



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シカクマメKunitz型キモトリブシンインヒビター遺伝子の発現調節機構の解析
Author(s)	坂田, 洋一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第3668号
Issue Date	1995-03-24
DOI	https://doi.org/10.11501/3082670
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50169
Type	doctoral thesis
File Information	000000285122.pdf



シカクマメ Kunitz型キモトリプシンインヒビター遺伝子
の発現調節機構の解析

農芸化学専攻 博士課程

坂田 洋一

①

シカクマメKunitz型キモトリプシンインヒビター遺伝子の発現調節機構の解析

農芸化学専攻 博士課程

坂田洋一

目次	
要約	1
緒論	3
第1章 WCI遺伝子の発現の解析	
1 序	14
2 WCI-3をコードする遺伝子の塩基配列の決定	15
3 WCI遺伝子のタバコにおける発現の解析	17
4 タバコBY-2培養細胞プロトプラストにおけるWCI遺伝子の発現の解析	22
5 考察	23
第2章 WCI-3遺伝子の発現を制御するシスエレメントの同定	
1 序	38
2 トランスジェニックタバコにおけるWCI-3遺伝子の発現に関与するシスエレメントの同定	38
3 パーティクルガン法によるシカクマメ種子における一過的発現系を用いた解析	42
4 考察	44
第3章 WCI-3遺伝子プロモーターに結合する核内因子をコードするcDNAのクローニングと解析	
1 序	61
2 WCI-3遺伝子プロモーター断片に結合するシカクマメ葉cDNAの単離	62
3 cDNAの塩基配列の決定	64
4 WBHD1をコードする遺伝子のシカクマメゲノムにおける構成と葉における発現	67
5 考察	68
総括	81
謝辞	83
参考文献	84

要約

植物における遺伝子の時間的および空間的な発現制御機構の解析は、植物の成長および分化の分子機構を知る上で非常に意義深いと考えられる。しかし、植物遺伝子の発現制御機構については未だ詳細な情報は得られていない。熱帯産マメ科植物であるシカクマメの種子および塊根にはKunitz型キモトリプシンインヒビター (WCI) が蓄積することが知られている。また、種子におけるWCIの蓄積は時期特異的に開始される。WCIをコードする遺伝子の時期および器官特異的な発現制御機構の解析は、植物の分化に伴った遺伝子発現を制御している分子機構に多くの知見を与えるものとする。本論文では、WCIをコードする遺伝子の発現解析を行い、そのシスエレメントおよびトランス因子の同定を行った。

1 主要なWCIタンパク質であるWCI-3はきわめて相同性の高い2つの遺伝子、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子によりコードされていることが明らかとなった。WCI多重遺伝子族を構成する各WCI遺伝子の5'上流域をレポーター遺伝子につないだキメラ遺伝子をタバコに導入し、得られたトランスジェニックタバコの解析を行った。その結果、WCI遺伝子の特異的な発現は転写レベルで制御されていること、その器官特異的な発現を制御するシスエレメントはWCI遺伝子に共通して存在する領域、すなわちTATAボックスを含む約100bpの領域に存在する可能性が示された。また、WCI-3遺伝子の5'上流域には器官特異性に加えて、種子の胚における時期特異的な転写の活性化に関わるシスエレメントが存在することが示された。また、WCI遺伝子はタバコ培養細胞プロトプラストに導入した場合、特異的な発現制御を失うことが示された。

2 WCI-3遺伝子の5'上流域を様々に欠失させたプロモーターを作製し、トランスジェニックタバコにおけるプロモーター活性を解析した。その結果、時期特異的な転写の活性化にはTATAボックスを含む約100bpの保存領域に加えて、-882bp~-623bpのAT塩基対に富む領域とRY配列が必要であることが示された。また、パーティクルガン法によりシカクマメ種子に導入されたWCI-3遺伝子の一過的な発現は、トランスジェニックタバコにおける発現と部分的に異なる機構で行われていることが明らかとなった。

3 サウスーウェスタン法により、WCI-3遺伝子プロモーターに結合するタンパク質をコードするcDNAを、シカクマメ葉のcDNAライブラリーよりクローニングした。塩基配列の解析より、このcDNAはホメオドメインとPHDフィンガードメインを持つDNA結合タンパク質をコードすることが明らかとなった。マメ科植物におけるホメ

オドメインを持つタンパク質の報告は、本論文が始めてである。このタンパク質をシカクマメホメオドメインタンパク質 (winged bean homeodomain protein : WBHD1) と命名した。WBHD1の結合特異性の解析および推定される分子量から、WBHD1は、シカクマメ中に普遍的に存在し、WCI-3遺伝子プロモーターに結合するバンド3形成因子を構成するタンパク質であると推定された。

緒論

植物の種子は温度、水分、酸素あるいは光等の条件が整うと休眠を解除し発芽を開始する。胚は分裂と成長を続け、根、莖、葉、花といった器官を形成し、次世代の種子を残す。植物種によってはこの過程で塊根あるいは塊莖といった貯蔵器官を形成する。次世代の種子においても同様の分化成長が正確に行われる。この遺伝情報はその植物固有のゲノム中の各遺伝子に収められており、植物の分化成長は様々な遺伝子の発現が順序良く正確に行われた結果であるといえる。一方、植物は地上に根を下ろしているため、外界での温度変化、乾燥といった様々なストレスに巧妙に対応し、種の存続をはかる。これは外界での変化がシグナルとなって植物に伝わり（短期的には物質レベルで対応するが）、ある特定の遺伝子の発現を誘導あるいは抑制した結果と考えられる。つまり、時間軸に沿ってあらかじめ決められた順序で遺伝子発現のON/OFFスイッチが切り替えられる正確さと、ストレスが発生した場合に特定の遺伝子発現のON/OFFスイッチを切り替えられる柔軟さの組み合わせが植物の分化成長を支えている。ではこのON/OFFの切り替えはどのような仕組みにより行われているのであろうか。近年の分子生物学の進歩は、遺伝情報の発現はDNA→RNA→タンパク質の一方向でのみ流れていくというClickにより提唱されたセントラルドグマが、多少の例外はあるものの、生物の基本原理であること、またその発現制御は各ステップで行われていることを示してきた。

以下に現在までに得られている遺伝子発現の制御機構についての知見をまとめておく。1) 染色体レベルでの制御:ウマノカイチュウやタマバエでは生殖細胞から一部の染色体が捨てられる（不必要な遺伝子の除去）ことにより体細胞へと分化する。また哺乳動物の雌ではX染色体の不活性化が起こることが知られている。2) DNAの一次構造の変化による制御:アフリカツメガエルの卵細胞におけるrRNA遺伝子の特異的増幅、哺乳動物における免疫グロブリン遺伝子の組み替え等が例に挙げられる。また、トランスポゾンの挿入や、DNAのメチル化による遺伝子の不活性化等も知られている。3) 転写段階での制御:遺伝子のプロモーターと転写を行う基本装置、およびその活性を制御する因子との相互作用により転写が行われる。遺伝子発現の主要な制御段階と考えられている。4) mRNAの安定性による制御:mRNA自体の配列や、付加されるpoly(A)の長さによりその安定性が異なることが知られている。5) スプライシングによる制御:同一の転写産物が異なるスプライシングにより異なるタンパク質をコードするmRNAになることが知られている。6) 翻訳段階での制御:リボソームに結合する翻訳開始因子やポリペプチド鎖延長因子の増加によるタンパク質合成活性の上昇が挙げられる。7) タンパク質の修飾による制御:リン酸化による活性制御がある種の転写因子の作用に重要である。

このように、遺伝子は様々な段階での制御を受けた後にその表現型を示す。近年

の遺伝子発現における分子生物学的研究は転写段階での制御が遺伝子発現において重要であることを明らかにした。では、転写はどのようにして起こるのだろうか。現在までに得られている知見をもとに要約してみる (Fig.0-1)。遺伝子の転写を司る情報を持つ領域をプロモーターと呼ぶ。通常このプロモーター領域はアミノ酸をコードする領域の5'上流域に存在する。真核生物の場合、プロモーターは大きく分けて2つの領域に分けることが出来る。1つは基本配列と呼ばれる領域で、TATAボックスと転写開始点を含む領域である。ここにはRNAポリメラーゼを含む基本転写装置 (TFIIA~I) が形成される。基本転写装置は主に正確な位置からの転写を制御している。この領域のみでは通常転写は活性化されず、転写の時間的および空間的制御や量を決定する調節配列領域がその上流に存在する。その位置や方向に関係なく転写の量を増大させる領域をエンハンサーとして区別するが、調節配列との決定的違いは曖昧であり、ここではまとめて調節配列と呼ぶことにする。遺伝子発現の多様性の源はこの調節配列であることから、動植物を問わず集中的な解析がなされている。このようにプロモーターには転写を制御する情報が存在しており、そのような配列をシスエレメントと呼ぶ。このシスエレメントを認識し実際に転写の制御を行うのが転写因子 (トランス因子) である。当初は比較的単純に見えたシスエレメントとトランス因子の相互作用による転写活性化のメカニズムも、実際に研究が進むにつれて、予想以上に複雑であることがわかり、トランス因子同士の三次元的な位置関係がようやく明らかになりつつあるが、タンパク質同士による転写活性化のメカニズムの研究は今ようやく出発点に立ったところである。残念なことに、このような知見は酵母や昆虫、哺乳動物を材料にした解析で明らかになってきたことであり、植物においてはその解析は大きく遅れているのが現状である。*In vitro* 転写系の確立が遅れていること、動物におけるがん細胞由来の培養細胞の様に組織特異性を維持した培養細胞が得にくいため、トランスフェクション実験のような一過的発現系を用いられなかったことがあげられる。また、世代時間が酵母やショウジョウバエと比べて長く、また、ゲノムサイズが大きいため遺伝学的解析が困難であったことがあげられる。近年になって、世代時間が短く、ゲノムサイズが小さいアラビドプシスを用いた遺伝学的解析が盛んになってきており、このようなアプローチにより植物でも様々な生命現象に関わる遺伝子が数多く同定されるようになってきた。しかし、遺伝学的解析のみでは同定された遺伝子の機能 (役割でなく) について詳細な情報は得ることは困難である。遺伝学的アプローチと分子生物学的アプローチの両方がそろって初めて植物においても遺伝子発現のメカニズムが詳細に明らかになると考えられる。

植物には動物には見られない多くの興味深い現象が観察される。光により発現が誘導される遺伝子 (Glimartin et al., 1990; Kuhlemeier et al., 1987)、乾燥、塩濃度といっ

たストレスにより誘導される遺伝子 (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994)、微生物との相互作用により誘導される遺伝子 (Manen et al., 1991; Dixon and Harrison, 1990) などは植物固有の現象として多くの研究がなされている。胚発生と種子形成も植物固有の現象を含んだ過程である。胚形成期には植物体の主要な組織と細胞タイプが形成され、このような時期に発現する形態形成を制御する遺伝子の同定が行われてきた (Goldberg et al., 1989)。胚発生初期における基本的な形態が確立されると発生中期～後期の胚には種子特異的なタンパク質の蓄積が開始される。これらは発芽時の炭素源、窒素源としての役割や種子の乾燥耐性に関わる貯蔵タンパク質やLea (late embryogenesis abundant) タンパク質に加えて、機能の判明していないレクチンやプロテアーゼインヒビターが含まれる。このうち種子貯蔵タンパク質は胚の成熟中期以降にしか発現が見られないという時間的および空間的制御を受け、発現量も多いことから植物の分化に伴う遺伝子の発現制御解析のモデル系として研究が為されている (Barker et al., 1988; Harada et al., 1989; Jofuku and Goldberg 1989; Thomas 1993)。

本論文では、熱帯産マメ科植物であるシカクマメ (英名 winged bean : *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.) の種子および塊根に多量に蓄積するKunitz型キモトリプシンインヒビターをコードする遺伝子の発現制御機構を明らかにすることにより、植物の分化に伴う遺伝子の時間的および空間的発現制御機構を解明することを目的とした。

シカクマメは多年生つる性植物であり、塊根を形成する (Duke et al., 1986) (Fig.0-2, 3)。通常は一年生作物として育てられ、乾期になると地上部は枯れるが、雨期になると塊根から芽が出て再び生育を開始する。植物体の各組織が高タンパク質であり、食用に供する事が出来るため、特に、熱帯地方の発展途上国における食糧資源として注目される。一般にマメ科植物の種子中には多量のプロテアーゼインヒビターが蓄積することが知られている。一般にこれらインヒビターは、分子量約20kDaで2つのジスルフィド結合を持つKunitz型と、分子量が約8kDaで7つのジスルフィド結合を持つBowman-Birk型に分けられる。マメ科植物は熱帯性木本として出現し、熱帯性草本、温帯性木本を経て温帯性草本へと進化したと考えられている。この過程でプロテアーゼインヒビターはKunitz型からBowman-Birk型へと進化した (Hara, 1989)。進化の中間地点に位置するシカクマメはKunitz型とBowman-Birk型を併せ持つが、ほとんどの活性はKunitz型に由来する (Shibata et al., 1988)。このプロテアーゼインヒビターの機能としては、貯蔵タンパク質、内在性プロテアーゼ活性の制御、害虫からの防御機構等が考えられているが、詳しいことは判っていない。ササゲにはBowman-Birk型のトリプシンインヒビターが存在するが、このトリプシンインヒビターのcDNAに、植物体内で構成的に働くカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーターをつないだキメラ遺伝子を導入したタバコでは、タバコガ

(*Heliothis virescens*) の幼虫に対して抵抗性を示したことから (Hilder et al., 1987)、Bowman-Birk型のプロテアーゼインヒビターには害虫に対する防御の機能がある考えられる。Kunitz型に関してはこのような解析は行われていないが、ダイズではKunitz型トリプシンインヒビター (KTI) 活性を持たない変異株が存在する (Orf and Hymowitz, 1979) ことから、植物の生育に必須なものではないと考えられる。また、進化の過程でKunitz型からBowman-Birk型へと移行した (Hara, 1989) と考えられることから、Kunitz型に関しても害虫からの防御機能を持つ可能性が考えられる。

シカクマメ種子にはキモトリプシン活性を阻害するキモトリプシンインヒビター (WCI: winged bean chymotrypsin inhibitor)、トリプシン活性を阻害するトリプシンインヒビター、トリプシンとキモトリプシン活性を阻害するトリプシン/キモトリプシンインヒビターの3種類が存在し (Shibata et al., 1986)、その蓄積量はマメ科植物の中でも最も多いものの一つである。WCIには少なくとも4種のイソインヒビター (WCI-1~4) が存在し (Shibata et al., 1986)、このうちWCI-3は主要なWCIタンパク質で、その全アミノ酸配列が決定されている (Shibata et al., 1988)。WCI-3は1分子で2分子のキモトリプシンの活性を阻害する双頭型であり、Kunitz型としてはきわめてユニークなタンパク質である。WCI-3をコードするcDNAは既にクローニングされており、その塩基配列が決定されている (Peyachoknagul et al., 1989) (Fig.0-4)。また、WCI活性は種子の成熟中期に急激に上昇することが報告されていたが (Abe et al., 1985)、Habuら (1992) はWCI-3抗体を用いたウェスタン解析およびWCI-3 cDNAをプローブとしたノザン解析から、WCIタンパク質の蓄積パターンはWCI活性と同様であること、WCI mRNAの蓄積は成熟中期に一過的に起こることを明らかにし、塊根においても多量のWCIタンパク質とWCI mRNAの蓄積が認められることを報告した (Fig.0-5,6,7)。マメ科植物において塊根を形成するものはシカクマメの他にはわずかし報告されておらず (Duku et al., 1986)、WCIをコードする遺伝子は種子および塊根で特異的に発現しているというきわめてユニークな発現特異性を持つことが明らかとなった。このような遺伝子の発現解析は行われておらず、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現様式と異なる制御の存在がうかがわれる。また、WCI遺伝子は多重遺伝子族を形成していることが示され、その一部が既に Habu (1992) によりクローニングされた。

本論文はWCIをコードする多重遺伝子族の発現解析、そのシスエレメント、トランス因子の同定を行った。

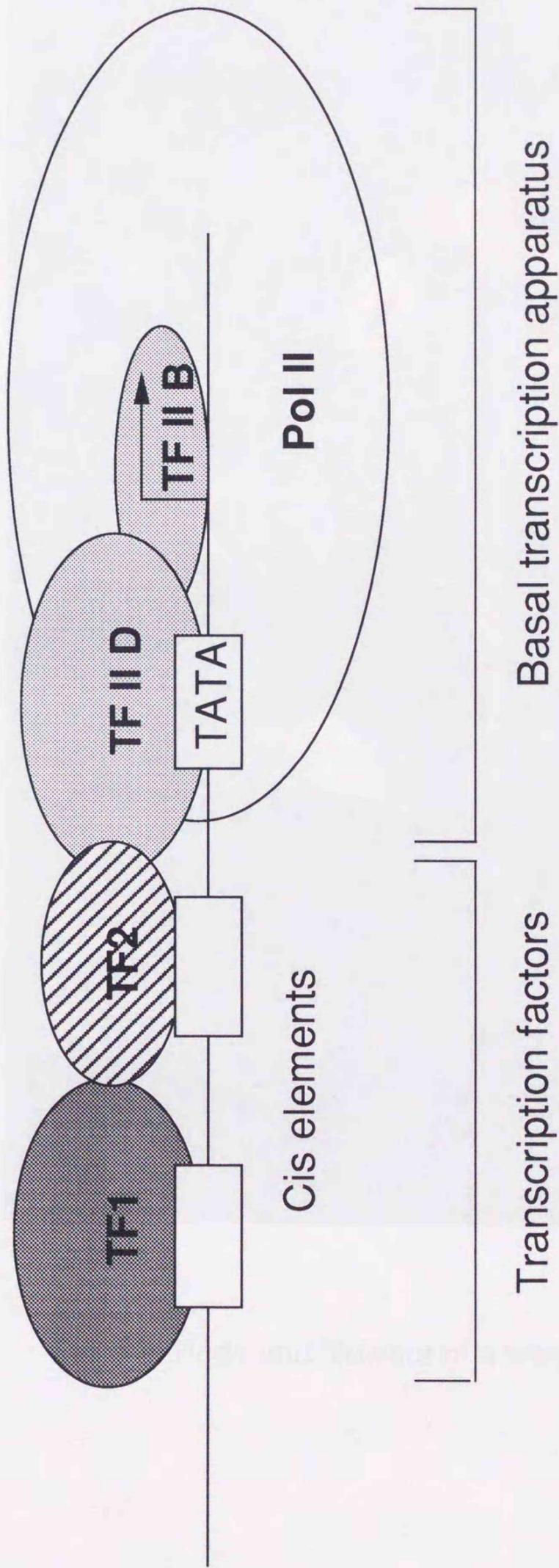


Fig.0-1 Model for transcription of a gene by RNA polymerase II. In this model, the basal transcription apparatus is activated by certain transcription factors (TF1 and TF2) bound to its cis elements, and RNA polymerase II (Pol II) can initiate transcription from the startpoint.



Fig.0-2 Pods and flowers of a winged bean plant.



Fig.0-3 Tuberous roots of a winged bean plant.

		Met Lys Ser Thr Thr Phe Leu	7
1	GG AAA TCG TTC CAC AAG CAT AAA AAA ATG AAG AGT ACT ACA TTT CTT		47
8	Ala Leu Phe Leu Leu Ser Ala Ile Ile Ser His Leu Pro Ser Ser Thr		23
48	GCC CTC TTT CTA CTC TCT GCC ATC ATC TCA CAC CTA CCA TCA TCC ACT		95
	▼		
24	Ala Asp Asp Asp Leu Val Asp Ala Glu Gly Asn Leu Val Glu Asn Gly		39
96	GCT GAT GAT GAT TTG GTC GAT GCT GAA GGT AAC TTA GTT GAA AAT GGT		143
40	Gly Thr Tyr Tyr Leu Leu Pro His Ile Trp Ala His Gly Gly Gly Ile		55
144	GGC ACA TAC TAT CTG TTG CCA CAT ATA TGG GCA CAC GGG GGA GGA ATA		191
56	Glu Thr Ala Lys Thr Gly Asn Glu Pro Cys Pro Leu Thr Val Val Arg		71
192	GAA ACA GCA AAA ACA GGA AAC GAA CCA TGC CCT CTA ACA GTG GTA CGA		239
72	Ser Pro Asn Glu Val Ser Lys Gly Glu Pro Ile Arg Ile Ser Ser Gln		87
240	TCT CCC AAT GAG GTC TCT AAA GGG GAA CCA ATA AGG ATC TCA TCC CAA		287
88	Phe Leu Ser Leu Phe Ile Pro Arg Gly Ser Leu Val Ala Leu Gly Phe		103
288	TTC CTT TCA TTG TTC ATC CCC AGA GGC TCT CTA GTG GCT CTT GGA TTC		335
104	Ala Asn Pro Pro Ser Cys Ala Ala Ser Pro Trp Trp Thr Val Val Asp		119
336	GCT AAC CCT CCA TCT TGT GCA GCT TCT CCG TGG TGG ACT GTT GTT GAC		383
120	Ser Pro Gln Gly Pro Ala Val Lys Leu Ser Gln Gln Lys Leu Pro Glu		135
384	TCT CCA CAA GGA CCC GCT GTT AAA CTT AGT CAG CAA AAA CTT CCG GAA		431
136	Lys Asp Ile Leu Val Phe Lys Phe Glu Lys Val Ser His Ser Asn Ile		151
432	AAG GAT ATT CTA GTG TTT AAA TTC GAG AAA GTT TCC CAT TCT AAC ATT		479
152	His Val Tyr Lys Leu Leu Tyr Cys Gln His Asp Glu Glu Asp Val Lys		167
480	CAC GTG TAC AAG CTT TTG TAC TGT CAA CAT GAC GAA GAG GAT GTG AAG		527
168	Cys Asp Gln Tyr Ile Gly Ile His Arg Asp Arg Asn Gly Asn Arg Arg		183
528	TGT GAT CAG TAT ATC GGG ATT CAT AGG GAT CGC AAT GGA AAC AGA CGT		575
184	Leu Val Val Thr Glu Glu Asn Pro Leu Glu Leu Val Leu Leu Lys Ala		199
576	TTG GTG GTG ACT GAG GAA AAC CCA TTA GAG CTT GTG CTT CTG AAA GCT		623
200	Lys Ser Glu Thr Ala Ser Ser His ***		
624	AAG TCA GAA ACT GCA TCA AGC CAT TAA GCA CTT CTC ATC CTT AAA AGT		671
672	CAT CTG TGC TTA TGA CTA AAT GAA TGC TTT GCT TGT <u>AAT AAA</u> TTG TCA		719
720	CAC CAC <u>TCA ATA AAA</u> TTA TCT AAG TTT TTG CTT TTC TTT TTT T(A) _n		762

Fig.0-4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of WCI-3 cDNA. A reactive site for inhibitory activity (Leu-Ser) is shaded. Cys residues which make disulfide bridges are boxed. Poly (A) signal sequences are underlined. Putative cleavage site of signal peptide is indicated by an arrowhead. (from Habu, 1992)



Fig.0-5 Northern hybridization of RNA from various organs of winged bean. RNAs extracted from various organs of winged bean were hybridized to WCI-3 cDNA probe. cDNA : WCI-3 CDNA, 35DAF Seed: 35 days after flowering seeds. (from Habu et al., 1992)

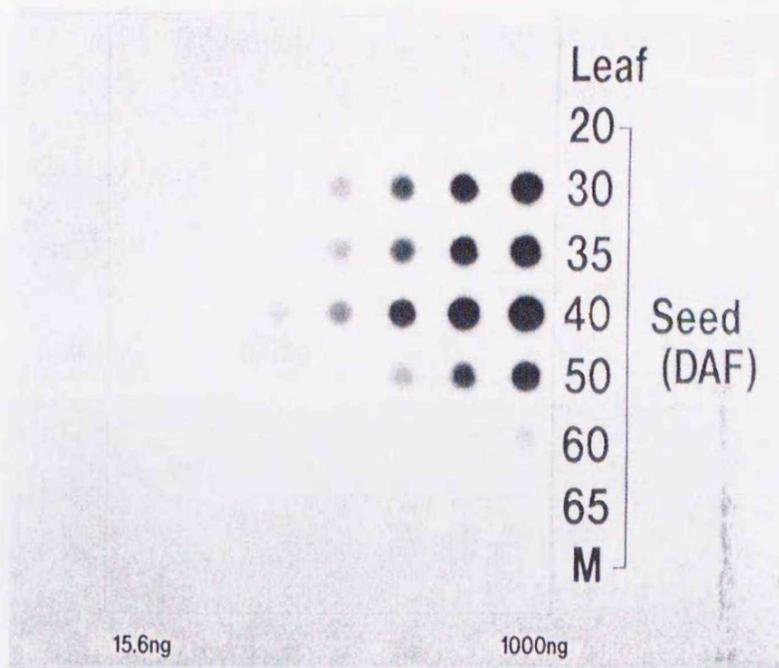


Fig.0-6 Dot blot hybridization of RNA from winged bean leaves and developing seeds. RNA from leaves and various maturation stage seeds were serially diluted and hybridized to WCI-3 cDNA probe. M: mature seeds, L: leaves. (from Habu et al., 1992)

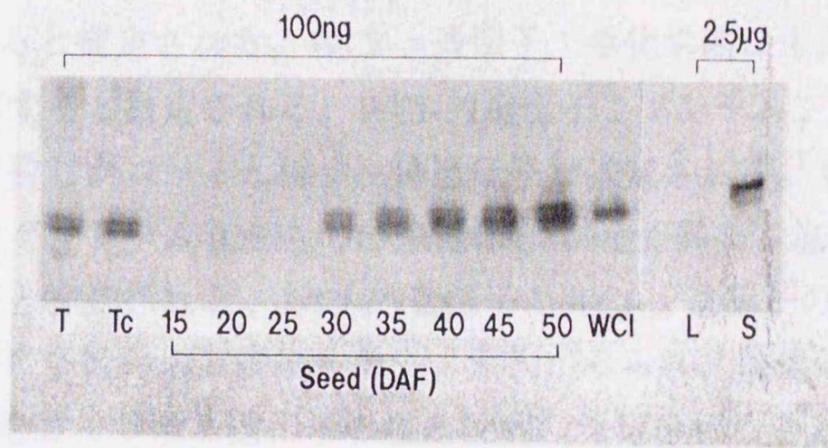


Fig.0-7 Western blot analysis of protein from various organs of winged bean. T: tuberous roots, Tc: cortices of tuberous roots, WCI: purified WCI-3 protein, S: stems. (from Habu et al.,1992)

第1章 WCI遺伝子の発現の解析

1 序

一般に種子貯蔵タンパク質は多重遺伝子族によりコードされており、イネグルテリン遺伝子のように各々が機能的な遺伝子として発現している場合 (Takaiwa, 1990) や、1つの遺伝子が主に機能している場合 (Jofuku et al., 1989) が知られている。しかし、多重遺伝子族を構成するそれぞれの遺伝子の発現を詳しく解析した例はほとんどみられない。Shibataら (1986) はシカクマメUPS31株の種子中には複数種のWCIタンパク質が蓄積していることを明らかにした。Habuら (1992) はWCIが多重遺伝子族を形成していることをWCI-3 cDNAをプローブとしたシカクマメゲノムのサザン解析で示し、WCI-3 cDNAとの相同性から以下に述べる5つのWCI遺伝子を得た。WCI-2遺伝子：シカクマメ (UPS-31 株) 種子中でWCI-3に次ぐ主要なWCIタンパク質であるWCI-2をコードすると推定される。WCI-x 遺伝子：生化学的に未同定であるWCIタンパク質をコードすると推定される。WCI-P1遺伝子：フレームシフト変異により極めて短いタンパク質しかコードし得ず、偽遺伝子と推定される。WCI-P2遺伝子：オープンリーディングフレーム (ORF) のC-末端側1/3が全く異なる塩基配列に置換されており、偽遺伝子と推定される。WCI-P3遺伝子：WCI-x 遺伝子の5'上流域に存在する遺伝子で、ORFに多数の塩基置換、欠失、挿入がみられ、偽遺伝子と推定される。

本章ではWCI-3をコードする遺伝子の塩基配列の決定を行うとともに、多重遺伝子族を構成する遺伝子の発現を2つの系を用いて解析し、WCI遺伝子の発現調節に関与するシスエレメントについて考察した。

1つはトランスジェニック植物を用いた解析である。緒論でも述べたように、遺伝子発現の重要な制御段階は転写段階であることが多い。Habuら (1992) はWCI mRNAの蓄積はWCIタンパク質の蓄積する器官においてのみ検出されること、また種子においてWCI mRNAは成熟中期に一過的に蓄積することを示した。このことは、WCI遺伝子においても転写段階における発現制御が働いていることを示唆する。転写レベルでの制御機構を解析する場合、プロモーター領域に定量の容易な遺伝子 (レポーター遺伝子) をつないだキメラ遺伝子を *in vivo* あるいは *in vitro* 発現系に導入し、その発現を解析する方法が有効である。遺伝子そのものを使用した場合にはそのmRNAの安定性などが関わってきて解釈が複雑になるが、レポーター遺伝子を用いた場合には、プロモーターによる転写レベルでの発現制御を効率よく解析することができる。植物の場合にはアグロバクテリウムのTiプラスミドを用いた遺伝子導入および個体の再生法がいくつかの植物種において確立されているため、このようなキメラ遺伝子を導入したトランスジェニック植物を用いた解析が盛んに行われている。マメ科植物においては個体の再生法が十分に確立されていないことから (Dhir et

al., 1991)、その遺伝子の発現解析は遺伝子導入の容易なタバコ、ペチュニア、アラビドプシスといった異種植物が用いられてきた。実際、マメ科植物の種子貯蔵タンパク質遺伝子がこれら植物に導入されて解析されたが、その発現特異性は異種植物中でも保持されていた (Goldberg et al., 1989)。このことは種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現制御機構は種を越えて保存されていることを示唆している。そこでWCI遺伝子ファミリーの転写レベルでの制御機構を、トランスジェニックタバコを用いて解析することを試みた。ここではレポーター遺伝子として大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を用いた。GUSは植物中には存在せず、蛍光法による感度の高い解析が容易に行えるため、植物におけるレポーター遺伝子としてよく用いられる (Jefferson et al., 1987)。

トランスジェニックタバコを用いた遺伝子発現の解析は時間がかかるという短所がある。特に第2章で示すシスエレメントの同定においては多数の変異プロモーターの転写活性を解析しなければならないため、より迅速に解析を行える系の開発が望まれる。そこでよく用いられるのが一過的発現系である。この方法の長所は *in vivo* での解析が非常に効率よく行える点にある。一過的発現系には通常、プロトプラストを用いたエレクトロポレーション法がその簡便性から用いられている (McCarty et al., 1991; Salmenkallio et al., 1990; Ueda et al., 1992;)。そこで、ここではプロトプラスト化およびエレクトロポレーション法による遺伝子導入系が確立されているタバコBY-2培養細胞を用いて、WCI遺伝子の一過的発現の解析を行った。

2 WCI-3をコードする遺伝子の塩基配列の決定

2-1 実験材料および方法

2-1-1 WCI-3をコードする遺伝子のクローニング

シカクマメ UPS89 株の葉より、Habuら (1992) の方法に従い、ゲノムDNAを調製した。EcoRIにより完全分解したゲノムDNAを λ Sep6-lac5 (Maniatis et al, 1982) に連結した。ギガパックゴールド (Stratagene) を用いて *in vitro* パッケージングを行い、Sambrookら (1989) らの方法に従い大腸菌Y1090 *hsd^r* に感染させた。1.5%寒天を含むNZY培地 (1リットル当たり5g NaCl, 2g MgSO₄·7H₂O, 5g イーストエキス、10g NZアミン) にプレーティングしてナイロン膜 (Hybond-N+, Amersham) にプラークを写し取り、DNAを固定した。ECL遺伝子検出システム (Amersham) を使用して、シカクマメ UPS89 株の開花後 (DAF : days after flowering) 30~40日目の種子由来のWCI-3 cDNA (Peyachoknagul et al., 1989) に西洋わさびペルオキシダーゼを結合させたプローブを用いてスクリーニングを行った。陽性クローンをSambrookら (1989) の方法に従い大量

