

味噌・醤油酵母の部位特異的組織系の産物への導入

尾之内 均

報告番号 甲 第 3156 号

南京大學物理系物理學系

# 主 論 文

南京大學物理系  
物理學系

第 一 卷

①

味噌・醤油酵母の部位特異的組換え系の植物への導入

名古屋大学大学院  
理学研究科生物学専攻

尾之内 均

目次	頁
要旨	2
第一章 序論	4
第二章 材料と方法	6
第三章 結果	
1. タバコ培養細胞での R-RS 組換えを検出するための実験系	13
2. エレクトロポレーション法によりタバコプロトプラストに導入したプラスミド DNA 上にある RS 配列間の組換え	13
3. タバコ培養細胞の染色体上にある RS 配列間の組換え	15
4. シロイヌナズナにおける R-RS 組換えの検出系	16
5. シロイヌナズナの体細胞における R-RS 組換えの組織化学的検出	16
6. シロイヌナズナの生殖細胞における R-RS 組換えの検出	18
7. R-RS 組換え系と Ac 転移系を利用した変異株作製法の原理	19
8. (RS/dAc-RS)T-DNA の作製とシロイヌナズナ染色体への導入	20
9. dAc-RS の転移による変異株分離の試み	
9-1. dAc-RS の転移が誘導された株の分離	21
9-2. 形態異常変異株の解析	21
10. dAc-RS の転移距離の測定	23
11. R-RS 組換えによる染色体の欠失の誘導	23
第四章 考察	25
謝辞	30
引用文献	31

## 要旨

味噌・醤油酵母の pSR1 プラスミドは、一对の逆向き反復配列を持ち、その配列内にある組換え開始部位 (RS ; 58 bp 以内) で分子内組換えを起こす。この組換えに必要な酵素は pSR1 内の R 遺伝子にコードされる R タンパク質のみである。また、この組換えは出芽酵母の染色体に一对の RS 配列を導入した場合にも R タンパク質によって誘導され、RS 配列の位置と向きによって、逆位、欠失、転座などの染色体の再編成を誘導することができる。

本研究では、この R-RS 部位特異的組換え系を高等植物に利用するために、まず、タバコ培養細胞においてこの組換え系が機能するかどうか検討した。そのため、一对の RS 配列間で組換えが起こると  $\beta$ -グルタロニダーゼ (GUS) 遺伝子が発現するように構築したレポーター遺伝子と、カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA プロモーターに連結した R 遺伝子 (P35S-R 遺伝子) を、タバコ培養細胞プロトプラストにエレクトロポレーション法により同時に導入した。その結果、一過的な GUS 遺伝子の発現が検出された。また、同様のレポーター遺伝子をタバコ培養細胞の染色体に組み込んだ形質転換体を作製し、それに P35S-R 遺伝子を導入したところ、GUS 遺伝子の発現がみられた。それぞれの細胞から抽出した DNA の構造解析から、正確に RS 配列間で組換えが誘導されたことがわかった。また、GUS 遺伝子が発現した細胞を化学染色することにより、P35S-R 遺伝子が導入された細胞のうちどれくらいの細胞で組換えが起きたか調べたところ、43% の細胞で組換えが起きたことが示された。したがって、タバコ培養細胞でも R-RS 組換えを効率良く誘導できることがわかった。次に、シロイヌナズナ植物体においても R-RS 組換えを誘導できるかどうか検討するために、同様のレポーター遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナと P35S-R 遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナを交配し、F1 植物を組織化学的に染色した。その結果、葉、根、子葉、胚軸、花などの器官で GUS 遺伝子の発現を示す青い染色がパッチ状やセクター状など様々なパターンで観察され、様々な時期に様々な部位で組換えが誘導されたことが示唆された。それらの植物で確かに RS 配列間の組換えが起きたことが、PCR 解析によって示された。さらに、F1 植物の自殖により得られた F2 植物を組織化学的に染色したところ、F1 植物と同様にモザイク状に染色された個体の他に、植物体全体が染色された個体が観察された。そのような個体は F1 植物の生殖細胞で組換えの起きたレポーター遺伝子を受け継いだことが、サザンブロット解析によって示された。植物体全体が染色された個体の出現頻度から算出した生殖細胞における組換え頻度は最高で 3.2% であった。これらの結果から、シロイヌナズナの体細胞と生殖細胞のいずれにおいても、R-RS 組換えが誘導できることが示された。

次に、この組換え系とトウモロコシの *Ac* 転移系を組み合わせ、植物の変異株作製法の開発を試みた。そのために、*Ac* 転移因子が同一染色体近傍に転移しやすいという性質を利用して、次のような手順で植物染色体の欠失を誘導することを考えた。(1) まず染色体の一箇所に、*RS* 配列を含む非自律性転移因子 (*dAc-RS*) とさらにもう一つの *RS* 配列を *dAc-RS* の外側に持つ T-DNA [(*RS/dAc-RS*)T-DNA] を挿入する。(2) *Ac* 転移酵素によって *dAc-RS* の転移を誘導し、二つの *RS* 配列のうちの一つを同一染色体の他の部位に移動させる。(3) *R* タンパク質によって *RS* 配列間の組換えを誘導し、その間の染色体領域を欠失させる。欠失させた領域に相当する DNA 断片は、末端が *dAc-RS* と T-DNA に印付けされているので、欠失を誘導する前の (2) の段階の植物体の DNA から単離することが原理的には可能である。したがって、このような方法で変異株が得られれば、変異の原因遺伝子のクローニングが可能である。本研究では、このような操作が実際に可能であるかどうか検討した。そのためにまず (*RS/dAc-RS*)T-DNA を染色体に組み込んだ形質転換シロイヌナズナを作製し、その中から T-DNA が第一染色体マップポジション  $78.7 \pm 3.2$  に挿入された系統について、*Ac* 転移酵素遺伝子を持つシロイヌナズナと交配し、*dAc-RS* の転移を誘導した。転移した *dAc-RS* の挿入部位と元の部位の間の DNA の長さを直接測定することにより、*dAc-RS* の転移距離と転移方向を調べた。その結果、転移した *dAc-RS* のうち約半数が元の位置から 800 キロ塩基対以内の近傍に転移したことがわかった。この結果は、染色体の特定の部位から *dAc-RS* を転移させれば、効率良く同一染色体の近傍に *RS* 配列を再挿入させることができることを意味している。次に、このようにして *dAc-RS* が 12 キロ塩基対離れた部位に転移した個体に、交配により *P35S-R* 遺伝子を導入し、*RS* 配列間の組換えによる染色体の欠失を誘導できるか否か検討した。その結果、F1 植物の体細胞において誘導された染色体の欠失が PCR 解析によって検出された。以上の結果は、*Ac* 転移因子と *R-RS* 組換え系を組み合わせる利用することにより、シロイヌナズナ染色体に欠失変異を誘導できる可能性を示している。また、この方法では、欠失を誘導する前に *dAc-RS* による挿入変異株を単離できる可能性もある。したがって、この方法が開発されれば、変異の原因遺伝子のクローニングが可能である変異株作製法として利用価値の高いものになると期待される。

味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の pSR1 プラスミドは、959 塩基対 (bp) の一対の逆向き反復配列を持ち、その配列内にある組換え開始部位 (RS ; 58 bp 以内) で分子内組換えを起こす (1)。この組換えに必要な酵素は pSR1 内の R 遺伝子にコードされる R タンパク質のみであることが、*in vitro* の実験によって示された (2)。この R-RS 部位特異的組換え系はバクテリオファージ P1 由来の Cre-loxP 組換え系 (3)、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 2  $\mu$ m プラスミド由来の FLP-FRT 組換え系 (4) と類似の組換え系である。これらの部位特異的組換え系は次のような特徴を持っており、*in vivo* における DNA 操作技術への応用に適している。1. 数十塩基対 (bp) の特異的な配列の間でのみ起こる特異性の高い反応である。2. 単一の組換え酵素に触媒される単純な反応である。3. 普遍的な相同的組換えと違って効率が良い (1, 4, 5, 6)。

これらの部位特異的組換え系は哺乳動物、ショウジョウバエ、植物などにおいても機能することが示された (7)。ショウジョウバエではすでにモザイク解析に利用されている (8)。植物では、Cre-loxP 組換え系がタバコとシロイヌナズナで、FLP-FRT 組換え系がトウモロコシとタバコで機能することが示された (9-15)。

部位特異的組換えを利用した染色体の大きな領域の欠失、逆位、転座の誘導は、最初に R-RS 組換え系を使って出芽酵母において行われた (16, 17)。出芽酵母の XV 番染色体上の 180 kbp 離れた *RAS1* 座と *HIS3* 座に、RS 配列を同じ向きで導入した場合には両遺伝子座間の欠失を、逆向きに導入した場合には逆位を、R タンパク質によって効率よく誘導できることが示された (16)。また、二つの RS 配列を非同源染色体に導入した場合には、染色体間の相互転座を誘導できることが示された (17)。したがって、この R-RS 組換え系は真核生物の染色体操作に有用であると考えられる。

植物では、薬剤処理や放射線処理によって欠失、逆位、転座などの染色体の再編成を誘導する染色体工学技術が育種などに利用されてきたが (18, 19)、染色体の特定の部位で再編成を誘導できるような染色体工学技術の開発は、育種など応用面だけでなく、植物染色体の特定領域の機能や構造を解析するために重要である。

シロイヌナズナは、ゲノムサイズが小さい、反復配列が少ない、世代時間が短い、植物体のサイズが小さいなど、ゲノム研究や遺伝学的研究の材料として優れた特徴を持っている (20, 21)。そのため、cDNA プロジェクト (22) やコンティグ地図の作製 (23) が進められている。また、これまでに多くの変異株が分離されており、遺伝子地図が作製されている (24)。それらの変異株の原因遺伝子のクローニングは、主に、染色体歩行法、T-DNA あるいは転移因子によるタギング法によって行われている。染色体歩行法は多大な労力を要する場合が多いが、RFLP マーカーの増加、YAC ラ



ライブラリーの改良など状況は徐々に改善されつつある(25)。T-DNAによる遺伝子タギングは、Feldmanらによって作製された14000系統のT-DNA挿入ライブラリーのうち5000系統が公開されており、それを利用して多くの遺伝子がクローニングされている(26, 27)。ただし、T-DNAは植物染色体の不特定な位置に挿入されるので、既にあるライブラリーから目的の変異株が分離されない場合に、新たにT-DNAタギングによって特定の遺伝子の変異株を分離することは困難である。また、種子に直接アグロバクテリウムを感染させて作製したFeldmanらのライブラリーにおいても体細胞変異が高い頻度で出現するため、T-DNAと変異が連鎖していない場合も多い(28)。転移因子による遺伝子タギングは、トウモロコシのAc-Ds系、En-Spm系を利用して行われている(29, 30, 31)。Ac転移因子はトウモロコシのp座とbz座から転移した場合に、それぞれ61%と52%の頻度で遺伝学的に連鎖した部位に転移したことが報告された(32, 33)。また、タバコとシロイヌナズナに導入した場合にも、それぞれ72%と68%の頻度で連鎖した部位に転移したことが報告された(34, 35)。このようにAc転移因子は同一染色体の比較的近傍に転移する傾向があるので、染色体上の目的の遺伝子に近い部位からAc転移因子を転移させることにより、より高い確率で目的の遺伝子のAc挿入変異株が分離できると考えられている(35)。

出芽酵母で誘導されたようなR-RS組換えによる染色体の特定領域の欠失を、シロイヌナズナにおいて誘導できれば、染色体の特定領域に存在する遺伝子の機能解析やクローニングに有用であると考えられる。そのような欠失を誘導するには、二つのRS配列を同一染色体に挿入する必要があるが、植物では標的遺伝子組換え技術は実用化されていないので、染色体上の特定の部位にRS配列を挿入することはできない。

本研究では、Ac転移因子の同一染色体近傍に転移しやすい性質を利用して同一染色体に二つのRS配列を挿入し、RS配列間の組換えにより欠失変異を誘導することを考え、そのような変異株作製法を開発するために、まずR-RS組換え系が植物で機能するか否かを検討した。その結果、タバコ培養細胞においてR-RS組換え系が効率良く機能することが示された。また、シロイヌナズナの体細胞と生殖細胞においてもR-RS組換えを誘導できることを示した。次に、Ac転移因子とR-RS組換え系を利用して、シロイヌナズナにおいて挿入変異や欠失変異の誘導を試みた。欠失変異株はまだ分離されていないが、体細胞において染色体の一部の領域の欠失が誘導され、この組換え系が植物の染色体操作に利用可能なことが示された。

## 第二章 材料と方法

### 1. 植物細胞と菌株

植物細胞としてタバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) 培養細胞 BY-2 (36) を用いた。形質転換シロイヌナズナ CATGUS-6、CATGUS-11、CATGUS-12、R-21、R24 の作製には Wassilewskija (WS) エコタイプが用いられた。形質転換シロイヌナズナ R-51、RS/dAc-RS #14、P35S-TPase #9 の作製には Landsberg *erecta* エコタイプが用いられた。T-DNA 挿入部位のマッピングに用いた検定株 NW3、NW4、NW7、NW8、NW9、NW127 は Nottingham Arabidopsis Stock Centre から分与された。プラスミド作製の宿主として *Escherichia coli* JM109 (37)、DH5 $\alpha$  (37) が用いられた。BY-2、シロイヌナズナの形質転換の宿主として *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (38) が用いられた。BY-2 は 0.2 mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を含む Linsmaier and Skoog (LS) 液体培地 (39) を用いて 26°C、暗所で振盪培養した。シロイヌナズナは人工気象機内で 22°C、昼間 16 時間、夜間 8 時間のサイクルで栽培した。

### 2. 酵素、化合物、プラスミド

制限酵素、修飾酵素は、宝酒造、東洋紡から購入した。硫酸カナマイシンは明治製菓から購入した。ハイグロマイシンは和光純薬から購入した。セルラーゼオノズカ RS はヤクルトから、ペクトリアーゼ Y-23 は Seisin から購入した。 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) の基質として用いた 4-メチルウンベリフェリルグルクロニド (MUG) と 5-プロモ 4-クロロ 3-インドリルグルクロニド (X-Gluc) はそれぞれ Sigma と Clonetech から購入した。タンパク質濃度の測定に用いたプロテインアッセイキットは BIO-RAD から購入した。プラスミド pUC18、pBluescript KS(+), pBI221 (40) は、それぞれ東洋紡、Stratagene、Clonetech から購入した。I-SceI と I-SceI リンカーは Boehringer Mannheim Biochemica から購入した。ハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ (HPT) 遺伝子を含む pLAN101MHyg は奈良先端大の島本功博士より分与された。RS 配列を含むプラスミド pREC58 と R 遺伝子を含むプラスミド pHM153 (41) は大阪大学工学部の大嶋泰治博士より分与された。5' 非翻訳領域にイントロンを挿入した GUS 遺伝子を含むバイナリーベクタープラスミド pIG121HM (42) は名古屋大学農学部の中村研三博士より分与された。 $\lambda$  cos 配列を含む pHc79 は Boehringer Mannheim Biochemica から購入した。Ac 転移因子を含む pKU3 (43) は J.Schell 博士より分与された。Ac 転移酵素の cDNA を含む pPCV720 は C.Koncz 博士

より分与された。バイナリーベクタープラスミド pGAH は当研究室の横井によって作製された。

### 3. プラスミドの作製

プラスミド作製における全ての操作は常法 (29) に従って行った。図 1 に示したような構造のレポータープラスミドを構築するために、まず pREC58 から調製した RS 配列を含む *Sa*I 断片を pBluescript KS(+) の *Sa*I 部位に挿入した。以後の RS 配列断片はこのプラスミドから調製した。GUS のコード領域とノパリン合成酵素の転写終結シグナル配列を含む 2.1 キロ塩基対 (kbp) の DNA 断片と、カリフラワーモザイクウィルスの 35S RNA プロモーター (P35S) を含む 0.8 kbp の DNA 断片は pBI221 (40) から調製した。RS 配列断片、2.1 kbp GUS 断片、0.8 kbp P35S 断片を pBluescript KS(+) のマルチクローニングサイトに挿入し、pGI と pRGR を作製した。pCATG は、P35S 断片、RS 配列断片、pCaMVCAT (44) から調製したクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を含む 2.3 kbp 断片、GUS 断片を pBluescript KS(+) のマルチクローニングサイトに挿入して作製した。pGAHGI は、pGI から調製した IGUS レポーター遺伝子 [図 1 (A)] を含む 3.4 kbp 断片を pGAH のマルチクローニングサイトに挿入して作製した。pBICATG は、pIG121HM (42) から GUS 遺伝子を含む 3.1 kbp 断片を削除し、pCATG から調製した CATGUS レポーター遺伝子 [図 1 (B)] を含む 5.8 kbp 断片に置き換えることにより作製した。

P35S-R 遺伝子を持つプラスミド pdP35S を作製するために、まず pCaMVCAT から調製した P35S のエンハンサー領域を含む 0.35 kb 断片を pCaMVCAT の *Sma*I 部位に挿入し、P35S のエンハンサー領域を重複させた。その改変した P35S を含む DNA 断片と pHM153 (41) から調製した R 遺伝子のコード領域を含む 1.9 kbp 断片を pUC18 のマルチクローニングサイトに挿入し、pdP35R を作製した。また pdP35 $\Delta$ R は、pdP35R から R 遺伝子のコード領域中の 1.3 kbp *Bgl*II-*Mlu*I 断片を削除して作製した。pGAHR は pdP35R から調製した P35S-R 遺伝子を含む 2.7 kbp 断片を、pGAH $\Delta$ R は pdP35 $\Delta$ R から調製した 1.4 kbp 断片をそれぞれ pGAH のマルチクローニングサイトに挿入して作製した。pGAH $\Delta$ N は pGAH からネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II (NPTII) 遺伝子のコード領域中の 0.6 kbp *Nco*I-*Bam*HI 断片を削除することによって作製した。pGAH $\Delta$ NR は pdP35R から調製した P35S-R 遺伝子を含む 2.7 kbp 断片を pGAH $\Delta$ N のマルチクローニングに挿入して作製した。

pGAH $\Delta$ NRsAc は図 12 に示した (RS/dAc-RS)T-DNA を含むバイナリーベクターブ

ラスミドである。λ cos 配列を含む 1.7 kbp 断片は pHc79 から調製された。RS 配列を含む 70 塩基対 (bp) 断片は pREC58 から調製された。1' プロモーターと Ac 5' 末端を含む 2.3 kbp 断片と、Ac 3' 末端と NPTII 遺伝子のコード領域とオクトピン合成酵素の転写終結シグナル配列を含む 3.7 kbp 断片は pKU3 (43) から調製された。HPT 遺伝子を含む 2.5 kbp 断片は pLAN101MHyg から調製された。pGAΔN は pGA492 (45) から NPTII 遺伝子のコード領域中の 0.6 kbp *NcoI*-*Bam*HI 断片を削除することによって作製した。pGAΔNRSdAc 作製の詳細については省略するが、上述の DNA 断片を適当に連結した後、pGAΔN のマルチクローニングサイトに挿入し作製した。

pGAHΔN35SACG は 35S プロモーターに連結した Ac 転移酵素の cDNA とマーカー遺伝子として HPT 遺伝子と GUS 遺伝子を含むバイナリーベクタープラスミドである。Ac 転移酵素の cDNA の 5' 非翻訳領域は、翻訳効率を上げるために *par* 遺伝子 (46) の 5' 非翻訳領域に置換した。Ac 転移酵素の cDNA を含む 2.9 kbp 断片は pPCV720 から調製した。P35S を含む 0.8 kbp 断片は pBI221 から調製した。*par* 遺伝子の 5' 非翻訳領域は 5'-CTCCGCAGTAAGAAAAACAACCTCTTATATATAGATC-3' と 5'-TATATATAAGAGTTTGTCTTACTGCGGAGGC-3' という相補的な塩基配列の合成 DNA から調製し、Ac 転移酵素 cDNA の *Msp*I 部位に連結した。GUS 遺伝子を含む 2.9 kbp 断片は pBI221 から調製した。pGAHΔN35SACG はそれらの DNA 断片を pGAHΔN のマルチクローニングサイトに挿入し作製した。

pGAHGI、pBICATG、pGAHR、pdP35ΔR、pGAHΔNR、pGAΔNRSdAc、pGAHΔN35SACG はそれぞれエレクトロポレーション法 (47) によりアグロバクテリウムに導入した。

#### 4. BY-2 プロトプラストの調製とエレクトロポレーション法によるプラスミド DNA の導入

継代培養三日目の BY-2 細胞から Nagata らの方法 (48) に従ってプロトプラストを調製した。70 mM KCl、5 mM MES (pH 5.8)、0.3 M マンニトール、1% PEG およびプラスミド DNA (3 pmol) を含む緩衝液 800 μl に  $3 \times 10^6$  個のプロトプラストを懸濁しキュベットに移した。そのプロトプラスト-DNA 混合液に、Gene Pulser (BIO-RAD) を使って 750 V/cm、100 μF の電気パルスを与えた。氷中で 10 分間冷却した後、1% ショ糖、0.4M マンニトール、0.2 mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を含む

LS 液体培地に移し 26℃、暗所で 20 時間静置培養した。

#### 5. アグロバクテリウムとの共存培養法による BY-2 の形質転換と一過的な遺伝子導入

形質転換 BY-2 を作製するために、BY-2 細胞をバイナリーベクタープラスミド pGAHGI または pBICATG を持つアグロバクテリウムと、An の方法 (49) に従って共存培養した。形質転換体はカナマイシンおよびハイグロマイシンに対する耐性で選抜し、0.2 mg/l 2,4-D、200 mg/l カナマイシン、50 mg/l ハイグロマイシンを含む LS 液体培地で振盪培養した。形質転換 BY-2 細胞への R 遺伝子の一過的な導入もアグロバクテリウムとの共存培養法によって行ったが、以下のような改変を加えた。pGAHR または pGAHΔR を持つアグロバクテリウムを 600 nm における吸光度が 1.5 になるまで培養し、その 4 倍濃縮液 100μl を継代培養三日目の形質転換 BY-2 細胞 4ml と混ぜ、0.2mg/l 2,4-D を含む LS 液体培地で 26℃、暗所で 48、72、96 時間静置培養した。

