

高等植物の小孢子形成過程において発現する
アミノ酸トランスポーター様遺伝子に関する研究

上藤 洋敬

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物遺伝子機能学講座

(橋本 隆 教授)

平成13年 1月 9日提出

目次

序論	3
第一章 テッポウユリの小胞子母細胞で発現する <i>LIM8</i> 遺伝子	8
1－1 序文	8
1－2 材料と方法	8
1－3 結果	13
1－4 考察	29
第二章 <i>LIM8</i> 遺伝子と相同なシロイヌナズナの <i>AATL1</i> 遺伝子	34
2－1 序文	34
2－2 材料と方法	34
2－3 結果	39
2－4 考察	56
総括	61
参考文献	63
謝辞	77

序論

有性生殖は真核生物において一般的に見られる増殖様式であり、異なる個体に由来する配偶子が接合することによって新たなゲノムの組合せを生じ、その結果、次世代に遺伝的な多様性を与える機構である。有性生殖を行う生物種は配偶子の接合によってゲノムが倍数化することを防ぐため、その生活環において減数分裂を行い、半数体の細胞を形成することが必須である。例えば、下等真核生物の酵母は栄養源の枯渇によって減数分裂が誘導され、半数体の孢子を形成する。一方、高等真核生物の被子植物は環境の刺激（日長の変化など）によって茎頂で花芽が分化し、雄性器官の葯および雌性器官の胚珠において減数分裂が起こり、それぞれ半数体の小孢子と大孢子を形成する。減数分裂過程では二回の連続した核分裂によってゲノムが半数化するだけでなく、相同染色体間で高頻度の遺伝子組換えが起こることによって更に遺伝的多様性が高められている。従って、減数分裂（半数体形成）は有性生殖における基盤的な過程であり、その機構を明らかにすることは重要な研究課題であると考えられる。

減数分裂は第一分裂と第二分裂の連続した二回の有糸分裂から構成されている。第一分裂は体細胞有糸分裂と著しく異なることから異型分裂とも呼ばれ、その前期は染色質が細い糸状に凝縮する細糸期、相同な染色糸が対合を始める対合期、対合を終えて染色糸が太くなる厚糸期、キアズマを残して二組の姉妹染色分体が分離する複糸期、染色体が短縮肥厚する移動期に細分されている。また、第一分裂の後期では四本の染色分体が二本ずつ紡錘体の両極に分離する。一方、第二分裂は同型分裂であり、その後期では二本の染色分体が一本ずつ極へ分離する。第一分裂の前期では、シナプトネマ構造の消失と分離を伴った相同染色体の安定な対合と分離が起こっており、また、相同遺伝子組換えに関与すると考えられる組換え節がシナプトネマ構造上に形成されている。これらのことから第一分裂の前期は減数分裂過程の中でも特に注目される時期となっている。

これまで減数分裂に関して様々な生物種と様々な手法を用いて非常に多くの研究が行われてきた。例えば、高等動植物では減数分裂細胞の形態学的な観察が容易であり、相同染色体の対合に関与すると考えられるシナプトネマ構造について多数の報告がなされてきた (Moses, 1968)。出芽酵母や分裂酵母は遺伝学的な解析が容易であるとともに人為的に減数分裂を誘導できることから、減数分裂の進行制御機構や相同遺伝子組換え機構が解析されてきた (Yamamoto, 1986; Roeder, 1990; Malone, 1990)。また、トウモロコシ、コムギ、ショウジョウバエなどでも多数の遺伝学的解析が行われている (Golubovskaya et al, 1989; Sears, 1976; Smith and King, 1968; Carpenter, 1988)。一方、ユリやマウスでは雄性の減数分裂細胞（小孢子母細胞、精母

細胞) の摘出が容易であり、それらを細胞周期のステージごとに分画することが可能なことから、相同遺伝子組換えに関与するタンパク質の生化学的な解析が行われてきた (Hotta et al., 1985; Higashitani et al., 1990a, 1990b)。近年では特に酵母を用いた分子遺伝学的な研究が盛んになり、減数分裂の進行制御機構や相同遺伝子組換え機構について解析が進んでいる (Yamamoto, 1996; Mitchell, 1994; Roeder, 1995, 1997; Haber, 1998)。これまでのところ減数分裂に関する分子レベルの知見は大部分が酵母から得られたものである。しかしながら、酵母の様な下等真核生物と高等動植物の間では減数分裂細胞を取り巻く環境や減数分裂前後の発生過程が全く異なっており、減数分裂の開始と進行の制御機構および減数分裂細胞の栄養動態などについては、各生物分類群において独特の様式を有していることが考えられる。従って、高等動植物の減数分裂についても分子レベルで詳細に研究される必要がある。

シロイヌナズナは古くから遺伝学的研究が行われ、近年では分子遺伝学、生理学、生化学、発生学においてモデル植物として広く研究に用いられている (Meyerowitz, 1989)。また、シロイヌナズナはゲノムの全塩基配列の解読が試みられ、モデル植物としての有用性が更に高められている (Meinke, 1998)。これまで高等植物の配偶子形成を理解するために、シロイヌナズナの雄性不稔変異体を用いていくつかの遺伝学的解析が行われてきた (Dawson et al., 1992; Chaudhury et al., 1994; Peirson et al., 1996; He et al., 1996; Ross et al., 1997)。近頃では、それらの研究から減数分裂異常を起こす原因の遺伝子が分子遺伝学的手法によって単離されている (Glover et al., 1998; He and Mascarenhas, 1998; Bhatt et al., 1999; Bai et al., 1999; Caryl et al., 2000)。また、酵母などから単離された既知の減数分裂関連遺伝子のシロイヌナズナにおける相同遺伝子も単離され、逆遺伝学的手法によって機能解析が行われている (Couteau et al., 1999; Yang et al., 1999; Hartung and Puchta, 2000)。これらのシロイヌナズナを用いた研究によって、高等植物の減数分裂過程は断片的ではあるが理解が進み始めている。

これまで我々の研究グループは高等植物における減数分裂あるいは小孢子形成の全体像を理解するため、小孢子母細胞において発現する遺伝子群の cDNA を単離することを試みてきた。Kobayashi ら (1994) はテッポウユリの小孢子母細胞から調製した cDNA ライブラリーを用い、サブトラクティブハイブリダイゼーション法によって減数分裂過程において発現誘導される 18 種類の *Lily messages Induced at Meiosis (LIM)* 遺伝子に対応する cDNA 群を単離している。また、Morohashi ら (2000) は Kobayashi らの cDNA ライブラリーを用いて大規模な塩基配列決定を行い、減数分裂あるいは小孢子形成に関与すると考えられる数多くの遺伝子を同定している。これまでに *LIM* 遺伝子のいくつかは詳細な機能解析が行われている。*LIM15* 遺伝子がコードするタンパク質は原核生物の遺伝子組換え酵素 *RecA* と類似しており、減数第一分裂前期の対合期においてシナプトネマ構造上の組換え節に局在する

ことから、相同塩基配列の検索と対合に関与することが考えられている (Terasawa et al., 1995; Anderson et al., 1997)。LIM9 遺伝子はセリンプロテアーゼをコードしており、小胞子が四分子から分離する過程で機能している可能性などが考えられている (Taylor et al., 1997)。その他にも新規タンパク質をコードする LIM5 と LIM13、グリシンリッチタンパク質をコードする LIM14、熱ショックタンパク質 70 をコードする LIM18 についてタンパク質レベルの発現様式や細胞内局在が解析されており、これらの機能が考察されている (Ogata et al., 1999; Mousavi et al., 1999; Minami et al., 2000)。

植物は光独立栄養生物であるが、正常な発生と生育のために糖とアミノ酸の取込みに依存する多くの従属栄養組織から構成されている (Thorne, 1985)。例えば、全ての細胞は分化の初期において一過的に従属栄養であるし、根、展開途中の葉、生殖器官、成熟過程の種子は従属栄養組織で構成されている。多くの従属栄養組織は無機窒素を利用することができないため、窒素同化の起こっている組織からアミノ酸を輸入することが必要である。植物個体において窒素の再配置は重要な事象であり、その過程においてアミノ酸トランスポーターは中心的な役割を果たしていると考えられている。高等植物では培養細胞あるいは原形質膜由来の小胞を用いたアミノ酸取込実験が行われており、基質特異性の異なる複数のアミノ酸トランスポーターが存在していることが示唆されていた (Harrington and Henke, 1981; Bernstein and Henke, 1982; Li and Bush, 1990; Li and Bush, 1991)。これらはプロトン共役シンポーターであり、P 型プロトンポンプによって作られるプロトン駆動力と結びついていることが考えられている (Serrano, 1989)。

近年になるとアミノ酸輸送能が欠損する酵母変異株を用いた発現スクリーニングが行われ、シロイヌナズナから基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターをコードする *AtAAP1/NAT2* 遺伝子の cDNA が単離されてきた (Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993)。現在では、種々の植物から推定のものを含めて数多くのアミノ酸トランスポーターおよびオーキシントランスポーターの cDNA が単離されている (Fischer et al., 1998)。これまでに同定されてきた大部分の植物のアミノ酸トランスポーターは真核生物に特異的な amino acid/auxin permease (AAP) ファミリーに属している (Young et al., 1999)。出芽酵母、線虫および大部分の原核生物においてアミノ酸の輸送は AAP ファミリーとは遠縁の amino acid-polyamine-choline facilitator (APC) ファミリーのトランスポーターが主に担っているのに対して、シロイヌナズナでは AAP ファミリーのトランスポーターが主要であると考えられている (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。AAP ファミリーのトランスポーターは大部分が 400 から 500 残基のアミノ酸で構成され、アミノ末端が細胞内に、カルボキシ

ル末端が細胞外に配した 11 回膜貫通型の膜タンパク質であると考えられている (Young et al., 1999)。また、AtAAP1/NAT2 については実験によって 11 回膜貫通型の膜タンパク質であることが示唆されている (Chang and Bush, 1997)。これまでに単離されてきたアミノ酸トランスポーターについて、いくつかは発現様式の解析などから発生および生育における役割が考察されてきたが、多くのものは詳細なことが不明のままである。

小孢子形成過程において、小孢子母細胞は維管束から葯隔、葯壁の各組織を通して糖およびアミノ酸の供給を受けることが推測されている。本研究を開始した当初、テッポウユリの小孢子母細胞で発現する *LIM8* 遺伝子は *AtAAP1/NAT2* 遺伝子などのアミノ酸トランスポーター遺伝子群と相同性を示すことが見いだされた。そこで、本研究では *LIM8* 遺伝子の小孢子形成過程における機能を明らかにすることを試み、一次構造の解析、発現様式の解析、細胞内局在の解析、出芽酵母を用いた生育相補試験、小孢子母細胞と葯におけるアミノ酸動態の調査を行った。また、シロイヌナズナより *LIM8* 相同遺伝子 (amino acid transporter-like protein 1: *AATLI*) を単離し、これについて一次構造の解析、発現様式の解析、遺伝子強制発現植物の解析を行った。

植物ではアグロバクテリウムを介した T-DNA 導入、エレクトロポレーション、パーティクルボンバードメント、マイクロインジェクションなどの様々な外来遺伝子導入法が確立され、種々の植物において形質転換体の作成が可能となった (Gasser and Fraley, 1989)。これによって分子遺伝学的に遺伝子機能が解析されるようになっただけでなく、農作物の分子育種が行われるようになった。現在ではトウモロコシ、大豆、綿花、ジャガイモなどの形質転換作物が商業的に栽培されており、この他の多くの形質転換作物についても圃場試験が行われている (Dunwell, 2000)。

形質転換植物において導入遺伝子を発現させるためには、様々な植物種で構成的に機能するカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターが広く利用されている。植物個体の特定の場所や時期において遺伝子を発現させたい場合には、目的にあった発現様式を示す遺伝子のプロモーターを利用する必要がある。例えば、葯のタペート組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用い、毒素をタペート組織で生産することによって、雄性不稔形質を獲得したタバコが作成されている (Kriete et al., 1996)。また、維管束の師部組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用い、レクチンを師部組織で生産することによって、吸汁害虫に対する抵抗性を獲得したイネが作成されている (Rao et al., 1998)。今後更に、導入遺伝子の発現様式を制御した形質転換作物を育種するため、様々な植物種から数多くのプロモーターが単離され、それらの知見が蓄積されることが望まれている。

