

氏名(本籍)	なか 中	がわ 川	ゆう 裕	こ 子
学位の種類	博	士	(農	学)
学位記番号	農	博	第	659号
学位授与年月日	平	成	13年	3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	トランスポゾンと部位特異的組換え因子を利用したイネ 遺伝子破壊システムの研究			
論文審査委員	(主査)	教授	西尾	剛
		教授	山谷	知行
		教授	前	忠彦
		助教授	鳥山	欽哉

# 論文内容要旨

## 緒言

トランスポゾンとは転移性遺伝因子で、ゲノム上のある部分から切り出されて他の部位に挿入される。トランスポゾンの挿入による遺伝子の不活性化が起こると突然変異体を得られ、トランスポゾンの塩基配列を手がかりにして、タグされた原因遺伝子をクローニングできる。このように、トランスポゾン・タギングは遺伝子のクローニングと機能解析に有効な手法である。トウモロコシのトランスポゾン *Ac* に由来する *Ac/Ds* 系は、*Ac* の持つ転移酵素 (*AcTP*) を利用して非自律性の *Ds* を転移させるシステムである。この系は特にシロイヌナズナの解析に多く用いられているが、イネでの報告は少なく、詳しい解析はされていない。

本実験では、*Ac/Ds* 系を利用して、①イネにおける *Ds* 転移パターンの解析を行った。さらに、*Ds* ベクターに味噌・醤油酵母由来の部位特異的組換えの認識配列 (*RS*) を組み込むことで、②部位特異的組換えを利用したイネ染色体欠失の誘発を試みた。そして、2つの系を組み合わせることにより (Fig. 1) ③イネ遺伝子破壊システムを開発することを目的とした。

## 第1章 *Ac/Ds* 系を利用したトランスポゾン・タギング

### 1) イネへの遺伝子導入と *Ds* を含む T-DNA 挿入部位の解析

アグロバクテリウム法を用いて、*Ds* ベクター2種類 (*I-RS/dAc-I-RS* 及び *Hm<sup>R</sup>Ds*)、35S プロモーター (*35Sp*) に *AcTP* の cDNA 部分を連結した *35Sp::AcTP*、及び *35Sp* に R 組換え酵素遺伝子を連結したベクターである *pGAHdNR* (Fig. 2) をそれぞれイネに遺伝子導入した。得られた形質転換体について、サザンブロット分析を用いて導入遺伝子の確認を行った。2種類の *Ds* ベクターを導入したイネが合計 20 個体得られ、そのうち *Ds* が 1 コピー導入されたものは 7 個体であった。*AcTP* 及び R 組換え酵素導入イネは、各 2 個体ずつ作出した。

*Ds* を含む T-DNA 挿入位置のマッピングを目的として、1 コピー *Ds* 導入個体のゲノム DNA を材料に、T-DNA 挿入部に隣接するゲノム領域のクローニングを行った。I-RS/dAc-I-RS 導入系統 #d5 の LB 隣接領域を TAIL PCR を用いてクローニングし、イネの RFLP 連鎖地図上にマッピングしたところ、第 11 番染色体の短腕に位置していることが分かった (Fig. 3)。11 番染色体には、いもち病耐性などの耐病性遺伝子が数多く存在している。トランスポゾンと比較的同一染色体上の近傍に転移しやすい性質を持つことが報告されており、#d5 由来の *Ds* 転移系統を数多く展開することによって、耐病性遺伝子をタグできると期待された。

## 2) *Ds* 導入イネと AcTP 導入イネの交配及び F<sub>1</sub> 個体の体細胞における *Ds* 切り出しの検出

*Ds* と AcTP を共存させて *Ds* の転移 (transposition) を誘導するため、*Ds* が 1 コピー導入された系統と、AcTP 導入個体 (#A1 及び #A2) を交配した。本論文では、*Ds* の切り出し (excision) が起こり、それが再挿入 (re-insertion) された場合を転移 (transposition) と記述した。PCR 法を用いて F<sub>1</sub> の葉で *Ds* の切り出しが起きているかを調べた。その結果、*Ds* 系統 #d3 及び #d5 に由来する F<sub>1</sub> 個体で *Ds* の切り出しを示す 260bp のバンドが検出された (Fig. 4A)。これより F<sub>1</sub> の体細胞で *Ds* の切り出しが起きていることが分かった。

