イネ貯蔵蛋白質グルテリン遺伝子の発現制御

高岩文雄*

種子貯蔵蛋白質遺伝子の発現は、種子登熟時期特異的に、また子葉や胚乳など貯蔵組織特異的に厳密に制御されている。したがって、貯蔵蛋白質遺伝子は植物遺伝子の発現制御機構を明らかにするための良いモデル系となる。ここでは、イネの主要貯蔵蛋白質であるグルテリン遺伝子の発現制御に関与するシスエレメントおよび転写調節因子を中心に紹介する。

高等植物の種子には乾燥重量あたり、豆類では20~30%、穀類では10%程度の蛋白質が含まれている。この種子蛋白質には、プロテアーゼやアミラーゼなど発芽の際に特定の機能をもつものと、それ自身では特定の機能をもたず発芽の際に分解されて窒素源として幼植物体に利用される種子貯蔵蛋白質が含まれており、後者が全体の7~8割を占めている。

種子貯蔵蛋白質は一般に、開花後の特定の時期(種子登熟期の中期および後期)に、しかも限定された組織(双子葉植物では子葉、単子葉植物では胚乳)で多量に合成され、貯蔵組織に存在する蛋白質顆粒と呼ばれる細胞内顆粒に蓄積される。すなわち、これら遺伝子群の発現は、組織特異的に、また種子の登熟ステージ特異的に厳密に制御されている。したがって、植物の遺伝子発現制御機構の研究において格好の材料として注目を受け、多くの情報が集積されてきた⁽¹⁾。さらに我々人類は、直接的あるいは間接的にこれら種子貯蔵蛋白質を蛋白質源として利用しており、栄養学的、蛋白質化学的見地から大きな関心を払ってきた。

種子貯蔵蛋白質遺伝子は植物ではいち早く、1981年のインゲンマメのファゼオリン遺伝子を皮切りに、その後も多くの植物で単離され、一次構造の決定が行なわれてきた。その後、*Agrobacterium*のTiプラスミドを利用する方法や直接導入法など遺伝子導入技術の急速な発展に伴い、一つには特異的発現制御に関与するDNA配列(シ

スエレメント)の同定、他方においては異種植物の高品質貯蔵蛋白質遺伝子や改良化した特定の貯蔵蛋白質成分の改良を図る道も開けてきた⁽²⁾。本稿では、筆者らが進めているイネの主要貯蔵蛋白質であるグルテリン遺伝子の構造および発現制御について、現在までに得られた研究成果を紹介したい。

イネ種子貯蔵蛋白質^(3,4)

イネ種子中には乾燥重量あたり8~10%程度の蛋白質が含まれている。この蛋白質のうち、希酸や希アルカリにのみ可溶なグルテリンと呼ばれる成分が約80%を占め、主要な貯蔵蛋白質となっている。残りは有機溶媒で可溶なプロラミン(10~15%)と、塩で可溶なグロブリン(5~10%)とで構成されている。この蛋白質構成比は、他の多くの穀類の種子では一般にプロラミンが主要な貯蔵蛋白質であることと比べると、大きな相違点であり、イネ種子の特徴となっている。

イネグルテリンは、分子量の不均一な37~39 kdの酸性サブユニットと22~23 kdの塩基性サブユニットから構成されている。これら両サブユニットはジスルフィド(S-S)結合を介して1:1の割合で会合し、蛋白質顆粒中(PB II)に集積されている。一方、プロラミンは16 kd, 13 kd, 10 kdの数種類のポリペプチドから構成されており、グロブリンは分子量26 kdの大きさを有している。これらの貯蔵蛋白質はプロラミンの場合、グルテリンとは別の形態の異なる蛋白質顆粒 I (PB I) に、グロブリンはグルテリンと同じ蛋白

