総説

Ac/Ds を用いたトランスポゾン・タギングと、イネにおける研究の現状と展望

中川裕子・鳥山欽哉

(東北大学大学院農学研究科, 仙台市, 〒981-8555)

Recent progress toward transposon tagging using *Ac/Ds* in rice

Yuko Nakagawa and Kinya Toriyama

(Grad. Sch. Agr. Sci, Tohoku Univ., Sendai 981-8555, Japan)

キーワード: トランスポゾン・タギング, 突然変異体,
イネ, 遺伝子破壊

はじめに

最近, シロイヌナズナやイネについてのゲノム解析が急速に進んでおり, 全塩基配列が明らかになるのも時間の問題になってきた。しかし, ゲノム構造が明らかになっても, 植物体内での機能が明らかにならないと, その遺伝子を有効に利用することは出来ない。ここで, 突然変異体が遺伝子の生体内での機能解析に非常に重要な役割を果たすことになる。突然変異体を得るには, 薬剤処理やγ線によって突然変異を起こす方法と, T-DNA等を導入して突然変異体を得る方法がある。前者は, 変異が起こった遺伝子が標識(タグ)されていないために, ゲノム上のどの位置で変異が起こったかを特定するまで時間がかかるが, 後者の方は変異の原因遺伝子が導入遺伝子によってタグされているので, 原因遺伝子のクローニングが容易であるという利点がある。T-DNAの挿入により植物で突然変異が起こった場合, その植物のゲノムからゲノミクライブラリーを作り, T-DNAをプローブとして用いることで不活化された遺伝子のスクリーニングを行うことができる。しかし, 通常のT-DNAをタギングに利用する場合, 異なる位置にT-DNAが挿入された形質転換体が多数必要となる。一方, 遺伝子タギングにトランスポゾンを利用すれば, トランスポゾンを導入した1個体の形質転換体から多数のタグラインを得ることができる。ここでは, イネを材料に, *Ac/Ds*型トランスポゾンを用いたタギング法を紹介した。さらに, この応用として, エンハンサー・トラッピングや, 著者らが行っている部位特異的組換えを組み合わせた実験系等, DNA型トランスポゾン・タギングの応用についてまとめた。

トランスポゾン・タギングについて

トランスポゾンとは染色体上の決まった位置に固定されない転移性遺伝因子で, ゲノム上のある部分から他の部位に挿入される。トランスポゾンが転移することによって, 以前の挿入により不活性化されていた遺伝子の活性化や, 新たに挿入した部位の遺伝子の不活性化が起こるといった発現パターンの変化を引き起こすことができる。トランスポゾンには転移様式の異なるレトロ型とDNA型の2種類があり, 植物ゲノムには両者が存在している。DNA型トランスポゾンは, それ自身がゲノムから切り出されて, ゲノム中の他の部位に挿入される。DNA型トランスポゾンには, トウモロコシの *Ac/Ds* (Activator/Dissociation), *En/dSpm* (Enhancer/defective Suppressor-mutator) (*En*は *Spm*, *dSpm*は *I*(inhibitor)と同義), *Mu* (Mutator), キンギョソウの *Tam*, ペチュニア *dTph1* 等がある。一方, レトロ型は, トランスポゾンが転写, 逆転写を介して複製され, ゲノム中の他の部位に挿入されるという転移様式をとる。そのため, レトロ型トランスポゾンは転移毎にコピー数が増大する。レトロ型では, 一度挿入したトランスポゾンは再び切り出されることがないため, DNA型トランスポゾンに比べて安定な変異を引き起こす。レトロ型トランスポゾンを用いたイネのタギング法については, Hirochika (1997) や武田ら (1999) による詳しい記述があるので, レトロ型トランスポゾンについても理解を深めたい方には, これらを参照することをお薦めする。

トランスポゾンを用いて, 遺伝子を単離した初めての成功例は, *Ac/Ds*を用いた Fedoroff *et al.* (1984) の *bronze gene* (*Bz1*) である。その他に内在性のトランスポゾンを用いて遺伝子を単離した例としては, *Bz1* の allele である *Bz2* (McLaughlin and Walbot 1987), キンギョソウの花弁表皮細胞の形状をコントロールする転写調節因子の *Mixta* (Noda *et al.* 1994), トウモロコシの胚乳の主要貯蔵タンパク質の蓄積を制御する *Opaque-2* (Schmidt *et al.* 1987) 等が挙げられる(表1)。こうして内在性のDNA型トランスポゾンを利用したタギングの手法が確立されると同時に, クローン化したトランスポ