#### 6. シロイヌナズナの形質転換

アグロバクテリウムを介したシロイヌナズナの根の切片の形質転換は Valvekens らの方法 (50) を改変して行った。2% 次亜塩素酸ナトリウムと 0.002% トリトン X-100 を含む溶液で表面滅菌したシロイヌナズナの種子を MS 寒天培地 [ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (和光純薬)、20 g/l ショ糖、3 mg/l チアミン、0.5 mg/l ピリドキシン、5 mg/l ニコチン酸、0.2% グランガム (和光純薬)、pH 6.3] の上で発芽させ、22℃、連続光の下で 3 週間栽培した。その後、培地から引き抜いた根を 5 株分ずつ束にして約 1 cm の切片に切断し、MS 寒天培地に 0.5mg 2,4-D と 0.05 mg/l カイネチンを加えたカルス誘導培地の上で 3 日間培養した。一方、バイナリーベクタープラスミドを含むアグロバクテリウム EHA101 株の培溶液を 30℃ で 2 日間、定常状態に達するまで培養した後、培養液を MS 液体培地で 5 倍に希釈した。その中にカルス化した根の切片を 30 秒間浸した後、濾紙で余分な水分を除き、カルス誘導培地の上で培養した。2 日後、MS 寒天培地に 0.15 mg/l IAA と 5 mg/l 2-イソペンテニルアデニンを加えたシュート誘導培地に移した。さらに 2 日後、切片を 20 mg/l ハイグロマイシンを含むシュート誘導培地に移した。その後、シュート誘導培地は 10 日に 1 度交換した。再生したシュートは切り取って発根培地に移した。発根後はロックウールに定植して栽培し、T2 種子を採取した。

## 7. GUS活性の検出

蛍光量測定と組織化学的染色による GUS 活性の検出は Jefferson ら (51) の方法を改変して行った。エレクトロポレーション法または共存培養法により DNA を導入した BY-2 細胞を、培養後遠心により回収し 200 $\mu$ l の抽出用緩衝液 (51) を加え超音波破碎した。超音波破碎の際に、エレクトロポレーション法の場合には電気パルスを 30 秒間 1 回、共存培養法の場合には電気パルスを 30 秒間 3 回与えた。細胞残さを遠心により除き上清をタンパク質濃度の定量と GUS 活性の定量に用いた。また、pGAH $\Delta$ R、pGAHR あるいは pIG121HM を持つアグロバクテリウムと 4 日間共存培養した形質転換 BY-2 細胞をセルラーゼとペクトリアーゼで処理 (48) した後、1 mg/ml X-gluc、50 mM (pH7.0) 磷酸ナトリウム、0.35 M マンニトールを含む溶液中で 37 $^{\circ}$ C で一晩静置し、GUS 遺伝子を発現している細胞を化学染色した。

シロイヌナズナは、播種後 12 日間または 30 日間 MS 寒天培地の上で栽培した後、植物体を 1mg/ml X-gluc、50 mM (pH7.0) 磷酸ナトリウム、0.5% トリトン X-100 を含む溶液に浸し 30 分間真空浸透させた。溶液に浸したまま 37 $^{\circ}$ C で一晩静置した後、5% ホルムアルデヒド、5% 酢酸、20% エタノールを含む定着液に 10 分間、50% エタノールに 5 分間、100% エタノールに 5 分間浸し、葉緑素を除いた。

## 8. DNA 解析

BY-2 細胞からの全 DNA の抽出は Murray と Thompson による臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を用いる方法 (52) に以下のような改変を加えて行った。エレクトロポレーション法により DNA を導入したプロトプラストは、細胞内に導入されなかった DNA を除くために 30 unit/ml DNaseI を含む培地で培養し、12 時間後 0.4 M マンニトールで 2 回洗浄した後 70 $^{\circ}$ C の抽出用緩衝液 [2% CTAB、1.4% NaCl、20 mM EDTA、100 mM Tris-HCl (pH8.0)、1% ポリビニルピロリドン] を加えた。また共存培養法により形質転換 BY-2 細胞に DNA を導入する場合は、96 時間共存培養後に細胞を 2,4-D を含む LS 培地で 2 回洗浄し -80 $^{\circ}$ C で凍結させた。凍結した細胞をブレンダーで破碎し 70 $^{\circ}$ C の抽出用緩衝液を加えた。PCR は、抽出した DNA を鋳型として、DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) を使って行った。反応液の組成は 20 mM Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、25 mM KCl、100 mg/ml ゼラチン、50 mM dNTP、2 unit Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus)、1  $\mu$ M プライマー (2 種類)、0.5  $\mu$ g 鋳型 DNA で、全反応液量は 100  $\mu$ l である。この反応液に 50  $\mu$ l のミネラルオイ

ルを重層した後、94°C 1分間、60°C 2分間、72°C 2分間のサイクルを27サイクル行った。反応液は4%ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し解析した。用いたプライマーの塩基配列は、5'-CAGTATGGACGATTCAAG GC-3' (プライマー1)、5'-CAACGCTGATCAATTCCACA-3' (プライマー2)、5'-ACGCTGGAC TGGCATGAACT-3' (プライマー3)、5'-TGTTCTTTACGATGCCATTG-3' (プライマー4)、5'-TCGTGCGCATGTC TTGCGTT-3' (プライマー5)、5'-TGTTCTTTACGATGCCATTG-3' (プライマー6)であった。PCRによって増幅されたDNAをT4 DNAポリメラーゼと制限酵素で処理した後pUC18にクローニングし、Sangerらの方法(53)に従って塩基配列を決定した。

シロイヌナズナのゲノムDNAの抽出はMurrayとThompsonの方法(52)を改変して行った。播種後20日目のシロイヌナズナの本葉5,6枚を微量遠心管の中に入れ、200 µlの抽出用緩衝液 [3% CTAB、1.4% NaCl、20 mM EDTA、100 mM Tris-HCl (pH8.0)、1% ポリビニルピロリドン] を加え乳棒で擦りつぶした。さらに200 µlの抽出用緩衝液を加え60°Cに30分間静置した。500 µlのクロロフォルムを加え混合した後、遠心分離した水層に330 µlのイソプロパノールを加えDNAを沈殿させた。DNAは70%エタノールで洗浄し真空乾燥させた後、10 mM Tris-Cl (pH 8.0)、0.1 mM EDTAを含む緩衝液に溶解した。抽出したDNAはPCR解析とサザンブロット解析に用いられた。PCRはXL PCRキット (Perkin-Elmer Cetus) とDNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) を用いて付属のプロトコルに従って行った。10 ngのゲノムDNAを鋳型として上述のプライマー1とプライマー2を用いて、94°C 30秒間、60°C 1分間、72°C 3分間のサイクルを30サイクル行った。反応液は4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し解析した。サザンブロット解析は、Southernの方法(54)を改変して行った。ゲノムDNAを制限酵素で切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分画し、1.5 M NaCl、0.5 N NaOHで30分間変性させた後、同じ組成の溶液溶液を用いてナイロン膜 (商品名; GeneScreen Plus, Du-Pont社製) に吸着させた。フィルターは2xSSCで洗浄した後、80°Cで2時間減圧乾燥した。6xSSC、1% SDSにより65°Cで1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、Random Primed DNA Labeling kit (Boehringer Mannheim Biochemica) を用いて<sup>32</sup>Pで標識したプローブを加え、同様の条件で一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄は2xSSC、1% SDSにより65°Cで30分間を2回行った。

## 9. T-DNA挿入部位のマッピング

形質転換シロイヌナズナRS/dAc-RS #14を検定株NW4、NW6、NW7、NW8、NW9、NW127とそれぞれ交配し、F2種子をハイグロマイシンを含むMS寒天培地

の上で発芽させハイグロマイシン耐性 (Hyg<sup>r</sup>) 株 54-87 個体をロックウール (日東紡) に移植して育て、それぞれ Hyg<sup>r</sup> 株のうちマーカー遺伝子の表現型を示す株と野性型株の分離比を調べた。その結果、それぞれ第二、第三、第四、第五染色体のマーカー遺伝子を含む検定株 NW6、NW7、NW8、NW9 と交配した場合の観察値は、RS/dAc-RS #14 に挿入された T-DNA がそれらのマーカー遺伝子と連鎖していないと仮定したときの期待値と有意に一致した。第一染色体の検定株である NW4、NW127 と交配した場合には、マーカー遺伝子である *ch1* 遺伝子、*ap1* 遺伝子と T-DNA が連鎖していないと仮定したときの期待値と観察値は有意に異なった。したがって RS/dAc-RS #14 の T-DNA は第一染色体に挿入したと考えられる。RS/dAc-RS #14 と NW4、NW127 と交配によるさらに多くの F<sub>2</sub> 集団について解析したところ、Hyg<sup>r</sup> 株 736 個体のうち *ch1* の表現型を示す株は 77 個体、*ap1* の表現型を示す株は 78 個体であった。Hyg<sup>s</sup> 株は 233 個体であった。これらの値をもとに *ch1* 遺伝子座、*ap1* 遺伝子座と T-DNA 挿入部位の組換え率を算出し、Kosambi の地図作製関数 (55) から、T-DNA 挿入部位の染色体上の位置を決定した。



1. タバコ培養細胞での R-RS 組換えを検出するための実験系

タバコ培養細胞において R-RS 組換え系が機能するかどうか調べるために、図 1 に示すような二つの型のレポータープラスミドを構築した。

pGI は、一対の逆向きの RS 配列間の組換えによる逆位反応を検出するためのレポータープラスミドで、カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA プロモーター（35S プロモーター）の下流にプロモーターと逆向きに  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) のコード領域が連結してある。この GUS のコード領域は RS 配列にはさまれており、R タンパク質によって RS 配列間の逆位が誘導されるとプロモーターと正しい向きで連結し GUS 遺伝子が発現する。このレポーター遺伝子を IGUS (inverted GUS) レポーター遺伝子と名付けた [図 1 (A)]。pRGR は、pGI の RS 配列間で逆位が起きた後の構造と同じ構造を持つプラスミドで、正のコントロールとして使用するために構築された。pCATG は、一対の同一方向の RS 配列間の組換えによる欠失反応を検出するために構築されたプラスミドで、35S プロモーターと GUS のコード領域の間にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子が挿入された構造を持つ。そのままでは GUS 遺伝子は発現しないが、CAT 遺伝子は二つの同一方向の RS 配列にはさまれており R タンパク質によって RS 配列間の欠失が誘導されると GUS 遺伝子は発現する。このレポーター遺伝子を CATGUS レポーター遺伝子と名付けた [図 1 (B)]。

R 遺伝子を植物細胞で発現させるために、エンハンサー領域を重複させた 35S プロモーターを R 遺伝子に連結し、P35S-R 遺伝子を作製した。pdP35R はその P35S-R 遺伝子を含むプラスミドである。また負のコントロールとして、P35S-R 遺伝子のコード領域中の 144 番目から 1400 番目の塩基を欠失させた P35S- $\Delta$ R 遺伝子を含むプラスミド (pdP35 $\Delta$ R) を構築した。

2. エレクトロポレーション法によりタバコプロトプラストに導入したプラスミド DNA 上にある RS 配列間の組換え

対数増殖期のタバコ培養細胞 BY-2 から調製したプロトプラストに、レポータープラスミド (pGI、pCATG) と P35S-R 遺伝子を含むプラスミド (pdP35R) をエレクトロポレーション法により同時に導入し、レポータープラスミド上の RS 配列間の組換えが誘導されるか否かを検討した。エレクトロポレーション後 20 時間培養後のプロ

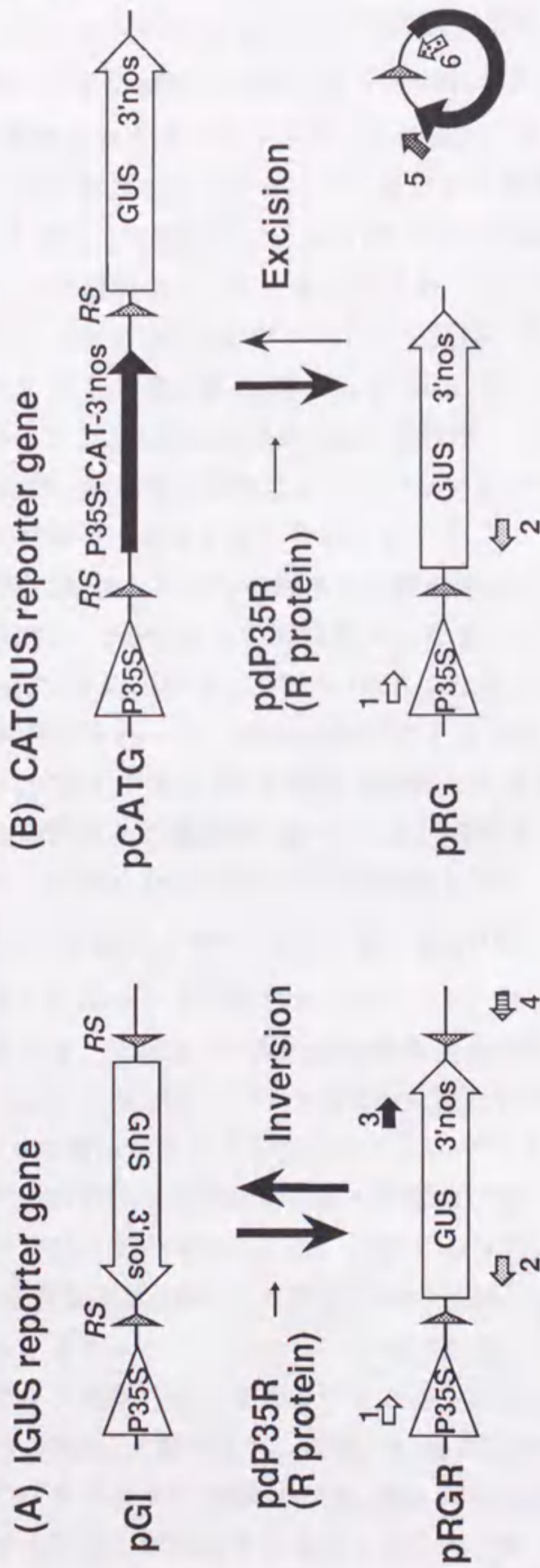


図 1. 植物細胞における R-RS 部位特異的組換えを検出するためのレポーター遺伝子の構造

(A) RS 配列間の逆位を検出するために使われた pGI プラスミド中の IGUS レポーター遺伝子の構造。pRGR は pGI の RS 配列間で逆位が起きた後と同じ構造を持つ。(B) RS 配列間の欠失を検出するために使われた pCATG プラスミド中の CATGUS レポーター遺伝子の構造。P35S, カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター; GUS, β-グルクロニダーゼのコード配列; CAT, クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼのコード配列; 3'nos, ノバリン合成酵素遺伝子の転写終結シグナル配列; RS, 組換え酵素 R タンパク質の認識配列。矢じりは RS 配列の向きを示す。pdP35R は P35S-R 遺伝子を含む。数字の付いた小さい矢印は PCR 解析に用いたプライマーの位置を示す。

トプラストから可溶性タンパク質を抽出し、GUS 活性を測定した [20 時間培養後に最も高い活性が検出される (図 2)。]。その結果、表 1 に示すように、pGI と pdP35R を同時に導入した場合 (表 1、3 行目) に、正のコントロール (pRGR) (7-9 行目) と比べると低いものの有意な GUS 活性が検出された。一方、pGI のみを導入した場合 (1 行目)、また pGI と pdP35 $\Delta$ R を同時に導入した場合 (2 行目) には有意な GUS 活性は検出されなかった。これらの結果は、タバコプロトプラスト内において pGI 中の RS 配列間の逆位が R タンパク質により誘導されたことを示唆する。同様に、pCATG を用いた実験結果は、pCATG 中の RS 配列には含まれた領域の欠失が R タンパク質により誘導されたことを示唆する (4-6 行目)。

レポータープラスミドと pdP35R プラスミドを同時に導入した後の GUS 活性の経時的变化を調べたところ、導入後 20 時間まで GUS 活性が上昇し、その後減少した (図 2)。したがってここで検出された GUS 活性は、pdP35R から一過的に合成された R タンパク質が、染色体に組み込まれていないレポータープラスミド上の RS 配列に対して働いた結果であると考えられる。

次に、RS 配列間で期待した通りの組換えが誘導されたことを DNA レベルで確かめるために、pCATG と pdP35R を同時に導入したプロトプラストを 30 unit/ml DNaseI を含む培地で 12 時間培養した後全 DNA を抽出し、図 1 に示したプライマー 5, 6 を用いて PCR 解析を行った。DNaseI はプロトプラストの外に残ったプラスミド DNA を除くために加えた。もし RS 配列間で期待した通りの組換えが起きていれば、プライマー 5 と 6 の間の 740 塩基対 (bp) の領域が増幅されるはずである。その結果図 3 に示すように、期待した通りのバンドが検出された (レーン 3)。一方、pCATG のみを導入した場合 (レーン 1)、また pCATG と pdP35 $\Delta$ R を同時に導入した場合 (レーン 2) にはバンドは検出されなかった。さらに増幅された DNA の塩基配列を決定したところ、正確な RS 配列間の組換えが誘導されたことがわかった (データは示さない)。ここで pGI については DNA 解析を行わず、pCATG についてのみ DNA 解析を行ったのは次のような理由による。プラスミドを構築する際に宿主とした大腸菌の中で非特異的な相同的組換えが低頻度で起こるため、RS 配列間で組換えを起こした分子が低い割合で存在する。ただし pCATG の RS 配列間の組換えで生じる CAT 遺伝子を含む環状 DNA は大腸菌の中で複製しないので、ほとんど存在しないと考えられる。またエレクトロポレーション法によりプロトプラストにプラスミドを導入する際に、実際に導入されるプラスミドはほんの一部で大部分は細胞外に残る。そのため DNaseI で除いても、細胞内に導入されたプラスミドに比べ多量の導入されなかったプラスミドが PCR の鋳型 DNA として混入すると思われる。そこで大腸菌内で起きた組換えが検出されるのを避けるため、CAT 遺伝子を含む環状

表1. エレクトロポレーション法によりに P35S-R 遺伝子とレポーター遺伝子を同時に導入した BY-2 プロトプラストの GUS 活性

Reporter carrier	R gene carrier	GUS activity (pmole/min/mg protein)	
pGI	no plasmid	0.85 ±	0.17
	pdP35ΔR	1.12 ±	0.10
	pdP35R	21.3 ±	1.8
pCATG	no plasmid	1.13 ±	0.26
	pdP35ΔR	1.26 ±	0.11
	pdP35R	30.3 ±	10.0
pRGR	no plasmid	208 ±	28
	pdP35ΔR	161 ±	33
	pdP35R	125 ±	16

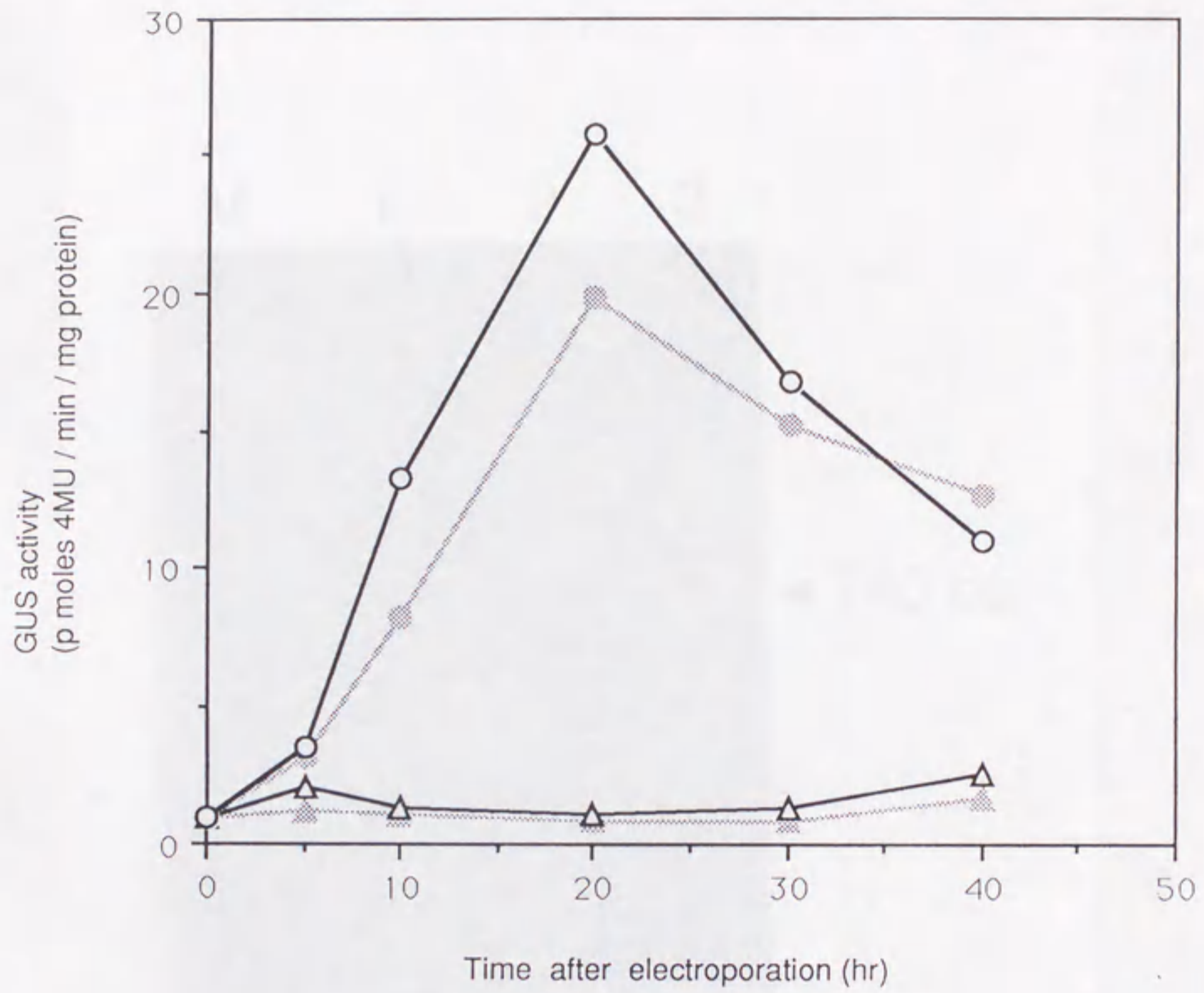


図2. エレクトロポレーション法により P35S-R 遺伝子とレポーター遺伝子を同時に導入した BY-2 プロトプラストの GUS 活性の経時的変化

それぞれ次のような組み合わせでプラスミド DNA を導入した。

- ▲ pGI + pdP35 $\Delta$ R
- pGI + pdP35R
- △ pCATG + pdP35 $\Delta$ R
- pCATG + pdP35R