Gene Regulation of Rice Storage Protein Glutelin

* Fumio TAKAIWA, 農林水産省農業生物資源研究所

質顆粒 (PB II) に集積されている。

イネグルテリンの構造⁽⁴⁾

In vivo でのアイソトープによるパルス標識-
チェイス実験, poly(A) mRNA の無細胞蛋白質
合成系での翻訳, さらにグルテリンサブユニット
抗体を用いたウェスタンブロットングの結果な
どから, イネグルテリンを構成する酸性および塩
基性両サブユニットは, 両者を含む共通の前駆体
(57 kd) として翻訳された後, 限定分解により形
成されることが示されてきた。また, 蛋白質顆粒
への集積機構に関しても, 粗面小胞体→ゴルジ体
→液胞を経由して PB II にグルテリンが集積さ
れることを示唆する結果が得られてきた。これら
の生合成機構および集積機構は, イネグルテリン
とグロブリンとでは溶解性という物理化学的特性
が大きく異なるにもかかわらず, 多くの点でマメ
類の主要な種子貯蔵蛋白質である 11S グロブリン
と類似していることを示している。そこで 11S
グロブリンとの共通性をより明らかにするため,
イネ登熟期の胚乳の cDNA ライブラリーよりグ
ルテリン cDNA クローンを単離し, その塩基配
列からグルテリン前駆体のアミノ酸配列を推定し
た。

この結果, イネグルテリンの構成成分である 2
個のサブユニットはまず, 酸性サブユニット→塩
基性サブユニットの順序で配列しており, 酸性サ
ブユニットの 5' 端には疎水性アミノ酸に富むシ
グナルペプチドが存在することが示された。また,
前駆体から両成熟サブユニットへの翻訳後の
限定分解には特殊なエンドペプチダーゼが関与
し, アスパラギンとグリシンの間で切断を受ける
ことも示された。このグルテリン前駆体のアミノ
酸配列を, エンドウのレグミン
やダイズのグリシニンなど 11S
グロブリンのアミノ酸配列と比較したところ, これらに対し 37
~40% 程度の相同性を示した。
また, サブユニット間の会合に
関与するシステイン残基の位置
も 11S グロブリンと相同な位

置に保持されていた。

これらの結果は, イネの主要な貯蔵蛋白質であ
るグルテリンが多くの点で双子葉植物の主要な貯
蔵蛋白質である 11S グロブリンと共通性を有し,
同じ祖先の遺伝子から進化してきたことを意味し
ている。一方, 11S グロブリンとイネグルテリン
の物理化学的特性の異なる要因に関しては, 分子
の表面に位置している酸性サブユニットの C 末端
領域が 11S グロブリンに比較してイネグルテリ
ンでは親水性度が低く, これが塩溶液に対する不
溶性と関係していることが示唆されている。

イネグルテリン遺伝子群^(5,6)

グルテリンを構成する酸性サブユニットおよび
塩基性サブユニットを二次元電気泳動で解析する
と, 前者は少なくとも 12 個, 後者は少なくとも
9 個のポリペプチドに分離される。これらグルテ
リンをコードする遺伝子は, cDNA および核遺
伝子のレベルで現在までに 8 個の独立した遺伝子
群が分離されており, 6 個については塩基配列の
構造から, アミノ酸配列や分子量も推定されてい
る (表 1)。また, 塩基配列やアミノ酸配列の比較
から, グルテリン遺伝子群はグルテリン A およ
び B に対応する 2 つの大きなサブファミリーに分類
することができ, 互いに 60~65% の相同性を示
した。これら両サブファミリー中には, 80% 以上
の相同性を示す少なくとも 4 種類以上のメンバー
が存在することが, サザン分析や得られた cDNA
や核遺伝子のクローンの解析から明らかにされて
いる。

現在までに解析されたグルテリン核遺伝子中に
は, いずれにも酸性サブユニットコード領域に 2
個, 塩基性サブユニットコード領域に 1 個, 計 3

表 1 ■ グルテリン前駆体および酸性・塩基性両サブユニットの分子量および
アミノ酸残基数

遺伝子	グループ	分子量 (カッコ内アミノ酸残基数)		
		前駆体	酸性サブユニット	塩基性サブユニット
<i>GluA-1</i>	A	56216 (499)	31862 (282)	21760 (193)
<i>GluA-2</i>	A	56305 (499)	31904 (282)	21806 (193)
<i>GluA-3</i>	A	56073 (496)	31924 (281)	21539 (191)
<i>GluB-1</i>	B	56674 (499)	31850 (278)	21743 (197)
<i>GluB-2</i>	B	56226 (496)	31267 (274)	22302 (198)
<i>GluB-3</i>	B	56817 (499)	32037 (279)	22168 (197)