培養し、ファージDNAを調製した。

2-1-2 WCI-3遺伝子の塩基配列の決定

2つの陽性クローンより得られた*EcoRI*断片 (7.8kbp, 8.0kbp) からcDNAと相同性を示す領域とその5'上流域1.1kbをpGEM-7zf(+)に両向きにサブクローニングした。様々な欠失プラスミドをキロシーケンスディリジョンキット (宝酒造) を用いて作製し、M13KO7ヘルパーファージ (Promega) を用いて、Sambrookら (1989) の方法に従い1本鎖DNAを調製した。DNA蛍光プライマー・サイクルシーケンシングキットとDNAシーケンサー370A (いずれもApplied Biosystem社) を用いて、塩基配列の決定を行った。データ解析にはDNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いた。

2-2 結果

2-2-1 WCI-3をコードする2つの遺伝子WCI-3aおよびWCI-3bの塩基配列

2つのクローンの3'末端にWCI-3 cDNAとホモロジーの高い領域が存在し、この領域の塩基配列は2つのクローンともWCI-3 cDNAと完全に一致した(Fig.1-1)。すなわち、WCI-3は2つの遺伝子 WCI-3a (7.8kbp *EcoRI*断片)、およびWCI-3b (8.0kbp *EcoRI*断片) によってコードされていることが示された。この2つの遺伝子の翻訳開始コドン(ATG)の上流の塩基配列を比較したところ、上流373bpまでは完全に一致し、約1.1kbp上流までの塩基配列においても、7bpの塩基の置換、挿入しか見られなかった(Fig.1-2)。そのさらに上流については塩基配列の解析は行っていないが、制限酵素の切断パターンにおいて違いがみられた (データは省略)。ATGから上流約1.1kbpまでの領域はAT塩基対に富み、その含有率はORF(56%)と比較して高い(74%)のが特徴であった。またATGの上流約75bp付近に典型的なTATA ボックスを含む配列が存在した。ATGの上流約380bpに同じく真核生物のプロモーターの保存配列であるCCAAT ボックスのコンセンサス配列 (5'-GGC/TCAATCT-3') に極めて似た配列 (5'-GGCCAATTT-3') が存在したが、TATAボックスからの距離は離れていた (通常はTATAボックスの約50bp上流に位置する)。RY配列 (5'-CATGCAT-3') (Dickinson et al., 1988) およびCACA配列 (5'-A/T/CAACACAA/CA/T/C-3') (Goldberg, 1986) は多くの種子タンパク質遺伝子の5'上流域に保存されている配列で、それぞれATGの上流557bpおよび100bpに存在した。本遺伝子においてはCACA配列のコンセンサス配列とは1bp違っていた。なお、その主要な転写開始点はATGの上流40bpに位置するC残基であることが示されている (Habu et al., 1992)。

2-2-2 WCI-3遺伝子5'上流域と他のWCI遺伝子5'上流域との比較

WCI-3a および WCI-3b 遺伝子の 5' 上流域と他の WCI 遺伝子ファミリーの 5' 上流域の塩基配列を比較したところ、TATA ボックスを含む ATG の上流約 100bp が各ファミリー遺伝子でよく保存されていた (Fig.1-3)。しかし、その上流域においては、その相同性から 2 つのグループ (WCI-3a、WCI-3b と WCI-P3 および WCI-2、WCI-x と WCI-P2) に分かれていた。WCI-P1 はいずれの遺伝子とも有意な相同性を持たなかった。WCI-3a および WCI-3b 遺伝子と相同性を示す WCI-P3 遺伝子は WCI-x 遺伝子の 5' 上流域に逆向きに位置していたことから、WCI-2、WCI-x および WCI-P2 遺伝子サブファミリーの祖先遺伝子は WCI-3 遺伝子の TATA ボックスを含む共通領域のすぐ上流に挿入が起って生じた遺伝子と考えられる。WCI-2 遺伝子の塩基配列は ATG の上流約 1kbp までしか決定していないので、その上流に WCI-3 遺伝子との相同領域が存在するかどうかは不明である。WCI-P1 遺伝子においてはその相同性が低いことから、進化の過程の早い時期にその機能を失ったと考えられる。また、各遺伝子の 5' 上流域は WCI-P1 遺伝子を除いて、いずれも AT 塩基対に富むという特徴を持っていた (WCI-3a, WCI-3b, WCI-2, WCI-x, WCI-P1, WCI-P2, WCI-P3 遺伝子の 5' 上流域約 1kbp (ただし WCI-P2 遺伝子は約 400bp) の AT 塩基対の含有率はそれぞれ 74%, 76%, 77%, 64%, 73%, 75%)。一般的に種子貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーター領域は AT 塩基対に富むことが知られている (Gatehouse et al., 1986)。また、AT 塩基対に富む領域が転写の活性化に関与する事例がいくつか報告されている。酵母では AT 配列が転写の活性化に関与し (Struhl, 1985)、インゲンマメ β -ファゼオリン遺伝子の AT に富む領域を CaMV35S プロモーターを -90bp までの領域に融合し、トランスジェニックタバコに導入すると種子に加えて他の器官においても転写の活性化がおこる (Bustos et al., 1989)。このことは AT に富む領域が転写の活性化領域として働くことを示している。WCI 遺伝子の 5' 上流域が AT 塩基対に富むことと転写の活性化の関連性については後述する。

3 WCI 遺伝子のタバコにおける発現の解析

3-1 実験材料および方法

3-1-1 プラスミドの構築

WCI-3a および WCI-3b 遺伝子の 5' 上流域約 1kbp を得るために、-392bp ~ +34bp (転写開始点を +1 とする) の領域を polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅し、HpaI (-48bp) により消化した後、WCI-3a および WCI-3b 遺伝子の ClaI (-1.9kbp) ~ HpaI 領域と連結し 1.9kbp 5' 上流域を作製した。この 5' 上流域をキロシーケンスディレイションキットを用いて -1018bp (WCI-3a) あるいは -1043bp (WCI-3b) まで欠失させて、1kbp の 5' 上流域とした。WCI-2 遺伝子の 5' 上流域については、-40bp ~ +34bp の領域を PCR 法で増

幅し、*AccI*(-27bp)で消化し、*WCI-2*遺伝子の*SphI*(-1.2kbp)～*AccI*領域と連結し約1kbpの5'上流域とした。*WCI-x*、*WCI-P1*遺伝子については5'上流域1kbpを、*WCI-P2*遺伝子については5'上流域を400bpまでしか持たないため400bpを、直接PCR法にて増幅した。これら5'上流域をpBI101 (Clontech) のクローニング部位 (*HindIII-XhoI*) に挿入し、それぞれp*WCI-3a*, p*WCI-3b*, p*WCI-2*, p*WCI-x*, p*WCI-P1*, p*WCI-P2*とした。p*WCI-P2*については5'上流域とGUS遺伝子の連結部位にATGコドンが出来てしまったため、重複して存在した*NcoI*切断部位で消化し、平滑末端化して再び連結した。

3-1-2 融合遺伝子のタバコへの導入

構築したプラスミドは*Escherichia coli* HB101株に導入し、トリペアレントメーティング法 (Rogers et al., 1986) により、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404株に導入した。*Agrobacterium*より Sambrookら (1989) の方法に従ってプラスミドを調製し、電気泳動により導入を確認した。導入を確認した*Agrobacterium*をリーフディスク法 (Rogers et al., 1986) により、*Nicotiana tabacum* cv. Petit Habana SR-1に感染させ、トランスジェニックタバコ個体を得た。

3-1-3 融合遺伝子の導入の確認

得られたトランスジェニックタバコに融合遺伝子が導入されたことの確認は、サザンハイブリダイゼーション法あるいはPCR法にて行った。カナマイシン耐性を示したタバコ個体の葉からのゲノムの抽出は、CTAB法 (Doyle and Doyle, 1990) を改変して行った。以下にその概略を示す。タバコの葉約1gを液体窒素中で粉状に粉碎する。液体窒素が蒸発した瞬間に、65℃に保温したCTAB抽出液 (2% (w/v) CTAB (臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム), 100mM Tris-Cl pH8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 0.2% (w/v) 2-メルカプトエタノール) を5ml加えて十分にホモジナイズする。テフロンチューブに移して65℃で1時間保温する。5mlのクロロフォルム-イソアミルアルコール(24:1)を加えて転倒操作にて穏やかに混合する。1600xgで5分間遠心して上清を回収する。0.6倍量のイソプロパノールを加えDNAを沈殿させる。パスツールピペットでDNAをからめ取り、エッペンドルフチューブに移す。70%のエタノールで洗浄し、高塩濃度TE緩衝液 (10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA, 1.0M NaCl)に溶解する。2倍量のエタノールを加えてDNAを沈殿させ、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTE緩衝液 (10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA) に溶解する。

得られたDNAはRNAを含むため、DNA量の定量はヘキスト33342を用いた蛍光定量法 (Sugino, 1991) により行った。以下にその概略を示す。DNA試料 (0.5～2.5 μ g) を含む200 μ lのTEに750 μ lの25%エタノールを加えブランクとする。蛍光分光光度計 (日立F2000) により励起波長350nm、蛍光波長485nmで測定する。ブランクに、200 μ

Mのヘキスト33342を25%エタノールで20 μ Mに希釈した溶液を50 μ l加えて、同様にして蛍光をはかる。検量線として、濃度のわかっているDNAを希釈したものを同様にして測定したものをを用いる。

いくつかの個体において導入遺伝子のコピー数をサザン解析により調べたが、コピー数とGUS活性に明らかな相関関係は認められなかった（データは省略）。このため、遺伝子導入の確認は、プロモーターとGUS遺伝子をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いてPCR法により行うのみとし、サザン解析によるコピー数の確認は行わないことにした。

3-1-4 GUS活性の測定

得られたトランスジェニック個体は北海道大学遺伝子実験施設の隔離温室にて生育させた。遺伝子導入の確認されたトランスジェニック個体について葉および開花後5, 10, 15, 20, 25日目の種子を回収し、Jeffersonら(1987)の方法に従って、4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronideを基質として、GUSタンパク質の定量を行った。タンパク質の定量はBradford(1976)の方法に従って行い、GUS活性は単位時間、単位タンパク質当たりの基質の分解産物(4-methyl umblliferone)の遊離量(4-MU pmol/min/mg protein)として表した。

3-1-5 シカクマメ種子におけるWCIタンパク質の蓄積の組織化学的解析

開花後35日目のシカクマメ種子を固定液(3.6%ホルムアルデヒド, 10% DMSO, 0.1% トライトンX-100, 1xPBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH7.2))で一晩室温で処理する。ミクロトームで薄切片にし、TBS (20mM Tris-Cl, 137mM NaCl, pH7.4)で洗浄する。TBS-BSA (1xTBS, 5% BSA)で1:250に希釈した1次抗体で切片を室温、1時間処理する。TBSで3回、PBSで1回室温で5分ずつ洗浄した後、TBS-BSAで1:10に希釈したFITC標識の2次抗体により室温で30分間反応させる(以後の操作はアルミホイルで遮光して行う)。PBSにより洗浄(室温で5分x3回)し、蛍光顕微鏡で観察した。対照として、放線菌タンパク質に対する抗体(北海道大学川本博士より分与を受けた)を用いた。

3-1-6 GUSタンパク質の蓄積の組織化学的解析

トランスジェニックタバコの完熟種子を剃刀の刃を用いて2つに切り分け、固定液(0.3%ホルムアルデヒド, 10mM MES (pH5.6), 0.3M マンニトール)中で1分間真空吸引した後、室温で1時間処理する。100mMリン酸緩衝液(pH7.0)で2-3回洗い、染色液(2mM 5-bromo-4-chloro-3-indoryl- β -D-glucuronide (X-Gluc), 0.5mM フェリシアン化カリウム, 0.5mM フェロシアン化カリウム, 0.3% トライトンX-100, 20%メタノール、

66.7mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 中で37°C、一晚処理して染色を行った。

3-2 結果

3-2-1 トランスジェニックタバコの種子および葉におけるGUS活性

3-1-1において構築した各プラスミド (Fig.1-4)を導入して得られたトランスジェニックタバコのGUS活性の測定結果をFig.1-5に示した。図におけるそれぞれのバーは独立に得られた個体を表している。動物、植物を問わずトランスジェニック個体を作製した場合、同一の遺伝子を導入したにも拘わらず発現量が大きく異なる場合がある。この原因は導入される外来遺伝子が組み込まれる宿主の染色体上の位置による影響 (位置の効果) と考えられている。そのため、複数のトランスジェニック個体を作製し、この位置効果を補正する必要がある。

シカクマメ種子中における主要なWCI-3タンパク質をコードするWCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の5'上流域を導入したタバコにおいては種子の成熟に伴ってGUS遺伝子が発現した。今回用いたタバコSR-1株は開花後約30日で種子が完熟するが、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の5'上流域を導入したタバコでは開花後5、10日目の種子ではわずかなGUS活性しか認められないが、開花後15日目になるとGUS活性は急激に上昇し、20日目をピークに25日目で若干減少するというパターンを示した。これに対して葉におけるGUS活性はバックグラウンドレベルであった。CaMV35Sプロモーターを導入したタバコにおいては種子の成熟を通して、また葉で高いGUS活性が得られ、GUS遺伝子のみを導入したタバコ (no promoter)ではGUS活性は検出されなかった。WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の5'上流域を導入したタバコにおいて、開花後10日~20日目という種子成熟の中期にかけてGUS活性の上昇がみられることは、この時期にWCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の5'上流域が高い転写活性を持つことを示している。このことから、シカクマメにおいて見られる種子の成熟中期におけるWCI遺伝子mRNAの一過的蓄積は、成熟中期特異的にWCI遺伝子の転写が活性化された結果と考えられる。また、葉においてはGUS活性は認められないことから、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子5'上流域はタバコ葉において転写活性を持たないことが示された。以上のことから、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の器官および時期特異的な発現制御機構はタバコにおいても保存されること、その特異的発現には転写レベルでの制御が働いていることが示唆された。

他のWCI遺伝子5'上流域については、偽遺伝子を含むすべてについてタバコにおいてGUS遺伝子の発現を誘導する事ができた。このことは、ここで解析したWCI遺伝子族を構成する遺伝子の5'上流域はすべて転写活性を持つことを示している。WCI-2, WCI-x, WCI-P2遺伝子の5'上流域は、GUS遺伝子の発現を種子特異的に誘導

することができたが、その活性はWCI-3aおよびWCI-3b遺伝子と比べて低く、成熟中期特異的なGUS活性の上昇は明らかではなかった。WCI-P1遺伝子の5'上流域を導入したタバコは種子におけるGUS活性が高く、葉においても高いGUS活性が認められた。このことは、WCI-P1遺伝子を除いて、ここで解析したWCI遺伝子は器官特異的な転写活性を持つが、時期特異的な転写活性はWCI-3遺伝子のみが持つことを示している。

3-2-2 シカクマメ種子におけるWCIタンパク質の蓄積の組織化学的解析

シカクマメの種子には胚発生の初期には胚乳が存在するが、胚の成熟に伴って消失していき、WCI遺伝子の転写が起こる成熟中期の種子においては胚乳はほとんど存在しないため（データは示さない）、WCI遺伝子は胚で発現していると考えられる。このことを確認するため、ウサギ抗WCI-3抗血清を用いてWCIタンパク質の種子における蓄積を観察した。ここで用いたウサギ抗WCI-3抗血清は、WCI-3を含むWCIタンパク質に交差反応するが、WTIには交差反応しない。WCIタンパク質は子葉、胚軸を含む胚全体で発現していた (Fig.1-6)。ここで用いた胚は種皮を除く時点で薄い胚乳の層も剥がれており、WCIタンパク質の胚乳における蓄積については明らかでない。

3-2-3 トランスジェニックタバコ種子におけるGUS活性の組織化学的解析

WCI遺伝子はシカクマメ種子の胚全体で発現していることが示されたが、タバコにおいては種子は胚と胚乳が成熟期を通して存在する。タバコにおけるWCI遺伝子の発現が組織レベルにおいてもシカクマメにおける発現と同様に行われていることを調べるため、トランスジェニックタバコ種子におけるGUS活性の分布を組織化学的に解析した。X-GlucはGUSにより分解されてインディゴを遊離し、組織に沈着するためGUS活性の存在する部分が青く染色される。この方法を用いてトランスジェニックタバコの完熟種子を染色したところ (Fig.1-7)、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子を導入したタバコ種子では胚が主に染色された (WCI-3a遺伝子についてはデータは示していない)。独立に得られた3個体を調べたが全て同様のパターンを示した。活性が最も高かった個体については胚乳において若干の染色が見られた。このことから、WCI-3遺伝子の発現制御機構が組織レベルにおいてもタバコで保存されていることが示された。それに対して、種子特異性を示したWCI-2、WCI-x遺伝子を導入した種子においては、胚が主に染まる個体や胚乳が主に染まる個体などが存在し、一定したパターンは得られなかった。WCI-P2遺伝子については活性が弱いため染色が行えなかった。器官特異性を示さなかったWCI-P1遺伝子およびCaMV35Sプロモーターを導入したタバコにおいては主に胚が染まった。このことから、WCI-P1遺伝子を除く

WCI遺伝子は種子特異的な転写活性を持つが、WCI-3遺伝子のみが、種子特異性に加えて胚特異的な転写活性を持つことが示された。

4 タバコBY-2培養細胞プロトプラストにおけるWCI遺伝子の発現の解析

4-1 実験材料および方法

4-1-1 プラスミドの構築

第1章3-1-1において構築したプラスミドより、WCI遺伝子5'上流域とGUS構造遺伝子を含む領域を、HindIIIおよびEcoRIを用いて切り出しpUC19に導入したプラスミドを、タバコBY-2培養細胞における一過的発現系の解析に用いた (Fig.1-8)。pBI221 (Clontech) はCaMV35SプロモーターとGUSの融合遺伝子がpUC19に入っているプラスミドである。

4-1-2 タバコBY-2培養細胞のプロトプラスト化

Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow 2 由来のタバコBY-2培養細胞を改変LS培地 (MS無機塩、3%しょ糖、0.2mg/l 2,4-D、1mg/l チアミン塩酸塩、100mg/l ミオイノシトール、pH5.8) 中で暗所で26°Cで培養し、一週間ごとに培養液5mlを100mlの新鮮な培地に植え継いでいく。実験に際しては培養液10mlを新鮮な培地100mlに植え継ぎ、40~48時間培養したものをを用いる。培養液を50mlのスクリュウキャップ付きチューブに移し、しばらく放置して細胞を集める。上清を除き、培養液の2/3溶の0.4Mマンニトールに懸濁して30°Cで10分保温する。上清を除き、酵素溶液(1%セルラーゼ オノズカRS、1%ドリセラゼ、0.1%ペクトリアーゼ Y23、0.4M D-マンニトール pH5.5) 25mlを細胞に加える。懸濁液を直径9cmのプレートに移して26°Cで2時間保温する。30分ごとにピペティングにより懸濁する。得られたプロトプラストを200xg、室温、1分の遠心で集める。細胞を氷冷した0.4Mマンニトールで6回洗う。適当量の0.4Mマンニトールに懸濁し、トーマの血球計数盤で細胞数を数える。

4-1-3 エレクトロポレーション

6×10^5 個の細胞を0.6mlのMES-マンニトール(5mM MES、70mM KCl、0.3M D-マンニトール、pH5.8)に懸濁する。8 μ gのプラスミドDNAを含んだ0.2ml MES-マンニトールを加えて穏やかに混ぜ、プラステックキュベットに移す。氷中にて電極をセットし、電圧300V、コンデンサー容量100 μ Fで一回パルスを与える。氷中で30分置いた後、30°Cで5分間保温する。細胞を集めて3mlのプロトプラスト培地(MS無機塩、1%シュークロース、1mg/l チアミン塩酸塩、0.2mg/l 2,4-D、100mg/l ミオイノシトール、

0.4M D-マンニトール、pH5.8)に懸濁する。そのうち1mlを直径3cmのガラスシャーレに移して26°Cで0~48時間培養する。細胞を遠心により集め100 μ lのGUS抽出液を加え、激しく攪拌して細胞を破壊し、第1章3-1-3と同様の方法でGUS活性を定量した。

4-2 結果

4-2-1 導入した遺伝子の発現の経時的变化

タバコBY-2培養細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入を行った場合のGUS遺伝子の発現の経時的变化を、WCI-3遺伝子の5'上流域(1.9kbp)およびCaMV35Sプロモーターを用いて解析した。いずれの遺伝子も導入後24~36時間で活性のピークを迎え、その後減少していった(Fig.1-9)。このことは、導入された遺伝子はその種類に拘わらず同時期に発現が誘導されることを示している。また、構成的な発現をすることが知られているCaMV35Sプロモーターに比べて、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の5'上流域は約10倍のGUS活性を誘導した。このことから、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子はタバコ培養細胞中で高い転写活性を持つことが示された。

4-2-2 WCI遺伝子5'上流域のプロトプラストでの転写活性

各WCI遺伝子の5'上流域を持つ遺伝子と、CaMV35Sプロモーターを持つ遺伝子およびGUSのみを持つ遺伝子を一セットとして、独立に2回の実験を行った(Table1-1)。4-2-1の結果から、遺伝子導入後24時間培養したプロトプラストのGUS活性を測定することとした。各WCI遺伝子の5'上流域はいずれもCaMV35Sプロモーターに比べて2-10倍高いGUS活性を誘導した。個々の遺伝子について見てみると、機能的なWCIタンパク質をコードすると考えられるWCI-3a, WCI-3b, WCI-2およびWCI-x遺伝子の5'上流域が、偽遺伝子と考えられるWCI-P1, WCI-P2の5'上流域に比べて2-5倍のGUS活性を誘導したが、シカクマメおよびタバコ種子中で最も発現量の多いWCI-3遺伝子よりも、WCI-2およびWCI-x遺伝子の5'上流域の方が高いGUS活性を誘導した。この結果から、トランスジェニックタバコとタバコ培養細胞プロトプラスト中でのWCI遺伝子プロモーターの転写活性は異なっていると考えられた。

5 考察

WCI-3 cDNAと高い相同性を示すシカクマメゲノム断片の塩基配列の解析から、種子中に多量に存在するWCI-3はきわめて相同性の高い2つの遺伝子WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子によりコードされていることが明らかになった。この2つの遺伝子の5'上流域の塩基配列は99%以上の相同性を持ち、その転写領域は100%一致した。全く同じタンパク質をコードする遺伝子が2つ存在することから、この2つの遺伝子は発

現様式が異なっている可能性も考えられた。通常、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現の器官特異性は厳密であり、種子以外の器官においては発現しない (Goldberg et al., 1989)。しかし、WCI-3は種子に加えて塊根においても多量の蓄積が見られることから、5'上流域に見られる若干の構造の違いにより、2つの遺伝子の一方が種子で発現し、他方が塊根において発現している可能性が考えられる。この2つの遺伝子の転写領域は塩基配列が完全に一致するため、通常のノザン解析や塩基特異的プライマー伸長停止法 (Umemoto et al., 1992) では、この2つの遺伝子の発現を区別する事はできない。トランスジェニックタバコにおいて、この2つの遺伝子がいずれも種子において同様の転写活性を持っていたことは、2つの遺伝子の5'上流域1.1kbpに見られる7塩基の相異がプロモーター活性には影響を及ぼさないことを示している。そこで、この2つの遺伝子は同一の遺伝子と考え、以後特に必要がない場合にはこの2つの遺伝子を区別しないでWCI-3遺伝子と表記する。この2つの遺伝子はシカクマメ中でも同様の発現パターンを持ち、タンパク質量の増大に寄与しているのであろう。

WCI-3はシカクマメ種子における主要なWCIタンパク質であるが、その他にもいくつかの異なるWCIタンパク質が同定されている。シカクマメUPS31株においてはWCI-3の次にWCI-2の蓄積量が多い (Shibata et al., 1986)。しかし、シカクマメUPS89株の種子においてはWCI-2遺伝子由来のmRNAの蓄積は認められない (Umemoto et al., 1992)。一方、生物学的に未同定であるWCI-xをコードする遺伝子由来のmRNAの蓄積がUPS89株において観察される (Umemoto et al., 1992)。WCI遺伝子の発現量は栽培条件の影響を受けやすいのかもしれない。あるいはUPS31株とUPS89株において異なる遺伝子の発現制御機構が存在することも考えられる。トランスジェニックタバコにおける解析では、WCI-2およびWCI-x遺伝子の5'上流域は種子における転写活性を持っていた。このことから、WCI遺伝子の発現制御機構にはmRNAの安定性による制御が働いている可能性が考えられる。mRNAの安定性による分解速度の変化はダイズのK_{Ti}欠損変異株においても報告されている (Jofuku and Goldberg, 1989)。しかし、予想されるWCI-2 mRNAの塩基配列はWCI-3 mRNAと2箇所異なるのみである (Habu et al., 1992)。この2塩基がmRNAの安定性に関与しているのであろうか。あるいは、UPS89株においては今回解析に用いたWCI-2遺伝子の5'上流域1kbpより上流に転写を抑えるサイレンサーが存在するのかもしれない。

今回解析したWCI遺伝子の5'上流域は全て種子特異的な転写活性を持っていた。しかし、時期特異的な転写活性を持っていたのはWCI-3遺伝子のみであった。WCI-2およびWCI-P2遺伝子の5'上流域は成熟初期にGUS活性が最も高いというパターンを持っていた。このような多重遺伝子における異なる発現制御はダイズのK_{Ti}多重遺伝子族 (Jofuku and Goldberg, 1989; Perez-Grau and Goldberg, 1989)、 β -コングリシニン多重遺伝子族 (Harada et al., 1989) においても報告されている。組織レベルで見ても

ると、*WCI-3*遺伝子の5'上流域は胚特異的な転写の活性を誘導したが、*WCI-2*および*WCI-x*遺伝子の5'上流域は、胚と胚乳の両方で転写を活性化した。すなわち、*WCI*多重遺伝子族を構成する遺伝子は空間的にも異なる制御を受けていると考えられる。種子における転写活性は今回解析した*WCI*遺伝子の5'上流域全てが持っていたことから、各遺伝子間で保存されている領域、すなわち、TATAボックスを含む約100bpの領域が種子特異性に関与していることが考えられた。この領域を持つ*WCI-P1*遺伝子が葉においても転写活性を持っていたことから、この領域は種子における転写の活性化に関与しており、他の器官における転写の抑制には関与していないと考えられる。*WCI-P1*遺伝子の5'上流域には100bpの保存領域以外に、他の*WCI*遺伝子との相見が見られないことから、進化の過程で葉での抑制に関与するシスエレメントを失ったか、葉での転写を誘導するようなDNA領域が挿入されたと考えられる。100bpの保存配列を比較した結果をFig.1-10に示す。この領域には、種子タンパク質遺伝子のプロモーター領域に共通して存在するCACAC配列がよく保存されている。この配列が種子特異性に関与している可能性も考えられるが、現在のところ、CACAC配列の種子特異性への関与を示す報告はなされていない。この領域が実際に種子特異的な転写に関与しているのだろうか。このことに関しては次章で詳しく述べる。*WCI-3*遺伝子の5'上流域は、種子特異性に加えて胚における時期特異的な転写を誘導したことから、100bpの保存領域の上流に、胚における時期特異的な転写活性を支配するシスエレメントが存在することが示された。種子タンパク質遺伝子の保存配列であるRY配列が*WCI-3*遺伝子の5'上流域にのみ存在することから、この配列がシスエレメントの候補として考えられる。この配列の*WCI-3*遺伝子の転写活性への関与については次章において述べる。

植物遺伝子の発現制御機構の解析に一過的発現系が有効であった事例がいくつか報告されている。*Opaque-2*はトウモロコシの種子貯蔵タンパク質であるゼインの発現を制御する因子であることが遺伝学的解析から示されていたが、胚乳由来の培養細胞プロトプラストを用いた一過的発現の解析から、*Opaque-2*が転写活性化因子であることが直接証明された(Ueda et al., 1992)。トウモロコシのアントシアニン合成酵素遺伝子や種子におけるABA誘導性遺伝子の発現調節因子である*Vp-1*についても、同様な方法で転写活性化因子であることが証明された(McCarty, 1991)。*WCI*遺伝子はタバコ培養細胞プロトプラストにおいても偽遺伝子を含めて高い転写活性を持つが、その活性はシカクマメやタバコにおける活性とは異なっていた。このことは、タバコ培養細胞プロトプラストにおいては*WCI*遺伝子が特異的発現制御を失うことによるものと考えられる。プロトプラストを用いた一過的発現系では遺伝子の特異的発現が見られなくなる事例が報告されている。Fujiwaraら(1991)は、ダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子 β -コングリシニンの α' サブユニット遺伝子をタバコ培養細胞お

よびタバコ葉のプロトプラストに導入した場合、いずれにおいても高い発現が見られることを報告している。Bruceら(1989)は、大麦のフィトクローム遺伝子をプロトプラストに導入した場合、光による発現調節が見られないことを報告している。これらは、はっきりとした原因は不明であるが、プロトプラスト化により細胞が脱分化し、その組織特異性を失うため、あるいはプロトプラスト化に伴う高浸透圧によりストレスを受けるためと考えられている。このようなことから、一過的発現系においてはプロトプラスト化せずに、直接、組織に遺伝子導入を行える方法の使用が望ましいと考えられる。

WCI遺伝子の場合、タバコ培養細胞プロトプラストにおいては構成的プロモーターであるCaMV35Sプロモーターより高い転写活性を示した。一般に、培養細胞は同調した細胞が効率よく大量に調製可能なため、*in vivo*あるいは*in vitro*発現系のモデルシステムとして用いられている。その中でもタバコBY-2培養細胞はその維持の容易さから広く研究に用いられているが、この細胞における遺伝子発現の詳しい解析はあまり行われていない。培養細胞というモデル系におけるWCI遺伝子の発現解析は、転写の活性化機構という点からは(特異性を持った発現ではないが)非常に興味深いと考えられる。

```

-100      -90      -80      -70      -60      -50
WCI-3 cDNA      CTATTTACAAAATTCGTTTAAATTAATAATCGTTATCGAAAACACAGTTTATAGTTAACGAGC
WCI-3a/3b
-40      -30      -20      -10      +1      +20      +30
ACTTCTAIAAAIAGTCTACATTCGGCGAAACCTATTCCTCAAAATGAGTAGAAAGGAAATCGTTCCACAA
GGAAAATCGTTCCACAA
+40      +50      +60      +70      +80      +90      +100
GCATAAAAATAAGAGAGTACTACATTTCTTGCCCTCTTTCTACTCTGCGCATCATCTCACACCTTACCA
GCATAAAAATAAGAGAGTACTACATTTCTTGCCCTCTTTCTACTCTGCGCATCATCTCACACCTTACCA
+110      +120      +130      +140      +150      +160      +170
TCATCCACTGCTGATGATGATTTGGTCGATGCTGAAGGTAACCTTAGTTGAATAATGGTGGCACATATC
TCATCCACTGCTGATGATGATTTGGTCGATGCTGAAGGTAACCTTAGTTGAATAATGGTGGCACATATC
+180      +190      +200      +210      +220      +230      +240
TGTGGCCACATATATGGGCACACGGGGAGGAATAGAAAACAGCAAAAACAGGAAACCAATGCCCTCT
TGTGGCCACATATATGGGCACACGGGGAGGAATAGAAAACAGCAAAAACAGGAAACCAATGCCCTCT
+250      +260      +270      +280      +290      +300
AACAGTGGTACGATCTCCCAATGAGGTCCTAAAGGGGAACCAATAAGGATCTCATCCCAATTCCTTTCA
AACAGTGGTACGATCTCCCAATGAGGTCCTAAAGGGGAACCAATAAGGATCTCATCCCAATTCCTTTCA
+310      +320      +330      +340      +350      +360      +370
TTGTTCAATCCCCAGAGGCTCTCTAGTGGCTCTTGGATTCGGCTAACCCCTCCATCTTGTCCAGCTTCTCCGT
TTGTTCAATCCCCAGAGGCTCTCTAGTGGCTCTTGGATTCGGCTAACCCCTCCATCTTGTCCAGCTTCTCCGT
+380      +390      +400      +410      +420      +430      +440
GGTGGACTGTTGTTGACTCTCCACAAAGGACCCGCTGTTAAACTTAGTCAGCAAAAACCTTCCGGAAAAGGA
GGTGGACTGTTGTTGACTCTCCACAAAGGACCCGCTGTTAAACTTAGTCAGCAAAAACCTTCCGGAAAAGGA
+450      +460      +470      +480      +490      +500      +510
TATTTCTAGTGTAAATTCGAGAAAGTTTCCCATTTCTAAACTTCAAGCTTGTACTGTCTCAA
TATTTCTAGTGTAAATTCGAGAAAGTTTCCCATTTCTAAACTTCAAGCTTGTACTGTCTCAA
+520      +530      +540      +550      +560      +570      +580
CATGACGAAAGAGGATGTGAAGTGTGATCAGTATATCGGGATTCATAGGGAATCGCAATGGAAAACAGACGTT
CATGACGAAAGAGGATGTGAAGTGTGATCAGTATATCGGGATTCATAGGGAATCGCAATGGAAAACAGACGTT
+590      +600      +610      +620      +630      +640      +650
TGGTGGTGAAGTGAAGGAAACCCCAATAGAGCTTGTGCTTCTGAAAGCTAAGTCAGAAACTGCAATCAAGCCA
TGGTGGTGAAGTGAAGGAAACCCCAATAGAGCTTGTGCTTCTGAAAGCTAAGTCAGAAACTGCAATCAAGCCA
+660      +670      +680      +690      +700      +710      +720
TTAAGCACTTCTCATCCCTTAAAGTCACTGTGCTTATGACTTAAATGAAATGCTTTGCTTGTAAATAATTTG
TTAAGCACTTCTCATCCCTTAAAGTCACTGTGCTTATGACTTAAATGAAATGCTTTGCTTGTAAATAATTTG
+730      +740      +750      +760      +770      +780
TCACACCCACTCAATAAAAATTAATCTAAGTTTTTCTTTTTT(A)n
TCACACCCACTCAATAAAAATTAATCTAAGTTTTTCTTTTTT(A)n
EcoRI

```

Fig. 1-1 Comparison of WCI-3cDNA and WCI-3a/b nucleotide sequences around the coding region. The transcription initiation site is taken as +1. Bars under the WCI-3cDNA sequence indicate the start codon (ATG), the stop codon (TAA) and poly adenylation signals(AATAAA) in WCI-3cDNA. Bar under WCI-3a/b sequence indicates putative TATA box(TATAAAT).