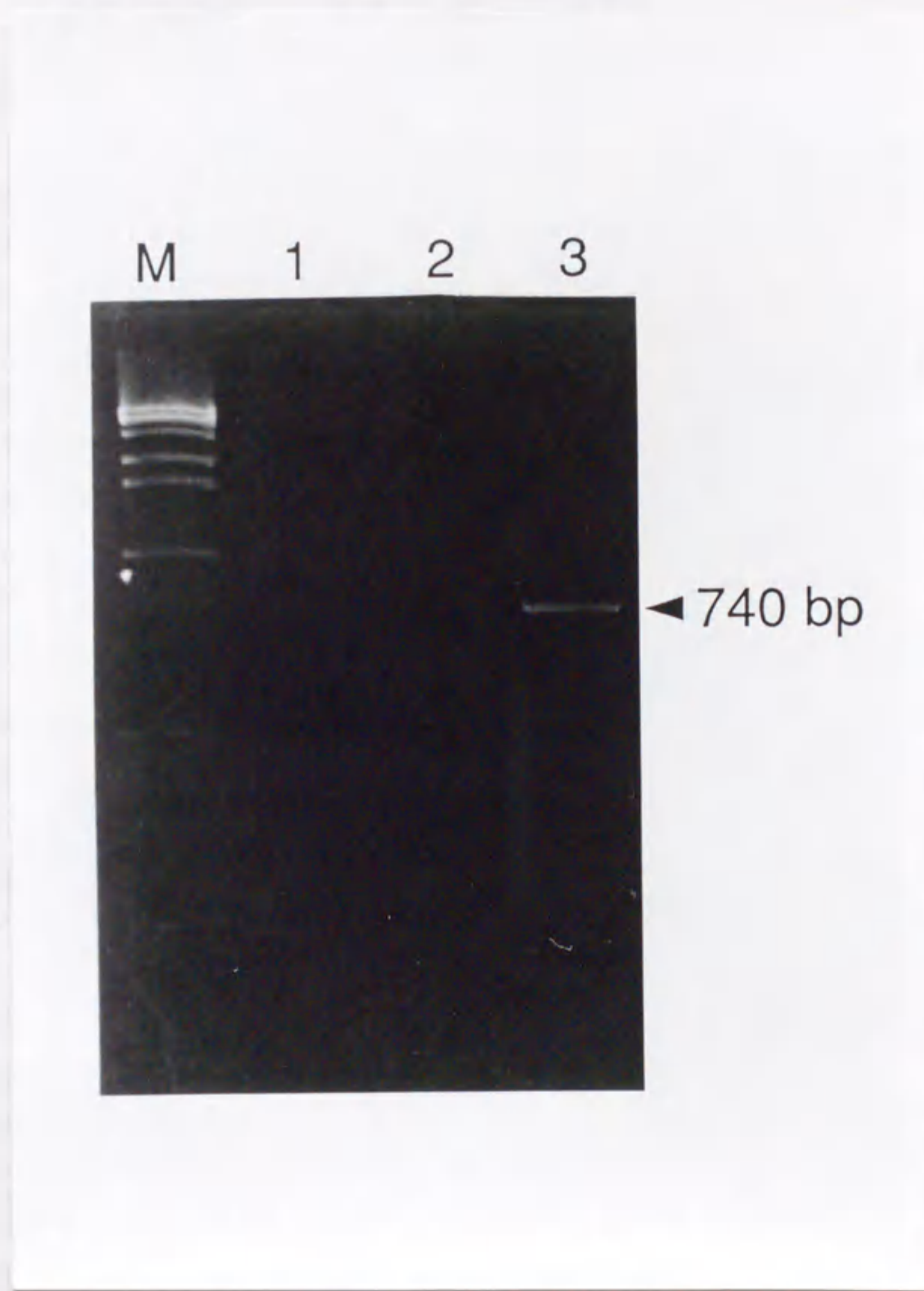


図3. プラスミド DNA 上にある RS 配列間の組換えの PCR 解析による検出

pCATG を単独で導入した BY-2 プロトプラスト (レーン 1)、pCATG と pdP35ΔR を同時に導入した BY-2 プロトプラスト (レーン 2)、pCATG と pdP35R を同時に導入した BY-2 プロトプラスト (レーン 3) からそれぞれ抽出した DNA を鋳型 DNA として、図 1 に示したプライマー 5 と 6 を用いて PCR を行い、増幅された DNA を 4% ポリアクリルアミドゲルで分画した。λ ファージ DNA の StyI 切断断片 (レーン M) をサイズマーカーとして使用した。

DNA 上の RS 配列についてのみ DNA 解析を行った。

### 3. タバコ培養細胞の染色体上にある RS 配列間の組換え

RS 配列がタバコ染色体上にある場合に R タンパク質によって RS 配列間の組換えを誘導できるかどうかを検討するために、CATGUS レポーター遺伝子を染色体に組み込んだ形質転換 BY-2 [BY-2(CATGUS-1), BY-2(CATGUS-2)] と IGUS レポーター遺伝子を染色体に組み込んだ形質転換 BY-2 [BY-2(IGUS)] を作製した。これらの形質転換 BY-2 に P35S-R 遺伝子を導入するために、形質転換 BY-2 を P35S-R 遺伝子を含むバイナリーベクタープラスミド (pGAHR) を持つアグロバクテリウム [EHA101(20)] と共存培養した。アグロバクテリウムのスーパーヴィルレンス株を用いた共存培養法による BY-2 細胞への一過的な遺伝子導入の効率は、エレクトロポレーション法による導入の効率よりも 10 倍以上高いことが示されている (56, 57)。共存培養開始後 48、72、96 時間後にそれぞれ GUS 活性を測定した。その結果、表 2 に示すように、BY-2(CATGUS-1)、BY-2(CATGUS-2)、BY-2(CATGUS) のいずれに P35S-R 遺伝子を導入した場合も有意な GUS 活性の上昇が検出された。一方、P35S- $\Delta$ R 遺伝子を含む pGAH $\Delta$ R を持つアグロバクテリウムと共存培養した場合には GUS 活性の上昇は検出されなかった。これらの結果はタバコ染色体上にある RS 配列間の組換えが R タンパク質によって誘導されることを示唆する。

次に、P35S-R 遺伝子が導入された細胞のうちどれくらいの細胞で組換えが起きたかを調べるために、P35S-R 遺伝子を含む pGAHR を持つアグロバクテリウムと共存培養 96 時間後の BY-2(CATGUS-1) を X-グルクロニドを用いて化学染色し、GUS 遺伝子を発現している細胞の数を調べた。BY-2 細胞は普通クラスターをなしているので、GUS タンパク質に分解された基質が隣接した細胞に拡散するのを防ぐために、酵素処理により細胞をプロトプラスト化して個々の細胞を遊離させた後染色を行った。その結果、pGAHR を持つアグロバクテリウムと共存培養した場合には 2.0% の細胞が青く染色された (表 3、図 4)。正のコントロールとして、GUS 遺伝子を含むバイナリーベクタープラスミド (pIG121HM) を持つアグロバクテリウムと共存培養した場合には 4.6% の細胞が青く染色された (表 3、図 4)。P35S-R 遺伝子と GUS 遺伝子の遺伝子導入効率が同程度だと仮定し、4.6% の細胞に P35S-R 遺伝子が導入されたとすれば、P35S-R 遺伝子が導入された細胞のうち 43% の細胞で組換えが起きたと考えられる。

次に、タバコ染色体上の RS 配列間で期待した通りの組換えが誘導されたことを DNA レベルで確かめるために、pGAHR を持つアグロバクテリウムと 96 時間共存培

表 2. レポーター遺伝子を持つ形質転換 BY-2 の P35S-R 遺伝子導入後の GUS 活性

Transformed cell line	Binary vector	GUS activity (pmole/min/mg protein) after co-culturing for		
		48 hr	72 hr	96 h
BY-2(CATGUS-1)	pGAH $\Delta$ R	14.2 $\pm$ 2.3	9.1 $\pm$ 0.7	11.5 $\pm$ 1.4
	pGAHR	81.5 $\pm$ 17.6	163 $\pm$ 2.7	252 $\pm$ 4.4
BY-2(CAT/GUS-2)	pGAH $\Delta$ R	23.3 $\pm$ 0.7	23.9 $\pm$ 0.8	19.3 $\pm$ 0.7
	pGAHR	36.4 $\pm$ 4.0	94.4 $\pm$ 2.3	124 $\pm$ 5
BY-2(IGUS)	pGAH $\Delta$ R	16.2 $\pm$ 2.6	15.0 $\pm$ 1.1	15.6 $\pm$ 1.4
	pGAHR	18.8 $\pm$ 3.1	52.9 $\pm$ 7.5	90.5 $\pm$ 12.4



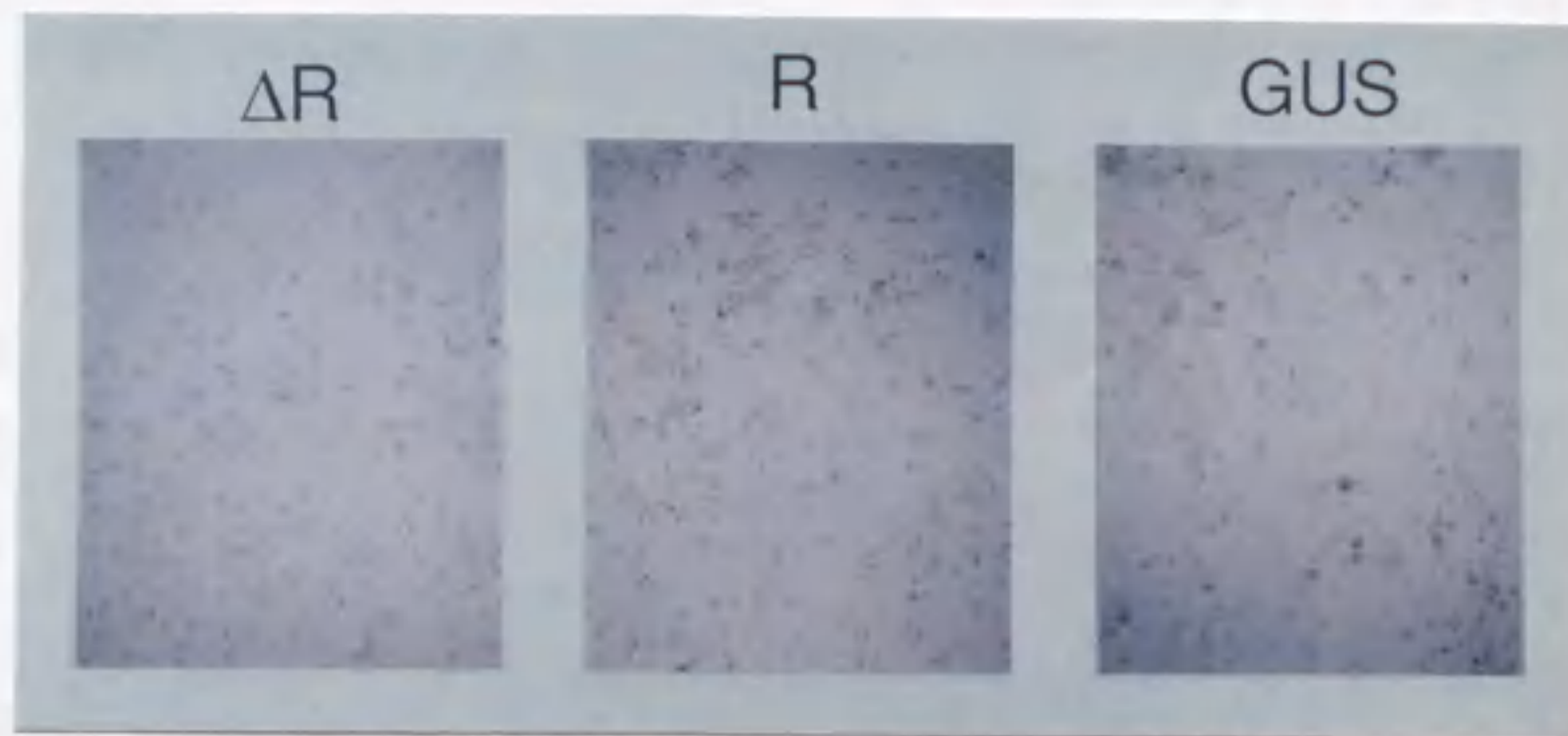


図4. アグロバクテリウムとの共存培養により P35S-R 遺伝子を導入した BY-2(CATGUS-1) の化学染色による組換えの検出

BY-2(CATGUS-1) にアグロバクテリウムとの96時間共存培養により一過的に P35S- $\Delta R$  遺伝子 (pGAH $\Delta R$ ) を導入した場合 ( $\Delta R$ ) には青く染色される細胞はみられず、P35S-R 遺伝子 (pGAHR) を導入した場合 (R) と P35S-GUS 遺伝子 (pIG121HM) を導入した場合 (GUS) に青く染色される細胞がみられた。染色は細胞をプロトプラスト化した後行った。

表3. アグロバクテリウムとの共存培養により P35S-R 遺伝子を導入した BY-2(CAT/GUS-1) の化学染色による組換えの検出

Binary vector	Number of blue cells	Total cells	Percentage of blue cells
pGAH $\Delta R$	0	1542	0
pGAHR	43	2153	2.0
-----			
pIG121HM	70	1525	4.6

養した形質転換 BY-2 から全 DNA を抽出し、図 1 に示したプライマーを用いて PCR 解析を行った。BY-2(CATGUS-1)についてはプライマー 1, 2 を、BY-2(IGUS)についてはプライマー 1, 2 および 3, 4 を用いた。もし RS 配列間で期待した通りの組換えが起きていれば、プライマー 1, 2 を用いた場合には 820 bp の DNA 断片が、プライマー 3, 4 を用いた場合には 590 bp の DNA 断片が増幅される。その結果、図 5 に示すように期待した通りのバンドが検出された (レーン 2, 4, 6)。一方、pGAHΔR を持つアグロバクテリウムと共存培養した場合にはバンドは検出されなかった (レーン 1, 3, 5)。さらに増幅された DNA の塩基配列を決定したところ、正確な RS 配列間の組換えが誘導されたことがわかった (データは示さない)。

#### 4. シロイヌナズナにおける R-RS 組換えの検出系

シロイヌナズナ植物体において R-RS 組換えを誘導し、体細胞と生殖細胞における組換えの頻度とパターンを解析するために、CATGUS レポーター遺伝子と P35S-R 遺伝子を染色体に組み込んだ形質転換シロイヌナズナをそれぞれ作製した。その中から P35S-R 遺伝子を染色体上の一箇所あるいは二箇所に持つ 3 系統 (R-21, R-24, R-51) (表 4) と CATGUS レポーター遺伝子を染色体上の一箇所に持つ 3 系統 (CATGUS-6, CATGUS-11, CATGUS-12) (表 4) を選び、それぞれ導入遺伝子のホモ接合体 (二箇所に導入されたものは少なくとも一方についてのホモ接合体) を T3 世代から分離し以下の解析に用いた。

CATGUS レポーター遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナの花粉を P35S-R 遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナの雌しべに受粉させて交配し、得られた F1 植物と、さらにその自殖による F2 植物を X-グルクロニドを用いて組織化学的に染色した。R 遺伝子と GUS 遺伝子を発現させるために使用した 35S プロモーターは植物体のほとんどの組織で恒常的な活性を持つと考えられているので (58)、組換えは植物体のランダムな部位でランダムな時期に誘導されることが期待される。したがって、この系では、F1 植物と F2 植物の体細胞における組換えは、組換えの起きた時期と部位によって様々なパターンのモザイク状の染色として検出されることが期待される。また、F1 植物の生殖細胞における組換えは、次世代の F2 植物の植物体全体の染色として検出されることが期待される (図 6)。

#### 5. シロイヌナズナの体細胞における R-RS 組換えの組織化学的検出

F1 植物を播種後 12 日目に染色した結果、解析した全ての F1 植物で青く染色される部分がみられた [図 7 A(a)(b) B]。このことは全ての F1 植物のいずれかの体細胞

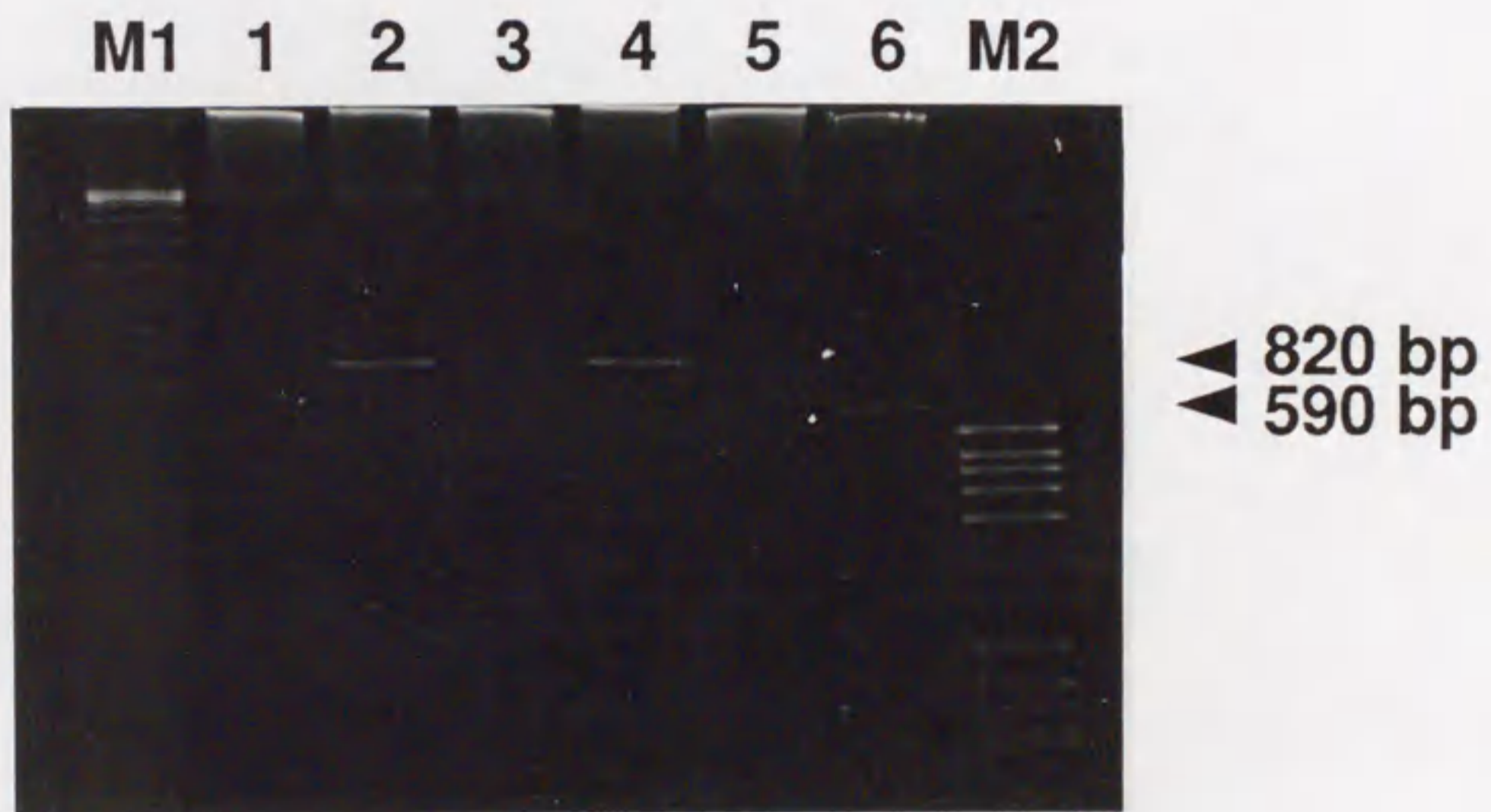


図5. タバコ培養細胞 BY-2 の染色体上にある RS 配列間の組換えの PCR 解析による検出

P35S- $\Delta$ R 遺伝子 (レーン 1) または P35S-R 遺伝子 (レーン 2) を持つアグロバクテリウムと共存培養した BY-2 (CATGUS-1)、P35S- $\Delta$ R 遺伝子 (レーン 3, 5) または P35S-R 遺伝子 (レーン 4, 6) を持つアグロバクテリウムと共存培養した BY-2 (IGUS) から抽出した DNA を鋳型 DNA として、図 1 に示したプライマー 1 と 2 (レーン 1-4) またはプライマー 3 と 4 (レーン 5, 6) を用いて PCR を行い、増幅された DNA を 4% ポリアクリルアミドゲルで分画した。 $\lambda$  フォージ DNA の *StyI* 切断断片 (レーン M1) と pBR322 の *HaeIII* 切断断片 (レーン M2) をサイズマーカーとして使用した。