図 1 ■ グルテリン遺伝子群の構造

↑ シグナルペプチド切断部位, ↑ 翻訳後アサブユニット切断部位. AACA : 共通配列領域, TATA : TATA ボックス, AATAAAA : ポリアデニル化シグナル

個のイントロンが見いだされる (図 1). これらイントロンの挿入されるアミノ酸配列への相対的位置は、イネグルテリンと進化的起源を同じくする 11S グロブリン遺伝子と完全に一致していた。また、これらイントロンは 77~129 bp と短く、A+T 含量がコード領域に比べ 15~20% 程度高いという特徴をもっていた。さらにイントロンとエキソンの境界部位の配列は AG/gt.....ag/であり、他の真核生物のスプライシングと共通の機構によりイントロンが除去されることが推察されている。

次に、現在までに明らかになっている 6 個のグルテリン前駆体のアミノ酸配列を比較したところ、酸性サブユニットの C 末端領域や N 末端領域、130~140, 210~225 の領域、塩基性サブユニットの C 末端領域が変異に富んでいた。これらの変異に富む領域は、イネグルテリンと 11S グロブリンとの比較においても同定されていることから、グルテリンの会合など立体構造形成に関与しない機能のない領域と考えられる。したがって、今後イネグルテリン遺伝子の改良の際のターゲットとして注目できる領域である。

グルテリン遺伝子群の発現と 5' 上流域の構造

グルテリン遺伝子群の種子登熟過程での発現様式を調べるため、代表的な 3 個の遺伝子について cDNA をプローブにして、開花後 6 日目からほぼ胚乳が完熟する 20 日目までの mRNA の発現量をノーザン分析で解析した。その結果、*GluA-2* や *GluB-1* 遺伝子の mRNA 量は開花後 6 日目より漸進的に増加し、14 日目で最大になり、その後減少することが示された。一方、*GluA-3* の遺伝子に関しては、他の遺伝子と異なり登熟期初期にはほとんど検出されず、登熟期後期の 20 日目に mRNA のレベルが最大になった。したがって、グルテリン遺伝子群の発現に関しては、すべての遺伝子群が同調的に発現されることなく、一部遺伝子については発現時期がずれていることが示された。

さて、胚乳および登熟期特異的発現に関与すると思われる調節領域を同定するため、現在までに構造解析の行なわれている 6 個のグルテリン遺伝子の 5' 上流域の塩基配列の比較を行なった。これら遺伝子には、いずれにも典型的な TATA ボックスが転写開始点から上流 -34~-28 bp の所

に見いだされる。しかし CAAT ボックスや GGA ボックス様の配列は見いだすことができない。また、5' 上流域の塩基配列は同じサブファミリー内では高い相同性を示すにもかかわらず、A と B の 2 つのサブファミリー間では相同性はほとんど見られない。すべての遺伝子で共通に見られる 10 bp 以上の連結した共通配列は唯一、転写開始点から上流 -60~-80 bp の所に見いだされる AACAACTCTATC という 13 bp の配列のみであった。この配列は、他の貯蔵蛋白質遺伝子の共通配列として知られるレグミンボックスやビシリンボックス、-300 エlement や RY 反復配列などいずれとも類似しておらず、イネグルテリンに特有な配列であった。

一方、ノーザン分析で他の遺伝子と発現時期の異なることが明らかにされてきた *GluA-3* 遺伝子と同じサブファミリーに属する *GluA-1* や *GluA-2* 遺伝子の 5' 上流域の塩基配列を比較したところ、転写開始点から約 -170 bp 付近まではコード領域と同程度の相同性を示すにもかかわらず、この付近より上流域では相同性が見られなくなることが示された。したがって、これらの遺伝子間の 5' 上流域の塩基配列の比較から、胚乳特異的発現に関与するシスエレメントは転写開始点より上流 -60~-80 の共通配列領域に、生育時期特異的発現のシスエレメントは -170 bp より上流領域にあることが推察された。