## 3) F<sub>2</sub> における *Ds* 転移頻度の解析

トランスポゾン・タギングを行うためには、*Ds* の切り出しが検出された個体から、F<sub>1</sub> の生長点や生殖細胞での転移 (ジャーミナルな転移) に由来する F<sub>2</sub> 個体を同定する必要がある。まず、*Ds* の切り出しが起こった F<sub>2</sub> 個体を PCR 法により選抜した (Fig. 4B)。Table 1 に F<sub>2</sub> 個体における *Ds* 系統毎の切り出し頻度を示した。#d3, #d5, #D3, #D13, #D14 と #A2 を親に持つ F<sub>2</sub> 個体での *Ds* 切り出しの頻度は 0~63.3%であった (Table 1)。AcTP 導入系統 #A1 と #A2 を比較すると、F<sub>1</sub> 個体の体細胞では #A1, #A2 とも切り出しを誘導し

たが、#A1 を交配した F<sub>2</sub> 系統からは切り出しが起こった個体は得られなかった。

PCR 法で切り出しが検出された個体については、ジャーミナルな転移が起こった個体を選抜するため、サザンブロット分析を行った。Fig. 5 に示したように、転移前の Ds を示す 5.6kb のバンドと異なる位置にバンドが検出された個体は、Ds がジャーミナルに転移したと推定できる。独立した転移が起こった頻度を Table 2 にまとめた。I-RS/dAc-I-RS 系統 #d5 では Ds が転移したのは 14 個体、バンドの位置から、Ds が独立に転移した個体は 8 個体であると同定した。Hm<sup>R</sup>Ds 系統 #D14 についてもサザンブロット分析を行い、転移頻度を調べ (Table 2)、最終的に合計 18 の独立な Ds 転移系統を得た。独立した位置への Ds の転移頻度は、それぞれ 3%、20%であった。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。また、同じ交配組み合わせによって得られた F<sub>1</sub> 個体を数個体栽培し、F<sub>1</sub> 個体別にそれ由来する F<sub>2</sub> における転移頻度を比較すると、個体毎にジャーミナルな転移の頻度が異なっており (Table 3)、例えば #d5 では、0~40%と大きな幅があった。このことから、独立した位置に Ds が転移した個体を効率良く得るためには、Table 3 に示した k4 のように独立した位置への転移が起こりやすい F<sub>1</sub> 個体を選び、その後代を数多く展開する方が有効であると分かった。

#### 4) Ds 転移パターンの解析

Ds が同一染色体上の近傍に転移しているか、あるいは他の染色体上に転移しているかを明らかにするため、転移した Ds と Ds の抜け出た跡、つまり Empty donor site (ED) との連鎖解析を行った (Table 4)。#d5 由来の独立した 5 つの転移系統のうち 3 つ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、k5-1 は 11±6% の組換え価を持っており、約 3Mb 離れた同一染色体上に Ds が転移していると推測された。k4-2 は連鎖が見られなかった。このことから、イネでも 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。一方 k4-2 では他の染色体への転移が起こ

っていると推察され、他の染色体上の遺伝子を破壊するためにも *Ds* が有効であると考えられた。

転移した *Ds* の 3'側及び 5'側の隣接領域を TAIL PCR を用いてクローニングし、#d5 由来の転移位置の異なる  $F_2$  植物 4 個体について、転移距離及び *Ds* 再挿入の方向を明らかにした。*Ds* 転移個体 k2-2 では、*Ds* が T-DNA 内の LB 側に再挿入しており、転移距離は 2.6kb であった (Fig. 6)。残りの 3 系統は RB 側の植物ゲノム内に *Ds* が転移しており、転移距離は k4-4 が 4.6kb、k4-1 が 5.6kb、k2-1 が 7.4kb であった。また、*Ds* 再挿入の向きはどれも 5'側と 3'側が入れ替わることなく転移していた。これらの結果から、イネでも *Ds* が元の挿入位置の近傍に転移しやすいという連鎖解析の結果を裏付けることができた。

#### 5) *Ds* でタグされた遺伝子の解析

*Ds* 転移個体 k2-1 の *Ds* 隣接領域の塩基配列を決定したところ、プロペナゾールで誘導され、いもち病耐性に関与していると報告されている *RPR1* 遺伝子と相同性が見られた。*RPR1* は他の耐病性遺伝子と高い相同性を持つ NBS-LRR 型の遺伝子で、*Ds* はロイシンリッチリピート (LRR) 部分に挿入されていた (Fig. 7)。RT-PCR でこの遺伝子の発現を解析した結果、サリチル酸処理した葉で発現が見られ、この遺伝子が病害抵抗性関連遺伝子である可能性が示唆された。

## 第2章 部位特異的組換えを利用したイネ染色体欠失の誘導

### 1) イネにおける R/RS 部位特異的組換えの誘発

味噌・醤油酵母の R/RS 部位特異的組換えは、シロイヌナズナとタバコを材料にした報告により、植物でも機能することが確かめられている。そこで、イネにおける活性を調べるために、2 つの RS 配列間で欠失が起こると GUS が発現するようにデザインされたベクター (pBIHCATG) を用いたトランジェントアッセイを行った。R 組換え酵素遺伝子導入イネのカルスに、パーティクルガ