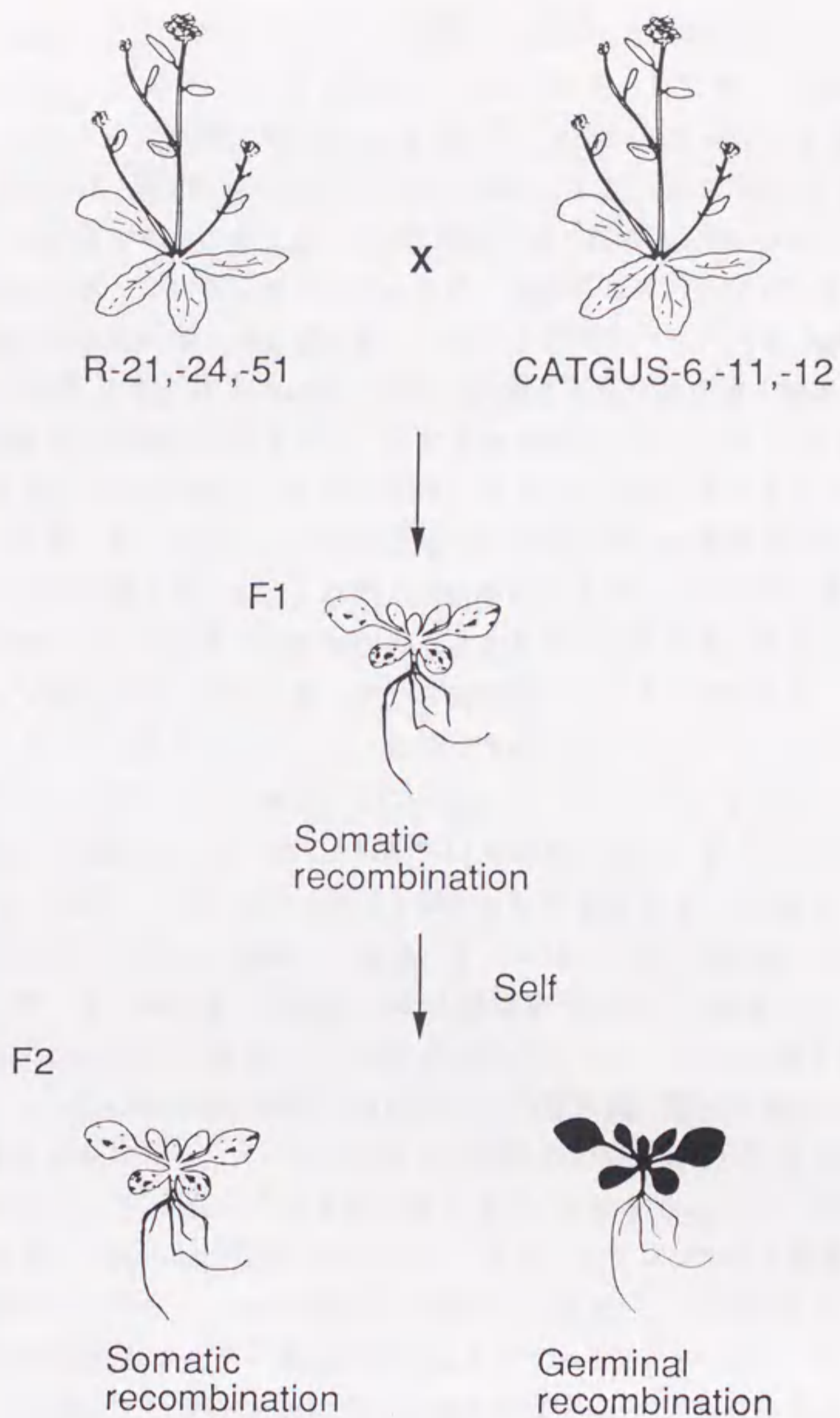


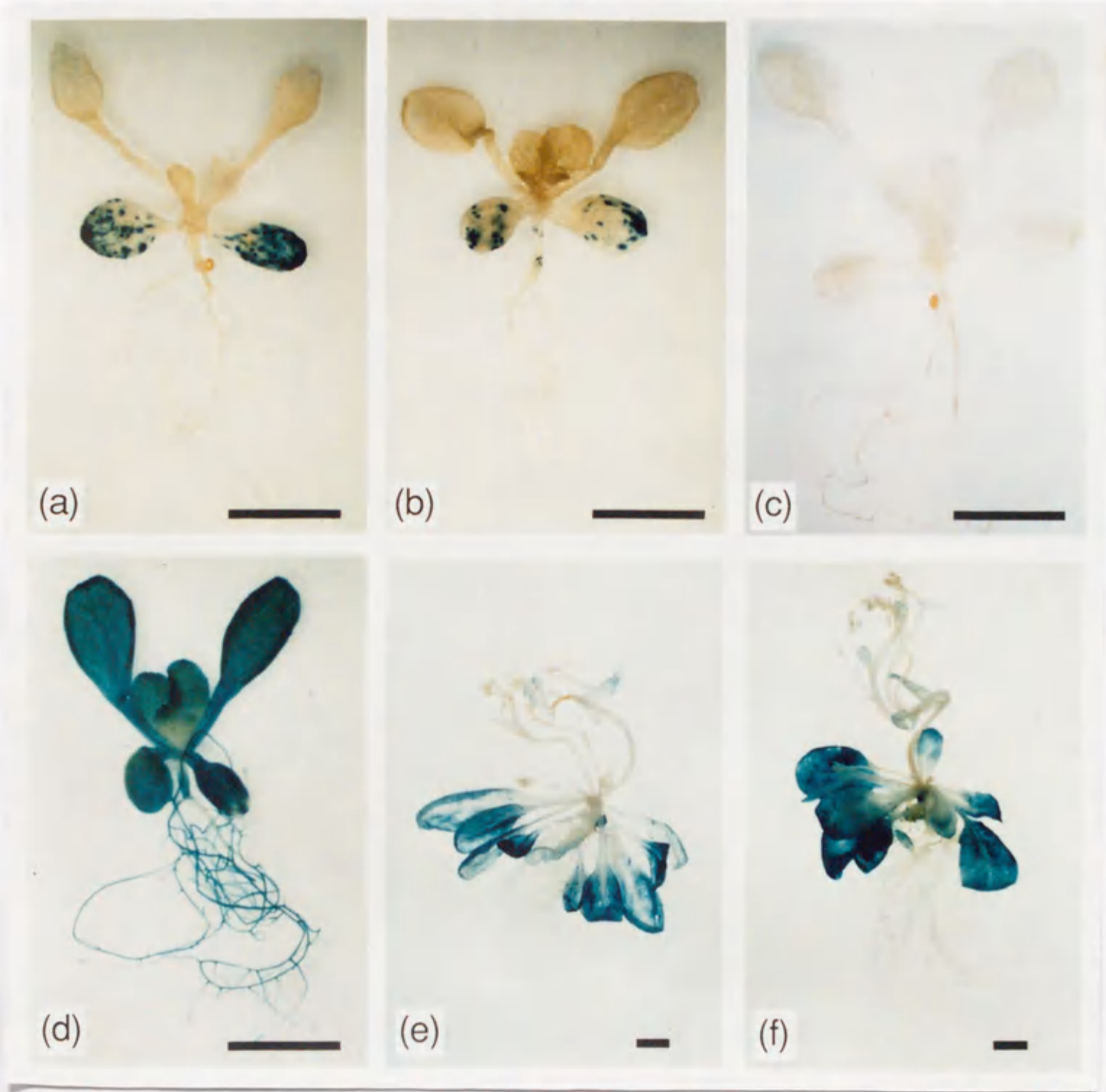
図 6. シロイヌナズナの体細胞と生殖細胞における R-RS 部位特異的組換えを検出するための実験系

CATGUS レポーター 遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナ (CATGUS-6, CATGUS-11, CATGUS-12) と P35S-R 遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナ (R-21, R-24, R-51) を交配し、得られた F1 植物と、さらにその自殖による F2 植物を X-グルクロニドを用いて組織化学的に染色した。この系では、F1 植物と F2 植物の体細胞における組換えは、様々なパターンのモザイク状の染色として検出されることが期待される。また、F1 植物の生殖細胞における組換えは、次世代の F2 植物の植物体全体の染色として検出されることが期待される。

でRS配列間の組換えが起きたことを示す。交配する前のCATGUSレポーター遺伝子を持つ植物を染色した場合には、青く染色される部分はみられなかった[図8A(c)]。また、35Sプロモーターに直接つないだGUS遺伝子(P35S-GUS遺伝子)を持つ植物を染色した場合には、植物体のほぼ全体が青く染色された[図7A(d)]。F1植物の染色パターンは様々であったが、多くのF1植物では、図7A(a)(b)のように子葉にパッチ状の青いスポットが多くみられた。また、本葉にも少数のスポットがみられた。胚軸と根も部分的に青く染色された。このような染色パターンをType Aと呼ぶことにする(図8)。稀に図7B(a)のように、子葉と胚軸全体が青く染まり根も多くの部分が染色された個体が見られた。このような染色パターンをType Bと呼ぶことにする(図8)。さらに稀に、図7B(c)(d)(e)のように本葉にセクター状の染色がみられるものがあった。セクターは葉の基部から主脈に沿って葉身まで広がり、葉のちょうど半分が染色されたもの、扇形に染色されたもの、主脈の途中までと葉身の片側の中央部あるいは縁まで染色が広がったものがみられた。また、セクターが観察された3個体ではいずれも第一葉から第三葉にセクターがみられ、第四葉と第五葉にはセクターはみられなかった。このような染色パターンをType Cと呼ぶことにする(図8)。表1にまとめたように、Type Bの染色パターンを示したF1個体はR-21系統とCATGUS-11またはCATGUS-12系統を交配した場合にのみみられた。またType Cの染色パターンを示したF1個体はR-21系統とCATGUS-12系統を交配した場合にのみみられた。Type Aの染色パターンはすべての組み合わせのF1個体で見られたが、青く染色される部分はR-51系統を親に用いた場合より、R-21系統、R-24系統を親に用いた場合により多くみられた。また、CATGUS-6系統を親に用いた場合より、CATGUS-11系統、CATGUS-12系統を親に用いた場合により多く部分に青い染色がみられた。ノーザンブロット解析の結果、R-51系統ではR-21系統、R-24系統に比べR遺伝子の発現量が低く(データは示さない)、組換え頻度とR遺伝子の発現量の間に相関関係がみられた。また、サザンブロット解析の結果、CATGUS-6系統では1コピー、CATGUS-11系統では4コピー、CATGUS-12系統では2コピーのCATGUSレポーター遺伝子が導入されていることがわかった(データは示さない)。CATGUS-11系統を親に用いた場合にはType Cはみられなかったため、組換え頻度はCATGUS-12系統を親に用いた場合に比べ同程度以下と考えられる。したがって、組換え頻度とCATGUSレポーター遺伝子のコピー数の間に厳密な相関関係はみられなかった。

播種後30日目のF1植物を同様にX-ゲルクロニドを用いて組織化学的に染色した[図7(e)(f)]。12日目の植物では本葉はわずかな部分しか青く染色されなかったが、30日目の植物では本葉の多くの部分が染色された。また、若い葉より古い葉でより多くの青いスポットが観察された。花のつぼみにも青く染色される部分がみられた。

(A)



(B)



(前ページ)

図7. F1植物の体細胞におけるR-RS部位特異的組換えの組織化学的染色による検出

(A) Type A の染色パターンを示した F1 植物。CATGUS-6 と R-21 の交配による F1 植物 (a)、CATGUS-6 と R-51 の交配による F1 植物 (b)、交配する前の CATGUS-6 植物 (c)、P35S-GUS 遺伝子を持つ植物 (d) をそれぞれ播種後 12 日目に、X-gluc を用いて染色した。CATGUS-6 と R-21 の交配による F1 植物 (e)、CATGUS-12 と R-21 の交配による F1 植物 (f) をそれぞれ播種後 30 日目に、X-gluc を用いて染色した。図中の棒線は 5 mm を示す。(B) Type B と Type C の染色パターンを示した F1 植物。CATGUS-11 と R-21 の交配による F1 植物 (a)、CATGUS-12 と R-21 の交配による F1 植物 (b, c, d) をそれぞれ播種後 12 日目に、X-gluc を用いて染色した。図中の棒線は 5 mm を示す。

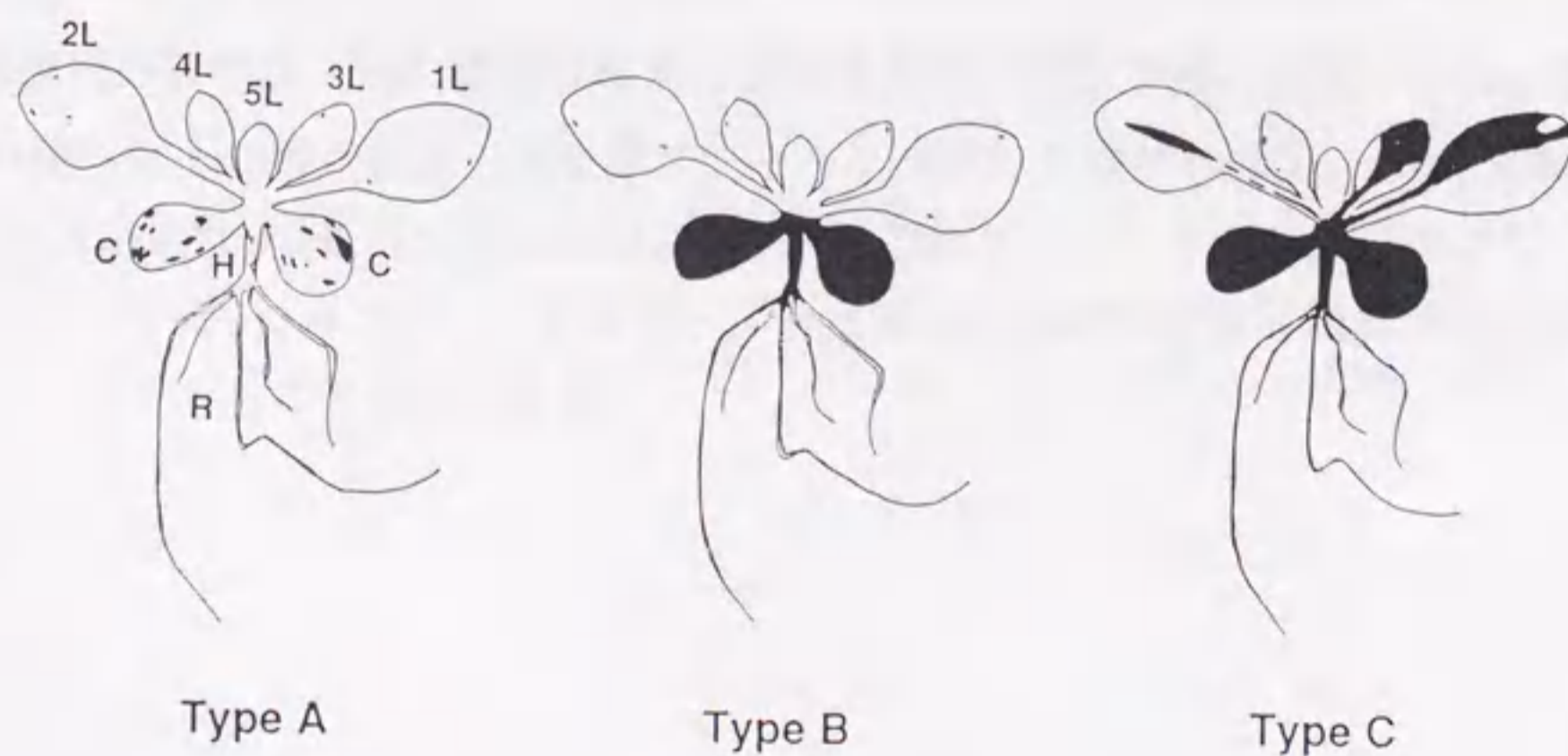


図8. 播種後12日目のF1植物の染色パターンの模式図

R, 根; H, 胚軸; C, 子葉; 1L, 第一葉; 2L, 第二葉; 3L, 第三葉; 4L, 第四葉; 5L 第五葉

表 4. それぞれの系統の交配による F1 植物の組織化学的染色のパターン

Parents	R-21	R-24	R-51
	[2] <sup>b</sup>	[2]	[1]
CATGUS-6 [1] <sup>b</sup>	Type A (8) <sup>a</sup>	Type A (6)	Type A (2)
CATGUS-11 [1]	Type A (4) Type B (2)	Type A (7)	Type A (4)
CATGUS-12 [1]	Type A (7) Type B (2) Type C (3)	Type A (6)	Type A (5)

<sup>a</sup> 括弧内の数字はそれぞれのタイプの染色パターンを示した F1 個体数を示す。

<sup>b</sup> 角形括弧内の数字は、抗生物質に対する耐性を指標に遺伝学的に決定された、導入遺伝子の染色体上の挿入箇所の数を示す。サザンブロット解析の結果、CATGUS-6 系統、CATGUS-11 系統、CATGUS-12 系統の CATGUS レポーター遺伝子のコピー数はそれぞれ 1 コピー、4 コピー、2 コピー、また R-21 系統の P35S-R 遺伝子のコピー数は 1 コピーであることが示された。



次に、観察された GUS 遺伝子の発現が、確かに CATGUS レポーター遺伝子の RS 配列間の組換えが起きた結果によるものかどうか調べるために、R-21 系統と CATGUS-12 系統の交配により得られた F1 植物のゲノム DNA を、図 9 (A) に示したプライマー 1, 2 を用いて PCR 法により解析した。RS 配列間で組換えが起これば、0.82 kbp の DNA 断片が増幅されるはずである。その結果、図 9 (B) に示すように、解析した全ての F1 植物のゲノム DNA から 0.82 kbp の DNA 断片の増幅が検出された。一方、親である CATGUS-12 植物のゲノム DNA を鋳型にした場合には、0.82 kbp の DNA 断片の増幅は検出されず、組換えの起こっていない CATGUS レポーター遺伝子から増幅されることが期待される 3.3 kbp の DNA 断片の増幅が検出された。

以上の結果から、RS 配列を持つ形質転換シロイヌナズナと P35S-R 遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナを交配することにより、F1 植物の様々な器官の体細胞において RS 配列間の組換えが誘導されることが示された。ただし組換えの頻度や時期は用いた親の系統によって様々であった。

#### 6. シロイヌナズナの生殖細胞における R-RS 組換えの検出

F1 植物の生殖細胞における R-RS 組換えの組換え頻度を調べるために、F1 植物の自殖によって得られた F2 植物を X-グルクロニドを用いて組織化学的に染色した。RS 配列間で組換えの起きた CATGUS レポーター遺伝子を持つ生殖細胞を受け継いだ F2 植物は、植物体全体が青く染色されることが期待される。R-21 系統と CATGUS-12 系統を交配した後代の F2 植物 1600 個体を染色したところ、2.4% に相当する 38 個体で図 10 (d) のように植物体全体が青く染色された (表 5)。F2 植物のうち CATGUS レポーター遺伝子を持つものは  $3/4$  であることを考慮すると、この場合の生殖細胞における組換え頻度は  $38/1600 \div 3/4 \times 100 = 3.2 (\%)$  と計算される。また、47% の F2 植物において、F1 植物を染色した際にみられた Type A, Type B と同様の部分的な染色がみられた [図 10 (a)(b)、表 5]。51% の F2 植物はまったく染色されなかった [図 10 (c)、表 5]。R-21 系統はハイグロマイシン耐性株と感受性株の分離比から染色体上の二箇所を導入遺伝子が組み込まれたと考えられたが、サザンプロット解析の結果、ハイグロマイシン耐性遺伝子は 3 コピー導入されていたが P35S-R 遺伝子は 1 コピーのみ導入されていたことがわかった (データは示さない)。また、CATGUS-12 系統では CATGUS レポーター遺伝子は染色体上の一箇所に 2 コピー導入されていることがわかった。したがって F2 植物のうち P35S-R 遺伝子と CATGUS レポーター遺伝子の両方を持つものは  $9/16$  と期待されるので、それらのうち多くの個体で体細胞における組換えが誘導されたと考えられる。R-21 系統と