形質転換体タバコを用いた胚乳特異的発現に関与する制御領域（シスエレメント）の同定⁽⁷⁾

次に、-60~-80 bp 上流域に見いだされた 13 bp の共通配列の機能を明らかにするために、グルテリンプロモーターとレポーター遺伝子との融合遺伝子をタバコに導入し、形質転換体タバコの種子中でのレポーター遺伝子の発現の解析を行なった。まず、グルテリンのサブファミリー A の遺伝子 (*GluA-2*) の 5' 上流域 (-1336~+1) を、バイナリーベクター pBI101.1 の β -グルクロニダーゼ (*GUS*) レポーター遺伝子の翻訳領域上流に組み込み、ヘルパープラスミド (pRK2013) の助けを借りて、*Agrobacterium tumefaciens* LBA

図 2 ■ 形質転換体タバコ種子における登熟過程における活性の変動

GluA-2 遺伝子のプロモーターの以下のような 5' 欠失変異体と *GUS* 遺伝子との融合遺伝子をタバコに導入した。-1003 (-1003~+1 bp), -754 (-754~+1 bp), -441 (-441~+1 bp), -237 (-237~+1 bp)。

4404 に移行させた。このようにして得られた *Agrobacterium* をタバコの葉の切片に感染させ、ベクター上のカナマイシン耐性遺伝子 (*nos-NPT II*) によってカナマイシン耐性になった再生植物体を得た。次に、この再生植物体の葉より DNA を抽出し、サザン分析により外来遺伝子の存在を検討した。その結果、ハプロイドあたり 1~10 個の遺伝子が各個体に導入されていることが明らかになった。そこでこれら形質転換植物体を用いて、*GUS* レポーター遺伝子がグルテリンプロモーターの制御により種子特異的かつ登熟期特異的に発現しているかどうかを調べた。

蛍光基質 4-MUG (4-メチルウンベリフェリルグルクロニド) を基質に、登熟期の種子、葉、および茎の *GUS* 活性を調べたところ、葉や茎にはほとんど *GUS* 活性は検出されず非形質転換体と同レベルであり、登熟期の種子にのみ特異的に見いだされた。さらに登熟過程における *GUS* 活性の変動を調べたところ、開花後 12 日目以後 *GUS* 活性は急速に高まり 20 日目でピークになりその後減少することも示された (図 2)。そこで、種子中のどの組織に *GUS* 活性が局在しているのかを調べるために、*GUS* の発色基質である

図 3 ■ 形質転換体タバコ種子の X-Gluc による組織化学的染色

A : グルテリンプロモーター (-441~+1) と *GUS* 遺伝子との融合遺伝子を導入した形質転換体タバコ種子. *GUS* 遺伝子は胚乳 (EN) 組織特異的に発現し青く呈色する (写真では黒っぽくなっている). EM : 胚
B : 非形質転換体のコントロールのタバコ種子

X-Gluc (5-ブロモクロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸) を用いて組織化学的検出を行なった. 種子のさを 2~3 mm に切断し, X-Gluc の入ったリン酸緩衝液に 37°C で一晩インキュベートした. もし *GUS* 活性が存在すると, 青色に染まって見える. この手法を用いることにより, 導入されたグルテリン-*GUS* 融合遺伝子の発現が登熟期中期から後期の胚乳組織に特異的であることが示された (図 3).

これらの結果から, イネグルテリンプロモーターが双子葉植物

物のタバコで正常に機能し, 胚乳特異的, 登熟期特異的に *GUS* 遺伝子の発現を制御していることが示された. そこで次に, 胚乳特異的発現に *GluA-2* 遺伝子の 5' 上流域配列のどこまでが必要かを調べた.