ンを用いて pBIHCATG を導入し、GUS アッセイを行ったところ、標的に用いた 300 個のカルスのうち、4 個のカルスで 6 つのブルースポットが観察された (Fig. 8)。これは、非形質転換体のカルスに 35Sp で誘導した GUS 遺伝子を撃ち込んだ際に観察されるブルースポット数の 5%の割合であった。よって、イネでも R 組換え酵素による RS 間の欠失誘導が可能であることが分かった。

## 2) 部位特異的組換えとトランスポゾンを組み合わせたイネ染色体の欠失誘導

本研究に用いた *Ds* ベクターのうち、I-RS/dAc-I-RS には RS 配列が 3 カ所含まれており (Fig. 2)、*Ds* の転移に伴って、染色体上の様々な位置に RS 配列を挿入することができる。*Ds* 転移個体を R 組換え酵素遺伝子導入個体と交配すると、*Ds* 上の RS と T-DNA 挿入位置に残っている RS の 2 つの RS 配列に囲まれた DNA 領域の欠失を誘導できると期待される (Fig. 9)。そこで、Fig. 6 に示した 4 つの *Ds* 転移系統に、R 組換え酵素遺伝子を導入した #Re-2, #Re-3 の 2 系統を交配した。得られた  $F_2$  個体を材料に Fig. 9 に示したプライマーを用いて PCR を行い、RS 間の欠失を検出した (Table 5)。その結果、Fig. 10 に示したように、LB 側に *Ds* 転移が起こった k2-1 で 300bp、RB 側に転移が起こった k2-2 で 200bp のバンドが検出され、RS 間の欠失が起きていることを確認した。k4-1, k4-4 からも欠失を示す個体を得られ、調査した 573 個体のうち 25 個体で欠失を検出した (Table 5)。このことから、 $F_2$  の体細胞で 2 つの RS 配列に挟まれたイネ染色体の欠失が起きていることが明らかになった。欠失を検出した 25 個体については、ジャーミナルな欠失を起こしたものを選抜する目的でサザンブロット分析を行ったが、欠失は検出できなかった。そこで、欠失が観察された k4-1 の  $F_2$  を材料に、体細胞での欠失がどの程度誘導されているかを調査したところ、欠失は  $F_2$  の葉の細胞の 0.01%でしか起こっていないことが判明した。しかし、体細胞での欠失が起きている個体ではジャーミナルな欠失も誘導されると期待される。

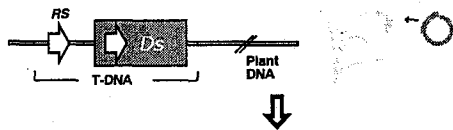
## 結語

本研究はイネで *Ds* の転移頻度と転移パターンを解析した初の報告であり、今後多数のトランスポゾンタグラインを作成するために有用な基礎データを示した。本研究で作出した *Ds* 導入系統及び転移系統は、今後の遺伝子解析に利用可能である。

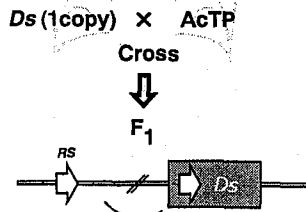
トランスポゾンと部位特異的組換え系を組み合わせることで染色体の欠失を誘導しようとする試みは、タバコ、シロイヌナズナ、トマトについてバクテリオファージの *Cre-lox* 系を用いた報告があるが、染色体欠失個体は得られていない。味噌・醤油酵母の *R/RS* 系を *Ac/Ds* 系に組み合わせることでイネに利用した報告は、本研究が初である。体細胞での欠失誘導個体が得られたことから、次世代では欠失変異体を得られることが期待される。

本研究で開発したトランスポゾン *Ac/Ds* 系と、部位特異的組換えを用いた遺伝子破壊システムは、ゲノム研究以後重要な研究となるイネ遺伝子の機能解析に有効に利用できることが期待される。

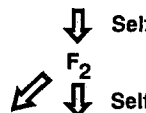
**1. Introduction of *Ds* elements into plants by *Agrobacterium*-mediated gene transfer**



