異型は与えられないはずである。それにもかかわらず、白色花が得られた(図7の Exp.4 の h) ので、この変異体のトランスポゾン *Tpn1* の挿入位置やその内部構造を解析することは大変興味深い。

絞り花アサガオの2系統(KK/SSB-3 と KK/SSB-4)はわずかにその絞りの頻度に違いがある(図1)。このことは2系統の絞り花アサガオのサザンハイブリダイゼーションの結果にも現われており、フェイント・バンドの濃さに違いが見られる(図3A)。どちらも大きなセクターが形成されているにも関わらず(図1D)、KK/SSB-3 に比べて、KK/SSB-4 は明らかにその絞りの頻度やジャーミナル・リバートアントの出現する頻度が低かった(図1B, C)。この2系統の絞り花アサガオの絞り頻度はその個体ごとに変化することも多々ある。トランスポゾンの転移の頻度とタイミングによっては白色花を咲かせることもあり(図7の Exp.4 の h)、このような表現型を示すようなトランスポゾンの転移の頻度とタイミングについては *En/Spm* においても観察されている³⁾。この理由については、第5章でも述べるが、トランスポゾン *Tpn1* が転移・脱離していないことがわかったので、おそらく転移酵素が結合するトランスポゾンの末端領域がメチル化されることにより、トランスポゾンの転移が抑えられているためと考えることができる⁴⁰⁻⁴⁴⁾。

最後に、アサガオ(牽牛子)(Japanese morning glory, 学名 *Pharbitis nil*)は日本では伝統的な園芸品種であり、生理学的かつ遺伝学的知見が数多く蓄積している植物の一つである¹¹⁾。1920-30年代には特によく研究され⁴⁶⁾、既に約 200 以上の遺伝子座が 10 の連鎖群にまとめられた連鎖地図も作成されている¹²⁻¹⁴⁾。その中の絞り模様の花を咲かせる易変性変異体は¹⁵⁾、18世紀に分離され、Imaiによりその遺伝学的研究が成された品種である^{12,15,17)}。その易変性変異遺伝子 *a-3^f*¹³⁾はアントシアニン色素合成系遺伝子 DFR-B遺伝子中にトランスポゾン *Tpn1* が挿入した構造であった。このトランスポゾン *Tpn1* はアサガオ染色体上に数多く存在していることが分かった(第5章参照)。アサガオには20以上にものぼる易変性の遺伝子座が知られていることや、全色花アサガオに比べ、絞り花アサガオにはトランスポゾン *Tpn1* が数多く存在していることなどから、このトランスポゾン *Tpn1* やその類縁因子が原因で易変性となっているものも存在している。もしも、この *Tpn1* やその類縁因子が原因で易変性となっている変異体が存在したならば、その場合には、この *Tpn1* をプローブとして未知の有用な遺伝子を単離することが出来るであろう。

なお、アサガオのゲノムサイズは 1×10^9 bp / haploid genome⁴⁵⁾であり、これはヒトの約 $1/3$ の大きさである。

2-5. 参考文献

- 1) Nevers, P., Shepherd, N.S., and Saedler, H. (1986). Plant transposable elements. *Adv. Bot. Res.* 12, 103-203.
- 2) Coen, E.S., Robbins, T.P., Almeida, J., Hudson, A., and Carpenter, R. (1989). Consequences and Mechanisms of Transposition in *Antirrhinum majus*. In *Mobile DNA*, D.E. Berg and M.M. Howe, eds (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 413-436.
- 3) Fedoroff, N.V. (1989). Maize transposable elements. In *Mobile DNA*, D.E. Berg and M.M. Howe, eds (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 375-411.
- 4) Weil, C.F., and Wessler, S.R. (1990). The effects of plant transposable element insertion on transcription initiation and RNA processing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 527-552.
- 5) Gierl, A., and Saedler, H. (1992). Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol. Biol.* 19, 39-49.
- 6) Martin, C., Carpenter, R., Sommer, H., Saedler, H., and Coen E.S. (1985). Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following isolation of the *pallida* locus by transposon tagging. *EMBO J.* 4, 1625-1630.
- 7) O'Reilly, C., Shepherd, N.S., Pereira, A., Schwarz-Sommer, Zs., Bertram, I., Robertson, D.S., Peterson, P.A., and Saedler, H. (1985). Molecular cloning of the *a1* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*. *EMBO J.* 4, 877-882.
- 8) Masson, P., Surosky, R., Kingsbury, J.A., and Fedoroff, N.V. (1987). Genetic and molecular analysis of the *Spm*-dependent *a-m2* alleles of the maize *a* locus. *Genetics* 177, 117-137.
- 9) Schwarz-Sommer, Z., Shepherd, N., Tacke, E., Gierl, A., Rohde, W., Leclercq, L., Mattes, M., Berndtgen, R., Peterson, P.A., and Saedler, H. (1987). Influence of transposable elements on the structure and function of the *A1* gene of *Zea mays*. *EMBO J.* 6, 287-294.
- 10) Gerats, A.G.M., Huits, H., Vrijlandt, E., Marana, C., Souer, E., and Beld, M. (1990). Molecular characterization of a nonautonomous transposable element (*dTph1*) of *petunia*. *Plant Cell* 2, 1121-1128.
- 11) Yoneda, Y. (1990). Japanese morning glory. In *Handbook of Plant Cell Culture*, P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y.P.S. Bajaj, eds (New York: McGraw-Hill Publishing Co.), Vol. 5, pp. 509-533.

- 12) Imai, Y. (1938a). The genes of the Japanese morning glory. *Jap. J. Genet.* 14, 24-33.
- 13) Hagiwara, T. (1956). Genes and chromosome maps in the Japanese morning glory. *Bull. Res. Coll. Agric. Vet. Sci. Nihon Univ.* 5, 34-56.
- 14) Hagiwara, T. (1977). Genes and linkage map of Japanese morning glory. In *Plant Genetics IV*, H. Kihara and H. Yamaguchi, eds (Tokyo: Shokabo), pp. 482-501 (In Japanese).
- 15) Imai, Y. (1934). On the mutable genes of *Pharbitis*, with special reference to their bearing on the mechanism of bud-variation. *J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo* 12, 479-523.
- 16) Hiraga, G. (1763). *Butsurui-hinshitsu* (Edo: Shouraikan) (In Japanese).
- 17) Imai, Y. (1931). Analysis of flower colour in *Pharbitis nil*. *J. Genet.* 24, 203-224.
- 18) Imai, Y. (1935). The mechanism of bud variation. *American Naturalist* 69, 587-595.
- 19) Iida, S., Hisatomi, Y. (1992). Transposable elements and a variegation mechanism of flowers and seeds, in *Molecular mechanism of flowering and bearing fruits.*, ed. Harada, H., pp.87-106. *shujyunsha*, Tokyo, Japan. (in Japanese).
- 20) Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.
- 21) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 22) Shimamoto, K., Miyazaki, C., Hashimoto, H., Izawa, T., Itoh, K., Terada, R., Inagaki, Y., and Iida, S. (1993). trans-Activation and stable integration of the maize transposable element *Ds* cotransfected with the *Ac* transposase gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 239, 354-360.
- 23) Beld, M., Martin, C., Huits, H., Stuitje, A.R., and Gerats, A.G.M. (1989). Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol. Biol.* 13, 491-502.
- 24) Martin, C., Prescott, A., Mackay, S. Bartlett, J., and Vrijlandt, E. (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1, 37-49.
- 25) Fedoroff, N.V., Furtek, D.B., and Nelson, O.E. (1984). Cloning of the bronze locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element Activator (*Ac*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3825-3829.
- 26) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- 27) Heller W., and Forkmann, G. (1988). Biosynthesis. In *The Flavonoids*, J.B. Harborne, ed. (London: Chapman and Hall), pp.399-425.

- 28) Dooner, H.K., Robbins, T.P., and Jorgensen, R.A. (1991). Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 25, 173-199.
- 29) Saito, N., Cheng, J., Ichimura, M., Yokoi, M., Abe, Y., and Honda, T. (1994). Flavonoids in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, 35, 687-691.
- 30) Pereira, A., Cuypers, H., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z., and Saedler, H. (1986). Molecular analysis of the En/Spm transposable element system of *Zea mays*. *EMBO J.* 5, 835-841.
- 31) Nacken, W.K.F., Piotrowiak, R., Saedler, H., and Sommer, H. (1991). The transposable element Tam1 from *Antirrhinum majus* shows structural homology to the maize transposon En/Spm and has no sequence specificity of insertion. *Mol. Gen. Genet.* 228, 201-208.
- 32) Upadhyaya, K.C., Sommer, H., Krebbers, E., and Saedler, H. (1985). The paramutagenic line niv-44 has a 5 kb insert, Tam2, in the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *Mol. Gen. Genet.* 199, 201-207.
- 33) Luo, D., Coen, E.S., Doyle, S., and Carpenter, R. (1991). Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1, 59-69.
- 34) Rhodes, P.R., and Vodkin, L.O. (1985). Highly structured sequence homology between an insertion element and the gene in which it resides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 493-497.
- 35) Shirsat, A.H. (1988). A transposon-like structure in the 5' flanking sequence of a legumin gene from *Pisum sativum*. *Mol. Gen. Genet.* 212, 129-133.
- 36) Hartings, H., Spilmont, C., Lazzaroni, N., Rossi, V., Salamini, F., Thompson, R.D., Motto, M.: *Mol. Gen. Genet.*, 227, 91-96 (1991).
- 37) Bennetzen, J.L., Swanson, J., Taylor, W.C., and Freeling, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4125-4128 (1984).
- 38) Kim, H.-Y., Schiefelbein, J.W., Raboy, V., and Furtek, D.B. and Nelson, O.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5863-5867 (1987).
- 39) Hudson, A., Carpenter, R., Coen, E.S.: *Mol. Gen. Genet.*, 207, 54-59 (1987).
- 40) Schwartz, D., Dennis, E.: *Mol. Gen. Genet.*, 205, 476-482 (1986).
- 41) Chandler, V.L., Walbot, V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1767-1771 (1986).
- 42) Chomet, P.S., Wessler, S., Dellaporta, S.L.: *EMBO J.*, 6, 295-302 (1987).
- 43) Nelsen-Salz, B., Doring, H.-P.: *Mol. Gen. Genet.*, 223, 87-96 (1990).
- 44) Levy, A.A., Walbot, V.: *Mol. Gen. Genet.*, 229, 147-151 (1991).
- 45) Hirano, H., Komeda, Y., and Iino, T. (1989). Cloning and structural analysis of the snap-back DNA of *Pharbitis nil*. *Plant Mol. Biol.* 12, 235-244.

46) Imai, Y. (1938b). Genetic literature of the Japanese morning glory. Jap. J. Genet. 14, 91-96.

3-1. 序論	4 1
3-2. 実験方法及び材料	4 4
3-3. 結果	4 6
3-4. 結論と考察	6 0
3-5. 参考文献	6 2

3-1. 序論

植物のアントシアニン色素生成系遺伝子群は、花卉など特定の分化段階の特定の組織・細胞においてのみ発現が見られ、さらに光照射、病原菌の感染、傷害などの外部ストレスによりその発現が誘導されることが知られている¹⁻⁴⁾。これらの遺伝子は植物の二次代謝に関与するため変異が生じても通常その変異株は正常に生育でき、その変異が色の変化という目につきやすい表現型を示すことなどから、トウモロコシやキンギョソウをはじめ様々な植物種より種々の変異株も分離され、それらの遺伝子も多数単離されている⁵⁻⁷⁾。その結果、アントシアニンの構造、生合成に関与する酵素の機能、及びその遺伝子などに関して豊富な知識が蓄積されている⁵⁻⁷⁾。また、組織特異的な発現や種々の外部ストレスによる発現誘導を示すこれらの遺伝子は、遺伝子発現の制御機構を理解する上で格好の実験材料になっている（第2章図2のアントシアニン色素生成系経路参照）。

このようなアントシアニン色素生成系遺伝子群のうち、DFR (dihydroflavonol-4-reductase) 遺伝子は種々の植物種から単離され、またプロモーター領域を含めその構造解析が進んでいるものの1つであり、現在トウモロコシ、大麦、キンギョソウ、ペチュニア、ガーベラ、アラビドプシスの6種の植物からの単離が報告されている。トウモロコシ (*al*)⁸⁾とキンギョソウ (*pallida* : *pal*)^{9,10)}はそれぞれトランスポゾン *En/Spm* 及び *Tam3* によるトランスポゾンタギングにより単離された。大麦 (*ant18*)¹¹⁾とペチュニア (*an6*)¹²⁾は、それぞれトウモロコシ、キンギョソウ、ペチュニアのDFR遺伝子をプローブに単離された。また、ガーベラ (*dfr*)¹³⁾、アラビドプシス (*tt3*)¹⁴⁾については既知DFR遺伝子間でよく保存されている領域のアミノ酸配列から変性オリゴヌクレオチドプライマーを作成してPCR (Polymerase Chain Reaction) によりホモプローブを得、そのプローブを用いて単離された。このうち、genomic についてイントロンも含めた遺伝子構造の報告をしているものはトウモロコシ *Al*¹⁵⁾、アラビドプシスの *tt3*¹⁴⁾、オオムギ

の *ant18*¹¹⁾、だけである。エキソン/イントロン構造についての報告はトウモロコシ *Al*¹⁵⁾、キンギョソウ *pallida*^{9,12)}、ペチュニア *An6*¹²⁾、アラビドプシス *tt3*¹⁴⁾、オオムギ *ant18*¹¹⁾の5つあり、残りのガーベラの *dfr*¹³⁾はcDNAについて報告されているだけで、まだgenomic DNAについての解析の報告はない。また、このうち、アントシアニン色素合成に関与していることが分子生物学的に証明されているものはトウモロコシ *Al*、キンギョソウ *pallida*、ペチュニア *An6*、ガーベラの *dfr*だけである。

また、オオムギの *ant18* に関しては生化学的にDFRとしての機能を確認している¹¹⁾。既に分子遺伝学的に解析されているアントシアニン色素合成に関与する遺伝子のうち、最も易変性が起こっている頻度の高いものの一つがDFRである^{8-12,14,15)}。このDFR遺伝子中で見つかったトランスポゾンには、自律性因子の *En/Spm* や非自律性因子の *dSpm/1* が^{8,15,16)}、自律性因子 *Tam3* がある^{9,10)}。さらに、ペチュニアのDFR-C遺伝子においては、非自律性因子 *dTph1* が見つかった¹⁷⁾。これは花弁の色の変異体は他の変異（例えば葉の形態形成など）に比べて一見して見分けられ、かつこれらの遺伝子は植物の二次代謝に関与するため変異が生じても通常その変異株は正常に生育できるので、分離しやすいことも一因であろうと考えられる。しかし色素合成系中で、なぜDFRなのかは、遺伝子個々の重要性や染色体中のコピー数などとも関係あると思われるが、今後解決すべき問題である。

現在報告されているトウモロコシ、大麦、キンギョソウ、ペチュニア、ガーベラ、アラビドプシス、の6種の植物のうち、サザン分析の結果からペチュニア（3コピー）¹²⁾、ガーベラ（5コピー）¹³⁾の2種ではDFR遺伝子が数コピー存在するが、他の4種ではDFR遺伝子は1コピーしか存在しないと考えられている。しかし、ペチュニア、ガーベラの様にDFR遺伝子が数コピー存在すると考えられる場合でもアントシアニン色素が発現している組織からはその内の1種類のDFR遺伝子由来のcDNAしか得られないことから、特定の組織でアントシアニン色素の合成に関与している活性なDFR遺伝子はゲノム中に1コピーしか存在しないのではないかと考えられる^{8,9,11,14,15)}。

このDFR遺伝子の機能はジヒドロフラボノール（dihydroflavonols には B 環の水酸基の数により dihydrokaempferol, dihydroquercetin, dihydromyricetin の3種類が存在する）を、NADPHを補酵素としてロイコアントシアニン（leucoanthocyanidins 同様にB環の水酸基の数により leucopelargonidin, leucocyanidin, leucodelphinidin が存在する）へ変換させる^{5,6)}（図1）。そして幾つかの反応を経て最終的に Pelargonidin 系、Cyanidin 系、Delphinidin 系のアントシアニンが合成される。しかしながら、アサガオにおいては3',5'-水酸化酵素活性が欠損しているためにこの3つの経路のうち、dihydromyricetin から leucodelphinidin への経路は存在しないことが知られている。すなわち、アサガオにおける青色はCyanidin（ペオニンジン、Peonidin）系の色素により表現される¹⁸⁾。ペチュニアにおいてはDFR酵素自身の基質特異性の違いが観察されている。ペチュニアには pelargonidin 系のアントシアニンが観察されず、*in vitro* においても dihydroquercetin や

dihydromyricetin は基質となり得るが、dihydrokaempferol は基質となり得ないことが知られている¹⁹⁾。このような基質特異性の存在は、ペチュニアにトウモロコシのDFR遺伝子 (Al) を導入した形質転換体で、野生型では見られない Pelargonidin 系アントシアニンの生成が観察されたことから明らかである²⁰⁾。