エキソヌクレアーゼ III を用いて 5' 上流からのプロモーター領域の欠失変異体 (-1003, -754, -441, -237, -100, -74) を作製し, これらを pBI 101.1 の *GUS* レポーター遺伝子上流に挿入し *Agrobacterium* を介してタバコに導入した. これらの 5' 欠失変異体の導入された形質転換体タバコを用いて種子の *GUS* 活性を比較したとこ

図 4 ■ *GluA-2* 遺伝子の胚乳特異的発現に関するシスエレメントの同定
GluA-2 遺伝子のプロモーターの 5' 欠失変異体シリーズと *GUS* 遺伝子との融合遺伝子を作製し, *Agrobacterium* を介してタバコに導入した. これら形質転換体タバコ種子の *GUS* 活性を測定した.

ろ, -1336 bp から -441 bp までの 5' 欠失変異体の *GUS* 活性はほぼ同レベルであり, 組織特異的発現や生育時期特異的発現に変異は認められなかった. しかし, -237 bp まで削るとほとんどコントロールレベルにまで *GUS* 活性が低下した. したがって, -441~-237 bp の領域の中に, 組織特異的発現に関与する制御領域が存在することが示された (図 4).

同様の実験は, 別のサブファミリーのグルテリン遺伝子 *GluB-1* を用いても行なわれた. まず, *GluB-1* の 5' 上流域 (-1307~+14) をバイナリーベクター pBI 101 の *GUS* レポーター遺伝子の

上流に挿入し、*Agrobacterium* を介してタバコに導入した。その結果、サブファミリー B の遺伝子においても導入された *GUS* 遺伝子は登熟期の種子に特異的に発現されていた。また X-Gluc を基質とした組織染色によっても *GUS* 活性を発現している組織は胚乳組織のみで、決して胚や他の組織は青く染まることはなかった。

次に、5' 上流から削っていった -688, -474, -384 および -86 bp の欠失変異体シリーズを作製した。-1307 bp のものに比較して -688 bp および -474 bp の 5' 欠失変異体では種子中の *GUS* 活性は平均半分から 1/3 に、さらに -474 bp から -384 bp まで削ると前者の平均 1/5 以下になることが示された。これらの *GUS* 活性のレベルはノーザン分析によって検出される mRNA 量とほぼ一致することから、転写レベルで調節されていることも示された。また、-384 bp 上流まで削った 5' 欠失変異体においても胚乳特異的発現や登熟時期特異的発現の制御は変化しなかった。一方、転写開始点から上流 -86 bp まで削った場合、大部分の形質転換植物体については非形質転換体の種子と同レベルの *GUS* 活性を示すにもかかわらず、一部 (3/10 個体) のものでは有意な種子特異的 *GUS* 活性が検出された。したがって、これらのサブファミリー A および B の遺伝子を用いた 5' 欠失変異体の遺伝子導入実験から、胚乳特異的発現に関与するシスエレメントは -86 bp より下流のおそらく共通配列の見られる -60 ~ -80 bp の所に、そしてエンハンサー様な発現量を制御する領域は -250 ~ -400 bp 上流域中に存在するのではないかと推察された。

今後、これら正に働く制御因子については 5' 欠失変異性をイネに遺伝子導入し、均一なイネを用いた系においてもタバコを用いて得られたと同様な結果が得られるかどうかを調べる必要がある。

トランス因子の解析⁽⁸⁾

真核生物の遺伝子発現においても、バクテリアと同様、発現する遺伝子上の制御に関わるシスエレメントと、これを認識し調節に関与する蛋白質

図 5 ■ メチル化阻害実験による核蛋白質因子の結合領域の同定

T+C と G は、マキサム・ギルバートの塩基配列のパターン。F: フリーのプローブの G 特異的切断パターン、B: 蛋白質-DNA 複合体から回収された DNA 断片の G 特異的切断パターン。