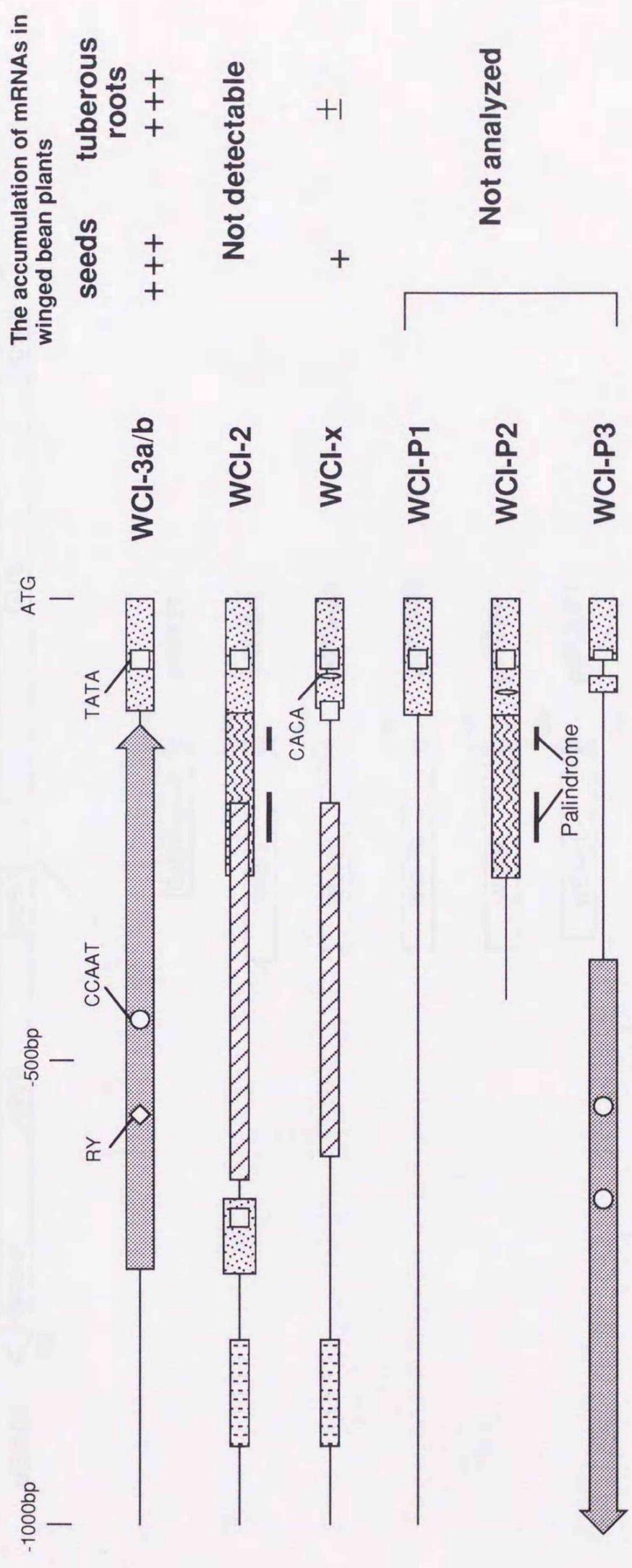


Fig. 1-3 Schematic representation of 5' upstream regions in WCI genes. Regions exhibiting more than 70% homology are represented by the same pattern. The positions of TATA box, CCAAT box, RY sequence, CACA sequence, and palindrome sequence are indicated. Accumulation of each WCI mRNAs in seeds and tuberos root of winged bean plants (Umemoto et al., 1992) is indicated by +.

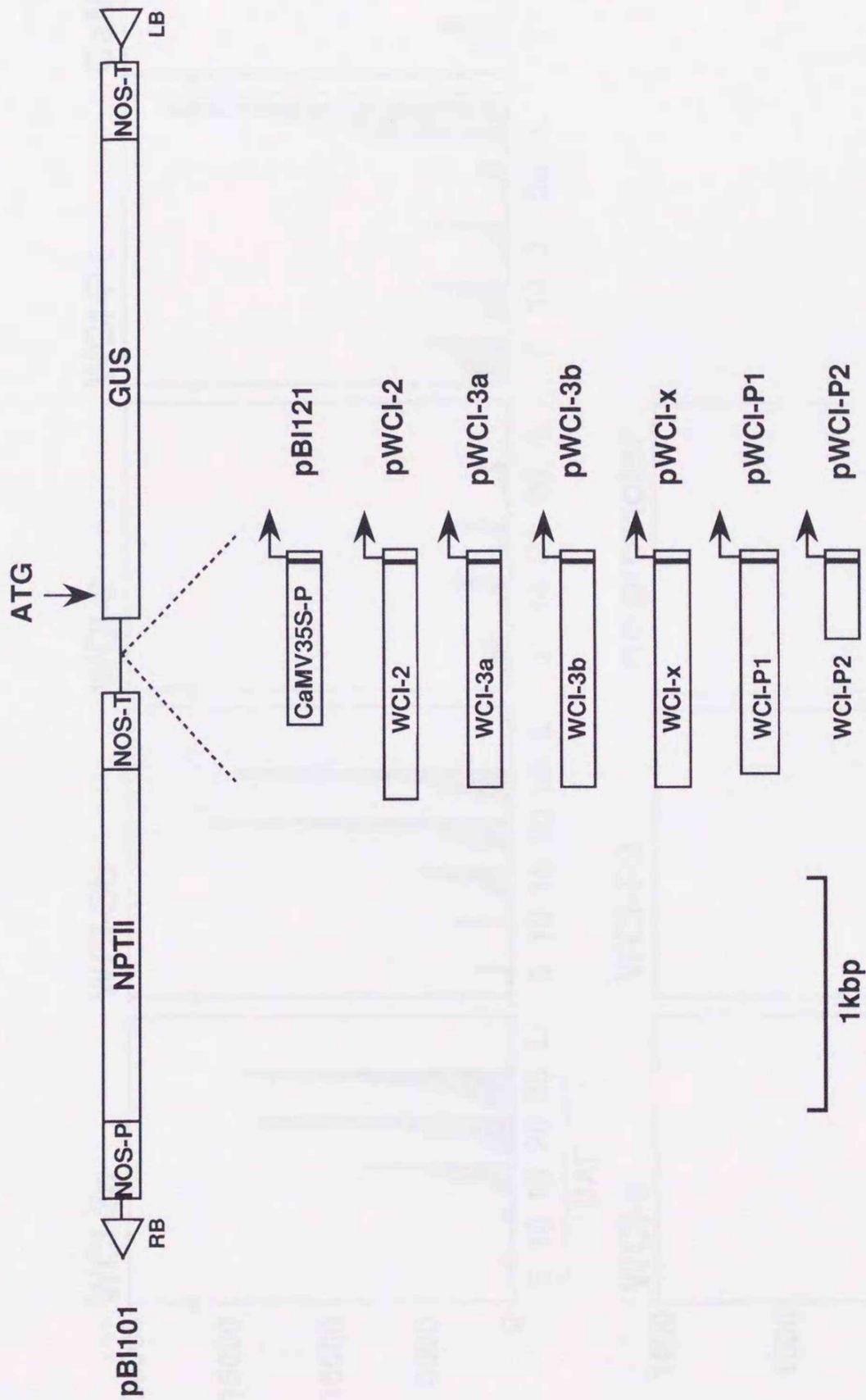


Fig.1-4 Diagram of WCI - GUS fusion genes used in transgenic tobacco experiments. The 5' upstream region of WCI genes (WCI-3a, WCI-3b, WCI-x, WCI-2, WCI-P1 and WCI-P2) are inserted into the cloning site of pBI101 vector. The TATA sequences are indicated by filled boxes. Arrows indicate the transcription initiation sites and the direction of transcription. NPTII: neomycin phosphotransferase gene, GUS: β -glucuronidase gene, NOS-P: nopaline synthetase gene promoter, NOS-T: nopaline synthetase gene terminator, RB: right border sequence, LB: left border sequence.

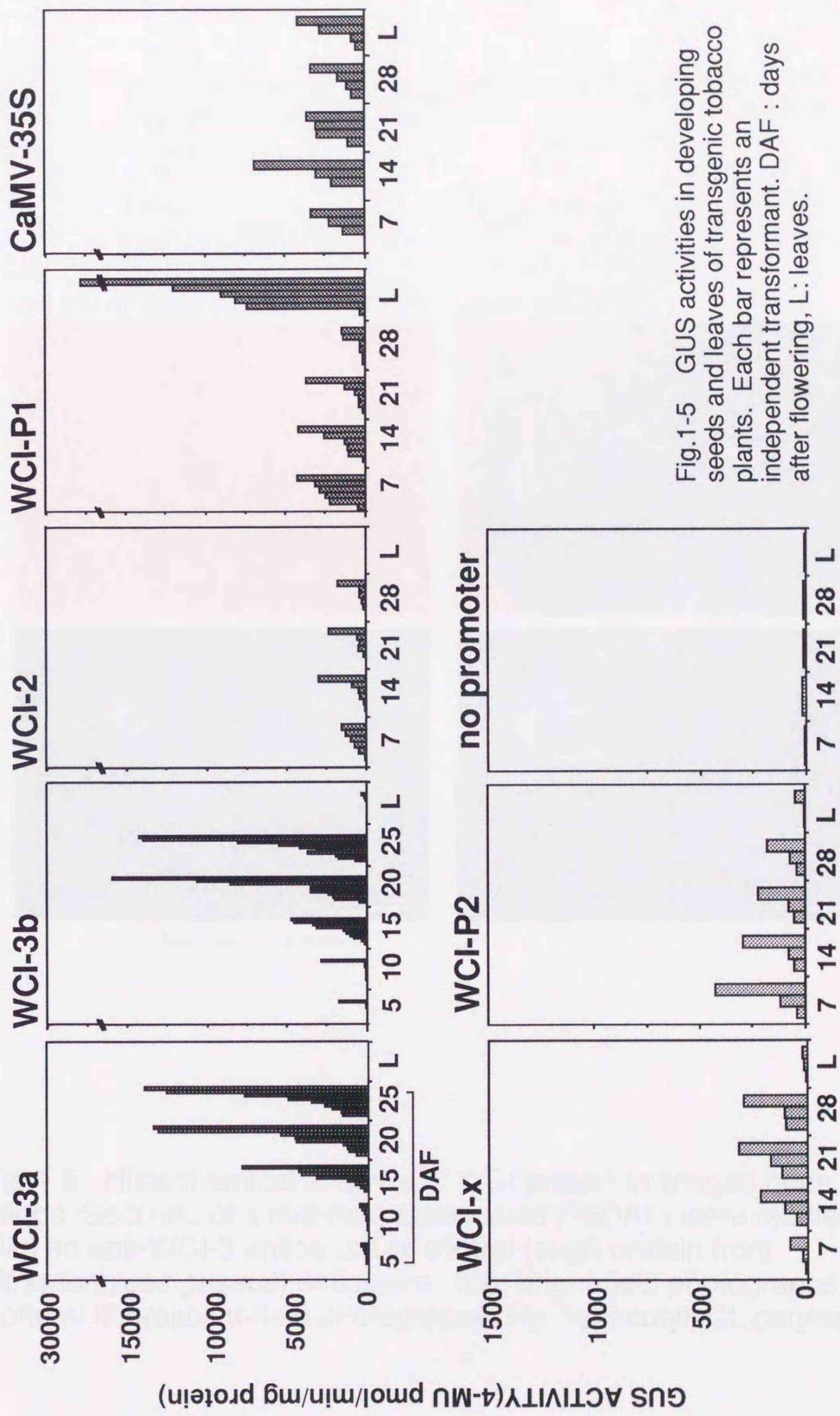


Fig.1-5 GUS activities in developing seeds and leaves of transgenic tobacco plants. Each bar represents an independent transformant. DAF : days after flowering, L: leaves.

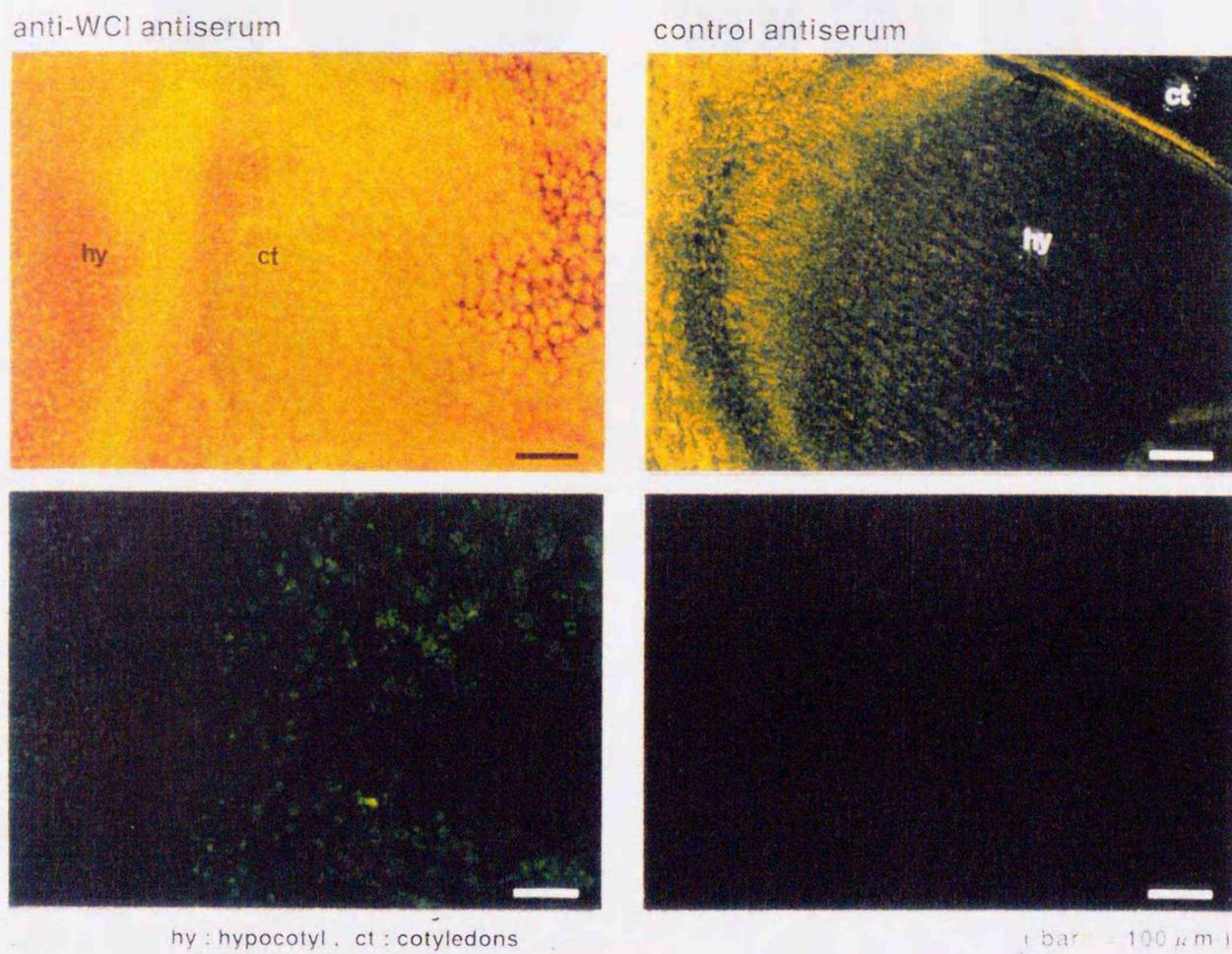


Fig.1-6 Histochemical analysis of WCI protein in winged bean seeds. Sections of a mid-maturation seed (35DAF) were reacted with an anti-WCI-3 antiserum or control (ssgA protein from *Streptomyces griseus*) antiserum. top: bright-field photographs, bottom: fluorescent-field photographs, Hy: hypocotyl, Ct: cotyledon.

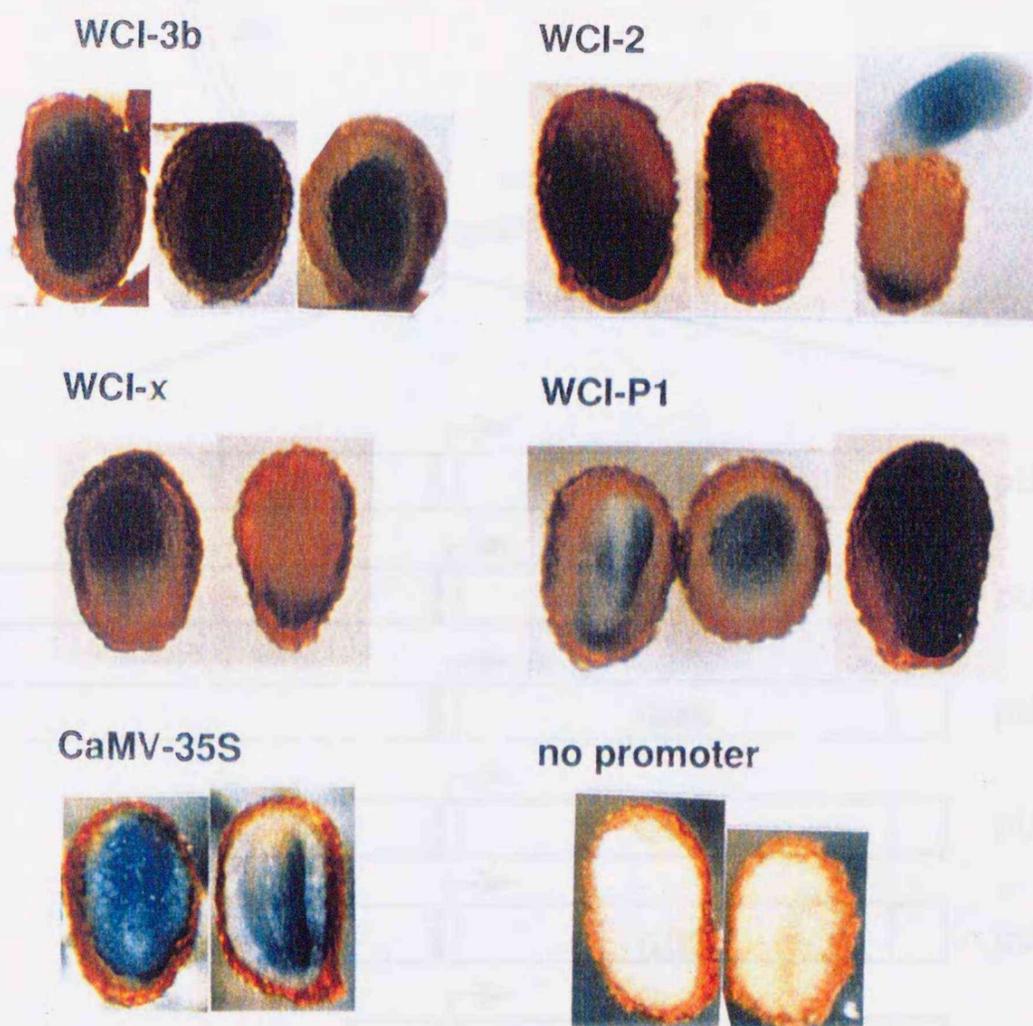


Fig. 1-7 Histochemical analysis of GUS activity in transgenic tobacco seeds. Transgenic tobacco mature seeds carrying each construct were harvested and cut into halves, then incubated with X-Gluc staining solution. Blue spots indicate the accumulation of GUS protein.

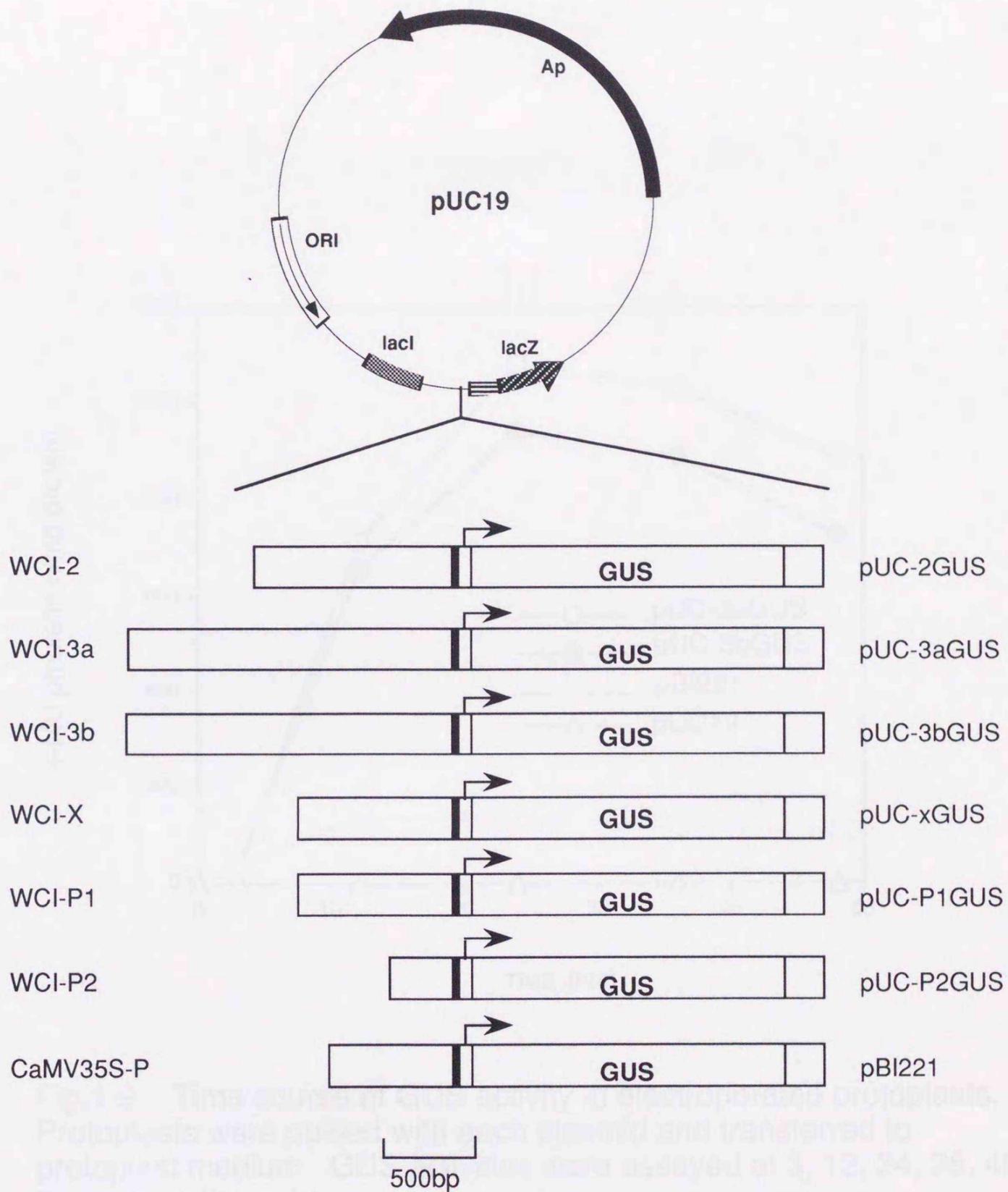


Fig. 1-8 Diagram of WCI-GUS fusion genes used in electroporation experiments. The same WCI-GUS fusion genes shown in fig.1-4 were cloned in pUC 19.

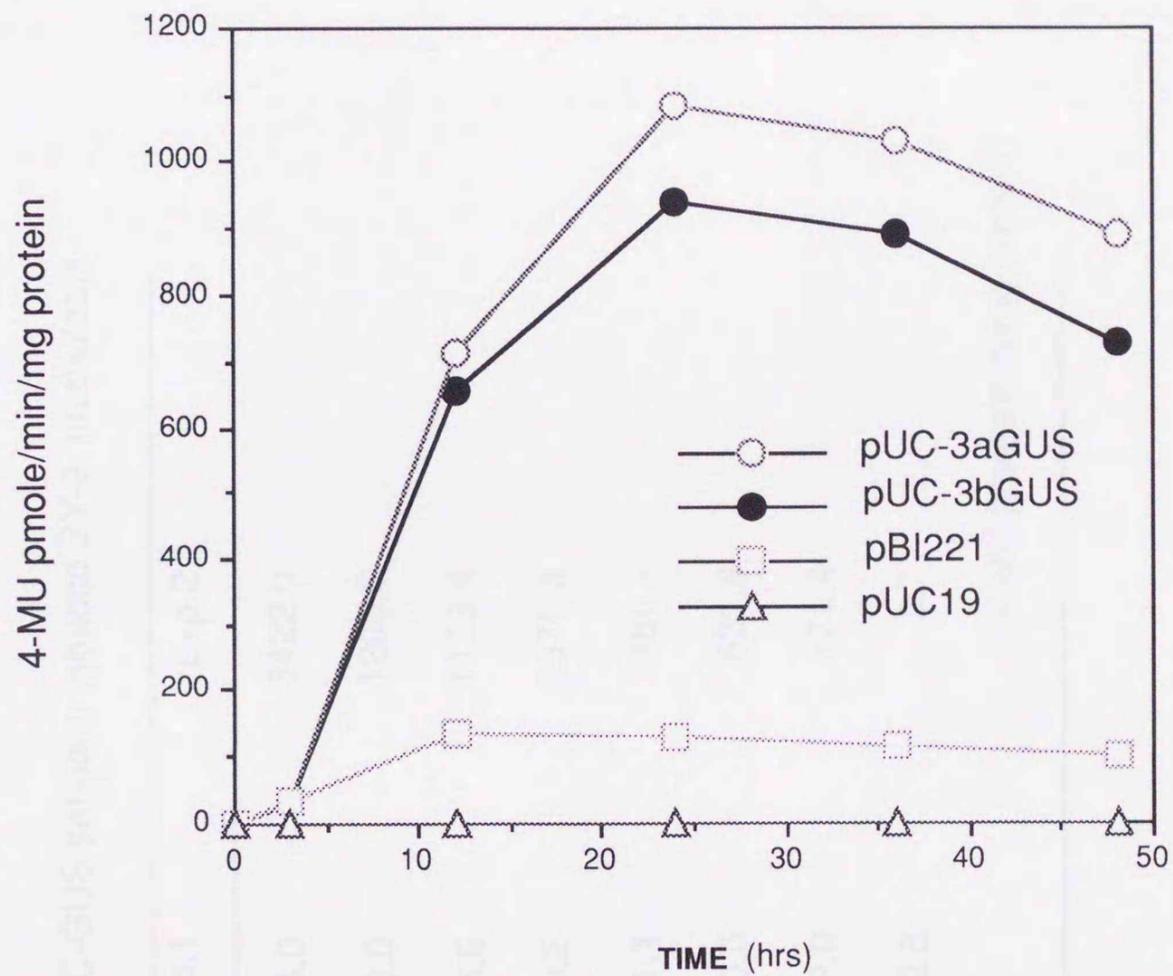


Fig.1-9 Time course of GUS activity in electroporated protoplasts. Protoplasts were pulsed with each plasmid and transferred to protoplast medium. GUS activities were assayed at 3, 12, 24, 36, 48 hours after the pulse.

Table 1-1 GUS activity of pUC-GUS series in tobacco BY-2 protoplasts

Plasmid	Exp.1	Exp.2
pUC-2GUS	2158.0	3422.0
pUC-3aGUS	1238.0	1200.6
pUC-3bGUS	1326.8	1128.4
pUC-xGUS	2549.2	2570.3
pUC-P1GUS	501.1	486.7
pUC-P2GUS	590.5	631.6
pBI221	242.0	171.4
no promoter	2.8	3.7

(4-MU pmole/min/mg protein)

	-100	-90	-80	-70	-60	-50
WCI-3a/3b	CTATTACAAATTCGTTTAAATAATAATGTTATCGAAACACAGTTTATAGTTAACGAGC					
WCI-2	CTCCTCGTTATTCCTTTCATATTTATCGAAACACAGTTTATAGTTAACGAGC					
WCI-x	ATAAATAGTCTACATTTCTGTCATTTGTCACACACCTTTGT-----ACC					
WCI-P1	GCACTCACATAATTCATTTTGTTCATATTTATCCAAAGCACATTTTATAATTAACTAGC					
WCI-P2	CTCCTTGTATAATTCCTTTCATTTATTTGTCATATTTATCGAAACACACCTTTTATAGTTAACGAGC					
WCI-P3	ATTTGTAATTAATTTGAGTTTATAATAAACCTCACATATTTTGGTCCATATTTATCCAAACA					
-40	-30	-20	-10	+1		
	ACTTCTATAAAATAGTCTACATTCGGCGGAAACCTATTCTCTC					
	ACTTCTATAAAATAGTCTACATTCGGCGGAAACCTATTCTCTC					
	ACCTCTATAAAATAGTCTACATTCCTCGAAACCTATTAGG-----					
	ACCTCTATAAAATAGTCTA-ATTCCCTCGAAACCTATTCTCTC					
	ACTTCTATAAAATAGTCTACATTCCTCGAAACCTATTCTCTC					
	CGCCTTATAATTTACCTACATTCCTCGAAACGTAATTCACAC					

Fig.1-10 Comparison of upstream region of WCI gene family from WCI-3a/b transcription start site to the 100bp upstream. Gaps are introduced to make maximum homology. Bases which are identical to those in WCI-3a/b gene are shaded. TATA sequences and CACA sequences are underlined and painted with white, respectively.