表1. トランスポゾン・タギングにより単離された主な遺伝子

内生トランスポゾンを用いた報告例

植物	トランスポゾン	遺伝子	遺伝子の機能	文献
トウモロコシ	<i>Ac</i>	<i>Bz1</i>	アントシアニン生合成系酵素	Fedoroff <i>et al.</i> (1984)
	<i>Mu</i>	<i>Bz2</i>	アントシアニン生合成系酵素	McLaughlin and Walbot (1987)
	<i>Spm</i>	<i>Opaque-2</i>	胚乳の主要貯蔵タンパク質 Zein の蓄積を制御する	Schmidt <i>et al.</i> (1987)
	<i>Ds</i>	<i>Knotted</i>	葉の形態形成	Sinha <i>et al.</i> (1993)
キンギョソウ	<i>Tam4</i>	<i>Mixta</i>	Mybに関連した転写因子	Noda <i>et al.</i> (1994)
	<i>Tam1, 3</i>	<i>Macho</i>	花の形態形成	Lonnig and Saedler (1994)
ペチュニア	<i>dTph1</i>	<i>NAM</i>	頂芽分裂組織形成	Souer <i>et al.</i> (1996)

外生トランスポゾンを用いた報告例

植物	トランスポゾン	遺伝子	遺伝子の機能	文献
シロイヌナズナ	<i>En/I</i>	<i>MS2</i>	雄性不稔	Aarts <i>et al.</i> (1993)
	<i>Ac/Ds</i>	<i>DRL1</i>	形態形成(ミュータントは花茎を作らない)	Bancroft <i>et al.</i> (1993b)
	<i>I/Spm</i>	<i>EDS1</i>	耐病性	Falk <i>et al.</i> (1999)
タバコ	<i>Ac</i>	<i>N</i>	TMV 抵抗性	Whitham <i>et al.</i> (1994)
トマト	<i>Ac/Ds</i>	<i>Cf-9</i>	葉カビ病抵抗性遺伝子	Jones <i>et al.</i> (1994)
	<i>Ac</i>	<i>Dwarf</i>	Cytochrome P450 family(ミュータントは矮化)	Bishop <i>et al.</i> (1996)
ペチュニア	<i>Ac</i>	<i>Ph6</i>	花色(花冠の pH 調整)	Chuck <i>et al.</i> (1993)

ンを形質転換法で異種植物に人為的に導入することによって、他の植物種にもトランスポゾン・タギングを応用する試みがなされた。外来性のトランスポゾンを用いた初の成功例は、シロイヌナズナにトウモロコシの *En/Spm* を導入して作成したタグラインから雄性不稔遺伝子 *MS2* を単離した Aarts *et al.* (1993) の報告である。この他に代表的な報告例を表1に示したが、農業的に早期活用できる遺伝子としては、TMV(タバコモザイクウイルス)抵抗性遺伝子 *N* (Whitham *et al.* 1994)、トマト葉かび病抵抗遺伝子 *Cf-9* (Jones *et al.* 1994)、矮性ミュータントから単離されサイトクローム P450 family に属する遺伝子であった *Dwarf* (Bishop *et al.* 1996) 等が挙げられる(表1)。

Ac/Ds 系を用いたトランスポゾン・タギング

外来性のトランスポゾンを用いた系には、*Ac/Ds* を利用したものが多い。ここでは、*Ac/Ds* について詳しく説明する。*Ac* はトウモロコシの自律性トランスポゾンで、転移に必要な転移酵素(*Ac* トランスポゼース)と逆反復配列(IR)の両方を持ち、単独で転移が可能である。一方、*Ds* は欠失を持つ非自律性トランスポゾンで、*Ac* トランスポゼースの非存在下では転移できない。トランスポゾン・タギングが行われた当初は、タグラインが早期に得られる *Ac* を利用した報告が多く見られたが、近年は主に *Ds* が使われるようになってきた。*Ds* を導入したトランスジェニック個体と *Ac* トランスポゼースを導入した個体とを交配することによって、*Ds* がトランスに活性化されて転移し、様々な遺伝子座に *Ds* を持つ植物が得

られる。*Ac* トランスポゼースは、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターに *Ac* トランスポゼースの cDNA を連結したものが多用されている。*IR* は除いてあるため、自己転移能はなく、変異を安定に保たせることができる。35S プロモーターを用いた場合、*Ac* トランスポゼースと *Ds* を持つ F₁ の体細胞で *Ds* の切り出し(excision)と、再挿入が起こる。本論文では *Ds* が切り出された後に再挿入が起こった場合を「転移」と記述した。また、体細胞での転移を「ソマティックな」転移と記述した。*Ds* が転移した細胞に由来する生殖細胞からは、後代に遺伝する「ジャーミナルな」転移が得られる。この場合、後代の分離を調べることで、変異の原因がトランスポゾンであることを簡便に立証できる(Bancroft and Dean 1993a)。また、ソマティックな復帰変異体も得られるため、その遺伝子がトランスポゾンによってタグされていることを簡便に立証できるといった利点がある(Yephremov *et al.* 1999)。さらに、タギングに利用するトランスポゾン内部に抗生物質耐性遺伝子を組み込んでおくことで、簡便にトランスポゾンの存在を確認することができる。現に *Ds* が転移すると抗生物質耐性になるようにベクターを工夫することによって、転移した *Ds* を持った後代を簡便に、しかも多量にスクリーニングできるようになった(Dean *et al.* 1991, Jones *et al.* 1989)。