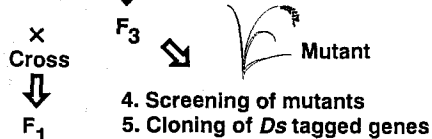
**2. Cross with plants carrying AcTP**



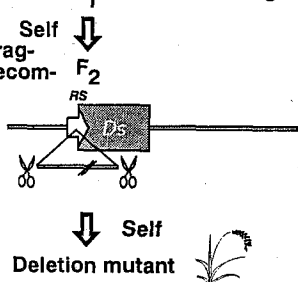
**3. Selection of F<sub>2</sub> plant with transposed *Ds***



**4. Cross with plants carrying Recombinase**

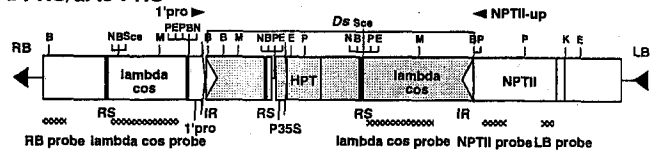


**5. Deletion of DNA fragment between two recombination sites**

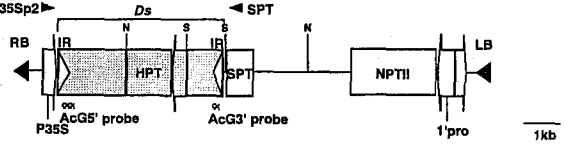


**Fig. 1** Flowchart of a system to induce deletion of genomic sequences using R/RS site-specific recombination and the transposon *Ds* in transgenic plants.

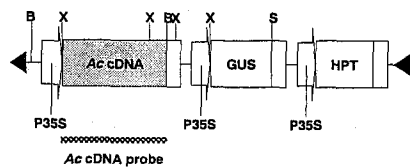
**A. I-RS/dAc-I-RS**



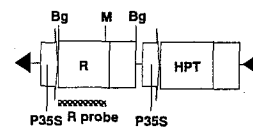
**B. Hm<sup>R</sup>Ds**



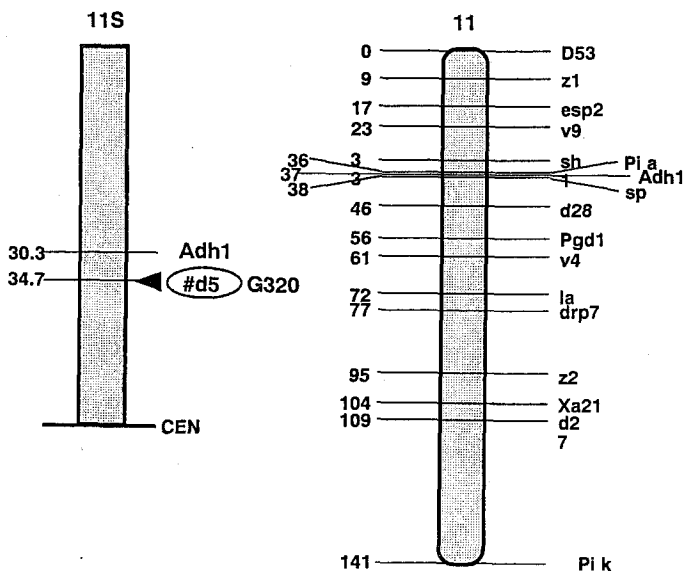
**C. 35Sp::AcTP**



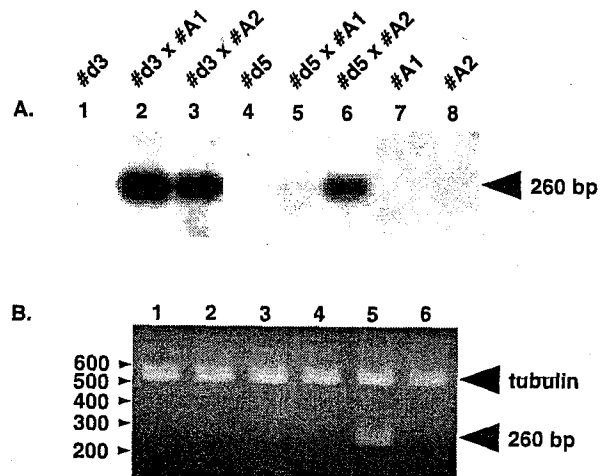
**D. pGAHdNR (Recombinase)**



**Fig. 2** Schematic diagram of the I-RS/dAc-I-RS (A), Hm<sup>R</sup>Ds (B), 35Sp::AcTP (C) and pGAHdNR (D) T-DNA region. RB, right border; LB, left border; P35S, CaMV 35S promoter; IR, inverted repeat; HPT, hygromycin phosphotransferase; SPT, streptomycin phosphotransferase; NPTII, neomycin phosphotransferase; 1' pro, 1' promoter on T-DNA; RS, recombination site recognized by R protein; lambda cos, fragment of lambda DNA containing the "cos"-region of lambda phage; GUS,  $\beta$ -glucuronidase; B, *Bam*HI cleavage site; Bg, *Bgl*II site; E, *Eco*RI site; K, *Kpn*I site; M, *Mlu*I site; N, *Not*I site; P, *Pst*I site; S, *Sac*I site; Sce, *I-Sce*I site; X, *Xba*I site. Positions of probes are indicated by shaded lines. Primers are indicated by arrowheads.



