

転移因子を用いたアントシアニン色素生合成遺伝子とその発現調節因子遺伝子の解析

東京理科大学基礎工学部

飯 田 滋

Although transposable controlling elements are believed to exist in virtually every organism, they have been isolated from only a few plants and have been characterized at genetic and molecular level in only two plants, maize (*Zea mays*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*). Their ability to transpose, affect gene expression and promote DNA rearrangements causes genetic instability. We have identified and isolated a new transposable controlling element, *Tpn1* (Transposon *Pharbitis nil* one), from a line of Japanese morning glory (*Pharbitis nil*) bearing variegated flowers. The 6.4 kb transposable element was inserted in the gene for dehydroflavonol-4-reductase (DFR), one of the genes involving anthocyanin pigment biosynthesis. Its terminal inverted repeats and the number of target duplications indicate that it belongs to the family of the maize transposable element *Suppressor-mutator/Enhancer* (*Spm/En*). Cosegregation data of the variegated flower phenotype and the *DFR* gene carrying *Tpn1* indicate that the mutable phenotype is due to excision of *Tpn1* from the *DFR* gene. Sequences homologous to *Tpn1* are present in multiple copies in the genome of Japanese morning glory.

1. 緒 言

キメラとは本来、頭が獅子、胴が山羊、尾が龍のギリシャ神話の怪獣で、生物学上は複数の遺伝的に異なる細胞群よりなる個体のことである。植物キメラは種々の原因により生ずるが、トランスポゾンの転移に伴う体細胞変異によっても生じる。トランスポゾンとは染色体上を転移し得る一定の塩基配列をもつ遺伝的因子で、挿入・転移・脱離・欠失など種々のDNA再編成を引き起こし、また遺伝子発現の調節に様々な影響を与え、遺伝的不安定性の一因となっている因子でもある。トランスポゾンの存在は最初トウモロコシの穀粒で発

現するアントシアニン色素生合成系遺伝子などの発現を調節して絞り模様(キメラ斑)を生じさせる因子として見出され、その後、種々の生物種のゲノム上に散在されていることが明らかにされた。トランスポゾンによる花の絞り模様形成に関する分子遺伝学的研究はそのほとんどがキンギョソウで行われているだけである。我々は平賀源内が記述した絞りアサガオのアントシアニン色素生合成系遺伝子中より6.4kbのトランスポゾン*Tpn1*を単離し、この*Tpn1*が花卉の器官形成時に転移することが絞り模様の形成に直接関与していることを明らかにしたので^{1, 2)}、その結果をここで述べる。

2. 実 験

絞り花アサガオ α -3' の系統として“時雨絞り” KK/SSB-3 と KK/SSB-4 を、野生型“全色花”アサガオとして KK/ZSk-2 を用いた。

植物ゲノムDNAはCTAB法³⁾により分離し、制限酵素による解鎖、DNA断片のλファージベ

Molecular analysis of a transposable controlling element affecting expression of a gene for anthocyanin biosynthesis.



Shigeru Iida

Department of Biological Science and Technology,
Science University of Tokyo

クターおよびプラスミドベクターへのクローン化、DNA塩基配列の決定などは既存の方法^{4, 5)}に準じて行った。また、DNAプローブとして用いたアントシアニン色素合成系の遺伝子は1.5kbのペチュニア *DFR-A* 遺伝子のcDNA⁶⁾、1.3kbのキンギョソウの *Candi* 遺伝子cDNA⁷⁾ および2.2kbのトウモロコシ *Bz1* 遺伝子のゲノミックDNA断片⁸⁾である。

3. 結 果

図1の白色地に有色の絞り模様のアサガオは、遺伝学的には“雀斑（そばかす／*flecked*）”、園芸上は絞り模様により“時雨絞り”もしくは“染め分け”と呼ばれる系統で、平賀源内の『物類品隲』（1762）の牽牛子・和名アサガホの項の黑白江南花・和名シボリアサガホに記載されているアサガオと同じ系統と考えられている。この雀斑系統のアサガオに関しては、1930年代に今井に

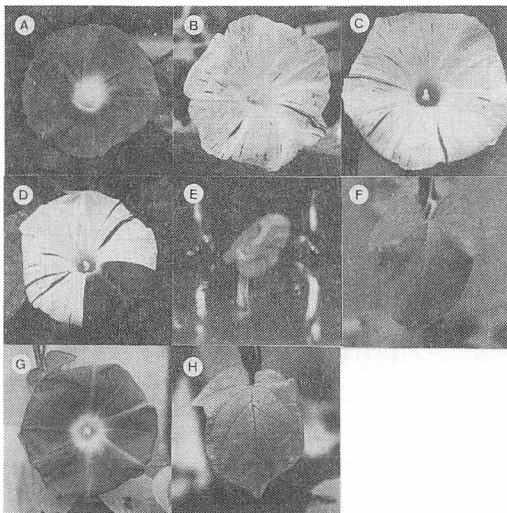


Fig.1 Pigmentation Phenotypes of *Pharbitis* Lines.