イネにおける *Ac/Ds* の転移

イネでは、現在までに DNA 型トランスポゾンを用いて単離された遺伝子は報告されていないが、トランスポゾンの転移の報告はいくつかなされている。表2にトラ

ンスポゾン・タギングを目的としたイネの報告をまとめた。Ac/Dsの他に、内在性、及び他の植物種のレトロトランスポゾンを用いた系もある。イネのタギングにAcが利用できることは、Izawa *et al.* (1991)によって証明された。Izawa *et al.*は、エレクトロポレーション法を用いて、35Sプロモーターとハイグロマイシン耐性遺伝子の間に転移能を持つAcを連結したベクターをイネのプロトプラストに導入し、ハイグロマイシン耐性になった細胞が得られたことで、Acがイネ細胞中でも転移能を持つことを立証した。また、形質転換イネにおけるAcの転移頻度が非常に高いと述べた。Murai *et al.* (1991)もAcの転移能を確認し、EDS(empty donor site= トランスポゾンの抜け出た跡)のシーケンスを調べて、Acがイネのゲノム中でもトウモロコシの場合と同様に振る舞うことを明らかにしている。これら2つのAc転移の報告がなされた後、Shimamoto *et al.* (1993)によって、Dsをトランスに活性化することができ、Acの非存在下ではDsの挿入が安定に保たれることが報告され、イネでもDsを用いたトランスポゾン・タギング法が主流となった(Izawa *et al.* 1997) (表2)。

Dsのジャーミナルな切り出し、つまり遺伝子解析の材料に有用な後代に遺伝する切り出しの頻度は、シロイヌナズナで0.03–30% (Bancroft and Dean 1993a, Long *et*

al. 1993, Lawson *et al.* 1994, Altmann *et al.* 1995, Ito *et al.* 1999), タバコでは25–50% (Hehl and Baker 1989), トマトで4.4% (Stuurman *et al.* 1998) という報告がある。さらに切り出されたDsが再挿入されたジャーミナルな転移個体は、植物種を問わず、切り出しが検出された個体の半数程度得られたと報告されている。遺伝子解析の材料には生殖細胞での転移を起こした個体が必要であり、切り出しの頻度が高いことは、より多くのタグラインを得るという面で有利である。著者らは、2種類のDsと35Sプロモーターで誘導したAcトランスポゼースをそれぞれイネに導入し、それらを交配して、F₂個体におけるDsの転移頻度を調査した。ジャーミナルなDsの切り出しを検出したF₂個体の中で、独立した位置に転移が起こっていた頻度は、I-RS/dAc-I-RSベクターを導入した#d5系統の場合44%, Hm^RDsベクターを導入した#D14系統の場合38%であった(表3)。#D14×#A2の組み合わせでは、調査した49個体のうち、10個体がゲノム上の独立な位置にDsが転移していた。調査したF₂個体中で独立した位置への転移が起こった頻度は、I-RS/dAc-I-RSベクターを導入した#d5系統で3%, Hm^RDsベクターを導入した#D14系統で20%となった。これらの結果から、イネでは比較的高い確率でDsが転移することが明らかになった(Nakagawa *et al.* 2000)。Dsの転移頻

表2. トランスポゾン・タギングを目的としたイネにおける研究報告

文献	トランスポゾン	要約
Izawa <i>et al.</i> (1991)	Ac	Acの転移
Murai <i>et al.</i> (1991)	Ac	Ac転移後のempty donor siteのシーケンシング
Shimamoto <i>et al.</i> (1993)	Ds	Dsの転移
Hirochika <i>et al.</i> (1996a)	<i>Tto1</i> (タバコのレトロトランスポゾン)	プロトプラストに <i>Tto1</i> を導入し、転移を検出
Hirochika <i>et al.</i> (1996b)	<i>Tos17</i> (イネのレトロトランスポゾン)	<i>Tos17</i> の転移は培養によって誘導される
Hirochika (1997)	<i>Tos17</i>	<i>Tos17</i> を用いた遺伝解析法
Izawa <i>et al.</i> (1997)	Ds	Dsを用いた遺伝解析法
Chin <i>et al.</i> (1999)	Ds	Ds-GUSを用いたジーン・トラップ
Enoki <i>et al.</i> (1999)	Ac	Acを用いたゲノムの機能解析法
Liu <i>et al.</i> (1999)	<i>Tag1</i> (シロイヌナズナの自律性トランスポゾン)	35SpとGUSの間に <i>Tag1</i> を連結して導入し、 <i>Tag1</i> の転移を検出
Nakagawa <i>et al.</i> (2000)	Ds	Dsの転移頻度と連鎖解析

表3. Ds導入イネとAcトランスポゼース導入イネを交配して得られたF₂系統でのDsの切り出し、Dsの再挿入、及び独立した位置へのジャーミナルなDs転移の頻度(Nakagawa *et al.* 2000)。

Ds系統(♀)		dAc-I-RS #d 5	Hm ^R Ds #D 14
調査したF ₂ 個体数	a	241	49
ジャーミナルなDsの切り出しが検出された個体数	b	18	25
ジャーミナルなDsの切り出しが起こった頻度(%)	b/a	8	51
Dsが再挿入を示した個体数	c	14	12
Ds再挿入の頻度(%)	c/b	78	48
独立した位置への転移が起こった数	d	8	10
独立した位置への転移が起こった頻度(%)	d/b	44	38
調査したF ₂ 個体中で独立した位置への転移が起こった個体数(%)	d/a	3	20