第2章 WCI-3遺伝子の発現を制御するシスエレメントの同定

1 序

第1章において、WCI遺伝子はタバコに導入した場合に転写活性を持つことが示された。特に、WCI-3遺伝子の転写はタバコにおいて時期および組織特異的に制御されていた。このことは、WCI-3遺伝子の5'上流域に種子特異的な制御に関わるシスエレメントに加えて、胚における時期特異的な転写の活性化に関わるシスエレメントを持つことを示している。現在までに、多くの種子タンパク質遺伝子において、その発現機構の解析が行われてきたが、種子タンパク質遺伝子の発現を制御している機構に関する詳細な情報は未だ得られない。いくつかの塩基配列が、種子での特異的な発現のシスエレメントとして示されてきたが (Kawagoe et al., 1994; Lelievre et al., 1992; Nunberg et al., 1994; de Pater et al., 1993)、各遺伝子に共通した配列はほとんど存在していない。このことは、種子タンパク質遺伝子の発現制御機構は複雑なシスエレメントの組み合わせで行われていることを予想させる。しかし、転写制御因子を解析するためにはシスエレメントの解析が必須となってくる。そこで、本章ではトランスジェニックタバコを用いて、WCI-3遺伝子の発現に関与するシスエレメントの同定を行った。

第1章において、遺伝子の一過的発現系における解析にはプロトプラスト化の処理を行わない方法が必要であることが考えられた。そこで、直接、組織に遺伝子導入を行うことが可能であるパーティクルガン法 (Klein et al., 1987)を用いて、シカクマメ成熟中期の種子におけるWCI-3遺伝子の一過的発現の解析を行った。パーティクルガン法は、DNAをまぶした粒子 (タングステンや金) を乗せたプロジェクタイトルを高速で発射し、粒子を試料に打ち込んでDNAを導入する方法である。この方法では物理的な力でDNAの導入を行うため細胞壁は障害にはならないので、プロトプラスト化の必要がない。実際、トウモロコシのアントシアニン合成酵素遺伝子であるCI遺伝子およびR遺伝子の胚乳における発現に関わるシスエレメント (Roth et al., 1991) や、大麦のファイトクローム遺伝子の赤色光による発現制御に必要なシスエレメント (Dehesh et al., 1990) がこの方法により同定されている。

第1章において、WCI-3a遺伝子とWCI-3b遺伝子の5'上流域約1.1kbpが99%以上の相同性を持つこと、トランスジェニックタバコにおける発現に差がなかったことが示されたため、本章ではWCI-3b遺伝子についてのみ解析を行った。

2 トランスジェニックタバコにおけるWCI-3遺伝子の発現に関与するシスエレメントの同定

2-1 実験材料および方法

2-1-1 プラスミドの構築

WCI-3遺伝子プロモーターのシスエレメントの解析のために作製した様々な欠失プロモーターの構造をTable2-1に示した。以下にその作製方法を示す。-882bp, -623bp, -377bp, -194bp, および-91bp プロモーターは、第1章3-1-1において構築されたWCI-3b遺伝子の-1.0kbpプロモーターをキロシーケンスディリジョンキットを用いて欠失させ、塩基配列の解析により、その5'端を確認した。-831および-705bpプロモーターは、PCR法により-840bp~-821bpおよび-718bp~-698bpの領域をそれぞれ増幅し、*Bgl*III (PCRの際-831bp、-705bpに導入した) および*Hinf*I(-557bp) で消化し、転写開始点上流-623bpを*Hinf*Iで消化したプロモーター領域に連結した。-775bpプロモーターは、-882bpプロモーターを*Ssp*I (-775bp) で消化して作製した。-622bp~-378bpの領域を欠失させたプロモーター (Δ 622-378) は、-377bpプロモーターの上流に、PCRで増幅した-1043bp~-623bpの領域を連結して作製した。-173bp~-92bp、-274bp~-92bp、-365bp~-92bpの領域を欠失させたプロモーター (Δ 173-92、 Δ 274-92、 Δ 365-92) は、-1.0kbpプロモーターを*Alu*Iで部分消化して-1.0kbp~-174bp、-1.0kbp~-275bp、-1.0kbp~-366bpの断片を調製し、-91bpプロモーターの上流に連結した。-629bp~-91bpの領域を欠失させたプロモーター (Δ 628-92) は、-1.0kbpプロモーターを*Mbo*II (-627bp) で消化し、平滑末端化した後、-91bpプロモーター上流に連結した。塩基配列の解析を行い、その構造を確認した。-1.0kbpプロモーターからRY配列を欠失させたプロモーター (Δ RY) は、3箇所存在する*Eco*T22I切断部位 (5'-ATGCAT-3'; -516, -376, -149) のうち、-516bpの位置のみを部分消化し、平滑末端化した後連結したものをを用いた。この結果、5'-CATGCAT-3' \rightarrow 5'-CAT-3' となったことを、塩基配列の解析により確認した。以後は第1章3-1-1~4と同様に行った。

2-2 結果

2-2-1 5'欠失プロモーターとGUS遺伝子の融合遺伝子の発現解析

5'欠失プロモーターとGUS遺伝子の融合遺伝子 (Fig.2-1) を導入したトランスジェニックタバコの種子におけるGUS活性を測定した (Fig.2-2)。第1章において、WCI-3遺伝子の-1.0kbpプロモーターが種子において時期特異的にGUS遺伝子の発現を強く誘導することを示したが、この活性の強さは-1.9kbpプロモーターと-882bpプロモーターの持つ活性と同レベルであった。このことは、WCI-3遺伝子プロモーターの種子における時期特異的な転写の活性化に必要なシスエレメントは転写開始点上流-882bpより下流にあることを示している。プロモーターを-623bpまで欠失させると

GUS活性は約1/10に低下したことから、-882bp~-623bpの領域に転写活性化の重要なシスエレメントが含まれていることが示された。さらに-377bpまで欠失させると、GUS活性の強さに大きな変化は見られないが、-623bpプロモーターの場合に比べて種子の成熟初期のGUS活性が上昇し、成熟後期においては減少しているため、結果として種子の成熟に伴うGUS活性の上昇が失われた。ここではGUS活性をタンパク質あたりで表しているが、種子タンパク質も種子の成熟に伴い上昇するため、種子あたりのGUS活性で表した場合にはGUS活性は上昇している可能性もある。しかし、シカクマメ種子におけるWCIタンパク質の蓄積はタンパク質あたりで比較しているため、ここでは、タンパク質あたりでGUS活性が上昇していない場合には時期特異性を失っていると判断した。-377bpから-194bpへとさらに欠失させると、GUS活性はバックグラウンドレベルまで減少した。このことから、-377bp~-194bpにも種子における転写活性化に関与するシスエレメントが存在するが、このシスエレメントは時期特異的な転写の活性化という情報は持たないと考えられる。-91bpまで欠失させると再び弱いながらもGUS活性が回復したことから、-194bp~-91bpには転写を抑えるサイレンサー活性があることが示された。また、種子における転写を誘導するには-91bp~+34bpの領域のみで十分であることが示された。この領域は第1章で示されたWCI遺伝子ファミリーに保存された約100bpの領域とほぼ一致しており、第1章の結果と併せて、この領域がWCI遺伝子の種子特異性に関与していることが示された。

2-2-2 -882bp~-623bpの領域に存在するシスエレメントの同定

第2章2-2-1の結果により、-882bp~-623bpの領域には種子の成熟中期における転写の活性化を支配する重要なシスエレメントが存在することが示された。そこで、この領域のより詳細な5'欠失プロモーターを作製し、そのシスエレメントの同定を行った (Fig.2-3)。-831bp、-775bp、-705bpと欠失させるに従い、15-25日目のGUS活性は徐々に減少していった。この結果は、-882bp~-623bpの領域における時期特異的な転写の活性化に関わるシスエレメントは、1つではなく、複数存在していることを示している。

2-2-3 中間欠失プロモーターとGUS遺伝子の融合遺伝子の発現解析

5'欠失プロモーターの解析では、上流域に存在するシスエレメントと協調して働くシスエレメントの存在を見落とす可能性がある。そこで、そのような可能性を検討するとともに、5'欠失プロモーターで得られた結果を確認するため、様々な中間欠失プロモーターを作製し、その転写活性を解析した (Fig.2-4)。△173-92プロモーターを導入したタバコでは、-1.0kbpプロモーターを導入したタバコと比べて若干のGUS活性の増加が認められた。5'欠失プロモーターの解析から、-194bp~-91bpの領

域はサイレンサー活性を持つと考えられたので、サイレンサーを除いた影響が現れている可能性が考えられる。さらに欠失領域を-274bp、-365bpへと拡大していくとGUS活性は徐々に減少していったが、時期特異的なGUS活性の上昇は依然見られた。この結果は、-377bp~-194bpの領域が種子における転写の活性化に関与しているという結果とよく一致している。欠失領域を-628bpへと欠失させるとさらにGUS活性は減少したが、種子の成熟に伴うGUS活性の上昇も見られなくなった。△628-92プロモーターは5'欠失プロモーターの解析から、種子における転写の活性化に重要であると考えられた-882bp~-623bpの領域をほぼ完全に持っているにも拘わらず、GUS活性の大きな上昇は見られなかった。このことから、-882bp~-623bpの領域による転写の時期特異的な活性化には-622bp~-378bpの領域の存在が必要である可能性が考えられた。

2-2-4 -622bp~-378bpの領域に存在する時期特異的な転写活性化に関わるシスエレメントの同定

第2章2-2-3において、-882bp~-623bpの領域による転写の時期特異的な活性化には-622bp~-378bpの領域の存在が必要である可能性が考えられた。このことを確認するために、△622-378プロモーターの解析を行ったところ、弱いGUS活性しか観察されず、時期特異的なGUS活性の上昇が認められなかった(Fig.2-5)。プロモーターの転写活性にはシスエレメント同士の距離が重要な場合がある。△622-378プロモーターにおいても、-882bp~-623bpの領域がTATAボックスと近づきすぎたためにその効果が見られなくなった可能性が考えられる。しかし、△622-378が約250bp欠失させているのに対し、約270bp欠失させた△365-92プロモーターにおいては高いGUS活性が得られているため、欠失させた領域の大きさが原因ではないと考えられる。以上より、-882bp~-623bpの領域と-622bp~-378bpの領域が存在することにより時期特異的な転写の活性化が起こることが示された。この領域には種子タンパク質遺伝子の保存配列であるRY配列が存在している。この配列は種子タンパク質遺伝子の種子における転写に関わるシスエレメントであることが報告されている (Baumlein et al., 1992; Chamberland et al., 1992; Fiedler et al., 1993; Fujiwara and Beachy, 1994; Lelievre et al., 1992)。この配列が-622bp~-378bpにおけるシスエレメントとして働いている可能性を調べるため、-1.0kbpのプロモーター領域からこの配列のみを欠失させたプロモーター(△RY)を作製し、トランスジェニックタバコ種子における発現を解析した。その結果、△RYプロモーターは△628-92プロモーターと△622-378プロモーターと同レベルのGUS活性しか誘導しなかった(Fig.2-5)。以上の結果から、RY配列が-882bp~-623bpの領域と協調的に働いて時期特異的な転写の活性化を誘導するシスエレメントであると考えられた。

2-2-5 タバコ葉におけるWCI-3遺伝子プロモーターの転写活性

5'欠失、中間欠失、RY欠失プロモーターを導入したタバコの葉におけるGUS活性の測定結果をFig.2-6に示す。-1.9kbp、-831bp、-775bpおよび-705bpプロモーターのGUS活性は他のプロモーターと同様であったので、データは省略している。いくつかの個体において高いGUS活性が得られたが、葉において高いGUS活性を誘導する特定の欠失プロモーターは存在しなかった。WCI遺伝子はシカクマメ中では茎において少量発現しており、WCI-3遺伝子を含むWCI遺伝子プロモーターをタバコに導入した場合においても、主に茎の維管束および葉柄で転写活性が認められる（福島、未発表データ）。いくつかの個体が示した葉における高いGUS活性については、この葉柄におけるGUS活性に由来していると考えられる。以上より、今回用いた欠失プロモーターではWCI-3遺伝子の発現を葉で抑えるような領域の存在は示されなかった。

3 パーティクルガン法によるシカクマメ種子における一過的発現系を用いた解析

3-1 実験材料および方法

3-1-1 プラスミドの構築

トランスジェニックタバコにおける解析に用いた5'欠失プロモーターを、D.R. Helinski博士およびS.H. Howell博士より分与を受けたpDO432 (Ow et al., 1986) から、CaMV35Sプロモーターを除いたプラスミド (pNP-L) に導入した (Fig.2-7, 8)。このプラスミドはレポーター遺伝子として、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子 (LUC) を持つ。遺伝子導入の組織化学的解析に用いたWCI-3a遺伝子-1.9kbpプロモーターとGUS遺伝子の融合遺伝子、WCI-3b遺伝子-1.9kbpプロモーターとGUS遺伝子の融合遺伝子は第1章のタバコ培養細胞プロトプラストへの遺伝子導入に用いたものと同一である。

3-1-2 シカクマメ種子への遺伝子導入と発現の組織化学的解析

パーティクルガンを用いた遺伝子導入法は基本的に Nishiharaら (1993)の方法に従って行った。以下にその方法を示す。開花後35-40日目のシカクマメ種子を滅菌し、種皮をピンセットを用いて除く。胚軸を通るように縦方向に二分割し、0.8%寒天培地上に切断面を上に向けて置く。エタノール沈殿法により、0.8 μ gのプラスミドDNAを0.2mgの金粒子 (Tokuriki-5)にまぶし、マイクロプロジェクタイトルにのせて風乾する。減圧下で200kg/cm²の圧力でプロジェクタイトルを発射させる。金粒子を打ち込んだ種子片をB5培地 (Gamborg et al., 1968) で24~48時間培養した後、第1章の方法

に従って、導入遺伝子の発現を組織化学的に解析した。

3-1-3 5'欠失プロモーターとLUC遺伝子の融合遺伝子の発現解析

WCI-3遺伝子プロモーターとLUC遺伝子の融合遺伝子とpBI221を0.4 μ gずつ含む溶液を金粒子にまぶし、3-1-2と同様の方法により遺伝子導入を独立に2回行った。種子を36時間培養した後、抽出用緩衝液(0.1M KPO₄ pH7.5, 1mM DTT)で抽出し、抽出液をGUS活性およびLUC活性の測定に用いた。LUC活性の測定はピッカジーン・ルミネセンスキット(東洋インク)を用いて行った。それぞれの融合遺伝子のLUC活性をGUS活性で補正した後、2回の平均値をとり、WCI-3b1.9Lの活性を100%とした相対値で表した。この実験を独立に2度行った。

3-2 結果

3-2-1 シカクマメ種子へ導入された遺伝子の一過的発現の組織化学的解析

開花後35-40日目のシカクマメ種子にWCI-3a遺伝子の-1.9kbpプロモーター、WCI-3b遺伝子の-1.9kbpプロモーター、CaMV35SプロモーターをGUS遺伝子につないだ融合遺伝子、およびGUS遺伝子のみをそれぞれ導入した。この時期のシカクマメ種子ではWCI遺伝子のmRNAの蓄積が最大に達しており、WCI遺伝子のmRNAの合成が最も盛んな時期と考えられる。GUS遺伝子の発現を組織化学的に解析したところ、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の1.9kbpプロモーターおよびCaMV35Sプロモーターを導入した種子ではGUS遺伝子の発現を示す青いスポットが多数観察されたが、GUS遺伝子のみを導入した種子においてはスポットは観察されなかった(Fig.2-7)。このことは、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の1.9kbpプロモーターが成熟中期のシカクマメ種子において一過的な転写活性を持つことを示している。また、種子中では子葉と胚軸の両方において転写活性を持っていた。このことは第1章におけるシカクマメ種子およびトランスジェニックタバコ種子の組織化学的解析の結果とも一致しており、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子が子葉と胚軸において発現している可能性を示している。また、シカクマメ葉においては、パーティクルガンにより導入されたWCI-3aおよびWCI-3b遺伝子の1.9kbpプロモーターは転写活性をほとんど示さなかった。しかしCaMV35Sプロモーターも同様にほとんど転写活性を示さなかった(データは省略)ことから、器官特異的な発現制御機構が働いているかどうかは不明である。アラビドプシスの葉においても、パーティクルガン法で導入されたCaMV35Sプロモーターは一過的な転写活性が低いことが知られている(西原、私信)。十分に展開しきった葉は細胞分裂を行わないため、転写活性も低いことが考えられる。このように遺伝子導入に用いた葉の状態や、遺伝子導入条件などが不適切であったことが考えら

れる。

3-2-2 WCI-3遺伝子のシカクマメ種子における一過的発現に關与するプロモーター領域の同定

第2章3-2-1において、WCI-3遺伝子はシカクマメ成熟中期種子中で一過的な転写活性を持つことが示されたので、この転写活性に必要なプロモーター領域の同定を行った。一般に、パーティクルガンを用いた遺伝子導入においては、用いる組織の状態や、その日の実験条件により大きく遺伝子導入の効率が変動する。そこで、CaMV35Sプロモーターを同時に導入し、その活性で遺伝子導入の効率を補正した。また、シカクマメ種子は内在性のGUS様の活性を持っていた（データは示さない）ため、内在性の活性が全く存在しないホタルのルシフェラーゼ (LUC) 遺伝子をWCI-3遺伝子プロモーターのレポーター遺伝子として用い、CaMV35SプロモーターにはGUS遺伝子を用いた。各5'欠失プロモーターにより誘導されたLUC活性値をGUS活性値で割り、pWCI-3b1.9Lの活性を100%とした時の相対値で示した (Fig.2-9)。パネルBには、第1章における、同様の5'欠失プロモーターを導入したトランスジェニックタバコの開花後25日目の種子のGUS活性を示した。パーティクルガンを用いたシカクマメ種子における一過的発現系においても、-623bp~-377bpおよび-91bp~+34bpの領域は、この領域を欠失させることによりLUC活性が減少することから、転写の活性化に關与していることが示された。このことは、この領域にトランスジェニックタバコ種子およびシカクマメ種子における一過的発現系に共通した転写の活性化のシスエレメントが存在することを示唆する。しかし、そのほかの領域においてはこれら二つの系において異なる結果が得られた。特に、トランスジェニックタバコの解析において示された転写の活性化に重要な-882bp~-623bpの領域は、一過的発現系では転写活性にほとんど影響を持たなかった。このことは、トランスジェニックタバコで転写の活性化に働く重要なシスエレメントが一過的発現系では働いていないことを示している。同様の相違が-377bp~-194bpおよび-194bp~-91bpにおいても見られた。トランスジェニックタバコにおいては-377bp~-194bpの領域は転写の活性化に働き、-194bp~-91bpの領域はサイレンサー活性を持つが、一過的発現系ではこれら領域を欠失させてもLUC活性に影響はみられなかった。以上の結果から、WCI-3遺伝子の発現は、タバコゲノムに組み込まれた場合とパーティクルガン法によりシカクマメ種子に導入された場合では、異なる仕組みで制御されていることが示された。

4 考察

植物の分化に伴う遺伝子の時間的および空間的発現制御機構を知る上で、器官特

異的および時期特異的な制御を受け、転写量も豊富なことから多くの種子タンパク質遺伝子の発現が解析されてきた (Thomas, 1993)。それにもかかわらず現在までに種子特異性を与えるとされるシスエレメントは数えるほどしか同定されていない。しかもその多くがその遺伝子のみに見られるシスエレメントであり、種子での転写に関与すると考えられる普遍的なシスエレメントは現在のところRY配列のみである。本論文ではWCI-3遺伝子の転写に関わるシスエレメントの同定を行い、種子での転写に関わる領域を同定したが、このうち3つの領域、すなわち-882bp~-623bp、-622bp~-378bpおよび-91bp~+34bpの領域がWCI-3遺伝子のトランスジェニックタバコにおける発現に不可欠であること示された。

-91bp~+34bpの領域は第1章においてWCI遺伝子の器官特異性に関わることが示唆されたが、この領域のみを持つWCI-3遺伝子プロモーターが種子特異的転写能を持つことが示されたことから、種子特異性を規定するシスエレメントはこの領域に存在すると考えられる。TATAボックスを含む転写開始点付近の領域が転写の器官特異性を制御している例はトウモロコシの*Adh1*遺伝子において報告されている。*Adh1*遺伝子のTATAボックスを含む配列は器官によって異なって認識され、その結果、異なる転写開始点からの転写物ができ、転写効率が変化するために器官特異性が起こる (Kloeckener-Gruissem et al., 1992)。シカクマメにおいても葉におけるTATAボックス付近の塩基配列の認識が葉と種子では異っている可能性がある。現在までに、種子特異性を与えるとされるシスエレメントがいくつか報告されている。エンドウのレクチン遺伝子に見られるTGACの繰り返し配列が gain of function 法により種子特異性を与えることができるので、種子特異性のシスエレメントであると考えられる (de Pater et al., 1993)。また、ヒマワリのヘリアンチニン遺伝子のTATAボックス付近に見られるWS配列も loss of function 法により、種子特異性のシスエレメントであると報告されている (Nunberg et al., 1994)。しかし、いずれの配列もWCI-3遺伝子の-91bp~+34bpの領域には存在しない。いくつかの種子タンパク質遺伝子は種子における低レベルの転写をTATAボックスを含む短い領域で誘導することが出来る (Baumlein et al., 1992; Fiedler et al., 1993; Goldberg et al., 1989; Nunberg et al., 1994)。しかし、これらの領域に共通する配列は見つかっていない。このことは、種子特異性を決めるシスエレメントはいくつか存在することを意味しているのかもしれない。あるいは、1次配列のみならず、2次的 (3次的) なDNA構造を種子特異性として、植物は認識しているのかもしれない。この領域には種子タンパク質遺伝子に比較的よく保存されているCACAC配列 (コンセンサス配列と1塩基異なる) が存在する。また、このCACAC配列はWCI遺伝子間で保存されている。ダイズレクチン遺伝子にもCACAC配列が存在する。レクチン遺伝子の場合、転写開始点上流-77bpの領域が種子特異的な発現に重要であることが示されているが、この領域にはCACAC配列は含まれていない (Goldberg

et al., 1989)。他の種子タンパク質遺伝子においてもCACACA配列の転写への関与は報告されていない。WCI遺伝子においてもCACACA配列は種子特異性に関与していないことも予想される。この領域に新たな種子特異性のシスエレメントが存在しているかもしれない、より詳細な解析が必要である。

-882bp~-623bpの領域は種子での転写量の増大に関与していることが示されたが、そのシスエレメントは1つではなく複数存在していた。しかし、この領域には現在までに報告されている種子タンパク質遺伝子の転写に関わるとされるシスエレメントや、この領域に繰り返し存在する配列は存在しないので、現在のところシスエレメントの推定はできない。この領域の特徴としてはAT塩基対に富むこと(80%)が挙げられる。-1.0kbpプロモーター領域(-1.0k~+34)のAT含有率も74%と高いが、特にこの領域は他の領域に比べてATの連続する配列に富んでいる(Fig.2-10)。ATに富む領域は転写の活性化に関与する事例がいくつか報告されている。酵母においてはATの繰り返し配列が転写を促進することが報告されている(Struhl, 1985)。ダイズの熱ショックタンパク質遺伝子プロモーターのATに富む領域をCaMV35Sプロモーターを-90bpまで持つ領域につないだところ、タバコでの転写活性が増大した(Czarnecka et al., 1992)。同様の結果が、インゲン β -ファゼオリン遺伝子プロモーターのATに富む領域についても報告されている(Bustos et al., 1989)。このことから、-882bp~-623bpのATに富む配列が転写の増大に関与している可能性が考えられる。この領域は-622bp~-378bpの領域が存在しないときには顕著な転写量の増大を誘導できないことが示された。すなわち、この領域に存在するシスエレメントは、単独で存在した場合にはそれほど高い転写活性化能を持たないと考えられる。このことは、この領域を含む-1.0kbp~-623bpの領域を-91bpプロモーターにつなげてても低い転写活性しか誘導できなかったことと一致する。また、-622bp~-378bpの領域が存在しない場合には、この領域は時期特異的な転写の活性化も誘導できなかった。このことと、ATに富む領域の転写への関与を考えあわせると、この領域は普遍的な転写活性化領域であり、-622bp~-378bpおよび-91bp~+34bpの領域の存在下で、種子において時期特異的に転写を活性化できるという仮説を立てることができる。実際、シカクマメの各器官に存在し、ATに富む配列を認識し結合する核内タンパク質(Habu et al., 1993)がこの領域にも結合する(深澤、私信)。このような仮説を証明するためには、器官特異性を持たない(あるいは種子以外の器官特異性を持つ)プロモーターにこの領域を導入し、他の器官での転写を活性化できるか否かを調べる必要がある。

-622bp~-378bpの領域は、-882bp~-623bpの領域と協調して時期特異的な転写の活性化を誘導することが示された。この領域を5'側から欠失させると成熟中期~後期におけるGUS活性は若干減少したが、逆に成熟初期におけるGUS活性が上昇した。また、中間欠失プロモーターの解析においても、この領域を除いた場合に時期特異

的なGUS活性の上昇が見られなくなった (Fig. 2-5)。一方、この領域を5' (-623bp → -377bp) および3'側 (-365bp → -628bp) から欠失させていった場合に見られるGUS活性の減少はそれほど大きくないことから、この領域は転写の量を調節するのではなく、主に時期特異的な活性化働いていると考えられる。このことは、この領域を持たない欠失プロモーターは (-91bpプロモーターを除いて) 全て時期特異的な転写の活性化を誘導できなかつたことと一致する。おそらく、他の領域は転写量を増大 (時期特異的とは無関係に) するという情報のみを持っており、その時期特異性の制御は-622bp~-378bpの領域に存在するシスエレメントによりなされているのであろう。すなわち、このシスエレメントは種子タンパク質遺伝子の時期特異的な発現制御に重要であると考えられる。RY配列を破壊したプロモーターの場合も種子におけるGUS活性が減少し、時期特異的な活性化も見られなくなることから (Fig.2-5; Δ RY)、この配列が622bp~-378bpの領域におけるシスエレメントであることが示された。すなわち、RY配列は転写量を増大させる他の領域と協調して時期特異的に転写を活性化させるシスエレメントであると考えられる。このことは、*WCI*遺伝子のうちRY配列を持っているのは*WCI-3*遺伝子のみであり、時期特異的に転写を活性化したのも*WCI-3*遺伝子のみであったこととよく一致する。他の*WCI*遺伝子へのRY配列の導入により、時期特異的な転写の活性化を誘導することが出来るかもしれない。RY配列が種子での転写に関与している事例がいくつか報告されている (Baumlein et al., 1992; Chamberland et al., 1992; Fiedler et al., 1993; Fujiwara and Beachy, 1994; Lelievre et al., 1992)。いずれの場合も、RY配列単独では転写の活性化は起こらず、他の領域と協調して働くことが示されており、今回の結果とも一致する。RY配列が時期特異的な転写活性化のシスエレメントであることは、ダイズ β -コングリシニンの α' サブユニット遺伝子についても報告されている (Fujiwara and Beachy, 1994)。 α' サブユニット遺伝子の種子特異的エンハンサー領域をCaMV35Sプロモーターの-90の位置に挿入したキメラプロモーターは、種子において時期特異的な転写活性を示す。このエンハンサー領域にはRY配列が2箇所存在する。このうち、5'側に存在するRY配列を破壊すると時期特異的な活性化が観察されなくなる。この結果と、今回の-377bpプロモーターの成熟初期の種子におけるGUS活性の上昇を併せて考えると、RY配列は種子の成熟初期における転写活性を抑えていることも考えられる。

今回の解析から、*WCI-3*遺伝子のプロモーターには転写量を増大させる領域に加えて、転写量を抑える領域が存在することが明らかとなった。種子タンパク質遺伝子におけるこのような領域の存在はインゲン β -ファゼオリン遺伝子においても報告されている (Bustos et al., 1991)。 β -ファゼオリン遺伝子のNRS1 (negative regulatory sequence) には5'-AGAAC/AA-3'という配列が繰り返し存在するが、*WCI-3*遺伝子の-194bp~-91bpの領域には存在していなかった。この領域の*WCI-3*遺伝子の発現におけ

る機能は現在のところ不明である。この領域を除いたプロモーターは葉における転写を誘導しなかったことから、葉における転写の抑制に関わっていることは考えにくい。

シカクマメ種子におけるパーティクルガンにより導入されたWCI遺伝子の発現は、トランスジェニックタバコにおける発現と、少なくとも部分的に、異なる機構で行われていることが明らかとなった。この相違はなぜ起こるのだろうか。まず第一に、シカクマメとタバコにおける遺伝子発現の制御機構が異なっている可能性が考えられる。WCI-3遺伝子はタバコにおいても、シカクマメと同様の時期および器官特異的発現を示したが、用いられているシスエレメントが異なっているのだろうか。このような可能性を検証するには、タバコ種子を用いた一過的発現の解析を行う必要がある。第二の可能性として、一過的発現系においてはクロマチン構造を持たないプラスミドDNAを導入していることが、相違の原因になっていることが考えられる。マウスの組織特異的遺伝子プロモーターにおける転写制御因子複合体の形成にはヌクレオソームがプロモーター上に規則正しく位置することが必要であることが報告されている(McPherson et al., 1993)。このような、クロマチンによるプロモーターの三次元的な構造がWCI遺伝子の発現制御機構に関わっているのかもしれない。第三の可能性として、これら2つの系において導入される遺伝子の数が著しく異なることが相違の原因となっていることが考えられる。パーティクルガンを用いた遺伝子導入系では相当数の遺伝子が導入されていると考えられ、この過剰の遺伝子が核内に限られた数しか存在しない転写因子を奪い合い、正しい転写因子複合体の形成を妨げている可能性がある。一方、-622bp~-378bp、-91bp~+34bpの領域は2つの系において転写の活性化に関与していることが示された。この2つの領域は主に転写の時期および器官特異性をそれぞれ制御していることがトランスジェニックタバコを用いた解析から示されている。-622bp~-378bpの領域におけるシスエレメントはRY配列であることが示されたが、-91bp~+34bpに存在する種子特異性に関与するシスエレメントは未同定である。このシスエレメントの解析にはパーティクルガンを用いた一過的発現系が有効に働くかもしれない。

Table2-1 Summary of deletion promoter structures used in the analysis of *WCI-3b* gene promoter.