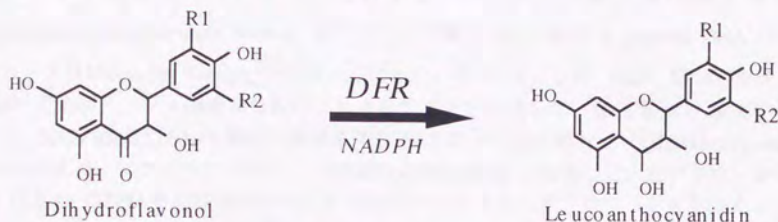


図1 DFR (dihydroflavonol-4-reductase) 遺伝子の機能

アントシアニン色素合成経路中の1つDFR遺伝子の機能は、ジヒドロフラボノール (dihydroflavonol; R1=R2=H: dihydrokaempferol; R1=OH, R2=H: dihydroquercetin; R1=OH, R2=OH: dihydromyricetin) の3つの酵素反応基質を、NADPHを補酵素として3つロイコアントシアニン (leucoanthocyanidin; R1=R2=H: leucopelargonidin; R1=OH, R2=H: leucocyanidin; R1=OH, R2=OH: leucodelphinidin) へ変換させる。

また、アサガオでは古典遺伝学的研究が非常に詳細に進んでおり (第1章序論参照)、花色生成に関わる基本遺伝子については *a*, *ca*, *c*, *r* の4つから成ることが知られている²¹⁾。そのなかの *a* は緑茎白花の表現型を示し、*a-1* から *a-4* まで4つの変異体が分離されている。そのうちの *a-3* の本体がDFR遺伝子であることを明らかにした (第2章参照)。

したがって、このようにアントシアニン色素合成系遺伝子DFR自身の重要性だけでなく、アサガオの新しいトランスポゾン *Tpn 1* がアントシアニン色素合成に関わる遺伝子群の一つDFR-B遺伝子内に挿入されていたことから、アサガオのDFR遺伝子 (*a-3*) について、その構造や発現様式を解析する必要があると考え、以下の解析を行った。

3-2. 実験方法及び材料

全色花アサガオ (A-3) からDFR遺伝子領域のクローニングとマッピング

まず、青色の花を咲かせる中国産のアサガオの一系統 (KK/ZSK-2) のDFR遺伝子領域について解析を行うため、この野生型アサガオより染色体DNAを葉から hexadecyltrimethylammonium bromide 法²²⁾により分離した。一般的な genomic DNA のクローニングはMolecular Cloning²³⁾に従って行った。各々100 μ g の Plant DNA を完全に BglII で処理し、ショ糖濃度勾配によりその大きさを分画した。全色花 A-3 由来のアサガオ (KK/ZSK-2) のDFR遺伝子領域を含む 17.3 kb の BglII 断片を λ GEM11 (Promega) の BamHI Site にクローニングし、 λ GEM11-DFRwt5141 と命名した。このクローン化した 17.3 kb のDNA断片は必要に応じて pUC7 プラスミドにサブクローンをを行った。これらサブクローンについて制限酵素地図を作成後、これらのサブクローンは適当な長さのDNA断片としてpBluescript SK⁻ プラスミドに入れ、DNAシーケンシングを行った。第2章実験方法及び材料を参照のこと。

DNAシーケンシング

適当な長さのDNA断片としてpBluescript SK⁻ プラスミドに入れたサブクローンについて欠失変異を起こさせたシリーズを揃え、DNAシーケンシングはサンガー法に従って行った²⁴⁾。

全色花々弁のcDNAライブラリーの作成とDFR cDNA クローニング

全色花、絞り花、絞り花由来のジャーミナル・リバータント、絞り花由来の白色花それぞれのアサガオの花弁について、その成長過程に応じて3段階に分け (1cm、1.5cm、2cm程度)、それぞれの段階について同数個ずつを一度に処理し、Molecular Cloning²³⁾に記載された方法によりトータルRNAを抽出した。そのうちの全色花と絞り花についてcDNAライブラリーの作成を行った。ライブラリーにはZAP cDNA Synthesis kit (Stratagene) を用いた。ファージのタイターは全色花の花弁cDNAライブラリーが 1.0×10^6 、絞り花の花弁cDNAライブラリーが 1.4×10^6 であった。全色花の花弁cDNAライブラリーからベチュニアの DFR cDNA¹²⁾をプローブにしてアサガオのDFR cDNA のクローニングを行った。その結果、8つの独立なクローンが得られ、そのうちの最も長い (1.5 kb) ものをノーザンハイブリダイゼーションのプローブとして使用した。

ノーザンハイブリダイゼーション

全色花、絞り花、絞り花由来のジャーミナル・リバータント、絞り花由来の白

色花それぞれのトータルRNAについて各 $10\mu\text{g}$ を一回の電気泳動に用いた。トータルRNAの電気泳動には全色花、絞り花、絞り花由来のジャーミナル・リバータント、絞り花由来の白色花それぞれについて各 $4\mu\text{g}$ を一回の電気泳動に用いた。ハイブリダイゼーションはMolecular Cloning²³⁾に記載された方法により行った。1.0%のアガロース gel で電気泳動し、プローブとしては全色花アサガオのDFRcDNAの全長 1.5 kb を用いた。

プライマー・エクステンション

プライマーはDFR-Bの転写開始点から下流+171から上流方向に29mersのもの：5'-GGAGGAGTGTCTTGACCAACCAGGAGCCG-3'を用いた。絞り花由来のジャーミナル・リバータントから得られたトータルRNAをOligo-dTカラムにてmRNAに精製し、その内の $4.35\mu\text{g}$ を使用してMolecular Cloning²³⁾に記載された方法を参考にプライマー・エクステンションを行った。

3-3. 結果

全色花アサガオDFR遺伝子領域の構造解析

易変性変異遺伝子 $a-3^{f25}$ はアントシアニン色素合成系遺伝子 $A-3$ が易変性 (*flecked*) になったもので、白地に紫のスポットやセクターのキメラ斑を生じる絞り花アサガオである (図2 A、右上) 21,25,26)。したがって、この $a-3^f$ の表現型が即ち、 $A-3$ の発現パターンであり、それは花卉 (図2 A、右上) や茎 (図2 A、左下)、葉脈 (図2 A、右下) において特異的に発現するアントシアニン色素合成遺伝子であることを示している (図2 A)。



図2 A アサガオ易変性変異遺伝子 $a-3^f$ の発現パターン

そこで全色花アサガオ ($A-3$) のDFR遺伝子について発現様式やその遺伝子領域の構造について解析するために、まず、KK/ZSK-2 から 17.3 kb の *Bgl*III 断片をクローニングした。次いでこれらについて制限酵素地図を作成し、全色花アサガオの 17.3 kb の断片についてペチュニアのDFR cDNA の5'側 0.5 kb のDNA断片をプローブとしたサザンハイ

ブリダイゼーションを行ってDFRにホモロジーのある領域を検索した。その結果、全色花アサガオの 17.3 kb の断片中には 3 か所に DFR ホモログが存在しており、これをそれぞれ DFR-A、-B、-C と名付けた (図 2 B)。

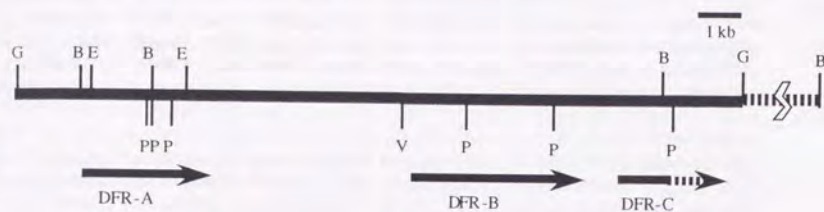


図 2 B 全色花アサガオ (A-3) の DFR 遺伝子領域

制限酵素切断部位は B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; G, *Bgl*II; P, *Pst* I; V, *Eco*RV である。太い黒線は 17.3 kb の *Bgl*II 断片を示していて、太い点線はまだクローニングしていないが、図 3 A で示された 8.9 kb の *Bam*HI 断片を示している (スケールは合わせてない)。また、ペチュニアの 5' 側 0.5 kb 断片とホモログをもつ 3 つの領域について詳しく解析した結果、全色花アサガオの 17.3 kb の断片中には 3 か所に DFR ホモログ (DFR-A、-B、-C) が存在しており、太い矢印で示される方向とその長さで示される領域にそれぞれの DFR 遺伝子領域が存在していた。

そこで、アサガオゲノム中にタンデムに並んだ 3 つの遺伝子 DFR-A、-B、-C 及び全色花アサガオ花弁より得られた DFR cDNA について構造解析を試みた。まず、活性のある DFR 遺伝子をコードし、a-3 遺伝子の本体と考えられる DFR-B 遺伝子についてゲノミックと cDNA の両者の塩基配列の決定を試み、その両者及びペチュニアとキンギョソウの DFR cDNA¹²⁾ の塩基配列を比較することにより解析を行った (図 3、4)。genomic DNA については DFR-B、-C 遺伝子領域 *Eco*RV ~ *Pst* I ~ *Pst* I ~ *Bam*HI ~ *Pst* I の間 (図 2 B 参照) の 6.6 kb の塩基配列を決定した。全色花の花弁 cDNA ライブラリーは 1 回増幅したものを使用し、 4.0×10^5 からペチュニアの DFR cDNA¹²⁾ をプローブにしてアサガオの DFR cDNA のクローニングを行い、独立に 8 クローンを得た。これらのすべてについて cDNA の 5' 末端と 3' 末端を決定し (図 5、6)、そのうちの最も長かった DFR-B クローン #83 について全塩基配列を決定した (図 3 太字で示した始めの 6 つの部分)。これにより DFR-B cDNA のコード領域は 1212 bp で 45 kD のタンパクが生合成されることが分かった。なお、これら 8 つのアサガオの DFR cDNA クローン中には DFR-A 及び DFR-C 遺伝子に対応する cDNA は検出できなかった。また、genomic 及び cDNA の両者の比較からは、DFR-B 遺伝子は、6 つのエキソンが存在し、さらにプロモーター領域 (図 5)、ターミネーター領域 (図 6) と考えられる配列も見い出された。プロモーター領域についてはさらにプライマー・エクステンション法により、DFR-B 遺伝子の転写開始点 (+1) を決定した (図 5、7)。

AACGCTCCAA TGAAGTACTC TAAATTTAAAG CAGTAAAATA GTGCAATTAG TTATATTATT
ACCCATTAAG CATTGAAGTG TCGTTAGCCA TGCTAACATG TGGTGTTTTA ATATTATTAT
TTATTATTAT TGTTGGAATA ATAATATATA GTATATAAGG TTACGTTGTG TTGTTGGGTC
ACCAAACGGG GGGTTGATAT CGAGTATGAA GCACGCACGT GCATCGACGA GCGGACCAAA EcoRV
CAGTCATGAG CTTAACTAAT AACGTGTATA AAACCTTTGAT CATTCTATAA GGCTTTTCAC 300
TTGCGACAGA TTAATTAGAT CCACAATATA CTTTAATTTC TTGGCTAGAA GCTTAGCTTA
TTGATCCGAG GAAAAATGGT GGACGGTAAT CATCCTCTTC TGCGGCCAAA AGTGTGCGTC
ACCGGAGCTG CTGGCTTTAT CGGCTCCTGG TTGGTCAAGA CACTCCTCCA ACGAGGCTAC
CATATTACG CCACCGTTCG AGATCCTGCT ACCATCATAT TTTACTACTC ACTTTCACAA
CATTTTTTTT TTTTGAGTTA GACTCTAAGA CTATCTTTAC CCTTACAATT CGATTCAGAG 600
ATAGAAATGG GGTAGGGAGT AATGGAATAT AGTGTATACT TGAAATGTGT ATTATTATCT
GATTGAAATG TAGGGAACAC AAAAAAAGTG AAACATCTGC TTGAACCTACC GAAAGCCGAC
ACGAATTTGA CAATATGGAA GGGGGTGATG GAGGAAGAAG GAAGCTTTGA TGAAGCCATT
GCAGGGTGAG AAGGAGTGTT CCATGTGGCC ACCCCTATGG ATTTTCGATT CCAAGGACCTT
GAGGTAACATA AGTTCGTGGC CGGGGTAACT CAAGCAAATC AGAGTTAATC GACCAGCCAA 900
CTTAGTAATT ATAACTTCA AAATTTAAAT TCTTTACAAG AGTTGGTTAT TAGTTTTCTT
GATTTGAGAG GTGATCAGCT ATGAGTAAAC TAATTAAGCG TACTTCTAT GATAACTAAA
TCATAGTTTT ATTTGTCTTT TTGGGCCATC CACTTGATAA TAAATTGTGA CATATATTAT
AACATATATA TATGTGTAAT TTGTGGTAGA ATGAAGTGAT AAAACCAGCC ATCAATGGAG
TGCTCAACAT TATAAATCTT TGCCTCAAAG CCAAAACCGT GAAGAGGCTG GTTTTCACTT 1200
CCTCTGCCGG GACTCTCAAC GTTCAACCAC AACAAAAGCC TGTCTACGAG GAGACCTGCT
GGAGTGATCT GGATTTCATA TATGCCAAGA AAATGACTGG ATGGGTAGT TTAATCTTCT
CTCTTTTTTT TCTTTGTTTT TTATTTTTAT TTTTATTTT ATTATTATTATA GCTAGGAAAC
CCGCAACAAC TATCTAGGA TATGCGTGCA TGTAGTAGGT GTAACGTTTA TCCGTTACTA
TTATTATAAC ATTAGGATAA GTTATGATAA TATTCAGTAT TTGATATGTG GTGCAACACT 1500
AATAACCTAA TAGCTAGACT ACCATTATGA TTAGGAGTCT AGTTAGGGTT TAGGAGACCT
AAAAACAATC AACCAATAG ATGGCCAGTG GTTATATAAG GTCCTAGTCT CTTCTACGGC
TCACATTACA TACCTCATAC ACCATCTAGA GAGAGCTGAG TAAAGTGAGA GACAAAATAC
TCGTTATCTC TGCAGCAGTC CGGATCGCTC AACCGTATCA AGAATATGG CGGGAGGTTA PstI
GTCGATCCTA TTATCACATT ATTATAGTGA TGCATGTGAT ATTTTAGTCT AACAGTTGGT 1800
AAACTCTGCC TTGTGATTGC ATAGCTGACA AACGATCACA ATGAGGTAAA CCAACCTAGT
TAGTAAAGGA AATCCCGCCT TGTGACCCTA TAACGTGTAA AGAACCAACA GGAGGTAAG
CAGCTTAACT GGCAAGGAG CACAAAGAAG ATAAACCAGC CTAGGAAAGT CGATAGACCG
CTTCACTAT GAATCGAAGC TTAATGCTTG CGGTACCAA GCTAACGAC AGTCTGACCA
ACGTTAATTG TGGTTGCTT TCTTTGGAA AAAGGTGATA TATATGGACT GAGAATTATA 2100
GTGTTATATA TTGTTGGTGT GATCTGCATG CAGATGTATT TTGCATCCAA AATCTGGCA
GAGAAGGAAG CATGGAAAGT AACAAAAGAG AAGAAAATTG ATTTTCATAAG CATCATACCA
CCACTAGTGG TTGGCCCATT CATTACCCCA ACATTCACAC CCAGTCTCAT CACTGCACTC
TCACTAATTA CTGGTATTTT CTGAAATTA ACCTGCAAAA ATTAACACAA GACATCTGTT
TTCTTCCCT GAAACTATAT TTACTTTTGT ATATAATAAT ATATAGGGAA CCAAGCTCAC 2400
TACTCCATCA TTAAGCAAGG GCAGTATGTT CATCTGGATG ATCTCTGTGA AGCTCACATA
TTCTTGATAG AGCATCCCAA AGCAGAAAGG AGATTCATCT GCTCTTCTCA TCATACAACC
ATCCATGGTT TAGCGGACAT GATCACACAG AATTGGCCTG AATACTACAT CCCTCCGAG
TAAGCTACAC ATATATATAC TAACATATTC ATTCTAGCTA TTGCTACTCA GAGGTGTCAA 2700
ACGGACGTGC TTGGGCCGAC CGGACCCACC CATAAGTCTG CTTATTTTTT GAATTGAGTC
GGCCGAGCCT AATTAAATTT TGGATCAGAC TTGACCCGGA CACTCGGTTA AAAATAATAA
GAACATAAAT CAGTGTGAT CTATAGTCTT ATAAATTTT AAAAAATTAC GAAGTATTAA
AAATTATATA TCCACTCAT TAAAGTTATGT TTTCTTCTA AATTAGCTTT ACAAGTTTAC
ATATTATTTT TTAAGTATTT AATTATGAA TTATAACAAA AAATAAGAAA TCAATAATTA 3000
ATAATGAGTA ATAATATAAT AACATTAATA AGAATAAGTT AATAACTTGC AACTACTAAC
TACTAAGTAG TAAGATAAAT TTTTACTTT TTTTCAATT TGAAGCAAA AGAATTTTAC
AACTTTAAAT TATATATTTT AAGGTAGTAA TTAATAATTA ATATGATAGT TAGACAATTA
ACTAGCTAAA TAGTAAATGT GTAACAATT GATAGTCATA AAACCAGTTT CAGAAATTTCT
AATGTGAAAT TACTCCTTTA GACTATATAT GTATATTTAA TCTTTTAAGA AATATACGAA