度が高いことは、もとのT-DNA導入個体が少なくても、十分なタグラインが得られるということを示している。

また、同じ交配組み合わせによって得られたF₁個体を数個体栽培し、F₁個体別にそれに由来するF₂における転移頻度を比較すると、F₁個体別にジャーミナルな転移の頻度が異なっていた。このことから予め転移頻度の高い系統を選抜すれば、独立した位置にDsが転移した個体を数多く得られる可能性が高いことが分かった。イネはシロイヌナズナと異なり、株保存ができることから、転移頻度の高い系統を保持するということが可能である (Chin *et al.* 1999)。

Ac/Dsは、様々な植物種(トウモロコシ、タバコ、シロイヌナズナ、トマト)でT-DNA導入位置の比較的近傍に転移が起こる傾向が見られることから、付近の遺伝子を詳細に解析する際に有効であると言われている (Sundaresan 1996)。例えばトマトのCf-9を単離した例では、もとのDs挿入位置から3 cM離れたところにDsが転移していたミュータントが材料となった (Jones *et al.* 1994)。そこで、著者らはイネにおいて転移したDsとEDSとの連鎖解析を行った。その結果、独立した5個の転移系統のうち3系統は完全連鎖しており、Dsが元の導入位置の近傍に転移していると考えられた。また、1系統は11±6%の組換え価を持っており、約3 Mbp離れたイネゲノム中にDsが転移していると推測された。もう1系統は連鎖が見られず、Dsが他の染色体に転移していると考えられた (Nakagawa *et al.* 2000)。このことから、イネでも他の植物同様Dsが比較的近傍に転移しやすい性質を持つことが明らかになった。この性質は、元の挿入位置の付近の遺伝子を詳細に解析するという点では利点となり、ある特定の遺伝子を標的としたタギングにも役立つが、逆に遠くの遺伝子をタグしたい場合には欠点となる。しかし、現在までの報告から、5～10 cMおきにDsが入ったシリーズがあれば、標的遺伝子が決まっていなくてもゲノム解析には充分であると考えられるため、当初の形質転換体(スターターライン)の数が多い場合には問題はない。

また、転移後のDsがEDSと連鎖していない個体のみを選抜する方法もあり、その場合はスターターラインは2～3個体で十分であると言われている (Sundaresan 1996)。例えばSundaresan *et al.* (1995)はシロイヌナズナを材料とし、オーキシン感受性遺伝子(IAAH)をDs転移後にEDSとして残る部分のT-DNAに組み込んだベクターを用いた。IAAHは、ナフトレンアセトアミド(NAM)をナフトレン酢酸に変換する働きがあり、NAM含む培地で形質転換体の選抜を行うと、IAAHを持つ個体が除かれる逆選抜マーカーとして使用できるのである。そこで、Ds内部のマーカーであるカナマイシン耐性でDsを持つ個体を選抜し、かつNAMでIAAHを持たない、すなわちEDSを持たない個体を選抜することで、転移後のDsがEDSと連鎖していない個体の選抜を行っている。

Ac/Ds型トランスポゾン・タギングの応用

外来性遺伝子を用いたタギングには、プロモーターレスのマーカー遺伝子を導入して、遺伝子のほかに、エンハンサーやプロモーターを単離しようとするジーン/エンハンサー(またはプロモーター)・トラップ法や (Lindsey *et al.* 1993)、逆に強発現するプロモーターのエンハンサー部分をいくつか連結して、T-DNA導入位置近傍の遺伝子を過剰発現させるアクティベーション・タギング法 (Hayashi *et al.* 1992)といった応用がある。これをDNA型トランスポゾンと組み合わせることで、少数の形質転換体から多くのタグラインが作成できる。ここではAc/Ds型トランスポゾンの応用を詳しく述べたい。