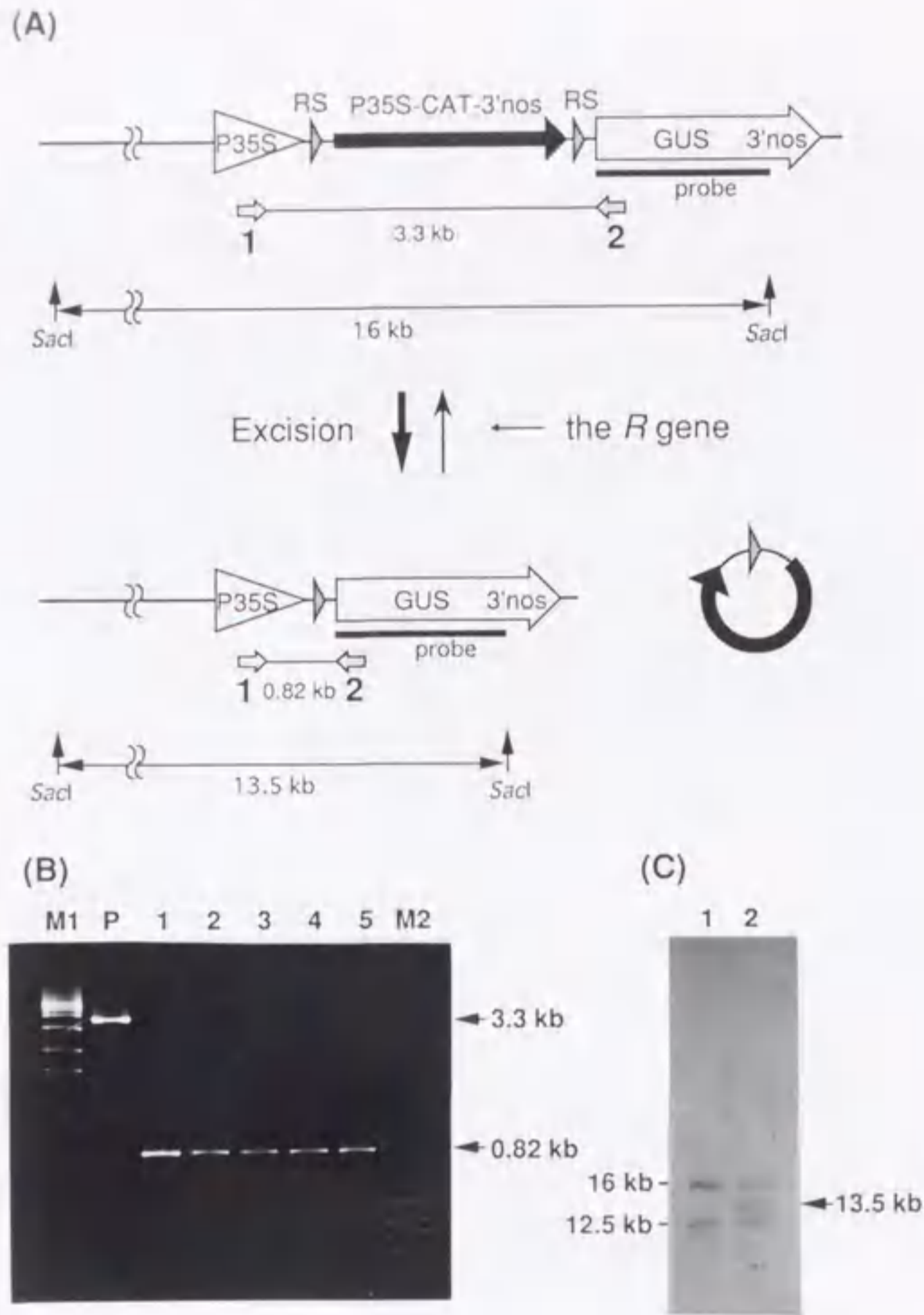


図9. シロイヌナズナにおける R-RS 部位特異的組換えの DNA 解析による検出

(A) CATGUS レポーター遺伝子の構造。数字の付いた小さい矢印は PCR 解析に用いたプライマーの位置を示す。図中の *SacI* 部位は CATGUS-12 系統についてのもので、サザンブロット解析に使用された。太い実線はサザンブロット解析のプロープとして使用された領域を示す。P35S, カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター; GUS,  $\beta$ -グルクロニダーゼのコード配列; CAT, クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼのコード配列; 3'nos, ノパリン合成酵素遺伝子の転写終結シグナル配列; RS, 組換え酵素 R タンパク質の認識配列。矢じりは RS 配列の向きを示す。(B) 体細胞における R-RS 組換えの PCR 解析による検出。レーン M1,  $\lambda$  フェージ DNA の *StyI* 切断断片 (サイズマーカー); レーン P, CATGUS-12 植物; レーン 1-5, R-21 植物と CATGUS-12 植物の交配によるそれぞれ別個の F1 個体; レーン M2, pBR322 の *HaeIII* 切断断片 (サイズマーカー)。(C) 生殖細胞における R-RS 組換えのサザンブロット解析による検出。レーン 1, CATGUS-12 植物; レーン 2, R-21 植物と CATGUS-12 植物を交配した後代の F2 個体で植物体全体が染色されたもののうち P35S-R 遺伝子を持たない個体。

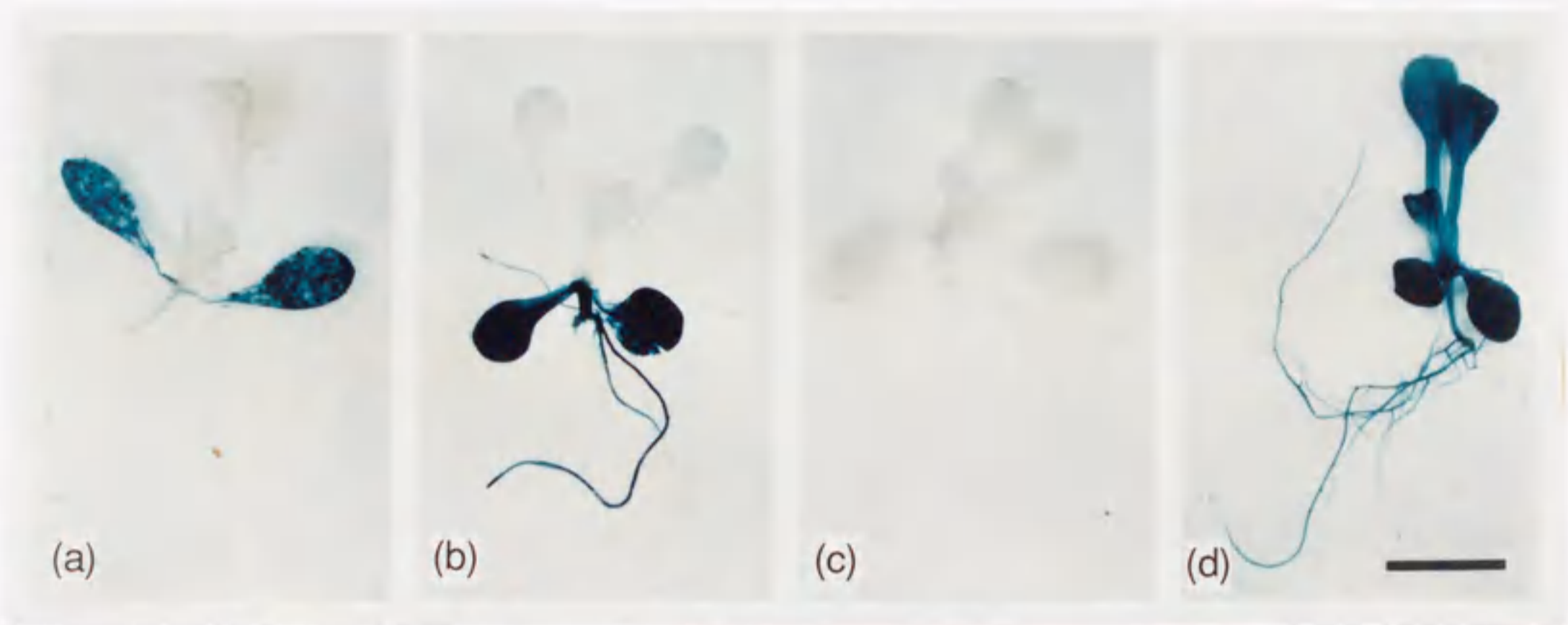


図 10. F2 植物の組織化学的染色による解析

CATGUS-12 と R-21 の交配による F2 植物 (f) を播種後 12 日目に X-gluc を用いて染色したところ、47% の F2 植物で (a) (b) のような部分的な染色がみられ、51% の F2 植物は (c) のように全く染色がみられず、2.4% の F2 植物は (d) のように植物体全体が染色された。図中の棒線は 5 mm を示す。

表 5. シロイヌナズナの生殖細胞における R-RS 部位特異的組換えの頻度

Transgenic parents	Total number of F2 plants examined	Number of plantlets with staining patterns of indicated type		
		Type A and B	No staining	Staining of entire plant
CATGUS-12 x R-21	1,600	745 (46.5%)	817 (51.1%)	38 (2.4%)
CATGUS-12 x self	1,000	0 (0%)	1,000 (100%)	0 (0%)
CATGUS-6 x R-21	1,200	750 (62.5%)	449 (37.4%)	1 (0.1%)
CATGUS-6 x self	1,000	0 (0%)	1,000 (100%)	0 (0%)

CATGUS-6 系統を交配した後代の F2 植物 1200 個体を染色した場合には、全体が青く染色されたものは 1 個体のみであった (表 5)。したがって、この場合の生殖細胞における組換え頻度は  $1/1200 \div 3/4 \times 100 = 1.0$  (%) と計算される。したがって、体細胞における組換えがより高頻度であった CATGUS-12 系統を用いた場合の方が、生殖細胞における組換えも高頻度であった。また、62.5% の F2 植物において部分的な染色がみられた。CATGUS-6 系統では CATGUS レポーター遺伝子は染色体上に 1 コピー導入されており、この場合も F2 植物のうち P35S-R 遺伝子と CATGUS レポーター遺伝子の両方を持つものは 9/16 期待されるので、それらのうち多くの個体で体細胞における組換えが誘導されたと考えられる。

F2 個体における植物体全体の青い染色が、F1 植物の生殖細胞で RS 配列間の組換えが起きていた CATGUS レポーター遺伝子を受け継いだためであることを、DNA レベルで確かめるために、サザンブロット解析を行った。CATGUS-12 系統は CATGUS レポーター遺伝子を 2 コピー持っており、ゲノム DNA を *SacI* で切断し GUS 遺伝子のコード領域をプローブとしてサザンブロット解析を行うと 12.5 kbp と 16 kbp のバンドが検出された [図 9 (C) レーン 1]。R-21 系統と CATGUS-12 系統を交配した後代の F2 個体で植物体全体が染色されたもののうち P35S-R 遺伝子を持たない個体について同様のサザン解析を行ったところ、12.5 kbp と 16 kbp のバンドに加え 13.5 kbp のバンドが検出された [図 9 (C) レーン 2]。CATGUS レポーター遺伝子の RS 配列間の距離は 2.5 kbp なので、13.5 kbp のバンドは 16 kbp のバンドが RS 配列間の欠失により短くなったために生じたと考えられる。この個体は PCR 解析により P35S-R 遺伝子を持たないことが確認されている (データは示さない) ので、この RS 配列間の欠失は F1 植物の生殖細胞で起こっていたはずである。16 kbp と 13.5 kbp の両方のバンドが検出されたのは、この個体は 16 kbp のバンドに対応する CATGUS レポーター遺伝子のコピーについてホモ接合体であり、そのうちの一方で RS 配列間の欠失が起きたためと考えられる。

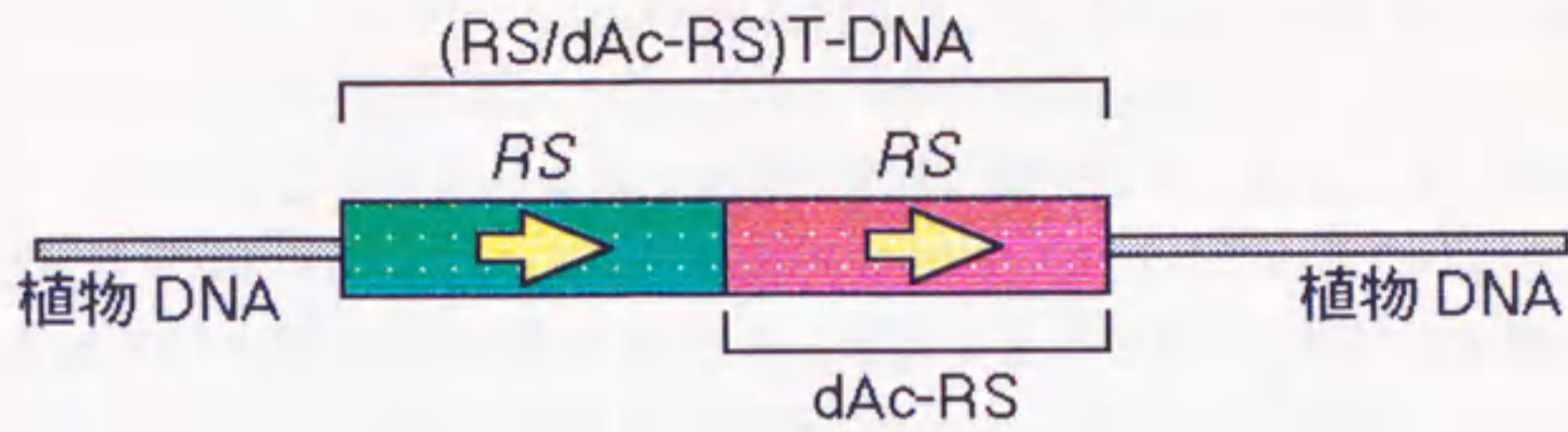
## 7. R-RS 組換え系と Ac 転移系を利用した変異株作製法の原理

R-RS 組換え系とトウモロコシの Ac 転移系を組み合わせて、次のような三つの段階から成る変異株作製法を考案した (図 11)。

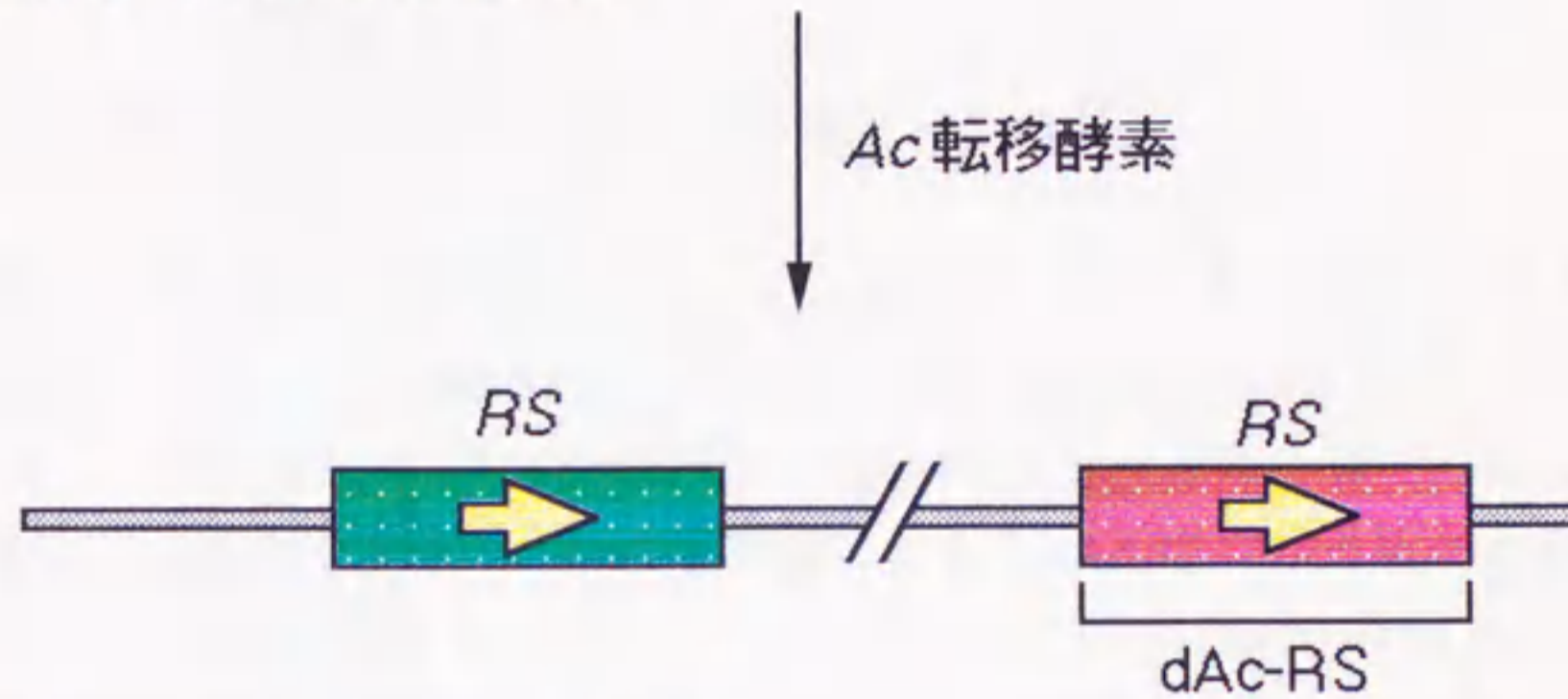
(1) Ac 転移因子内部の Ac 転移酵素遺伝子を削除し RS 配列を挿入した非自律性転移因子 dAc-RS とさらにもう一つの RS 配列を持つ T-DNA [(RS/dAc-RS)T-DNA] を、植物染色体の一箇所に挿入する。

(2) (RS/dAc-RS)T-DNA を持つ植物と Ac 転移酵素遺伝子を持つ植物を交配し、dAc-RS の転移を誘導する。

(1) (RS/dAc-RS)T-DNA の植物染色体への組み込み



(2) dAc-RS の転移の誘導



(3) RS 配列間の欠失の誘導

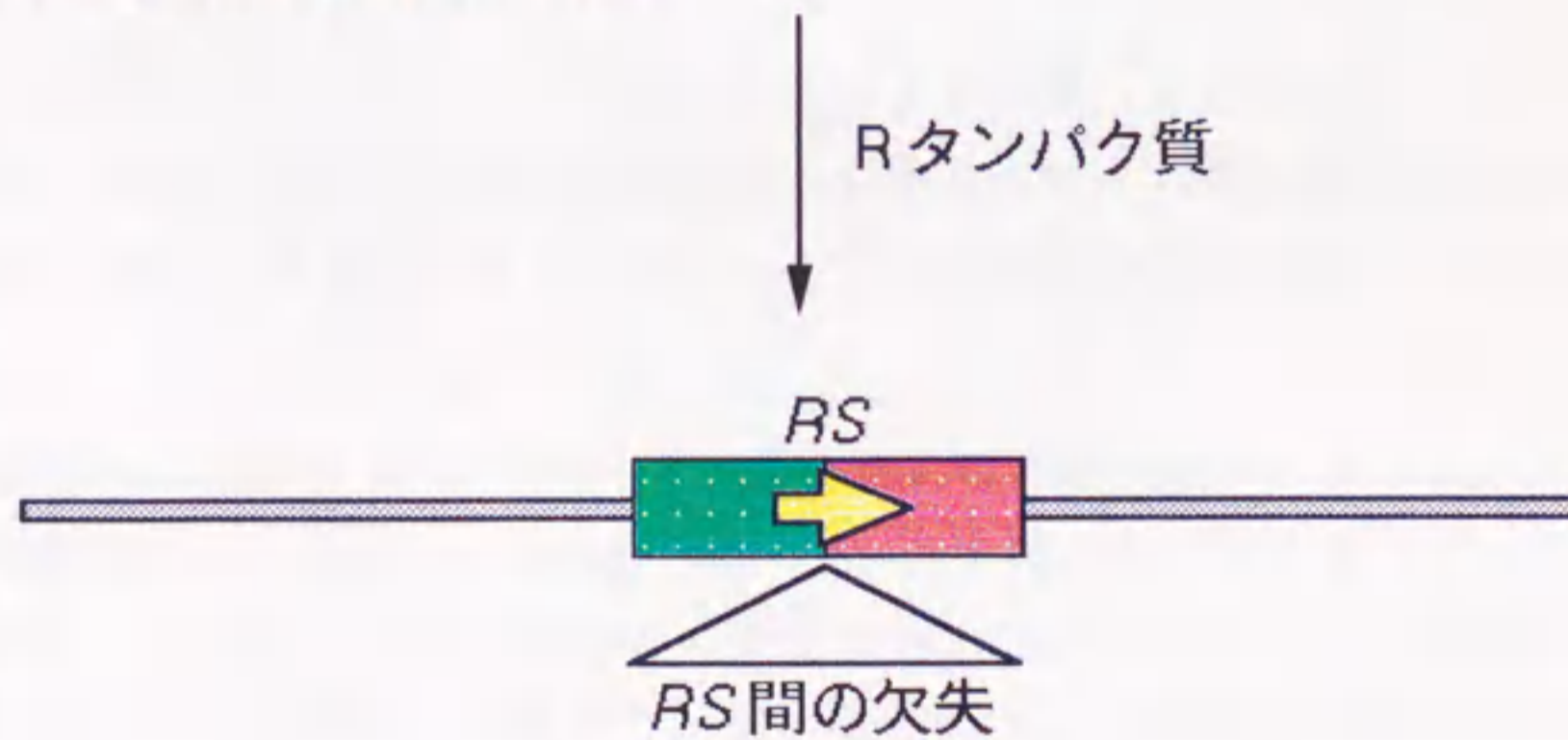


図 11. Ac 転移因子と R-RS 組換えを利用した変異株分離法の原理

RS, 組換え酵素 R タンパク質の認識部位 ; dAc-RS, Ac 転移因子内部の Ac 転移酵素遺伝子を削除し RS 配列を挿入した非自律性転移因子

(3) dAc-RS が同一染色体に転移したものを選び、*R* 遺伝子を持つ植物と交配し、二つの *RS* 配列間の欠失を誘導する。

(1) と (2) の段階では、T-DNA、dAc-RS 挿入変異株、(3) の段階では欠失変異株が分離される可能性がある。挿入変異の場合には、変異の原因遺伝子は、T-DNA や dAc-RS によってタギングされる。また、欠失変異株の場合にも、欠失させた領域に相当する DNA 断片は、末端が dAc-RS と T-DNA にタギングされているので、欠失を誘導する前の (2) の段階の植物体の DNA から単離することが原理的には可能である。したがって、このような方法で変異株が得られれば、変異の原因遺伝子のクローニングが可能であると考えられる。