TGAATGGACC GAATAATTCA TACATCAAAA GTTAACGTCT AGCTAAGTCC GTAGTATAAA 3300
 ACAGACTAGC CCTTCTTATT ATAGCAAATG GGATGGTCGA GCCAAGCCGA CCTAAATTGA
 TCAGACTTGG ACTGGATTTC ACCTAACCCG CTTGTTTGAC ACCTCTACTG ATACTCAACC
 CCAACCAAGC TAGGTGGCTT GTAATATAAG AATGCCATTT GTTGTTTATT TTGACAGGTT
TAAGGGTATT GAAAAGGACT TGCCAGTGGT TTATTTTTCA TCCAAGAGT TGCAAGATAT
 GGGGTTCCAG **TTCAAGTACT CTCTAGAGGA CATGTACAGA GGAGCTATAG AGACCTTGAG** 3600
 GAAGAAGGGG **TTACTTCCCT ATTCTACTAA AGAAGCTGCT GCAATTGAAG AAGAGCAAGA**
 GACAGTGGCC **TTAAAAGTGG AAAAGCCTAC TGCCATTGAA CAAAAGCAAG AGGCCAAAAC**
 AGTGCCCTTA **AAACCTAGTG CCATTGAACA AAAAGCAAGAG ACTGCAAGTGC CCTTAAAAAT** PstI
GGAAAGAGAA CCCACTGCCA TTGAACAAAA GCAAGAGGTA GTGCCCTTAA AAGCTTGAGA
 AGCACATTGA TACACCATGG TGCAATGTTG TTGTAGTTAC TATTATTATT GTTTTAAAAA 3900
 TATGGACATG AAAATGACTA AGCCAGGAAT AATATATTGA ATTTGTTTGG AGACTTCTCG
 TCTGCTATCT TTCTCTTCTC TAAAGTTAGA TTGCCACTCG AACCAAGATT ATGTTTTTTT
 TTTCTTACTT TTTGAAGTAT AACTTTAACG GAAAGAAAAA CATTTTCGATA TAACCTCAGG
 ATTGTATCAC ACACACATCC CCTTATTAAA ATTGAAAAAA AATCAAAACA CTAATTGGCT
 CAACATTATA CATAATAAGA ACACCAATGC CGCCATAGTC GTCTAAGGCA AGTCCAAGGA 4200
 ACTTGGTATT ATATTCTTGG TGCAGGAAAA AAAAAAACA ATCTTAATTT TTCTCGTGGG
 GCTAGATCAA TTGGTTTGAC CGATCACGTT AAAGTTTGA GCGATCAAAG GTGATAAAAA
 TTCCTTGTGC GTAAATGTAC TGACAGAAAT TGAGGATTGG ACCACTGATG ATTTAATTAC
 CTCCTCTAGC GACTTTTGAA CAGATGCTCT GAAGATTAG AATTAGTACA GTCTAGCATA
 CTGCTATAAG CTAGATACTT GAGTAATAA AAAAAATCAT CTTTTTTTTT 4500
 TACTCACAAT TTTTATAAAA GCAGTATAAA GAATTACACT ACATAATAGT TAACAAAAAA
 AAAAAAAGAA GCATCTTAAT TTGTCTTTAA TTTTCATTTT TTTTCAATAA TTTTCTTTAC
 CGTACTGTTG TTATTACGTT TGTAACTCAT GTTACTGGGT TGTTAATACG GAGTATAAAA
 TAATGTTTGT GTTATTTTAT TTGGGAGTTT CAAGTAATTA ATGTCTTAAG CCATCCCCAT
 TAGAAAGTTT CTTATGGTTT TTGAAAATCT TTTTGTCAAC ATGTAAGATA GAGAAGATAA 4800
 AATGCCTCTT AGGTTTTTAC AAAAATGTGA GGCTACTTTT ATTTTTTTTT TAAATTTAAA
 TAAGCTTTTG TTATTATTTT TTTTCTTTTT TCTCTTCTCC TATCTTCTCT TTCTTAAATC
 ACACCTACAA AAACCTTTTT AAAATCATAA CAAAAACTTT ACTATTGAGC ATACTCTTAG
 TAAATTTTAA AAAGTTTGA ACTTCAATAA AATTTTATTA AAAACTATCA TTTTAAAAAGT
 TTAAAGATAT TGAAAATTTT TGTTTCACT CATGTACTCT CTCAAATCCC AAGAAAACCT 5100
 TCACTCCTAA AATCTAAATA GTATTGCGCT TGTTTAAGTT TGTTGATAGT AATATATCTT
 GAGTGCTCAA CTATGTTGTT GTTTAAAAAA AAAATCACAT AAATCCATTT TATAGTAGGA
 GATTGATGTT ATAACGTTGC TAGCACCATC AAGAGATAAC AAATCAATTT TAAGAAAAAGT
 ATATGTTATA CACCGAATTA AATTTTCTTT TTCTCTTAAC ATTTTTTTCC GTATCGGACT
 TATTTTCACT TTCTAGGAAT TTTATTTTTC TGAATAAATT GTGAAAATTC TCAACATATG 5400
 TTAGTAAATA AATTGTGAAA ATTCTCAAGT GTTCACCAAA CTGGGGGTTG AACACGCACG
 TGTGTATCCA CCAAGCCTAC AGAAGAGGGT TTCTGAAAAA TAAAAAGGAC ATTTCAAGCT
 GATCTCTTTC ACTTCAAAAA CACTCACCAC CTTTAAGCTC CATCTAAGCC ATCTAATTAA
 GCATACATTA CTGTATATAA CAAAATGTCG **GGCGGGCGCC GTAATGCCCC TACTCTCCG**
GCTCCCAAAG TTTCGCTCCT CGGAGCTGCT GGATACGTCG GCTCTTGGCT CTGCTATGAAG 5700
CTCCAACGAG GTTACGTCGT CCATGCAACC GTTAGAGACC CCGGTACGTT CAATTCCTAC
 ATATATACTT ATTCTAAACT AAATACGGAG TACTATTTAT TTGTCAACTC TAATCTTTT
 TTGGAGATGT TAAGGAAGTC AAGTCGAGTT TAATGGATAA GTGCACACAA CATGAATGTT
 GAAACGTAGG **GAACACGAAA AAGGTGAAAC GCTTACTAGA ACTGCCGAAA GCGGCGGAGG**
GGAAAGTTGAG GCTGTGGAAG GGGGTGTTGG AGGAAGAAGG AAGCTTTGAC GACGCCATTG 6000
CAGGGTGTGA AGGTGTGTTT CATGTGGCGG CCACCCCTGT GATTTCGTGT CCGACGACCC
TGAGGTAAGC AACTTCATTC CCGGCCCAT ACATGCTTGC ATGCACAGGT TCAATTAGTA
CCAAAATAAC AATCTTCTGG GAACAACCTCA ACCAAGTTGG TCGGACTGTT CACTTTCAGA
CGAGAATGAC CTATTGACAT AGCTATAGGT CTCTTAGTGT TGAATTGGTC AGCTTTGGAC

AACCTAACT GATTATCTCC TTATGGTCAC AATATAGGAT TTACCTTGTA CACACCCCTCA 6300
 GGTAGGGATT GCGGATTTC CTATGGATT TATAGGTCTA TATAATATG GCAGAAATGAG
ATAATCAGGC CGGCAGTTAA GGGGATCCTG AGCATCATAA ACTCCTGTGC AAAAGCAAAA BamHI
 ACTGTGAAGA GGCTGGT TTT CACTTCCTCT GCTGTAACCTC TCATCGTCCA AGAAAACCCA
 AACCTGCTA CGACGAAAGC AGCTGGAGTG ACTTGATCT CATAATGCC AAGAAAATGC
 CTGGATGGGT TTGCTCTCAT CTCTTTCAT TTCTCCTCG TTTTTCATAT CACTGCTGAT 6600
 GTGGGGTCT CGTAACAATA TAACATCAGC TGCTTCTTGC GGTCCTCTGA TCTGCAG PstI

図3 全色花アサガオの genomic DFR-B, -C 遺伝子領域の塩基配列

塩基配列はDFR-BとDFR-C遺伝子領域 EcoRV ~ Pst I ~ Pst I ~ BamHI ~ Pst I の間 (図2B参照) 6.6 kb を、太字はDFR遺伝子のエキソンを示す。上流からDFR-Bのエキソン1~6、次いでDFR-Cのエキソン1~3である。下線部はそれぞれ左欄外に示した制限酵素切断部位を示す。

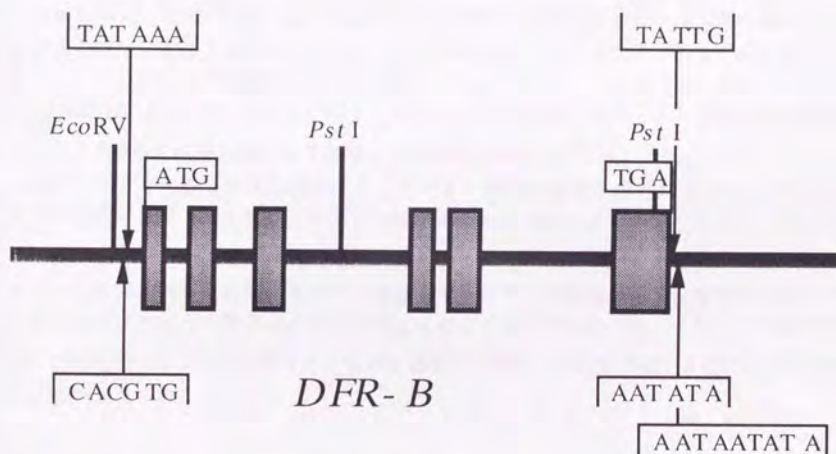


図4 DFR-B遺伝子領域の模式図

影のついた四角はエキソンを示す。ATGは翻訳開始点を、TGAは翻訳終始点を表わす。TATAAA, CACGTGはDFR-B遺伝子のプロモーター領域を、TATTG, AATATA, AATAATATAはターミネーター領域を示す。

DFR-Bのプロモーター領域 (図5) には2か所のTATAボックスと考えられる塩基配列が存在していた。そこで、転写開始点 (+1) を決めることによりどちらのTATAボックスがより重要であるのか推定しようと試みた。、転写開始点 (+1) を決めた結果 (図7)、下流のTATAボックスでは転写開始点から 10 bp と離れていないのに対して、上流のTATAボックスは転写開始点から -32 bp に存在していたことから、おそらくこの上流のTATAボックスが遺伝子発現に重要な役割をはたしているものと考えられた。また、DFR遺伝子の

翻訳開始部位と考えられるATGコドン近傍の塩基配列 (GGAAAAATGGTG、図5) は、Joshiが79種の高等植物遺伝子から得たコンセンサス配列 (TAAACAATGGCT)²⁷⁾ と類似したものであり、この79種の高等植物遺伝子中の幾つかの配列とはかなりの類似性が見い出された。

DFR-B遺伝子の転写開始点を決定しようとプライマー・エクステンション法を行った結果、その開始点はプライマー・エクステンション法に用いたプライマーから考えて+171の位置のアデニン、Aか+172の位置のシトシン、Cかはっきりとは決められなかった (図7)。しかし、Joshiが79種の高等植物遺伝子から得た転写開始点²⁷⁾ はそのほとんど (12種以外すべて) がアデニン、Aであり、また、このDFR-B遺伝子の転写開始点と似た様な配列でAから始まっているものも多数存在していた。このことからAに+1を決定した。

また、DFRをはじめとするアントシアニン色素生成系遺伝子は、Myb及びMyc様の転写調節タンパク (トウモロコシの場合のC1²⁸⁾ やR^{29,30)}) により発現が制御されていることが知られているが^{31,32)}、MybあるいはC1様の転写調節タンパクが認識し結合し得ると考えられているシスエレメント (A/T AAC G/T G/T) が5つ存在しており、MycあるいはR様の転写調節タンパクが認識し結合すると考えられているシスのエレメント (CANNTG) も1つ見つまっていることから、この領域がプロモーター活性のある配列であることをDNA配列の面からも示唆してと考えられた²⁷⁾。

次にアサガオのDFR-B遺伝子のターミネーター領域の構造を図6に示した。第6エクソン中の翻訳終止コドンと推測されるTGA配列の下流にはポリアデニレーション・シグナルAATAAA³³⁾ と考えられる配列が2箇所存在していた。これに関しては6つのcDNAの3'末について結果が得られたが、これから類推してもどちらが遺伝子発現に重要な役割をはたしているシグナルなのかということを推定することは出来なかった。また、この配列の近傍には植物のmRNAの3'スプライシングに重要だと考えられているC/T A C/T TG³³⁾ に類似した配列も見られた (図6)。

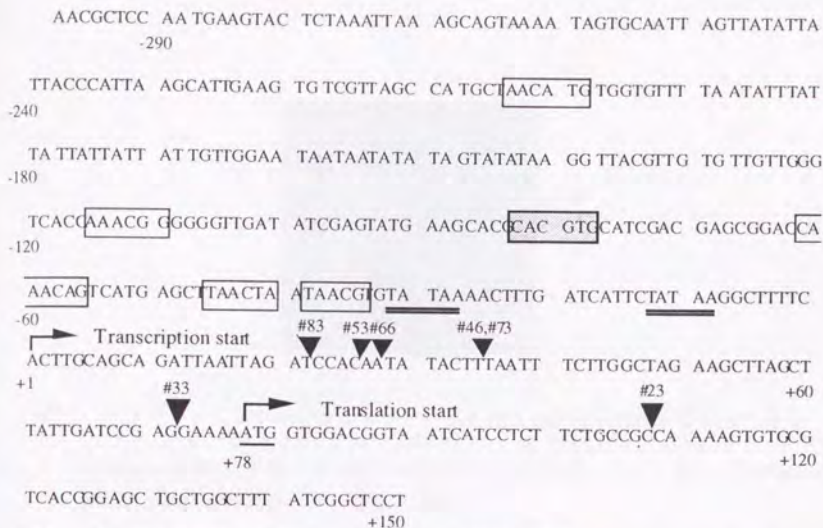


図5 アサガオのDFR-B遺伝子のプロモーター領域の構造

四角は、MybあるいはC1様の転写調節タンパクが認識し結合すると考えられているシスエレメント (A/T AAC G/T G/T) を、影のついた四角が MycあるいはR様の転写調節タンパクが認識し結合すると考えられているシスのエレメント (CANNTG) を示している。TATAボックスは、二重下線で、cDNA各クローンの5'端を黒三角で示し、+1がプライマーエクステンション法により決定した転写開始点である。+78から翻訳が始まる。

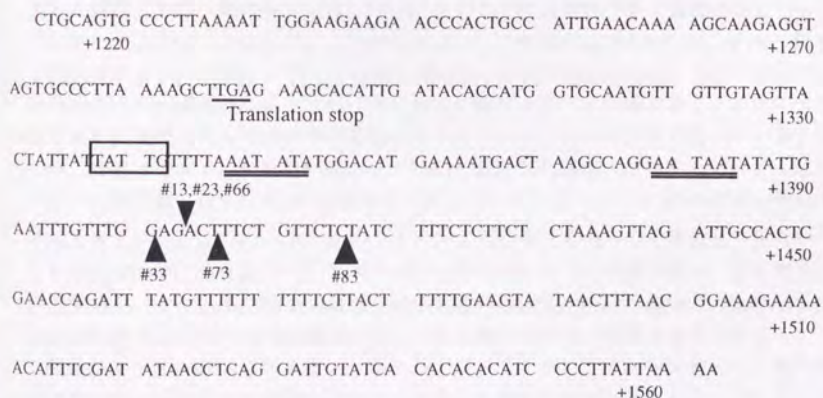


図6 アサガオのDFR-B遺伝子のターミネーター領域の構造

四角は、植物のmRNAの3'スプライシングに重要だと考えられている配列である。また、TGAは翻訳終始点であり、ポリA付加シグナルは、二重下線で、cDNA各クローンの3'終点を黒三角で示した。

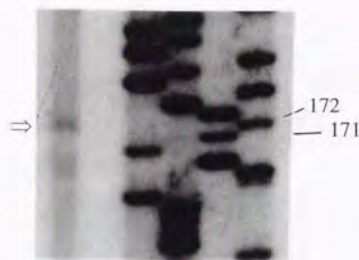


図7 プライマー・エクステンション法によるDFR-B遺伝子の転写開始点の決定
 プライマーはDFR-Bの+171から上流方向に29mersのもの：5'-GGAGGAGTGTCTTGACCAACCAGGAGCCG-3'を用いた。となりにはpBluescript SK⁺プラスミドの塩基配列が流してある。

また、DFR-B遺伝子をプローブに用いた花卉のトータルRNAに対するノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ（図8）、そのシグナルがシングルバンドであったことやシグナルの大きさ（ 1.5×10^3 nt）であったことから、花卉では主にDFR-B遺伝子だけが発現していることが分かった。図8のデータを長時間感光させると（1～2週間）その他にも 1.2×10^3 nt と $0.7 \sim 0.8 \times 10^3$ nt のシグナルが V3 と White のレーンにもうすらと確認できた（他のレーンは 1.5×10^3 nt のシグナルが強すぎて確認出来なかった。そのデータは示していない）。これが DFR-A や -C 由来の mRNA なのか、それとも *Tpn1* が DFR-B 遺伝子中に挿入していたために *Tpn1* 中で転写が止められ、ちょうどそのくらいの大きさの mRNA が出てきただけなのかは今後解決すべき問題である。。というのも絞り花や白色花アサガオの DFR-B 遺伝子のプロモーターは活性がまだ残っていると考えられ、DFR-B 遺伝子の 5' 末端の mRNA と *Tpn1* と融合した mRNA が発現しているもおかしい。現に絞り花アサガオの cDNA ライブラリーからそのような cDNA がつい最近単離されてきている。この 1.5×10^3 nt のシグナルがどちら由来のものか解析して見ないと何とも言えないが、DFR-A や -C 由来の mRNA ならばそれらの発現様式の一端を知ることが出来るし、また、もし DFR-B 遺伝子の 5' 末端の mRNA と *Tpn1* と融合した mRNA ならば、*Tpn1* の DFR-B 遺伝子の発現制御のメカニズムに関する有用な知見と考えられよう。