1. ジーン/エンハンサー・トラップ法

ジーン/エンハンサー・トラップ法とは、レポーター遺伝子の発現を手がかりとして、遺伝子の発現パターンを検出し、未知の遺伝子を同定する方法である (図1A)。レポーター遺伝子がエンハンサーの近傍に挿入されると、そのエンハンサーに依存した発現パターンを示すことが期待されるため、部位や時期に特異的な発現をする遺伝子や、発現誘導するエンハンサー(またはプロモーター)を単離することができる。さらに、劣性致死突然変異を引き起こすような遺伝子や、機能が重複している遺伝子の解析も可能である。また、レポーター遺伝子の発現が優性であるため、ヘテロ個体でスクリーニングが可能であるといった利点を持つ。トランスポゾンにジーン/エンハンサー・トラップ法を組み合わせた最初の報告は、35S ミニマルプロモーターにGUS遺伝子を連結したものをDs内部に組み込んだDs-GUSベクター (図1B)をシロイヌナズナに利用したFedoroff and Smith (1993)によってなされた。図1Bのベクターを利用したこの系では、Ds-GUS部分が転移すると、2x35Sプロモーターにアセトラクテート合成酵素(ALS)が連結してクロルスルフロン耐性になるようにデザインされている。クロルスルフロンとハイグロマイシン耐性を示し、なおかつAcトランスポゼースを持たない個体を選抜してGUSアッセイを行ったところ、Ds転移個体の10%程度が組織特異的な発現を示した。この技術的な報告がなされた後、Springer *et al.* (1995)によって、Ds-GUSが遺伝子のイントロンに挿入されたことによって、部位及び時期特異的なGUSの発現を示したタグラインが得られ、大配偶体と胚発達に必要なPRLが単離された。その後、この系では、Dsにマーカー遺伝子であるGUSを組み合わせる用いるのが非常に一般的になった。ジーン/エンハンサー・トラップ法を用いた報告はシロイヌナズナに多く (Smith and Fedoroff 1995, Tsugeki *et al.* 1996, Klimyuk *et al.* 1999)、この系が遺伝子単離に非常に有効であることを示している。

イネでは、Chin *et al.* (1999)によってシロイヌナズナ

図1. ジーン/エンハンサー・トラップ用ベクターの例

A) 基本構造

① 抗生物質耐性 a 及びマーカーは、プロモーターを欠いているので発現しない。導入遺伝子の有無は抗生物質耐性 b で検出する。

② Ds 転移後、レポーター遺伝子であるマーカーが発現し、エンハンサーに制御されている遺伝子の単離ができる。近傍にエンハンサーやプロモーターがない場合は、マーカーの発現は見られない。

抗生物質耐性 a で Ds の転移を、抗生物質耐性 b で Ds の存在を確認できる。

B) Ds-GUS (Fedoroff *et al.* 1993)

IR, 逆反復配列; ALS, クロルスルフロン耐性遺伝子。Ds が転移すると、2x35Sp に連結してクロルスルフロン耐性を示す。; GUS, トラップ用のマーカー; HygR, ハイグロマイシン耐性。Ds が再挿入されている個体を調べるためのマーカー。; KmR, カナマイシン耐性

C) Acc-gDs (Chin *et al.* 1999)

P450, シトクローム 450 をコードするカウンターマーカー遺伝子。; 2x35SpAc, Ac トランスポゼースを 35S プロモーター 2 個で強発現させている。; Maize *Adh* intron, トウモロコシのアルコール脱水素酵素の第 3 イントロン; BarR, ビアロフォス耐性遺伝子。Ds の再挿入を調べるためのマーカー。

CSHL-gDs ベクターは *Adh* intron の代わりにシロイヌナズナの *GPA1* 遺伝子の第 4 イントロンを含み、BarR の代わりに HygR を持つ。

と同じベクター (CSHL-gDs), 及びイントロン部分を改変したベクター (図 1C, Acc-gDs) の 2 種類を用いた報告がなされている。Acc-gDs を例にとって説明すると、このベクターは、マーカー遺伝子としての P450, 2x35S プロモーターで誘導した Ac トランスポゼース, イントロ

ンを含む Ds-GUS の全てを連結したものである (図 1C)。Ds 転移個体は、サザンブロット分析によって同定している。タギング個体を材料にした遺伝子単離までは行っていないが、TAIL PCR を用いて転移した Ds 隣接領域の単離を行い、増幅した断片をプローブにサザンブロット分析を行って、半数がコピー数の少ない DNA を検出したと報告している。GUS アッセイは穎花を材料に行っており、転移した Ds のうち 8% で花器官特異的な GUS の発現を認め、イネでもジーン/エンハンサー・トラップ法が有効であると述べている。

2. アクティベーション・タギング法

アクティベーション・タギング法は、今まで行われてきた遺伝子破壊型の突然変異体から遺伝子をクローニングする方法とは逆に、ゲノム上にランダムにエンハンサーを挿入し、付近の遺伝子の転写を活性化した突然変異体を作成して、原因となっている転写活性化された遺伝子をクローニングする方法である (図 2)。この方法は、非常に発現の弱い遺伝子でも単離できることの他に、前述のエンハンサー・トラップと重複する利点を持つ。主に用いられているアクティベーション・タギング用ベクターは 35S プロモーターのエンハンサー部分を 4 つ繋ぎあわせたものにマーカー遺伝子を連結したものである (図 2)。未だトランスポゾンと組み合わせた報告はなされていないものの、シロイヌナズナでは近いうちに結果が出されることが期待される (Weigel *et al.* 2000)。記述のみの報告しかないので、詳しい T-DNA の構造は不明だが、使用されているベクターの Ds 部分は、内部に 35S プロモーターのエンハンサー部分を 4 つ繋ぎあわ

図2. アクティベーション・タギング用ベクターの基本構造

① 抗生物質耐性はプロモーターを欠いているので発現しない。遺伝子導入の有無はマーカーで検出する。35SEn x 4 は 35S RNA プロモーターのエンハンサー配列をタンデムに 4 個連結したもの。