#### 8. (RS/dAc-RS)T-DNA の作製とシロイヌナズナ染色体への導入

実際に作製した (RS/dAc-RS)T-DNA には、dAc-RS がどちら向きに転移しても染色体の欠失を誘導できるように dAc-RS の内部に二つの異なる向きの *RS* 配列を挿入した (図 12, 13)。また、I-SceI 等の認識配列は、dAc-RS の転移距離を物理的に測定するために挿入してある (後述)。Ac 転移酵素によって dAc-RS が切り出されると、1'プロモーターとネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II (NPTII) のコード領域が連結して NPTII 遺伝子が発現し、細胞はカナマイシン耐性 ( $Km^r$ ) になる。dAc-RS の内部にはハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ (HPT) 遺伝子があり、dAc-RS の存在をハイグロマイシン耐性 ( $Hyg^r$ ) を指標にして知ることができる。dAc-RS が転移した後、同一方向の *RS* 配列間の組換えによって染色体の欠失が誘導されると、dAc-RS の転移方向によってカナマイシン感受性 ( $Km^s$ ) またはハイグロマイシン感受性 ( $Hyg^s$ ) になる (図 13)。

そのような (RS/dAc-RS)T-DNA を染色体に組み込んだ形質転換シロイヌナズナを作製し、その中から 1 コピーの (RS/dAc-RS)T-DNA を持つ形質転換シロイヌナズナを 4 系統得た。dAc-RS の転移や染色体の欠失は (RS/dAc-RS)T-DNA 挿入部位周辺に多く誘導されることが期待されるので、検定株を用いて遺伝学的に T-DNA 挿入部位のマッピングを行った。その結果、RS/dAc-RS #14 系統では、第一染色体の *chl* 遺伝子座から  $18.5 \pm 1.4$  cM、*apl* 遺伝子座から  $18.8 \pm 1.4$  cM 離れた位置に T-DNA が挿入されたことが示された。したがって、それぞれの標準偏差の最大幅をとると、T-DNA 挿入部位は第一染色体マップポジション  $78.7 \pm 3.2$  に位置付けられた (図 14)。その付近には、図 14 に示したものの以外に、花茎の形成に関与する *aca2* 遺伝子座がマップポジション 78 付近に存在する (稲場ら、私信)。他の系統の T-DNA 挿入部位のマッピングは現在進行中である。

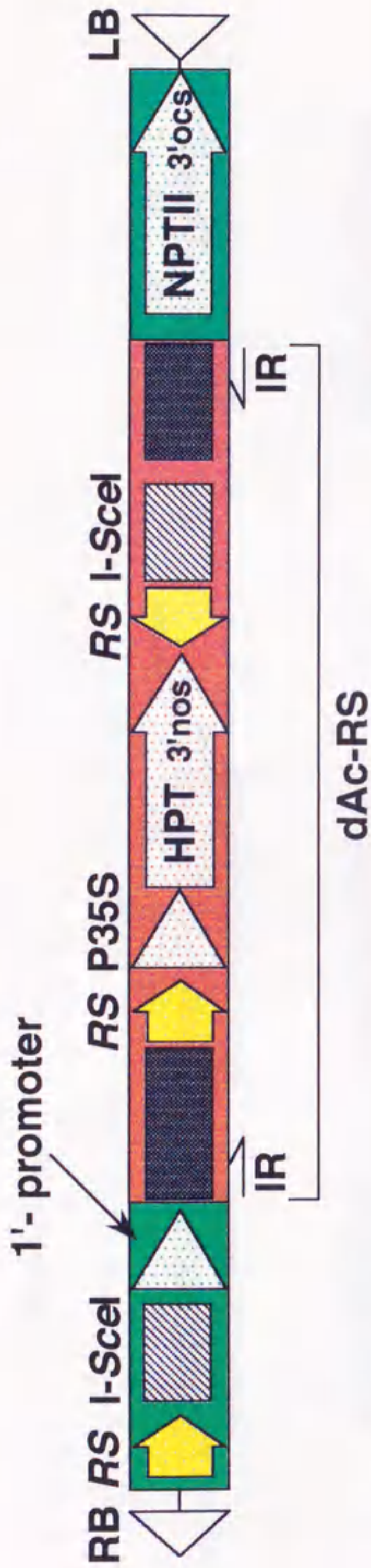


図 12. (RS/dAc-RS)T-DNAの構造

RS, 組換え酵素 R タンパク質の認識部位; dAc-RS, Ac 転移因子内部の Ac 転移酵素遺伝子を削除し RS 配列を挿入した非自律性転移因子; I-SceI, I-SceIの認識配列; P35S, カリフラワーモザイクウイルス 35S RNAプロモーター; IR, Ac 転移因子の逆反復配列; HPT, ハイグロマイシン耐性遺伝子のコード配列; 3'nos, ノパリン合成酵素遺伝子の転写終結シグナル配列; NPTII: カナマイシン耐性遺伝子のコード配列; 3'ocs, オクトピン合成酵素遺伝子の転写終結シグナル配列; RB, LB: T-DNA の左右境界配列

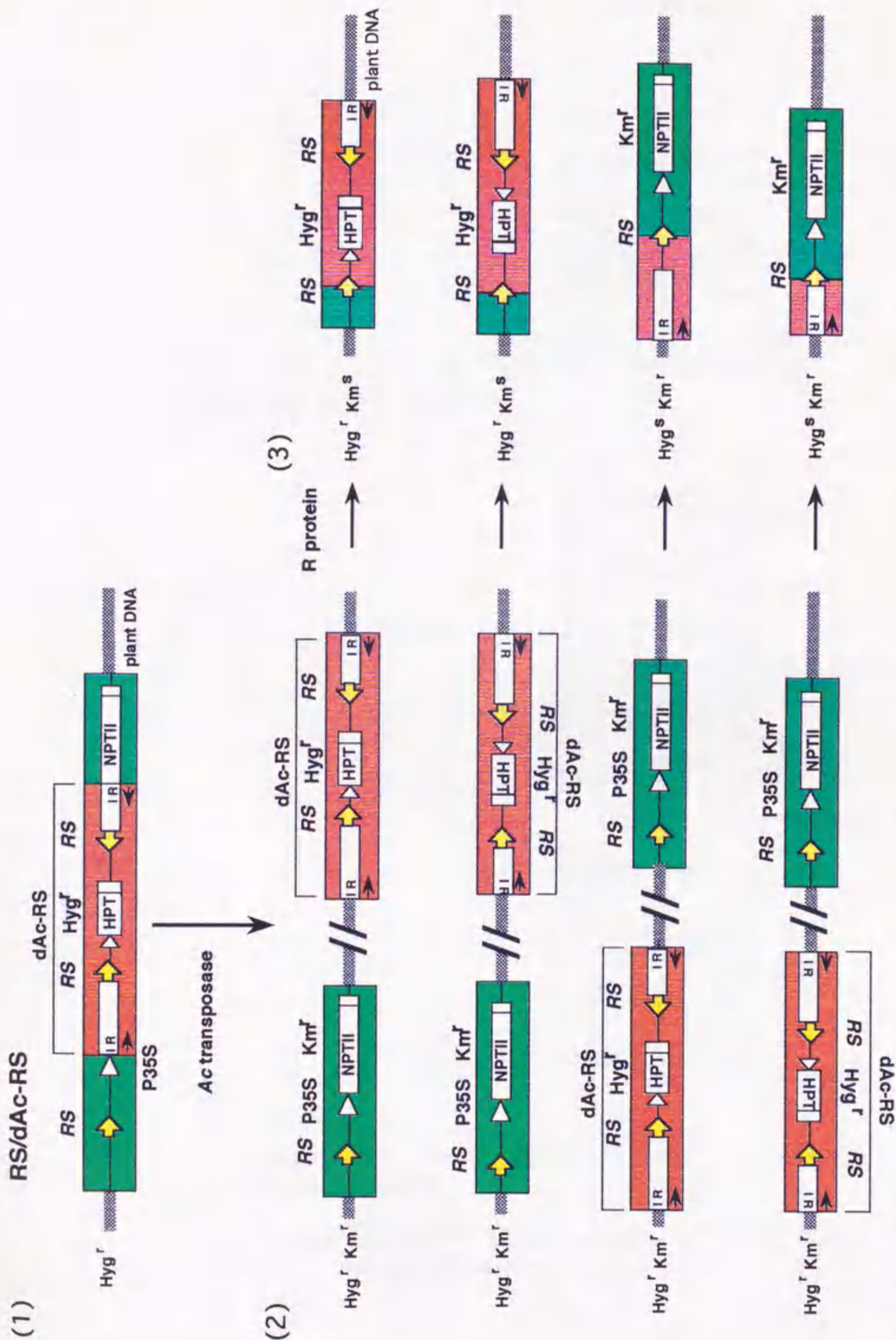


図. 13 dAc-RS の転移と染色体の欠失のパターン

dAc-RS が転移した後、同一方向の RS 配列間の組換えによって染色体の欠失が誘導されると、dAc-RS の転移方向によってカナマイシン感受性 (Km<sup>s</sup>) またはハイグロマイシン感受性 (Hyg<sup>s</sup>) になる。



# Chromosome 1

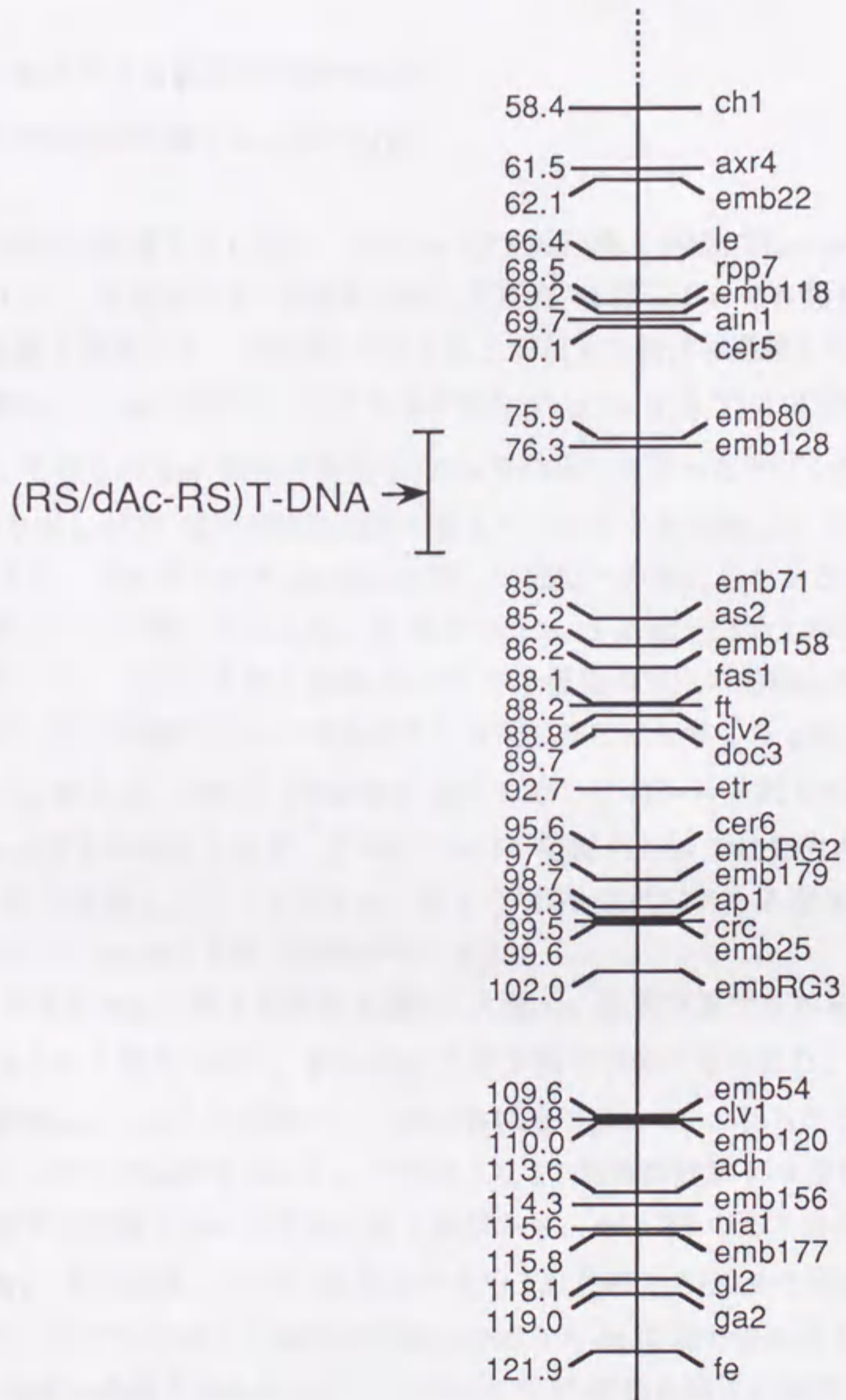


図 14. RS/dAc-RS#14 系統の (RS/dAc-RS)T-DNA のシロイヌナズナ染色体上の挿入部位

遺伝子地図は D. Meinke と M. Koornneef によって作成された。  
(Nottingham Arabidopsis Stock Center 1994 Seed List)

また、35S プロモーターに連結した Ac 転移酵素 cDNA を染色体に組み込んだ形質転換シロイヌナズナを作製した。その中から Ac 転移酵素 cDNA が染色体上の一箇所に組み込まれた P35S-TPase #9 系統を以下の解析に用いた。

## 9. dAc-RS の転移による変異株分離の試み

### 9-1. dAc-RS の転移が誘導された株の分離

dAc-RS の転移を誘導するために、RS/dAc-RS #14 植物と P35S-TPase #9 植物を交配した (図 15)。72 個体の F1 植物を自殖して得た F2 種子それぞれ数百個ずつを Km を含む培地で発芽させ、dAc-RS の切り出しが起きた個体を選抜した。その結果、72 の F1 系統のうち 24 系統から Km<sup>r</sup> を示す個体が 0.5% から 71% まで様々な頻度で得られた。それらの Km<sup>r</sup> 個体の葉から DNA を抽出して行ったサザン解析は、dAc-RS の切り出しが F1 植物の生殖細胞で起きていたことを示唆した (データは示さない)。また、切り出された dAc-RS が新しい部位へ再挿入したかどうかサザンプロット解析によって調べたところ、24 系統のうち 15 系統で再挿入がみられた (データは示さない)。そのうちの 1 系統 (#14-2) で 2 種類の独立に転移した dAc-RS が検出されたが、他の系統では一つの系統からは同じ部位に転移した dAc-RS しか検出されなかった。例えば、71% の F2 植物が Km<sup>r</sup> を示した #14-64 系統でも同じ部位に転移した dAc-RS しか検出されず、このことは F1 植物 #14-64 では発生の非常に早い段階で dAc-RS が転移したことを示す。このような F2 世代における選抜で 16 種類の独立に転移した dAc-RS を持つ植物が得られた。

また、F2 個体を Km に対する耐性で選抜した際に、生育可能ではあるが完全な Km<sup>r</sup> 個体に比べると成長の悪い、弱い Km<sup>r</sup> を示す個体が多くみられた。サザンプロット解析の結果は、それらの個体では一部の体細胞で dAc-RS の切り出しが起きたことを示唆した (データは示さない)。そのような F2 個体の自殖により得られた F3 種子を数百個ずつ同様に Km を含む培地で発芽させ、dAc-RS の切り出しが起きた個体を選抜した。その結果、173 の F2 系統のうち 120 系統から Km<sup>r</sup> を示す個体を得られた。また、サザンプロット解析の結果、そのうち 66 系統で切り出された dAc-RS の新しい部位へ再挿入がみられた。その中から 87 種類の独立に転移再挿入した dAc-RS を持つ植物が得られた。

### 9-2. 形態異常変異株の解析

F2 と F3 世代の選抜で得られた 103 種類の独立に転移再挿入した dAc-RS を持つ植

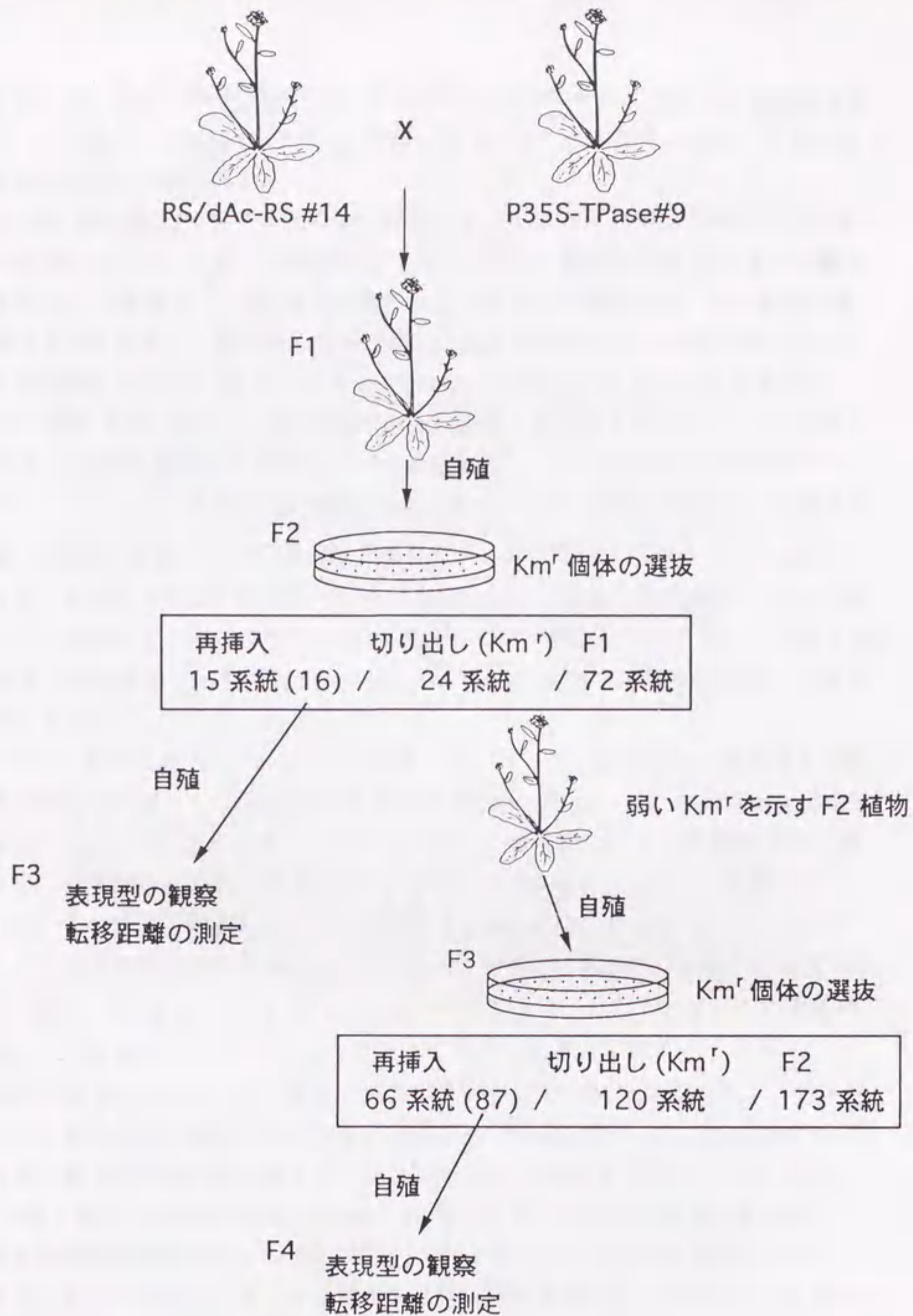


図 15. 転移した dAc-RS を持つシロイヌナズナの単離

RS/dAc-RS#14 植物と P35S-TPase#9 植物を交配し、F1 植物の自殖による F2 世代と、さらにその自殖による F3 世代で、親の生殖細胞で転移していた dAc-RS を持つ植物を選抜した。四角い枠内には、解析した F1 または F2 系統のうち、生殖細胞で dAc-RS の切り出しが起きたことを示す Km 耐性個体が次世代の F2 または F3 集団の中から得られた系統数、さらにそのうち dAc-RS の再挿入が検出された系統数、また、括弧内にはそれらの系統から検出された dAc-RS の再挿入のうち独立した転移として認められたものの数を示した。

物のうち、42種類について次世代を土とMS寒天培地でそれぞれ栽培し表現型を観察した。その結果、#14-1.413.2系統、#14-1.14.1系統、#14-22.4.4系統から形態異常を示す変異株が分離された。

#14-1.413.2系統のF4種子を土の上で発芽させたところ、発芽後子葉が展開し本葉がわずかに見えたところで成長が停止する変異株が、野性型に対し1:3の分離比で観察された(図16A)。MS寒天培地の上で発芽させた場合には、その変異株は土の場合よりも成長し、数枚の本葉が展開した後成長が停止した(図16B)。この変異の原因遺伝子がdAc-RSによってタギングされているかどうか調べるために、#14-413.2植物を戻し交配し、F1植物の中から転移したdAc-RSについてヘテロ接合体で且つAc転移酵素遺伝子を持たない個体を選抜し、その自殖によるF2種子をハイグロマイシン(Hyg)を含むMS寒天培地の上で発芽させ表現型を調べた。転移したdAc-RSと変異が連鎖していれば、Hyg<sup>r</sup>植物のうち野性型株と変異株の分離比は2:1になることが期待される。連鎖していなければ、3:1になることが期待される。独立した戻し交配により得られた二つのF2集団について解析したところ、どちらも有意に3:1の分離比を示した(表6)。したがって、dAc-RSと変異が連鎖していないことが示された。

