

イネ遺伝子のcDNA塩基配列をもとにした プロモーターの単離法とその一過的発現解析法

宮村弘明・佐久間茂雄*・飯島加奈子*・佐々木卓治*
萩尾高志*・市川裕章*・宇垣正志*

PCR-based Isolation of Rice Gene Promoters and Their Transient Expression Analysis

Hiroaki MIYAMURA, Shigeo SAKUMA, Kanako IJIMA, Takuji SASAKI,
Takashi HAGIO, Hiroaki ICHIKAWA and Masashi UGAKI

キーワード: イネ, プロモーター, PCR, パーティクルガン法

組換え植物の実用化にあたっては、組織特異的プロモーターを用いて、外来遺伝子を目的の組織でのみ特異的に発現させる技術が重要であると考えられるが、利用できる組織特異的プロモーターは数少ない。そこで、組織特異的発現を示す多くのcDNAが同定されているイネを用いて、cDNAの塩基配列をもとにその遺伝子のプロモーターを単離する手法と最適条件を検討した。また、単離したプロモーターの組織特異性を、発現レポーター遺伝子の一過的発現で検証するための手法として、イネ幼植物体にDNAをパーティクルガン法で導入する条件を最適化した。

単離手法はcDNA特異的なプライマーを用いるサブプレッションPCR法が最も有効であった。また二次PCRはタッチダウンPCRの原理を応用すれば、効率的にPCR増幅産物を得ることができた。パーティクルガン法による遺伝子導入では、1.6 μ mの金粒子と1,300psiのラプチャーディスクを用い、12cmの距離で行うことが最適であることが明らかになった。

本研究で確立された実験条件により、イネの組織特異的プロモーターの単離が加速されると期待される。

1 緒 言

農作物の育種は、遺伝資源から見出される、あるいは人為的突然変異で作り出される有用遺伝子を、交配によって植物に導入することによって行われ、人類の食糧確保に貢献してきた。一方、1940年代に遺伝子がDNAであることが明らかにされ、1970年代に植物の遺伝子組換え技術が開発されたことから、交配によらず遺伝子組換えにより植物に有用遺伝子を導入することが可能になった。遺伝子組換え育種の利点として、既存の品種の遺伝的背景を大きく変えずに単一の遺伝子のみを導入できること、交配では導入できない異種生物の遺伝子を導入できること、既存の遺伝子を人為的に改変して導入できることなどが挙げられる。1994

年に初の組換え作物である日持ちの良いトマトがアメリカで市販されたのを皮切りに、今日までに除草剤耐性、耐病性、耐虫性など様々な形質を付与した組換え作物が世界で実用化されている¹⁾。当初、単子葉植物の遺伝子組換えは困難であったが、双子葉植物に感染する土壌細菌アグロバクテリウムによる効率的な遺伝子導入法を単子葉植物に適用する技術が開発され²⁾、今後はイネ、トウモロコシ、パンコムギなどの主要穀物、およびヨシなどの環境浄化作物を含む単子葉植物への遺伝子導入が盛んになると予想される。

国内で実用化されている組換え植物は、厚生労働省の指針（厚生省生活衛生局長通知、衛食第153号、組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針、平成3年12月26日）に基づき食品としての安全性

* 生物資源研究所

が、また文部科学省（内閣総理大臣、組換えDNA実験指針、昭和54年8月27日）および農林水産省（農林水産事務次官依命通達、元農会第747号、農林水産分野等における組換え体の利用のための指針、平成元年4月20日）の指針に基づき環境に対する安全性が、それぞれ確認されている。しかし、さらに安全性の高い組換え植物を開発するための基礎研究は、引き続き重要であると考えられる。安全性に関するひとつの懸念として、現在実用化されている組換え植物の大部分では、導入遺伝子を発現させるプロモーターとして、構成的に発現するカリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35Sプロモーター²⁾が使われており、導入遺伝子が可食部を含め植物の多くの組織で発現していることが分かっている。したがって、さらに安全性を高めるためには、導入遺伝子を組織特異的プロモーターにより特定の組織でのみ発現させ、可食部では発現させないというアプローチが必要となる。植物の遺伝子の総数は数万と予想されているが、それらから単離されたプロモーターは200種類たらずにすぎず³⁾、利用できる組織特異的プロモーターの種類は限られている。したがって、今後より多くの組織特異的プロモーターを単離する技術の開発が重要であると考えられる。

組織特異的プロモーターは、組織特異的に発現する遺伝子の転写領域（mRNAとして転写される領域）の5'上流に位置し、その発現を転写レベルで制御している。組織特異的に発現する遺伝子が多数解析されている植物として、単子葉植物のモデル植物であり、わが国を中心に大規模なゲノム解析が進行中のイネが挙げられる。イネでは、様々な植物組織からcDNAライブラリーが作成され、それらを構成するcDNAクローンの塩基配列が網羅的に解析されており⁴⁾、組織特異的に発現する遺伝子のcDNAが多数同定されている。したがって、イネcDNAをもとに、その遺伝子の転写領域の5'上流領域を単離する技術を開発することにより、組織特異的プロモーターが効率的に単離できると期待される。

イネ遺伝子の転写領域の5'上流領域を単離するためには、イネのゲノムDNAライブラリーからcDNA配列を含むクローンをスクリーニングする一般的な方法が考えられるが⁵⁾、多くの労力と時間を要する。そこで本研究では、イネcDNAクローンの塩基配列をもとにして、その遺伝子の5'上流領域をPCR法により効率的に単離する手法を確立することを目的とする。

また、単離された遺伝子上流領域の組織特異的プロモーター活性を検定するためには、その領域に発現レポーター遺伝子を接続してイネに導入し、発現レポーター遺伝子の各組織における発現を調べることが必要である。イネへの遺伝子導入には、プロトプラストにポリエチレングリコールなどの化学物質やエレクトロポレーションを用いて導入する方法、未熟胚にパーティクルガンを用いて導入する方法、および、カルスにアグロバクテリウムを感染させる方法などが用いられるが⁶⁾、それらの方法により組換えイネを作出するには、多くの労力と時間を要する。

そこで本研究は、その前段階として、単離された領域を接続した発現レポーター遺伝子をパーティクルガンによりイネ幼植物体に導入し、その一過的な発現を検定する手法を確立することを目的として行った。本研究によって確立される一連の技術を用いることにより、組織特異的に発現するイネ遺伝子のcDNAを手がかりにして、そのプロモーターを効率的に単離し、その発現の特異性を解析することが可能になる。また、単離されたそれら組織特異的プロモーターは、有用遺伝子が可食部で発現しない安全性の高い組換えイネや、水質を浄化する機能を高める遺伝子を根で強く発現する組換えヨシの開発など、実用的な組換え植物の作出において有用であると考えられる。