花卉のトータルRNAに対するノーザンハイブリダイゼーションの結果から、絞り花アサガオにおいてシグナルが検出されなかったことや絞り花から派生したリバータントにおいて DFR-B 遺伝子の発現が回復していたこと、さらに絞り花から派生した白色花においては絞り花同様シグナルが検出されなかったことから、*Tpn1* の転移が DFR-B 遺伝子の発現を制御していること、すなわち *Tpn1* が絞り模様形成の原因となっていることが

分子生物学的手法により再確認された。さらに、このことは、DFR-B遺伝子だけが主に花弁で発現するDFR遺伝子であることも同時に確認した。

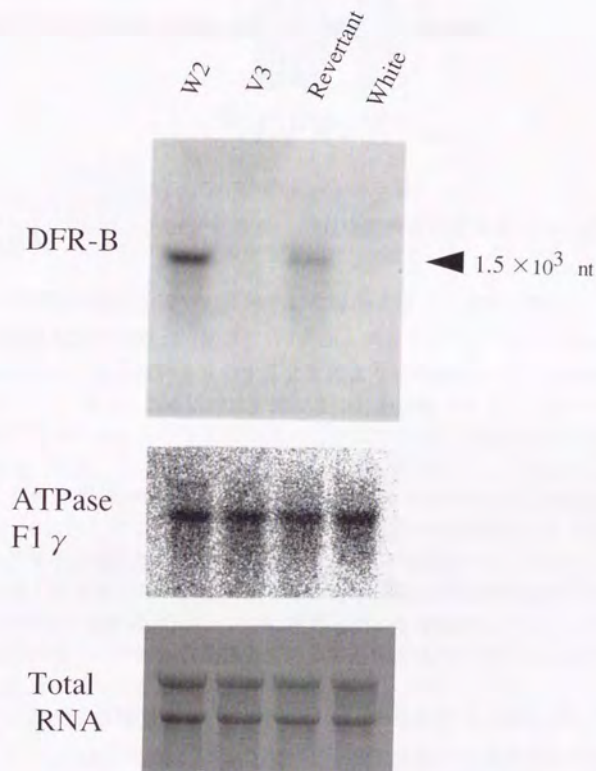


図8 DFR-B遺伝子をプローブに用いた花卉のトータルRNAに対するノーザンハイブ
リダイゼーション

W2：金色花、V3：絞り花、Revertant：絞り花から派生したジャーミナル・リバータント、White：絞り花から派生したジャーミナル・リバータントを示す。トータルRNAの電気泳動には金色花、絞り花、絞り花由来のジャーミナル・リバータント、絞り花由来の白色花それぞれについて各 4μ gを各スロットに使用した。プローブとしては金色花アサガオのDFR-BcDNA#83の全長1.5kbを用いた。また、コントロールにはサツマイモのミトコンドリア F1 ATPase γ サブユニット遺伝子1.5kbをプローブに用いた。

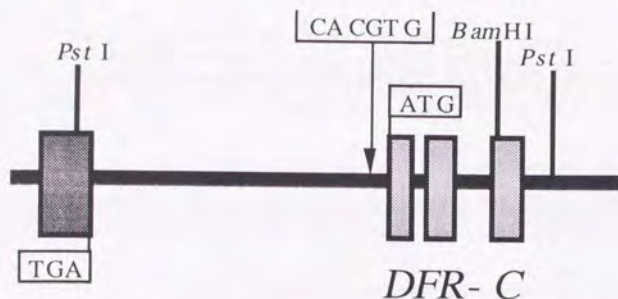


図9 DFR-C遺伝子領域の模式図

影のついた四角はエキソンを示す。ATGは翻訳開始点を表す。CACGTGはDFR-B遺伝子のプロモーター領域を示す。

つぎにDFR-AとDFR-C遺伝子について解析した結果を示す。DFR-C遺伝子については genomic DNA の塩基配列を決定し（図3）、ペチュニアとキンギョソウの DFR cDNA¹²⁾、アサガオDFR-B遺伝子の塩基配列を比較することにより解析を行った。その結果、DFR-C 遺伝子のエキソンと考えられる領域は5'側の3つしか検出されず、しかもこれらの領域内には2箇所フレーム・シフト変異が見いだされたので、偽遺伝子である可能性が高いと考えられる（図9、10）。第2章図3Aに見られるように、W2の全色花やV3、V4の絞り花でも制限酵素 *Bam*HI で処理したサザン分析の結果現われる 8.9 kb のバンドは、この章の図2Bに示したように、このDFR-C遺伝子の一部が含まれるためにこのバンドが確認できたように考えられたが、たった 0.17 kb の第3エクソンだけでシグナルがあれほど強くでるとは考えづらい。したがって、図1 DFR-Cの矢印で点線に示すように第3エクソン以降もこの 8.9 kb のバンド中に存在している可能性もある。しかし、フレーム・シフト変異が見いだされ、偽遺伝子である可能性が高いと考えられたのであるから、これ以上の解析は行わなかった。

DFR-A 遺伝子の構造上の特徴についてはゲノミックの塩基配列（図11）とペチュニアとキンギョソウの DFR cDNA¹²⁾、アサガオDFR-B遺伝子の塩基配列の比較から、DFR-A遺伝子にもDFR-B遺伝子同様、6つのエキソンが存在し、さらにプロモーター領域、ターミネーター領域と考えられる配列も見い出された（図12）。しかしながら、DFR-A 遺伝子の潜在的機能や発現様式についてはこれ以上のデータが得られてなく、今後さらに検討を試みる必要がある。

9 18 27 36 45 54
 5' ATG TCG GGC GGC GGC CGT AAT GCC CTT ACT CTT CCG GCT CCC AAA GTT TGC GTC
 Met Ser Gly Gly Gly Arg Asn Ala Pro Thr Leu Pro Ala Pro Lys Val Cys Val
 Cys Arg Ala Ala Ala Val Met Pro Leu Leu Phe Arg Leu Pro Lys Phe Ala Ser
 Val Gly Arg Arg Pro *** Cys Pro Tyr Ser Ser Gly Ser Gln Ser Leu Arg Leu
 61 72 81 90 99 108
 ACC GGA GCT GCT GGA TAC GTC GGC TCT TGG CTC GTC ATG AAG CTC CAA CGA GGT
 Thr Gly Ala Ala Gly Tyr Val Gly Ser Trp Leu Val Met Lys Leu Gln Arg Gly
 Pro Glu Leu Leu Asp Thr Ser Ala Leu Gly Ser Ser *** Ser Ser Asn Glu Val
 Arg Ser Cys Trp Ile Arg Arg Leu Leu Ala Arg His Glu Ala Pro Thr Arg Leu
 117 126 135 144 153 162
 TAC GTC GTC CAT GCA ACC GTT AGA GAC CCC GGG AAC ACG AAA AAG GTG AAA CGC
 Tyr Val Val His Ala Thr Val Arg Asp Pro Gly Asn Thr Lys Lys Val Lys Arg
 Thr Ser Ser Met Gln Pro Leu Glu Thr Pro Gly Thr Arg Lys Arg *** Asn Ala
 Arg Arg Pro Cys Asn Arg *** Arg Pro Arg Glu His Glu Lys Gly Glu Thr Leu
 171 180 189 198 207 216
 TTA CTA GAA CTG CCG AAA GCG GCG GAG GGG AAG TTG AGG CTG TGG AAG GGG GTG
 Leu Leu Glu Leu Pro Lys Ala Ala Glu Gly Lys Leu Arg Leu Trp Lys Gly Val
 Tyr *** Asn Cys Arg Lys Arg Arg Arg Gly Ser *** Gly Cys Gly Arg Gly Cys
 Thr Arg Thr Ala Glu Ser Gly Gly Gly Glu Val Glu Ala Val Glu Gly Val
 225 234 243 252 261 270
 TTG GAG GAA GAA GGA AGC TTT GAC GAC GCC ATT GCA GGG TGT GAA GGT GTG TTT
 Leu Glu Glu Glu Gly Ser Phe Asp Asp Ala Ile Ala Gly Cys Glu Gly Val Phe
 Trp Arg Lys Lys Glu Ala Leu Thr Thr Pro Leu Gln Gly Val Lys Val Cys Phe
 Gly Gly Arg Arg Lys Leu *** Arg Arg His Cys Arg Val *** Arg Cys Val Thr
 279 288 297 306 315 324
 CAT GTG GCG GCC ACC CCT GTG ATT TCG TGT CCG ACG ACC CTG AGA ATG AGA TAA
 His Val Ala Ala Thr Pro Val Ile Ser Cys Pro Thr Thr Leu Arg Met Arg ***
 Met Trp Arg Pro Pro Leu *** Phe Arg Val Arg Arg Pro *** Glu *** Asp Asn
 Cys Gly Gly His Pro Cys Asp Phe Val Ser Asp Asp Pro Glu Asn Glu Ile Ile
 333 342 351 360 369 378
 TCA GGC CGG CAG TTA AGG GGA TCC TGA GCA TCA TAA ACT CCT GTG CAA AAG CAA
 Ser Gly Arg Gln Leu Arg Gly Ser *** Ala Ser *** Thr Pro Val Gln Lys Gln
 Gln Ala Gly Ser *** Gly Asp Pro Glu His His Lys Leu Leu Cys Lys Ser Lys
 Arg Pro Ala Val Lys Gly Ile Leu Ser Ile Ile Asn Ser Cys Ala Lys Ala Lys
 387 396 405 414 423 432
 AAA CTG TGA AGA GGC TGG TTT TCA CTT CCT CTG CTG TAA CTC TCA TCG TCC AAG
 Lys Leu *** Arg Gly Trp Phe Ser Leu Pro Leu Leu *** Leu Ser Ser Ser Lys
 Asn Cys Glu Glu Ala Gly Phe His Phe Leu Cys Cys Asn Ser His Arg Pro Arg
 Thr Val Lys Arg Leu Val Phe Thr Ser Ser Ala Val Thr Leu Ile Val Gln Glu
 441 450 459 468 477 486
 AAA ACC CAA AAC CTG CTA CGA CGA AAG CAG CTG GAG TGA CTT GGA TCT CAT ATA
 Lys Thr Gln Asn Leu Leu Arg Arg Lys Gln Leu Glu *** Leu Gly Ser His Ile
 Lys Pro Lys Thr Cys Tyr Asp Glu Ser Ser Trp Ser Asp Leu Asp Leu Ile Tyr
 Asn Pro Lys Pro Ala Thr Thr Lys Ala Ala Gly Val Thr Trp Ile Ser Tyr Met
 495 504
 TGC CAA GAA AAT GCC TGG ATG G 3'
 Cys Gln Glu Asp Ala Trp Met
 Ala Lys Lys Met Pro Gly Trp
 Pro Arg Lys Cys Leu Asp

図10 DFR-C遺伝子がフレーム・シフト変異を起こしている様子

ここにはDFR-C遺伝子の類推されたエクソン領域をつなげた塩基配列を示した。四角は、どの読み枠で読んでいるのかを示している。読み枠の決定は、ベチュニアとキンギョソウの DFR cDNA²⁰⁾、アサガオDFR-B遺伝子の塩基配列を参考にした。その結果、エキソン2とエキソン3にそれぞれ1か所づつフレーム・シフト変異が存在していた（読み枠がずれている場所が、すなわちフレーム・シフト変異の位置）。

AGATCTCTCG AACATTGTGA ACGTTCTTCG TAGTTCTCAT GATCAATCTT TGCAGTTCTA *Bgl* II
 ATGATTATTC CGTTTCTTAT TCGATTATTC TTTGGTTTCT ATGTGACTAT GTGCATATTT
 GACTTGATTT GTTACTTGTG TTTGTTGATC ATTTAATTTT GGTGACTATT TCTCCTTAAA
 TATTTTCCGC AAACCAATGG GTTCTACCTA TATTTTTTTA TTTTATTTT TATTTTTTTA 300
 GATTGGCCAC CTCTCTCCGT TTTAGATGAT TACCATGTGG CATTTTTGT GTCTTCGTTA
 TAAATTTTTA AAAAAAGAC ATTTTAAAGT GTTATTTTGT GATATAAATA TATGTAGAGT
 CCACTACAAG TTTGAGTCCG ATCAAAGTAG GTTCAGGATT CTTCGAATGA AAGAGAAATT
 GAGATACTAT AACTCAAAAT GAATAATATC TGAATGAAAA ATAATTTTTA ATGAGACACA
 TTGGAATAAA AAATATAGAT GGGAAAGGAG TGGAAAGAAG CCTTAGATTG GTGGCCACACA 600
 TTA AAAACAG AAGACTATTG GACTGAGAAA TATTCTTGG TAAGTATTGC CTTTAAAGAC
 GAGTAAGCTA CACATGTAAT ATATAGTTTG GTAAAAAATT GATTAAGTCA ATTTTGGCTT
 ATTTGACCAC TATTAATTAT TTGATTAGT TAAAAATCA ATATAAATGT TTGATTAATT
 ACGTTTTCG AACTCCAAAA GGCTAAAAAT CAAAAAGCTA CTCCAAACAA CTTTTTTAAAT
 TAACTTTTTG AGAAAAGAAA TTATACCAAA CAACATCCG TTAACAGCTA ATTTACCAAA
 CACTTTTTTT ACAATCAGCT AATGTTATCA ACTATTTATA CCTTCTAATT AACACAATCA 900
 GCTAACAGCT AACAACTATT AGCTAACAC CATTTTACCA AACAGGACAA ATGTAAATTA
 TCATATAATC TTTAAGGTGG TTGAAATGG TGGACGAATA TATAATAATG CAAATTCAG
 GAGTTTGAGT ATTTCTGAAT TAGTATTTAA AAATTCCTTC CAGTTTGCTC TTCATTATCA
 TTTTCTCACT AATTTATTAC ACGATATTAG TAGCTTGT TT AAAGTGCAT TGTCAAAGAT
 AGATGTGGTA AAATGAAC AAGCAAGATA ATAAATCACT ATAAAAATTA CACAAAAATT 1200
 TGPATGACG CACATGGTAG TCTGTGGAAG CAACCTGTGG CGTTGACCAA TTAACCTGT
 GAGCATATAT ATAATATATA AAGTAATTGT GCAATTCAC TATGTGTGT T CAGCCAACCT
 AATGTCAAAC GCCATGGATT TGAATTGACT ATGATCCACG TATTGTTGG ATCCAATTAA *Bam* HI
 AAAATAATCA GTCTGCATAG AGGCGGTATG TCAAACATCT ATTAACCTAA *GCTTGGTCAT* *Hin* dIII
 CAACCCATAA GACATATACA CATGTTATAT ATTTCTTAT TTAATTTAA ATTTGATTTA 1500
 AATACAAAT TGTACTCGT AGGCATCGAA TTTCACAACA CAAGACACAT AAATTTATAA
 CATTAGACA TACACAATA CTAATTTATG TCGAGCACAG AATTCATACT CTTAAAAAGG *Eco* RI
 TACAAAATTT CATAACAAA GACACAAAA CTATTACAT AAAACGCATA CACATGCACC
 AATGACGAGG TATAAAATTC ATACTTCTAA GGTACATATT TTCATAACAC AAGACACAAG
 TCTGATTAA GTACAAAATT TGTGTTTATA GGCATAGTTT TGCACAGCAT AAAGACACAA 1800
 AAATTCATAA CATAGAACAC AATTACTAAT TTGTTTCAGA TACATAATTC ATACTCTTTA
 AGGTACAAAA TTTTCATAACA CAAGACACAA AATTTACAAA CATAAAATAC ATACACATGA
 TCTATGGTAT ATATATGGAT TAAATATATT GCTTTAGGCT GAATACTCAA ATTTGTTGCT
 TGGCTCACCT AACCGGAGT GAGCACGTGT GTATCCTCCC AGGTTAACAA ACAGTGGAA
 CAGTGGTTCC AGCCCGTCC TGAGCAACAT TCTATAAAGA TAGACGTGCT CCTACTATAC 2100
 ACTTTCACCT CAAAACATTA ATCACCTTAT AAAAATTTCT TCCCTTTAAT TTGTCTTTTT
 CACGTGCTTA AAAATGGTGG GCGGTAATCA TACTCCTGCT TCTCCGGCAC CGACCGTTTG
 CGTCACCGGA GCTGCTGGAT TTGTCGGCTC TTGGCTCGTC ATGAAGCTCC TCCAACGAGG
 CTACATTGTC CACGCCACTG TTCGAGATCC TGGTACATT ATAAAAATTT CTAGCTAAGC *Spe* I
 TACTAGTTAT TATTGACTAT ATATTAGACA AGTATAAAAA GAAAAAGTTA CACAGCTTTT 2400
 ATTGACTATA ACTTTTGACG TAGTGGTAAG GATTTGGTTC TGAAAAATCTG TAGCTATGCA
 ATTGAGGTG ACGGGTGTG GGCAGGAGT GTTGGGACG GCTCAAAAGA GTCGAGTCCA
 GCCTCCTGCT AGCATCAAAA CTAATAAAGT TATGCTATG TTATTAGTTA TAGCTTTTAG
 CATAGTGGTA AGCATTGAT ACTGACATGT AGGGAACGCA CAAAAGGTGA AACACCTGCT
 AGAAGTCCG AAAGGCGAGG GGAAGTTGAA AGTGTGGAAG GGGGTGTTGG AGGAAGAAGG 2700
 AAGTTTGTG GAAGCCATTG CAGGGTGTGA AGGGGTGTTT CATGTGCGCG CTGCTGTGAA
 TTTCCGCTCC AAGGACCTG AGGTAATTAA TGAAGAAGTC CATTGCCATC ATCCCATGCA
 TGCATGCATG CAAATAGCCA AATAGTATAT AAATATTGTC TTTTTTTTTT TTTTTTTTGT
 TAATTGGAGT TAATAATATG TATGTATATA TATATGGTAA AATGAAGTAA TAAACCAGC