② Ds が転移するとエンハンサーが機能し、周囲の遺伝子が強発現する。選抜方法を変えることで、単離できる遺伝子は様々である。抗生物質耐性 a で Ds の転移を、マーカーの発現で Ds の存在を確認できる。

たものにGUSを組み込んだものである。つまり、図2のマーカー部分にGUSが使われている。

イネでは森ら(1998)による学会報告がある。使用しているDsの構造は、内部に35Sプロモーターのエンハンサー部分を4つ繋ぎあわせたものにピアロフォス耐性遺伝子を組み込んだものである。現時点では、葉及び花の顕著な形態変異体が1系統ずつ得られたという報告がある。

3. 部位特異的組換えによる欠失誘導

前述以外の応用法として、Dsに部位特異的組換え因子を組み込み、ゲノムに直接組換えや欠失を起こさせようとする系があげられる(van Haaren and Ow 1993)(図3A)。最初に報告されたのは、DsにCre-loxを組み合わせた系であった(Osborne *et al.* 1995)(図3B)。Cre-lox部位特異的組換えは、2つのlox配列をCre組換え酵素が認識することで起こり、2つのlox配列が同一方向に存在すると、lox配列に囲まれたDNA領域の欠失、逆位、もしくは転座が誘導される。Ds内部にloxを組み込んでおくことで、Dsの転移により、lox配列をゲノム上に散在させることができる。Ds転移個体にCreを共存させると、Ds転移後に残るT-DNAの元の挿入箇所、つまりEDSを含むT-DNA部分のlox配列と、転移したトランスポゾン内のlox配列間で組換えを誘導し、染色体に欠失を起こすことができる(図3B)。こうして、Ds単独では遺伝子タギングできなかった個体からも突然変異体が得られると期待される。現段階ではジャーミナルな欠失を起こした突然変異体の報告はなされていないが、今後の研究発表が期待される。

著者らは、イネを材料としてトランスポゾン・タギングと部位特異的組換えを組み合わせた実験を行っている。著者らが使用しているのは、味噌・醤油酵母(*Zygosaccaromyces rouxii*)由来の部位特異的組換えの認識配列であるRSを3ヶ所含むDNA型トランスポゾンDsを含むベクター(図3C)(Machida *et al.* 1997)である(Nakagawa *et al.* 2000, 2001)。R/RS部位特異的組換えは、58 bpからなるRS配列をRタンパク質(Recombinase)が認識することによって起こり、Cre-lox系と同様、2つのRS間で欠失や逆位などが誘導される。Ds転移が起こっており、2つのRS間の距離が7.3~10.1 kbであることを明らかにした4個体をR組換え酵素を持つ系統と交配し、得られたF₂の葉を材料にPCRによる欠失の検出を行った。その結果、調査した459個体のうち19個体のF₂の葉において、RS間の欠失を検出した(表4)。DsがLB側に転移したk2-2はベクター内に欠失を起こしたのみであったが、RB側に転移した3系統はRS間にイネゲノム領域を0.1~2.8 kb含んでおり、染色体DNAの欠失が起きていることを明らかにした。しかし、今までに検出した欠失は全てソマティックな欠失であった(Nakagawa *et al.* 2001)。ソマティックな欠失を検出したF₂個体につ

図3. 部位特異的組換えを組み合わせたベクターの例

A) 基本構造

- ①マーカー及び抗生物質耐性bはプロモーターを欠いているので発現しない。遺伝子導入の有無は抗生物質耐性aで検出する。
- ②Dsが転移すると抗生物質耐性bが発現する。マーカーはプロモーターを欠いているので発現しない。抗生物質耐性aでDsの存在を確認できる。
- ③組換えが起こるとマーカーが発現する。抗生物質耐性a及びbは失われる。

B) T-DNAlox-Dslox (Osborne *et al.* 1995)

lox, Creの認識配列; surA, B, Dsが転移すると35Spに連結してクロルスルフロン耐性を示す。; AAC, ゲンタマイシン耐性遺伝子。DsがRB側に転移した場合は、プロモーターがないため欠失が起こっても発現しないが、LB側に転移した場合には、35SpとAACが連結してゲンタマイシン耐性を示す。

C) I-RS/dAc-I-RS (Nakagawa *et al.* 2000a, b)

RS, Rの認識配列。RSがDs内に逆向きに2ヶ所含まれており、Dsが上下逆向きに再挿入しても欠失誘導が可能。; 1'p, T-DNAの1'プロモーター; NPTII, カナマイシン耐性遺伝子。Dsが転移すると1'プロモーターに連結してカナマイシン耐性を示す。このベクターには欠失を確認するマーカーはない。

いてはジャーミナルな欠失が起こった個体が見られると期待されるため、現在F₃個体を展開中である。

表4. Ds転移個体(♀)とR組換え酵素導入個体(#Re-2)との交配によって得られたF₂でのRS間の欠失個体数と2つのRS間の距離(中川ら2000).