2. 材料および方法

2.1 イネゲノムDNAの単離

イネからのゲノムDNAの抽出は、CTAB法⁷⁾を改変して行った。イネゲノム解析の標準品種「日本晴」の若い葉10gを、液体窒素中で磨砕し、15mlの2%ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)溶液（2%CTAB, 0.1Mトリス塩酸(pH8.0), 20mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA2Na), 1.4M塩化ナトリウム, 1%ポリビニルピロリドン）と、5mlの純水を加えて攪拌し、55℃で15分ゆっくり振とうした。20mlのクロロホルム：イソアミルアルコール（24:1(v/v)）を加え、室温で30分ゆっくり振とうした後、室温、2,800rpmで15分遠心し、上層を採取した。クロロホルム：イソアミルアルコール抽出を再度繰り返したのち、上層に0.1倍量(v/v)の10%CTAB溶液（10%CTAB, 0.7M塩化ナトリウム）を混和し、等量(v/v)の沈殿用緩衝液（1%CTAB, 5mMトリス

塩酸(pH8.0), 10mM EDTA) を加え, 30分室温で静置した. その後, 同様に遠心し, 1M塩化ナトリウム, 10mMトリス塩酸(pH8.0)および1mM EDTAを含む溶液10 mlを得られた沈殿に加えて55℃にて溶解させ, 0.6倍量(v/v)の2-プロパノールを加え, 室温, 2,800rpmで10分遠心した. 沈殿を70%エタノールで洗浄し, 3mlのTE溶液 (10mMトリス塩酸(pH8.0), 1mM EDTA) に完全に溶解した後, 300 μ lの10 μ g/ml RNaseAを加え, 55℃で30分間静置した. これを4℃で冷蔵保存した.

2. 2 イネcDNA

プロモーター単離のためのcDNAとして, イネcDNAライブラリー¹⁸⁾から単離されたcDNAクローンS1543を用いた. S1543は全長が1493bpで, その5'端の第1~463塩基の塩基配列 (GenBank Acc. No.: D39891), 3'端の第1148~1493塩基の塩基配列 (GenBank Acc. No.: AU033037) および中央部分の第332~784塩基の塩基配列 (GenBank Acc. No.: D41717) がDNA塩基配列データベースで公開されている.

2. 3 サザン解析

サザン解析は, 標準的なプロトコル¹¹⁾ に準じて行った. イネゲノムDNA10 μ gを制限酵素で消化し,

0.8%アガロースゲル電気泳動により分画し, 変成後, Hybond-N+ナイロンメンブレン (Amersham Pharmacia社) にサザン転写し, 固定した. cDNAクローンS1543をベクターから制限酵素NotIおよびSalI消化により分離, 精製し, DIG DNA Labeling Kit (Roche社) によりジゴキシゲニンで標識してプローブとした. 検出は, DIG Luminescent Detection Kit (Roche社) を用い, 化学発光により行った.

2. 4 サプレッションPCR

サプレッションPCRはSiebert et al.(1995)¹³⁾ の方法を改変し, Universal GenomeWalker Kit (Clontech社) を用い, 図1のように行った. イネゲノムDNA 2.5 μ gずつを平滑末端を生ずる5種類の制限酵素 (EcoRV, DraI, PvuII, StuI, ScaI) でそれぞれ消化し, フェノール: イソアミルアルコール: クロロホルム (24:1:25(v/v)) 抽出とエタノール沈殿により精製し, 20 μ lの10mMトリス塩酸(pH7.5), 0.1mM EDTAに溶解した. 平滑末端を持つこれらゲノムDNA断片4 μ l (0.5 μ g) に, アダプターDNA1 (5'-GTAAT ACGAC TCACT ATAGG GCACG CGTGG TCGAC GGCCC GGGCT GGT-3') およびアダプターDNA2 (5'-リン酸化-ACCAG CCC-アミノ化-3') を, 最終濃度が6 μ Mになるように加え, T4DNAリガーゼを含む