(トランスファクター) があり、これらの相互作用により遺伝子発現のスイッチの on/off が制御されていることが知られてきた。そこでグルテリン遺伝子のプロモーター領域にトランスに働く因子を調べる目的で、*GluA-2* 遺伝子の 5' 上流域 (-1336 ~ +1) を *Hinf* I-*Dde* I で切断後、³²P で末端標識し、イネ登熟中期の種子の核蛋白質との結合能をゲルシフト法によって解析した。その結果、-272 ~ -100 bp の DNA 断片に特異的に結合する蛋白質因子が検出された。この断片との結合は葉や根の核抽出液を用いた時は検出されないことから、登熟期種子特異的でもあった。次に、核蛋白質因子がどのような配列を認識して結合しているのかを同定するため、-272 ~ -100 bp の DNA 断片を用いてメチル化阻害実験を行なった。ジメチル硫酸により部分的にメチル化したプローブ DNA を用い、ゲルシフト法で核蛋白質

図 6 ■ -130~-120 bp 領域に結合する核蛋白質因子に対する競合実験

B1~3: 蛋白質-DNA 複合体, F: フリーのプローブ.
 プローブは *GluA-2* 遺伝子の -143~-110 bp 領域を含む 33 残基の合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P で末端標識して用いた.
 33W: プローブと同じ, 33M: 3 残基置換した 33 残基の合成オリゴヌクレオチド, 20W: -137~-118 bp 領域を含む 20 残基の合成オリゴヌクレオチド, 25C: -216~-192 bp 領域を含む 25 残基の合成オリゴヌクレオチド. これらの合成オリゴヌクレオチドをプローブの 100 倍のモル比で加えゲルシフト分析を行なった.
 N: 核抽出液なし, O: 競合オリゴヌクレオチドなし

因子と結合した DNA 断片 (B) とフリーの DNA 断片 (F) を分離後回収し, ピペリジン処理しシーケンス用ゲルで分離した. 図 5 に示し

たように, B と F のラダーのパターンを比較したところ, 転写開始点から上流 -130~-120 bp の G 残基がレーン C では抜けていたり薄くなっていた. このことから, 矢印で示した塩基が結合に必要な G 残基であり, 結合に必要なコア配列は CTTTCGTGTAC であることが示された.

そこでさらに, この配列と核蛋白質因子との結合が塩基配列特異的であるかどうかを調べる目的で, この配列を含む 33 残基の合成オリゴヌクレオチドを作製し, 上記 173 bp の *Hinf* I 断片との競合反応を行なった. 10 倍から 100 倍過剰の合成オリゴヌクレオチドを添加すると核蛋白質因子の結合能は失われた.

さらにこの合成オリゴヌクレオチド自身にも核蛋白質因子との結合能が認められるかどうかをゲルシフト法で調べた. この結果, この長さでも充分結合能があり, 過剰の同合成オリゴヌクレオチドの添加で競合阻害されること, メチル化阻害実験で明らかにされた結合に関与する 3 残基の G 残基の部位 (-130, -126, -125 部位) を置換した合成オリゴヌクレオチドでは 100 倍量過剰に添加しても競合阻害されないことなどが示されてきた (図 6).

また, 結合に必要なコア配列を含む 20 残基の合成オリゴヌクレオチドを作製し, 33 残基の合成オリゴヌクレオチドとの競合反応を行なったところ, 20 残基の合成オリゴヌクレオチドを 100 倍量加えると結合能は完全に失われることも示された. しかし, コントロールとして転写開始点 -216~-192 bp の領域を含む 25 残基の合成オリゴヌクレオチドを作製し競合反応を行なった場合, 100 倍量加えても阻害は認められなかった. したがって, これらの結果は, 登熟期種子の核蛋白質因子と -120~-130 bp 領域との結合がきわめて塩基配列特異的であることを示し

図 7 ■ 種子登熟過程における -130~-120 bp 領域に結合する核蛋白質因子の結合能変化 (A) と *GluA-2* 遺伝子の mRNA 量の登熟過程での変化 (B)
 A: プローブとして -142~-110 bp 領域を含む 33 残基のオリゴヌクレオチドを用いた. DAF: 開花後の日数, N: 核抽出液なし, L: 葉からの核抽出液.
 B: プローブとして pREE99 cDNA のインサート部位を用いた. 25S: 25S リボソームのサイズマーカー, 17S: *GluA-2* 遺伝子の mRNA