**Fig. 3** RFLP map position of T-DNA harbouring the I-RS/dAc-I-RS element in #d5. The #d5-LB flanking region is located on the chromosome 11. Morphological markers on the chromosome 11 are also indicated.



**Fig. 4** Detection of somatic excision of *Ds* element in leaves of F<sub>1</sub> plants (A) and germinal excision in F<sub>2</sub> plant derived from crosses between *Ds* lines (#d3 and #d5) and AcTP lines (#A1 and #A2) (B). A. An empty donor site was amplified by PCR using 1' pro and NPTII-up primers and detected by Southern hybridization using NPTII probe. Lane 1, #d3; lane 2, #d3 X #A1; lane 3, #d3 X #A2; lane 4, #d5; lane 5, #d5 X #A1; lane 6, #d5 X #A2; lane 7, #A1; lane 8, #A2. B. PCR was carried out in each F<sub>2</sub> plant (lanes 1 to 6) of *Ds* line #d5 X AcTP line #A2 and the bands were visualized by staining the gel with ethidium bromide. The PCR primers, 1' pro and NPTII-up, were used to amplify a 260 bp fragment indicating *Ds* excision. The PCR primers for the tubulin gene were also included for a positive control of PCR. *Ds* excision was detected in a plant in lane 5. Molecular markers are indicated in bp on the left.



**Table 1.** The number of plants with *Ds* excision in the F<sub>2</sub> progeny resulting from crosses between designated *Ds* and AcTP lines.

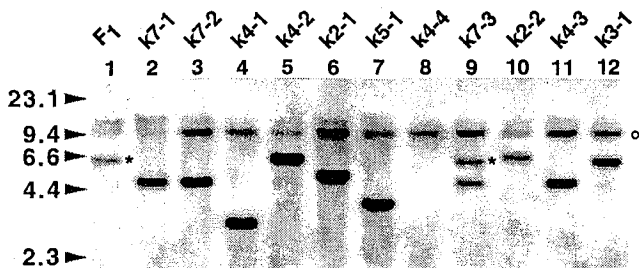
<i>Ds</i> line (♀)	AcTP line (♂)	F <sub>2</sub> plants tested	No. of F <sub>2</sub> plants showing		Frequency of <i>Ds</i> excision (%)
			<i>Ds</i> excision	lacking AcTP	
<b>I-RS/dAc-I-RS</b>					
#d 3	#A 1	217	0	—	0
	#A 2	55	5	0	9.1
#d 5	#A 1	25	0	—	0
	#A 2	241	22	7	9.1
<b>Hm<sup>R</sup>Ds</b>					
#D 3	#A 1	31	0	—	0
	#A 2	35	1	0	2.9
#D 13	#A 1	—	—	—	—
	#A 2	44	11	0	25.0
#D 14	#A 1	25	0	—	0
	#A 2	49	31	10	63.3
#D 16	#A 1	—	—	—	—
	#A 2	45	0	—	0

— : Not determined.

**Table 2.** The frequency of germinal *Ds* excision, *Ds* reinsertion and individual *Ds* transposition in the F<sub>2</sub> progeny resulting from crosses between selected *Ds* lines and AcTP line #A2

	<i>Ds</i> line (♀)		
	I-RS/dAc-I-RS	Hm <sup>R</sup> Ds	
	#d 5	#D 14	
F <sub>2</sub> plants tested	a	241	49
No. of plants showing germinal <i>Ds</i> excision	b	18	25
Frequency of germinal <i>Ds</i> excision (%)	b/a	8	51
No. of plants showing reinsertion of <i>Ds</i>	c	14	12
Frequency of <i>Ds</i> reinsertion (%)	c/b	78	48
No. of individual transposition events *	d	8	10
Frequency of individual <i>Ds</i> transposition out of germinal <i>Ds</i> excision (%)	d/b	44	38
Frequency of individual <i>Ds</i> transposition out of F <sub>2</sub> plants tested (%)	d/a	3	20

\* Based on Southern blot analysis.