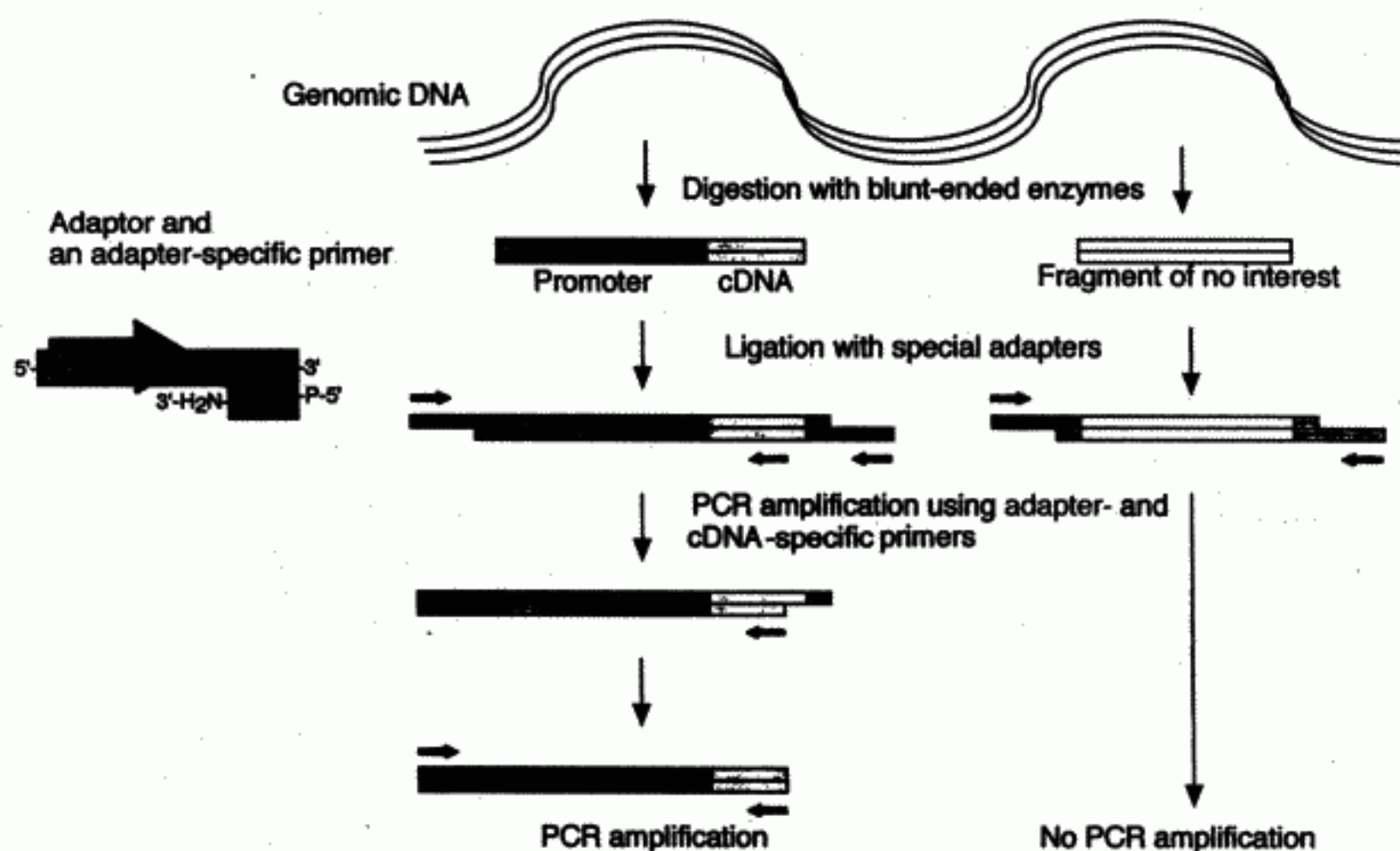


図1 サプレッションPCR法によるプロモーター領域の単離法

8 μ lの反応液中で16 $^{\circ}$ C, 12時間ライゲーションさせた。70 $^{\circ}$ C, 5分の熱処理でDNAリガーゼを失活させ、72 μ lの10mMトリス塩酸(pH7.4), 1mM EDTAを加えて5種類の制限酵素ごとにアダプター付きゲノムDNA断片の集団を作製した。この集団の1 μ lに、37.8 μ lの純水, 5 μ lの10 $\times$ Tth PCR reaction buffer (Clontech社), 1 μ lの10mM dNTP mix, 2.2 μ lの25mM酢酸マグネシウム, 1 μ lの10 μ Mアダプタープライマー-1 (AP1: 5'-GTAAT ACGAC TCACT ATAGG GC-3'), 1 μ lの10mM S1543特異的プライマー-1 (GSP1: 5'-CTC AC TACTC CTTAC TCTCT CTAGT G-3': S1543の第62~87塩基に相補的な配列) および1 μ lのAdvantage Tth Polymerase Mix (Clontech社)を加え、GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer社)のサーマルサイクラーを用いて、下記の条件で一次PCRを行った。(94 $^{\circ}$ C/2秒+72 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 7サイクル, (94 $^{\circ}$ C/2秒+67 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 32サイクル, 67 $^{\circ}$ C/4分 $\times$ 1サイクル。次いで、一次PCR反応溶液を純水で50倍に希釈し、その1 μ lに、37.8 μ lの純水, 5 μ lの10 $\times$ Tth PCR reaction buffer, 1 μ lの10mM dNTP mix, 2.2 μ lの25mM酢酸マグネシウム, 1 μ lの10 μ Mアダプタープライマー-2 (AP2: 5'-ACTAT AGGGC ACGCG TGGT-3'), 1 μ lの10mM S1543特異的プライマー-2 (GSP2: 5'-CTAGA AATGC AGTGA TGCTA GTAGT GG-3': S1543の第24~50塩基に相補的な配列) および1 μ lのAdvantage Tth Polymerase Mixを加え、下記の条件で二次PCRを行った。(94 $^{\circ}$ C/2秒+72 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 1サイクル, (94 $^{\circ}$ C/2秒+71 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 1サイクル, (94 $^{\circ}$ C/2秒+70 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 1サイクル, (94 $^{\circ}$ C/2秒+69 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 1サイクル, (94 $^{\circ}$ C/2秒+68 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 1サイクル, (94 $^{\circ}$ C/2秒+67 $^{\circ}$ C/3分) $\times$ 20サイクル, 67 $^{\circ}$ C/4分 $\times$ 1サイクル。PCR産物は、0.8%アガロースゲル電気泳動で確認した。

2. 5 PCR産物のクローニングおよび塩基配列の決定と解析

PCR産物のクローニングとシーケンシングは、標準的なプロトコール¹¹⁾に準じて行った。二次PCR産物を0.8%低融点アガロースゲルで電気泳動し、PCR産物のバンドを回収・精製したのち、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いてpCR2.1-TOPOプラスミドにTAクローニングした。プラスミドDNAをアルカリ法により精製して鋳型とし、ユニバーサル

またはリバース・プライマーまたは25~30merの合成プライマーと、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社)を用いてサイクルシーケンス法によりダイデオキシ反応を行ったのち、DNAシーケンサーABI Prism 377 (Applied Biosystems社)を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列はGENETYX-MAC (ソフトウェア開発)を用いて解析した。また、既知の塩基配列との比較は、米国バイオテクノロジー情報センターのBLASTサーバ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>)により行った。

2. 6 イネ幼植物の育成

イネ '日本晴'の玄米を、70%エタノールで30秒、次亜塩素酸ナトリウム溶液の2倍希釈液で40分滅菌し、滅菌水で十分に洗浄することによって滅菌種子を得た。直径9cmのプラスチックシャーレのふた側に滅菌したろ紙を6枚重ねて入れ、9 mlの滅菌水で湿らせ、30~40粒の滅菌種子を並べた。次いで、シャーレの底側を通常とは逆に、ふたと同じ向きにして種子に重ね、植物が種子の厚みだけの狭い空間で生育するようにし、ふたと底との間のすきまを滅菌したパラフィルムでシールした。シャーレを斜めの状態で保持し、28 $^{\circ}$ C, 16時間明期/8時間暗期の光条件で、7日間育成した。

2. 7 イネ幼植物体への外来遺伝子導入

イネ幼植物体への遺伝子導入は、パーティクルガンBiolistic PDS-1000/He (Bio-Rad社)を用いて行った。導入するDNAは、発現レポーターの β -グルコニダーゼ (GUS) 遺伝子にCaMV35Sプロモーターを接続したものを持つpWI-GUSプラスミド¹⁶⁾を、大腸菌からQIAGEN Plasmid MIDI Kit (QIAGEN社)で精製し、滅菌した10mMトリス塩酸(pH 8.0), 1mM EDTAに1 μ g/ μ lの濃度になるよう溶解して使用した。直径1.6 μ mの金粒子を70%エタノールで滅菌し、滅菌水で洗浄したのち、50%グリセロールに60mg/mlの割合で懸濁させ-20 $^{\circ}$ Cで保存した。滅菌した1.5mlマイクロチューブをボルテックス・ミキサーで振とうさせながら、金粒子懸濁液50 μ l, DNA溶液5.0 μ l (5.0 μ g), 2.5M塩化カルシウム50 μ l, 0.1Mスベルミジン20 μ lを順に加え、3分間振とう、1分間静置してDNAを金粒子に結合させた。10,000rpmで数秒遠心し、上清を除き、沈殿した金粒子を、70%エタノール、次