ている。

さて、 $-120 \sim -130$ bp 領域に結合する核蛋白質因子はイネ種子の登熟過程で *GluA-2* の遺伝子発現と協調的に変化するのであろうか。この問いに答えるために、開花後 6 日、10 日、15 日および 20 日目の種子より核抽出液を得て、33 残基の合成オリゴヌクレオチドをプローブにしてゲルシフト法で核蛋白質因子との結合能の変化を調べた。図 7 に示されるように、6 日目から結合能は次第に増加し、15 日目に最大になり、その後減少することが示された。この結合能の変化は、*GluA-2* 遺伝子の mRNA のレベルの登熟過程での変化ときわめてよく一致していた。これらの結果から、*GluA-2* 遺伝子の発現は、登熟中期になると核蛋白質因子が $-120 \sim -130$ bp 領域に特異的に結合することにより転写が開始されるように制御されているのではないかと推察された。

*

イネの主要な種子貯蔵蛋白質であるグルテリン遺伝子は、ハプロイドあたり 10 個程度からなる多重遺伝子族を形成している。一方、同じイネの貯蔵蛋白質であるプロラミン遺伝子はハプロイドあたり 70~80 個と非常に多い。しかし、種子中に集積されるグルテリンとプロラミンを比較した場合、前者が約 80% なのに対し、後者は 10% 程度とグルテリンのほうが圧倒的に多い。この制御は何に由来するのであろうか。登熟過程での遺伝子再構成や増幅の報告は現在のところ知られていない。一般的には種子貯蔵蛋白質の合成量と mRNA 量との間に高い相関関係があり、登熟中

期にはこれら貯蔵蛋白質 mRNA の割合が高まることから、これらの制御は第一義的に転写レベルで行なわれていると考えられている。しかし、イネ登熟中期の cDNA ライブラリーを用いてグルテリンとプロラミンをコードする組換え体の割合を比較した場合、種子中に集積されるグルテリンおよびプロラミンの差を説明できるほどの有意な差は両者の間に見いだすことはできない。すなわち、グルテリン mRNA が選択的に翻訳されたり、合成されたグルテリン前駆体が効率よく蛋白質顆粒に集積されるなど、転写後の翻訳レベルでの制御も示唆されている。したがって、転写および翻訳の両レベルから制御されていると考えるのが妥当であろう。

グルテリンをはじめとする種子貯蔵蛋白質遺伝子は組織特異的に、また生育時期に特異的に厳密に制御を受けている。これら特異的発現に関しては、制御に関与する DNA の配列（シスエレメント）とこの配列に結合する転写因子（トランスエレメント）との関係で研究が進行している。まずグルテリン遺伝子の示す胚乳特異的発現に関与する DNA 制御領域（シスエレメント）を解析するにあたり、グルテリン遺伝子群の 5' 上流域の塩基配列を比較したところ、転写開始点から上流 $-60 \sim -80$ bp 領域に 13 bp の共通配列が存在することが見いだされた。そこで、実際グルテリンプロモーターの 5' 欠失変異体シリーズを作製し、これを *GUS* レポーター遺伝子に結合し *Agrobacterium* を介してタバコに遺伝子導入して制御領域を同定した。その結果、転写開始点から上流 -86 bp まで削っても種子中に *GUS* 活性が検出

図 8 ■ グルテリン遺伝子のプロモーター領域の構造

されることから、共通配列が胚乳特異的発現に関与する シスエレメントである 可能性が示唆されてきた。さらに これら 遺伝子導入実験により、
-250~-400 bp の領域に発現量を高めるエンハンサーの存在も示されてきた。

一方、トランスファクターに関しては、登熟種子特異的核蛋白質因子が転写開始点-120~-130 bp 領域に塩基配列特異的に結合することがゲルシフト法やメチル化阻害実験により明らかにされてきた。しかもこの転写因子の結合は登熟過程におけるグルテリン mRNA 量と相関関係を示すものであった。しかし、この結合部位は胚乳特異的発現に関与する シスエレメントと推定されている-60~-80 bp 領域の共通配列と一致していない。-120~-130 bp 領域に結合する核蛋白質因子がどのような機構で胚乳特異的発現を制御するのか、また 13 bp の共通配列に結合する核蛋白質因子が存在するのかなど、今後の研究を待たなければならない。現在までに解析されたグルテリン