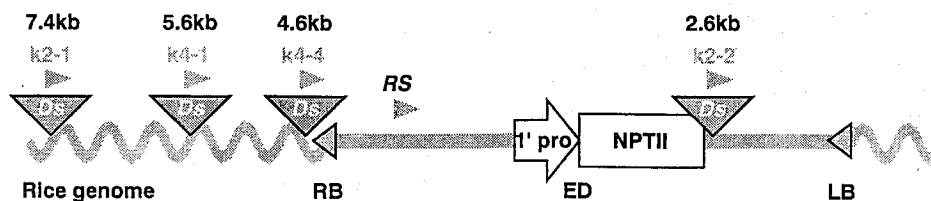
**Fig. 5** Southern blot analysis of F<sub>1</sub> (lane 1) and F<sub>2</sub> (lanes 2 to 12) plant with *Ds* excisions resulting from a cross between *Ds* line #d5 and AcTP line #A2. Genomic DNA was digested with *Eco*RI and the blot was hybridized with the lambda cos probe. Lane 1, F<sub>1</sub>; lane 2, k7-1; lane 3, k7-2; lane 4, k4-1; lane 5, k4-2; lane 6, k2-1; lane 7, k5-1; lane 8, k4-4; lane 9, k7-3; lane 10, k2-2; lane 11, k4-3; lane 12, k3-1. The band patterns in lanes 2 to 12 are different from that of F<sub>1</sub> in lane 1. An asterisk (\*) indicates the band of 5.6 kb corresponding to the *Ds* element before transposition. A circle indicates the band of 10 kb which does not change before and after *Ds* transposition. Molecular makers are indicated in kbp on the left.

**Table 3.** The number of plants with *Ds* excision and number of individual transposition event in the F<sub>2</sub> progeny of each F<sub>1</sub> plant resulting from crosses between designated *Ds* lines and the AcTP line (#A2)

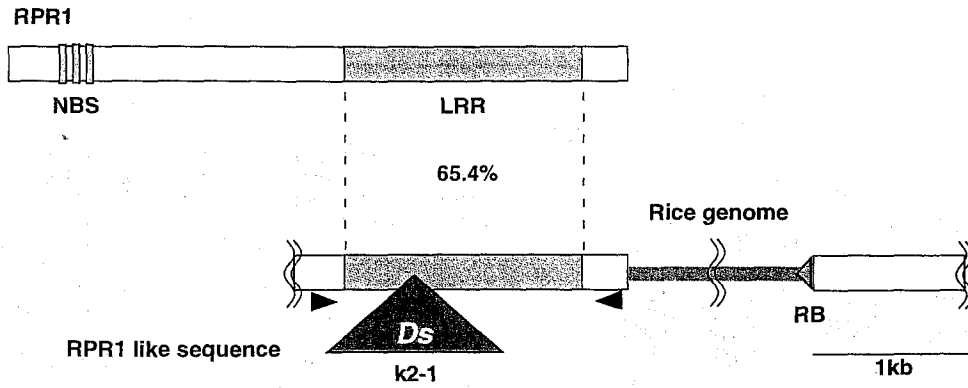
<i>Ds</i> line (♀)	F <sub>1</sub> plant	F <sub>2</sub> plant tested	No. of F <sub>2</sub> plants showing		Frequency of <i>Ds</i> excision (%)	No. of individual transposition events
			<i>Ds</i> excision	lacking AcTP		
<b>I-RS/dAc-I-RS</b>						
#d 3	k 7	15	1	0	6.7	0
	k 8	15	4	0	26.7	0
#d 5	k 1	20	0	0	0	0
	k 2	87	4	1	4.6	2
	k 3	91	5	0	5.5	1
	k 4	20	8	2	40.0	3
	k 5	10	2	2	20.0	1
	k 7	13	3	2	23.1	1
<b>Hm<sup>R</sup><i>Ds</i></b>						
#D 3	k 2	7	1	0	14.3	0
#D 13	k 2	10	7	0	70.0	0
	k 7	9	4	0	44.4	0
#D 14	k 2	20	11	1	9.1	5
	k 5	29	20	9	45.0	5

**Table 4.** Linkage analysis of empty donor site (ED) and transposed *Ds*-insertion site (*tDs*) in F<sub>3</sub> plants derived from each F<sub>2</sub> plant of #d5 X #A2. The number of F<sub>3</sub> plants was scored for the presence (+) and absence (-) of ED and *tDs*