いで100%エタノール (99.5%エタノールをmolecular sieve (Sigma社) で脱水したもの) で洗浄し, 100%エタノール60 μ lに再懸濁した。均一な状態の懸濁液6 μ lを手早くマクロキャリアに塗布し, 乾燥後使用した。この装置では, 加圧されたヘリウムガスが所定の圧力に達するとラプチャーディスクを破り, 金粒子を塗布したマクロキャリアを加速する。マクロキャリアはストッピングスクリーンで止まり, 慣性でマクロキャリアを離れた金粒子が植物組織に衝突し, 金粒子表面のDNAが細胞内に機械的に導入される。粒子の加速度に関するラプチャーディスクの種類は圧力が1,100pound per square inch (psi)で破碎するものと1,300psiのものの2種類。粒子の植物組織への侵入速度に関するストッピングスクリーンと植物組織との距離は, 9cmと12cmの2つの条件をそれぞれ検討した。シャーレ上で育成した多数のイネ幼植物体は, 滅菌したキムワイプで拭き表面が濡れていない状態でDNAを導入した。DNA導入後の幼植物体は, 24~36時間, 育成時と同じ条件で維持した。

2. 8 GUS遺伝子の一過的発現の検出

イネ幼植物体に導入されたGUS遺伝子の一過的発現は次のように検出した。シャーレから幼植物体をろ紙の1枚目とともに取り出し, キムタオルではさんでろ紙の水分を除き, 固定液 (0.3%ホルムアミド, 10mMMES, pH6.5, 0.3Mマニトール, 1mMジチオスレイトール (DTT)) に浸し, アスピレータで20~30分脱気した。固定液を前処理液 (50mMリン酸緩衝液 (pH7.0), 5%メタノール, 1mMDTT) に交換し, 同様に20~30分脱気したのち, 幼植物体とろ紙とをハイブリバッグに移し, 適当量のGUS染色液 (1mM 5-ブromo4-クロロ3-インドリルグルクロニド (X-gluc), 10 μ g/mlシクロヘキシミド, 50mMリン酸緩衝液 (pH7.0), 5%メタノール, 1mMDTT) を入れ, シールして37°Cで12~24時間反応させた。クロロフィルなどの色素を除くために, 反応液をエタノールに換え, 室温で12~24時間脱色し, エタノールを交換したのち, 遮光して室温で保存した。

3 結 果

3. 1 サザン解析によるS1543遺伝子のコピー数の推定

イネ品種 '日本晴' の若い葉約10gからゲノムDNAを抽出したところ, 約1mgが得られ, アガロースゲル電気泳動により高分子量DNAであることが確認された。ゲノムDNAを数種類の制限酵素で消化し電気泳動で確認したところ, 高分子のDNAが消失し, 様々な大きさのDNAがスメア状に観察された。したがって, 抽出されたゲノムDNAは, 制限酵素処理が可能な純度に達していることが確認された。

プロモーター単離を行うイネcDNAクローンS1543 (以下S1543cDNA) が由来する遺伝子 (以下S1543遺伝子) と相同性のある配列が, イネのゲノム上に何コピー存在するかを調べるために, S1543cDNAの全長をプローブとしてイネのゲノムDNAのサザン解析を行った。その結果, 図2で示すようにS1543の配列中に認識サイトを持たない制限酵素BamHI, EcoRIおよびHindIIIで消化したいずれの試料においても, 1本の濃いバンド (大きさはそれぞれ3.5kbp, 8.5kbpおよび10kbp以上) と多数の薄いバンドが観察されたことから, S1543遺伝子はゲノム上に1コピー存在すると推定された。

3. 2 S1543遺伝子の転写領域の上流の単離

S1543遺伝子のプロモーターは, ゲノム上でS1543cDNAに対応する転写領域の上流に位置すると考えられる。そのような領域をPCR法により単離する手法を検討した。

はじめに, インバースPCR法^{8, 14)}による単離を試みた。サザン解析の結果, S1543遺伝子の転写領域は, 3.5kbpのHindIII断片上にあることが推定されたので (図2, レーンH), ゲノムDNAをHindIIIで消化したのち, Ochman et al. (1988)の