遺伝子の特異的発現制御に関しては図8のようにまとめることができる。今後、これら遺伝子の制御機構をより分子レベルで明らかにするために、発現特異性を決定している転写因子の単離・精製ならびに cDNA クローニングやこれら転写因子の作用機序を解明する必要がある。

文献

- 1) R. B. Goldberg, S. J. Barker & L. Perez-Grau : *Cell*, **56**, 149 (1989).
- 2) 高岩文雄 : 組織培養, **16**, 8 (1990).
- 3) 田中國介, 増村威宏 : 化学と生物, **26**, 543 (1988).
- 4) 高岩文雄 : 蛋白質 核酸 酵素, 別冊 **30**, 247 (1987).
- 5) F. Takaiwa, H. Ebinuma, S. Kikuchi & K. Oono : *FEBS Lett*, **221**, 43 (1987).
- 6) T. W. Okita, Y. S. Hwang, J. Hnilo, W. T. Kim, A. P. Aryan, R. Larson & H. B. Krishnan : *J. Biol. Chem.*, **264**, 12573 (1989).
- 7) 高岩文雄, 加藤 明, 大野清春 : 育種学雑誌, **39**, 別冊 2, 174 (1989).
- 8) 高岩文雄, 大野清春 : 育種学雑誌, **40**, 別冊 1, 184 (1990).

プ ロ フ ィ ル

中谷 和夫 (Kazuo Nakatani) 昭和23年9月29日生<略歴>昭和46年京都大学工学部工業化学科卒業/49年同大学大学院修士課程修了/同年サントリー(株)入社, 中央研究所勤務(ビール研究室)/59年工博(京都大学)/平成元年同社ビール研究所所長, 現在にいたる<研究テーマと抱負>①ビールのヒット商品の開発, ②醸造設備(特に発酵タンク)とビールの味との関係<趣味>テニス, 囲碁

橋床 泰之 (Yasuyuki Hashidoko) 昭和37年4月30日生<略歴>昭和60年北海道大学農学部農芸化学科卒業/平成2年同大学大学院農学研究科博士後期課程修了後, 新技術事業団水谷植物情報物質プロジェクト研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>植物の情報伝達のしくみ, 生態系における他の要因との関わりなどを分子レベルで解明したい<趣味>

海外動植物人類観察, 縁側でお茶

藤井 義晴 (Yoshiharu Fujii) Vol.26, No.10, p.681 参照

古川 俊之 (Toshiyuki Furukawa) 昭和6年2月7日生<略歴>昭和30年大阪大学医学部医学科卒業/47年同大学医学部講師/50年東京大学医学部医用電子研究施設教授/62年同大学先端科学技術研究センター教授(医学部併任)/平成元年国立大阪病院長, 現在にいたる

宮崎 香 (Kaoru Miyazaki) 昭和23年1月24日生<略歴>昭和45年高知大学文理学部理学科卒業/51年大阪大学大学院博士課程卒業/同年同大学蛋白質研究所(堀尾武一教授)に教務職員, 助手として勤務/63年横浜市立大学木原生物学研究所助教授, 現在にいたる。この間,

米国カリフォルニア大学サンディエゴ校 (G. H. Sato 教授) 交授研究員<研究テーマと抱負>癌と細胞増殖に基本的な興味。現在, 研究室の若い仲間達と“癌細胞の悪性増殖におけるプロテアーゼの役割”および“細胞増殖阻害因子とその作用”について研究しています<趣味>洋蘭, テニス, スキー

山下 哲 (Satoshi Yamashita) 昭和10年3月19日生<略歴>昭和36年東京大学医学部医学科卒業/41年同大学大学院医学系研究科博士課程修了(生化学)/43年京都大学医学部助手(医化学教室)/47年同助教授/49年群馬大学医学部教授(生化学教室), 現在にいたる。この間, 41~43年米国コーネル大学研究員<研究テーマと抱負>酵母・動物細胞のリン脂質合成系の遺伝子制御を明らかにすること<趣味>園芸, イワナ釣り