- (A), Fully pigmented line KK/ZSK-2.
- (B), (E) and (F), Variegated line KK/SSB-3.
- (C) and (D), Variegated line KK/SSB-4.
- (G) and (H), Germinal revertant derived from KK/SSB-3.

より古典遺伝学的解析が行われている^{9, 10)}。すなわち、アントシアニン色素合成に関与する遺伝子の *A-3* に変異が起こったために、花卉細胞中で色素が生成されなくなり白色となるはずが、花卉形成時に体細胞復帰変異を起して、色素が合成されるようになり、花卉の一群の細胞が有色となったことが白色地に有色の絞り模様の形成機構である。白色の細胞群と有色の細胞群は体細胞変異により遺伝的に異なるので、このような絞り模様はキメラ斑とも呼ばれる。花卉形成の早い時期に変異により白色から有色となった細胞はより多く細胞分裂するので有色の細胞群の数も多くなり、当然有色セクターも大きくなる。それ故、絞り花の有色のセクターの大きさは体細胞変異の時期を、またセクターの数は体細胞変異の頻度を表す。“時雨絞り”のように小さな有色スポットがたくさんある絞り花は花卉形成の後期に高頻度で変異が起こり、“染め分け”のような小数の大きなセクターのある花は低頻度の変異が早い時期に起こったためと考えられる。

この体細胞変異の起こる茎頂や花茎頂の分裂組織はアサガオなど双子葉植物の場合は、 $L I \cdot L II \cdot L III$ の3層に分けられる¹¹⁾。花の中には $L I$ 由来の表皮細胞でのみ色素発現が見られるものも多いが、アサガオの場合は $L I \cdot L II \cdot L III$ 由来のいずれの細胞においてもアントシアニン色素が合成される。そこで今井は雀斑アサガオを用いて表皮下の $L II$ 由来細胞が変異により有色となった花を自殖すると3対1の割合で有色花と絞り花の次世代アサガオが生ずることなどから生殖細胞は $L II$ 由来であることを明らかにした¹⁰⁾。なお、アントシアニン色素の発現による絞り模様は雀斑系統のアサガオでは花ばかりでなく、葉や茎でも観察され（図1）、アサガオの場合、茎の色素発現は $L II$ 由来の細胞でのみ起こることも知られている。この雀斑の絞り模様を司るアントシアニン色素合成系の易変性（mutable）遺伝子 *a-3'* は連鎖地図の第V染色体上にマップされている。この易変性遺伝子 *a-3'* は野生型（有色

花)の遺伝子A-3に対し、劣性で、しかもa-3'からA-3になった生殖細胞復帰変異体が2-5%位の頻度で得られることも知られている^{9, 10)}。

図1のような白色地に有色のキメラ斑は図2に示したアントシアニン色素生成経路のアントシアニジン-3-グルコシドまでの段階の生合成に関与する遺伝子か、もしくは、その転写調節因子遺伝子が易変性になっている場合が多い¹²⁾。そこでこの絞り花の白色地部分の色素分析をしたところ、フラボノールが検出できたのでフラボノールの段階までは生合成されていると考えられた。すなわち、図2のCHS、CHI、およびF3H遺伝子

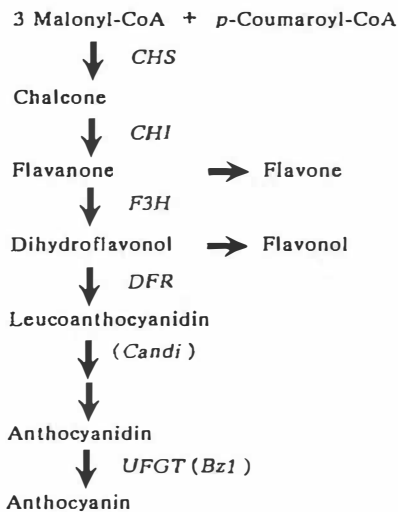


Fig.2 A Simplified Pathway for Anthocyanin Biosynthesis.