#14-1.14.1系統のF4種子を土の上で発芽させたところ、植物体全体が小さくなる変異株が野性型株に対し1:3の分離比で観察された(図17)。この変異の原因遺伝子がdAc-RSによってタギングされているかどうか調べるために、F4植物のうち野性型を示した各個体が転移したdAc-RSを持つかどうかをサザンブロット解析によって調べた。その結果、解析した全ての個体がdAc-RSを持っていた(データは示さない)。もし変異の原因遺伝子がdAc-RSによってタギングされていれば、野性型を示したF4個体の1/3はdAc-RSを持っていないはずである。したがって、この変異の原因遺伝子はdAc-RSによってタギングされていないと考えられる。

#14-1.413.2系統と#14-1.14.1系統の変異の原因として、Ac転移酵素によってシロイヌナズナの内在性の転移因子の転移が誘導された可能性が考えられる。シロイヌナズナの可動な内在性の転移因子としてはTag1(59)が知られている。そこで#14-413.2系統と#14-14.1系統の変異がTag1の転移によるものかどうか調べるために、それぞれの系統の植物のゲノムDNAに対しTag1をプローブとしてサザンブロット解析を行った。しかし、それらの系統からは野性型株と同じサイズのバンドしか検出されず、Tag1の転移は認められなかった(データは示さない)。

#14-14.1系統のF4種子を土の上で発芽させたところトライコームの数が著しく減少した変異株が野性型株に対し1:3の分離比で観察された(図18)。この変異株の表現型はglabrous1(gll)変異株の表現型に類似していた。gll遺伝子はすでにT-DNAタギングによってクローニングされている(60)。その塩基配列はMybファミリーの

(A)



(B)

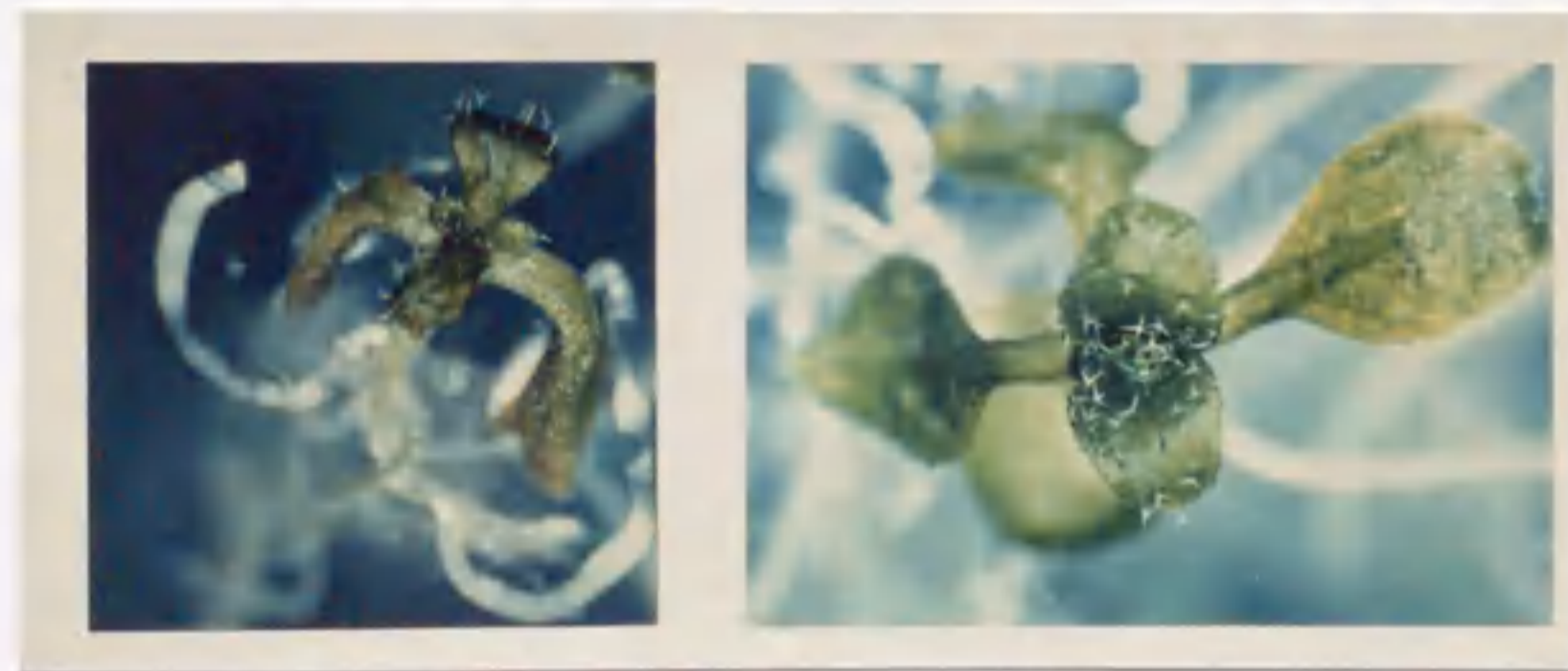


図 16. #14-1.413.2 系統で観察された表現型

(A) 土に播種後、上からそれぞれ 5, 9, 12 日目の F4 植物。発芽後本葉がわずかに見えたところで成長が停止する変異株 (左) と野性型株 (右) が、1:3 の分離比で観察された。(B) MS 寒天培地に播種後、13 日目の F4 植物。変異株 (左) は、数枚の本葉を展開して、この後成長が停止した。野性型株 (右) はこの後も正常に成長した。

表 6. #14-1.413.2 系統の変異と dAc-RS の連鎖解析

Backcross line	Phenotype of Hyg <sup>r</sup> progeny		$\chi^2$ <sup>a</sup>
	Wild type	Mutant	
#14-1.413.2.B1	279	79	1.79
#14-1.413.2.B2	257	92	0.43

<sup>a</sup> 変異と dAc-RS が連鎖していない場合の期待値に基づいて計算された  $\chi^2$

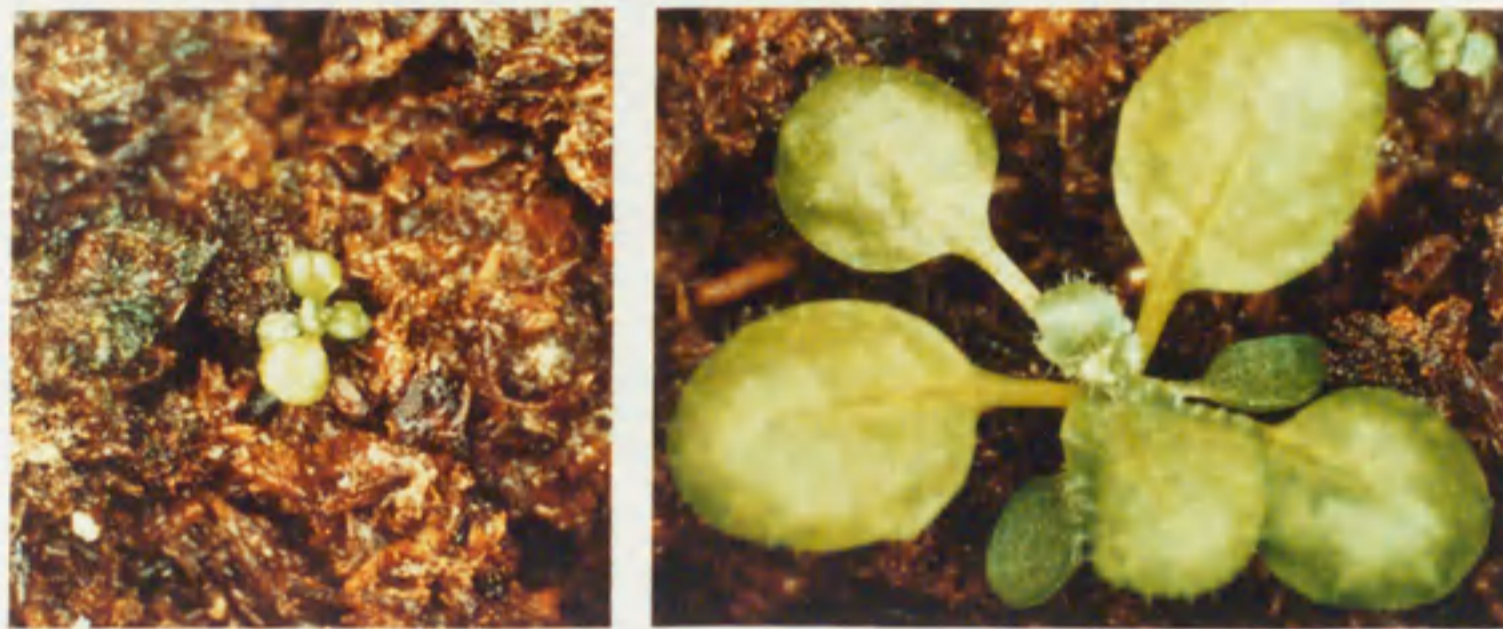


図 17. #14-1.14.1 系統で観察された表現型

F4 世代で植物体全体が小さくなる変異株（左）と野性型株（右）が、1:3 の分離比で観察された。

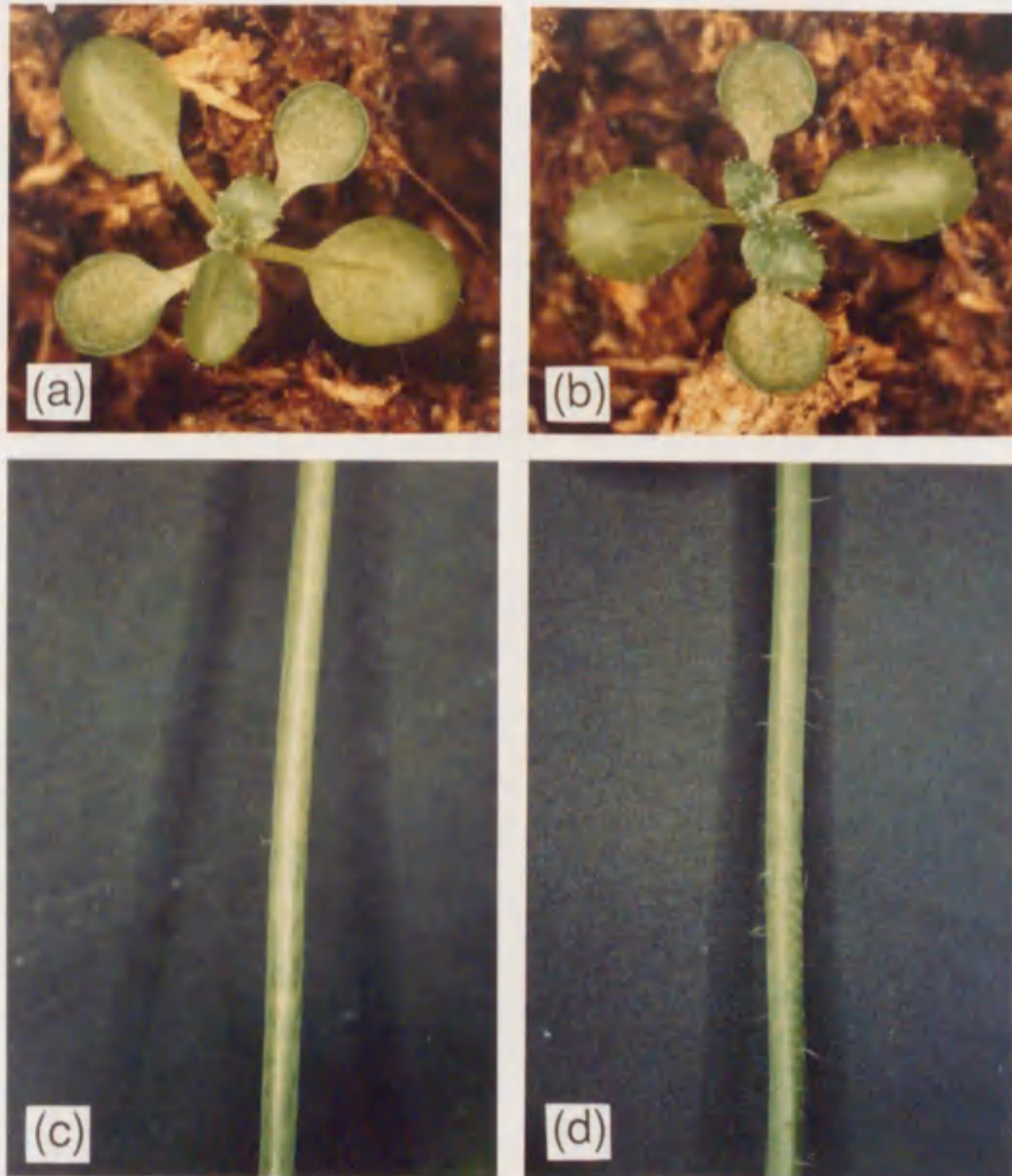


図 18. #14-22.4.4 系統で観察された表現型

トライコームの数が少ない変異株 (a, c) と野性型株 (b, d) が、1:3 の分離比で観察された。(a) と (b) は播種後、14 日目の F4 植物。(c) と (d) は播種後、25 日目の F4 植物の主茎。



DNA 結合ドメインと相同性があり、*gll* 遺伝子産物は転写因子であると考えられている (61)。これまでに *gll* 変異株は *gll-1*, *gll-2*, *gll-43* の 3 つが分離されている (62, 63, 60)。*gll-1* ではトライコームは葉の縁にのみみられる。*gll-2* では葉身にも葉の縁に近い部分にトライコームがみられる (63)。*gll-43* では葉にはトライコームは正常にみられるが茎にはみられない (60)。*#14-14.1* 系統から分離された変異株では、葉には野性型の 1/4、茎には 1/10 程度の数のトライコームがみられた。*#14-14.1* 系統は *Ac* 転移酵素遺伝子についてホモ接合体なので、それらのトライコームは体細胞における復帰変異によるものかもしれない。今後、次世代で復帰変異株が分離されるかどうか、また *#14-14.1* 系統の変異株と *gll* 変異株を交配し変異が相補されるかどうかを調べる予定である。

#### 10. *dAc-RS* の転移距離の測定

T-DNA 挿入部位と *dAc-RS* 挿入部位にそれぞれ存在する *RS* 配列の間の組換えを誘導しその間の染色体領域の欠失を誘導するためには、*dAc-RS* が同一染色体近傍に転移した個体を選抜する必要がある。*dAc-RS* の転移距離を簡便に測定するために、(*RS/dAc-RS*)T-DNA には *dAc-RS* の内部と外部に一つずつ *I-SceI* の認識配列が挿入されている。*I-SceI* の認識配列は 18 bp であり、シロイヌナズナのゲノム上にはほとんど存在しないと考えられる。そのため、*dAc-RS* が転移した後 *I-SceI* によってゲノム DNA を切断し、切り出される DNA 断片の長さをパルスフィールド電気泳動法を用いて解析することによって、*dAc-RS* の転移距離を物理的に測定することができる。そのようにして本研究室の小泉が測定した結果、図 19 にまとめたように、独立に転移再挿入した 38 の *dAc-RS* のうち 18 が元の位置から 1000 kbp 以内の近傍に転移していた。さらにそのうちの 8 は元の位置から 10 kbp 前後の非常に近い部位に転移していた。38 の *dAc-RS* のうち残りの 20 は、パルスフィールド電気泳動法による分離の限界 (我々の技術では約 2000 kbp) よりも遠くか、あるいは他の染色体に転移したと考えられる。

#### 11. *R-RS* 組換えによる染色体の欠失の誘導

本研究室の工藤が、12 kbp 離れた部位に転移した *dAc-RS* を持つ *#14-17.5* 植物を *R-21* 植物と交配し、*RS* 配列間の欠失を誘導した。播種後 30 日目の *F1* 植物の葉からゲノム DNA を抽出し PCR 解析を行ったところ、T-DNA 挿入部位と *dAc-RS* 挿入部位の *RS* 配列の間の領域の欠失が起きたことを示すバンドが検出された。さらに増幅された DNA の塩基配列を決定したところ、正確に *RS* 配列間で組換えが起きた

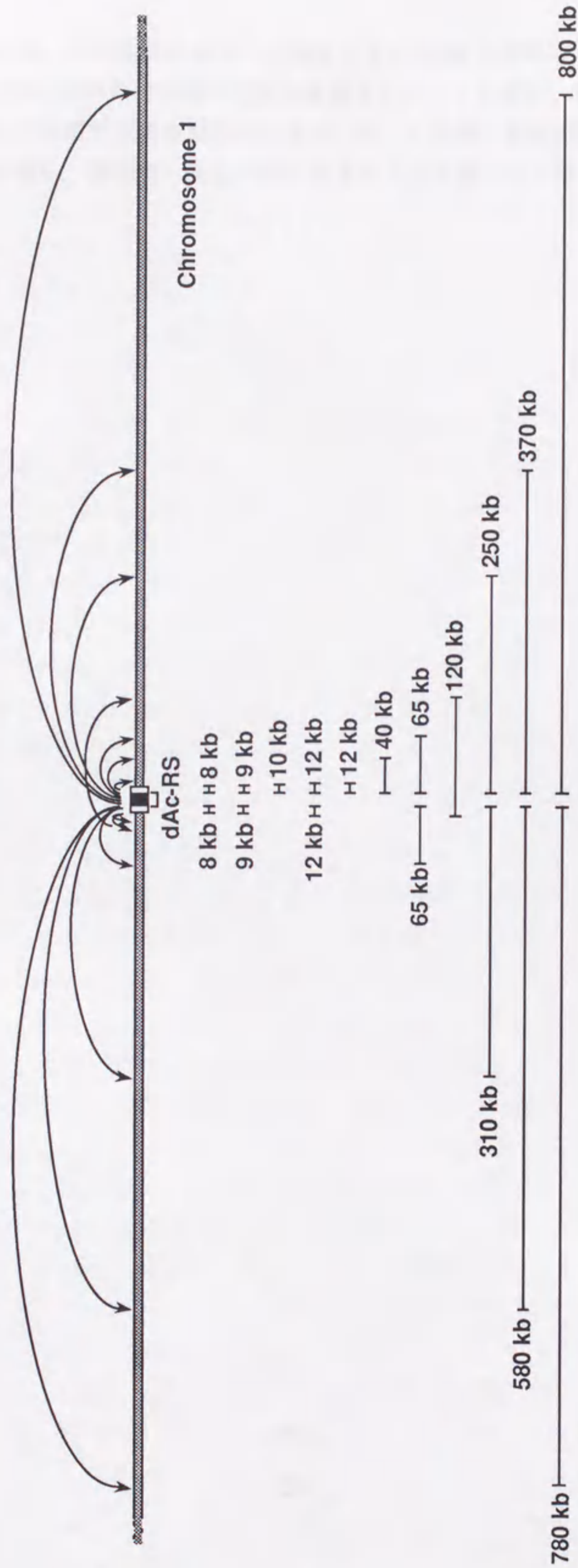


図 19. RS/dAc-RS#14 系統の dAc-RS の近傍への転移

独立に転移した 38 の dAc-RS のうち 18 が、物理的に転移距離の測定が可能な近傍に転移していた。その 18 の dAc-RS の転移距離と転移方向を模式的に示した。120 kb 転移した dAc-RS は、一度 12 kb 転移した後、逆方向に再転移したことが示された。これらの dAc-RS の転移距離の測定は、本研究室の小泉によって行われた。

ことがわかった。この結果は #14-17.5 植物と R-21 植物の交配による F1 植物の体細胞において 12 kb の染色体領域の欠失が誘導されたことを示す。他の近傍に転移した系統についての解析は現在進行中である。また、今後、生殖細胞で欠失が誘導された個体を分離し、表現型に変化が見られるかどうか調べる予定である。

#### 第四章 考察

##### 1. タバコ培養細胞における R-RS 組換えの誘導と組換え頻度

本研究によって、RS 配列がプラスミド DNA 上にある場合と染色体上にある場合の双方について、タバコ培養細胞内で R タンパク質による組換えを誘導できることが示された。RS 配列がプラスミド DNA 上にある場合の実験で、IGUS レポーター遺伝子と P35S-R 遺伝子を同時に導入した場合 (pGI + pdP35R) と CATGUS レポーター遺伝子と P35S-R 遺伝子を同時に導入した場合 (pCATG + pdP35R) の GUS 活性は、正のコントロール (pRGR + pdP35 $\Delta$ R) のそれぞれ 13% と 19% であった (表 1)。これらの値は導入されたレポータープラスミド分子のうち組換えの起きた分子の割合を反映していると考えられる。ただし pGI と pCATG の GUS 遺伝子は組換えが起きてから発現が開始されるので、正のコントロールプラスミド (pRGR) の GUS 遺伝子に比べ発現が遅れ、その分 GUS 活性が低くなった可能性がある。したがって実際の組換えが起きた分子の割合はもっと高い可能性がある。また、欠失が誘導される pCATG + pdP35R の組み合わせの方が、逆位が誘導される pGI + pd35R の組み合わせよりもやや高い GUS 活性が検出された。これは欠失の場合の方が逆反応が起こりにくいためだと考えられる。また、正のコントロールプラスミド pRGR を P35S-R 遺伝子とともに導入した場合 (pRGR + pdP35R) の GUS 活性は、P35S- $\Delta$ R 遺伝子とともに導入した場合 (pRGR + pdP35 $\Delta$ R) の GUS 活性に比べて低かった。これは P35S-R 遺伝子とともに導入した場合には pRGR の RS 配列間の組換えが誘導され、GUS のコード領域がプロモーターに対し逆向きになったプラスミド分子を生じたためだと考えられる。pRGR + pdP35R では pRGR + pdP35 $\Delta$ R に比べ GUS 活性は 23% 低かった。この値が組換えの起きた分子の割合を反映していると考えられるが、最終的に組換えの起きた分子も組換えが起こる前は GUS 遺伝子が発現し得るので、この場合も実際の組換えが起きた分子の割合はもっと高い可能性がある。