これまでに様々な植物種において薬あるいは花粉粒で発現する遺伝子が同定され、それらのゲノミッククローンが単離されてきた。これらの大部分は、プロモーター領域に β -glucuronidase (*GUS*) のコード配列を連結した融合遺伝子が作成され、その発現様式が解析されている (Twell et al., 1990; Hamilton et al., 1992; Paul et al., 1992; John and Petersen, 1994; Treacy et al., 1997; Zabaleta et al., 1998)。更に、花粉粒で発現する遺伝子のプロモーターは、*GUS* あるいは luciferase (*LUC*) を用いて特異的発現に関与するシス領域が詳細に解析されてきた (Twell et al., 1991; Eyal et al., 1995; Bate and Twell, 1998; Hamilton et al., 1998; Zabaleta et al., 1998)。一方、小孢子母細胞で発現する遺伝子は方法的な難しさによってあまり多く同定されていないのが現状である。その中でシロイヌナズナの *AtDMC1* 遺伝子 (Klimyuk and Jones, 1997) とタバコの *CcaMK* 遺伝子 (Poovaiah et al., 1999) はゲノミッククローンが単離されており、これらのプロモーターと *GUS* の融合遺伝子について発現様式が解析されている。しかしながら、これらのプロモーターのシス領域については未だ報告がなされていない。

私が所属するグループは、基礎研究および分子育種への利用を目的として、テッポウユリの小孢子母細胞で発現する *LIM* 遺伝子群についてプロモーター領域の単離を試みている。テッポウユリはゲノムサイズがシロイヌナズナの約 800 倍であり、従って、そのゲノム断片をハイブリダイゼーションスクリーニングによって単離することは現実的ではない。そこで、これまでにインバース PCR 法 (Ochman et al., 1988) やベクトレット法 (Isegawa et al., 1992) を用いて *LIM10*、*LIM12*、*LIM15*、*LIM18* のプロモーター領域が単離されている (Minami et al., 未発表)。

LIM8 と *LIM10*、*LIM12*、*LIM15*、*LIM18* の間では小孢子形成過程における mRNA の蓄積量および変動様式が異なっている (Kobayashi et al., 1994)。そこで、本研究では *LIM8* 遺伝子の 5' 上流領域を単離し、これについてプロモーター活性の検出、定量的なプロモーター活性の測定を行った。また、本研究では *LIM8* の相同遺伝子としてシロイヌナズナから *AATL1* 遺伝子のゲノミッククローンを単離した。そこで、*AATL1* 遺伝子の 5' 上流領域と *GUS* の融合遺伝子について組織化学的に発現様式を解析した。

第一章 テッポウユリの小孢子母細胞で発現する *LIM8* 遺伝子

序文

ユリ科植物の小孢子母細胞は、1) 葯が大きい比較的大量に存在し、2) 同調的に発生が進み、3) 減数分裂期が約一週間と長いことが特徴である (Erickson, 1948; Taylor and McMaster, 1954)。更に、ユリでは蕾の大きさと小孢子母細胞における減数分裂ステージが厳密に対応している。これらのことからユリ的小孢子母細胞は、1) 容易にかつ大量に調製でき、2) 減数分裂のステージごとに分画でき、3) 生化学的および分子生物学的な実験を始め、様々な目的に適している。これまでにユリの特徴を活用して減数第一分裂前期の小孢子母細胞に由来する cDNA ライブラリーが作成され、サブトラクティブハイブリダイゼーション法によって、減数分裂過程において発現誘導される 18 種類の Lily messages Induced at Meiosis (*LIM*) 遺伝子に対応する cDNA 群が単離されている (Kobayashi et al., 1994)。

第一章では初めに、*LIM* 遺伝子の一つである *LIM8* 遺伝子について相同性検索を行った。その結果、*LIM8* 遺伝子は高等植物のアミノ酸トランスポーター遺伝子群と相同性を示すことが見いだされた。そこで、*LIM8* 遺伝子の小孢子形成過程における機能を明らかにすることを試み、一次構造の解析、発現様式の解析、細胞内局在の解析、出芽酵母を用いた生育相補試験、小孢子母細胞と葯におけるアミノ酸動態の調査を行った。また、*LIM8* 遺伝子の特異的な発現制御機構を明らかにすることを試み、*LIM8* 遺伝子の 5' 上流領域を単離し、これについてプロモーター活性の検出、定量的なプロモーター活性の測定を行った。

材料と方法

配列情報の解析

相同性検索は日本 DNA データバンク (DDBJ)、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および European Molecular Biology Laboratory (EMBL) のデータベースにおいて BLAST プログラム (Altschul et al., 1990) を用いて行った。アミノ酸配列のアライメントは CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) プログラムを用いて行った。分子系統樹の描画は TreeView プログラム (Page, 1996) を用いて行った。疎水性プロットの描画と膜貫通性部位の予測は、Kyte と Doolittle (1982) あるいは

Engelman (1986) の方法に従って TopPred II (Claros and Heijne, 1994) プログラムを用いて行った。シスエレメントの検索は農業生物資源研究所の PLACE データベース (Higo et al., 1999) において Signal Scan プログラムを用いて行った。

植物材料

温室で栽培したテッポウユリ (*Lilium longiflorum* cv. Hinomoto) の蕾を 1 mm 毎の長さによって分別した。それぞれのグループについて蕾から小孢子母細胞を摘出し、顕微鏡観察によって減数分裂および花粉成熟のステージを決定した。蕾を半分の位置で輪切りにすると葯の上端が切開されるので、この蕾を押しつぶすことによって小孢子母細胞を摘出した。

出芽酵母の生育相補試験

plim8 (Kobayashi et al., 1994) の *ApaI* サイトを切断、平滑化した後に *EcoRI* サイトで切断し、1.7 kbp の *LIM8* cDNA を切り出した。これを酵母用の発現ベクター pYES2 (Invitrogen) の *EcoRI-XbaI* (平滑化) サイトへ挿入し、pYES2-LIM8 ベクターを作成した。*AtAAP2* cDNA を単離するため、シロイヌナズナの花芽から調製した cDNA ライブラリーを鋳型として、AAP2F1 プライマー (GCGGTACCAAGAGGAGATGGGTGAAA) と AAP2R1 プライマー (GCGAATTCGTTCATGGTCCATAATCATC) のセットを用いて PCR を行った。PCR は TaKaRa LA Taq (Takara) を用いて以下の条件で行った。反応液を 94 °C で 1 分間置き、その後に、98 °C で 20 秒間、58 °C で 30 秒間、68 °C で 2 分間の反応を 30 サイクル行った。この 1.6 kbp の増幅産物をプライマー配列中の *KpnI* サイトおよび *EcoRI* サイトで切断し、pYES2 の *KpnI-EcoRI* サイトへ挿入することによって pYES2-AAP2 ベクターを作成した。pYES2-LIM8、pYES2-AAP2 および pYES2 を用いて出芽酵母の KY11 株 (JT16 株: *MAT-a hip1-614 his4-401 ura3-52 inol can1*: Tanaka and Fink, 1985) を形質転換した。pYES2 由来のベクターを含んだ Ura⁺ 形質転換体を S1 寒天培地 (2 % グルコース、0.67 % yeast nitrogen base (Difco)、0.002 % イノシン、0.1 % アルギニン、3.9 mM ヒスチジン: Hsu et al., 1993) によって選抜した。これらの形質転換株と KY11 株を HLM 培地 (4 % ガラクトース、0.67 % yeast nitrogen base、0.002 % イノシン、0.1 % アルギニン、130 μM ヒスチジン: Hsu et al., 1993) および HFM 培地 (2 % グルコース、0.67 % yeast nitrogen base、0.002 % イノシン、0.1 % アルギニン: Hsu et al., 1993) に移し、生育を観察した。

LIM8 mRNA 発現様式の RT-PCR 解析

RNA PCR kit (AMV) ver. 2.1 (Takara) を用いて RT-PCR を行った。RNeasy plant mini

kit (Qiagen) を用いて total RNA を調製し、これを逆転写反応の鋳型とした。LIM8RT1 プライマー (AATGCAATTGGGATCATCGC) と LIM8RT2 プライマー (GCTTATA-TTCACACCAGTCTCGACC) のセットおよび LiEF1-1 (GAGGCAGACTGTTGCTG-TCGG) と LiEF1-2 (AGCAGACTGAAATGAAGATGC) のセットを用い、以下の条件で PCR を行った。反応液を 94 °C で 1 分間置き、その後、94 °C で 30 秒間、57 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間の反応を 25 サイクル行った。増幅産物は 1 % アガロースゲルによる電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで染色した。

抗 LIM8 タンパク質抗体の作成

plim8 の *Apa*I サイトを切断、平滑化した後に *Bam*HI サイトで切断し、1.7 kbp の LIM8 cDNA を切り出した。これをヒスチジン 6 量体タグ融合タンパク質発現ベクター pQE-30 (Qiagen) の *Bam*HI-*Sma*I サイトへ挿入し、pQE-LIM8 ベクターを作成した。更に、このベクターの *Kpn*I サイトと *Hind*III サイトを切断することによって LIM8 タンパク質の 219 残基から 508 残基までの配列を削除し、その後、平滑末端化および自己環状化して pQE-LIM8d1 ベクターを作成した。pQE-LIM8d1 で大腸菌 SG13009 株を形質転換し、LIM8 由来の 27 kDa の組換えタンパク質を生産した。27 kDa の組換えタンパク質は変性条件下で Ni-NTA 親和性クロマトグラフィーによって部分精製し、SDS-PAGE によって分離した後、model 422 electro-eluter (Bio-Rad) を用いて分取した。分取したタンパク質が組み換えタンパク質であることは、ヒスチジン 6 量体タグを認識する抗 RGS (H)₄ 抗体を用いたウエスタンブロット解析によって確認した。この組換えタンパク質で免疫されたウサギの血清を抗 LIM8 抗血清とし、これをプロテイン A 親和性クロマトグラフィーすることによって抗 LIM8 抗体を得た。

LIM8 タンパク質のウエスタンブロット解析

発現様式を調査するために、植物材料を等量の 2 X 試料緩衝液 (1 X: 12 mM トリス-塩酸 (pH 6.8)、5 % グリセロール、0.4 % SDS、1.6 M 尿素、0.1 M DTT、0.02 % BPB) 中で磨碎し、5 分間煮沸した後、4 °C、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した上清をタンパク質試料として用いた。細胞分画は Wang ら (1993) の方法に従って行った。小孢子母細胞を等量の緩衝液 A (50 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、1 mM EDTA、10 mM 塩化カリウム、2 mM DTT、0.5 mM PMSF、0.5 M ショ糖) 中で磨碎したものを全抽出物とした。更に、全抽出物は 4 °C、6,000 g で 20 分間遠心分離した後、その上清を 4 °C、110,000 g で 1 時間遠心分離し、この上清を可溶性画分、沈殿をミクロソーム画分とした。可溶性画分は等量のアセトンを加えてタンパク質を析出させ、4 °C、14,000 g、10 分間の遠心分離によって沈殿を得た。可溶性画分とミクロソ-

ム画分は等量の緩衝液 B (緩衝液 A からショ糖を除いたもの) に懸濁し、5 X 試料緩衝液を加えて 5 分間煮沸した後、4 °C、15,000 rpm、5 分間の遠心分離を行い、これによって得られた上清をタンパク質試料とした。ウエスタンブロットは Immuno-Lite II Chemiluminescent Protein Detection System (Bio-Rad) の付属の説明書に従って行った。タンパク質は SDS-urea PAGE (Bollag and Edelstein, 1991) によって分離した後、Hybond-PVDF (Amersham) メンブレンに転写した。メンブレン上のタンパク質は抗 LIM8 抗体で一次標識し、アルカリフォスファターゼを結合した抗ウサギ IgG 抗体で二次標識した。二次標識由来の化学発光は X 線フィルム New RX (Fuji) を用いて検出した。

LIM8 タンパク質の組織免疫染色

薬を 4 % パラホルムアルデヒドを含んだ PBS (pH 7.4) 中で固定し、エタノールシリーズで脱水した後、Technovit 7100 樹脂 (Kulzer) に包埋した。ミクロトームを用いて 1 μ m の厚さの切片を作成し、これを 0.1 % ポリ-L-リジンでスライドグラスに張り付けた。この切片をブロッキング液 (3 % BSA、0.1 % アジ化ナトリウムを含んだ PBS) で 1 時間処理した後、ブロッキング液で 100 倍希釈した抗 LIM8 抗血清によって 4 °C で一晩処理した。更に、この切片を PBS で洗浄した後、PBS で 40 倍希釈した FITC 結合抗ウサギ IgG 抗体および DAPI によって 37 °C で一時間処理した。顕微鏡観察による透過光像および蛍光像は ASA400 フィルム (Fuji) を用いて写真撮影した。