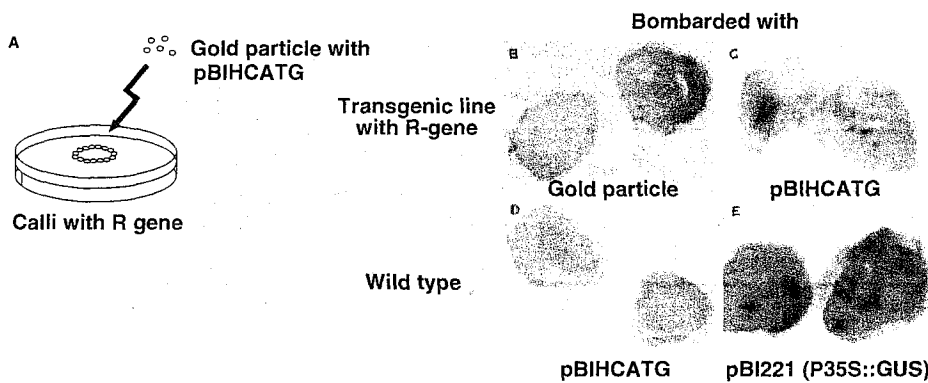
F <sub>2</sub> plant	No. of F <sub>3</sub> plants				Recombination value (%)
	ED+ / <i>tDs</i> +	ED+ / <i>tDs</i> -	ED- / <i>tDs</i> +	ED- / <i>tDs</i> -	
k2-1	22	0	0	8	0
k4-1	22	0	0	6	0
k4-2	24	0	5	0	independent
k5-1	21	1	2	6	11 ± 6
k7-1	23	0	0	7	0



**Fig. 6** *Ds* insertion sites of the four *Ds* transposition lines which were used for the detection of the deletion event between two *RS*s. Triangles indicate transposed *Ds*. The orientation of *Ds* was the same as that of the original I-RS/dAc-I-RS.

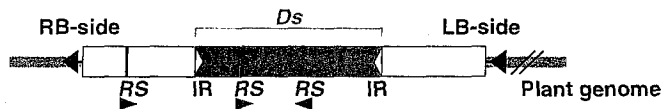


**Fig. 7** *Ds* element of k2-1 was transposed into the LRR of *RPR1*-like sequence. Arrowheads indicate the PCR primers used for RT-PCR and preparation of the probe of Southern blot analysis. LRR, leucine-rich repeats; *RPR1*, rice probenazole-responsive gene1

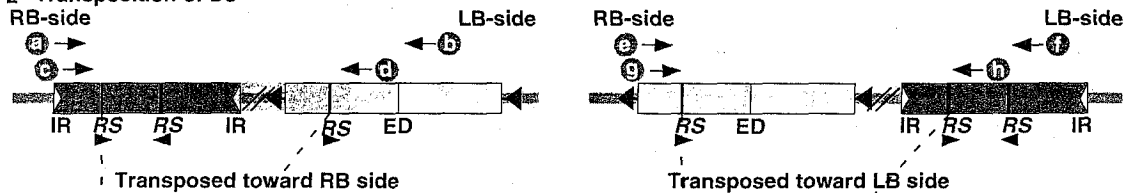


**Fig. 8** Transient GUS assay for detection of R/RS recombination in rice calli. **A**, Schematic diagram of plasmid delivery into rice calli by particle bombardment. **B**, Transgenic calli with the *R* gene (#Re-2) were bombarded with gold particles only and showed no blue spots. **C**, Transgenic callus with the *R* gene (#Re-2) was bombarded with pBIHCATG (cryptic GUS gene), showing blue spots of GUS activity. **D**, Wild-type callus bombarded with pBIHCATG, showing no blue spots. **E**, Wild-type callus bombarded with pBI221 (P35S::GUS), showing many blue spots.

**1 Introduction of I-RS/dAc-I-RS T-DNA into plant genome**



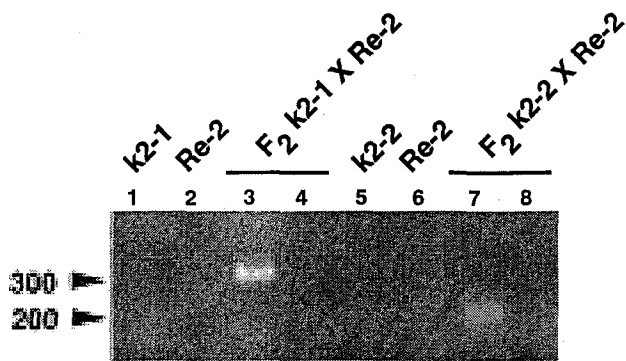
**2 Transposition of *Ds***



**3 Detection of deletion between two *RS*s by PCR analysis**



**Fig. 9** Flowchart for the induction of R/RS deletion using I-RS/dAc-I-RS T-DNA and strategy to detect deletion of a DNA fragment between two *RS*s by PCR analysis. The *Ds* element transposed by crossing with the transgenic plants expressing AcTP. R/RS deletion is expected to take place between *RS* in the T-DNA region and one of the *RS*s within the *Ds* element in the same orientation. Two-step PCR was carried out to detect deletion between the two *RS*s. In case that the *Ds* element transposed toward the RB side, primers a and b were used in the first PCR, and primers c and d were used in the second PCR, resulting in amplification of the 300-bp band. In case that the *Ds* element transposed toward the LB side, primers e and f were used in the first PCR, and primers g and h were used in the second PCR, resulting in amplification of the 200-bp band. Arrowheads indicate the orientation of *RS* and arrows with letters represent positions of primers. Other abbreviations are the same as those in Fig. 2.