RS 配列が染色体上にある場合は、GUS 遺伝子の発現はレポーター遺伝子が組み込まれた染色体上の部位にも影響されるので、GUS 活性は必ずしも組換えの効率を反映しないと考えられる。そこで細胞を X-グルクロニドを用いて化学染色し、GUS 遺伝子の発現した細胞の数を数えることによって組換え効率を調べた。その結果、BY-2(CATGUS-1) では P35S-R 遺伝子が導入された細胞のうちの 43% の細胞で組換えが起きたことが示された。しかし他の系統では青く染色される細胞はまったくみられなかった。BY-2(CATGUS-2) では BY-2(CATGUS-1) の約半分の GUS 活性が検出されたにもかかわらず青く染色される細胞はまったくみられなかったので、組換え

の効率が低いというより、むしろ細胞1個あたりのGUS活性が化学染色に不十分であったために染色されなかったと考えられる。そうだとすれば、BY-2(CATGUS-1)と他の系統の組換え効率の差はGUS活性の差[BY-2(CATGUS-2)ではBY-2(CATGUS-1)の43%、BY-2(IGUS)ではBY-2(CATGUS-1)の31%]より小さいと考えられる。

## 2. シロイヌナズナ植物体におけるR-RS組換えのパターンと頻度

本研究では、P35S-R遺伝子を持つ形質転換シロイヌナズナとRS配列を持つ形質転換シロイヌナズナを交配することによってRS配列間の組換えを誘導し、次世代の植物体における組換えのパターンと頻度をレポーター遺伝子であるGUS遺伝子が発現した細胞の組織化学的染色によって視覚的に検出した。それぞれの器官で様々な数と大きさの青いスポットやセクター状の染色が観察された。スポットやセクターの大きさと数は組換えの起きたタイミングと頻度を反映すると考えられる。R遺伝子とGUS遺伝子を発現させるために使われている35Sプロモーターは発生のどの段階においてもほとんどの組織で発現すると考えられており(58)、そうだとすればRS配列間の組換えとそれに伴うGUS遺伝子発現が起こる植物体の部位と時期は基本的にはランダムであることが期待される。F1植物を播種後12日目に染色すると、多くの場合、子葉で大小の多くのスポットがみられ、本葉では小さなスポットがかすかにみられた。第一葉の原基は発芽後2、3日目から見ることはできるが、12日目の時点では組換えは少数の体細胞でしか起こっていないか、あるいは組換えは起こっていてもGUSタンパク質の蓄積が十分でないためにスポットとして検出されないのかもしれない。12日目にはかすかな染色しかみられなかった本葉も30日目の植物では多くの部分が染色された。これは組換えの起きた細胞の増加とGUSタンパク質の蓄積のいずれかあるいは両方によるものと考えられる。

組換え頻度は用いた親の系統の組み合わせによって異なった。最も高い頻度で組換えが誘導されたのはR-21系統とCATGUS-12系統を親に用いた場合で、この組み合わせでのみF1植物の本葉にセクター状の染色がみられた。この親の組み合わせを用いた場合に生殖細胞における組換え頻度も他の組み合わせと比べて高かった。したがって、体細胞における組換え頻度と生殖細胞における組換え頻度の間に相関関係があると考えられる。R遺伝子の発現量と組換え頻度の間には相関関係がみられたが、CATGUSレポーター遺伝子のコピー数と組換え頻度の間には相関関係はみられなかった。また、RS配列を出芽酵母の染色体に組み込んだ場合に、セントロメア、テロメアの近くにRS配列を導入した場合には組換えが起こりにくいなど、染色体上の部位によって組換え頻度に差がみられることが報告されている(17, 松崎ら、私

信)。したがって組換え頻度は *RS* 配列の染色体上の部位に依存すると考えられる。

*RS* 配列を染色体に組み込んだタバコ培養細胞に P35S-*R* 遺伝子を一過的に導入した場合の組換え頻度は 43%であった。それに対しシロイヌナズナの生殖細胞における組換え頻度は最も高い組み合わせでも 3.2%であった。体細胞における組換え頻度も、12 日目の染色でパッチ状の染色パターンを示したものが多いこと、サザン解析で組換えが検出できなかった（データは示さない）ことからそれほど高くないと考えられる。タバコ培養細胞とシロイヌナズナにおける組換え頻度の差は実験系の違いによるものかもしれない。シロイヌナズナの実験では染色体に組み込んだ数コピー（*R*-21 系統では 1 コピー）の P35S-*R* 遺伝子を交配によって供給したが、タバコ培養細胞の実験ではアグロバクテリウムを介して一過的に P35S-*R* 遺伝子を導入した。アグロバクテリウムを介した一過的な遺伝子導入では一つの細胞に多コピーの遺伝子が導入されると考えられ、遺伝子発現の時間は短いが発現量は多いと考えられる。タバコ培養細胞でみられた高い組換え頻度が *R* 遺伝子の一過的な高い発現によるものだとすると、シロイヌナズナ植物体においても *R* 遺伝子の発現量を増大させることによって組換え頻度の上昇が期待される。特に、染色体の欠失により変異株を分離するためには、生殖細胞において効率良く組換えが誘導されることが重要である。それには *R* 遺伝子のプロモーターとして生殖細胞において高い発現を示すようなプロモーターを用いることが有効かもしれない。あるいは *RS* 配列はシロイヌナズナ染色体上に存在する場合よりもタバコ染色体上に存在する場合の方が組換えが起りやすいのかもしれない。FLP-*FRT* 組換えの誘導がタバコ植物体においては検出されたがシロイヌナズナにおいては検出されなかったという報告がある (15)。その結果は組換えのレポーター遺伝子としてハイグロマイシン耐性遺伝子を用いたためにタバコとシロイヌナズナのハイグロマイシンに対する耐性の違いを反映したのかもしれないが、シロイヌナズナよりタバコの方が組換えが起りやすいことを示しているかもしれない。また、トウモロコシの *Ac* 転移因子もシロイヌナズナよりタバコにおいて高い頻度で転移することが知られている (64)。これらのことはタバコとシロイヌナズナの染色体構造の違い、あるいは外来 DNA 配列の修飾などの調節機構の違いによるのかもしれない。

### 3. *R-RS* 組換え系のクローン解析への利用

本研究で用いた *IGUS*, *CATGUS* レポーター遺伝子のような系を用いて、部位特異的組換え系をクローン解析に利用することが考えられている (65, 66)。すなわち発生のある特定の時期に活性化するようなプロモーターに *R* 遺伝子をつないで発現させ、*CATGUS* レポーター遺伝子の *RS* 配列間の組換えを一時的に誘導すれば、組換

えの誘導された細胞から由来する細胞を GUS 遺伝子の発現を指標に追跡できると考えられる。本研究でみられた本葉のセクター状の染色は R-RS 組換え系が植物で実際にそのような解析に利用できることを示している。R 遺伝子の発現には 35S プロモーターを用いており一時的に発現を誘導したわけではないが、R-21 系統と CATGUS-12 系統の交配による F1 植物 3 個体の第一葉から第三葉に葉の基部から主脈に沿って葉身まで広がるセクターが観察された。これらのセクターは茎頂の葉の原基の細胞で RS 配列間の組換えが起きたために形成されたと考えられ、セクター部分の細胞は葉の原基の中の同一の細胞に由来すると考えられる。Furner らは、*alb1* 変異をヘテロに持つシロイヌナズナの種子を X 線照射し体細胞染色体組換えを誘導することによってアルビノのセクターを誘導し、シロイヌナズナの胚の茎頂頂端分裂組織から形成される葉の細胞系譜の解析を行った (67)。また、Irtsh らは、シロイヌナズナの種子を  $\gamma$  線照射し、同様の解析を行った (68)。本研究では R 遺伝子の発現には 35S プロモーターを用いたので発生のどの時点で組換えが起きたのか正確にはわからないが、観察されたセクターの形状は乾燥種子を X 線あるいは  $\gamma$  線照射して誘導されたセクターに類似しており、発芽前の胚の茎頂頂端分裂組織の葉の原基になる細胞が発芽後の葉の発達の非常に早い時期に組換えが起きたと考えられる。以上のように R-RS 組換え系は植物のクローン解析に有用であると考えられる。

#### 4. dAc-RS の転移と染色体の欠失による変異株の分離と遺伝子クローニング

dAc-RS の転移が誘導された植物の自殖後代から 3 種類の形態異常を示す変異株が分離されたが、そのうちの 2 つでは転移した dAc-RS と変異が連鎖していなかった。その原因として次のような可能性が考えられる。1. dAc-RS が変異の原因遺伝子に一度挿入したが、再び他の部位に転移し、その際フットプリントが残されたために変異は復帰しなかった。2. Ac 転移酵素によってシロイヌナズナの内在性の転移因子の転移が誘導され、その転移因子が変異の原因遺伝子に挿入した。Long らは、シロイヌナズナで、転移した *Ds* 転移因子と変異が 12 cM 離れていた例を報告しており、*Ds* 転移因子の近傍に転移しやすい性質から考えて、この場合には 1. の可能性が高いことを考察している (30)。また、ペチュニアの系で、Ac 転移因子が一度転移した後、転移頻度が上昇する例が報告された (69)。したがって、転移した部位によっては再転移が非常に起こりやすいと考えられ、このことは 1. の可能性を支持する。2. については、本研究で分離された変異株の変異が *Tag1* の転移によって起きた可能性は否定されたが、他の未同定の内在性転移因子が原因である可能性は否定されない。

本研究では、T-DNA 挿入部位と dAc-RS 挿入部位の間のゲノム DNA の長さを直接調べることによって、dAc-RS の転移距離を測定した。これまでに Ac (*Ds*) 転移因

子の転移距離を遺伝学的に測定した例は報告されているが(24-27)、DNAレベルで直接測定した例は同一遺伝子内に転移した例(70)以外は報告されていない。DNAレベルで直接測定することによって、近傍に転移した場合の転移距離をより正確に測定することができる。RS/dAc-RS#14系統のdAc-RSの転移を誘導した場合には、転移したdAc-RSのうち約半数が元の位置から1000 kbp以内の近傍に転移しており、さらにそのうちの約半数は10 kbp前後の非常に近い部位に転移していた。したがって、変異株の分離という目的からは、10 kbp以内に興味深い遺伝子が無ければ近傍に転移したdAc-RSのうち半分は無駄になるが、逆に10 kbp前後に興味深い遺伝子がある場合はその遺伝子の様々な部位に転移因子が挿入した変異株が分離できると考えられる。ただし、本研究では出発材料として一系統しか用いていないので、そのような傾向が一般的かどうか調べるには複数の系統を出発材料にして解析を行う必要がある。

本研究で分離された近傍に転移したdAc-RSを持つ植物のRS配列間の組換えを誘導することによって、RS/dAc-RS#14系統のT-DNA挿入部位(第一染色体マップポジション  $78.7 \pm 3.2$ )の両側に約800 kbpまでの欠失を誘導できる可能性がある。シロイヌナズナでは1 cMは200 kbpなので、例えばマップポジション78付近に存在するaca2遺伝子座(稲場ら、私信)はその中に含まれる可能性が高い。ただし、シロイヌナズナのゲノムサイズは  $1 \times 10^8$  bpなので、遺伝子の数が仮に数万個だとすれば10 kbpあたり数個の遺伝子が存在することになり、数百kbpの欠失を誘導した場合に同時に欠失した他の遺伝子の影響によって目的の表現型が見られないことが考えられる。その場合には、欠失変異株(ホモ接合体が致死、不稔を示す場合にはヘテロ接合体)と目的の遺伝子の点変異株を交配し、次世代に点変異株の表現型が現れるかどうか調べることにより、目的の遺伝子が欠失領域中にあるかどうかを調べることができる。多くの種類の欠失領域の異なる欠失変異株についてそのような解析を行えば、目的の遺伝子を含む領域をより狭い範囲に限定でき、それだけ遺伝子のクローニングが容易になると考えられる。これまでに欠失変異株は分離されていないが、#14-17.5系統とR-21系統の交配によるF1植物の体細胞において12 kbの染色体領域の欠失がPCR解析によって検出され、R-RS組換えにより植物染色体のある領域の欠失の誘導が可能であることが示された。今後、生殖細胞において染色体の欠失が誘導された植物が分離されれば、遺伝子クローニングを行う上で非常に有用であると期待される。



## 謝辞

本研究の遂行にあたり熱心な御指導を賜りました名古屋大学理学部生物学科の町田泰則教授に心より感謝の意を表します。また、共同研究を行う機会を与えてくださった大阪大学工学部の大嶋泰治教授、有益な御助言を頂いた福山大学工学部の松崎浩明博士に深く感謝致します。東京大学理学部植物学教室の高橋陽介博士、静岡県立大学食品栄養科学部の丹羽康夫博士ならびに名古屋大学理学部生物学科の吉岡泰博士、宇佐美昭二博士をはじめ植物学第二講座の皆様には様々な実験技術を御指導頂くとともに終始変わらぬ励ましと御配慮を賜りました。ここに改めて御礼申し上げます。最後になりましたが、共同研究者として数々の御協力を頂いた鳥飼聡美氏、小泉順氏、工藤光子氏、多くの御助言と御援助を賜りました町田千代子博士に心より御礼申し上げます。

## References

1. Araki,H., Jearnpipatkul,A., Tatsumi,H., Sakurai,T., Ushio,K., Muta,T. and Oshima,Y. (1985) *J. Mol. Biol.*, 182, 191-203.
2. Araki,H., Nakanishi,N., Evans,B.R., Matsuzaki,H., Jayaram,M. and Oshima,Y. (1992) *J. Mol. Biol.*, 225, 25-37.
3. Sauer,B. (1987) *Mol. Cell. Bio.*, 7, 2087-2096.
4. Broach,J.R. (1981) In Strathern,J.N., Jones,E.W. and Broach,J.R. (eds.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. pp 445-470.
5. Sauer,B. and Henderson,N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5166-5170.
6. Jayaram,M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5875-5879.
7. Kilby,N.J., Snaith,M.R. and Murray,J.A.H. (1993) *Trends Genet.*, 9, 413-421.
8. Simpson,P. (1993) *Trends Genet.*, 9, 227-228.
9. Dale,E.C. and Ow,D.W. (1990) *Gene*, 91,79-85.
10. Dale,E.C. and Ow,D.W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10558-10562.
11. Bayley,C.C., Morgan,M., Dale,E.C. and Ow,D.W. (1992) *Plant Mol. Biol.*, 18, 353-361.
12. Odell,J., Caimi,P., Sauer,B. and Russel,S. (1990) *Moll. Gen. Genet.*, 223, 369-378.
13. Russell,S.H., Hoopes,J.L. and Odell,J.T. (1992) *Mol. Gen. Genet.*, 234, 49-59.
14. Qin,M., Bayley,C., Stockton,T. and Ow,D.W. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 1706-1710.
15. Lloyd,A.M. and Davis,R.W. (1994) *Mol. Gen. Genet.*, 242, 653-657.
16. Matsuzaki,H., Nakajima,R., Nishiyama,J., Araki,H. and Oshima,Y. (1990) *J. Bacteriol.*, 172, 610-618.
17. Kawasaki,H., Matsuzaki,H., Nakajima,J. and Oshima,Y. (1991) *Yeast*, 7, 859-865
18. Anderson,E.G., Longley,A.E., Li,C.H. and Retherford,K.L.(1949) *Genetics*, 34, 639-646.
19. Auerbach,C. (1951) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 16, 199-213.
20. Estelle,M.A. and Somerville (1986) *Trends Genet.*, 2, 92-96.
21. Meyerowitz,E.M. (1987) *Annu. Rev. Genet.*, 21, 93-111.
22. Hofte,H., Desprez,T., Amselem,J., Chiapello,H., Caboche,M., Moisan,A., Jourjon,M.-F., Charpentreau,J.-L., Berthmieu,P., Guerrier,D., Giraudat,J., Quigley,F., Thomas,F., Yu,D.-Y., Mache,R., Raynal,R., Cooke,R., Grellet,F., Delseny,M., Parmentier,Y., de Marcillac,G., Gigot,C., Fleck,J., Philipps,G., Axelos,M. and Bardet,C. (1993) *Plant J.*, 4, 1051-1061.
23. Hwang,I., Kouchi,T., Hauge,B.M., Goodman,H.M., Schmidt,R., Cnops,G., Dean,C.,Gibson,S., Iba,K., Lemieux,B., Arondel,V., Danhoff,L. and Somerville,C. (1991)

Laboratory, New York, pp.6.94-6.97

25. Gibson, S.I. and Somerville, C. (1992) In Koncz, C., Chua, N.H. and Schell, J. (ed.) *Methods in Arabidopsis research*, World Scientific, Singapore, pp.119-143.
26. Feldmann, K.A. (1991) *Plant J.*, 1, 71-82.
27. Koncz, C., Nemeth, K., Redei, G.P. and Schell, J. (1992) *Plant Mol. Biol.*, 20, 963-976.
28. Castle, L.A., Errampalli, D., Atherton, T.L., Franzmann, L.H., Yoon, E.S. and Meinke, D.W. (1993) *Mol. Gen. Genet.*, 241, 504-657.
29. Bancroft, I., Jones, J.D.G. and Dean, C. (1993) *Plant Cell*, 5, 631-638.
30. Long, D., Martin, M., Swinburne, J., Puangsomle, P. and Coupland, G. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10370-10374.
31. Aarts, M.G.M., Dirkse, W.G., Stiekema, W.J. and Pereira, A. (1993) *Nature*, 363, 715-717.
32. Greenblat, I.M. (1984) *Genetics*, 108, 471-186.
33. Dooner, H.K. and Belachew, A. (1988) *Genetics*, 122, 447-458.
34. Dooner, H.K., Keller, J., Happer, E. and Ralston, E. (1991) *Plant Cell*, 3, 473-482.
35. Bancroft, I. and Dean, C. (1993) *Genetics*, 134, 1221-1229.
36. Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Nishida, K., Noguchi, M. and Tamaki, E. (1972) In Terui, G. (ed.), *Ferment technol. today*, Soc. Ferment Technol. Japan, Osaka, p 689.
37. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor.
38. Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M-D. (1986) *J. Bacteriol.*, 168, 1291-1301.
39. Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965) *Physiol. Plant*, 18, 100-127.
40. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Beven, M.W. (1987) *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
41. Matsuzaki, H., Araki, H. and Oshima, Y. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, 8, 955-962.
42. Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K. (1990) *Plant Cell Physiol.*, 31, 805-813.
43. Baker, B., Coupland, G., Fedoroff, N., Starlinger, P. and Schell, J. (1987) *EMBO J.* 6, 1547-1554.
44. Fromm, M., Taylor, L.P. and Walbot, V. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5824-5828.
45. An, G. (1987) In Wu and Grossman (eds.), *Methods in Enzymol. Recombinant DNA*. Academic Press, New York, Vol. 153, 292-305.
46. Takahashi, Y., Niwa, Y., Machida, Y. and Nagata, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8013-8016.
47. Mattanovich, D., Ruker, F., de Camara Machado, A., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G. and Katinger, H. (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17, 6747.

48. Nagata, T., Okada, K., Takebe, I. and Matsui, G. (1981) *Mol. Gen. Genet.*, 184, 161-165.
49. An, G. (1985) *Plant Physiol.*, 79, 568-570.
50. Valvekens, D., van Montagu, M. and van Lijsebetlens, M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5536-5540.
51. Jefferson, R.A. (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405.
52. Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325.
53. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
54. Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
55. Kosambi, D.D. (1943) *Annals of Eugenics*, 12, 172.
56. Janssen, B.-J. and Gardner, R.C. (1989) *Plant Mol. Biol.*, 14, 61-72.
57. Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Snchez, A., Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M. (1990) *Mol. Gen. Genet.*, 220, 245-250.
58. Benfey, P.N., Ren, L. and Chua, N.H. (1989) *EMBO J.* 8, 2195-2202.
59. Tsay, Y-F., Frank, M.J., Page, T., Dean, C and Nigel, M.C. (1993) *Science*, 260, 342-344.
60. Herman, P.L. and Marks, M.D. (1989) *Plant Cell* 1, 1051-1055.
61. Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Esch, J., Sivakumaran, S. and Marks, M.D. (1991) *Cell* 67, 483-493.
62. Koornneef, M., Dellaert, L.W. and van der Veen, J.H. (1982) *Mutant Res.* 93, 109-123.
63. Esch, J.J., Oppenheimer, D.G., Marks, M.D. (1994) *Plant Mol. Biol.* 24, 203-207.
64. Schmidt, R. and Willmitzer, L. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 220, 17-24.
65. O'Gorman, S., Fox, D.T. and Wahl, G.M. (1991) *Science*, 251, 1351-1355.
66. Golic, K.G. and Lindquist, S. (1989) *Cell*, 59, 499-509.
67. Furner, I.J. and Pumfrey, J.F. (1992) *Development* 115, 755-764.
68. Irish, V.F. and Sussex, I.M. (1992) *Development* 115, 745-753.
69. Robbins, T.P., Jenkin, M. and Courtney-Gutterson, N. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 244, 491-500.
70. Moreno, M.A., Chen, J., Greenblatt, I and Dellaporta, S.L. (1992) *Genetics*, 131, 939-956.