AGTTAAGG GG ATCC TGAG CA TCATAAAC TC TTGTGCGAA AA GCCAAAAC CG TGAAGAAGCT 3000
GGTTTTCA CT TCCTCTAC TG CAGCTGTC CA CATTAAAGAA ACCCAACA AC TGGAGTACGA BamHI
TGAGAGCAGC TGGAGCGA CC TGGATTTC AT ATACGCCAAT AAAATGGGAG GATGGGTTAG Pst I
TTTTTTTG CT CTCTATT TA TTTATTTA TT TATTTTAA ATTTAGTAA CCCGTC TCCT
GATCCTAG CT GCCAAAAG AT CAAAAGTA GG TAAATTA TT CAGGTTGC TT AAATCTGATT
AGTTCAAA CC ATAAAACC AT TAGACCTG TT AGGAATTT GA ACTTGTA TT TTGTAGTTAG 3300
TAGATCGA AA TTCTCTCA CT CCCAGAGC CC TACATGAT AG GGGAGGGG TA AATAATCATT
GTGACTCA TC AACTCATT AG GTCAGACG GG TGTCTGAA GG GTGCAACT CC CACATTATAT
ATAGCTGT TA GTTATCC AC AATCTAAC AC ATAAGAAC CA ACTGAGCT AT ATCCAGGCGG
TAGTTGTC AG AACTCAGT TC TGTGTTCT TA TTCACAAT CT AACACATG AG AACCAACTGA
GCTACCCAG A CGGGAGGC TT TGAATGAG AA TTGTTGCA TA TATGTTGT CT CTGTCAGAT 3600
GTATTTTG CA TCCAAGAC AC TGGCGGAG AA GGAAGCAT GG AAAGCAGC CA AAGAAAAGCA Pst I
GATTGAGT TC ATCAGCAT CA TACCACCA CT AGTCATTG GC CCATTCCT CA TACCAACATT Spe I
CCCACTCAG C CTTGTCACTG CACTCTCACC AATAATGG GT ATTCTATATA TCAACTTATT 3780
CTCATCTT TC TGCAGAA TTC NN NNNNNNNN AGGGAACGGA CT TCACCACA ACATCATAAA Pst I
GCAAGGCA AA TTTGTGCATC TGGATGAT CT GTGCGAGG CT CAGATATT CT TGTACCAGCA EcoRI
TCCCAAAG CA GGAGGAAG AT TCATCTGT TC TTCCCAAC AT GCCACCAT TC ACGATGTGGC
AAAGATGA TC AGACACA CT GGCCTGAA TA CTACG TCCCT TCTGAGTNNN NNNNNNNNN
AGGTTTAA GG GCATTGAG AA GGAGTTGC CA ATAGTGTC AT TTTCAATC AA GAAGTTGCAA
GAGATGGG GT TTCAATTC AA GTACACAC TT GAGGACAT GT ACAAAGGA GC AATAGAGACG
TTGAGGAA GA AAGGTTTA CT TCCCTATT CT ACT TAA

図1 1 全色花アサガオの genomic DFR-A遺伝子領域の塩基配列

塩基配列はDFR-A遺伝子領域 *Bgl*II ~*Eco*RI~*Eco*RIの間 (図2 B参照エクソン1~4まで) 3.8 kb を、太字はDFR遺伝子のエキソンを示す。上流からDFR-Aのエキソン1~6である。DFR-A遺伝子領域 *Eco*RI~*Sac*I までの間 (図2 B参照、エクソン5~6のTAAまで) は塩基配列が完全には決定できなかったため、エキソン5及び6だけを示した。下線部はそれぞれ左欄外に示した制限酵素切断部位を示す。

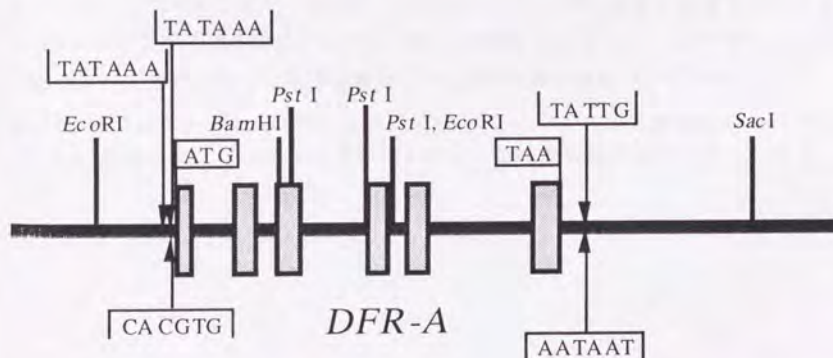


図1 2 DFR-A遺伝子領域の模式図

影のついた四角はエキソンを示す。ATGは翻訳開始点を、TAAは翻訳終始点を表す。TATAAA, CACGTGはDFR-A遺伝子のプロモーター領域を、TATTG, AATAATはターミネーター領域を示す。

3-4. 結論と考察

アサガオゲノム中にタンデムに並んだ3つの遺伝子 DFR-A、-B、-C 及び花卉より得られたDFRcDNAについて構造解析を試みた(図3、11)。その結果、DFR-B遺伝子についてはゲノミックと cDNAの両者の塩基配列の比較から、6つのエクソンが存在し、さらにプロモーター領域、ターミネーター領域と考えられる配列も見い出された(図4)。また、DFR-B遺伝子をプローブに用いた花卉のトータルRNAに対するノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、そのシグナルがシングルバンドであったことやシグナルの大きさなどから、DFR-B遺伝子だけが花卉で主に発現していると考えられる結果を得た(図8)。また、絞り花アサガオにおいてシグナルが検出されなかったことから、*Tpn 1*の挿入によりDFR-B遺伝子の発現が抑制されていることも確認された。

また、DFR-A 及び DFR-C 遺伝子については、残念ながらこれらに対応するcDNAは検出できなかった。さらに、DFR-C 遺伝子のエクソンと考えられる領域は5'側の3つしか検出されず(図9)、しかもこれらの領域内には2箇所フレーム・シフト変異が見いだされたので、偽遺伝子である可能性が高いと考えられる(図10)。また、DFR-A 遺伝子の構造上の特徴についてはゲノミックの塩基配列の比較から、DFR-A遺伝子にも6つのエクソンが存在し、さらにプロモーター領域、ターミネーター領域と考えられる配列も見い出された(図12)。しかしながら、DFR-A遺伝子の潜在的機能や発現様式については今後さらに検討を試みたい。

アサガオのDFR-B遺伝子は、既に塩基配列も決定されているベチュニアやキンギョソウのDFR遺伝子(*An6*, *Pal*)との比較やcDNAの解析から6つのエクソンと5つのイントロンにより構成されていることがわかった(図4)。これは同じ双子葉植物のベチュニアやキンギョソウ¹²⁾、アラビドプシス¹⁴⁾の構造と同様であり、これらも6つのエクソンと5つのイントロンにより構成されていることが知られている(図13)。これに対して単子葉植物である他の2種の植物(トウモロコシ¹⁵⁾、大麦¹¹⁾、)ではこれが4つのエクソンと3つのイントロンにより構成されている(図13)。分類学上、このような差がみられることは大変興味深いと考えられる。

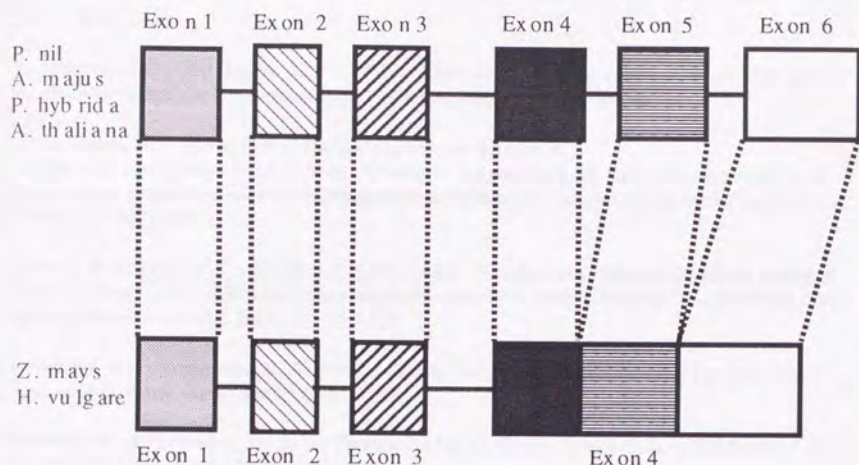


図13 各植物におけるDFR遺伝子のエキソン／イントロン構造の様子

また、今回のアサガオを含めた7種の植物DFR遺伝子の推測されるアミノ酸を比較すると、アサガオDFR-B遺伝子に対してDNAレベルで双子葉類では70～60%の相同性を示すのに対し、単子葉類では60%前後の相同性しかないことが分かった(表1)。また、アサガオDFR-B遺伝子に対して単子葉類と双子葉類ではっきりとアミノ酸が分かれている箇所も多数存在し、それぞれの植物の進化を考える上でも良い指標を与えていると考えられる。

	<双子葉植物>				<単子葉植物>	
	A. majus キンギョソウ	P. hybrida ペチュニア	A. thaliana アラビドプシス	G. hybrida ガーベラ	Z. mays トウモロコシ	H. vulgare 大麦
DNA	63%	70%	60%	66%	59%	61%
アミノ酸	60%	68%	59%	63%	52%	53%

表1 アサガオDFR-B遺伝子と他の植物のDFR遺伝子との相同性

3-5. 参考文献

- 1) Mehdy, M.C., and Lamb, C.J. (1987).: Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *EMBO*, 6, 1527-1533.
- 2) van Tunen, A.J., Koes, R.K., Spelt, C.E., van der Krol, A.R., Stuitje, A.R., and Mol, J.N.M. (1988).: Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *EMBO*, 7, 1257-1263.
- 3) Koes, R.E., Spelt, C.E., and Mol, J.N.M. (1989).: The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Mol. Biol.*, 12, 213-225.
- 4) Dooner, H.K., Jorgensen, R. A. (1991).: Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 25, 173-199
- 5) Heller, W. & Forkmann, G.: in the *Flavonoids, Biosynthesis of flavonoids*, ed. Harborne, J.B., pp.499-535. Chapman & Hall, London (1994).
- 6) Forkmann, G.: in the *Flavonoids, Genetics of flavonoids*, ed. Harborne, J.B., pp.536-564. Chapman & Hall, London (1994).
- 7) Martin, C. and Gerats, T: in the *molecular biology of flowering, The control of flower coloration.*, ed. Jordan, B.R., pp.219-255., CABI, Wallingford, UK. (1993).
- 8) O'Reilly, C., Shepherd, N.S., Pereira, A., Schwarz-Sommer, Z., Bertram, I., Robertson, D.S., Peterson, P.A., and Saedler, H. (1985).: Molecular cloning of the *a1* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu*., *EMBO J.*, 4, 877-882.
- 9) Martin, C., Carpenter, R., Sommer, H., Saedler, H. and Coen, E.S. (1985).: Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following isolation of the *pallida* locus by transposon tagging., *EMBO J.*, 7, 1625-1630.
- 10) Coen, E.S., Carpenter, R., and Martin, C. (1986).: Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*., *Cell*, 47, 285-296.
- 11) Kristiansen, K.N. and Rohde, W. (1991).: Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol-4-reductase and molecular analysis of *ant18* mutants blocked in flavonoid synthesis., *Mol. Gen. Genet.*, 230, 49-59.
- 12) Beld, M., Martin, C., Huits, H., Stuitje, A.S. and Gerats, A.G.M. (1989).: Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes., *Plant Mol. Biol.*, 13, 491-502.
- 13) Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Seppanen, P. and Teeri, T.H. (1993).: Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and characterization of *dftr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae), *Plant Mol. Biol.*, 22, 183-193.

- 14) Shirley, B.W., Hanley, S. and Goodman, H.M. (1992): Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations., *Plant Cell*, 4, 333-347.
- 15) Schwarz-Sommer, Z., Shepherd, N., Tacke, E., Gierl, A., Rohde, W., Heclercq, L., Mattes, M., Berndtgen, R., Peterson, P.A. and Saedler, H. (1987): Influence of transposable elements on the structure and function of the *Al* gene of *Zea mays*., *EMBO J.*, 6, 287-294.
- 16) Masson, P., Surosky, R., Kingsbury, J.A. and Fedoroff, N.V. (1987): Genetic and molecular analysis of the *Spm*-dependent *a-m2* alleles of the Maize *a* locus., *Genetics*, 177, 117-137.
- 17) Gerats, A.G.M., Huits, H., Vrijlandt, E., Marana, C., Souer, E., and Beld, M.: Molecular characterization of a nonautonomous transposable element (*dTph1*) of perunia., *Plant Cell*, 2, 1121-1128 (1990).
- 18) Saito, N., Cheng, J., Ichimura, M., Yokoi, M., Abe, Y., and Honda, T. (1994): Flavonoids in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, 35, 687-691.
- 19) Gerats, A.G.M., Beld, M., Huits, H. and Prescott, A. (1989): *Developmental Genetics*, 10, 561-568.
- 20) Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G., and Saedler, H. (1987): A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*, 330, 677-678.
- 21) Hagiwara, T. (1977): Genes and linkage map of Japanese morning glory. In *Plant Genetics IV*, H. Kihara and H. Yamaguchi, eds (Tokyo: Shokabo), pp. 482-501 (In Japanese).
- 22) Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.
- 23) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 24) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- 25) Hagiwara, T. (1956): Genes and chromosome maps in the Japanese morning glory. *Bull. Res. Coll. Agric. Vet. Sci. Nihon Univ.* 5, 34-56.
- 26) Imai, Y. (1938): The genes of the Japanese morning glory. *Jap. J. Genet.* 14, 24-33.
- 27) Joshi, C.P. (1987): An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes., *Nucl. Acids Res.*, 15, 6543-6653.
- 28) Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A. and Saedler, H. (1987): The regulatory *cl* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators., *EMBO J.*, 6, 3553-3558.

- 29) Dellaporta, S.L., Greenblatt, I, Kermicle, J.L., Hicks, J.B. and Wessler, S.R. (1988).: Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*., In *Chromosome Structure and Function*, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson, J.P. and Appels, R., eds.). New York: Plenum Publishing Co., pp.263-282.
- 30) Robbins, T.M., Walker, E.L., Kermicle, J.L., Alleman, M. and Dellaporta, S.L. (1991).: Meiotic instability of the *R-r* complex arising from displaced intragenic exchange and intrachromosomal rearrangement., *Genetics*, 129, 271-283.
- 31) Goff, S.A., Klein, T.M., Roth, B.A., Fromm, M.E., Cone, K.C., Radicella, J.P. (1990).: Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of *B* regulatory genes into maize tissues., *EMBO J.*, 8, 2517-2522.
- 32) Roth, B.A., Goff, S.A., Klein, T.M. and Fromm, M.E. (1991).: *C1*- and *R*-dependent expression of the maize *Bz1* gene requires sequences with homology to mammalian *myb* and *myc* binding sites., *Plant Cell*, 3, 317-325.
- 33) Joshi, C.P. (1987).: Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants:a compilation and analysis., *Nucl. Acids Res.*, 23, 9627-9640.