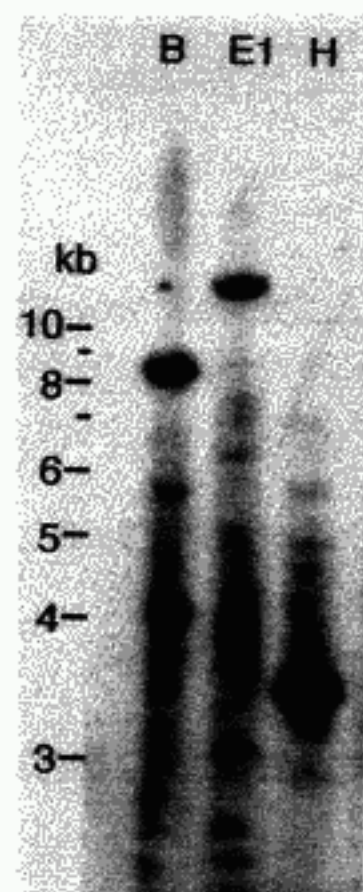


図2 イネcDNA S1543をプローブとしたイネゲノムDNAのサザン解析
B: BamHI, E1: EcoRI, H: HindIIIで消化したDNA

方法³⁾にしたがってインバースPCRを行ったが、目的とするPCR産物は得られなかった。その原因は不明であるが、それ以上条件の最適化は行わなかった。

次に、サブプレッションPCR法¹³⁾による単離を試みた。平滑末端を生ずる5種類の制限酵素 (DraI, EcoRV, PvuII, ScaI, StuI) でゲノムDNAをそれぞれ消化し、それぞれに、互いに相補的で長さの異なるアダプターDNA1と2を加えた。アダプターDNA1は48塩基の長さを持ち、アダプターDNA2はアダプターDNA1の3'端の8塩基に相補的な配列を持つため、これらがアニールすると一端に平滑末端、他端に40塩基の1本鎖DNA突出を持つ2本鎖アダプターとなる。アダプターDNA2の3'端はアミノ化されており、それ以上に伸長することはできない。この2本鎖アダプターの平滑末端をゲノムDNA断片の両端にDNAリガーゼにより結合させ、アダプター付きゲノムDNA断片の集団を作製した。ついで、アダプターDNA1の第1~22塩基の配列を持つアダプタープライマー1 (AP1) と、S1543の5'端に近い第62~87塩基に相補的な26塩基の配列を持つS1543特異的プライマー1 (GSP1) を加えて、一次PCR反応を行った。GSP1に相補的なS1543の配列を持たない多くのゲノムDNA断片には、GSP1はアニールせず、両端に結合している2本鎖アダプターにもAP1 (2本鎖アダプターの1本鎖部分と同じ配列をもつ) がアニールしないため、それらの断片はPCR増幅されないと予想される。一方、GSP1に相補的なS1543の配列を持つゲノムDNA断片には、GSP1がアニールし、伸長して、末端に結合している2本鎖アダプターの1本鎖部分に相補的な配列を合成する。その配列にはAP1がアニールできるため、GSP1とAP1との間でPCR増幅が起こると期待される。様々な反応条件を試した結果、材料および方法に記載した条件のときに、ScaIで消化した断片の集団から、約2.5kbpのPCR増幅産物が得られた (図3A, レーンSc)。しかし、他の制限酵素で消化した集団では、非特異的な増幅産物と見られるわずかなスメアが観察されるのみで、目的の増幅産物と思われる明確なバンドは検出されなかった (図3A)。検出されなかったがわずかに生じていると期待される目的の増幅産物を特異的に増幅するため、一次PCRよりも内側に設計したプライマー、すなわちアダプターDNA1の第13~31塩基の配列を持つアダプタープライマー2 (AP2) とS1543の第24~50塩基に相補的な27塩基の配列を持つS1543特異的プライマー2 (GSP2) を

用いて、二次PCRを行った。様々な反応条件を検討した結果、はじめのサイクルは高温でアニールさせて高い特異性を確保し、その後のサイクルで少しずつアニール温度を下げて増幅効率を上げるタッチダウンPCRの原理⁴⁾を応用したときに、すべての集団からPCR増幅産物が得られた (図3B)。すなわち、DraIでは2.1kbpのわずかな産物が、EcoRVでは1.1kbpと0.9kbpの2種類の産物が、PvuIIでは1.3kbpの産物が、ScaIでは一次PCRですでに増幅された2.5kbpの産物と1.0kbpのわずかな産物が、StuIでは1.3kbpのわずかな産物が、それぞれ増幅された。

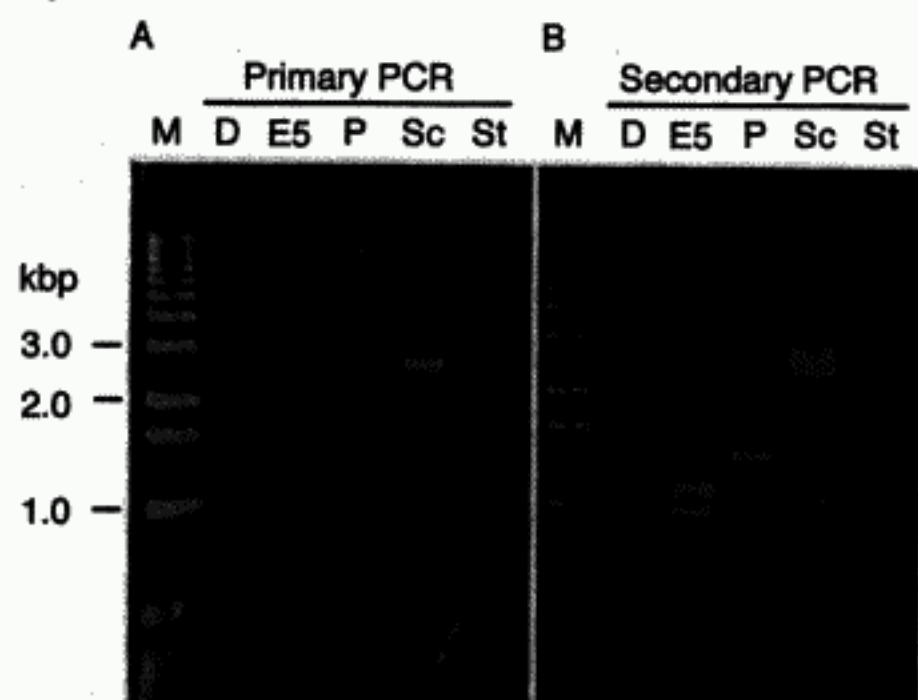


図3 サブプレッションPCR法によるS1543遺伝子転写領域上流領域の単離

A:一次PCR、B:二次PCR、
D:DraI、E5:EcoRV、P:PvuII
Sc:ScaI、St:StuI (消化DNA)、M:サイズマーカー

そこで、最も顕著に増幅した産物であるScaI消化断片集団由来の2.5kbpの増幅産物、および同じ集団由来の1.0kbpの増幅産物を回収、精製し、プラスミドにクローニングした。

3.3 単離されたS1543遺伝子上流領域の塩基配列の解析

ScaI消化断片の集団から増幅されクローン化された2.5kbpおよび1.0kbpの増幅産物の塩基配列を決定した。その結果、2.5kbpの増幅産物は、全長が2527bpであり、予想通り5'端に19塩基のAP2の配列、3'端に27塩基のGSP2に相補的な配列を含んでおり、3'端の50塩基はS1543cDNAの第1~50塩基と一致していた。S1543cDNAがS1543遺伝子の転写開始点を含む全長のcDNAクローンであると仮定すると、この2.5kbp増幅産物は、S1543遺伝子の転写領域の5'上流の2458塩基を含んでいることになる。

また、その配列を見ると、転写開始点と予想されるS1543cDNAの最初の塩基の上流第44から36塩基の位置に、真核生物のプロモーターに共通して見られるTATAbox配列と思われる配列5'-TATATATA-3'が存在した。したがって、この増幅産物は求めるS1543遺伝子のプロモーターを含んでいる可能性が高い。

塩基配列解析後、イネゲノム研究チームによってS1543遺伝子およびその上流の領域を含む、イネのゲノムDNAのPACライブラリーのクローンのひとつで第1染色体にマップされる148kbpのクローンAP002747 (GenBank Acc. No.: AP002747) の全塩基配列が報告された。このPACクローンの配列の、第142259塩基から第144716塩基までの配列が本研究で得られた2458bpの配列と一致した。また、この2458bpの配列の3'下流にはS1543遺伝子の転写領域の配列が存在し、5'末端にはゲノムDNAの消化に用いたScaIサイトが見い出された。以上より、サブプレッションPCR法により増幅された2.5kbp産物は、S1543遺伝子の転写領域の上流領域であることが確認された。