小胞子母細胞および薬における遊離アミノ酸含量の分析

薬あるいは小胞子母細胞を 20 mM 塩酸中で磨砕した後、4 °C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離した。この上清を口径 0.45 μ m のフィルターで濾過することによって分析試料とした。アミノ酸混合標準液 H 型 (Wako) にアスパラギン、グルタミン、トリプトファンを加え、それぞれ 0.1 mM のアミノ酸混合標準液を調製した。分析試料中に含まれる遊離アミノ酸あるいは混合標準液中のアミノ酸を蛍光誘導体化試薬 AccQ-Fluor (Waters) によってラベルした。HPLC は AccQ-Tag アミノ酸分析システム (717+ オートサンプラー、626 LC システム、AccQ-Tag アミノ酸分析カラム、474 蛍光検出器、Millennium クロマトグラフィーマネージャプログラム: Waters) を用いて行った。蛍光誘導体化アミノ酸の分離は 39 °C で行った。溶離液 A (蒸留水 1 L に酢酸ナトリウム三水和物 19 g、トリエチルアミン 700mg、EDTA 1 mg を加え、リン酸によって pH 5.8 に調節したもの)、溶離液 B (アセトニトリル)、溶離液 C (Milli-Q 水) を用い、以下の条件で分離を行った。0 から 1 分は 100 % 溶離液 A (同組成)、1 - 16 分は 99 % - 97 % 溶離液 A と 1 % - 3 % 溶離液 B (直線勾配)、

16 - 25 分は 97 % - 94 % 溶離液 A と 3 % - 6 % 溶離液 B (直線勾配)、25 - 35 分は 94 % - 91 % 溶離液 A と 6 % - 9 % 溶離液 B (直線勾配)、35 - 43 分は 91 % - 86 % 溶離液 A と 9 % - 14 % 溶離液 B (直線勾配)、43 - 50 分は 86 % - 82 % 溶離液 A と 14 % - 18 % 溶離液 B (直線勾配)、50 - 51 分は 82 % 溶離液 A と 18 % 溶離液 B (同組成)、51 - 54 分は 60 % 溶離液 B と 40 % 溶離液 C (同組成)、54 - 65 分は 100 % 溶離液 A (同組成)。1 mL / 分の流速で分離を行った。

LIM8 遺伝子 5' 上流配列の単離

ゲノミック DNA から LIM8 遺伝子 5' 上流配列を増幅するためにインバース PCR (Ochman et al., 1988) を行った。CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) によって小孢子母細胞からゲノミック DNA を抽出した。ゲノミック DNA を制限酵素で切断し、自己環状化したものを PCR の鋳型として用いた。PCR は TaKaRa LA Taq (Takara) を用いて行った。LIM8F1 プライマー (ATTGTGAGCATGAGAGGCTATCTGG) と LIM8R1 プライマー (AGTGGTGATCGGGTTAGGGATG) のセットを用いて、以下の条件で PCR を行った。反応液を 94 °C で 1 分間置き、その後に、98 °C で 20 秒間、64 °C で 30 秒間、68 °C で 2 分間の反応を 30 サイクル行った。更に、その増幅産物を鋳型にして、LIM8F2 プライマー (CCATACTCTCAGTTCTGGCATTG) と LIM8R2 プライマー (GTCACCGGCATGGACTGT) のセットを用いて、以下の条件で PCR を行った。反応液を (Novagen) へ挿入した。DNA 塩基配列決定は DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を用いてダイプライマー法によって行った。インバース PCR によって得られた配列定法をもとに LIM8F3 プライマー (CGCTTACTAGGAGACAACCTAGCA)、LIM8F4 プライマー (GGCATGTGATTCTTTGCTATT)、LIM8F5 プライマー (CCCAAAGTACCTAGGACTTA)、LIM8F6 プライマー (GGTAAGAGTGCCATTGTTGG)、LIM8F7 プライマー (AAGCTTAGAATGACCCACCACT) を設計した。これらのプライマーと LIM8R2 プライマーを用い、制限酵素処理を施していないゲノミック DNA を鋳型にして、以下の条件で PCR を行った。反応液を 94 °C で 1 分間置き、その後に、98 °C で 20 秒間、58 °C で 30 秒間、68 °C で 1 分間の反応を 30 サイクル行った。これらの増幅産物 (0.6 kbp と 0.4 kbp) を pT7Blue T-vector へ挿入した後、塩基配列決定を行った。

GUS 遺伝子を用いたプロモーター活性の検出

LIM8 遺伝子の 5' 上流配列と部分コード配列を含んだ、0.6 kbp の PCR 増幅断片を *Pst*I および *Bam*HI によって pT7Blue T-vector から切り出した。この断片を pBI221 ベクター (Clontech) の *Pst*I-*Bam*HI サイトへ挿入することによって、pLIM8(600)-GUS ベクターを作成した。0.5 µg の pLIM8(600)-GUS を 0.5 mg の金

粒子 (直径 1.6 μm) に吸着させた。これを PDS-1000/He particle delivery system (Bio-Rad) を用いてパーティクルボンバードメント法によって改変 White 寒天培地 (Ito and Stern, 1967) 上の小胞子母細胞へ導入した。遺伝子導入後、小胞子母細胞を改変 White 液体培地で埋没させて暗所で 24 時間培養した。Martin ら (1992) の方法に従って遺伝子導入した細胞を 2 日間 X-gluc 染色した。微分干渉像を C-CU ユニバーサルシステムコンデンサと COOLPIX 990 デジタルカメラを装着した ECLIPSE E800M 顕微鏡 (Nikon) を用いて撮影した。

ルシフェラーゼ遺伝子を用いたプロモーター活性の測定

pBI221-luc+ ベクター (Matsuo et al., in press) を *Hind*III および *Nco*I で切断することによってカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを削除し、その後に平滑化した。この断片へ、*Pst*I および *Bam*HI によって pT7Blue T-vector から切り出して平滑化した *LIM8* 遺伝子 5' 上流配列と部分コード配列を含んだ 0.6 kbp の断片を挿入することによって pLIM8(600)-luc+ ベクターを作成した。pBI221-luc+ ベクターを *Hind*III で切断することによって 35S プロモーターを削除し、自己環状化することによって pless-luc+ ベクターを作成した。0.5 μg の pLIM8(600)-luc+、pBI221-luc+ あるいは pBI221-luc+ を 0.5 μg の pBI221-Rluc (Matsuo et al., in press) と共に 0.5 mg の金粒子 (直径 1.6 μm) に吸着させた。これを PDS-1000/He particle delivery system (Bio-Rad) を用いてパーティクルボンバードメント法によってテッポウユリへ導入した。1 cm^2 の葉片と葯はプラスチックシャーレに、小胞子母細胞は改変 White 寒天培地に置いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、葉片と葯は湿らせたキムワイプで包み、小胞子母細胞は改変 White 液体培地で埋没させ、暗所で 24 時間培養した。pLIM8(600)-luc+、pBI221-luc+ および pless-luc+ に由来するホタルルシフェラーゼ (F-luc) の活性、および pBI221-Rluc に由来するウミシイタケルシフェラーゼ (R-luc) の活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

結果

LIM8 遺伝子の配列解析

LIM8 cDNA は 513 アミノ酸残基のタンパク質をコードする ORF を有している (図 1)。LIM8 タンパク質について予測アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、LIM8 はシロイヌナズナから単離された基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーター (AtAAP1 から AtAAP5) および *Nicotiana sylvestris* から単離された推定ア

ミノ酸トランスポーター (NsAAP1) と相同性を示すことが見いだされた (図 2)。

Kyte と Doolittle の方法に従って疎水性プロットを作成したところ、LIM8、AtAAP2、NsAAP1 は互いによく類似していることが示された (図 3A)。Kyte と Doolittle の方法では、LIM8 から 10 個の予測膜貫通性部位が検出され、AtAAP2 と NsAAP1 から 11 個の予測膜貫通性部位が検出された (図 3B)。また、Engelman らの方法に従って疎水性プロットを作成したところ、LIM8 も 11 個の予測膜貫通性部位が検出された (データ省略)。

LIM8 タンパク質と高等植物のアミノ酸トランスポーター群は膜貫通性領域において高い相同性が示すが、アミノ末端から一番目の予測膜貫通性部位までの配列と長さは著しく異なることが見いだされた (図 3B)。LIM8 タンパク質のアミノ末端領域の配列に注目したところ、セリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んでいることが見いだされた (図 1)。

LIM8 タンパク質の機能検討

LIM8 タンパク質がアミノ酸トランスポーターとして機能するかどうかを検討するため、ヒスチジンの輸送系と合成系に欠損がある酵母変異株 (KY11) を用いた生育相補試験を行った (図 4)。酵母用発現ベクターの pYES2 へ LIM8 cDNA あるいはシロイヌナズナの中性/酸性アミノ酸トランスポーターをコードする AtAAP2 cDNA を挿入して、pYES2-LIM8 および pYES2-AtAAP2 を構築した。pYES2 ベクター、pYES2-LIM8 ベクターあるいは pYES2-AtAAP2 ベクターで形質転換した KY11 株は、いずれもヒスチジン 3.9 mM 添加培地において生育が観察された。ヒスチジン 130 μ M 添加培地においては、pYES2-LIM8 形質転換体が生育できなかったのに対して、対照の pYES2-AtAAP2 形質転換体は生育が観察された。ヒスチジン無添加培地においてはいずれの形質転換体も生育が見られなかった。

LIM8 mRNA の蓄積様式

LIM8 mRNA の発現様式を RT-PCR によって解析した (図 5)。その結果、LIM8 mRNA は葯および葯より摘出した小孢子母細胞と花粉粒において蓄積していたが、栄養器官では蓄積していなかった。また、LIM8 mRNA は小孢子母細胞において減数第一分裂前期の対合期から四分子期までの間で徐々に蓄積量が増加していたが、一核性花粉粒で著しく蓄積量が減少していた。対照の LIM15 mRNA は小孢子母細胞において減数第一分裂前期の細糸期で最も多く蓄積していたが、減数第一分裂前期の複糸期までにほとんど蓄積が見られなくなった。また、LIM8 mRNA および LIM15 mRNA は葯よりも小孢子母細胞において強いシグナルが観察された。

LIM8 タンパク質の蓄積様式

LIM8 タンパク質の発現様式を免疫学的に解析するため、まず、LIM8 タンパク質を特異的に認識する抗体を作成した (材料と方法を参照)。大腸菌において、完全長の組換え LIM8 タンパク質を生産できなかったため、LIM8 タンパク質のアミノ末端から 4 番目の予測膜貫通性部位までの組換えタンパク質 (27 kDa) を生産し、これを抗原に用いて抗 LIM8 抗体を作成した。

抗 LIM8 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った (図 6A)。その結果、LIM8 タンパク質は小孢子母細胞と花粉粒において蓄積していたが、栄養器官では蓄積していなかった。また、LIM8 タンパク質の蓄積量は減数第一分裂前期で低く抑えられていたが、減数第二分裂期において著しく上昇し、四分子期には減少していた。

LIM8 タンパク質の細胞内局在

小孢子母細胞を細胞分画して抗 LIM8 タンパク質抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、LIM8 タンパク質に由来するシグナルはミクロソーム画分から検出されたが、可溶性画分からはほとんど検出されなかった (図 6B)。

葯の組織切片を作成し、抗 LIM8 タンパク質抗血清を用いて免疫染色を行った (図 7)。その結果、減数第一分裂前期の対合期から四分子期までの小孢子母細胞において原形質膜および細胞壁の存在する場所から LIM8 タンパク質に由来するシグナルが検出された。一方、いずれの時期のタペート細胞においても原形質膜および細胞壁の存在する場所から LIM8 タンパク質由来のシグナルは観察されなかった。

小孢子形成過程における遊離アミノ酸の動態

タンパク質合成に用いられる 20 種類の遊離アミノ酸について、小孢子形成過程における動態調査を行った (図 8)。その結果、減数分裂の開始時において小孢子母細胞よりも小孢子母細胞を含む葯で遊離アミノ酸の含量 (20 種類の合計量) が 2 倍程度高いことが観察された (図 8A)。そして、小孢子母細胞および葯の遊離アミノ酸含量は減数第一分裂前期の間に大きく減少し、小孢子形成完了後の一核性花粉期には同レベルになることが観察された。

更に、小孢子形成過程における遊離アミノ酸組成の変動を調査した。その結果、小孢子母細胞および葯ともに減数第二分裂付近から四分子期の間で分枝側鎖アミノ酸であるバリン、ロイシンの組成比が著しく上昇していることが観察された (図 8B、C)。同時期において、他の分枝側鎖アミノ酸であるイソロイシンの組成比はわずかに上昇することが観察された。