絞り花アサガオから単離された新トランスポゾン
Tpn 1 の構造解析

4-1. 序論	6 5
4-2. 実験方法及び材料	6 7
4-3. 結果と考察	6 8
4-4. 参考文献	7 4

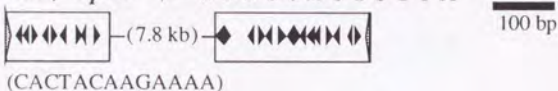
4-1. 序論

植物のトランスポゾンの転移と脱離は時には葉や花、茎そして種皮などの絞り模様を作り出すことが知られている^{1,2)}。しかしながら、これら易変性の表現型の原因としてトランスポゾンが関与していることが分子生物学的に解明されているものは主にトウモロコシとキンギョソウしかない³⁻⁵⁾。アサガオ (*Pharbitis nil*) には20を越える易変性変異体が Imai により報告されている⁶⁾。このうち、アントシアニン色素生合成遺伝子 *a-3* の易変性遺伝子であり、絞り模様を表現型とするアサガオ (*a-3^f*) において、未知のトランスポゾンが花弁のアントシアニン色素生合成系の遺伝子の発現を調節している可能性を分子生物学的に検討し、色素生合成に関与する DFR 遺伝子内にトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* 類縁の因子で、6.4 kb の新トランスポゾン *Tpn 1* (Transposable element *Pharbitis nil 1*) が挿入していることを見出した⁷⁾。なお、アントシアニン色素生合成系遺伝子 *a-3* は第5番の連鎖地図上にマップされている⁸⁾。また、青色あるいは紫色の絞り模様やセクターを持つ白色花の変異体はその他に葉脈や茎にも絞り模様が見られる (第2章図1、第3章図2A参照)。このトランスポゾン *Tpn1* は、その外側の 13 bp がトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm*^{9,10)} とまったく同じで、完全な 28 bp の末端逆反復配列を持っていた。それゆえ、この因子はトウモロコシの *En/Spm* 類縁のトランスポゾンに属すると考えられた^{5,7)}。トウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* 類縁の因子には、もちろんトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* とその内部欠失変異体である *I/dSpm*⁹⁻¹¹⁾ や、その他にはキンギョソウの *Tam1* とその類縁因子¹²⁻¹⁴⁾、また、ダイズの *Tgm1* とその類縁因子^{15,16)} やエンドウマメの *Pis1*¹⁷⁾ が含まれている。これらのトランスポゾンは、その末端部分には 13 bp 前後の末端逆反復配列が存在しており、転移・挿入に際して 3 bp の標的重複 (target duplication) が起こることも良く知られている。このトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* 類縁の因子には、順繰り返し配列や約 10 bp の反復配列を含む長い末端近傍領域 (Subterminal Repetitive Regions) が因子の両末端に存在するというもう一つの特徴をもっている (図1)。これらの末端近傍領域

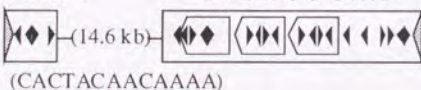
(Subterminal Repetitive Regions) には、トランスポゾンの内部にコードされる転移酵素の中の一つ、TnpA もしくはその関連タンパクが種類が結合すると考えられており、領域内部にはそのために必要な順繰り返し配列や約 10 bp の反復配列が存在していて、転移・脱離のシス・アクティング・サイトとして働くと考えられている^{18,19}。その他の *En/Spm* 類縁のトランスポゾンと同じように *Tpn1* も転移・挿入に際して 3 bp の標的重複 (target duplication) を起こす⁷⁾。

易変性遺伝子 *a-3^f* の構造、特に *Tpn1* の内部構造を解析するために、*Tpn1* の全塩基配列の決定を行い、その他の *En/Spm* 類縁のトランスポゾンと比較した。その結果、この *Tpn1* は 6412 bp で、他の *En/Spm* 類縁のトランスポゾン中、最も長くて非常に複雑な末端近傍領域 (Subterminal Repetitive Regions) を持つことが分かった。

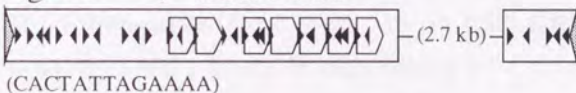
En/Spm ▶= C C C G C A C T C T T A



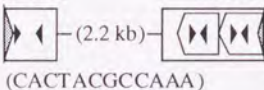
Tam 1 ▶= G T G T G G G A A



Tgm 1 ▶= A C A T C G G



Pis 1 ▶= A G A G G G C G C T T T



Tpn 1 ▶= G A C A A C G G T T

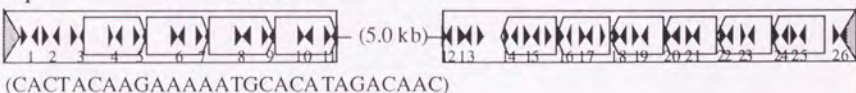


図1 *Tpn1* とその他の *En/Spm* 類縁のトランスポゾンの末端領域の構造比較
影のついた大きな三角は末端逆反復配列で、それぞれの因子の下のカッコ内にその塩基配列を示した。*Tpn1* ではその末端逆反復配列は 28 bp で、*En/Spm* 類縁のトランスポゾン中、最長である。小さな黒三角で示したものは、転移酵素が結

合すると考えられる約 10 bp の逆反復配列で、75% のホモロジーをもつものについてコンセンサスを取り、それぞれの因子の上にその塩基配列を示した。

En/Spm ではこの約 10 bp の逆反復配列を、転移酵素の一つ、TnpA もしくはその関連タンパクが認識することが示されている^{18, 19)}。この逆反復配列は、お互い逆向きの 10 bp のモチーフ2個で一つのペアとなっており、このペアを一単位として、これが両端に11個と15個繰り返されている。これについては図3Aに塩基配列を載せ、詳しく解析している。また、オープンボックスで示したものは 122 bp と 104 bp から成る順繰り返し配列で、122 bp が4つ、102 bp が6つ、繰り返されている。これについても図3Bに塩基配列を載せ、詳しく解析をした。

4-2. 実験方法及び材料

Tpn 1 の全塩基配列を決定するために、絞り花アサガオ (*a-3^f*) KK/SSB-4の系統から *Tpn 1* の完全長を含む 18.6 kb の *Bam*HI 切断断片をクローニングした⁷⁾。この *Bam*HI 切断断片は pBluescript SK⁻ ベクターにサブクローン化し、必要に応じて欠失変異体を作成し、これについて解析を行った。DNA 配列の決定はサンガー法を用いた²⁰⁾。

4-3. 結果と考察

Tpn 1 の末端逆反復配列は 28 bp で、*En/Spm* 類縁のトランスポゾン中、最長であった。この *Tpn 1* の全塩基配列を決定したところ、その長さは 6412 bp で (図 2)、他の *En/Spm* 類縁のトランスポゾン中最も長く、非常に複雑な末端近傍領域 (Subterminal Repetitive Regions) を持つことが分かった (図 1)。10 bp のモチーフ GACAACGGTT は因子の 5' 末端領域 650 bp の範囲に 22 コピー、3' 末端領域の 800 bp の範囲に 33 コピー存在していた。この 5' 末端側の 10 bp のモチーフ 22 コピーと 3' 末端側の 30 コピーでは、これらの逆反復配列の間に 3~8 bp の AT-rich な配列が挟まっていた (図 3 A,B)。残りの 3' 末端側の 3 コピーは因子の末端近傍領域中に単独で存在していた。そのうちの *Tpn 1* のポジション 861~968 にある 2 つは逆反復配列の間に 88 bp の塩基が挟まっていた。逆に 4.64 kb の内部配列 (ポジション 970~5610 の間) 中にはこの 10 bp のモチーフは存在しなかった (図 2)。また、因子の 28 bp の末端逆反復配列の内側の 6 bp はこの 10 bp のモチーフ中の 6 bp GACAAC と一致していた (図 1)。

この末端近傍領域では、122 bp の順繰り返し配列が 4 コピー、102 bp の順繰り返し配列が 6 コピー、存在していた (図 1、図 3 B)。これについては図 3 B に塩基配列を載せた。このような順繰り返し配列は *Tpn 1* の内部だけでなくキンギョソウの *Tam 1* やダイズの *Tgm 1*、エンドウマメの *Pis 1* でも見つけられている (図 1)。*Tam 1* では 95 bp、*Tgm 1* では 54 bp、*Pis 1* では 82 bp である。それゆえ、*Tpn 1* の末端近傍領域は、*En/Spm* 類縁のトランスポゾン中最も長く、最も複雑であるということが出来よう。

CACTACAAGA	AAAAATGCACA	TAGACAACAC	TAGAAAAGACA	ACAGTTTTTA	AGAAAAGTGT	
TGTCCTTTTGT	ATAAAAAGACA	ACAGTTTGGT	CCAAAACCGT	TGTCCTTTGAT	GCAACACTTT	
TGTCAAAGAC	AACGGTTTTT	ACTTAACCGT	TGTTGTAAGT	GTGTTGTCTT	TGTGCAATTTT	
GTGAAAAGAC	AACACCACAA	CGACAACGGT	TTTTTAAACC	GTTGTCTATG	TGCGTTTTTT	
TTTTTTTAAA	AGACAACCGT	TTTTTTAACC	GTTGTCGTTG	GTGTGTGTGC	TTTAAGCGCA	300
CTGGAATACA	CAACACTAGA	AAGACAACGG	TTTTTTAAAA	CCGTTGTCTT	TGTGCGCTCT	
TTTTTTAAAA	AAGACAACGG	TTTTTATTAA	CCATTGTCAT	TGGTGTGTTG	TCTTTAAGTG	
TACTCGAATA	CACAACACTA	CAAAAGACAAC	GGTTTTTAAA	AACCGTTGTC	TTTGCAACGT	
CTTTTTTATT	TAAAGGACAA	CGGTTTTTTT	ACCGTTGTTG	TTGGTGTGTT	GTCTTTAAGC	
GCAC TAGAAT	ACACAACACT	ACAAAGACAA	CGGTTTTTTA	AAACCGTTGT	CGTTGCGCGT	600
TCTTTATTGT	TTTAAGACAA	CGGTTTTATT	TAACCGTTGT	CTTTAAAAA	TAAAAAAGA	
TGTTAACATC	TTATGTATGA	ATGTGCAACA	TCTGGTATAT	AAC TGGGTTG	CTTCTGTGTT	
AGGATGCCCG	CAGGAAAAAT	AGAACCTGAG	ACCTCTAACA	TAATAAACTC	TAAACCCATC	
AAGCTACACC	AACACTTTAT	TATTTAAGCG	TAACATCTAG	GATATAACCA	GTTCGTTCTT	
GTGTTGTCTC	TGAGAACAAA	GACAAATGAT	GTATAAAATA	GGTTAAAGAT	GCTACCAGGA	900
AGGATAGAAC	CCAAAACCTC	TAACATAACA	AACAAAACCTA	AACCCACCAA	ACCACACCAA	
CCTTTGTGTTA	CTAAAGTGTT	ACACCTTATC	TTTTACTTAT	AATTTTGGGC	TGGCAGCTTT	
GACCTCCGGG	CATTGTGAACA	AAGAAAAGAA	ACAATTCAAA	AGTTAATTTA	TTGAATTATAT	
TTTCGTTTCT	ATTTAAATAT	AAAATTATTC	ACCAAAATTT	CAATTTTAAT	TAATTAAGT	EcoRI
TTTATTTTCA	ATTACAATTA	AGACCAATCT	ATGAATTCAA	ATAATAATAA	TAATAATAAT	1200
TATCAAGTAT	AAAAAATAAT	AGATTATATC	TATAATATTT	TTTTAAAAAA	ATTGGGGGGC	
CTGTGCGGTC	CGCGCGGTCC	GACATGGCCT	AGTACGGCCC	CGCGCGGTGC	GTTGTGGTGT	
CCGAATGGTG	CGGATGGTG	TGGATCGGCG	TAAGGGCGGT	ATGATAGGGG	CCTAGGTTGG	
TAATCGATCC	TTTCGGCTAG	CGCATGACTA	ACAAGGTTAG	CTATATGTTG	GTAATCAACC	
ATTCGCGGAT	GCATGGGACA	CGTGGAGAA	GGATATGAAA	GAGTAGTTGA	TATTGTACAG	1500
TAGTATTATG	CCCATTTCCT	TTGCCGCGAT	CTTTGTAATA	ATTGGGCGCC	CATCTGTCCTG	
GGTAATAAAG	GACAAATTAT	GATGTGCAAC	TGTTGTGACC	ATGGTGCACA	CTGTTCTATG	
TTTCAATATA	CCGAACATATA	TATTCATAAT	TTTTGAAATT	CATATTCATA	ATGATTGAAC	
TCTATATATA	TTTCAATATA	CAGAACTCTA	GTTCATAAT	TTTCGATATT	CATATTAACA	
AATGTTGAAC	TCTGTATTCA	CAAAATCACA	AAC TTTAGTA	TAGAAATTTAT	GAATCTACAA	1800
TATAAAAAAT	TGGAATATTT	ACACTACAAA	AAAAAAAAAA	AACAAATTTT	AGTGACAAAA	
ATTTAGTAGT	GGGTAGAAAA	ACCCCTCACT	AAATGTATTA	TTTGTATAAT	TTTTGTGAAA	
GTAAAAAAT	ACTCTAATTA	AAAGTTTATG	ATTTAGTGAC	AAAAATTTAA	TTATATATTT	
ATTTTAAAAAG	TATACTCTGA	CTATTGACAT	GAAAGATATT	GTTACCATCA	TCATTATCTG	
AAAAATATTT	CACTCAAATC	TCATTCCCAC	CAAAACCTTA	TTTTTAGGCG	CCCAAGTCTA	2100
ATTGCTTCTA	AAACACTAGT	ACAAAATTGA	ACATACCACC	GGCTTCGCAC	CCATCGCACA	
ACTACCACCG	GCTTCACGTC	ACACCCACCA	CCGTTACAG	CCACCGCGAC	AAAGCCACAG	
CCACCACCGC	GACGCCGACG	CCACAGCCGC	TGCCACGCCG	TTGATCTGAA	CCCCCTCCCT	
GCCCTGCGAC	GATGGCGGCC	TCCCTGTGAC	GACGCCACAG	CCGCCGCGTC	CGATGTGAGT	
TTGTGAGAAA	TTTTAATTTA	TTGATTTTCT	CTTGCCCTATA	AATAATTAAC	CATTGCGCCT	2400
TGCATAGTGT	TCATGTATAT	TGTTATGTTA	TTTCATATTG	TTAATAGTTC	TTCAATATTT	
TCAC TCTATT	TTCTCTGTTT	TCTCGTATGT	ATATTTAGGT	TTTTTTTTTT	CTTCTATTTG	
CTTGATTTTTG	TTTCTACTAT	TGCAATGATT	TTATGGTATA	CAAGAGTGTG	TTCCCGAAGA	
ATTACAAGGA	GAATTTTCTT	GATAACAAAT	CTATGGCCAT	TGTGAGATT	CTTAAAGCAT	
TGCATTTAAG	TTATCTTTAA	TACTAATTGC	ATAGTTGTTT	GGATGATACG	ATCATATGTT	2700
TATTTATATT	TTAAGCTTAA	TCAC TATTGT	GTTTTTGTAT	ATTAAAAATTG	AACCAAAGCT	Hin dIII
TCGAATTGATA	GATTATTTCC	TGTTTAAATTT	CATTTAAGGT	TGGGAAAGCT	GGTGGTGAGA	
AATGGAAGCG	AATGTCTGAC	TCTGTGAGCT	CTGATCTTCT	GCTTTAGAGT	TATTATTAG	Sac I
TTTGTGTATT	TAAATTTGAA	TAAATTTGCT	CGATACATCT	GTCACACGTT	TGCTATATGG	
ACTCTACTGT	TAGGAGAAAG	CTCCATATGT	GGCAAAGGCA	TCACCTCTGA	AGTCTGAGTA	3000
TGAGAAAGCT	ATGCAAGAGT	TCAGAAAAAA	TGTCCTGTGA	ATTCTCTTTG	AAATTGATCA	
CTTTTGATAT	TTTCCTTATT	TCACATCATT	ATTACATTAC	TTTTTGCTAT	GATTTTCCGC	
TAATGGCTTT	TTAAATTTAT	CTCTACTTCT	CTATTGTAGA	AGAGTAGCAG	CTCAGAAGCA	
ACCGTGTCTG	AGAATCTGTA	CGAGACTTCT	GAGGTGAAAG	ACAAC TCTGA	GCATGAAGCA	
AGCTGTTAGG	TCTGTTGCAA	CAAGATTTC	TTTACTGTAG	GGTTTGGTAT	TTCAATTGTT	3300
TCACAATTCA	GACTAATTCC	TCATGATATA	GTCTACCGTT	TGCATGTTAA	TGAGTGTAGT	