サブプレッションPCR法によりシングルコピー遺伝子から増幅される産物は、原理的にはひとつの制限酵素処理集団から1種類のみになるはずであるため、2.5kbp産物とともに増幅された1.0kbpの増幅産物の塩基配列を調べた。その結果、この産物は全長が972bpであり、2.5kbp産物と同様に両端にAP2の配列およびGS P2に相補的な配列を含み、3'端の50塩基はS1543cDNAの第1～50塩基と一致していた。転写領域の上流領域としては903塩基を含み、その配列は、2.5kbp産物に含まれる上流領域の3'寄りの903塩基と一致していた。しかし、その配列の5'端の配列を調べたところ、ScaIサイト (5'-AGTACT-3') で切れたものではなく、5'-TATACT-3'という配列の中央で切れたものであったことから、この増幅産物は、何らかの原因でゲノムDNAが非特異的に切断し、そこに2本鎖アダプターが結合した断片が増幅したものであると考えられた。これは、1.0kbp産物が2.5kbp産物よりも増幅しにくかったことと一致する。

以上より、アダプター付きゲノムDNA断片をサブプレッションPCR法によって、その中でも二次PCRにはタッチダウンPCRの原理を応用することによって、イネcDNAをもとにして、それに対応するゲノム上の遺伝子上流に存在するプロモーター領域を、効率的に単離する技術が確立された。

3. 4 パーティクルガン法によるイネ幼植物体への外来遺伝子DNA導入条件の検討

単離されたDNA配列のプロモーター活性を解析するためには、その配列に発現レポーター遺伝子を接続してイネに導入し、発現レポーター遺伝子の各組織における発現を調べることが有効である。そこで、イネ幼植物体に発現レポーター遺伝子をパーティクルガン法により導入し、その一過的な発現を解析する条件の最適化を試みた。

パーティクルガン法では、マクロキャリアにより加速された金属粒子がストッピングスクリーンで止まったマクロキャリアから慣性で離れ、植物組織に衝突するまでの間に空気抵抗により減速するため、ストッピングスクリーンから試料までの距離を最適化する必要がある。そこで幼植物体の葉、根などの各器官に均一な条件で粒子を衝突させるために、プラスチックシャーレのふたと底を同じ向きにして重ね、その間の狭い空間にイネ幼植物体を生育させた。

ついで、遺伝子導入条件の最適化を行った。イネの葉および根で発現することが知られているCaMV35Sプロモーターを発現レポーターのGUS遺伝子に接続したプラスミドDNAを付着させた金粒子を、様々な条件でイネ幼植物体に撃ち込み、一定時間後にGUS遺伝子の基質であるX-glucを加えて、GUS遺伝子がイネ細胞内に導入され一過的に発現して生じた青色のスポット数をカウントすることにより、遺伝子の導入効率を調べた。

予備的な実験により、イネへの遺伝子導入には、直径1.0 μm よりも直径1.6 μm の金粒子が適当であることがわかった。また、植物体表面に水分が多い場合には、遺伝子導入効率が顕著に低下したので、あらかじめ植物体の表面を滅菌したキムワイプで拭ってから遺伝子導入を行った。

導入条件としては、金粒子の加速度に関わるラブチャードディスクの種類、空気の抵抗による金粒子の減速などに関わるストッピングスクリーンと試料の距離、および金粒子の導入回数について調べた。その結果、表1が示すようにラブチャードディスクの種類としては、1,100psiのものよりも、1,300psiのものの方が、スポットの数が多く、また個々のスポットが大きくなる傾向があった(図4)。ストッピングスクリーンと試料との距離については、1,100psiのラブチャードディスクを用いたときには、9cmの方が12cmよりも多くのスポッ

トが観察されたが、1,300psiのラブチャーディスクを用いたときには、逆に12cmの方が9cmよりもスポットが多かった。スポットの見られる範囲については、9cmの場合、シャーレの中央付近の植物体にのみスポットが見られたのに対し、12cmの場合より広範囲の植物体にスポットが見られた。発射回数については、2回繰り返して発射した場合の方が、1回しか発射しなかった場合よりも多くのスポットが観察された。スポッ

トは葉、根のいずれからも観察されたが、根の方が相対的に面積が小さいため、根に生じたスポット数は葉に比べて少なかった。

以上より、イネ幼植物体へのパーティクルガンによる遺伝子導入は、1.6 μ mの金粒子と1,300psiのラブチャーディスクを用い、12cmの距離で行う条件が最適であることが明らかになった。

表1 パーティクルガン法によるGUS遺伝子DNAのイネ幼植物体への導入条件の検討

ラブチャーディスクの種類 a	距離 b	発射回数	スポットの数 c	
			葉	根
1100	9	1	92	34
1100	9	2	209	61
1100	12	1	42	34
1100	12	2	66	64
1300	9	1	118	48
1300	9	2	254	72
1300	12	1	175	57
1300	12	2	345	81

a 数字はディスクが壊れるときの圧力(pound per square inch)

b ストップングスクリーンと試料との距離(cm)