LIM8 遺伝子 5' 上流配列の単離

LIM8 遺伝子の 5' 上流配列をインバース PCR 法によって単離することを試みた (図 9)。制限酵素 *HaeII* で処理したテッポウユリのゲノミック DNA を自己環状化して鋳型を作成し、これと *LIM8* cDNA から設計したプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、1.1 kbp の増幅産物が得られた。この増幅産物について塩基配列決定を行い、新規配列として見いだされた領域から 5 種類のプライマーを設計した。これらのプライマーと *LIM8* cDNA から設計したプライマーのセットを用い、制限酵素処理を施していないゲノミック DNA を鋳型として 5 組の PCR を行ったところ、0.6 kbp と 0.4 kbp の増幅産物のみが得られた。0.6 kbp と 0.4 kbp の増幅産物について塩基配列決定を行ったところ、これらは *LIM8* cDNA の 5' 末端配列と新規配列を含んでおり、この新規配列を *LIM8* 遺伝子の 5' 上流領域とした。

***LIM8* 遺伝子の 5' 上流領域の配列解析**

LIM8 遺伝子の 5' 上流領域について配列の解析を行った (図 10)。*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域において、*LIM8* cDNA の 5' 末端と一致する場所を転写開始点 (+1) とした。-38 の位置に TATA ボックスが、-224 および -246 の位置に CAAT ボックスが見いだされた。また、-121、-133 および -452 の位置に ASF-1 結合モチーフ (TGACG) が、-453 の位置に C ボックス (GACGTC) が見いだされた。更に、*LIM8* 遺伝子 5' 上流配列と既に単離されている他の *LIM* 遺伝子 5' 上流配列の間で配列比較を行ったところ、3 種類の共通あるいは類似する配列が見いだされた。-59 の位置に *LIM10* および *LIM12* で繰り返し存在する配列 (CTTCCC/ATCC) が、-135 の位置に *LIM15* で存在する配列 (CAGTTCCGT) が、-289 の位置に *LIM12* で存在する配列 (CTTTCCCC) が見られた。これらの共通/類似配列にはいずれも TTCC 配列が含まれている。

***LIM8* 遺伝子 5' 上流領域のプロモーター活性**

LIM8 遺伝子 5' 上流領域と *GUS* 遺伝子の融合遺伝子 (*LIM8::GUS*) をパーティクルボンバードメント法によってテッポウユリの小胞子母細胞へ導入し、X-gluc 染色を行った (図 11B)。その結果、融合遺伝子をコーティングした金粒子が導入されている細胞において *GUS* の発現が観察された。一方、金粒子が導入されていない細胞においては *GUS* の発現は観察されなかった。

LIM8 遺伝子 5' 上流領域とホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子 (*F-luc*) の融合遺伝子 (*LIM8::F-luc*)、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと *F-luc* の融合遺伝子 (35S::*F-luc*) およびプロモーターを連結していない *F-luc* 遺伝子を 35S プロモーターとウミシイタケ由来ルシフェラーゼ遺伝子 (*R-luc*) の融合遺伝子 (35S::*R-luc*) と同時にテッポウユリの種々の部位へ導入し、それぞれの相対活性 (*F-luc* 活性

R-luc 活性) を測定した (図 11C)。その結果、小胞子母細胞において *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域を用いた場合は、35S プロモーターを用いた場合の 14.04 % の活性が見られ、プロモーターを連結していない場合の 470 倍の活性が見られた。一方、葉において *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域を用いた場合は、35S プロモーターを用いた場合の 0.38 % の活性が見られ、プロモーターを連結していない場合の 13 倍の活性が見られた。従って、*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域は小胞子母細胞において葉におけるよりも約 40 倍高いプロモーター活性を有することが示された。

AGCCAGCCACCAAGCAATGGAAGTACAGTCCATGCCGGTGACCCCGAGGTCTGGAACCCC	60
M E V Q S M P V T P R S G T P	(15)
GAGGGTCACCCCGCCCATCTCTGCACCGCCCTCGCAGCTCCACTCGCCATCCCTAACCCG	120
R V T P P I S A P P S Q L H S P S L T R	(35)
ATCACCACCTCCTCGGGCCAGCAACCCCGAGGGCGTCGCGCTGACACCGCTGGCGAGCCC	180
S P L L G P A T P R A S R L T P L A S P	(55)
GATAAGGAAGGCTATTGTGAGCATGAGAGGCTATCTGGAAGAGGTGGGGCATGTTACCCG	240
I R K A I V S M R G Y L E E V G H V T R	(75)
GCTCGACCCACAGGACGAGTGGCTGCCGATCACGCAGTCGAGGAACGGCAACTCCTACTA	300
L D P Q D E W L P I T Q S R N G N S Y Y	(95)
CTCGGCGTTCCATACTCTCAGTTCTGGCATTGGGTTCAGGCGCTGGTGGTTCCGGTAGC	360
S A F H T L S S G I G F Q A L V V P V A	(115)
CTTCACGTTTCTTGGATGGCTTTGGGGAATTGTATTATTATCTGTGGGCTTCTGCTGGCA	420
F T F L G W L W G I V L L S V G F C W Q	(135)
TM 1	
ACTCTACACTCTCTGGCTACTCGTCAACTCCACGAATCAGTCCCTGGCACACGATACAG	480
L Y T L W L L V E L H E S V P G T R Y S	(155)
CAGATACTTACATCTCGCCAAGGACACTTTTCGGTGAAAAGCTAGGAAAATTCATGGCCCT	540
R Y L H L A K D T F G E K L G K F M A L	(175)
GGTGGCCATTATCTACCTCTCCGCCGGCACATGCTCCGCCCTCATCATTTGTCGGGGGCTC	600
V P I I Y L S A G T C S A L I I V G G S	(195)
TM 2	
GACCATGAAAGGCTTCTTCCAGATCGTATGTGGTCCAAACATGTCGCTATATGCCCCCTGAC	660
T M K G F F Q I V C G P T C R Y M P L T	(215)
AACCGTAGAGTGGTACCTGGTGTTCGTCTGCCCTTGGCGTAGTCCTCGCTCAGCTACCTCA	720
T V E W Y L V F V C L A V V L A Q L P H	(235)
TM 3	
CCTCAACTCAATCGCTGGTGTCTCGCTCATCGGGGCGGTCACCGCCGTCACCTACTGTAC	780
L N S I A G V S L I G A V T A V T Y C T	(255)
TM 4	
CATGATATGGGTTATATCGGTCAGAAAGGGAAAGATACCAAACATCTCTATGAGGCTGT	840
M I W V I S V R K G K I P N I S Y E A V	(275)
TGACACAAGCTGGGATGTCGCTCGAGTACTCAGCATCCTCAATGCAATTGGGATCATCGC	900
D T S W D V A R V L S I L N A I G I I A	(295)
TM 5	
TTTTGCTTTTCAGGGGGCATAACCTTGTCTTAGAGATCCAGGGCACCATGCCATCGACTCA	960
F A F R G H N L V L E I Q G T M P S T Q	(315)
GAAACATCCAGCCCGTGTACCAATGTGGCGAGGAGTGAAGGTGCGCTACGTGCTCATCGC	1020
K H P A R V P M W R G V K V A Y V L I A	(335)
CTTCTGCTTGTTCCTGTGCGCACTCATTGGCTTCTGGTCTACGGAATCAGATACCTCC	1080
F C L F P V A L I G F W S Y G N Q I P P	(355)
TM 6	
CAACGGGGTCTCACC CGCTAAACCAATTTTCACAGCCACGACACCTCCAGGACGATACT	1140
N G V L T A L N Q F H S H D T S R T I L	(375)
TGGACTAACGACTTTACTCGTTGTTCATCAACTGCCTCAGCTCGTTCCAGATCTATGCAAT	1200
G L T T L L V I N C L S S F Q I Y A M	(395)
TM 7	
GCCGATCTTTTGACAACATGGAAGCTGGATACACTAGCAAGAAGAACAAGCCATGCCCCCA	1260
P I F D N M E A G Y T S K K N K P C P Q	(415)
GTGGCTTCGATCGGGGTTTCAAGGCGTTCCTCGGAGCAGTCGCTTCTCATATCTTTCAGC	1320
W L R S G F R A F F G A V A F L I S S A	(435)
TM 8	
TTTCCCATTTCTTCCGCAACTTGCAGGCCTCATCGGGGCGTTCGCTTTGCGCGGTGACTTT	1380
F P F L P Q L A G L I G A V A L P V T F	(455)
TM 9	
TGCTTACCCTTGCTTTATGTGGATTGTGATCAAGAAGCCAGAGAGGTTTGGTGTGATGTG	1440
A Y P C F M W I V I K K P E R F G V M W	(475)
GTGGTTGAAGTGGTGTGGGGTGTCTAGGGATGGGGCTTAGTGTGTGTTGGTTGTGGC	1500
W L N W C L G C L G M G L S V V L V A	(495)
TM 10	
AGGGGTATGGAGGCTGGTTCGAGACTGGTGTGAATATAAGCTTCTTCGATCCTCAGTGAAA	1560
G V W R L V E T G V N I S F F D P Q *	(513)
AAGAAACACATGTACAAGTAGCAATATTTGTTTAAATTAATTTCTAGTATTGCCAAAAA	1620
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1647

図 1 LIM8 cDNA の塩基配列とその予測アミノ酸配列

plim8 クローン (Kobayashi et al., 1994) に含まれる LIM8 cDNA の塩基配列 (上段) とその予測アミノ酸配列 (下段) を示した。終止コドンの下にアスタリスクを記した。1 から 60 残基までのセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基を白抜き文字で示した。予測膜貫通性領域 (TM 1 から TM 10) を下線で示した。

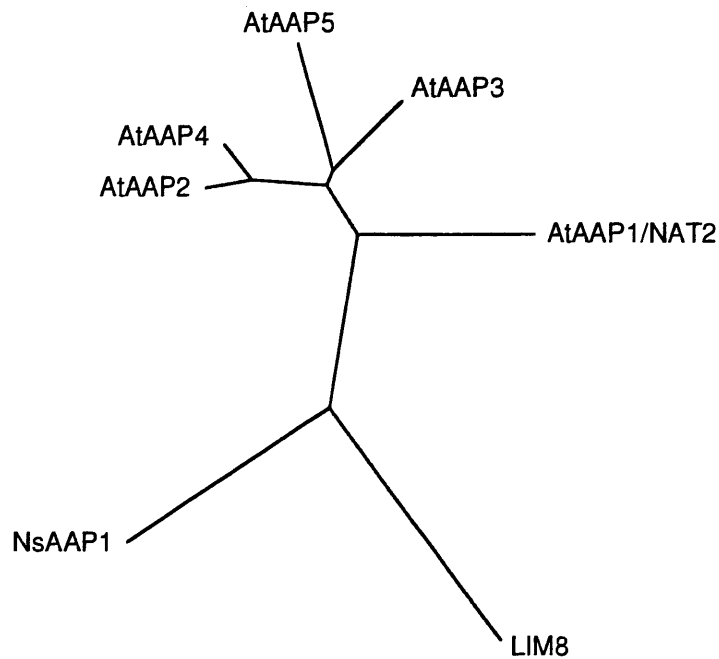


図 2 LIM8 タンパク質とその関連タンパク質群との分子系統解析

LIM8 タンパク質とその関連タンパク質群との間で予測アミノ酸配列のマルチプルアライメントを行い、分子系統樹を作成した。枝の長さは系統的な距離と比例している。AtAAP1/NAT2 (Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993)、AtAAP2 (Kwart et al., 1993)、AtAAP3 (Fischer et al., 1995)、AtAAP4 (Fischer et al., 1995)、AtAAP5 (Fischer et al., 1995) はシロイヌナズナから単離された基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターである。NsAAP1 (Lalanne et al., 1995) は *Nicotiana sylvestris* から単離された推定アミノ酸トランスポーターである。