ACTTAGATGG TTTTCATAC TCTGTTGAAT ACATACTTGA CAAGAA TGTA TCTACACATA
 TATATACCTT CTATTTATGAG AATGCAA ACA TGTCATCATA TTATTA AGAT GTGTGGACAA
 TATCAATCTT GAAATGTTTT CCCCTCAA CCT TTAGAGCAGC TTTGGTGGTG CTACATCTTA
 TTATATACCTC ACAGGATTC AGAATTT CCC CCGGTACTTT GTCTGT ACTT ATATTGTAAC 3600
 TTGTAAATGC TCCGTAACTA TTTCTTA TAT ATCAGATTTG AAGATC TGAA GGACCAATTA Bgl II
 AGAATGCGTT TTTTGAAGAA GCGCAAA GTT AAAAGAATCC AGTTTG TAAT TACAAATGGG
 GGTTTATCTA TAGAATTGAA TACATAT GCT TTAATCCGTC CAACCA ATCC AGGCTCTGATT
 TTATTCTTCG ATAGTTTCGT GAACCAA ATA TCTTCAAGAT AATTGA TAAC TAATTTATTT
 TCTTCTTTCT CAGGGACTAT TACTTGG CTT GATTCTGTCT CTAACC TTCC TATAAAGGTA 3900
 ATCAATCTTA ATGTCTTCTA TTCTCAC AAA CAAGAATACA AGATAA AACT TTAGCCTTGA
 GATGATGGTT TTAAATGAAT CAAAATG AAC AGCAGTCTCT GGACAG GGT AACTAAGTGG
 AATTTAATAA AGTGTGTTGTT AATTGAC TTC CTGTAGTCTG TCTTTG TTTA CTTATGTGCA
 ACTGGGCAAG ATAGAACAAA TCTTACT TAA GTGACTACTG ATCAIT CACG TGTCTTCATA
 TTCTACGTTT GATGTGATGA GCATTAC TAG TTTGCTAACA AATTAA TACT CAAATTTTTA 4200
 ATTACTTGGT GACTTCATTT AACAATG ATC TATAGGCTCG TTGATC TCAT GGTCTTACCA
 GTGAATGGTG ACATTTGATT ATGTCTA ATT GATATC CTCTG ATCTCT AAGG TATCACCATT Eco R V
 GTTCACTTCG AAGGTTGGT CAGGGAA CTG TCCATTCACT GTTATT GTGT ATGGGATATT
 GCACGACCTC TTCACTGGTG TTGCTTG AAT ATGTTTCACA ACTCTA ATCA GTATCTTCCA
 GTTTATGAGA GCCAAATACA AACCAA TGA AAATGAAAAA TTAATACTG AGAAAAAGAGA 4500
 GCATTGTTAG GATCAAATTC TTACAAC AAA CTGGTGT TTTG TGAACCTGCA CATTTGCGCAA
 AGAAAAATGCA TTTGCATAGA GAACCAA AAG GCTAATGAAC AAGAAA GGGT AGAGCGATTT
 AGCAATGCTG TGGCTGAAATG CTTCCAT GTT GCAATTCAGA GTTTAT CAGG TATGGTAGAT
 ATATGTTTFA TGCTTTTACT TGGTGAA GAG AAAAGTATCA AGGCCT TTCT TTTATACAGG
 GGATGAGGTT GGTAGATTTG GTTTCAG AAT GATTGTGAGC TTAAG GGCA GACTTAGTTC 4800
 AACCCATAG GAGCCGGTGC ATCCACT AAC CTATCAAACT ACTAAA TTCT CATAATACTT
 TGCTTCCATT AGATC TAATA TAATCTG CCA GGTTCATAAC TTTTGC ATTT ATGGGATTT Bgl II
 GTTGGCAGCA TCTCTTTTGT TGTGGCT GGA TTAGTTGATG AATGGG CTGC TCTCTTCTTT
 GAAGAGCTTG ATTACATTA TGAAGGGA GAA AATGTGACAC TTTTGT TAGA GATTTTGAAG
 AAAGTATACT TCAAGGAGGT CACATAT CTA TGAGAAACAT GTCTTT GTTA GTATCATGTA 5100
 CATCATGATA CTAATTGAGA GGCATCA CAC ATGGCTTAAT GATGAG TTAA CTACCAAAGT
 CAATGATCTC ATAAACCTTC GTAAAA TCA TTCCAAAC TT GAGGCA TATA CATGTCTGTT
 AAACCTTTCTG ATGTACTTTC TGATGTA AGT TGGTATTGAA GAGCATGTCA TGCCTACTAT
 TTATTCTTTG GTTCACCCAC ACAACAT CAC TGATATGAAT GTATTGACAA ATTCAGGTAG
 AGAGGAAGTT CAGTGAAAGT TCTAGCT CTT TGACATGGTA CACGGA CAGA GTAAAGGAGC 5400
 TGGGTTTGAA GTTGGCATCC TTAGACT TGG TTCGTGAA TT TTTTGTAG TATTTAGACT
 TGGATGATAT ATGATTTCGAT TAGAATT GTT CATGGAAGTA TTTAGA CTG TTAATTAGTT
 CTTTGTGAAC TACACTTGGC CATGGTG AAT GGATAAATTG ATTTTT ATAT GATTAATAAT
 TCAGCAGGTT AAAAAATAGTT AAAACCG TTT AGACAACCGT TAAAA CCGT TGTCTATTTT
 ACAAAAGACA ACAGTTTGAA ACTGTTG TCT TTTCTACAAA AGACAA CACT TTATGAGTGT 5700
 GACTTTTAA TAAAGCGGT TCAATAA CAC AATAGACAAC AGTTTA TAAC TGTGTTTTTT
 TAAAGAAAAAG ACAACAGTTA AAAACCG TTG TCTATGTGCA TCAC TTAA GACACCGGT
 TTCAACAACA TTGAATAGAC AACGGGT CAA AAACGTGTTGT CTTTGA AAGA AACGACAACG
 GTTTAAACCC GTTGTCTATG TACATGA CTT TTAACAACAC CCGTTT CAAC AACACTCAAT
 AGACAACCGT TCTTAAACCG TTGTTTT TTC TAGAAAAGAC AACGGT TATT AACCGTTGTC 6000
 TATGTGTGTTG ACTTACAACA ACACAGCTT CAACAACACT TAATAGACAA CCGTTAAAAA
 ACCGTTGTTT TTTCTAGAAA AGACAAC GGT TATTAACCGT TGTC TA TGFG CGTGACATAC
 AACACACCG GCTTCAACAA CACTTAA TAG ACAACGGTTA AAAAAC CGTT GTTGTCTCTA
 GAAAAGACAA CCGTTATTAA CCGTTGT CTA TGTGCGTGAC TTACAA CAAC ACCGGCTTCA
 ACAACACTTA ATGACACAAC GTTAAAA AAC CGTTGTTGTT TCTAGA AAG ACAACGGTTA 6300
 AAAACCGTT GTCTATGCGC GGGACTT ACA ACAACACCGG CTTCAA CAAC AGAAATTATA
 CCCCACGAC AACGGTTATT AACCGTTGTC **TATGTGCATT TTTCTTGTAAG TG**

図2 *Tpn1* の全塩基配列

Tpn1 の全塩基配列 6412 bp を示した。太字は 28 bp の末端逆反復配列を、下線部はそれぞれ左欄外に示した制限酵素切断部位を示す。

AACCGTTGTC

```

1      :::::A:::  TTTAAGAA  :::GT::: ( 37- 64)
2      :::::A:::  :GGTCC:::  ::::: ( 77-104)
3      :::::A:::  :CTT-  :::::T (128-154)
4      :::::A:::  :::T---  ::::: (202-226)
5      :::::A:::  :TT---  ::::: (252-276)
6      :::::A:::  :-:TTT-  ::::: (323-348)
7      :::::A:::  :::T:---  :::A::: (373-398)
8      :::::A:::  :::T---  ::::: (445-470)
9      :::::A:::  :::T---  T:::::T (496-519)
10     :::::A:::  :::T---  ::::: (566-591)
11     :::::A:::  :-:TTT-  ::::: (616-641)
      :::::T:A:::  88bp  :::T:::T (861-968)

12     :::::A:::  ---:-:-  ::::: (5612-5634)
13     :::::A:::  :---:-:-  :::T::: (5647-5669)
      :::::AC:::  ::::: (5682-5691)
14     :::::A:::  :A:-----  :::T:::T (5735-5757)
15     :::::A:::  ---:-:-  ::::: (5770-5792)
      A:::C:::  ::::: (5812-5821)
16     :::::G:::  CAAA-----  ::::: (5838-5861)
17     :::::A:::  :AA-----  ::::: (5874-5896)
      A:::C:::  ::::: (5916-5925)
18     :::::A:::  C:::-----  :::::T (5942-5965)
19     :::::A:::  A:::-----  ::::: (5978-6000)
20     :::::A:::  ---:-:-  :::::T (6046-6069)
21     :::::A:::  A:::-----  ::::: (6082-6104)
22     :::::A:::  ---:-:-  :::::T (6150-6173)
23     :::::A:::  A:::-----  ::::: (6186-6208)
24     :::::A:::  ---:-:-  :::::T (6254-6277)
25     :::::A:::  ---:-:-  ::::: (6290-6313)
26     :::::A:::  A:::-----  ::::: (6368-6390)

```

L1 GTAAGTGTGT TGTCTTTGTG CATTTTGTGA AAGACAACA CCACAACGAC AACGGTTTTT T-AAACGGTT
L2 : :TG: : : : : :AA: :GCAC: : : : : :T:C: : : : : :T:G: :A: : : : : : : :A: : : : : :
L3 A:TG: : : : : :AA: TG:AC:C: : : : : :T:C: : : : : :T: :A: : : : : : :AA: : : : : :
L4 : :TG: : : : : :AA: GCAC:A: : : : : :T:C: : : : : :T: :A: : : : : : :A: : : : : :

GTCCTATGTCG GTTTTTTTTT TTTTAAAAGA CAACGGTTTT TT-TAACCGT TGTC (155 - 276)
 ::::T::: ::C::: :::-AA::: ::::: ::A:T::: ::A::: (277 - 398)
 ::::T::: ::C::: ::C::: ::A::: ::G::: ::::: ::-T::: :::T (399 - 519)
 :::GT::C::: ::C::: ::A::: ::G::: ::T::: ::::: ::A:T::: ::::: (520 - 641)

```

R1  CACAAATAGAC AACAGTTTAT -AACTGTTGT TTTTAAAGA AAAGACAACA GTTAA--AAC CGTGTCTAT
R2  TTG:::~::~:~::G:G:C:A A:::~::~:~::C::G::~::~:~::C::~::~:~::G::~::~:~::T::~::~:~::
R3  T:::~::~:~::G::CT: A::C::~::~:~::~::CT::~::~:~::G::~::~:~::TT-::~::~:~::
R4  :TT:::~::~:~::G::A:A A::C::~::~:~::G::CT::~::~:~::G::~::~:~::TT-::~::~:~::
R5  :TT:::~::~:~::G::A:A A::C::~::~:~::G::CT::~::~:~::G::~::~:~::TT-::~::~:~::
R6  :TT:::~::~:~::G::A:A A::C::~::~:~::G::CT::~::~:~::G::~::~:~::A::~::~:~::

```

```
GTGCATCACT TTAAACAACA CCGGTTTCAA CAACA      (5728 - 5830)
::A:::G::: :::::::::: :::::::::: :::::      (5831 - 5934)
:::TG:G::: ::C::: :::A:C::: :::::      (5935 - 6038)
:::G:G::A ::C::: :::C::: :::::      (6039 - 6142)
:::G:G::C ::C::: :::C::: :::::      (6143 - 6246)
:C:GGG::: ::C::: :::C::: :::::      (6247 - 6351)
```

図3 A B Tpn1 末端近傍領域における 10 bp の逆反復配列のモチーフ (A) と順繰り
返し配列 (B)

図1で示した模式図の実際の塩基配列を示した。図中の2つのコロン(:)は上段の塩基と同じであることを、棒(-)は空欄を示している。カッコ内の数値は全塩基配列上(図2)の位置を示しており、(B)中の矢印は(A)で

示される逆反復配列を、L1~L2やR1~R6は末端近傍領域中の順繰り返し配列で、5'末端左側からL1~3'末端右側のR6までを示している。

トランスポゾン大きく2つのタイプに分けられる。1つは自らの因子内部に自らを転移させることができる転移酵素をコードしている自律性因子と自律性因子から産出される転移酵素がトランスに作用しないことや転移できない非自律性の因子である（第1章序論イントロダクション参照）。特にトウモロコシの自律性因子 *En/Spm* では2種類の転移酵素、TnpA、TnpD がコードされていることや、その転移酵素遺伝子が内部欠失した非自律性因子が存在することが知られている²¹⁻²³）。この自律性因子 *En/Spm* では TnpA 転移酵素が末端近傍領域の 12 bp のモチーフに結合するのに対して、TnpD 転移酵素は 13 bp の末端逆反復配列を認識すると考えられている。また、TnpA は自律性因子 *En/Spm* のプロモーターに作用する自律制御タンパクであることも明らかにされた²⁴）。その他の自律性因子、例えばキンギョソウの *Tam1* はトウモロコシの自律性因子 *En/Spm* 同様、その構造がよく知られており、これにも2つの転移酵素、Tnp1、Tnp2がコードされている¹³）。また、トウモロコシの *En/Spm*、キンギョソウの *Tam1* の両方の因子内部には、ともに大きな Open Reading Frames (ORF), 2.7 kb と 2.2 kb がコードされている（図4）。この ORF は TnpD と Tnp2 の一部をコードしており、両者の間にはアミノ酸レベルで約 45% のホモロジーが存在することが知られている。

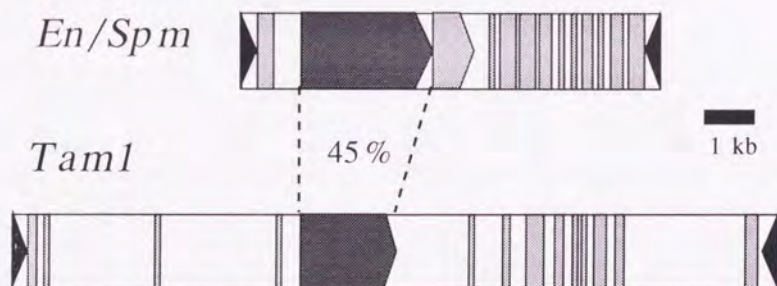


図4 トウモロコシの *En/Spm* とキンギョソウの *Tam1* の内部構造

これに対して *Tpn1* の内部には 250 bp 以上の ORF は最長でも 411 bp しかなかった（図5）。かつ、この 411 bp の ORF はこれらの大きな ORF とはホモロジーは存在しなかった。このことは、明らかにこの *Tpn1* が他の自律性因子、トウモロコシの *En/Spm* キンギョソウの *Tam1* の両方とはその構造が違っていることを示しており、非自律性因子である可能性が高いと思われる。

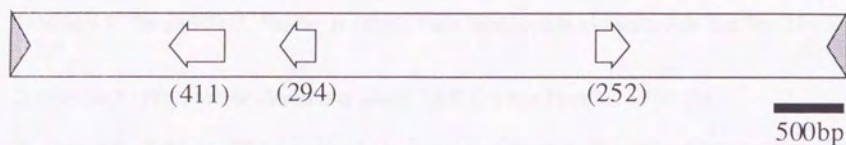


図5 Tpn1 内部に存在する250 bp 以上の Open Reading Frames (ORF)。

白抜き矢印の方向は250 bp 以上のORFの方向を、その矢印の大きさや位置は、250 bp 以上のORFの大きさや位置を示している。なお、カッコ内の数字は250 bp 以上のORFの大きさを示し、単位は bp である。

4-4. 参考文献

- 1) Nevers P, Shepherd NS, Saedler H (1986) Plant transposable elements. *Adv Bot Res* 12:103-203
- 2) Peterson P (1987) Mobile elements in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 6:104-208
- 3) Coen ES, Robbins TP, Almeida J, Hudson A, Carpenter R (1989) Consequences and mechanisms of transposition in *Antirrhinum majus*. In: Berg DE, Howe MM (eds) *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 413-436
- 4) Fedoroff NV (1989) Maize transposable elements. In: Berg DE, Howe MM (eds) *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 375-411
- 5) Gierl A, Saedler H (1992) Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol Biol* 19:39-49
- 6) Imai Y (1934) On the mutable genes of *Pharbitis*, with special reference to their bearing on the mechanism of bud-variation. *J Coll Agric Imp Univ Tokyo* 12:479-523
- 7) Inagaki Y, Hisatomi Y, Suzuki T, Kasahara K, Iida S (1994) Isolation of a Suppressor-mutator/Enhancer-like transposable element, Tpn1, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell* 6:375-383
- 8) Hagiwara T (1956) Genes and chromosome maps in the Japanese morning glory. *Bull Res Coll Agric Vet Sci Nihon Univ* 5:34-56
- 9) Pereira A, Cuypers H, Gierl A, Schwarz-Sommer Z, Saedler H (1986) Molecular analysis of the En/Spm transposable element system of *Zea mays*. *EMBO J* 5:835-841
- 10) Masson P, Surosky R, Kingsbury JA, Fedoroff NV (1987) Genetic and molecular analysis of the Spm-dependent a-m2 alleles of the maize a locus. *Genetics* 177:117-137
- 11) Pereira A, Schwarz-Sommer Z, Gierl A, Bertram I, Peterson PA, Saedler H (1985) Genetic and molecular analysis of the Enhancer (En) transposable element system of *Zea mays*. *EMBO J* 4:17-23
- 12) Krebbers E, Hehl R, Piotrowiak R, Lonnig WE, Sommer H, Saedler H (1987) Molecular analysis of paramutant plants of *Antirrhinum majus* and the involvement of transposable elements. *Mol Gen Genet* 209:499-507
- 13) Nacken WKF, Piotrowiak R, Saedler H, Sommer H (1991) The transposable element Tam1 from *Antirrhinum majus* shows structural homology to the maize transposon En/Spm and has no sequence specificity of insertion. *Mol Gen Genet* 228:201-208
- 14) Luo D, Coen ES, Doyle S, Carpenter R (1991) Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J* 1:59-69
- 15) Rhodes PR, Vodkin LO (1985) Highly structured sequence homology between an insertion element and the gene in which it resides. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:493-497

- 16) Rhodes PR, Vodkin LO (1988) Organization of the Tgm family of transposable elements in soybean. *Genetics* 120:597-604
- 17) Shirsat AH (1988) A transposon-like structure in the 5' flanking sequence of a legumin gene from *Pisum sativum*. *Mol Gen Genet* 212:129-133
- 18) Gierl A, Lutticke S, Saedler H (1988) TnpA product encoded by the transposable element En-1 of *Zea mays* is a DNA binding protein. *EMBO J* 7:4045-4053
- 19) Trentmann SM, Saedler H, Gierl A (1993) The transposable element En/Spm-encoded TNPA protein contains a DNA binding and a dimerization domain. *Mol Gen Genet* 238:201-208
- 20) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- 21) Masson P, Rutherford G, Banks JA, Fedoroff N (1989) Essential large transcripts of the maize Spm transposable element are generated by alternative splicing. *Cell* 58:755-765
- 22) Masson P, Strem M, Fedoroff N (1991) The tnpA and tnpD gene products of the Spm element are required for transposition in tobacco. *Plant Cell* 3:73-85
- 23) Frey M, Reinecke J, Grant S, Saedler H, Gierl A (1990) Excision of the En/Spm transposable element of *Zea mays* requires two element-encoded proteins. *EMBO J* 9:4037-4044
- 24) Schlappi M, Raina R, Fedoroff N (1994) Epigenetic regulation of the maize Spm transposable element: Novel activation of a methylated promoter by TnpA. *Cell* 77:427-437