5' deletion promoter		Internal deletion promoter	
Promoter	Region	Promoter	Region deleted from -1.0kbp promoter
-1.9kbp	-1.9kbp to +34bp	△173-92	-173bp to -92bp
-1.0kbp	-1.0kbp to +34bp	△274-92	-274bp to -92bp
-882bp	-882bp to +34bp	△365-92	-365bp to -92bp
-831bp	-831bp to +34bp	△628-92	-628bp to -92bp
-775bp	-775bp to +34bp	△622-378	-622bp to -378bp
-705bp	-705bp to +34bp	△RY	RY sequence
-623bp	-623bp to +34bp		(-518bp to -515bp)
-377bp	-377bp to +34bp		
-194bp	-194bp to +34bp		
-91bp	-91bp to +34bp		

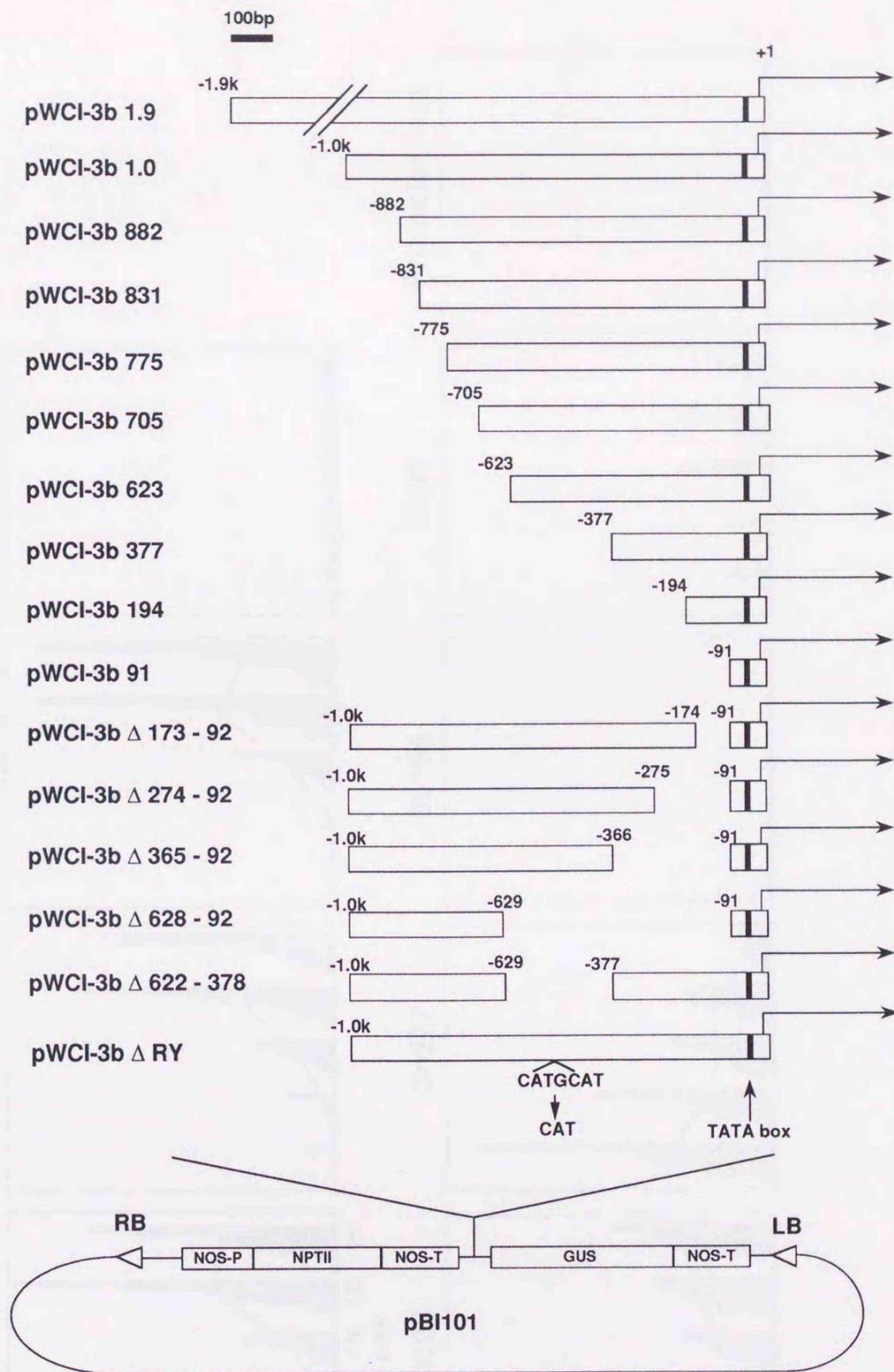


Fig.2-1 Diagram of deleted promoters of WCI-3b gene used in transgenic tobacco experiments. The 5'- and internal deletion promoter variants were cloned into pBI101. The 5' and 3' ends of deleted promoters are shown. The RY sequence (5'-CATGTCAT-3') were deleted to 5'-CAT-3' in Δ RY promoter.

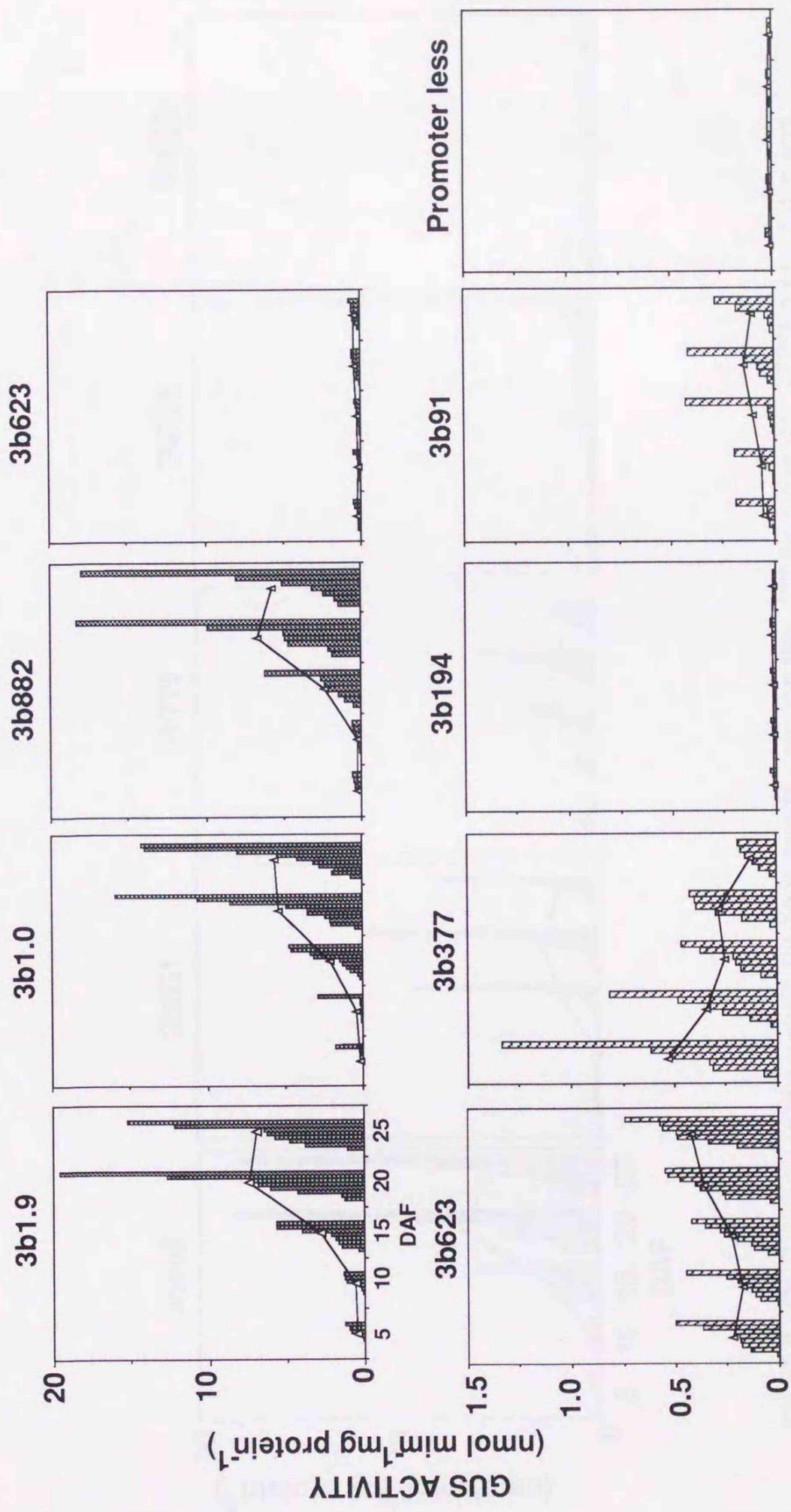


Fig.2-2 GUS activities of developing seeds of transgenic tobacco plants carrying the 5' deleted promoters of WCI-3b gene. The mean value of GUS activity of each transformant is shown by a triangle.

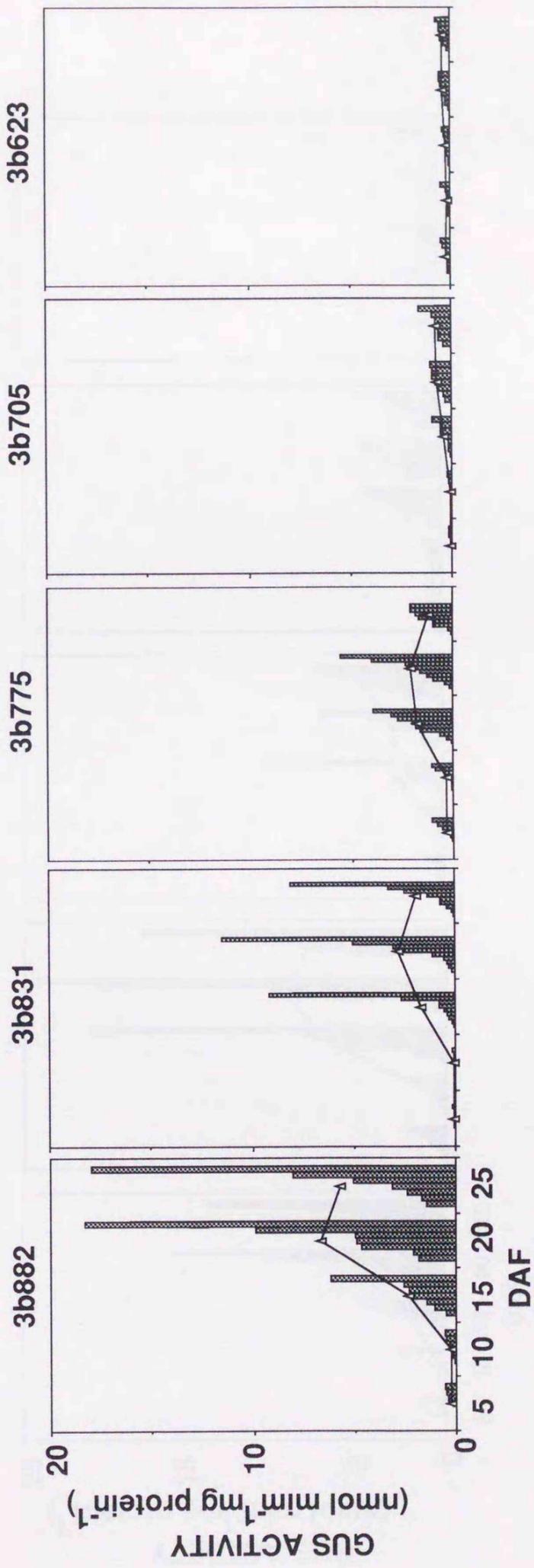


Fig. 2-3 GUS activity in transgenic tobacco seeds carrying the -831bp promoter, -775bp promoter and -705bp promoter. Figure legend is the same as in Fig.2-2.

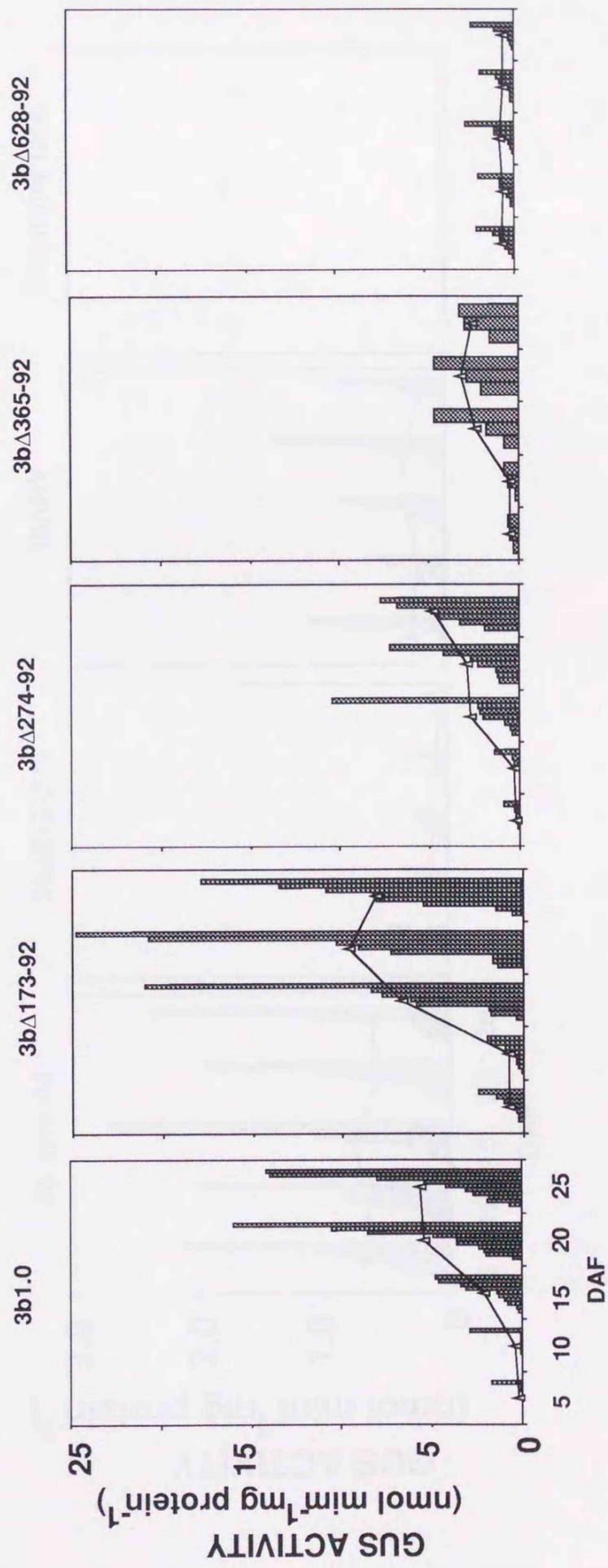


Fig. 2-4 GUS activity of transgenic tobacco seeds carrying internal deletion promoters of WCI-3b gene. Figure legend is the same as in fig.2-2.

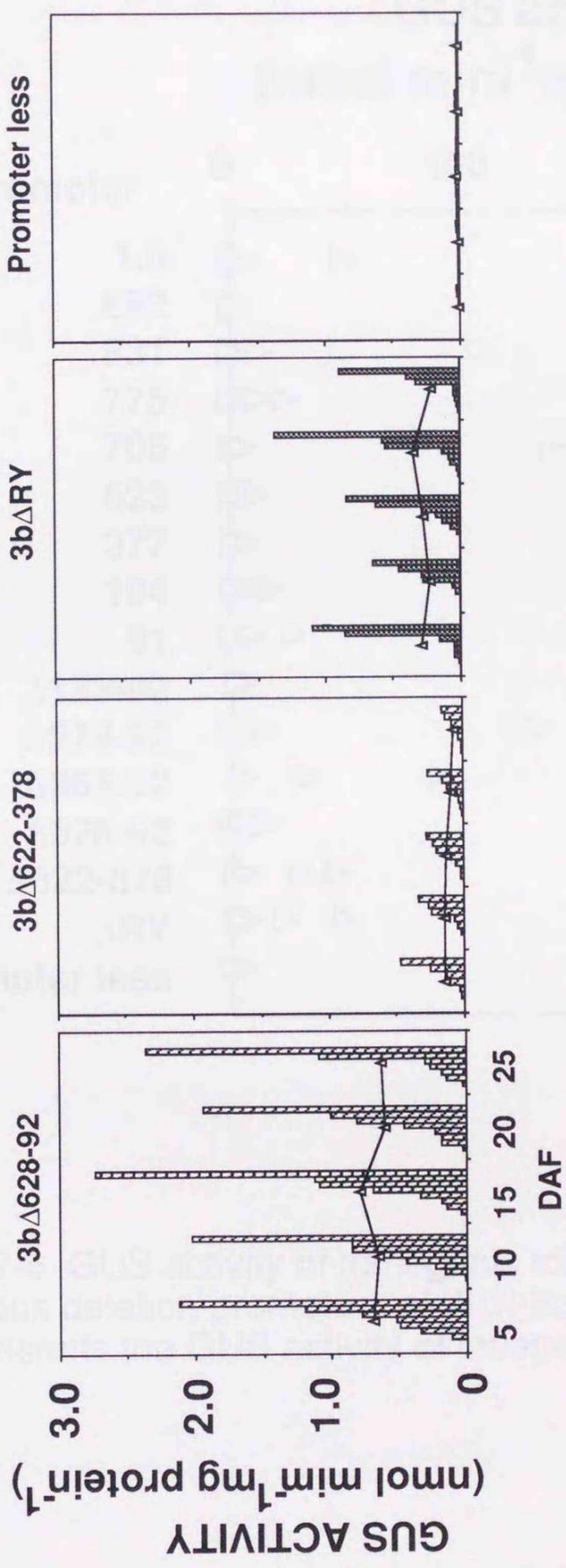


Fig.2-5 GUS activity of transgenic tobacco seeds carrying $\Delta 622-378$ promoter and ΔRY promoter of WCI-3b gene. Figure legends the same as in Fig.2-2.

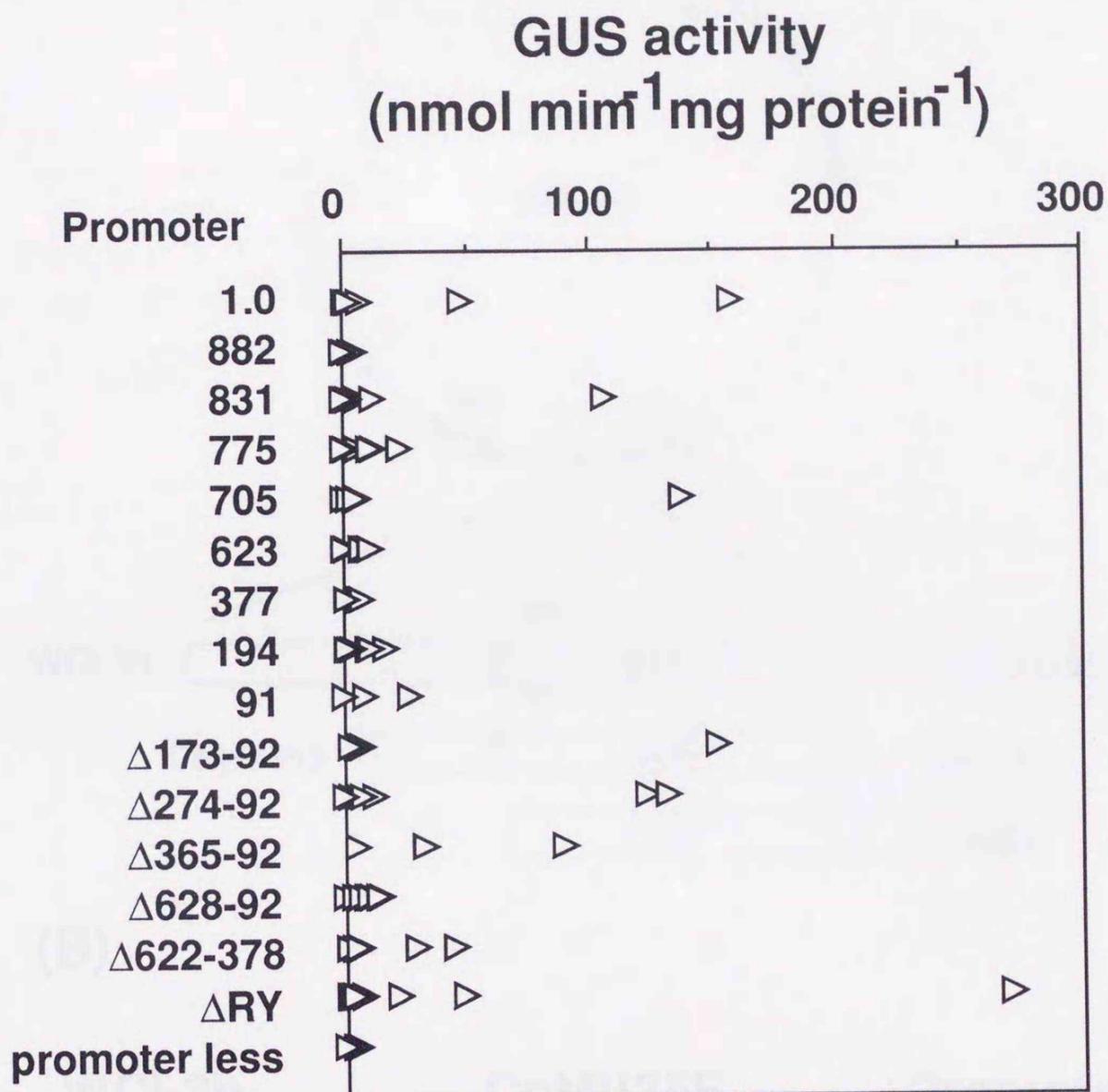
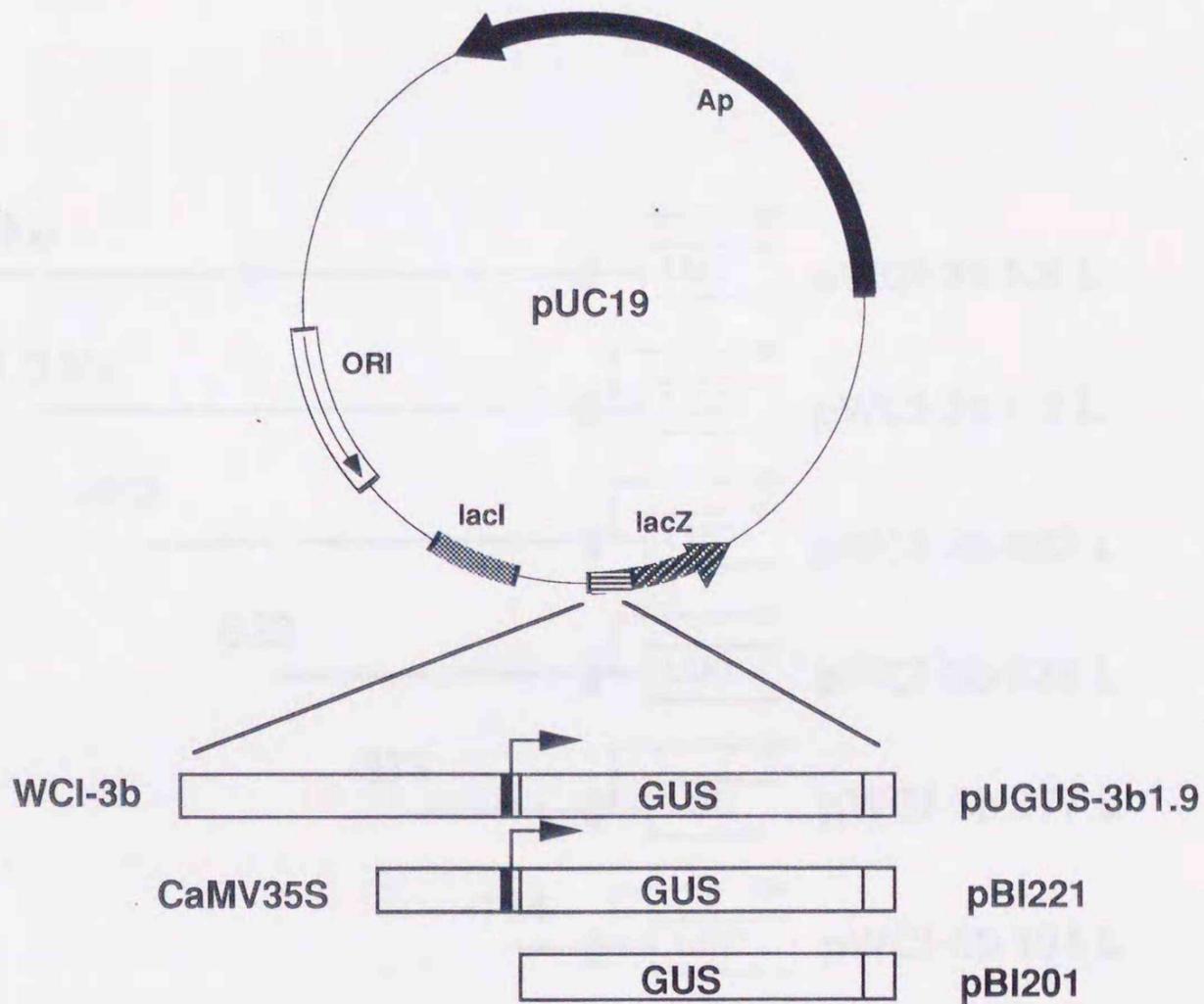


Fig.2-6 GUS activity of transgenic tobacco leaves carrying various deletion promoters of WCI-3b gene. Each triangle represents the GUS activity of independent transformant.

Fig.2-7 Effects of various deletions of the WCI-3b gene on the GUS activity of transgenic tobacco leaves. The plants were grown in soil. The GUS activity was measured in the leaves of the transgenic plants. The GUS activity was measured in the leaves of the transgenic plants. The GUS activity was measured in the leaves of the transgenic plants.

(A)



(B)

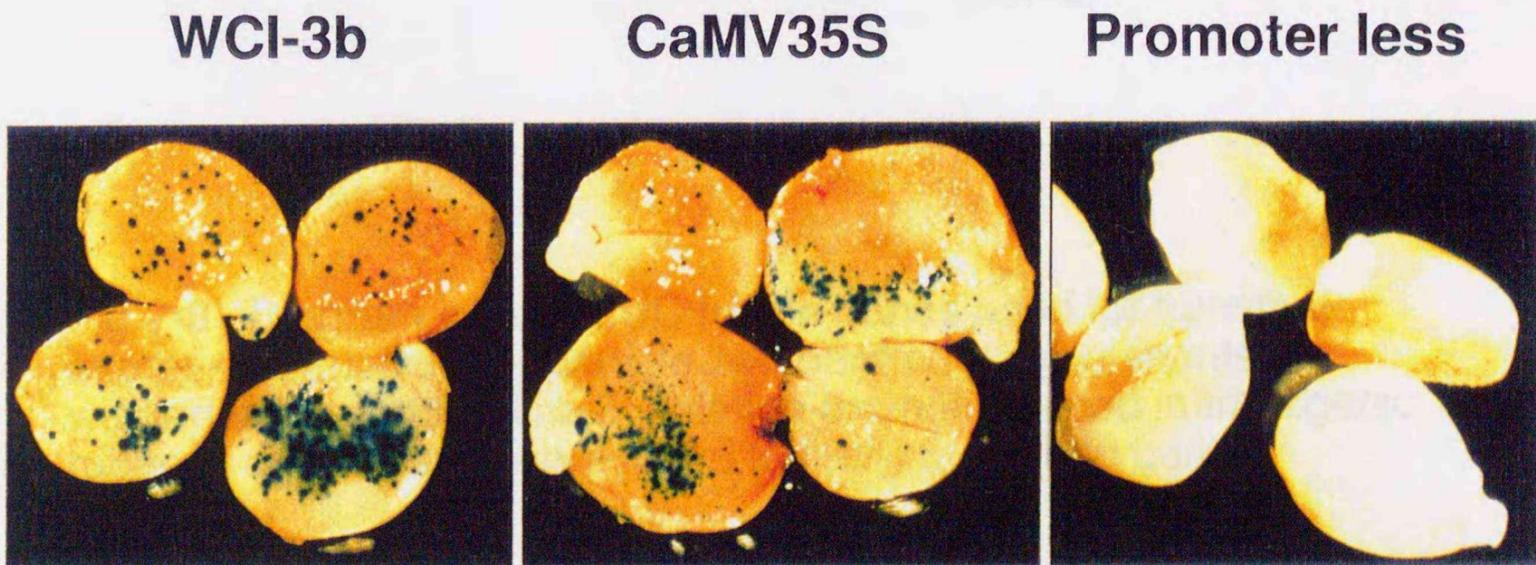


Fig.2-7 Histochemical assay of GUS activity in bombarded winged bean seeds. (A) Structure of fusion genes used in the histochemical assay. These plasmids are the same as used in electroporation experiments (Fig.1-6). (B) Histochemical assay of GUS activity in bombarded winged bean seeds. Blue spots indicate the expression of GUS gene.

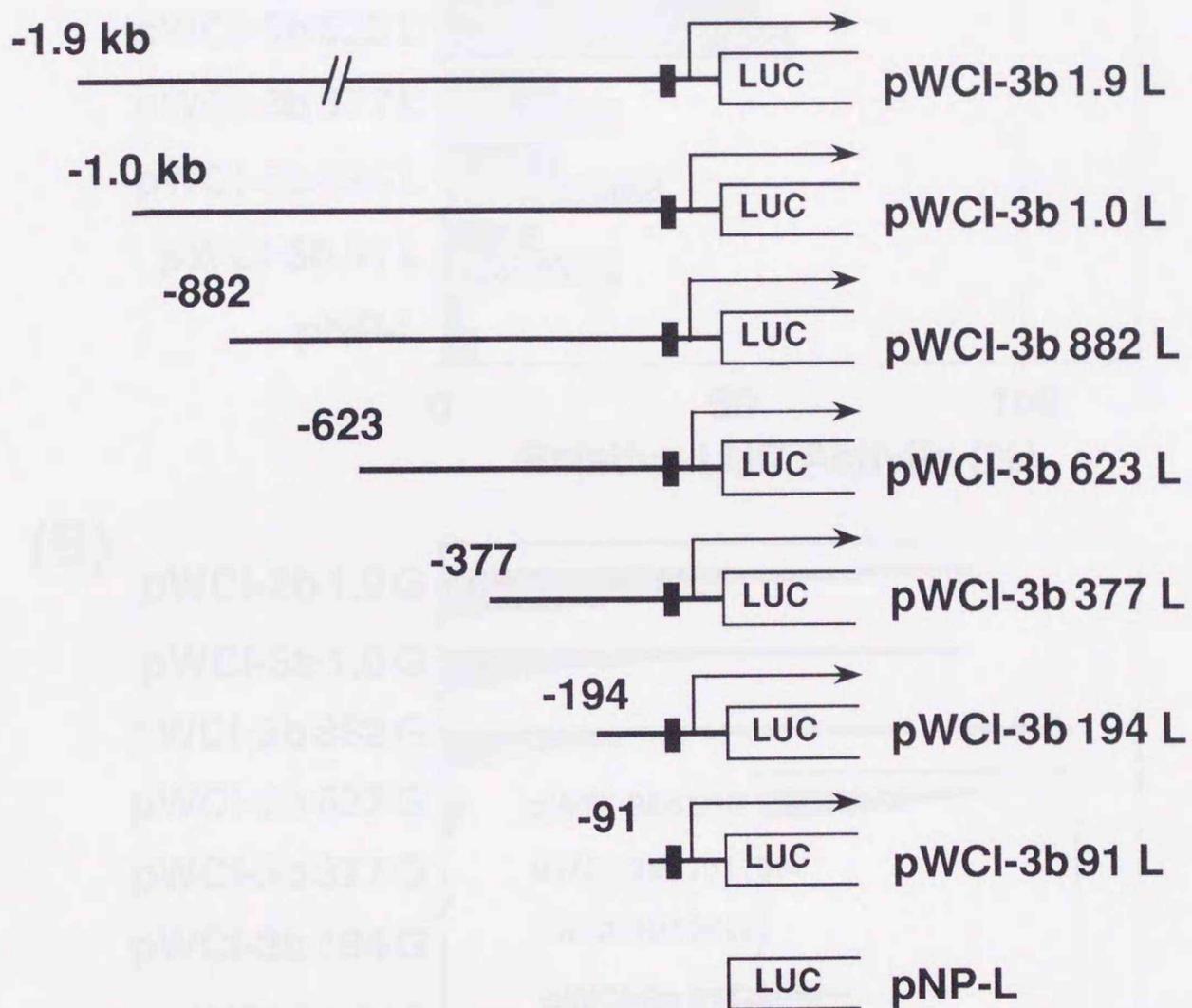


Fig.2-8 Diagram of WCI-LUC fusion genes used for transient expression analysis by particle bombardment experiments in winged bean seeds. The 5' deletion promoters used in transgenic tobacco experiments were fused to firefly luciferase gene.