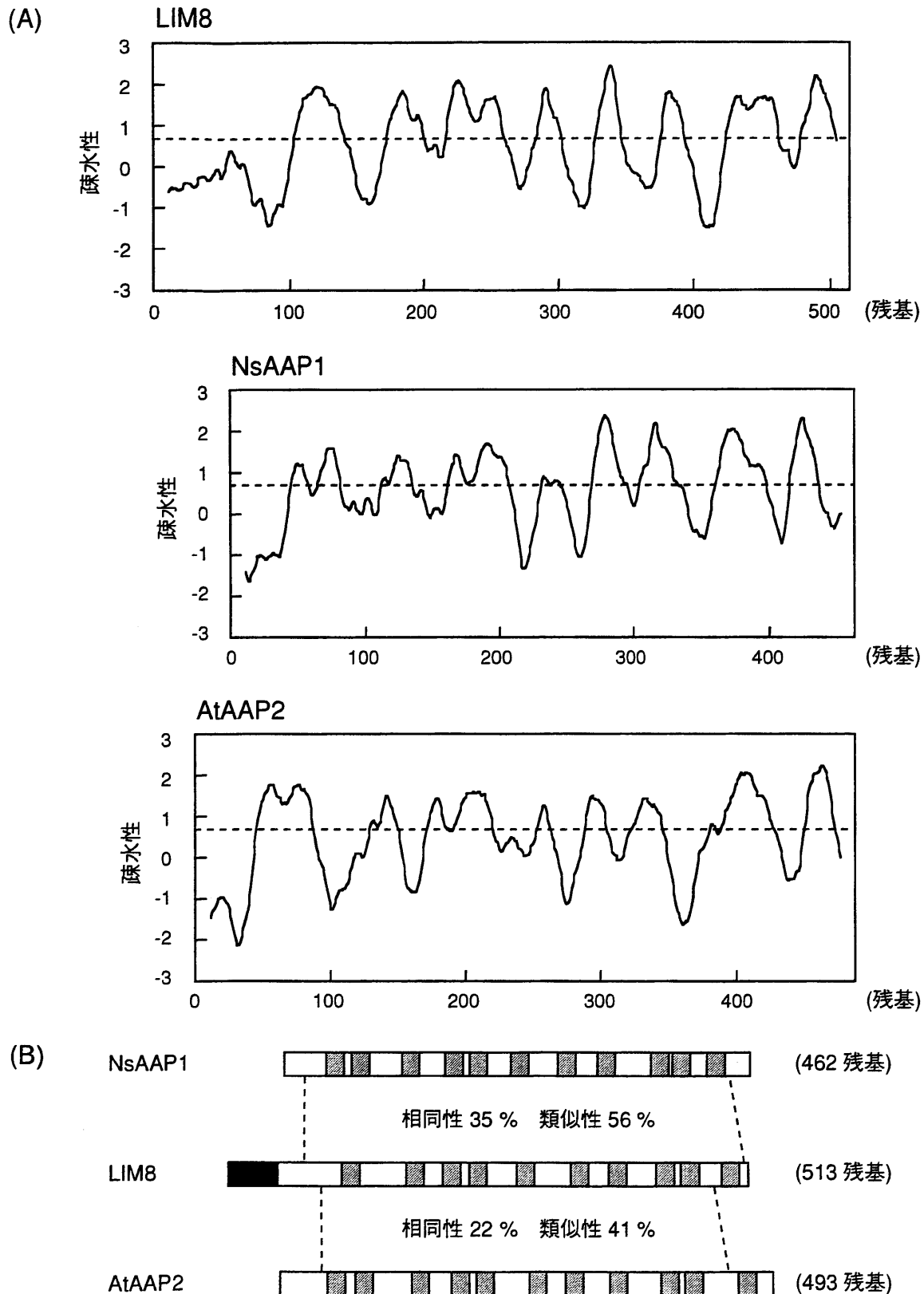


図 3 LIM8 タンパク質と高等植物アミノ酸トランスポーター群との一次構造比較
 (A) Kyte と Doolittle (1982) の方法に従って疎水性プロットを作成した。0.7 (破線) 以上の疎水性を示すところが予測膜貫通性部位として検出された。(B) 疎水性プロットから予測された膜貫通性部位 (灰色) と LIM8 に特徴的なセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んだ領域 (黒色) を模式図に示した。

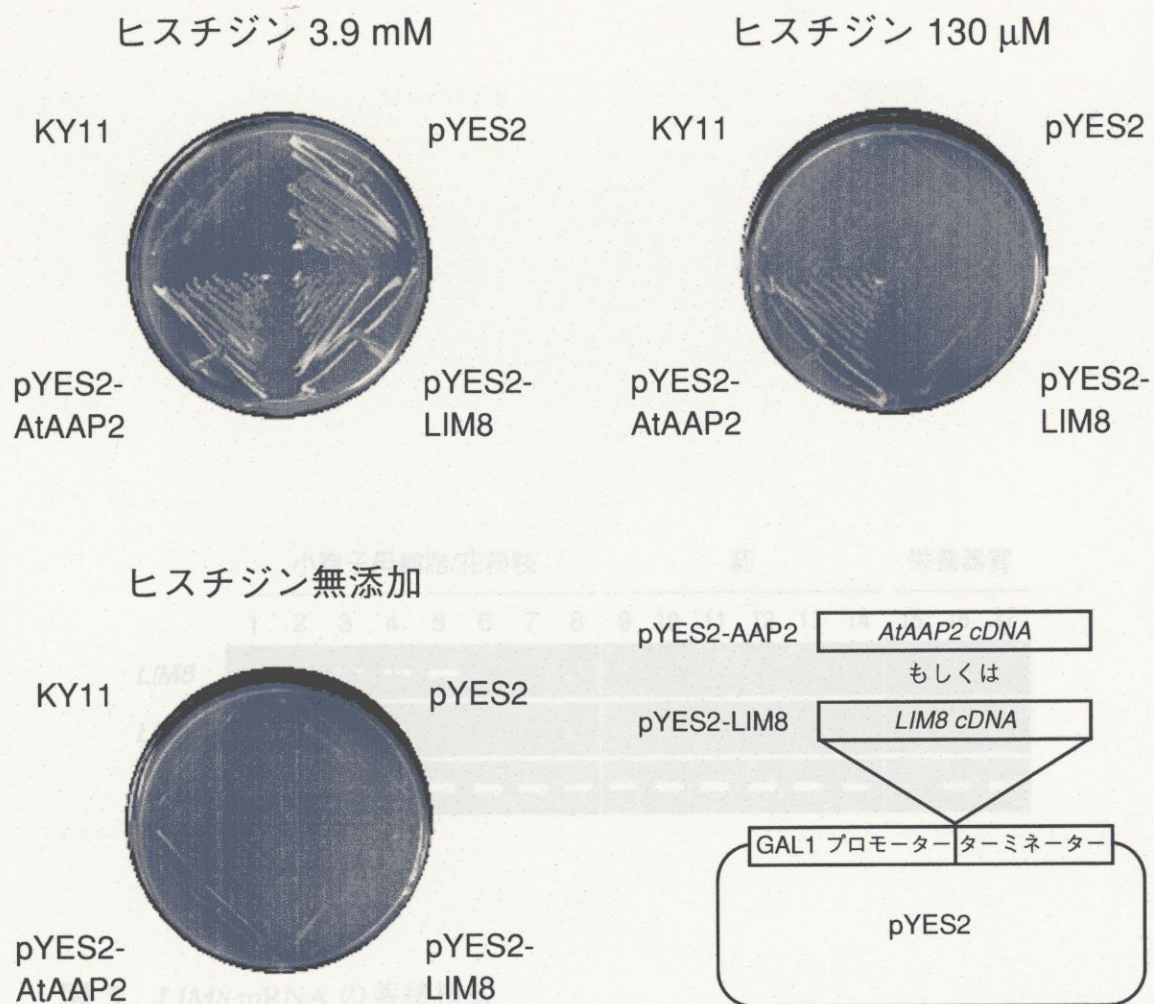


図 4 *LIM8* 遺伝子の生育相補試験

ヒスチジンの輸送系および合成系に欠損がある出芽酵母 *KY11* 株を *pYES2*、*pYES2-LIM8*、*pYES2-AtAAP2* で形質転換した。右下にベクターの模式図を示した。*KY11* 株および形質転換株を 3.9 mM のヒスチジンを含む S1 培地、130 μ M のヒスチジンを含む HLM 培地、ヒスチジンを含まない HFM 培地に移して生育を観察した。

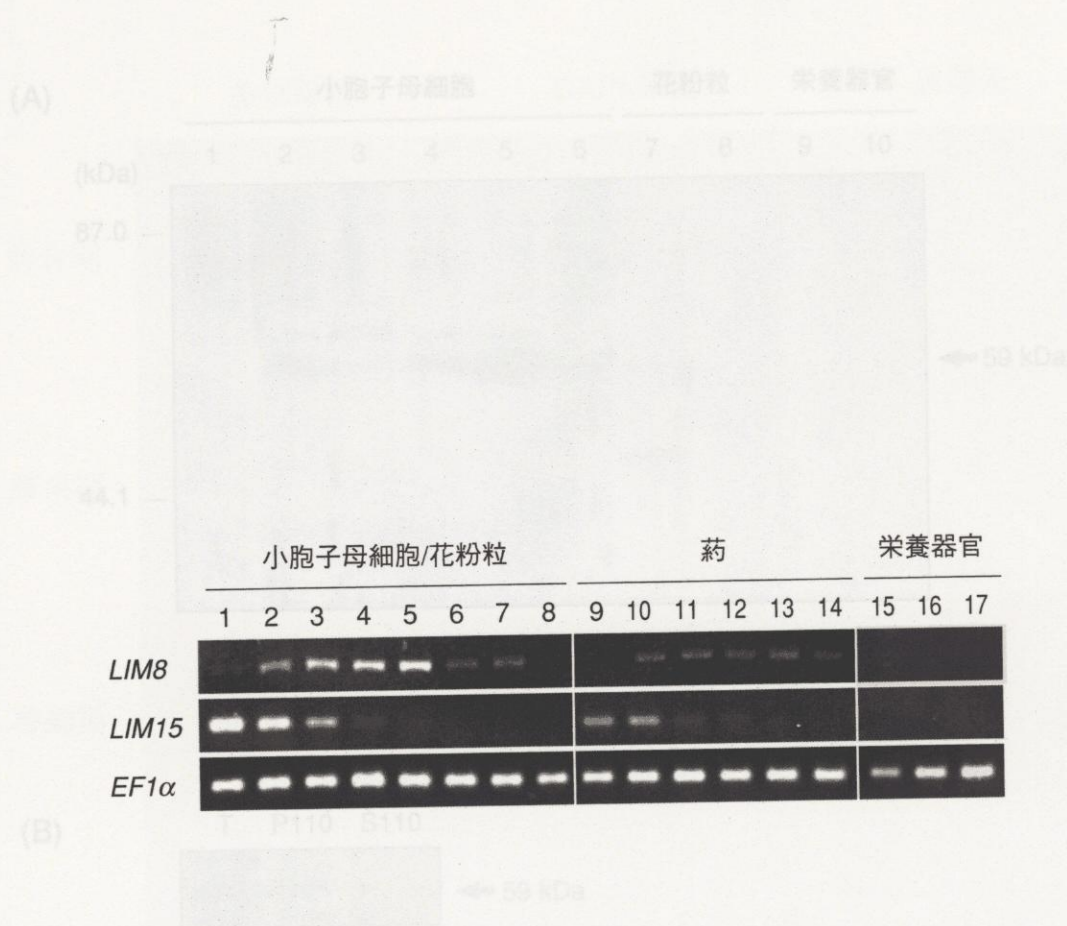


図 5 *LIM8* mRNA の蓄積様式

テッポウユリの各部位から調製した total RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。細糸期 (レーン 1 と 9)、対合期 (レーン 2 と 10)、厚糸期 (レーン 3 と 11)、複糸期から減数第二分裂期 (レーン 4 と 12)、四分子期 (レーン 5 と 13) の小胞子母細胞、一核性初期花粉粒 (レーン 6 と 14)、一核性後期花粉粒 (レーン 7)、二核性花粉粒 (レーン 8)、葉 (レーン 15)、茎 (レーン 16)、根 (レーン 17) を用いた。*LIM15* を小胞子母細胞および葯における特異的発現の対照として示した。*EF1 α* を全レーンの対照として示した。