Ds転移個体	転移の方向	2つのRS間の距離	調査したF ₂ 個体数	RS間の欠失を示したF ₂ 個体数
k2-2	LB側	8.0 (kbp)	82	3
k2-1	RB側	10.1	272	5
k4-1		8.3	73	10
k4-4		7.3	32	1
計			459	19

Ac/Ds タグラインの有用性

イネ遺伝子の機能解析にAc/Ds系が有効であることは、Enoki *et al.* (1999)によって報告されている(表2). Enoki *et al.* はAcを利用してタギングを行っているが、Acが転移した個体から99の隣接領域を単離し、部分的にシーケンスを決定したところ、21クローンでタンパク質をコードしている遺伝子と相同性が見られた. よって、Acがタンパク質をコードしている遺伝子に入りやすいと述べている. また、Ac転移系統でノックアウトが起こっている個体を選抜する目的で、約6000のAc系統を材料にランダムに選んだ14の遺伝子とAcの間でPCRを行い、Acが挿入されている遺伝子を持つ個体を調査したところ、そのような個体が2個体得られた. そのうち1個体は、ジャーミナルなAc転移によるものであったが、もう1個体はソマティックなAc転移によるものであった. ジャーミナルなAc転移によるノックアウトが起こったタグラインが得られたことから、イネでAcを用いたPCRベースのノックアウト・スクリーニングが可能であることが証明された. また、他の染色体にもAcが充分転移することが証明され、ある特定の標的遺伝子を標的としたタギングのように多くのタグラインが必要な系にAcが有効であることが分かった.

今後は、単純にAc/Ds系を利用したベクターだけでなく、前述のジーン/エンハンサー・トラップやアクティベーション・タギング、部位特異的組換えを組み合わせた応用可能なベクターを用いたタグラインが大きな位置を占めることが予想される. これは内在性のレトロトランスポゾンでは利用できない系であり、遺伝子解析の材料を作る上で威力を発揮すると期待される. 研究が進んでいるレトロトランスポゾン*Tos17*の他に、これらのDNA型トランスポゾンを併用することで、それぞれが持つ利点を最大限に活かせば、ゲノムを完全にカバーするタグラインができあがるであろう.

謝辞

この研究は、科学技術庁の「未来開拓研究」にサポートされている(JSPS=RFTF97L00601). 中川裕子は学術振興会の特別研究員である.

引用文献

- Aarts, M. G. M., W. G. Dirkse, W. J. Stiekema and A. Pereira (1993) *Nature* 363: 715–717.
- Altmann, T., G. Felix, A. Jessop, A. Kauschmann, U. Uwer, H. Pena-Cortes and L. Willmitzer (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247: 646–652.
- Bancroft, I. and C. Dean (1993a) *Genetics* 134: 1221–1229.
- Bancroft, I., J. D. G. Jones and C. Dean (1993b) *Plant Cell* 5: 631–638.
- Bishop, G. J., K. Harrison and J. D. G. Jones (1996) *Plant Cell* 8: 959–969.
- Chin, H. G., M. S. Choe, S. H. Lee, S. H. Park, S. H. Park, J. C. Koo, N. Y. Kim, J. J. Lee, B. G. Oh, G. H. Yi, S. C. Kim, H. C. Choi, M. J. Cho and C. Han (1999) *Plant J.* 19: 615–623.
- Chuck, G., T. Robbins, C. Nijjar, E. Ralston, N. Courtney-Gutterson and H. K. Dooner (1993) *Plant Cell* 5: 371–378.
- Dean, C., C. Sjodin, I. Bancroft, E. Lawson, C. Lister, S. Scofield and J. Jones (1991) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 45: 63–75.
- Enoki, H., T. Izawa, M. Kawahara, M. Komatsu, S. Koh, J. Kyojuka and K. Shimamoto (1999) *Plant J.* 19: 605–613.
- Falk, A., B. J. Feys, L. N. Frost, J. D. Jones, M. J. Daniels and J. E. Parker (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3292–3297.
- Fedoroff, N. V., D. B. Furtek and O. E. Nelson (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3825–3829.
- Fedoroff, N. V. and D. Smith (1993) *Plant J.* 3: 273–289.
- Hayashi, H., I. Czaja, H. Lubenow, J. Schell and R. Walden (1992) *Science* 258: 1350–1353.
- Hehl, R., and B. Baker (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217: 53–59.
- Hirochika, H., H. Otsuki, M. Yoshikawa, Y. Otsuki, K. Sugimoto and S. Takeda (1996a) *Plant Cell* 8: 725–734.
- Hirochika, H., K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa and M. Kanda (1996b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7783–7788.
- Hirochika, H. (1997) *Plant Mol. Biol.* 35: 231–240.
- Ito, T., M. Seki, N. Hayashida, D. Shibata and K. Shinozaki (1999) *Plant J.* 17: 433–444.
- Izawa, T., C. Miyazaki, M. Yamamoto, R. Terada, S. Iida and K. Shimamoto (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 391–396.
- Izawa, T., T. Ohnishi, T. Nakano, N. Ishida, H. Enoki, H. Hashimoto, K. Itoh, R. Terada, C. Wu, H. Miyazaki, T. Endo, S. Iida and K. Shimamoto (1997) *Plant Mol. Biol.* 35: 219–229.
- Jones, J. D. G., F. M. Carland, P. Maliga and H. K. Dooner (1989) *Science* 244: 204–207.
- Jones, D. A., C. M. Thomas, K. E. Hammond-Kosack, P. J. Balint-Kurti and J. D. G. Jones (1994) *Science* 266: 789–793.
- Klimyuk, V. I., F. Persello-Cartieaux, M. Havaux, P. Contard-David,