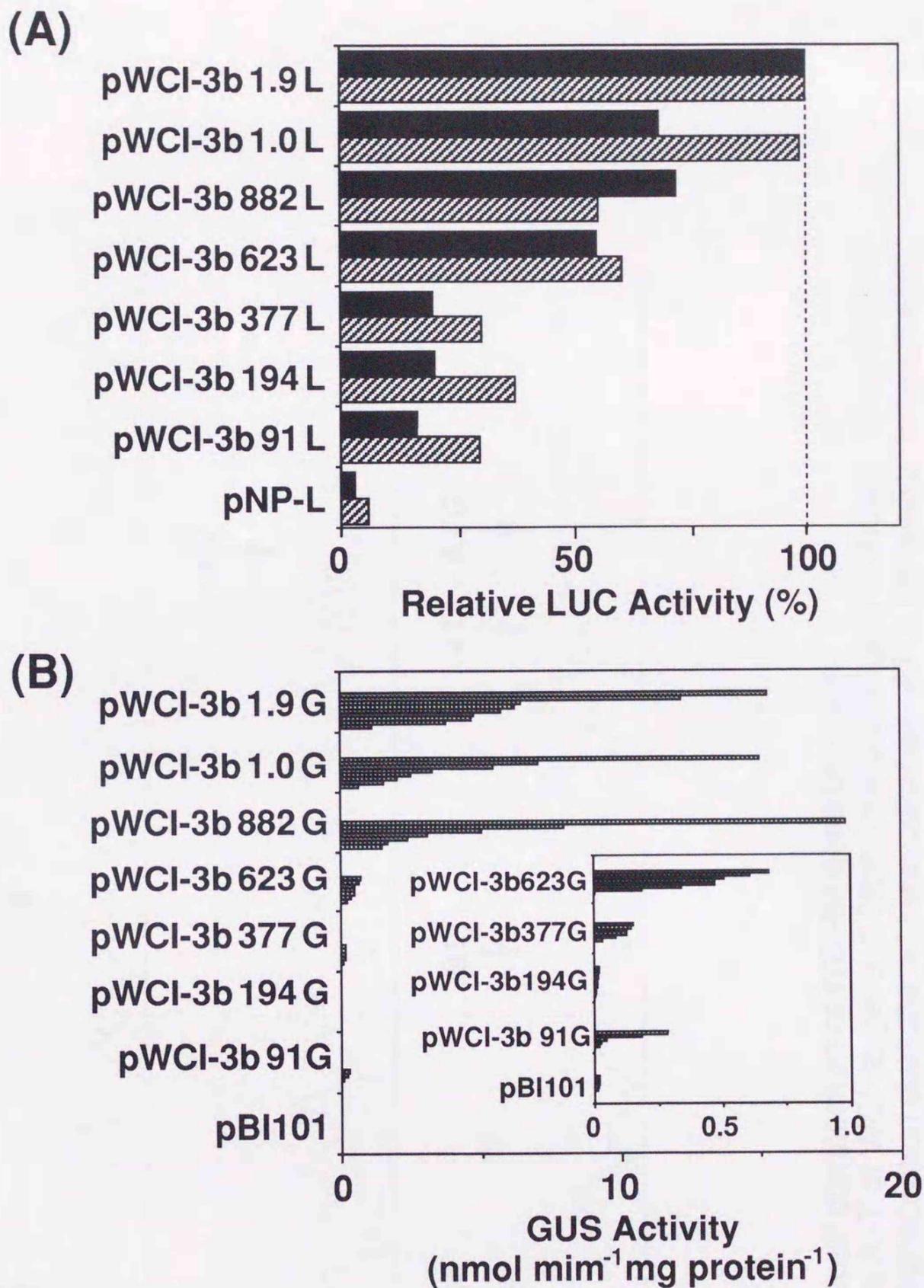


Fig. 2-9 Comparison of promoter activities in bombarded winged bean seeds and transgenic tobacco seeds. (A) Relative activity of sequentially deleted promoters in transient expression analysis in winged bean seeds. LUC activity of each construct was divided by the GUS activity of the same experiment. Experiments were done twice (indicated by filled and shaded boxes) in duplicate, and the averages of the duplicates are shown. Activity of pWCI-3b1.9L is taken as 100%. (B) GUS activities of sequentially deleted promoters in 25 DAF seeds of transgenic tobacco. Inset : The results of pWCI-3b623G, pWCI-3b377G, pWCI-3b194G and pBI101 were expanded.

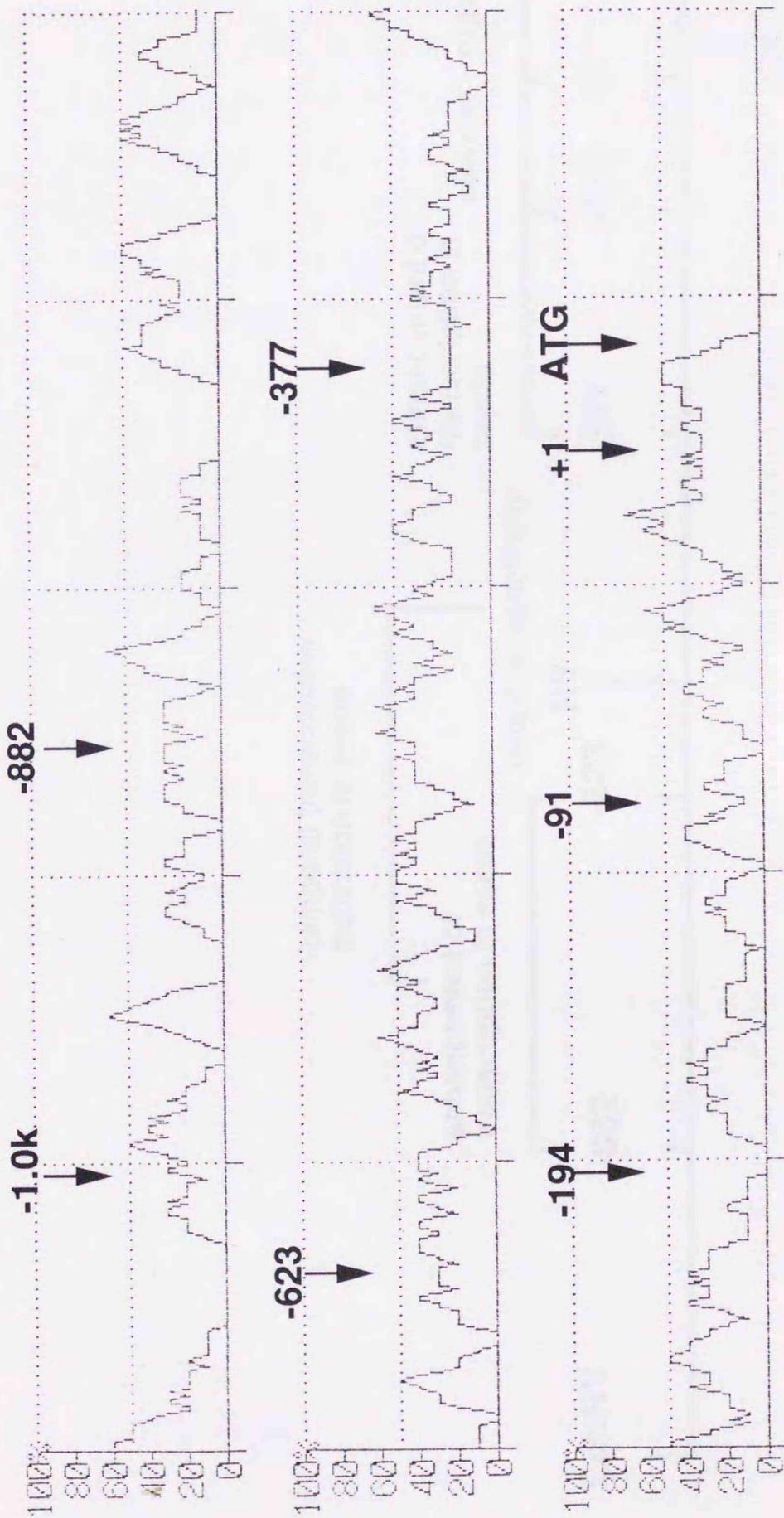


Fig.2-10 Basepair composition of WCI-3b gene promoter. The percentage A+T of WCI-3b gene -1.0kbp promoter region is shown. The positions relative to the transcription start site (+1) are indicated. ATG: translation initiation site.

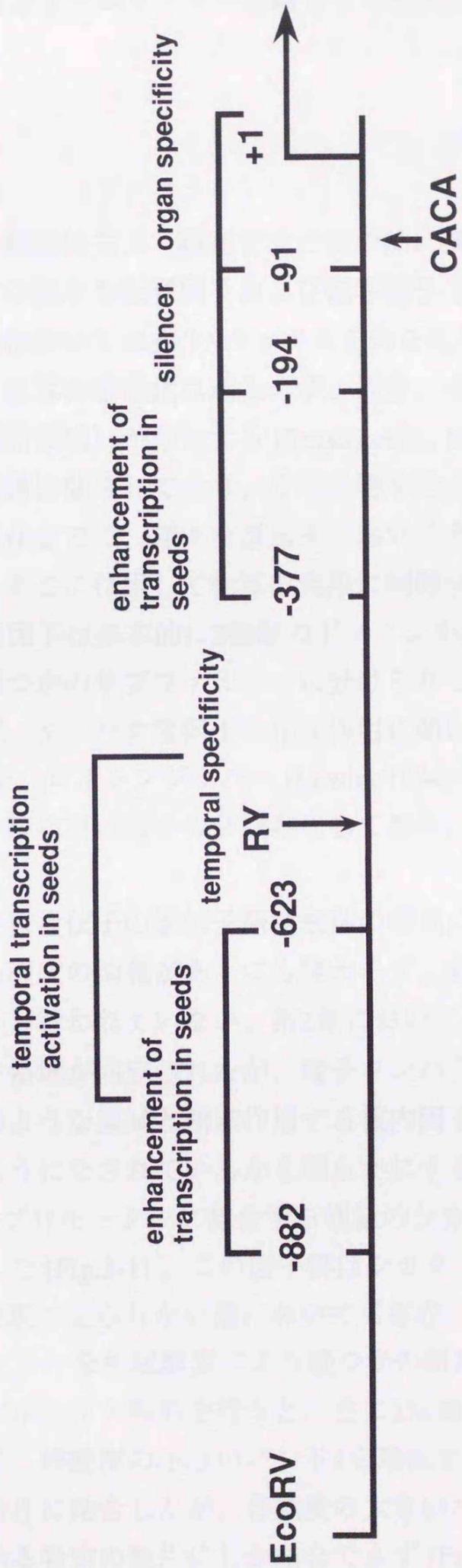


Fig.2-11 Schematic figure of cis-acting region of WCI-3b gene promoter.

第3章 WCI-3遺伝子プロモーターに結合する核内因子をコードするcDNAのクローニングと解析

1 序

遺伝子の転写制御は主に（現在までに集中的に調べられている範囲で）シスエレメントに結合する様々な転写因子および転写因子どうしの相互作用により行われる。特に、真核生物においてはTATAボックスを含む転写開始点付近の配列（基本配列）のみでは十分な転写の活性化は起こらず、通常、その上流域に転写の時期や量を調節する領域（調節領域）が存在する (Suzuki et al., 1993)。この調節領域が遺伝子の多様な発現制御機構に関与しており、分子生物学的な興味の対象として集中的に解析されてきた。現在までに、様々な遺伝子においてその発現を制御するシスエレメントが同定され、そこに作用して転写を実際に制御する転写調節因子が得られてきた。DNA結合性転写因子は基本的に2種類のドメインを持つ。1つはDNA結合ドメインで、その構造から幾つかのサブファミリーに分けられている (Suzuki et al., 1993)。他方は転写活性化領域（タンパク質同士の相互作用に関わる領域）である。酸性領域 (Ptashne, 1988)や、ロイシンジッパー (Lewin, 1994)という構造がその代表例だが、このような構造を持たない因子も多数存在しており、解析が進められている分野である。

種子タンパク質遺伝子の遺伝子発現制御の研究においては、そのシスエレメントについてはある程度の情報があるにも関わらず、転写因子のクローニングおよびその解析はほとんど行われていない。第2章において、WCI-3遺伝子の発現制御に関わるプロモーター領域が同定されたが、種子タンパク質の発現制御の仕組みを明らかにするにはこのような領域と相互作用する核内因子を同定し、発現制御がその因子を用いてどのようになされているかを明らかにする必要がある。Habuら (1993)はWCI-3遺伝子のプロモーターに結合する複数のシカクマメの核内因子をゲルシフト法により同定した (Fig.3-1)。この因子群はシカクマメの種子および塊根に存在し、WCI遺伝子の発現の見られない葉においても存在していた (Fig.3-2)。WCI-3遺伝子の-1.0kbpプロモーターを制限酵素により幾つかの断片に分割して、シカクマメの核抽出物を用いてゲルシフト解析を行うと、主に2種類の移動度の遅れるバンドが観察される。このうち、移動度の小さいバンド1を形成する因子（バンド1形成因子）はほとんど全ての断片に結合したが、移動度の大きいバンド3を形成する因子（バンド3形成因子）はある特定の断片にしか結合できず (Fig.3-1)、この領域は第2章で示したトランスジェニックタバコ種子での転写量を調節する領域と重複していた (Fig.3-3)。このことからこれら因子がWCI-3遺伝子の発現に何らかの役割を担っている可能性

が考えられた。これらの因子の正体を明らかにするには、これらをコードする遺伝子をクローニングし、更なる解析を行う必要があると考えた。そこで本章においては、バンド3形成因子を構成するDNA結合タンパク質をコードする遺伝子をクローニングするために、シカクマメのcDNA発現ライブラリーより、WCI-3遺伝子プロモーターに結合するタンパク質をコードするcDNAのクローニングを、サウス-ウェスタン法 (Singh et al., 1988) により行った。サウス-ウェスタン法は、cDNAを発現ベクターに組み込み大腸菌を用いてタンパク質を発現させ、ラベルした目的のDNAをプローブに結合タンパク質をコードするcDNAクローンを単離する方法である。この方法では、リン酸化などの修飾により結合活性を持つタンパク質や、他の因子を必要とするタンパク質 (例えばヘテロダイマーとしてしかDNAに結合できないもの) については理論上クローン化ができないという限界はあるものの、DNA結合タンパク質をその機能によりクローン化するために現在最も一般的な方法である。

2 WCI-3遺伝子プロモーター断片に結合するシカクマメ葉cDNAの単離

2-1 実験材料および方法

2-1-1 シカクマメ葉の全RNAの抽出

シカクマメ葉の全RNAの抽出はグアニジウムチオシアネート法 (Cox and Goldberg, 1988) により行った。

2-1-2 ポリ(A)RNAの単離

全RNAからのポリ(A)RNAの単離はオリゴd(T)セルロース (Pharmacia) を用いて、Sambrookら (1989) の方法に従って行った。この場合、poly(A)RNAの収率は全RNAの約1%であった。

2-1-3 cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーの作製はZAP cDNA合成キット (Stratagene) を用い、その説明書に従った。以下にその概略を示す。5 μ gのpoly(A)RNAを用いてcDNAのfirst strand合成をモロニー白血病ウィルスの逆転写酵素を用いて行う。次に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 存在下でDNAポリメラーゼIによりcDNAのsecond strand合成を行う。フェノール処理およびエタノール沈殿を行いクレノウ酵素により平滑末端化する。再びフェノール処理およびエタノール沈殿を行い、EcoRIアダプターをT4 DNA 連結酵素を用いて連結させる。70°Cで酵素を失活させ、T4ポリヌクレオチドリン酸化酵素を用いて5'末端をリン酸化する。酵素を70°Cで失活させ、XhoIでcDNAの3'末端を消化し、Sephacryl S-

400を用いてアダプターを除く。フェノール処理およびエタノール沈殿を行い、適量のdH₂Oに溶解する。この結果、2.1 μgのcDNAが得られた。

得られたcDNAを、*EcoRI*と*XhoI*で消化したUni-ZAP XRベクターに連結し、ギガパックゴールドを用いてパッケージングした。この結果、8.3x10⁷のライブラリーが作製できた。

2-1-4 サウス-ウェスタン法によるcDNAライブラリーのスクリーニング

サウス-ウェスタン法によるスクリーニングはAusubelら(1987)の方法とLelongら(1989)の方法を組み合わせで行った。以下にその概略を示す。WCI-3b遺伝子のA'断片(-223bp~-66bp)がpGEM-3Zf(+)の*HincII*部位に導入されたプラスミド(Habu et al., 1993)を*EcoRI*および*HindIII*で消化し、アガロース電気泳動した後、Qiaex (Qiagen)によりA'断片を精製した。この断片をニクトランスレーションキット(宝酒造)を用いて[α-³²P]dCTP (Amersham)で標識(>10⁸cpm/μgDNA)した後、Sephadex G-50を用いて精製し、プローブとした。大腸菌XL-1 blue MRF'(Stratagene)を、0.2%マルトース、10mM MgSO₄を含むLB培地2mlで一夜30°Cで培養した後、新しい2mlの培地に0.5ml移し、37°Cで4時間培養する。遠心で集菌し、OD₆₀₀=0.5となるように10mM MgSO₄で希釈する。この大腸菌200 μlにライブラリー10 μl (10⁴ pfu)を加え、37°Cで15分間保温する。48°Cに保温しておいた上層寒天(0.7%のアガロースH14(宝酒造)を含むNZY培地)を2.5ml加え、1.5%寒天を含むNZYプレート(φ10cm)にまく。室温に10分放置した後、42°Cで2.5-3時間培養する。小さなプラークが見え始めたら、予め10mM IPTGに30分浸し、十分に乾燥させておいたBA85ニトロセルロース膜(Schleicher and Schuell)を静かに乗せ、37°Cで一晩培養する。低温室にプレートを移して十分に冷やした後、膜をブロッキング溶液(10mM Tris-Cl pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA·2Na pH8.0, 5% スキムミルク(Difco))に移して室温で1時間穏やかに振とうする。ハイブリダイゼーション溶液(10mM Tris-Cl pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA·2Na pH8.0, 1xデンハルト溶液(0.02% (w/v) フィコール400, 0.02% (w/v) ポリビニルピロリドン, 0.02% (w/v) 牛血清アルブミン), 50 μg/ml変性ニシン精子DNA, 10⁶cpm/mlプローブ)をポリエチレンバッグに加え、膜を入れて気泡が入らないようにシールし、25°Cで1時間保温する。十分量の洗浄緩衝液(10mM Tris-Cl pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA·2Na pH8.0, 1xデンハルト溶液)による10分間の洗浄を4回繰り返す。膜を乾燥させた後、BAS2000(富士フィルム)による解析もしくはオートラジオグラフィーを行った。陽性を示したクローンに対して2次スクリーニングを行い、再度陽性を示した単一プラークをSM緩衝液(1リットル当たり:5.8g NaCl, 2.0g MgSO₄·7H₂O, 50ml 1M Tris-Cl pH7.5, 0.01%(w/v)ゼラチン)に懸濁し、その上清を以後の解析に用いた。

2-1-5 得られたcDNAクローンの結合特異性の解析

第3章2-1-4で述べた感染用大腸菌XL-1 blue MRF' 200 μ lに上層寒天を加えNZYプレートにまく。上層寒天が固まったら10 μ l(100pfu) のファージクローンをスポットする。その後は第3章2-1-4と同様に行った。非特異的DNA結合タンパク質 (B9タンパク質) をコードするファージクローンはニューヨーク大学Corruzi博士より分与を受けた。宿主大腸菌としてはY1090 *hsd*'を用いた。プローブおよび競合体に用いたB断片 (-478bp~-243bp)、E'断片 (-882bp~-623bp) はA'断片と同様に調製した。競合実験に際しては、プローブの100倍量のモル数の標識していないA'、B、E'断片を競合体として、標識したA'断片を含むハイブリダイゼーション溶液に加えた。

2-2 結果

当初、シカクマメの開花後35日目の種子より調製したcDNAライブラリー約100万個を用いてスクリーニングを行ったが、陽性クローンは得られなかった。そこで同じくバンド1、3形成因子の存在する葉よりcDNAライブラリーを調製し、A'断片を用いてスクリーニングを行った。この断片はバンド1、3形成因子の詳細な解析に用いられているプロモーター断片であり、ゲルシフト解析においてバンド1、3を形成する (Habu et al., 1993)。約100万個のクローンをスクリーニングしたところ、1個の陽性クローンを得たので、このクローンの結合特異性を解析した。バンド3形成因子はWCI-3遺伝子プロモーターのA'、E'断片に結合するがB断片には結合しない (Habu et al., 1993; 深澤, 未発表データ)。そこで、これら3つの断片をプローブに用いてサウス-ウェスタン解析を行った。この解析の場合、ハイブリダイゼーションをプローブ別に分けて行うので、内部標準として非特異的DNA結合タンパク質であるB9タンパク質に対する結合実験を同時に行った。陽性クローンは、バンド3形成因子と同様に、A'およびE'断片には結合したがB断片にはほとんど結合しなかった。それに対してB9タンパク質はどのプローブにも結合した (Fig.3-4 a)。同様の結果はこれら断片を競合体として用いたときにも見られた。A'断片をプローブとして用い、競合体として、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識をしていないA'、B、E'断片をプローブの100倍のモル数加えた。その結果、A'、E'断片を競合体として加えたときには結合反応は強く阻害されたが、B断片を用いたときには結合阻害はほとんど見られなかった。それに対してB9タンパク質はどの競合体を加えても結合反応の阻害は起こらなかった (Fig.3-4 b)。以上の結果から、このクローンは特異的なDNA結合能を持ち、その特異性はバンド3形成因子と同様であることが示された。

3 cDNAの塩基配列の決定

3-1 実験材料および方法

3-1-1 cDNAのサブクローニング

cDNAライブラリーの作製に際してベクターとして使用したUni-ZAP XR ベクターはf1ファージの複製起点を持ち、ヘルパーファージを感染させることにより、挿入cDNA断片を含んだプラスミド pBluescript SK(-)に変換することが出来る。大腸菌XL-1 Blue MRF'をLB培地でOD₆₀₀=0.5になるまで培養し、遠心で集菌した後、OD₆₀₀=1.0になるように10mM MgSO₄に懸濁する。このうち250 μlに250 μlの挿入cDNA断片を持つファージクローン (2000-3000pfu/μl) と1 μlの ExAssist ヘルパーファージ (>1000pfu/μl) を加えて37°Cで15分保温する。3mlのLB培地を加えて3時間37°Cで振とう培養する。2000xgで15分遠心し、上清を回収する。70°Cで15分保温することにより大腸菌を死滅させ、4000xg、4°Cで15分間遠心する。上清を回収し、10-100 μlを200 μlの大腸菌SOLR (OD₆₀₀=1.0) に加えて37°Cで15分間保温する。このうち50 μlをアンピシリン (50 μg/ml) を含むLB寒天培地にまき、37°Cで一晩培養する。得られたコロニーからSambrookら (1989)の方法に従い、プラスミドを調製した。

3-1-2 塩基配列解析用プラスミドの構築と塩基配列の決定

cDNAを含むpBluescript SK(-)をSacIとBamHIで消化し、キロシーケンスディリジョンキットを用いて様々な長さを持つクローンを作製した。逆鎖を読むためのプラスミドは、cDNAを含むpBluescript SK(-)をKpnIとBamHIで消化し、pGEM-7zf(+)にサブクローニングし、ApaIとSphIで消化した後、同様に欠失させた。これらプラスミドからSambrookら (1989)の方法に従い一本鎖DNAを調製し、第1章2-1-2と同様に塩基配列の決定を行った。このcDNAがコードするアミノ酸配列と相同性を持つタンパク質のデータベースからの検索には、Blastプログラム (Altschul et al., 1990) を用いた。

3-2 結果

3-2-1 塩基配列の決定と予想されるアミノ酸配列の解析

塩基配列の解析結果を (Fig.3-5)に示す。このcDNAは1937bpの長さを持っていた。また、ベクターのlacZのリーダー配列とin-frameになるようなORFのうち、最長のORFはインサートの1番目の塩基から1427bpまで続いていた。1番目のコドンはATGではないため、全長を持ったcDNAではないと考えられる。この最長のORFは475アミノ酸をコードしており、推定分子量は52kDaであった。このアミノ酸配列を用いてデータベースを検索したところ、4つの植物由来のホメオドメインを持つタンパク質

と部分的に高い相同性を持つことがわかった (Fig.3-6)。HAT3.1 (Schindler et al., 1993) は、*Nicotiana plumbaginifolia* の *cab-E* 遺伝子のプロモーターに存在するボックス7に結合する因子として、アラビドプシスのcDNAライブラリーより得られている。Zmhox1a (Bellmann and Werr, 1992) は、トウモロコシのショ糖合成酵素である *Shrunken* 遺伝子プロモーターに存在する26bpのフィードバックエレメントに結合する因子として、トウモロコシの根のcDNAライブラリーより得られている。PRHPとPRHA (Korfhage et al., 1994) は、パセリの病原抵抗性遺伝子である *pr2* 遺伝子のプロモーターに存在する転写活性に重要な125bpの領域に結合する因子として、病原処理したパセリとアラビドプシスの培養細胞のcDNAライブラリーよりそれぞれ得られている。

ホメオドメインは、ショウジョウバエの形態形成に関わる遺伝子に共通して存在するホメオボックスがコードするDNA結合ドメインである (Ottinger et al., 1990)。3つの α -ヘリックスがループとターンでつながっており、第3のヘリックスがDNAのメジャーグループにはまりこむ形で結合する (Lewin, 1994)。本研究で得られたcDNAクローンはホメオドメインのコンセンサス配列をよく保存しており (Fig.3-7)、ホメオドメインを持つタンパク質であると考えられる。シカクマメでホメオドメインを持つタンパク質は現在までに報告されていない。本研究で得られたcDNAがコードするタンパク質をシカクマメホメオドメインタンパク質 (winged bean homeodomain protein, 以下WBHD1と略す) と命名した。WBHD1とHAT3.1、Zmhox1a、PRHPおよびPRHAのホメオドメイン (領域4) (Fig.3-6,7) はアミノ酸レベルでそれぞれ51%、53%、58%、34%の相同性を示した。HAT3.1は現在までに得られているアラビドプシスのホメオタンパク質と異なり、ロイシンジッパー構造を持たないが、WBHD1もロイシンジッパー構造を持たなかった。またPRHPもロイシンジッパーを持たないことから、この3つのホメオドメインは現在までに植物で得られているロイシンジッパー構造を持つホメオドメインタンパク質とは異なるグループに属すると考えられる。

これら4つのホメオドメインタンパク質は、いずれもそのN-末端にシステインに富む領域が存在した (領域1) (Fig.3-6,7)。この領域を比較すると、それぞれのタンパク質においてシステイン残基とヒスチジン残基の位置が保存されていた。この領域はPHDフィンガー (plant homeodomain finger) と呼ばれ (Schindler et al., 1993)、その構造から金属を結合するドメインであると考えられている。PHDフィンガーによる予想される亜鉛イオンの結合様式を示した (Fig.3-8)。この領域の機能は不明であるが、おそらくタンパク質同士の相互作用に関与していると考えられている。この領域におけるWBHD1とHAT3.1、Zmhox1a、PRHPおよびPRHAとのアミノ酸レベルの相同性はそれぞれ56%、62%、58%、47%であった。WBHD1とHAT3.1、Zmhox1a、PRHPにはこれら領域以外に、相同性の高い領域が存在した (領域2,3) (Fig.3-6)。領域2は

セリン残基とアスパラギン酸残基に富む酸性領域であった。また、領域3は"LDYKKL"という保存配列を含んでいたがその機能は不明である。以上の結果から、今回得られたcDNAクローンは完全長ではなかったが、ホメオドメインとPHDフィンガーと呼ばれる金属結合モチーフを持つタンパク質WBHD1をコードしていることが明らかとなった。

4 WBHD1をコードする遺伝子のシカクマメゲノムにおける構成と葉における発現

4-1 実験材料および方法

4-1-1 シカクマメゲノムのサザン解析

第1章3-1-3で述べた方法により、シカクマメ葉よりゲノムDNAを抽出し、Sambrookら(1989)の方法に従い臭化エチジウム-塩化セシウム平衡密度勾配遠心を行いDNAを精製した。得られたDNA5 μ gをEcoRIあるいはHindIIIで完全分解し、0.8%(W/V)アガロース電気泳動で分画する。Sambrookら(1989)の方法に従い、ゲルを酸およびアルカリ処理した後、ナイロン膜(Zeta-probe, BioRad)に転写する。風乾した後、XL-1000UVクロスリンカー(Spectronics)を用いてDNAを膜に固定した。0.1xSSC(1xSSC:0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム)、0.5%SDS溶液中で65 $^{\circ}$ C、30分振とうしてゲルかすなどの汚れを除いた後、プレハイブリダイゼーション溶液(4xSSPE(1xSSPE溶液:0.18M NaCl, 10mM リン酸緩衝液 pH7.4, 1mM EDTA \cdot 2Na), 10xデンハルト溶液, 50%フォルムアミド, 1%SDS, 0.5mg/ml 変性ニシン精子DNA)中で2時間以上42 $^{\circ}$ Cで保温する。

Bluescript SK(-)にサブクローニングしたWBHD1 cDNAをKpnIおよびBamHIで消化して切り出し、GeneCleanキット(Bio 101)により精製し、マルチプライムDNA標識キット(Amersham)により $[\alpha$ - 32 P]dCTPで標識した後、Sephadex G-50により精製し、プローブとした。

膜をハイブリダイゼーション溶液(4xSSPE、2xデンハルト溶液、50%フォルムアミド、1%SDS、0.1mg/ml変性ニシン精子DNA、 10^6 cpm/ml変性プローブ)に移し、42 $^{\circ}$ Cで16-24時間保温した。膜を2xSSC、0.1%SDS溶液で室温1時間、0.1xSSC、0.1%SDS溶液で室温30分、55 $^{\circ}$ C30分で洗浄した後、オートラジオグラムを行った。

4-1-2 シカクマメ葉におけるWBHD1 mRNAの蓄積

シカクマメ葉の全RNAの抽出にはIsogen(ニッポンジーン)を用いた。

4-2 結果

4-2-1 WBHD1遺伝子のシカクマメゲノムにおける構成

シカクマメゲノムをEcoRIおよびHindIIIで消化し、WBHD1 cDNAをプローブにサザン解析を行ったところ、いずれの場合にも2本のバンドが観察された (Fig.3-9 a)。ここで用いたハイブリダイゼーションの条件はプローブと高い相同性を示すDNAを検出する場合に用いられること (Ausubel et al., 1987)、および得られたシグナル強度がどのバンドにおいても均一であったことから、これらバンドはWBHD1をコードする遺伝子由来であると考えられる。EcoRIおよびHindIII切断部位がWBHD1遺伝子内に存在する場合には遺伝子が1コピーの場合にも2本のバンドが観察されることになる。このことから、WBHD1遺伝子は1-2コピーで存在すると考えられる。遺伝子が縦列して存在している場合には2コピー以上でもこのような結果が得られると考えられるが、いずれにしてもWBHD1遺伝子は少ないコピー数で存在していると考えられる。