局在を調査した。全抽出物 (T)、ミクロソーム画分 (P110)、可溶性画分 (S110) を用いた。

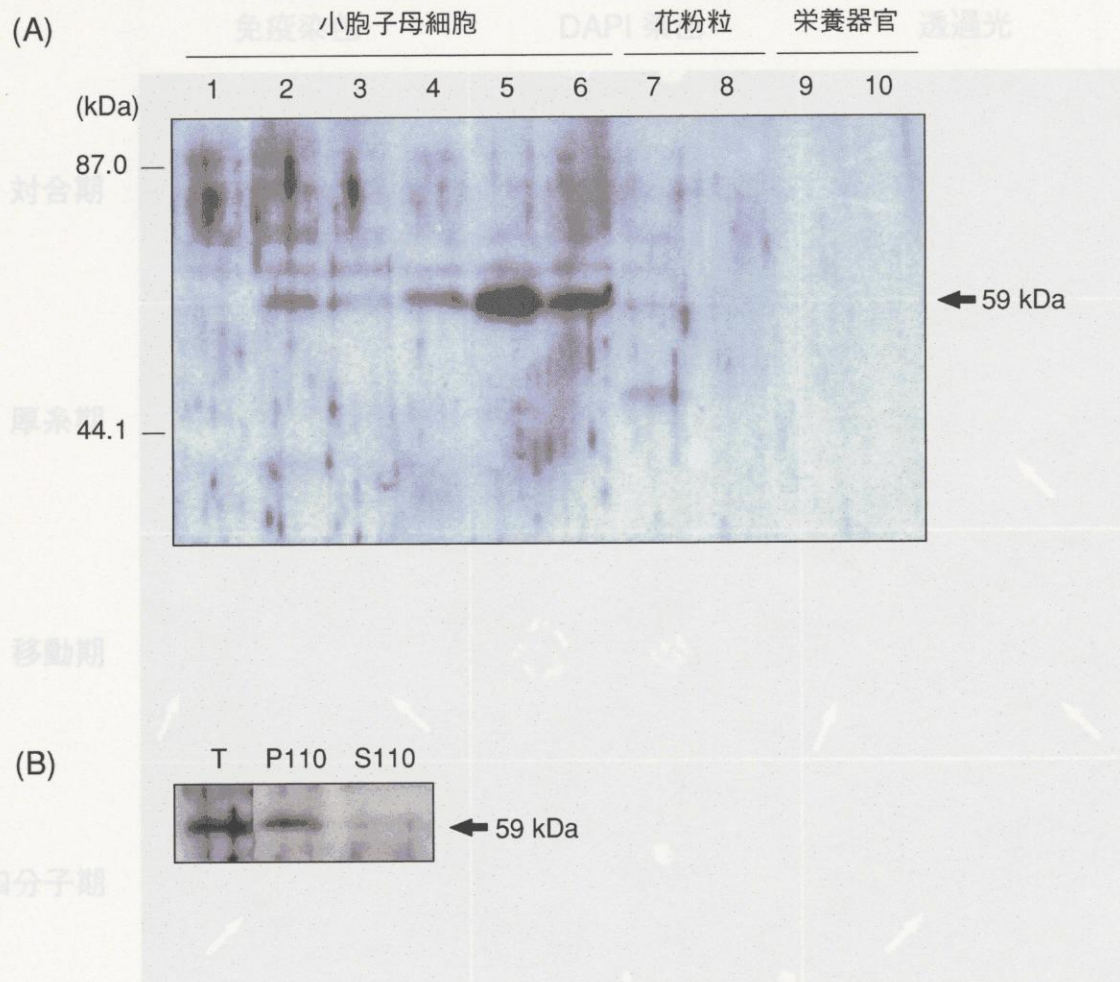


図 6 LIM8 タンパク質のウエスタンブロット解析

(A) LIM8 タンパク質の蓄積様式を調査した。細糸期 (レーン 1)、対合期 (レーン 2)、厚糸期 (レーン 3)、複糸期から移動期 (レーン 4)、減数第二分裂期 (レーン 5)、四分子期 (レーン 6) の小孢子母細胞、一核性花粉粒 (レーン 7)、二核性花粉粒 (レーン 8)、葉 (レーン 9)、茎 (レーン 10) を用いた。(B) LIM8 タンパク質の細胞内局在を調査した。全抽出物 (T)、ミクロソーム画分 (P110)、可溶性画分 (S110) を用いた。

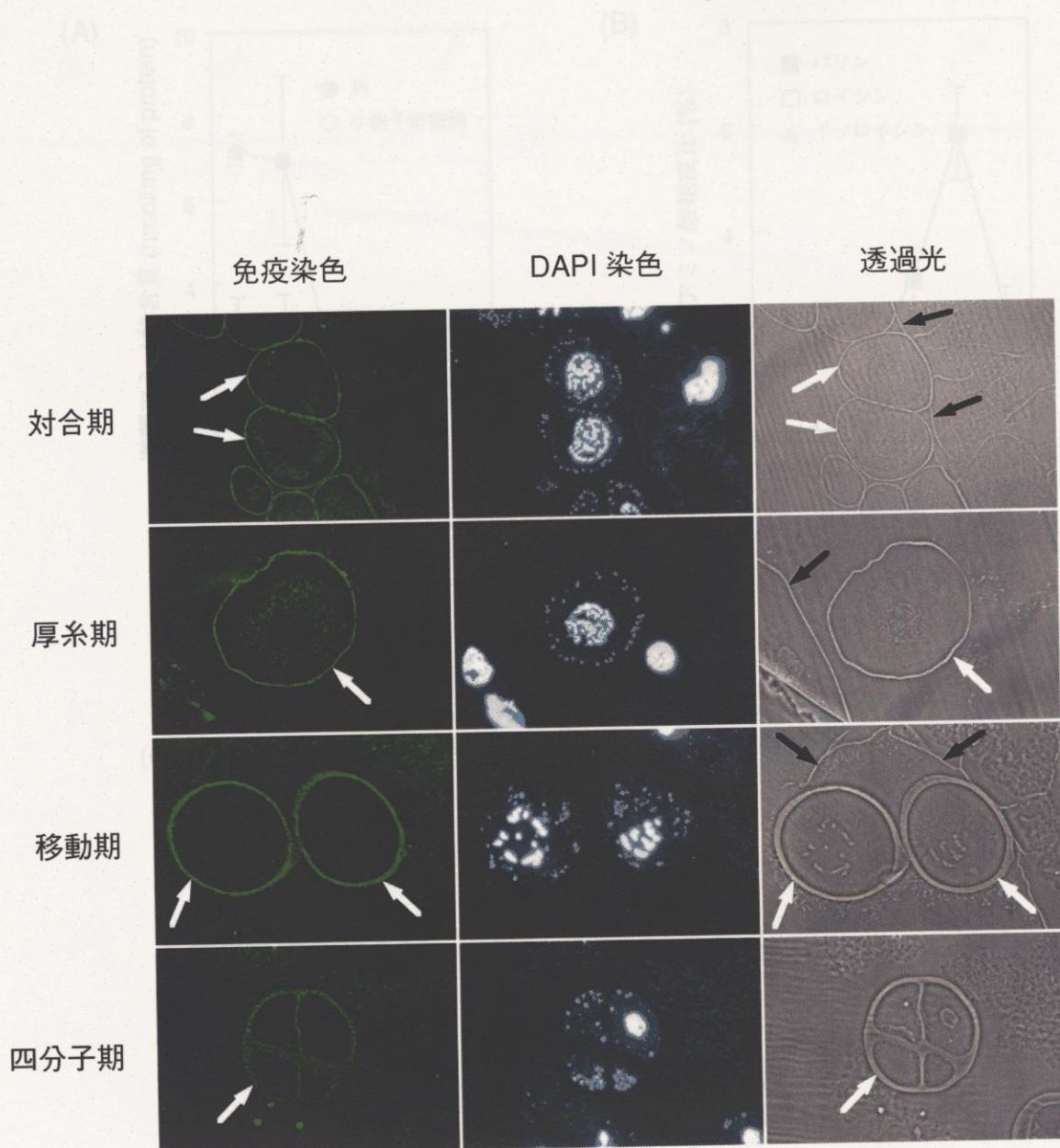


図 7 LIM8 タンパク質の組織免疫染色
 薬の組織切片を作成し、抗 LIM8 抗血清を用いた免疫染色像、DAPI 染色像、透過光像を観察した。白矢印は小孢子母細胞の、黒矢印はタペート細胞の細胞壁および原形質膜が存在する場所を示す。

図 8 小孢子形成過程における遊離アミノ酸の動態
 (A) タンパク質合成に用いられる 20 種類の遊離アミノ酸の合計含量を示した。
 (B) 小孢子母細胞。(C) 薬における遊離アミノ酸の組成比 (20 種類のアミノ酸の合計 mol 数に占める各アミノ酸 mol 数) を示した。エターバーは 2 倍以上の測定で得られた平均値の標準偏差を示す。

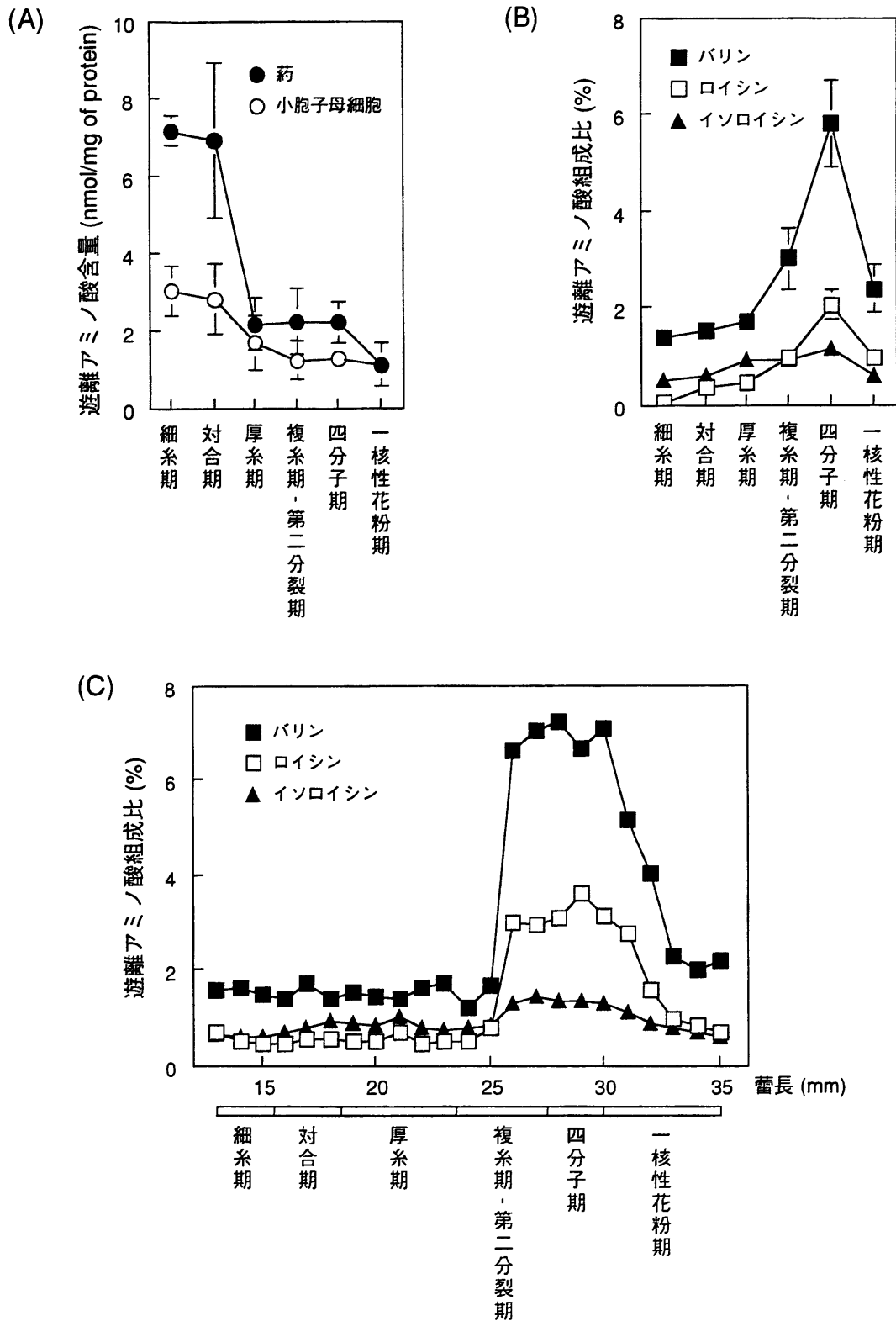


図 8 小孢子形成過程における遊離アミノ酸の動態
 (A) タンパク質合成に用いられる 20 種類の遊離アミノ酸の合計含量を示した。
 (B) 小孢子母細胞、(C) 葯における遊離アミノ酸の組成比 (20 種類のアミノ酸の合計 mol 数に占める各アミノ酸 mol 数) を示した。エラーバーは 2 回以上の測定で得られた平均値の標準偏差を示す。