やこれらの発現を制御する転写調節因子遺伝子は正常であって絞り模様の形成には関与していないと思われる。そこでその先のDFR、AS、UFGTの遺伝子が未知のトランスポゾンの挿入により易変性となっているか否かを検討するために、図1の絞り花と野生型有色花アサガオより各々ゲノムDNAを抽出し、各遺伝子構造を、既に単離されているペチュニアDFR-A遺伝子cDNA、キンギョソウのAS遺伝子であるCandi遺伝子のcDNA、およびトウモロコシのUFGT遺伝子であるBz1遺伝子のコード領域をプローブ

としてサザン法により検討した(図3)。その結果、絞り花アサガオDFR遺伝子領域中には6.4 kbのDNA配列が挿入されていることが明らかとなった。このDFR遺伝子領域を、全色花と絞り花アサガオの各ゲノムよりクローニングして、そのDNA配列の挿入領域の構造解析を行ったところ、絞り花アサガオDFRの第3エクソンの約10bp上流のイントロン内に6.4kbのDNA配列が挿入されていた。その末端繰り返し配列やDFR遺伝子内の挿入部位で認められた3bpの標的重複などの構造上の特徴から、トウモロコシSpm/

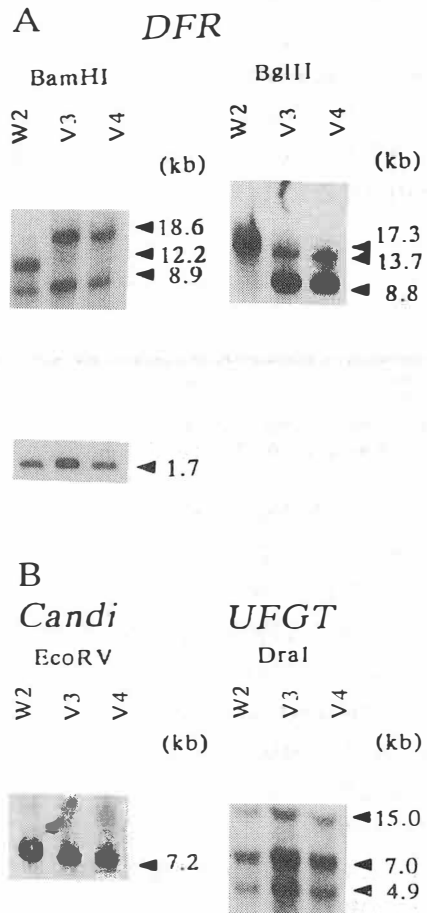


Fig.3 DNA Gel Blot Analysis of the *Pharbitis* DFR Region in A-3 and a-3' Lines. V4 indicates the variegated line KK/SSB-4; V3, the variegated line KK/SSB-3; W2, the wild type KK/ZSK-2.

En^{1, 3, 14)} 類縁の新しいトランスポゾンであることが明らかとなったので、アサガオ (*P. nil*) より最初に分離されたトランスポゾンということで *Tpn1* (Transposon *Pharbitis nil* One) と命名した^{1, 2)}。

この新たに単離された転移因子 *Tpn1* について、その構造と機能の解析を行うために全塩基配列の決定を行った。この *Tpn1* は 6412bp で、両末端には 28bp の逆繰り返し配列を、また、両末端近傍領域の各々 0.8kb および 1.0kb にわたり、*Spm/En* 類縁因子に見られる、転移酵素の結合部位と考えられる構造を有していた。これは今まで知られている *Spm/En* ファミリーのトランスポゾンの中で最も複雑な構造であった。

アサガオゲノム中にはペチュニアの *DFR* 遺伝子⁶⁾ と相同性のある *DFR*-A, B, C の 3 種類の遺伝子が存在する (図 4)。そこで、*Tpn1* の挿入し

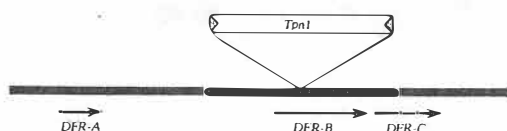


Fig. 4 The Structures of the *DFR* Region in the *Pharbitis* A-3 and a-3' Lines.