4-2-2 WBHD1遺伝子の葉における発現のmRNAレベルでの解析

WBHD1遺伝子のシカクマメの葉における発現をmRNAレベルで解析した。葉においては約2.5kbのところにシグナルが得られた (Fig.3-9B)。このことはWBHD1遺伝子のmRNAは約2.5kbの長さを持っていることを示している。今回得られたWBHD1 cDNAクローンは5'末端が不完全であったが、この結果から、WBHD1の完全長cDNAクローンはさらに500-600bpが5'末端に加わると考えられ、全体で分子量は約70kDaと推定される。また、より分子量の大きい位置にもバンドが観察された。今回用いた葉の全RNAはIsogenを用いて抽出したものであるが、このサンプルにはゲノムDNAが混入していた (データは示さない)。このゲノムDNAの電気泳動上の移動度とこのシグナルの位置が一致したことから、このシグナルはゲノムDNA由来であると考えられる。

5 考察

当初、シカクマメの開花後35日目の種子より調製したcDNAライブラリーを用いて約100万個のプラークをスクリーニングしたが、陽性クローンは得られなかった。この時期の種子には多量の種子貯蔵タンパク質遺伝子のmRNAの蓄積が起こっているため、実際にスクリーニングしたプラークの大半は種子貯蔵タンパク質のcDNAクローンであった可能性が考えられる。また、葉と種子のcDNAの鎖長を比較したところ、葉に比べて種子のcDNAは十分に伸長していなかった (データは省略)。このことはタンパク質の機能によりスクリーニングを行うサウス-ウェスタン法では問題になってくる。すなわち、DNA結合ドメインまで伸長が行われていないcDNAクローンは、

スクリーニングでは陽性を示さないことになる。バンド1およびバンド3形成因子は葉にも存在するため、葉のcDNAライブラリーでのスクリーニングを引き続き行ったところ、WCI-3遺伝子プロモーターに結合するタンパク質WBHD1をコードするcDNAクローンを得た。

このクローンはWCI-3遺伝子プロモーターのA'およびE'断片には結合するが、B断片には結合しないというバンド3形成因子と同様の結合特異性を持っていた。このcDNAクローンは完全長ではなかったが、葉のノザン解析から、mRNAの全長は約2.5kbであることが示された。この長さから推定されるWBHD1の分子量は約70kDaである。また、75kDaのDNA結合タンパク質がバンド3形成因子を構成する可能性が示唆されている（深澤、未発表データ）。以上より、WBHD1はバンド3形成因子を構成するタンパク質であると考えられる。

WBHD1はホメオドメインを持つことから、このドメインがDNA結合に関わっていると考えられる。このホメオドメインのアミノ酸配列と高い相同性を示すホメオドメインタンパク質が4つ（HAT3.1、Zmhox1a、PRHPおよびPRHA）報告されている。これらはPHDフィンガーと呼ばれるシステイン残基に富む領域がN-末端に存在するという共通した特徴を持ち、現在までに得られている他の植物ホメオドメインタンパク質とは異なっていた。植物種を越えてこのような保存領域が存在することから、このPHDフィンガーはこれらタンパク質の機能にとって重要な役割を果たしていることが考えられる。金属を結合するドメインとしてはDNA結合ドメインであるジンクフィンガーが詳細に解析されており、システイン残基に富み、金属を結合し得るドメインはDNA結合に働くと考えられている。一方、動物においてもホメオドメインと、LIMドメインというZnを結合するドメインを併せ持つ転写活性化因子が報告されている（Crawford et al., 1994）。最近、LIMドメインがタンパク質同士の相互作用に重要であることが報告された（Schmeichel and Beckerle, 1994）。他の植物ホメオドメインタンパク質およびZmhox1a、PRHAはホメオドメインのC-末端側にロイシンジッパー構造を持ち、ホモあるいはヘテロダイマーを形成し得る構造となっているが、WBHD1、HAT3.1、PRHPはロイシンジッパー構造を持たない。HAT.3はホメオドメインのみでは結合活性を示さない（Schindler et al., 1993）ことから、PHDフィンガーがDNA結合に関与していることも予想されるが、Zmhox1a、PRHPはPHDフィンガーを欠失させてもDNA結合活性を持っている（Bellmann and Wolfgang, 1992; Korfhage et al., 1994）。以上のことを考えあわせると、PHDフィンガーはDNA結合以外の機能、たとえばタンパク質同士の相互作用を持つことも考えられる。

WBHD1 cDNAをサブクローンしたプラスミドを用いて、WBHD1を大腸菌で大量発現させると約70kDaの分子量のタンパク質が誘導されてくる（データは省略）。これは、今回得られたcDNAがコードすると予想されるタンパク質の分子量よりも大き

いが、SDS-PAGE法による分子量の測定はアミノ酸組成や用いる緩衝液の種類、試料の処理により影響を受けるためと考えられる (Terada, 1989)。このタンパク質をSDS-PAGEで分画し、ニトロセルロース膜に転写し、A'断片を用いてサウス-ウェスタン解析を行うとDNA結合活性を示すが、ゲルシフト解析ではDNA結合活性が検出されない (データは省略)。同様の現象はHAT.3においても報告されている (Schindler et al., 1993)。原因は不明だが、おそらくDNA結合活性が強くないために、ゲルシフト解析の条件では結合状態を維持できないためと思われる。シカクマメの核抽出物に見られるバンド3形成因子は、1000kDaを越すタンパク質複合体を形成している可能性があることが示唆されている (深澤、未発表データ)。WBHD1はバンド3形成因子を構成していると考えられるが、シカクマメ核内においては複合体を形成している他のタンパク質がWBHD1のDNAへの結合を安定化しているのかもしれない。PHDフィンガーはこのようなタンパク質との相互作用に必要なのかもしれない。今回得たWBHD1 cDNAクローンはPHDフィンガーが一部欠けている (Fig.3-5)。このPHDフィンガーがホメオドメインとともにDNAへの結合に関わっている可能性も考えられる。この問題を明らかにするためには、WBHD1 cDNAの全長を持つcDNAクローンを得ることが必要である。

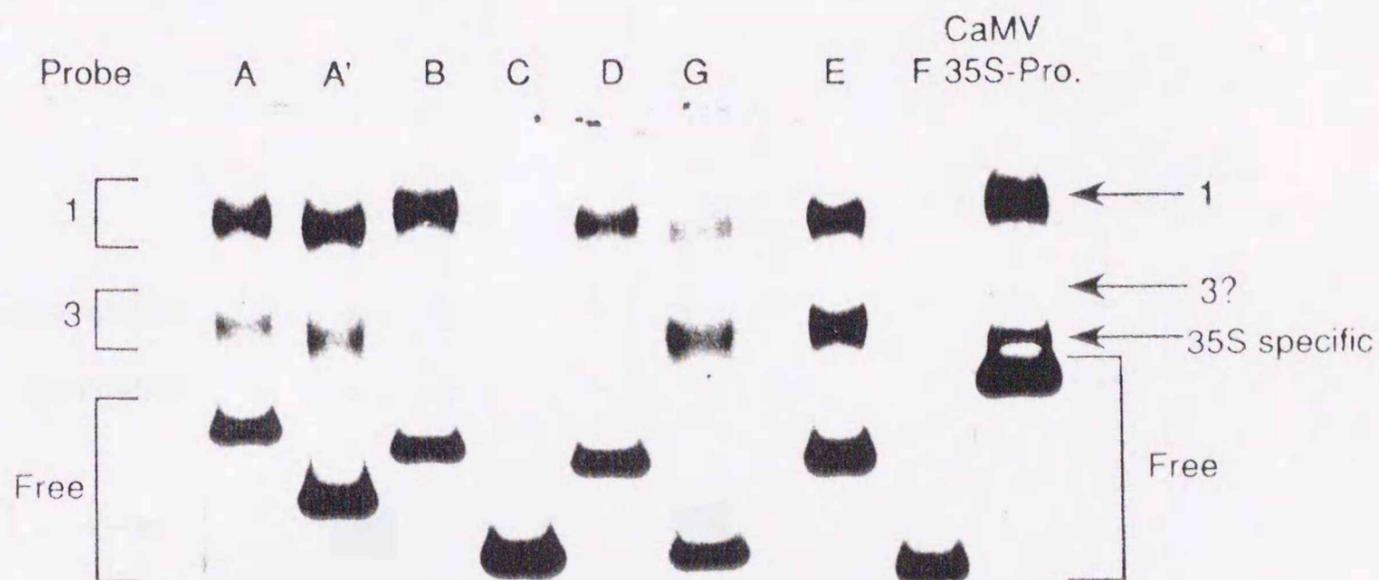
WBHD1はWCI-3遺伝子の転写制御因子なのだろうか。WBHD1はWCI-3遺伝子の種子における時期特異的な転写の活性化に必要な領域 (-882bp~-623bp) に結合することから、転写の活性化因子である可能性がある。PRHPは、パセリの培養細胞プロトプラストを用いた一過的発現系において、*pr2*遺伝子のエリシターによる発現誘導に重要な11bpのシスエレメントを認識する。一方、*Zmhox1a*は、トウモロコシ*Sh*遺伝子のフィードバック制御のシスエレメントに結合することから転写抑制因子である可能性が考えられる。HAT3は、DNAの長さ (>200bp) を認識して結合する (Schindler et al., 1993)。このように、保存されたドメインを持つにも関わらず、その機能は個々に異なっていると考えられる。おそらく、これら因子の機能はそれと相互作用する他の因子との組み合わせで決まるのだろう。最近になって、2種類のHMGドメインを持つDNA結合タンパク質が、インターフェロン- β 遺伝子の転写制御因子NF- κ Bが転写活性化因子として働くか、転写抑制因子として働くかを決定していることが報告された (Lehming et al., 1994)。このような機構がWCI-3遺伝子の転写においても起こっているのだろうか。-882bp~-623bpの領域はRY配列が存在する時にのみ時期特異的な転写の活性化を誘導することが示されたが、ソラマメの種子タンパク質遺伝子であるUSP遺伝子の場合、RY配列は転写の抑制に関与している (Fiedler et al., 1993)。以上のことは、RY配列を認識する転写因子は他の転写因子によって転写の活性化に働くか、抑制に働くかが決定されている可能性を示す。現在まで、RY配列を認識し結合するDNA結合タンパク質は報告されていない。このこと

は、RY配列結合タンパク質は単独ではDNAに結合出来ないため、短いDNA断片を用いる従来のゲルシフト法やサウス-ウエスタン法では検出できないのかもしれない。WBHD1が \approx -882bp \sim -623bpの領域による転写活性化に関与しているならば、この因子はRY配列結合タンパク質と相互作用している可能性が考えられる。WBHD1を用いたウエスト-ウエスタン解析によりRY配列結合タンパク質をクローニングする事が可能かもしれない。



Fig. 1. Schematic diagram of the WCI-3a gene 5' region. The region between -1100 and -30 bp upstream of the start site of the WCI-3a gene was amplified by PCR. The region was digested by EcoRV and the fragments were separated by agarose gel electrophoresis. The fragments were labeled and used for EMSA. The binding of WCI-3a protein to the fragments was analyzed by EMSA. The results are shown in Fig. 2. The WCI-3a protein binds to the region between -882 and -623 bp upstream of the start site of the WCI-3a gene. A region was amplified by PCR (from Miyata et al., 1994).

(A)



(B)

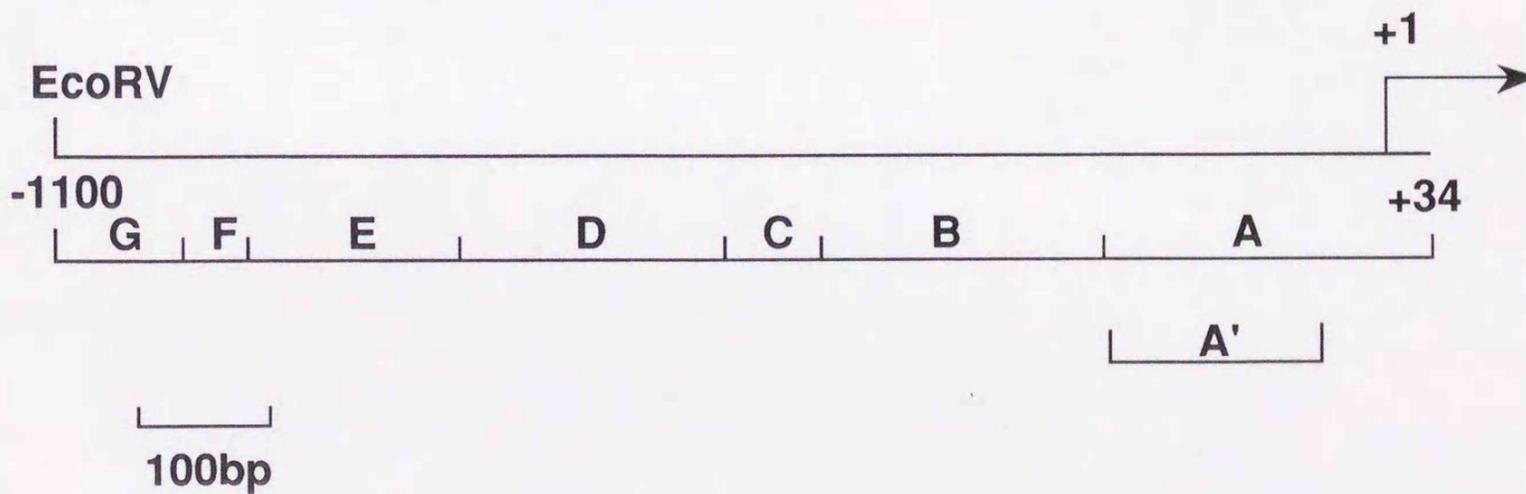


Fig.3-1 Gel shift analysis of WCI-3a gene independent probes with nuclear extract from mid-maturation stage seeds. (A) Each probe from WCI-3a gene upstream region was separately labeled and analyzed their bindings with 35 DAF seed nuclear extracts. 1, 3: retarded bands, Free: free probes. (B) Schematic figure of WCI-3a gene upstream region. WCI-3a gene promoter region was digested by various restriction endonucleases. A' region was amplified by PCR. (from Habu et al., 1993)

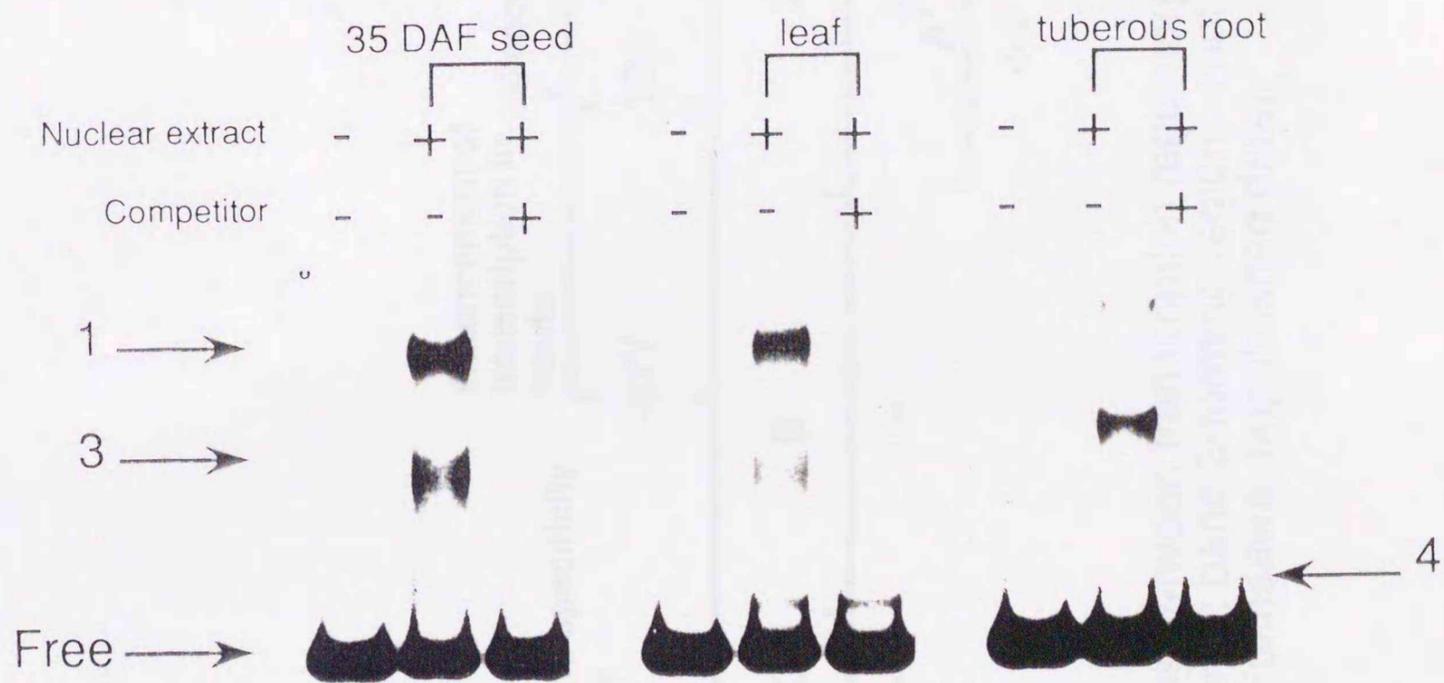


Fig.3-2 Gel shift assay of nuclear extracts prepared from various organs of a winged bean plant. Labeled A' probe was incubated with nuclear extracts prepared from seeds of 35 DAF, leaf, or tuberous root. Competition assays were performed with 100-fold molar excess of unlabeled A' probe. (from Habu et al., 1993)

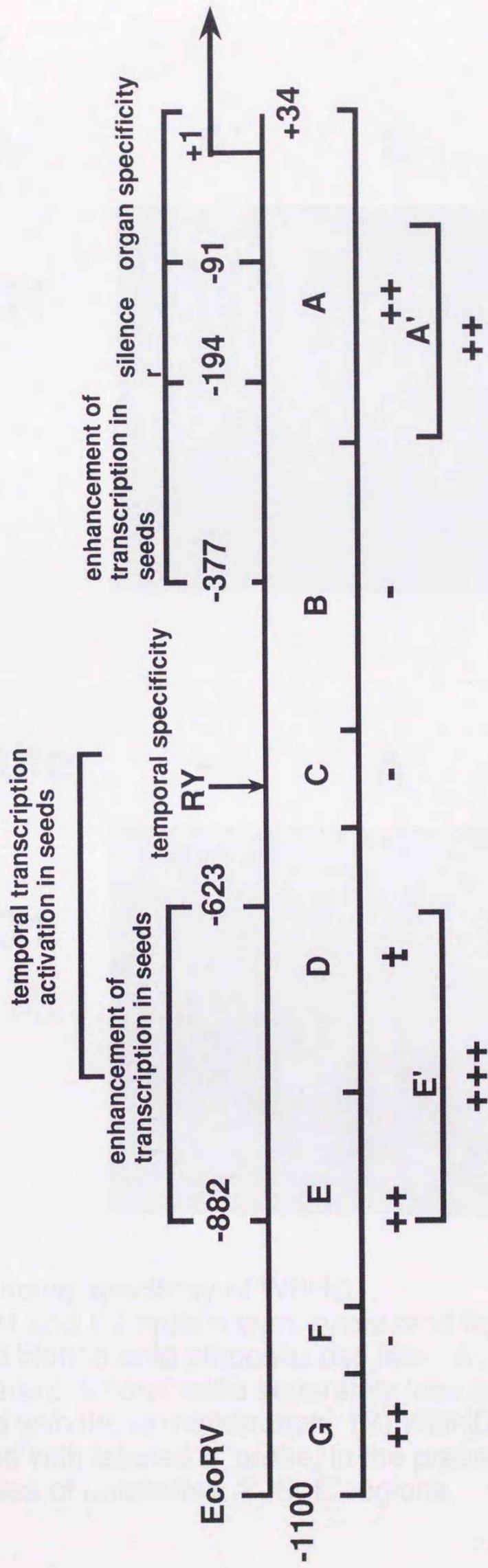
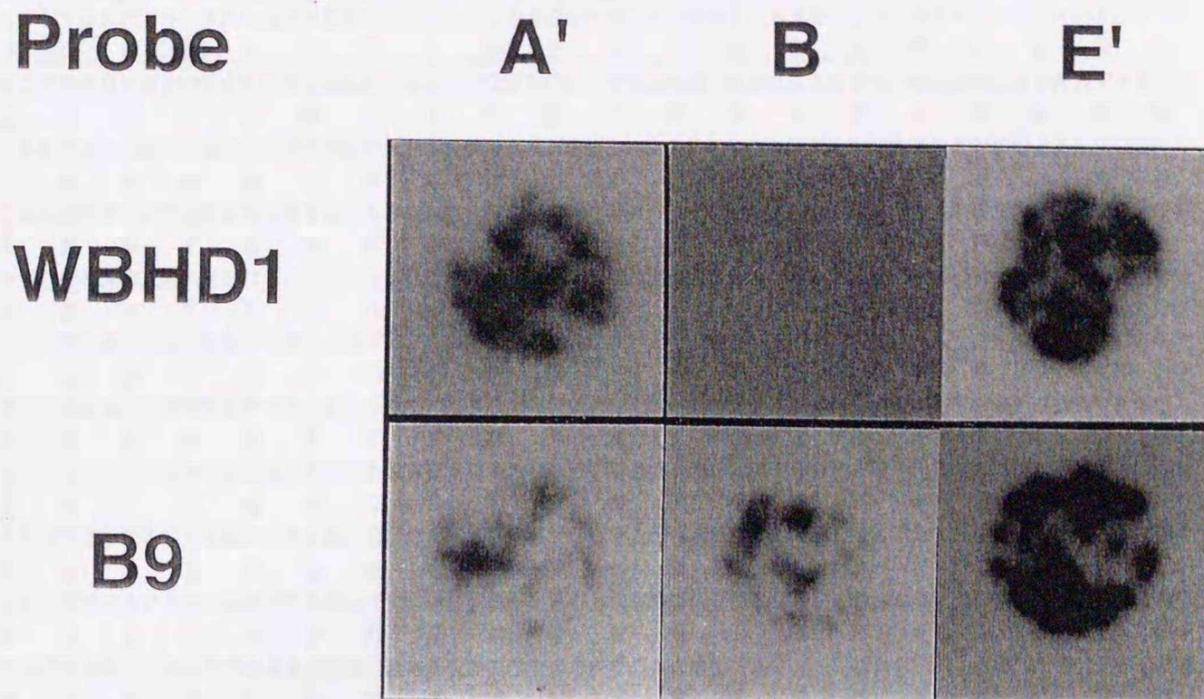


Fig.3-3 Schematic representation of correlations between transcription regulatory regions and band 3-forming regions of WCI-3 gene promoter. +: band 3-forming region, -: not band 3-forming region. E' region also forms band3 (Fukasawa, unpublished data).

(A)



(B)

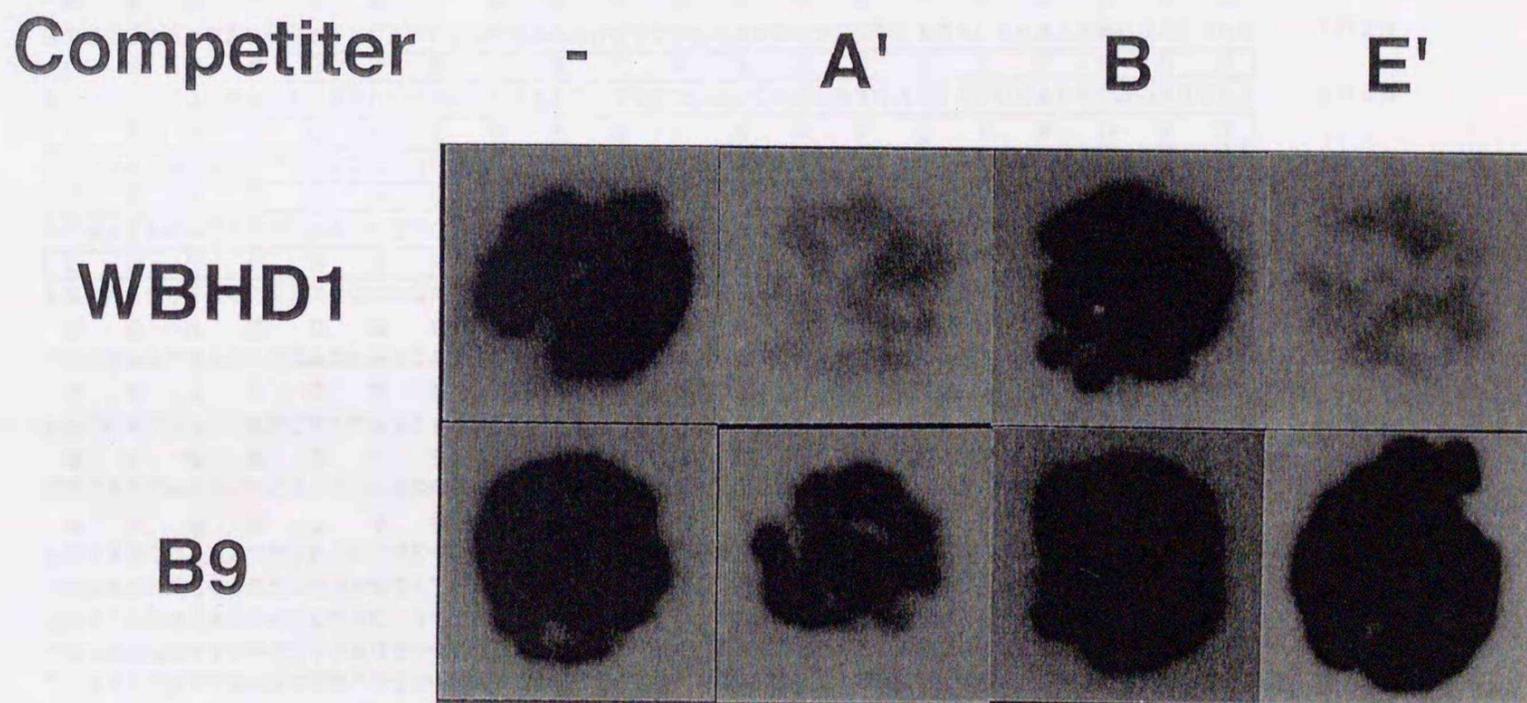


Fig.3-4 Binding specificity of WBHD1.

(A) WBHD1 and B9 protein were expressed from the phage clones and blotted onto nitrocellulose filter. A', B, E' regions of WCI-3b gene promoter were separately labeled and then hybridized with these membranes. (B) WBHD1 and B9 proteins were bound with labeled A' probe, in the presence of 100-fold molar excess of unlabelled A', B, E' regions.

CTGATAATGATATAATTCTCTGTGATGGTGTGTTTGTGACCGTGGATTTTCATCAGCTCTGTT	60
<u>D N D I I L C D G V C D R G F H Q L C</u>	
TGAATCCTCCGTTGTTAACTGAAGACATTCCACCTGGCGATGAGGGTTGGTTATGCCAG	120
<u>L N P P L L T E D I P P G D E G W L C P</u>	
GATGTGATTGCAAAGATGACTGCATGGACCTTGTTAACGAATCCTTTGGAATGAGTCTCT	180
<u>G C D C K D D C M D L V N E S F G M S L</u>	
CTCTTGGTGACTCCTGGGAGAGGGTCTTTCCTGAAGCAGCAACTGCTGGAAATAATATGG	240
<u>S L G D S W E R V F P E A A T A G N N M</u>	
ACAATAACATGGGACTTCCTTCTGATGATTCTGAAGATGATGATTATAATCCTAATGGTC	300
D N N M G L P S D D S E D D D Y N P N G	
CTGAGGATGTGGAAGTTGAAGGAGATGAGTCAAGTTCTGATGAATCCGAGTATGCTTCTG	360
P E D V E V E G D E S S S D E S E Y A S	
CTTCTGAGAAATTGGAGGGTTCCTCATGAGGATCAATATTTGGGCCTTCCATCTGAAGATT	420
A S E K L E G S H E D Q Y L G L P S E D	
CCGATGATGGTGATTATGATCCTAATGCTCCAGACGTTGACCATAAAGTCAATGAACAAA	480
S D D G D Y D P N A P D V D H K V N E Q	
GTTCAAGCTCTGATTTACGCTGACTCCGAGGATCTTGCACTGCAATTGAGGATAACA	540
S S S S D F T S D S E D L A A A I E D N	
CGTCTCCTGGACAGGATGGAGACATTAGATCTGCATCGTTGGATGATATTAAGTACTTGA	600
T S P G Q D G D I R S A S L D D I N Y L	
AAAGTTCTAGCAAACAAAAGTGCAAAGCTGGTAAGAAGCTATCTATGTCTGATGAACTGT	660
K S S S K Q K C K A G K K L S M S D E L	
CATCTTTACTAGAGCCAGATTCTGGCCAAGAGGGTTCTGCTCCTGTTTCTGGGAAAAGAC	720
S S L L E P D S G Q E G S A P V S G K R	
ATGTGGAAAGTTGGACTACAAAAAAGTATGAGGAGACATACCACAGTGATACCAGCG	780
H V E R L D Y K K L Y E E T Y H S D T S	
ATGATGAAGATTGGGCTTCCACTGCTGCTCCAAGTAGAAAAAAGAACTCACTGGCAATG	840
D D E D W A S T A A P S R K K K L T G N	
TGACTCCAGTGTACCAAATGGAAATGCTTCAAATAATTCTGTACATACTCCTAAGAGGA	900
V T P V S P N G N A S N N S V H T P K R	
ATGCCCATCAGATCAAAGTTGAAAATACGAATAATTCACCCACTAAATCAGCCGATGGCT	960
N A H Q I K V E N T N N S P T K S A D G	
GTGTGAAATATGGTTCCAGGGATAAAAAGTCTAGATCTTCGGCATACAAAAAACTAGGAG	1020
<u>C V K Y G S R D K K S R S S A Y K K L G</u>	
AAGCCGTAGTTTCAGAGACTTCACAAATCTTTAAGGAAAATCAGTATCCAGACAGAACCA	1080
<u>E A V V Q R L H K S F K E N Q Y P D R T</u>	
CAAAAGAAAGCTTGGCACAGGAAGTGGACTTACTTATCAACAGGTTACCAAATGGTTCG	1140
<u>T K E S L A Q E L G L T Y Q Q V T K W F</u>	
ACAATACACGTTGGAGCTTCCGACATTCATCACAAACCAATTCAGGTAGAAATGCTTAC	1200
<u>D N T R W S F R H S S Q T N S</u> G R N A S	
AGCAAGCTAGCGATGGCAGAGCTGAAAATGAGGGGAAGCAGGAATGTGAATTGAAGTCCC	1260
Q Q A S D G R A E N E G K Q E C E L K S	
CGGTGATCAGAGGAGAAAGATCGAAAACCTCAAGCTCGAGAAAAAGAAAACATTTGTCAG	1320
P V I R G E R S K T P S S R K R K H L S	
AACCTCAAGCATCTGTAACACAGCTGGATATCAATGGCTCAGCAACAAGTTCACCCAATT	1380
E P Q A S V T Q L D I N G S A T S S P N	
CTCATCAAACGCAAGTAGGCAATAAAATGAAGACTAGGAAAAGGAAATGATACATTATTG	1440
S H Q T Q V G N K M K T R K R K	
ATAAGTCAAATTTAACCTTTTCTAAGGCTTCGAATTAAGTATCCATCTTTTTGTGAGA	1500
TTGAGATCCCATGAGATGATCAGTTCGGATCTCGATGGATTTGTTTCCATTCAGGAAGGT	1560
AATCATGAAATGTGTGCCAGTGTGTAATTTTCAAATAGCTTTCCAGGCATTGATCCC	1620
TGGAGAGTTTGTGTTAGTGTGCCCCTCATGCAAACACTAAAAATAGTCAGTCATTAGCT	1680
TTAAATATTAGATTTTTTTTAAAAATTTTTTACAGACCCCATTCCTTGTTCAAATGATGT	1740
TTTTTCTCCTCTTAGGGGGGTTTACTAACAGTACAAAAAGAAAAGCGATGAAAATAG	1800
GGGAACAATTTATATTTGTACACCTCAGGATTCAATGTGCATATGTCATTACTGTATTAAC	1860
CTGCAGACGACCTTTGTAAATATAGCGGCTCATGTGTCTGACTGTTCAAAATCACAAACA	1920
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1937

Fig.3-5 Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of WBHD1 cDNA. The homeodomain and PHD finger are indicated by a box and underline, respectively. The conserved cysteine and histidine residues in PHD finger are shaded.