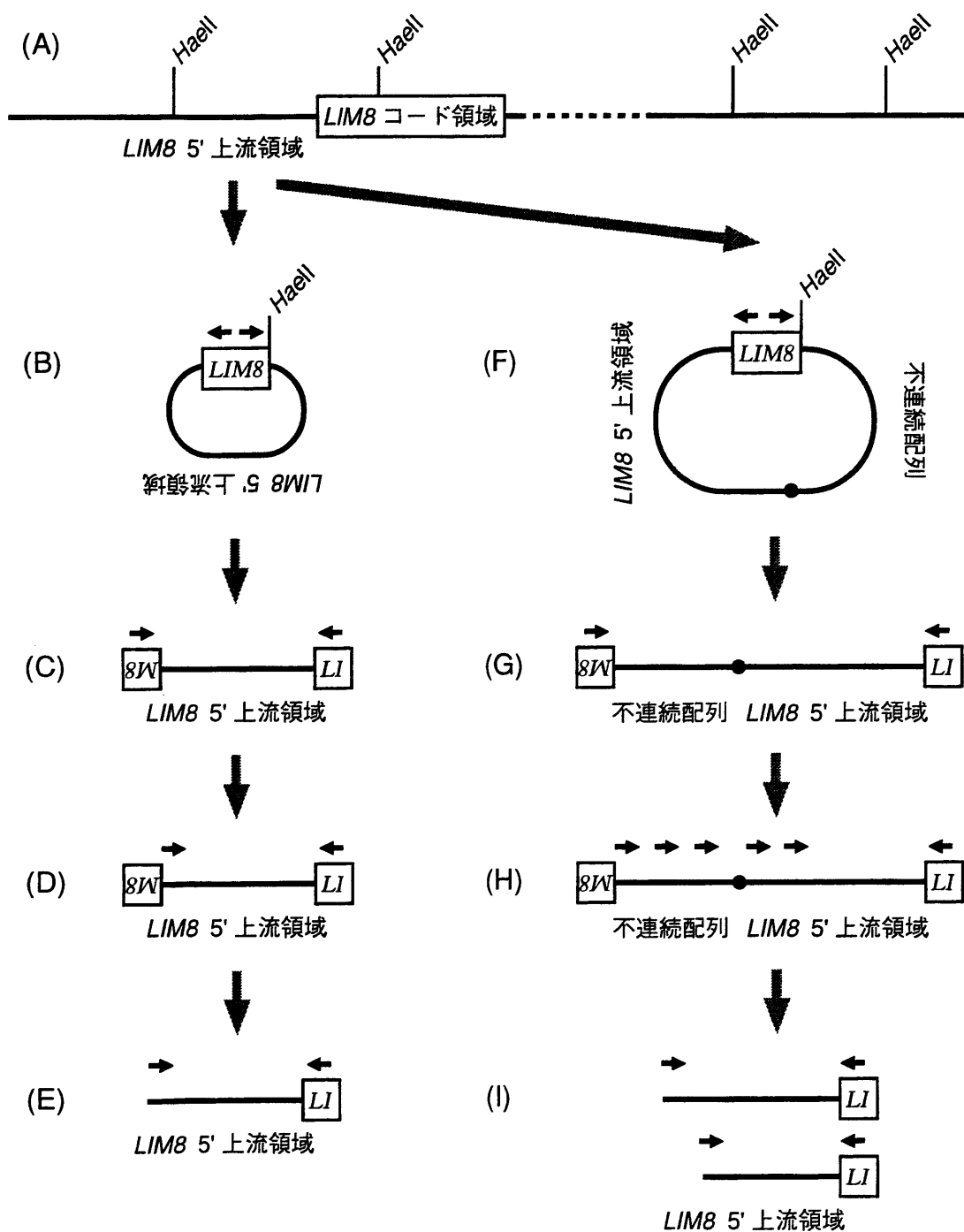


図 9 インバース PCR 法による *LIM8* 遺伝子 5' 上流配列の単離
 (A) ゲノミック DNA の制限酵素処理。(B、F) ゲノミック DNA の環状化と *LIM8* コード配列をもとにしたプライマー設計。(C、G) 環状化ゲノミック DNA を鋳型にした PCR。(D、H) 新規配列をもとにしたプライマー設計。(E、I) 未処理ゲノミック DNA を鋳型にした PCR。黒矢印はプライマーを示す。灰矢印は単離過程の流れを示す。実際には、*LIM8* 遺伝子 5' 上流配列が不連続配列と共に環状化したために A、F、G、H、I の流れで行った。その融合配列の境目を黒丸で示した。

(A)

```

GGTAAGAGTGCCATTGTTGGGACCTTATATACTAATATAGAAGAGGTTGT -536
AACAAAGAATAATAAAATCAAAACACAGGATCAGACAGGAAATGATTCAA -486
TTGGGACGGTATCATGCCATGCTGTAGGACGTCAGCATAGAATGAAAATG -436
GACGAAAACATCATCAGCCACCGGTATCTTTATAGTCATATAGGTAATAGC -386
TGATATATTTAAACTATAAGTCAAGTCAGCCAAAGTCAGCTATGTTTCAAG -336
CCCAACTAAAGCTTAGAATGACCCACCACTAACCTACCTTTCCCCCAA -286
AAGAAAATCTCACCAACCCTAATTAACATGTGTTAATTGGACGGTAAATT -236
AACTTAAACCAATGCTAGGGCATTATAATCCCCAGAGCTAGACGGTAGTGG -186
GCGACAGTCCTTGCGCTTTAAAAAGTTTACCCTGTATTTTACAGTTCCG -136
TCACGGTTGGTGACGTGGCGAGTTACACCTGATCCGAGCCACAAAGCAT -86
GACACACCAACCCCAAGTCTTCCCTCCCTCAGCTCCCAGCTTACATAAAGG -36
GTTGGGCTGAGGGAGGGAGAGAAGCAAGCTGAAAGAGCCAGCCACCAAGC +15
AATGGAAGTACAGTCCATGCCGGTGAC +42

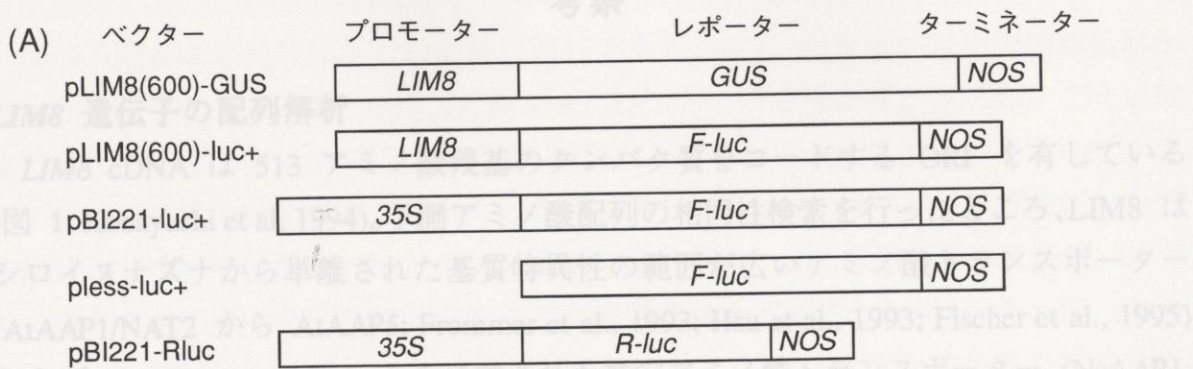
```

(B)

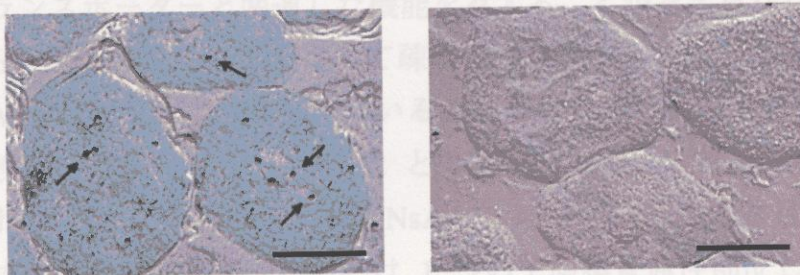
LIM8 (-59)	CTTCCCTCC	LIM8 (-135)	CAGTTCCGT
LIM10 (-84)	CTTCCCTCA	LIM15 (-57)	CAGTTCCGT
LIM12 (-236)	CTTCCCTAC	コンセンサス配列	CAGTTCCGT
LIM10 (-125)	CTTCCATCC		
LIM12 (-109)	CTTCCATCC		
LIM10 (-242)	GTTCCATCA	LIM8 (-289)	CTTTCCCCC
コンセンサス配列	CTTCC ^A _C TCC	LIM12 (-136)	CTTTCCCCC
		コンセンサス配列	CTTTCCCCC

図 10 LIM8 遺伝子 5' 上流領域の解析

(A) インバース PCR 法によって増幅した *LIM8* 遺伝子の 5' 上流配列と部分コード配列を示した。*LIM8* cDNA の 5' 末端と一致する場所を転写開始点 (+1) として矢印で示した。コード配列を斜体で示した。TATA ボックス、CAAT ボックスを枠で囲んだ。ASF-1 結合モチーフ (TGACG) とその逆方向配列および C ボックス (GACGTC) を下線で示した。他の *LIM* 遺伝子 5' 上流領域と共通あるいは類似する配列を白抜き文字で示した。(B) *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域と他の *LIM* 遺伝子 5' 上流領域との間で共通あるいは類似する配列を示した。*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域中の配列を白抜き文字で示した。各々の 5' 上流領域中での位置を括弧の中に示した。



(B)



(C)

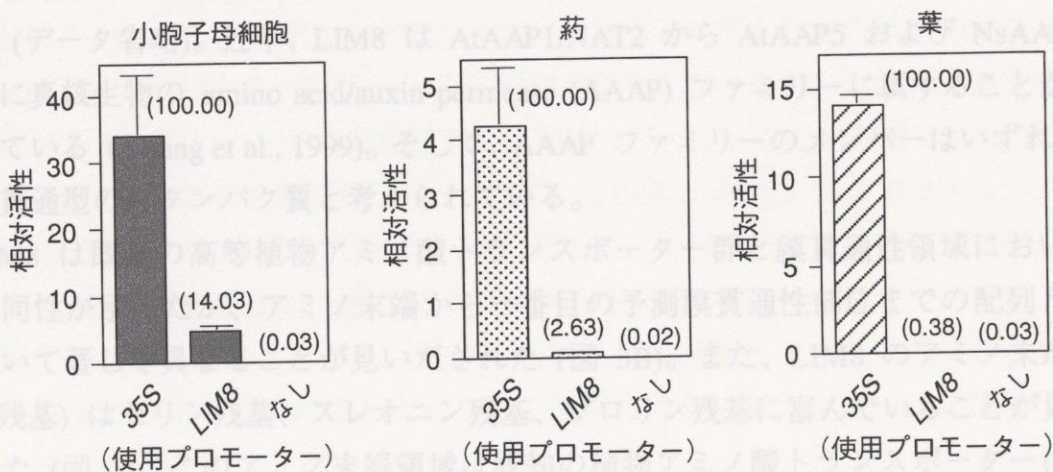


図 11 LIM8 遺伝子 5' 上流領域のプロモーター活性

(A) テッポウユリへ導入したベクターに含まれる遺伝子の模式図を示した。
 (B) pLIM8-GUS を小胞子母細胞へ導入し、X-gluc 染色を行った。左は金粒子と共にベクターが導入された細胞を、右は金粒子が導入されていない細胞を示した。矢印は金粒子を示す。スケールバーは 25 μ m を示す。
 (C) p221-luc+, pLIM8(600)-luc+ あるいは pless-luc+ を pBI221-Rluc と同時にテッポウユリへ導入し、F-luc 活性および R-luc 活性を測定した。少なくとも 3 回以上の遺伝子導入から得られた相対活性 (F-luc/R-luc) を示した。pBI221-luc+ を導入したときの相対活性を 100 % としたときの各々の割合を括弧内に示した。エラーバーは標準偏差を示す。

考察

LIM8 遺伝子の配列解析

LIM8 cDNA は 513 アミノ酸残基のタンパク質をコードする ORF を有している (図 1: Kobayashi et al, 1994)。予測アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、LIM8 はシロイヌナズナから単離された基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーター (AtAAP1/NAT2 から AtAAP5: Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993; Fischer et al., 1995) および *Nicotiana glauca* から単離された推定アミノ酸トランスポーター (NsAAP1: Lalanne et al., 1995) と相同性を示すことが見いだされた (図 2)。このことから、LIM8 はアミノ酸トランスポーターと関連した機能を有することが考えられた。

Kyte と Doolittle (1982) の方法に従って疎水性プロットを作成したところ、LIM8、AtAAP2、NsAAP1 は互いによく類似していることが示されたが、LIM8 からは 10 個の予測膜貫通性部位が検出され、AtAAP2 と NsAAP1 からは 11 個の予測膜貫通性部位が検出された (図 3B)。AtAAP2 と NsAAP1 の 1 番目と 2 番目の予測膜貫通性部位に対応する領域において、LIM8 は 1 つの予測膜貫通性部位しか検出されていなかった。しかしながら、Engelman ら (1986) の方法に従って疎水性プロットを作成したところ、LIM8 についてもその領域から 2 つの予測膜貫通性部位が検出された (データ省略)。近年、LIM8 は AtAAP1/NAT2 から AtAAP5 および NsAAP1 と同様に真核生物の amino acid/auxin permease (AAP) ファミリーに属することが報告されている (Young et al., 1999)。そして、AAP ファミリーのメンバーはいずれも 11 回膜貫通型の膜タンパク質と考えられている。