ていた *DFR*-B 遺伝子が絞り模様を形成させる易変性遺伝子の α -3' の本体であり、その野生型である A-3 遺伝子が花弁や葉、茎などの色素合成に関与する *DFR* 遺伝子であるか否かを検討するために、 α -3' の生殖細胞復帰変異体を得てさらにその自殖後代における有色花と絞り花アサガオの *DFR*-B 遺伝子内に *Tpn1* が挿入されているか否かをサザン法により検討した。その結果、有色花アサガオは全て 2 対の *DFR*-B 遺伝子のうち少なくとも一方は *Tpn1* が転移・脱離していたが、全ての絞り花アサガオの 2 対の *DFR*-B 遺伝子はともに *Tpn1* の挿入されたホモの状態であった (図 5)。それ故、*Tpn1* の挿入された *DFR*-B 遺伝子が易変性遺伝子 α -3' の本体であり、*Tpn1* の挿入した *DFR*-B 遺伝子は不活性化され

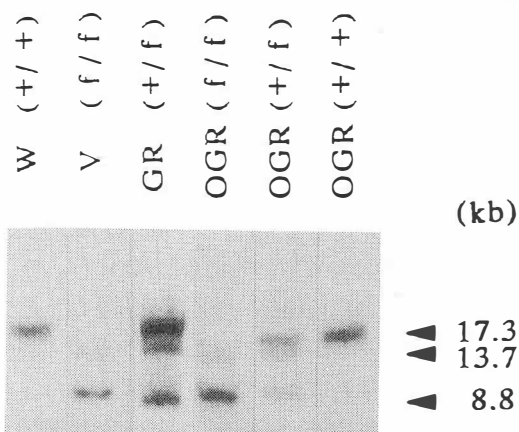


Fig. 5 DNA Gel Blot Analysis of the *DFR* Gene in the α -3' Lines and their Germinal Revertants.

Genomic DNAs were cleaved with *Bgl* II and hybridized with the petunia *DFR* cDNA probe. W (+/+) indicates the wild type line (homozygous); V (f/f), the variegated line (homozygous); GR (+/f), a germinal revertant (heterozygous); OGR (f/f), a variegated offspring (homozygous) of a germinal revertant; OGR (+/f), a solidly colored offspring (heterozygous) of a germinal revertant; OGR (+/+), a solidly colored offspring (homozygous) of a germinal revertant.

ていて発現されないが、花弁形成中に *Tpn1* が *DFR* 遺伝子より転移・脱離する体細胞変異によって、*DFR* 遺伝子が再活性化されることが絞り花 (キメラ斑) 形成の分子機構であることが明らかとなった。なお、*Tpn1* の挿入による *DFR*-B 遺伝子不活性化の分子機構としては、*Tpn1* 内のターミネーターにより転写が終結することやスプライシングが正常に起こらないことなどが考えられる。また、この花弁などで機能しているアサガオ *DFR*-B 遺伝子は 6 つのエキソンと 5 つのイントロンから構成されていることも明らかとなった。

なお、アサガオゲノム上には *Tpn1* に相同性の配列が多コピー存在する。図 6 から明らかなように、野生型の全色花アサガオに比べて雀斑系統の絞り花アサガオゲノム中には *Tpn1* 類縁の配列が

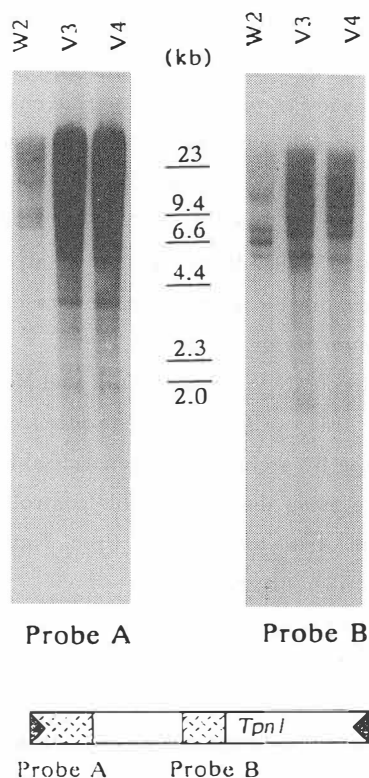


Fig.6 Presence of *Tpn1*-related Elements in the *Pharbitis* Genome
The genomic DNAs were cleaved with *Bgl* II and hybridized with the probes A or B as indicated. V4 indicates the variegated line KK/SSB-4; V3, the variegated line KK/SSB-3; W2, the wild type KK/ZSK-2.