今後の展望

アサガオは、日本では非常に良く知られた植物で、その変異体も数多く存在している。私は、そのうちの絞り花アサガオについて、この花の絞り模様がどのような原因により形成されるのか、そのメカニズムについての解明を試み以下の3点について結果を得た。

1つめにアントシアニン色素合成系遺伝子DFR-B中に見い出された新トランスポゾン *Tpn 1* を同定・単離し、絞り模様を形成させる原因がこの *Tpn 1* の転移にあったこと。2つめに、アントシアニン色素合成系遺伝子DFRの構造と機能について解析し、そのうちのDFR-B遺伝子が主にアサガオ花卉で発現するDFR遺伝子であり、アントシアニン色素合成に関わっていること。そして最後に、アサガオの新トランスポゾン *Tpn 1* の構造について解析を行い、おそらく、この *Tpn 1* は非自律性の因子であること。

以上のこの3点を明らかにしたことにより、この絞り花の絞り模様形成は図1に見られるような分子機構によるものと考えられる。すなわち、絞り花アサガオの絞り模様形成のメカニズムは、非自律性トランスポゾン *Tpn 1* が、アサガオゲノム中のどこかに存在する未知の自律性因子から産出される転移酵素が、トランスに作用することにより、アントシアニン色素の生合成に関与するDFR-B遺伝子から花卉形成時に転移、脱離することにより絞りもようが作り出される。したがって、今後はさらに絞り模様形成の制御機構、特に絞り模様の激しさ、すなわち、トランスポゾン *Tpn 1* のDFR-B遺伝子からの転移・脱離の頻度やタイミングについてのメカニズムを解明するためには、DFR-B遺伝子や *Tpn 1* の構造と機能を明らかにすることのみならず、未知の自律性因子を単離し、その自律性因子の側からの詳しい解析が行われる必要があろう。

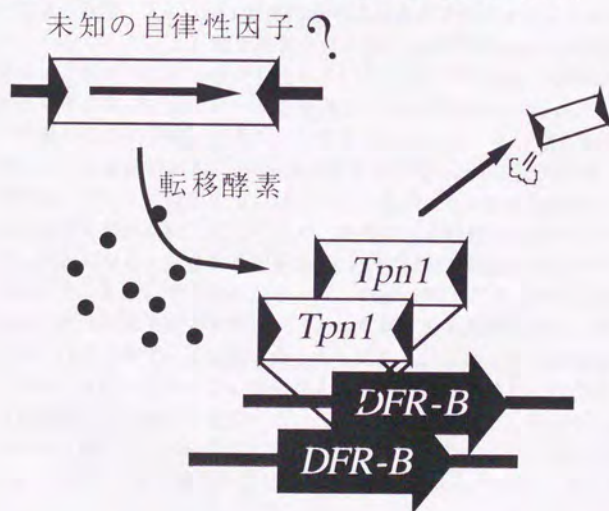


図1 絞り花アサガオの絞り模様形成のメカニズム

では、どのようなアプローチをすれば、この未知の自律性因子を単離することが出来るだろうか。過去に単離された自律性因子にはトウモロコシのトランスポゾン *Ac*¹⁾、*En/Spm*²⁾、あるいは *Mu*^{3,4)}、キンギョソウでは *Tam1*⁵⁾、*Tam3*⁶⁾ などが挙げられる。単離されてきている。*Ac*、*En/Spm*、あるいは *Mu*^{3,4)} は、B. McClintock をはじめトウモロコシの遺伝学者により蓄積された膨大なトウモロコシの遺伝学的知見があったからこそ、*Ds* や *I/dSpm* をトランスに作用させることのできる自律性因子を単離することが出来た。また、逆にキンギョソウでは *Tam1*、*Tam3* などの自律性因子は、もちろんその遺伝学的知見の蓄積によるところが大ではあるが、特に *Tam3* が自律性因子であることを証明したのは、この因子を異種植物に導入し、その可動性を確認したことによる。*Ac*¹⁾、*En/Spm*²⁾、*Tam1*⁵⁾、*Tam3*⁶⁾ などの自律性因子が1980年代後半に単離されて約10年、その間に単離できた自律性植物トランスポゾンは、*Mu*^{3,4)} だけである。さらに、過去の事例を参考にすれば、たとえ自律性らしき因子がアサガオから単離できたとしても、それを自律性因子であると証明するのは、並大抵なことではないと思われる。

未知の自律性因子を単離するには、例えば自律性因子が産出する転移酵素遺伝子 (mRNA) の方向から、あるいは遺伝学的知見から、あるいは絞り模様の頻度とタイミングの制御の違いとDNAメチレーションの差を用いるなど種々あるが、私は特に遺伝学的手法と分子生物学的手法の両者を用いる方法に注目し、解析を始めた。

自律性因子を単離することに今回単離した *Tpn1* がプローブとして使えるのか、まず、この因子のコピー数を絞り花アサガオ (V3、V4) と全色花アサガオ (W2) の両者について調べた (図2)。

図2の結果、1) *Tpn1* 類縁の因子は全色花アサガオゲノム中にはそれほど多くは含まれていないこと、2) 絞り花アサガオゲノム中では *Tpn1* の内部塩基配列に比べて末端部分ほど、多くのコピー数が存在していること、3) *Tpn1* の内部塩基配列中 B 領域と C 領域はアサガオゲノム中の一部を置換している可能性が示唆された (したがって、自律性因子単離のためのプローブとしては使えない) こと、4) V3とV4の系統は同じ祖先から由来している系統であることの4点が明らかになった。したがって、自律性因子単離のためのプローブとして使うのなら、コピー数が少ないD,E,F領域のうちのいずれかを用いればよいかも知れないと考えられた。さらに、この絞り花中のコピー数を減らすことを考えた。できるなら、非自律性因子 *Tpn1* と未知の自律性因子の2コピーの状態に近づけるようにする。もし、そうなったならば、*Tpn1* が転移することにより絞り模様が形成され、これは自律性因子がアサガオゲノム中に存在する指標となる。すなわち、転移酵素をトランスに作用させている証明となるからである。このコピー数を減らす遺伝学的手法を図3に示す。コピー数の少ない全色花と絞り花を掛け合わせ、F2世代で絞り花あるいは白色花を指標にその個体を選別する。このとき絞りとなった個体中には自律性因子が存在しているのに対して、白色花では存在していないことになる。また、すべてが絞り花になる場合には *Tpn1* と同じ染色体上に自律性因子が存在していることになる。



図2 絞り花アサガオ (V3, V4) と全色花アサガオ (W2) 両者のゲノム中における *Tpn1* のコピー数

genomic DNA は制限酵素 *Bgl*III により処理し、それぞれ示されたプローブ (A~G) を用いてハイブリダイズした。W2: 全色花アサガオ KK/ZSK-2 を、V3: 絞り花アサガオ KK/SSB-3 を、V4: 絞り花アサガオ KK/SSB-4 を示す。図中の数はバンドの大きさで、kb を表わしている。

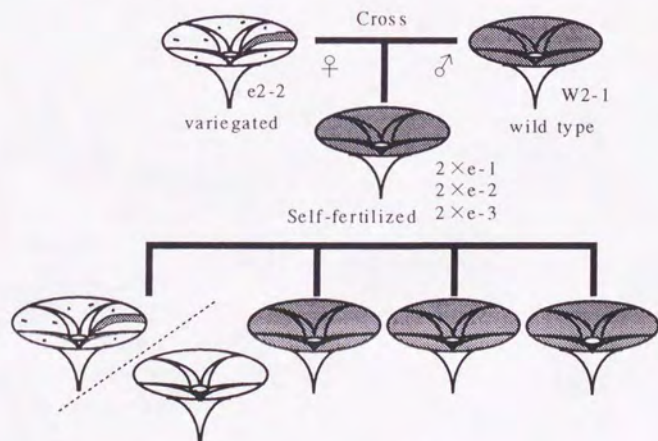


図3 未知自律性因子単離のための概念図

全色花W2-1と絞り花e2-2を掛け合わせた。F1については自家受精させ、F2世代で、その表現型により選抜を行った。

第2章・結論と考察 でもふれたが、絞り花アサガオでは、その個体ごとによっては、その個体に咲くすべての花において、絞り頻度が極端に低く、かつタイミングが極端に遅いために個体全体の花において白色花を咲かせることがある（第2章図7のExp.4のh）これはトランスポソンの転移の頻度とタイミングが極端に低く、かつ遅いためと考えられている。この白色花となる原因に関しては、ペチュニアDFR cDNAをプローブに用いたサザン法により、トランスポゾン *Tpn1* が転移・脱離していないこと（データは示していない）、さらに、DFR-B遺伝子の発現が止められていること（第3章図8参照）がわかったので、おそらく転移酵素が結合するトランスポソンの末端領域がメチル化されることなどにより、トランスポソンの転移が抑えられているためと考えることができる。このような表現型を示す現象はトウモロコシのトランスポゾン *En/Spm* においても、観察されている。

図4は絞り花アサガオの各個体の染色体DNAをメチル化・センシティブな制限酵素 *Bgl*II で処理し、*Tpn 1* の内部塩基配列D及びFをプローブとしたサザン法の結果である。これにおいて、本来、絞り花アサガオ由来の個体は、そのすべての染色体上に *Tpn 1* を持っているはずである。したがって、*Bgl*II で処理したときには絞り花アサガオ由来の個体では内部塩基配列EとFの領域の1.2 kbのシグナルが検出されるはず（V3, f, f3-1, c-1, i-5, a-2, e-2, g-4）なのに、白色花個体（h）由来のF1（h-1）では、そのシグナルが検出されず、その変わり、13.7 kbに検出されるA, B, C, Dの領域内部塩基配列由来のバンドが1.0 kb程度大きい方へシフトしていた。このような白色花を咲かせる現象には、メチル化が関与していると考えた場合に予測される結果を示している（図4）。それゆえ、トランスポソンの末端領域に対するメチル化が、何らかの関与をしているものと考えられる。



図4 絞り花アサガオにおける *Tpn1* の転移とメチル化の関係

絞り花アサガオの各個体の染色体DNAをメチル化・センシティブな制限酵素 *Bgl*II で処理し、*Tpn1* の内部塩基配列D及びFをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブFで解析したときのみ、*Tpn1* 固有の内部塩基配列E, F由来の 1.2 kb のシグナルが検出される。w2, v3, f, f3-1, c-1, i-5, a-2, e-2, h-1, g-4 は第2章図7を参照のこと。ただし、h-1 については絞り花と記載してあるが、その絞りの頻度は極端に低く、かつタイミングは極端に遅い表現型を示している。

コピー数の少ない全色花と絞り花を掛け合わせ、F2世代で絞り花あるいは白色花を指標に選別したところ、そのような個体は、全部で9個得られた(図5、ただし、図中2e1-3は全色花だった)。そのうちの2e2-2だけが白色花を示した。なお、この個体については、図5に示されるように *Tpn1* 内部塩基配列のEとFの領域由来のシグナル(1.2 kb)も得られており、メチル化に関与した白色花でないことも分かっている。したがって、この個体では自律性因子が分離された可能性が高いものと考えられる。また、その個体では、他の絞り花では存在し、この2e2-2の個体にだけ存在しないシグナル(図5、プローブFのサザン法の結果で矢印に示されるシグナル)が見つかったことから、このバンドが自律性因子の一端である可能性が示唆された。現在、このバンドについて、クローニングをし、さらなる解析を試みようと考えている。

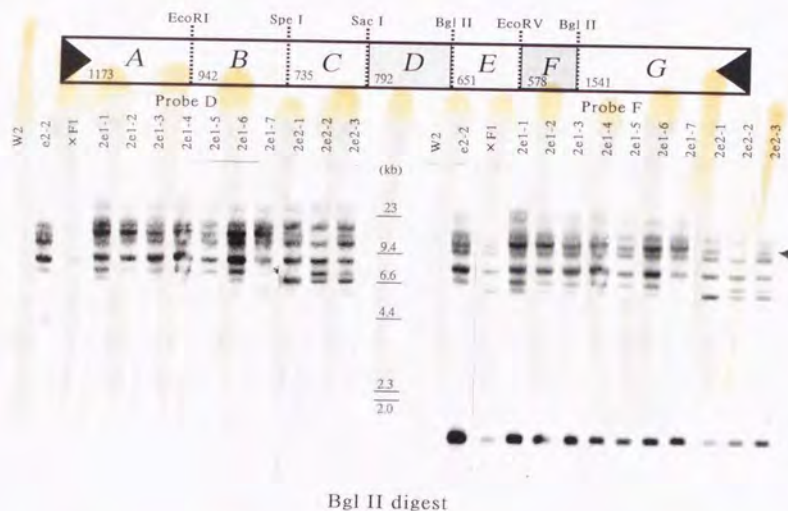


図5 全色花と絞り花アサガオを掛け合わせたF2世代について行ったプローブDとFを用いたサザンハイブリダイゼーション

絞り花アサガオの各個体の染色体DNAは、制限酵素 *Bgl* II で処理し、*Tpn 1* の内部塩基配列D及びFをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。絞り花あるいは白色花を指標に選別した個体は、全部で9個得られた。そのうちの2e2-2だけが白色花を示した。

参考文献

- 1) Fedoroff, N. Wessler, S. and Shure, M. (1983): Isolation of the transposable maize controlling element *Ac* and *Ds*., *Cell*, 35, 235-242.
- 2) Pereira A, Schwarz-Sommer Z, Gierl A, Bertram I, Peterson PA, Saedler H (1985) Genetic and molecular analysis of the Enhancer (En) transposable element system of *Zea mays*. *EMBO J* 4:17-23
- 3) Hershberger, R.J., Warren, C.A. and Walbot, V.: Mutator activity in maize correlates with the presence and expression of the *Mu* transposable element *Mu9*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10198-10202 (1991).
- 4) Qin, M., Robertson, D.S. and Ellingboe, A.H.: Cloning of the Mutator transposable element *MuA2*, a putative regulator of somatic mutability of the *a1-Mum2* allele in maize., *Genetics*, 129, 845-854 (1991).
- 5) Bonas, U., Sommer, H., Harrison, B.J. and Saedler, H. (1984): The transposable element *Tam1* of *Antirrhinum majus* is 17 kb long., *Mol. Gen. Genet.*, 194, 138-143.
- 6) Sommer, H., Carpenter, R., Harrison, B.J. and Saedler, H. (1985): The transposable element *Tam3* of *Antirrhinum majus* generates a novel type of sequence alterations upon excision., *Mol. Gen. Genet.*, 199, 225-231.

第6章

謝 辞

この博士論文を書くに当り、本研究の機会を与えて下さり、かつ御指導・御助言・御助力を賜りました東京大学薬学部衛生化学・裁判化学教室 井上圭三教授並びに新井洋由助教授に厚く御礼申し上げます。また、研究並びに原稿に対する御指導・御助言・御助力を賜りました東京理科大学基礎工学部生物工学科・飯田滋 教授、並びに宮崎力博士（現・九州大学農学部付属遺伝子資源センター）、土生芳樹博士（東京理科大学助手）、アサガオの種子をいただいた元・法政大学教授笠原基知治博士、研究に対する御助力いただいた東京大学教養学部 小関良宏博士、そして東京理科大学基礎工学部生物工学科飯田研究室の学生諸君に厚く御礼申し上げます。

平成7年 1月20日

稲垣 善茂

論文目録

論文

1. 題目 『絞り花アサガオから単離された転移調節因子の解析の研究』

2. 印刷公表の方法及び時期

- (1) Inagaki, Y., Hisatomi, Y., Suzuki, T., Kasahara, K. and Iida, S. Isolation of a Suppressor-mutator/Enhancer-like transposable element, *Tpn1*, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell* **6**, 375-383, 1994.
- (2) Hoshino, A., Inagaki, Y. and Iida, S. Structural analysis of *Tpn1*, a transposable element isolated from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Mol. Gen. Genet.* (In press)
- (3) Inagaki, Y., Hisatomi, Y. and Iida, S. Somatic excision of the transposable element, *Tpn1*, from the DFR gene for pigmentation in subepidermal layer of periclinally chimeric flowers and sexual transmission of empty donor sequences in their progeny of Japanese morning glory bearing variegated flowers. (In preparation)
- (4) 飯田 滋、稲垣善茂、久富恵世、星野 敦 『アサガオの花色とトランスポゾン』
学術雑誌・化学と生物 **31**, 492-494, 1993. (日本農芸化学会編学会出版センター刊)

3. 冊数 4 篇

参考論文

1. 題目 『トウモロコシの転移因子 *Ac/Ds* のイネ染色体上での可動性と安定性』

2. 印刷公表の方法及び時期

- (1) Shimamoto, K., Miyazaki, C., Hashimoto, H., Izawa, T., Itoh, K., Terada, R., Inagaki, Y. and Iida, S. *Trans*-activation and stable integration of the maize transposable element *Ds* cotransfected with the *Ac* transposase gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 354-360, 1993.
- (2) 飯田 滋、稲垣善茂、島本 功 『植物の転移因子とトランスポゾンタギング』
学術雑誌・蛋白質 核酸 酵素 **37**, 695-709, 1992. (共立出版社)

3. 冊数 2 篇

平成 7 年 1 月 20 日作成





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19