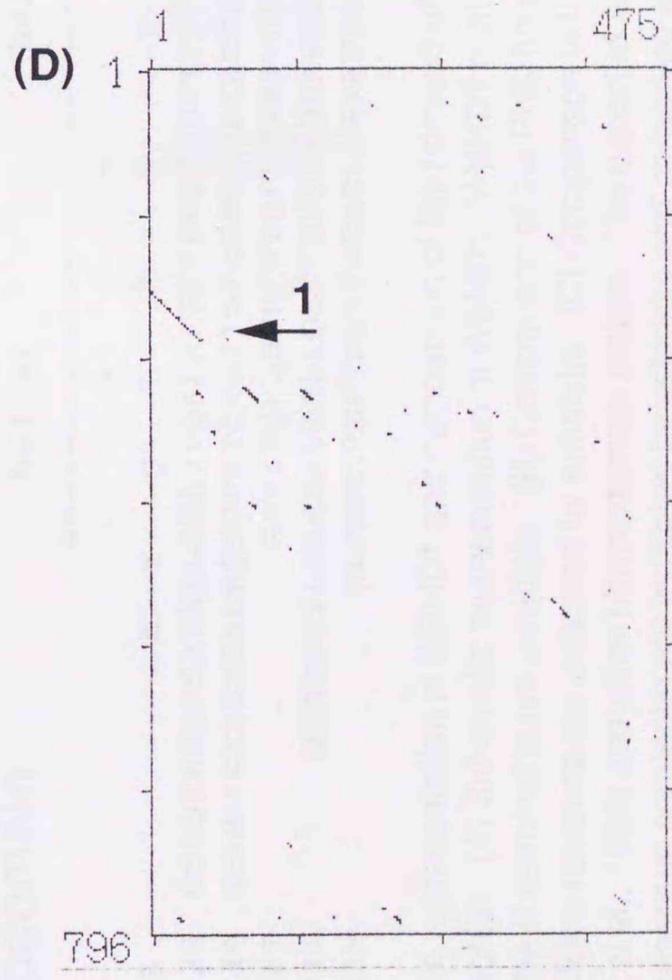
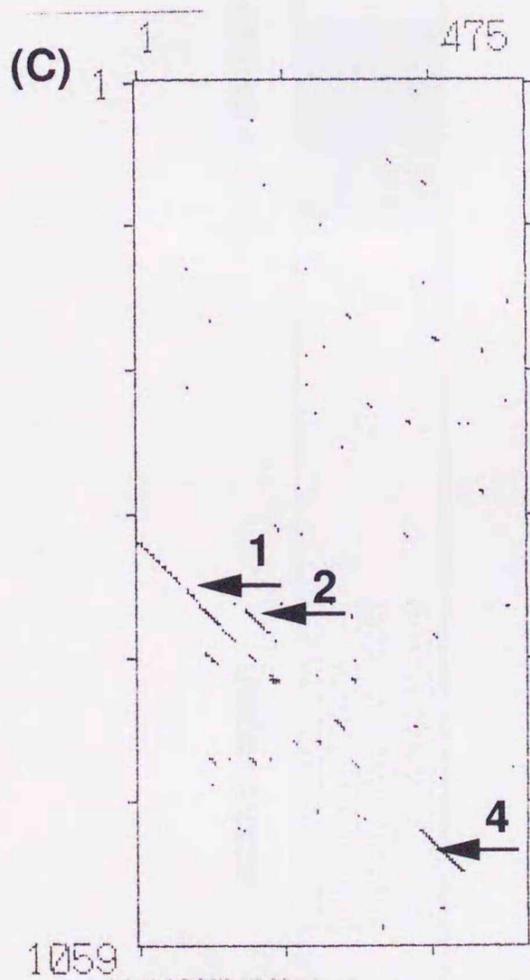
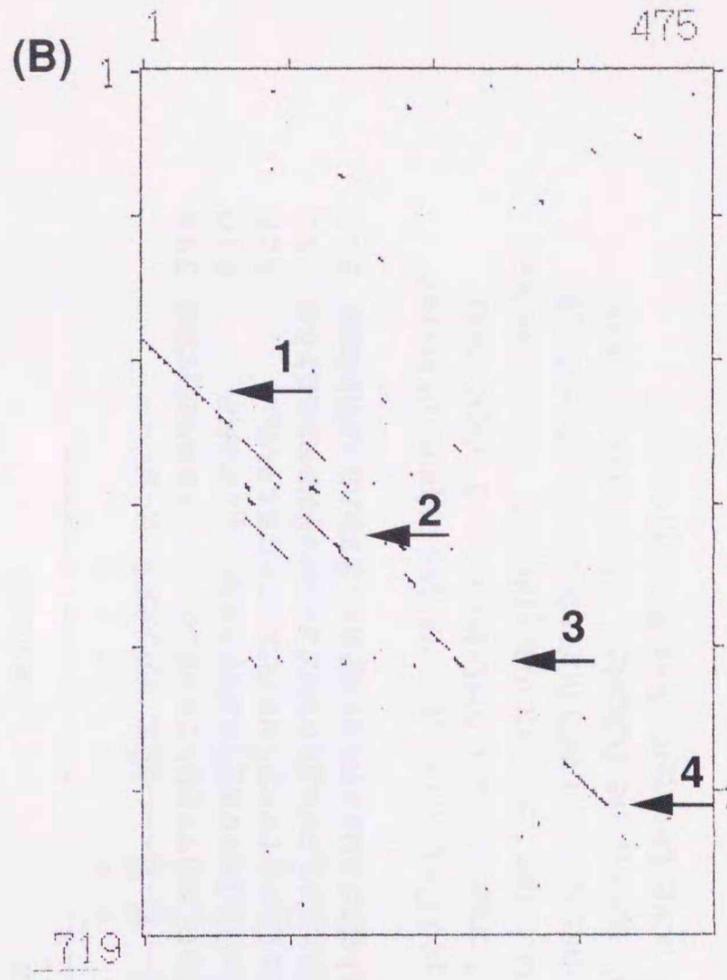
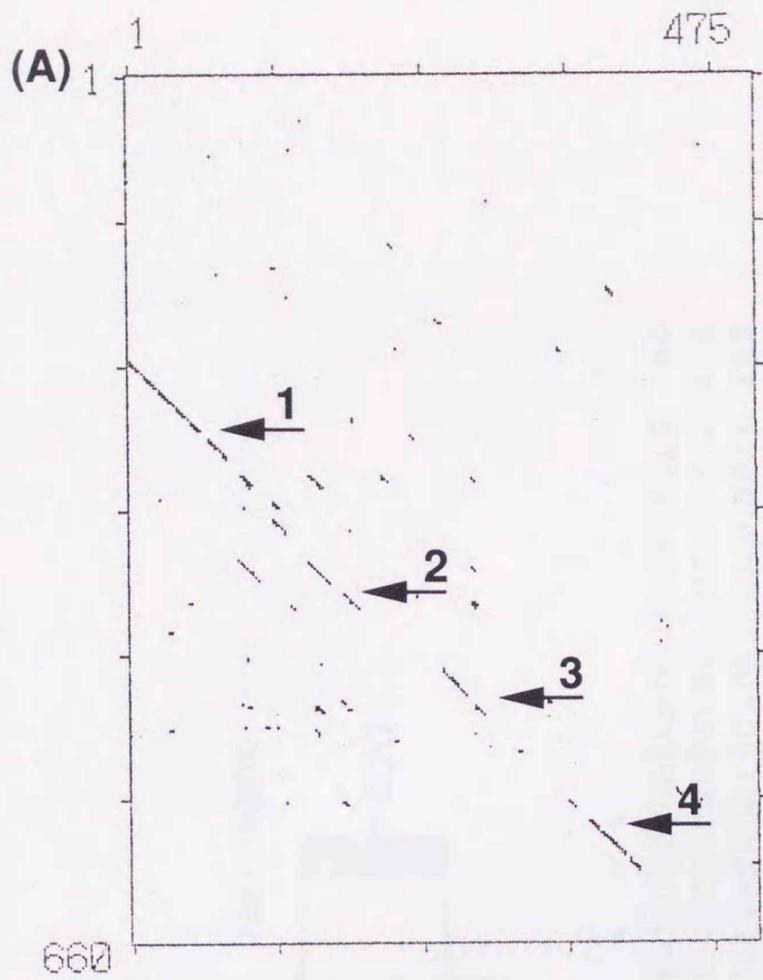
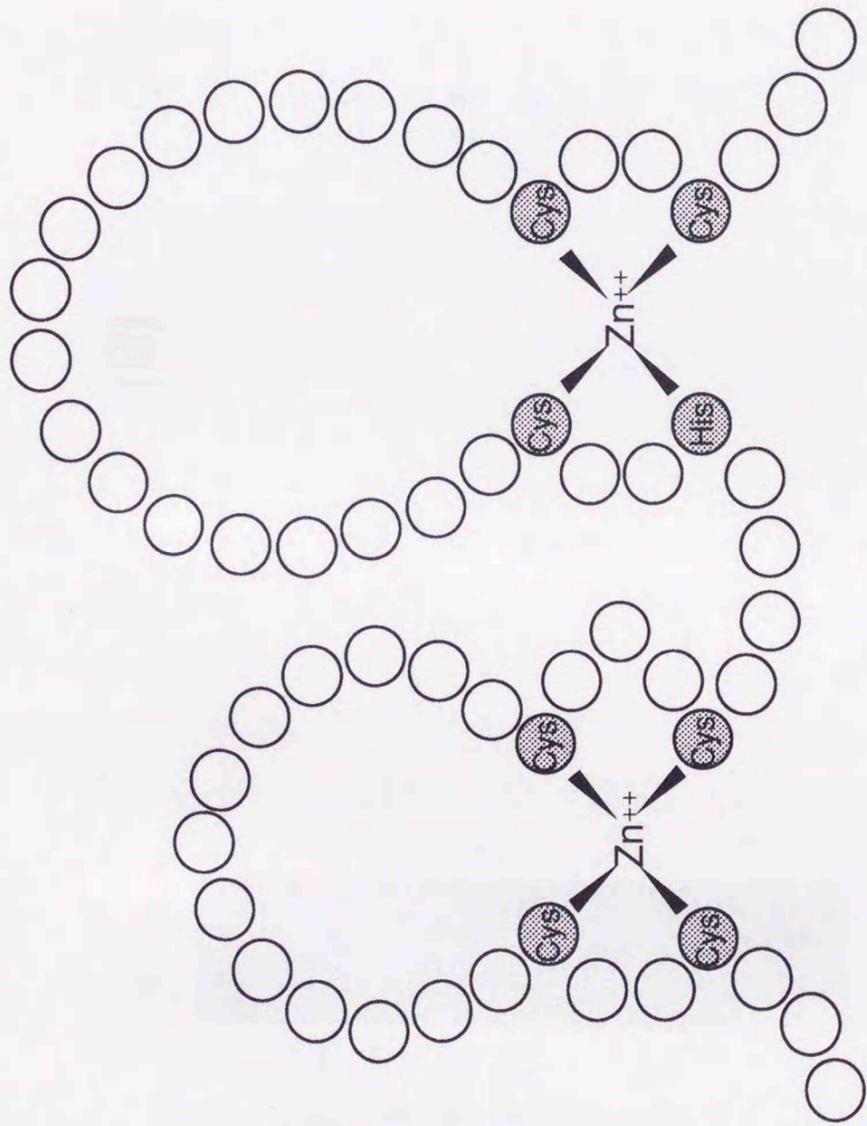


Fig.3-6 Homology plot of WBHD1 with other homeodomain protein. The regions exhibiting more than 50% similarity with each other are dot plotted. WBHD1 is taken as horizontal, and (A) HAT3.1, (B) Zmhox1a, (C) PRHP and (D) PRHA are taken as vertical. 1: PHD finger, 2: "SD" rich region, 3: "LDYKKL" conserved sequence, 4: homeodomain. Numbers on the top and left refer to amino acid positions.



Cys-X₂-Cys-X₁₃-Cys-X₃-Cys-X₄-His-X₂-Cys-X₁₈-Cys-X₂-Cys

Fig.3-8 Possible metal ion coordinations of the PHD finger domain. The conserved PHD finger motif is shown at the bottom. The WBHD1 cDNA lacks a part of the 5' end, resulting in lack of two conserved cysteine residues (underlined) at N-terminal region (see also Fig.3-7b). Cys : cysteine residue, His : histidine residue.

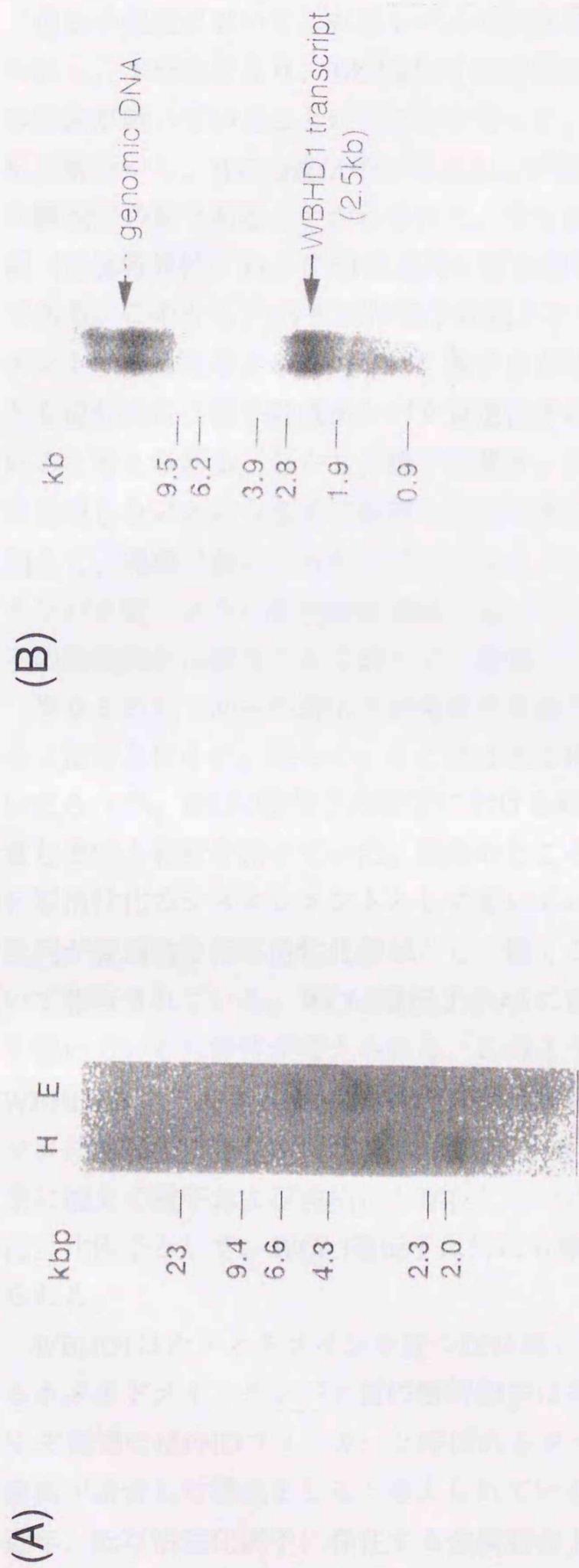


Fig.3-9 Genomic organization and expression of WBHD1 gene in winged bean.
 (A) The 5 μ g of winged bean genome DNA was digested with *EcoRI* or *HindIII* and separated on 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto nylon membrane and hybridized to labeled WBHD1 cDNA. H; *HindIII*, E: *EcoRI*. (B) Total RNA (30 μ g), isolated from winged bean leaves, was separated on 1.2% formaldehyde agarose gel and transferred onto nylon membrane and hybridized to labeled WBHD1 cDNA. The signal was obtained at 2.5kb in length. Signal from genomic DNA was also obtained.

総括

遺伝子発現において、転写レベルの制御は最も重要なステップの1つであると考えられる。本研究により、*WCI*遺伝子の時期および器官特異的な発現にも転写レベルの制御が働いていることが明らかとなった。また、*WCI-3*遺伝子を含む*WCI*遺伝子の発現解析から、*WCI-3*遺伝子の時期および器官特異的な転写制御には少なくとも3つの領域が必要であることが示された。すなわち、TATAボックスを含む約100bpの領域（器官特異性）およびAT塩基対に富む領域とRY配列（時期特異的な転写の活性化）である。このうち、RY配列は種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現を制御するシスエレメントであると考えられており、種子における*WCI-3*遺伝子の発現制御は、少なくとも部分的に、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現と共通した機構により制御されていると考えられる。しかし、種子貯蔵タンパク質遺伝子は種子以外の器官においては発現しないという極めて厳密な器官特異性を持つ。一方、*WCI-3*遺伝子は種子に加えて、塊根においても転写活性を持つ。このことは、*WCI-3*遺伝子には種子貯蔵タンパク質にはない発現制御機構が働いていることを示している。このような遺伝子の発現解析は報告されておらず、非常にユニークな系といえる。

異なる器官で同一の遺伝子が発現する場合、全く異なる機構により制御されているとは考えにくい。恐らく、そこにはある程度の共通した機構が存在するのではないだろうか。*WCI-3*遺伝子の種子における転写の活性化に必要な領域はAT塩基対に富むという特徴を持っていた。現在のところ、このATに富む配列が*WCI-3*遺伝子の転写活性化のシスエレメントとして働いているかどうかは不明であるが、ATに富む配列が普遍的な転写活性化領域として働くことが酵母やシカクマメ以外の植物において報告されている。*WCI-3*遺伝子のATに富む領域は塊根における転写の活性化にも働いている可能性が考えられる。このように考えると、この領域に結合するWBHD1をコードするcDNAを得た意義は非常に大きいと思われる。WBHD1はシカクマメに普遍的に存在するバンド3形成因子を構成していることが推定されたことから、葉に加えて種子および塊根にも存在していると考えられる。WBHD1は普遍的な転写活性化因子として、*WCI-3*遺伝子以外にも様々な遺伝子に働いている可能性が考えられる。

WBHD1はホメオドメインを持つDNA結合タンパク質であった。マメ科植物におけるホメオドメインタンパク質の解析報告は本論文が初めてである。また、WBHD1のN-末領域にはPHDフィンガーと呼ばれるドメインが存在していた。このドメインは金属が結合した構造をとると考えられているが、その機能については不明である。近年、転写活性化因子に存在する金属結合ドメインがタンパク質同士の相互作用に働くという報告がいくつかなされており、PHDフィンガーにおいてもそのような機

能が考えられている。種子においては、ATに富む領域による転写の増大にはRY配列が必要であった。このことは、もしWBHD1がこの領域に結合して転写の活性化に働いているならば、WBHD1はRY配列に結合する転写因子と相互作用している可能性を示している。RY配列に結合するタンパク質は現在まで報告されていない。このことは、RY配列結合タンパク質は、従来のゲルシフト解析やサウス-ウエスタン解析に用いられているような短いDNA配列に単独では結合できないためかもしれない。WBHD1を用いたウエスト-ウエスタン解析によりRY配列結合タンパク質遺伝子のクローニングが可能かもしれない。

本論文において報告した結果は、種子における遺伝子の発現機構の解析に大きく寄与したと考えられる。また、同一の遺伝子が異なる器官において発現するために持っている制御機構の解析に向けて、その方向付けを行った。今後のWBHD1による転写活性化の機構に関する更なる解析が、植物遺伝子の発現制御機構の解明に大きな前進をもたらすことを期待する。

謝辞

本研究を始めるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました故大野哮司教授には謹んで感謝申し上げますとともに、御冥福をお祈りします。

故大野哮司教授に代わり指導教官として終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました内藤 哲教授に謹んで御礼申し上げます。

本論文の御校閲を賜りました北海道大学農学部島本義也教授、北海道大学農学部富田房男教授ならびに北海道大学農学部三上哲夫教授には謹んでお礼申し上げます。

この研究を行うにあたり、多大なる御助言、御指導を頂きました川本伸一博士、石川雅之博士ならびに土生芳樹博士に深く感謝いたします。パーティクルガン法を用いた解析を行うにあたり御指導、御教授を頂いた広島大学森川弘道教授、ルシフェラーゼ活性の測定に御協力を頂いた住友化学工業株式会社生命工学研究所 大江田憲治博士ならびに飯田朝子博士に深く感謝いたします。pDO432を御供与頂いた Donald R. Helinski 博士ならびに Stephen H. Howell博士、B9タンパク質をコードするファージクローンを御供与頂いた Gloria M. Coruzzi博士に厚くお礼申し上げます。トランスジェニックタバコの解析に御協力を頂きました深澤和臣氏、福島久代氏、松原奈美子氏ならびに千葉由佳子氏、本論文作製に際し多大なるご支援を頂きました藤原久美事務官をはじめとする分子生物学講座および旧微生物学講座の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- Abe J., Nakamura H., Shibata H., Norioka S., Hara S. and Ikenaka T. : Trypsin and chymotrypsin inhibitors in winged bean. *Japan Agric. Res. Quart.* 18: 229-232 (1985)
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myere E.W. and Lipman D.J. : Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. eds. : *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. (1987)
- Bäumlein H., Nagy I., Villarroel R., Inze D. and Wobus U : Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant J.* 2: 233-239 (1992)
- Bellmann R. and Werr W. : Zmhox1a, the product of a novel maize homeobox gene, interacts with the Shrunken 26bp feedback control element. *EMBO J* 11: 3367-3374 (1992)
- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
- Bruce W.B., Christensen A.H., Klein T., Fromm M. and Quail P.H. : Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9692-9696 (1989)
- Bustos M.M., Begum D., Kalkan F.A., Battraw M.J. and Hall T.C. : Positive and negative cis-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter. *EMBO J.* 10: 1469-1479 (1991)
- Bustos M.M., Gultinan M.J., Jordano J., Begum D., Kalkan F.A. and Hall T.C. : Regulation of β -glucuronidase expression in transgenic tobacco plants by an A/T rich, cis-acting sequence found upstream of a French bean β -

phaseolin gene. *Plant Cell* 1: 839-853 (1989)

Chamberland S., Daigle N. and Bernier F. : The legumin boxes and the 3' part of a soybean β -conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 19: 937-949 (1992)

Cox K.H. and Goldberg R.B. : Analysis of plant gene structure. In *Plant Molecular Biology. A Practical Approach.* (Shaw C. H. ed.) pp.1-35 (1988)

Crawford A.W., Pino J.D. and Beckerle M.C. : Biochemical and molecular characterization of the chicken cystein-rich protein, a developmentally regulated LIM-domain protein that is associated with the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 124: 117-127 (1994)

Czarnecka E., Ingersoll J.C. and Gurley W.B. : AT-rich promoter elements of soybean heat shock gene Gmhsp17.5E bind two distinct sets of nuclear proteins in vitro. *Plant Mol. Biol.* 16: 877-890 (1992)

de Pater S., Pham K., Chua N-H., Memelink J. and Kijne J. : A 22-bp fragment of the pea lectin promoter containing essential TGAC-like motifs confers seed-specific gene expression. *Plant cell* 5: 877-886 (1993)

Dehesh K., Bruce W.B. and Quail P.H. : A trans-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter. *Science* 250: 1397-1399 (1990)

Dhir S.K., Dhir S. and Widholm M. : Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Cell Rep.* 10: 39-43 (1991)

Dickinson C.D., Evans R.P. and Nirlsen N.C. : RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nucleic Acids. Res.* 16: 317 (1988)

Dixon R.A. and Harrison M.J. : Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. : *Adv. Genet.* 28: 165-234 (1990)

Doyle J.J. and Doyle J.L. : Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15 (1990)

Duke J. A. (星合和夫 訳) 世界マメ科植物ハンドブック 幸書房 (1986)

Fiedler U., Filistein R., Wobus U. and Bäumlein H. : A complex ensemble of cis-regulatory elements controls the expression of a *Vicia faba* non-storage protein gene. Plant Mol. Biol. 22: 669-679 (1993)

Fujiwara T. and Beachy R.N. : Tissue-specific and temporal regulation of a β -conglycinin gene: roles of the RY repeat and cis-acting elements. Plant Mol. Biol. 24: 261-272 (1994)

Fujiwara T., Naito S., Chino M. and Nagata T. : Electroporated protoplasts express seed specific gene promoters. Plant Cell Rep. 9: 602-606 (1991)

Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K: Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cell. Exp Cell Res 50: 151-158 (1968)

Gatehouse J.A., Evans I.M. and Boulter D. : Differential expression of genes during legume seed development. Phil.Trans.Roy.Soci (Lond) B314 : 367-384 (1986)

Gilmartin P.M., Sarokin L., Memelink J. and Chua N-H : Molecular light switches for plant genes. Plant Cell 2: 369-378 (1990)

Goldberg R.B. : Regulation of plant gene expression. Phil. Trans. Roy. Soci. (Lond) B314: 343-353 (1986)

Goldberg R.B., Barker S.J. and Prez-Grau L. : Regulation of gene expression during plant embryo genesis. Cell 56: 149-160 (1989)

Habu Y., Peyachoknagul S., Umemoto K., Sakata Y. and Ohno T. : Structure and regulated expression of Kunitz chymotrypsin inhibitor genes in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.). J. Biochem. 111: 249-258 (1992)

Habu Y., Sakata Y., Fukasawa K. and Ohno T. : Ubiquitous nuclear

proteins bind to 5' upstream region of major Kunitz chymotrypsin inhibitor gene in winged bean. *Plant Mol. Biol.* 23: 1139-1150 (1993)

Harada J.J., Barker S.J. and Goldberg R.B. : Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. *Plant Cell* 1: 415-425 (1989)

Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Sheermann S.E., Barker R.F. and Boulter D. : A novel mechanisms of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 300: 160-163 (1987)

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. : GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907 (1987).

Jofuku K.D. and Goldberg R.B. : Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* 1: 1079-1093 (1989)

Kawagoe Y., Campell B.R. and Murai N. : Synergism between CACGTG (G-box) and CACCTG cis-elements is required for activation of the bean seed storage protein β -phaseolin gene. *Plant J.* 5 : 885-890 (1994)

Klein T.M., Wolf E.D., Wu R. and Sanford J.C. : High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acid into living cell. *Nature* 327: 70-73 (1987)

Kloeckener-Gruissem B., Vogel J.M. and Freeling M. : The TATA box promoter region of maize *Adh1* affects its organ-specific expression. *EMBO J.* 11: 157-166 (1992)

Korfhage U., Trezini G.F., Meier I., Hahlbrock K. and somssich I.E. : Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* 6 : 695-708 (1994)

Kuhlemeier C., Green P. and Chua N-H. : Regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 221-257 (1987)

Lehming N., Thanos D., Brickman J.M., Ma J., Maniatis T. and Ptashne M. : An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature* 371: 175-179 (1994)

Lelievre J-M, Oliveira L.O. and Nielsen N.C. :5'-CATGCAT-3' elements modulate the expression of glycinin genes. *Plant Physiol.* 98: 387-391 (1992)

Lelong J.-C., Prevost G., il Lee K. and Crepin M. : South western blot mapping: A procedure for Simultaneous characterization of DNA binding proteins and their specific genomic DNA target sites. *Anal. Biochem.* 179: 299-303 (1989)

Lewin B., : *Genes V.* Oxford University Press, New York (1994)

Manen J-F., Simon P., Van Slooten J-C., Osteras M., Frutiger S. and Hughes G.J. : A nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean is a protease inhibitor. *Plant Cell* 3: 259-270 (1991)

Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. eds. : *Molecular cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1982)

McCarty D.R., Hattori T., Carson C.B., Vasil V., Lazar M. and Vasil I.K. : The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66: 895-905 (1991)

McPherson C.E., Shim E-Y., Friedman D.S. and Zaret K.S. : An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. *Cell* 75: 387-398 (1993)

Nishihara M., Ito M., Tanaka I., Kyo M., Ono K., Irifune K. and Morikawa H. : Expression of the β -glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and Peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment. *Plant Physiol.* 102: 357-361 (1993)

Nunberg A.N., Li Z., Bogue M.A., Vivekananda J., Reddy A.S. and Thomas T.L. : Developmental and hormonal regulation of sunflower helianthinin

genes: proximal promoter sequences confer regionalized seed expression. *Plant Cell* 6: 473-486 (1994)

Orf J.H. and Hymowitz T. : Inheritance of absence of Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybean. *Crop Sci.* 19: 107-109 (1979)

Ow D.W., Wood K.V., DeLuca M., de Wet J.R., Helinski D.R. and Howell S.H. : Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cell and transgenic plants. *Science* 234: 856-859 (1986)

Perez-Grau L. and Goldberg R.B. : Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. *Plant Cell* 1: 1095-1109 (1989)

Rogers S.G., Horsch R.B. and Fraley R.T. : Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Methods Enzymol* 118: 627-640 (1986).

Roth B.A., Goff S.A., Klein T.M. and Fromm M. : *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 (1991)

Salmenkallio M., Hannus R., Teeri T.H. and Kauppinen V. : Regulation of a amyrase promoter by gibberellic acid and abscisic acid in barley protoplasts transformed by electroporation. *Plant Cell Rep.* 9: 352-355 (1990)

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. eds : *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1989)

Schindler U., Beckmann H. and Cashmore A.R. : HAT3.1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cystein-rich region. *Plant J.* 4: 137-150 (1993)

Schmeichel K.L. and Beckerle M.C. : The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 79: 211-219 (1994)

Shibata H., Hara S. and Ikenaka T. : Amino acid sequence of winged bean

(*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.) chymotrypsin inhibitor WCI-3. J. Biochem. 104 : 537-543 (1988)

Shibata H., Hara S., Ikenaka T. and Abe J. : Purification and characterization of proteinase inhibitors from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.). J. Biochem. 99 : 1147-1155 (1986)

Singh H., LeBowitz J.H., Baldwin A.S. and Sharp P.A. : Molecular cloning of an enhancer binding protein: Isolation by screening of an expression library with recognition site DNA. Cell 52: 415-423 (1988)

Struhl K. : Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 8410-8423 (1985)

Sugino Y. : High sensitivity measurement of DNA by fluorescence spectrophotometer Hitachi model F-3000. Hitachi Scientific Instrument News 34: 3285-3286 (1991)

Peyachoknagle S. : Isolation, characterization and analysis of the expression of chymotrypsin inhibitor gene in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.). 東京農工大学 博士論文 (1989)

Thomas T.L. : Gene expression during plant embryogenesis and germination: An over view. Plant Cell 5: 1401-1410 (1993)

Ueda T., Wawerczak W., Ward K., Sher N., Ketudat M., Schmidt R.J. and Messing J. : Mutation of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the *Opaque-2* protein. Plant Cell 4: 701-709 (1992)

Umemoto K., Habu Y. and Ohno T. : Analysis of differential accumulation of winged bean Kunitz chymotrypsin inhibitor mRNA species by a sequence-specific termination method. Plant Mol. Biol. 20: 1175-1178 (1992)

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. : A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell 6: 251-264 (1994)

鈴木義昭、岩淵雅樹、藤井義明、谷口維紹、村松正実 編 転写因子研究の新展開-
基本転写因子から発生、分化、医学まで 実験医学増刊号、Vol.11 (1993)

寺田 弘 編 電気泳動法 基礎と実験 廣川書店

土生芳樹：シカクマメKunitz型キモトリプシンインヒビター遺伝子の構造と発現に関
する研究 北海道大学 博士論文 (1992)

原 三郎：植物由来のセリンプロテイナーゼインヒビター 蛋白質核酸酵素
34：920-928 (1989)

のそとに講義館校構の解析

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



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