**Fig. 10** Detection of R/RS deletion in rice leaves by PCR analysis. A 300-bp band indicates that the R/RS deletion in the case *Ds* has transposed toward the RB side, while a 200-bp band indicates deletion in the case *Ds* has transposed toward the LB side. Lane 1, k2-1 (the *Ds* transposed toward the RB side); lane 2, #Re-2 containing *R* gene; lane 3, an F<sub>2</sub> individual of k2-1 x #Re-2. A 300-bp band was detected indicating R/RS deletion; lane 4, an F<sub>2</sub> individual, in which no deletion was detected; lane 5, k2-2 (the *Ds* transposed toward the LB side); lane 6, #Re-2; lane 7, an F<sub>2</sub> progeny of #d5-k2-2 x #Re-2. A 200-bp band was detected, indicating R/RS deletion; lane 8, an F<sub>2</sub> progeny in which no deletion was detected. The bands were visualized by staining with ethidium bromide.

**Table 5.** Distance between two *RSs* in the transposed *Ds* lines and the number of F<sub>2</sub> plants showing *RS* deletion in the F<sub>2</sub> progeny of each F<sub>1</sub> plant resulting from crosses between designated transposed #d5 (♀) lines and the recombinase line (#Re-2)

#d5 line	Direction of transposition	Distance between two <i>RSs</i> (kbp)	F <sub>2</sub> plants tested	No. of F <sub>2</sub> plants showing <i>RS</i> deletion
k2-2	LB side	7.4	82	3
k2-1	RB side	4.7	308	5
k4-1		2.9	151	16
k4-4		1.9	32	1
<b>Total</b>			<b>573</b>	<b>25</b>

## 論文審査結果要旨

植物のゲノム解析が近年急速に進み、シロイヌナズナでは昨年全塩基配列が決定された。イネにおいても日本を中心に研究が進んでいるが、次の研究段階として、そこにある遺伝子やその機能を明らかにする必要がある。そのための有効な手法の一つがトランスポゾンタギング法である。本研究は、イネにトウモロコシのAc/Ds系トランスポズンを導入して、Ac/Ds系がイネのトランスポゾンタギングに有効かどうかを明らかにするために、Dsの転移頻度、転移パターン等を解析するとともにAc/Ds系と部位特異的組換え機構を組み合わせたDNA欠失誘導のシステムを構築しようとしたものである。

非自律性のトランスポゾンDsとAc転移酵素遺伝子を導入したイネ形質転換システムを作出し、それらを交配してDsの転移頻度を調査した。高いものでは63%の転移頻度が得られ、次代に遺伝するDsの転移は50%、そのうち約40%が異なる位置へのDsの転移であったことから、イネではAc/Ds系で高頻度の転移が得られることがわかった。

Dsはももとの染色体上の位置から比較的近いところに転移しやすいことが知られているが、イネ形質転換体においてもそのことが確認できた。転移したDsとDsが抜け出た跡の連鎖解析を行うと、60%が0cMのごく近傍、20%がやや離れた位置、20%が連鎖が見られない位置に転移していた。このことから、染色体上の様々な位置にDsが導入されたシステムを多数作成し、目的とした遺伝子座の近傍にDsを持つシステムを選抜してAcの転移酵素を持つシステムと交配することにより、ねらった位置にDsを転移させることが可能になると期待される。

味噌・醤油酵母のR組換え酵素に認識されるRS配列をDs内とDs外に有するDNAを導入した形質転換体を作成し、Ac転移酵素を持つシステムを交配してDsを転移させた後、R組換え酵素遺伝子を導入した形質転換システムと交配することによって、RS配列間のDNAを欠失させることが出来た。この欠失が後代に遺伝するものは得られなかったが、多数の個体を扱うことによってDNA欠失システムを作成できることが期待され、この方法が遺伝子機能の研究において有効な手法となりうることがわかった。

以上のように本研究は、イネにおいてAc/Ds系がトランスポゾンタギングに有効であることを示し、味噌・醤油酵母のR/RS系と組み合わせることによりDNA欠失を誘導できることを初めて示したものである。よって審査員一同は本論文は博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。