c 独立した5回の実験の平均値

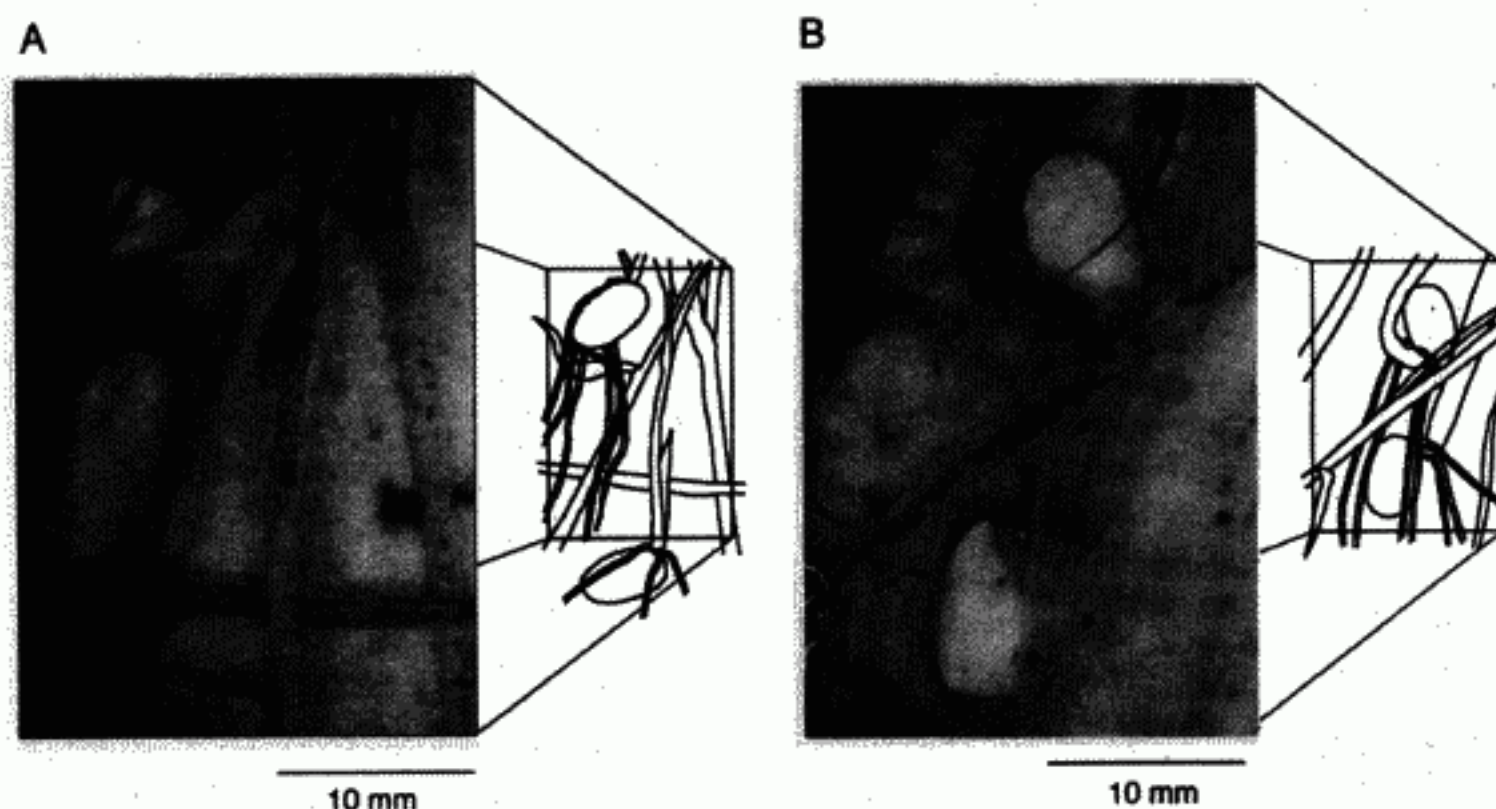


図4 イネ幼植物体への発現レポーター遺伝子の導入条件の検討

金粒子1.6 μ m、ストップングスクリーンと試料の距離は12 cm

A:1100 psiのラブチャーディスク使用

B:1300 psiのラブチャーディスク使用

4. 考 察

本研究では、イネcDNAを出発材料として、その遺伝子の転写領域の5'上流領域を効率的に単離する手法を確立した。この領域には、その遺伝子のプロモーターが存在すると考えられ、様々な組織特異的発現パターンを示すcDNAを用いることにより、それぞれの組織特異的プロモーターが単離できると期待される。イネでは、国際的なプロジェクトとしてゲノムDNAの全塩基配列の解析が進行中であり¹²⁾、それが完了すれば、この手法によらずともイネのプロモーターを単離できるようになる。実際、双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナにおいては、すでにゲノムDNAの全塩基配列が解析され¹⁾、特定のcDNAに対応する遺伝子のプロモーターを単離することは容易になっている。しかし、ゲノムDNA塩基配列解析が完了するまでは、この手法はイネ遺伝子プロモーターの単離にきわめて有用であるし、また、イネ、シロイヌナズナ以外の植物では、今後ともこの手法は有用であろう。

本研究では、ゲノムDNA上の既知の配列を手がかりにして、それに隣接する未知の配列をPCR法によって増幅する手法を比較検討した。そのような手法はいくつか報告されているが、およそ3つの原理に大別される。第1は、インバースPCR法^{8, 14)}と呼ばれ、ゲノムDNAを制限酵素で消化して配列が既知の領域と未知の領域を含む制限酵素断片を得、それらをDNAリガーゼにより環状化し、既知の領域から外側に向かうプライマーを用いて未知の領域を増幅する。第2の原理は、リンカーPCR法と総称され、ゲノムDNAを制限酵素で消化して既知の領域と未知の領域を含む制限酵素断片を得、それらにリンカー（あるいはアダプター）と呼ばれる短い合成DNAを結合し、既知領域に特異的なプライマーとリンカーに特異的なプライマーを用いて既知領域に隣接する未知領域を増幅する。この原理では、既知領域を含まない多くの不要なゲノムDNA断片にもリンカーが結合するため、それらがリンカー特異的なプライマーのみにより増幅されない工夫が必要であり、その工夫によってvectorette PCR法¹⁰⁾、splinkerette PCR法³⁾、サブプレッションPCR法¹³⁾などが報告されている。第3の原理は、低ストリンジエンシーPCR法と総称され、既知領域に相補的な長く特異性の高いプライマーと、未知領域にアニールする短く特異性の低いプライマーを用い、PCRサ

イクルの中に、特異性の高いプライマーしかアニールしない高温アニーリング条件のサイクルを加えることによって、特異性の高いプライマーを一方に持つ産物をそうでない産物よりも優先的に増幅させるもので、TAIL PCR法⁶⁾などが報告されている。本研究では、インバースPCR法はうまく行かなかったが、その原因としては、DNAリガーゼによる環状化などの条件の設定が難しいことなどが考えられる。リンカーPCR法のひとつサブプレッションPCR法は、本研究で最適化した条件を用いることにより、きわめて効率的にプロモーター領域を単離することができた。データは示さないが、S1543以外のcDNAについても、この方法で容易にプロモーター領域を単離することができた。低ストリンジエンシーPCR法は、本研究では試していないが、ゲノム上の制限酵素サイトの有無に影響されないという優れた点があるので、今後、検討する価値があると思われる。

本研究で単離したS1543遺伝子上流領域は、それを含むゲノムDNAのPACクローンがすでに単離・解析されていたので、両者の塩基配列を比較することにより、この手法を評価することができる。まず、ScaI消化DNA断片の集団から単離された約2.5kbpの領域は、PACクロンの塩基配列データと完全に一致していた。これは、本研究でPCR増幅に用いた耐熱性DNA合成酵素（Tth DNAポリメラーゼともう1種類の酵素の混合物）と反応条件では、塩基の取り込みの誤りが少ないPCR増幅がおきることを示す。一方、正しいScaIサイトでゲノムDNAが切れたと思われる2.5kbpの増幅産物に加えて、非特異的な配列で切れたと思われる1.0kbpのゲノムDNA断片が、わずかではあるが増幅された。しかし、その配列は、やはり目的とする領域を含むものであった。これは、サブプレッションPCR法が、正しい制限酵素サイトで切れた断片であれ、非特異的な場所で切れた断片であれ、遺伝子特異的プライマーのアニールする配列を含むDNA断片のみを特異的に増幅することを示している。サブプレッションPCR法においては、仮にアダプターDNA2の3'端のアミノ化が不十分でDNA鎖の伸長がおこった場合でも、そのような産物は両端に長く相補的なアダプターの配列を持ち、両端が分子内でアニールしてフライパンのような構造をとるため、PCR増幅されにくいと考えられている。