より多く存在する。

また、他の植物のトランスポゾンの場合と同様に、各々のアサガオゲノム中には *Tpn1* の末端領域に相同性のある配列の方が内部領域の配列よりもよりコピー数が多いことも明らかとなった。

4. 考 察

トランスポゾンは遺伝子発現を制御する調節因子として最初にトウモロコシで見い出された^{13, 14)}。高等植物ゲノムには脱離と再挿入により転移するDNA型トランスポゾンと、転移中間体として生じたRNAが逆転写酵素により

cDNAとなって転移するレトロトランスポゾンが存在する。これらのうち、主に前者が転移に伴うDNA再編成などによって植物遺伝子の発現を調節し、キメラ斑を形成させることが知られている。高等植物のトランスポゾンによる遺伝子発現の調節機構の分子遺伝学的解析は、そのほとんどがトウモロコシとキンギョソウで行われており、DNA型トランスポゾンにより調節される遺伝子としてアントシアニン色素合成系遺伝子群がよく研究されている。事実、図2のアントシアニン色素合成系遺伝子やその転写調節因子遺伝子の中にはトランスポゾンを用いた遺伝子タグging法により同定・単離されたものも多い。トランスポゾンの中で転移に必要な活性な転移酵素の遺伝子を持ち自ら転移できる因子を自律性因子、内部欠失変異体などで転移酵素遺伝子に欠損があり、自律性因子より活性な転移酵素が供給されたときのみ転移できる因子を非自律性因子という。我々は平賀源内が記述した絞りアサガオのアントシアニン色素合成系の *DFR-B* 遺伝子中より、*Spm/En* 類縁の6.4kbのトランスポゾン *Tpn1* を単離し、この *Tpn1* が花卉の器官形成時に転移することが絞り模様の形成に直接関与していることを明らかにした。この *Tpn1* は6412bpであって、その構造上の特徴から考えて、自律性因子であるよりも自律性因子の内部欠損型の非自律性因子である可能性が高い。もしもそうであるならば、アサガオゲノム中に存在する自律性因子の作用により、*Tpn1* は *DFR-B* 遺伝子より転移・脱離すると考えられる。

高等植物のトランスポゾンは転移因子としての側面から転移に伴う遺伝的組換え機構の解明や調節因子として植物遺伝子の発現調節機構の解明に貢献してきたのみならず、トランスポゾンタグgingによる有用遺伝子の単離やトランスポゾンベクターによる有用遺伝子の導入、さらには遺伝子発現制御のための生物学的スイッチなど植物バイオテクノロジーにも利用され始めた。ここに述べたアサガオのトランスポゾン *Tpn1* やその類縁因

子の解析も遺伝子発現機構の解析のみならず、植物バイオテクノロジーにも貢献できる可能性もあろう。事実、アサガオには20種以上の花色、葉色、さらには花や葉の形態に関して、トランスポゾンが関与すると考えられる易変性 (mutable) 変異体が知られている。これらの中には *Tpn1* 類縁因子の関与するものもあると思われ、トランスポゾンタグgingにより未知の有用遺伝子をアサガオから単離することもできそうである。

文 献

- 1) 飯田 滋 (1994). 絞り花アサガオから分離されたトランスポゾンによる遺伝子発現の調節. ファルマシア 30, 481-455.
- 2) Inagaki, Y., Hisatomi, Y., Suzuki, T., Kasahara, K. and Iida, S. (1994). Isolation of an *Suppressor-mutator/Enhancer*-like transposable element, *Tpn1*, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell*, 6, 375-383.
- 3) Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325.
- 4) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 5) Shimamoto, K., Miyazaki, C., Hashimoto, H., Izawa, T., Itoh, K., Terada, R., Inagaki, Y. and Iida, S. (1993). *Trans*-activation and stable integration of the maize transposable element *Ds* cotransfected with the *Ac* transposase gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.*, 239, 354-360.
- 6) Beld, M., Martin, C., Huits, H., Stuitje, A.R. and Gerats, A.G.M. (1989). Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol. Biol.*, 13, 491-502.
- 7) Martin, C., Prescott, A., Mackay, S. Bartlett, J. and Vrijlandt, E. (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.*, 1, 37-49.
- 8) Fedoroff, N.V., Frutek, D.B. and Nelson, O. E. (1984). Cloning of the *bronze* locus in the maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element *Activator (Ac)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3825-3829.
- 9) Imai, Y. (1931). Analysis of flower colour in *Pharbitis nil*. *J. Genet.*, 24, 203-224.
- 10) Imai, Y. (1934). On the mutable genes of *Pharbitis*, with special reference to their bearing on the mechanism of bud-variation. *J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, 12, 479-523.
- 11) Tilney-Bassett, R. A. E. (1986). *Plant chimeras* (London: Edward Arnold).
- 12) Dooner, H. K., Robbins, T.P. and Jorgensen, R.A. (1991). Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 25, 173-199.
- 13) Fedoroff, N.V. (1989). Maize Transposable Elements. In *Mobile DNA*, D.E. Berg and M. M. Howe, eds (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 375-411.
- 14) Gierl, A. and Saedler, H. (1992). Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol. Biol.*, 19, 39-49.