- D. Schuermann, K. Meierhoff, P. Gouet, J. D. G. Jones, N. E. Hoffman and L. Nussaume (1999) *Plant Cell* 11: 87–99.
- Lawson, E. J. R., S. R. Scofield, C. Sjodin, J. D. G. Jones and C. Dean (1994) *Mol. Gen. Genet.* 245: 608–615.
- Lindsey, K., W. Wei, M. C. Clarke, H. F. McArdle, L. M. Rooke and J. F. Topping (1993) *Transgenic Res.* 2: 33–47.
- Liu, D., S. Zhang, C. Fauquet and N. M. Crawford (1999) *Mol. Gen. Genet.* 262: 413–420.
- Long, D., J. Swinburne, M. Martin, K. Wilson, E. Sundberg, K. Lee and G. Coupland (1993) *Mol. Gen. Genet.* 241: 627–636.
- Lonnig, W. E. and H. Saedler (1994) *Mol. Gen. Genet.* 245: 636–643.
- Machida, C., H. Onouchi, J. Koizumi, S. Hamada, E. Semiarti, S. Torikai and Y. Machida (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8675–8680.
- McLaughlin, M. and V. Walbot (1987) *Genetics* 117: 771–776.
- 森 昌樹・杉本和彦・岡部 健・田切明美・西沢八恵子・廣瀬咲子・永田俊文・鐘ヶ江弘美・柴田百合子・土岐精一・宇垣正志・廣近洋彦・菊池尚志(1998) *育種* 48(別2): 23.
- Murai, N., Z. Li, Y. Kawagoe and A. Hayashimoto (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 617–622.
- Nakagawa, Y., C. Machida, Y. Machida and K. Toriyama (2000) *Plant Cell Physiol.* 41: 733–742.
- Nakagawa, Y., C. Machida, Y. Machida and K. Toriyama (2001) *Theor. Appl. Genet.* (印刷中)
- 中川裕子・町田千代子・町田泰則・鳥山欽哉(2000) *育種学研究* 2(別2): 86.
- Noda, K., B. J. Glover, P. Linstead and C. Martin (1994) *Nature* 369: 661–664.
- Osborne, B. I., U. Wirtz and B. Baker (1995) *Plant J.* 7: 687–701.
- Schmidt, R. J., F. A. Burr and B. Burr (1987) *Science* 238: 960–963.
- Shimamoto, K., C. Miyazaki, H. Hashimoto, T. Izawa, K. Itoh, R. Terada, Y. Inagaki and S. Iida (1993) *Mol. Gen. Genet.* 239: 354–360.
- Sinha, N. R., R. E. Williams and S. Hake (1993) *Genes Dev.* 7: 787–795.
- Smith, D. L. and N. V. Fedoroff (1995) *Plant Cell* 7: 735–745.
- Souer, E., A. van Houwelingen, D. Kloos, J. Mol and R. Koes (1996) *Cell* 85: 159–170.
- Springer, P. S., W. R. MacCombie, V. Sundaresan and R. A. Martienssen (1995) *Science* 268: 877–880.
- Stuurman, J., H. J. J. Nijkamp and M. J. J. Haaren (1998) *Plant J.* 14: 215–223.
- Sundaresan, V., P. Springer, T. Volpe, S. Haward, J. D. G. Jones, C. Dean, H. Ma and R. Martinsson (1995) *Genes Dev.* 9: 1797–1810.
- Sundaresan, V. (1996) *Trends Plant Sci.* 1: 184–190.
- 武田 真・宮尾安藝雄・廣近洋彦(1999) *育種学研究* 1: 243–248.
- Tsugeki, R., E. Z. Kochieva and N. V. Fedoroff (1996) *Plant J.* 10: 479–489.
- van Haaren, M. J. and D. W. Ow (1993) *Plant Mol. Biol.* 23: 525–533.
- Weigel, D., J. H. Ahn, M. A. Blazquez, J. O. Borevitz, S. K. Christensen, C. Fankhauser, C. Ferrandiz, I. Kardailsky, E. J. Malancharuvil, M. M. Neff, J. T. Nguyen, S. Sato, Z. Y. Wang, Y. Xia, R. A. Dixon, M. J. Harrison, C. J. Lamb, M. F. Yanofsky and J. Chory (2000) *Plant Physiol.* 122: 1003–1013.
- Whitham, S., S. P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr and B. Baker (1994) *Cell* 78: 1101–1115.
- Yephremov, A., E. Wisman, P. Huijser, C. Huijser, K. Wellesen and H. Saedler (1999) *Plant Cell* 11: 2187–2201.