本研究では、ScaI増幅産物の塩基配列のみを解析し

たが、他の制限酵素によってもすべて増幅産物が得られた(図3)。すなわち、DraIでは2.1kbpのわずかな産物が、EcoRVでは1.1kbpと0.9kbpの2種類の産物が、PvuIIでは1.3kbpの産物が、StuIでは1.3kbpのわずかな産物が、それぞれ増幅された。PACクローンの塩基配列データから、それぞれの制限酵素によって生ずるDNA断片の長さを推定すると、DraI, EcoRV, PvuIIおよびStuIでは、それぞれ、2087bp, 7184bp, 5116bpおよび5370bpであった。これら推定されるDNA断片の長さを実際に増幅された産物の長さとを比較すると、DraIについては、正しいサイトで切断された断片が増幅されたと思われるが、他の制限酵素では、いずれも5 kbp以上の長さの増幅産物が得られることが期待されるにもかかわらず、実際には、0.9~1.3kbpの短い産物が増幅された。ScaIの結果もあわせて考えると、目的とするDNA断片が2.5kbp以下であれば、正しいサイトで切れた断片が優先的に増幅するが、目的とするDNA断片が5.1kbp以上であると、正しいサイトで切れた断片は増幅せず、代わりに制限酵素部位以外の場所で切断された1.3kbp以下の短い断片が増幅されることを示している。したがって、この方法で増幅された産物は、長いものほど正しい制限酵素部位で切断された断片の増幅産物である可能性が高いと言える。

単離された増幅産物が目的とするプロモーターを含んでいるのか、また含んでいるとすればどの領域がそうなのか、を調べるためには、その配列を発現レポーター遺伝子に接続し、それをゲノムDNAに組み込んだ組換え植物を作製して検定することが望ましい。しかしながら、組換え植物の作製には最低でも数ヶ月を要することから、簡易にプロモーター活性を検定する方法として、本研究ではイネ幼植物体へのパーティクルガン法による遺伝子導入条件を最適化した。本研究で用いたプロモーターは、葉と根の両方で発現することが期待されるものであり、その通りの発現が見られたことから、葉のみではたらくプロモーター、逆に根のみではたらくプロモーターについても、本研究の実験系を用いて評価できると考えられる。

しかしながら、パーティクルガンによって導入された遺伝子の一過発現は、通常、細胞核内に多数コピー導入されたDNAによって起こり、ゲノムDNAに低コピーで組み込まれた遺伝子が安定的に発現する場合と、必ずしも一致するとは限らない。また、パーティクルガン法では、同一の植物の発育ステージをおってプロ

モーター活性を見ることは難しい。したがって、単離された配列のプロモーター活性はあくまでも組換え植物で検定すべきであり、本研究で最適化した手法は、その前段階として幼植物体における発現を簡易に検定する方法と位置づけられる。

以上のことから、本研究によって組織特異的に発現するcDNAの塩基配列をもとに、その遺伝子のプロモーターを効率的に単離する最適条件を確立するとともに、幼植物体におけるプロモーター活性を検定するための、パーティクルガン法による遺伝子導入の最適条件が確率された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、大変丁寧なご指導と終始有益なご助言、ご支援をいただいた農業生物資源研究所生物工学部遺伝子設計研究室の各位、佐賀県農業試験研究センターの中村典義氏、および静岡県農業試験場の青島洋一氏に対し、深謝の意を表する。

引用文献

- 1) Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796 - 815, 2000.
- 2) Benfey, P.N. & N.-H. Chua, 1990 The CaMV 35S promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, 250:959-966.
- 3) Devon, R.S., D.J. Porteous & A.J. Brooks, 1995. Splinkerettes-improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Res.*, 23:1644-1645.
- 4) Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker & J.S. Mattick, 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplifications. *Nucleic Acids Res.*, 19:4008.
- 5) Komari, T., Y. Hiei, Y. Ishida, T. Kumashiro & T. Kubo, 1998. *Advances in cereal gene*

- transfer. *Current Opin. Plant Biol.*,1:161-165.
- 6) Liu, Y.-G. & R.F. Whittier,1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert and fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*,25: 674-681.
- 7) Murray, M. G. & W. F. Thompson,1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8: 4321-4325.
- 8) Ochman, H., A.S. Gerber & D.L. Hartl,1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*,120: 621-623.
- 9) Perier, R.C., V. Praz, T. Junier, C. Bonnard & P. Bucher,2000. The Eukaryotic Promoter Database (EPD). *Nucleic Acids Res.*, 28: 302-303.
- 10) Riley, J., R. Butler, D. Ogilvie, R. Finniear, D. Jenner, S. Powell, R. Anand, J.C. Smith & A.F.Markham,1990. A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res.*, 18:2887-2890.
- 11) Sambrook, J., T. Fritsch & T. Maniatis,1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press., U.S.A..
- 12) Sasaki, T. & B. Burr, International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome. *Current Opinion Plant Biol.*, 3: 138-141.
- 13) Siebert, P.D., A. Chenchik, D.E. Kellogg, K.A. Lukyanov & S.A. Lukyanov,1995 An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, 23: 1087-1088.
- 14) Triglia, T., M.G. Peterson & D.J. Kemp,1988. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.*,16: 8186.
- 15) Tyagi, A.K. & A. Mohanty,2000. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Sci.*,158: 1-18.
- 16) Ugaki, M., Ueda, T., Timmermans, M. C. P., Vieira, J., Elliston, K.O. & Messing, J.,1990. Replication of a geminivirus derived shuttle vector in maize endosperm cells. *Nucleic Acids Res.*, 19: 371-377.
- 17) Ugozara, S. G.,2000. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review. *Biotechnol. Adv.*, 18: 179-206.
- 18) Yamamoto, K. & Sasaki, T.,1997 Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Mol. Biol.*, 35:135-144.

Summary

PCR-based isolation of rice gene promoters and their transient expression analysis

Use of tissue-specific promoters for expression of foreign genes in transgenic plants should be important for limiting the foreign gene expression only at desired tissues of the plants, but the number of currently available tissue-specific promoters is limited. In rice, *Oryza sativa*, a great number of tissue-specifically expressed cDNAs were identified. Therefore, here we optimized a protocol to isolate rice gene promoters by suppression PCR technique using cDNA sequence information. We further optimized conditions to introduce isolated putative promoters plus a reporter gene into young rice plants by particle bombardment and to analyze their transient expression.