LIM8 は既知の高等植物アミノ酸トランスポーター群と膜貫通性領域において高い相同性が示したが、アミノ末端から一番目の予測膜貫通性部位までの配列と長さにおいて著しく異なることが見いだされた (図 3B)。また、LIM8 のアミノ末端領域 (60 残基) はセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んでいることが見いだされた (図 1)。このアミノ末端領域は既知の植物アミノ酸トランスポーターに存在しない機能的な特徴を LIM8 タンパク質に付与している可能性が考えられた。

LIM8 タンパク質の機能検討

LIM8 は既知の植物アミノ酸トランスポーター群と比較的高い相同性を示した。そこで、LIM8 についてアミノ酸輸送活性の検出を試みた。AtAAP1/NAT2 から AtAAP5 は基質特異性の範囲が広く、いずれもヒスチジンの輸送系と合成系が欠損する出芽酵母の変異株 (JT16) を用いた生育相補試験によって単離されることが報告されている (Rentsch et al., 1996)。このことから、LIM8 が基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターとして機能するならば、AtAAP 群と同様に JT16 株の欠

損を相補することが考えられた。

遺伝子型および表現型が JT16 株と同一である KY11 株を用いて生育相補試験を行った (図 4)。その結果、対照の AtAAP2 については生育相補が見られ、アミノ酸輸送活性を有することが確認されたが、LIM8 については生育相補が見られず、アミノ酸輸送活性を検出できなかった。このことから、LIM8 は 1) 出芽酵母において機能発現しない可能性、2) ヒスチジン以外の特定のアミノ酸を輸送する可能性、3) アミノ酸トランスポーター以外の機能を有する可能性などが考えられた。そして、LIM8 と AtAAP 群は、一次構造解析の結果だけでなく生育相補試験の結果からも特性の異なるタンパク質であることが示された。

出芽酵母において LIM8 が発現しているかどうかは、抗 LIM8 タンパク質抗体を用いたウエスタンブロット解析によって調査することを試みた。その結果、LIM8、LIM8 の分解産物あるいは交差認識されるタンパク質に由来すると考えられる多数のシグナルが検出されたため、明瞭に LIM8 の発現を確認することはできなかった (データ省略)。

LIM8 遺伝子の発現様式

LIM8 遺伝子が機能している時期と場所を明らかにするため、詳細な発現様式の解析を試みた。RT-PCR 解析およびウエスタンブロット解析を行った結果、LIM8 mRNA と LIM8 タンパク質はともに小孢子母細胞で蓄積しているが、一核性花粉粒では蓄積がほとんど消失しており、栄養器官では蓄積していないことが観察された (図 5、6A)。更に、葯の組織免疫染色を行った結果、LIM8 タンパク質に由来するシグナルは小孢子母細胞から特異的に検出された (図 7)。これらのことから、LIM8 遺伝子は小孢子母細胞で特異的に発現することが明らかになった。

小孢子母細胞において、LIM8 mRNA の蓄積量は減数第一分裂前期の対合期から四分子期までの間で徐々に増加することが観察された (図 5)。また、LIM8 タンパク質の蓄積量は減数第一分裂前期で低く抑えられているが、減数第二分裂期において著しく上昇し、四分子期には減少することが観察された (図 6A)。これらのことから、LIM8 遺伝子は減数分裂が完了する付近で機能することが示唆された。また、mRNA レベルとタンパク質レベルの発現様式の違いから、小孢子母細胞における LIM8 遺伝子の発現には転写後調節の関与が示唆された。

LIM8 タンパク質の細胞内局在

LIM8 タンパク質は一次構造の解析によって 10 から 11 個の予測膜貫通性部位を有した膜タンパク質であることが推測された。そこで、LIM8 が膜タンパク質であることを免疫学的な解析によって検証することを試みた。小孢子母細胞を細胞分

画してウエスタンブロット解析を行ったところ、LIM8 タンパク質に由来するシグナルはミクロソーム画分から検出されたが、可溶性画分からはほとんど検出されなかった (図 6B)。このことから、LIM8 は膜タンパク質であることが示唆された。

更に、LIM8 が何れの膜構造に局在しているのかを明らかにすることを試みた。葯の組織切片を作成し、抗 LIM8 タンパク質抗血清を用いて免疫染色を行った。その結果、LIM8 タンパク質に由来するシグナルは小孢子母細胞の原形質膜および細胞壁が存在する場所から特異的に検出された (図 7)。一次構造解析、細胞分画実験および組織免疫染色実験の結果から、LIM8 タンパク質は小孢子母細胞の原形質膜に局在することが示唆された。

小孢子形成過程における遊離アミノ酸の動態

LIM8 遺伝子はアミノ酸トランスポーター様のタンパク質をコードし、小孢子母細胞において発現することから、小孢子形成過程における遊離アミノ酸の動態について興味を持たれた。そこで、タンパク質合成に用いられる 20 種類の遊離アミノ酸について小孢子形成過程における動態調査を行った (図 8)。その結果、小孢子母細胞および小孢子母細胞を含む葯において、遊離アミノ酸含量 (20 種類の合計量) は減数第一分裂前期の間に大きく減少することが観察された (図 8A)。テッポウユリの減数第一分裂前期の小孢子母細胞は、*in vitro* 培養において培地へアミノ酸を添加しないと正常な紡錘体を形成できないことが報告されている (Ito and Stern, 1967)。このことから、減数第一分裂前期で減少する遊離アミノ酸の大部分は紡錘体を構成するタンパク質の合成に用いられている可能性が考えられた。

次に、各々の遊離アミノ酸について変動様式を調査した。アミノ酸含量 (タンパク質重量当たりの各アミノ酸 mol 数) の調査では誤差が大きくなるため、アミノ酸組成比 (20 種類のアミノ酸の合計 mol 数に占める各アミノ酸 mol 数) の調査を行った。その結果、小孢子母細胞と葯において、大部分のアミノ酸種の組成比は小孢子形成過程を通して顕著に変動していなかったが、分枝側鎖アミノ酸であるバリンとロイシンの組成比は減数第二分裂付近から四分子期の間で著しく上昇していることが明らかになった (図 8B、C)。また、バリンとロイシンは組成比だけでなく含量も上昇することが示された (データ省略)。バリンとロイシンの組成比および含量が上昇する要因として、これらのアミノ酸種が細胞内へ取り込まれている可能性や細胞内で合成される可能性が考えられた。LIM8 タンパク質は減数第二分裂期で蓄積量が著しく増加している (図 6A)。このことから、LIM8 がバリンおよびロイシンを細胞内に取り込んでいる可能性も考えられた。

LIM8 遺伝子の 5' 上流領域

これまでに、小胞子形成関連遺伝子の発現制御機構を理解するため、*LIM10*、*LIM12*、*LIM15*、*LIM18* について 5' 上流領域が単離されており、各種レポーター遺伝子を用いてそれらの特徴付けが行われている (Minami et al., 未発表)。*LIM8* と *LIM10*、*LIM12*、*LIM15*、*LIM18* の間では小胞子形成過程における mRNA の蓄積量および変動様式が異なっている (Kobayashi et al., 1994、図 5)。そこで、*LIM8* 遺伝子についても 5' 上流領域を単離して特徴付けすることを試みた。

テッポウユリはゲノムサイズが非常に大きいため、ハイブリダイゼーションスクリーニングによってゲノミッククローンを単離することが実際的に不可能である。本研究ではインバース PCR 法を用いることによって、0.6 kbp の *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域を含んだゲノミッククローンを単離した (図 10)。*LIM8* 遺伝子の 5' 上流領域には TATA ボックス、CAAT ボックス、ASF-1 結合モチーフ (TGACG; Lam et al., 1989)、C ボックス (GACGTC; Izawa et al., 1993) が存在していた。また、*LIM8* 遺伝子と他の *LIM* 遺伝子の 5' 上流配列を比較したところ、3 種類の共通あるいは類似する配列 (CTTCCC/ATCC、CAGTTCCGT、CTTTCCCC) が見いだされた。これらの共通/類似配列にはいずれも TTCC 配列が含まれていることに興味を持たれた。

単離した 0.6 kbp の *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域がプロモーターとして機能するかどうかを *GUS* 遺伝子との融合遺伝子を用いて解析した。その結果、融合遺伝子をコーティングした金粒子が導入されている細胞において *GUS* の発現が観察されたが、金粒子が導入されていない細胞においては *GUS* の発現は観察されなかった (図 11B)。このことから、パーティクルボンバードメント法によるテッポウユリの小胞子母細胞への遺伝子導入が有効であることが示されるとともに、*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域はプロモーターとして機能することが示唆された。

次に、*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域のプロモーター活性を定量的に測定することを試みた。*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域とホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子 (*F-luc*) の融合遺伝子、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと *F-luc* の融合遺伝子およびプロモーターを連結していない *F-luc* 遺伝子を 35S プロモーターとウミシイタケ由来ルシフェラーゼ遺伝子 (*R-luc*) の融合遺伝子 (35S::*R-luc*) と同時にテッポウユリの種々の部位へ導入し、それぞれの相対活性 (*F-luc* 活性/*R-luc* 活性) を測定した (図 11C)。その結果、小胞子母細胞において *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域を用いた場合は、35S プロモーターを用いた場合の 14.04 % の活性が見られ、プロモーターを連結していない場合の 470 倍の活性が見られた。一方、葉において *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域を用いた場合は、35S プロモーターを用いた場合の 0.38 % の活性が見られ、プロモーターを連結していない場合の 13 倍の活性が見られた。従って、*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域は小胞子母細胞において葉におけるよりも約 40 倍高いプロモ

ーター活性を有することが示された。これらのことから、0.6 kbp の *LIM8* 遺伝子 5' 上流領域は小孢子母細胞において特異的に活性化されるプロモーターであることが示唆された。これまでに、*LIM10* 遺伝子 5' 上流領域あるいは *LIM18* 遺伝子 5' 上流領域と各種レポーター遺伝子との融合遺伝子は形質転換タバコにおいて葯、小孢子母細胞および花粉粒などで発現することが観察されている (Minami et al., 未発表)。このことから、*LIM8* 遺伝子の 5' 上流領域についてもタバコの小孢子母細胞において活性化されることが期待される。

第二章 *LIM8* 遺伝子と相同なシロイヌナズナの *AATL1* 遺伝子

序文

第一章では、テッポウユリの *LIM8* 遺伝子についてアミノ酸トランスポーターと関連した機能を有することを推察し、遺伝子産物が原形質膜に局在することを示唆した。また、*LIM8* 遺伝子は小孢子形成過程の小孢子母細胞で発現することを明らかにし、小孢子形成過程の遊離アミノ酸動態についても知見を得た。本研究では、更に、*LIM8* 遺伝子の機能を分子遺伝学的に解析することを試みた。

テッポウユリは形質転換体の作成が困難であることや、遺伝学的な知見が乏しいこと、ゲノムサイズが大きいことなどから、分子遺伝学的な研究には適していない。一方、シロイヌナズナは形質転換体の作成が容易なだけでなく、既に十分な T-DNA 挿入変異体を作成されていることなどから、分子遺伝学的な研究に最も適している。そこで、シロイヌナズナより *LIM8* 相同遺伝子を単離し、これについて分子遺伝学的な手法で機能解析することを試みた。

第二章では初めに、データベース検索によって *LIM8* 遺伝子と高い相同性を示すシロイヌナズナの 2 種類のゲノミック DNA 塩基配列を見いだした。そこで、これらがコードする遺伝子に amino acid transporter-like protein 1 (*AATL1*) および *AATL2* と命名し、対応する cDNA クローンを単離して一次構造と mRNA の蓄積様式について解析を行った。これらの解析から *LIM8* と相同な機能を有すると考えられた *AATL1* 遺伝子については、その 5' 上流領域と *GUS* 遺伝子の融合遺伝子について組織化学的な発現様式の解析を行い、更に、遺伝子強制発現植物を用いて分子遺伝学的な機能解析を行った。

材料と方法

配列情報の解析

相同性検索は日本 DNA データバンク (DDBJ)、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および European Molecular Biology Laboratory (EMBL) のデータベースにおいて BLAST プログラム (Altschul et al., 1990) を用いて行った。アミノ酸配列のアライメントは CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) プログラムを用いて行った。分子系統樹の描画は TreeView プログラム (Page, 1996) を用いて行った。疎

水性プロットの描画と膜貫通性部位の予測は、Kyte と Doolittle (1982) あるいは Engelman (1986) の方法に従って TopPred II (Claros and Heijne, 1994) プログラムを用いて行った。

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) の種を培養土 (Metro-Mix 350; Scotts) もしくは MS 寒天培地 (Murashige and Skoog, 1962) に植えた。播いた種を 4 °C の暗所に 3 から 4 日間置いて春化处理を行った。培養土に植えた種を 23 °C から 25 °C で温室で栽培し、MS プレートに植えた種を 24 °C で長日条件 (16 時間の照明と 8 時間の暗黒) で栽培した。

AATL1 cDNA および AATL2 cDNA の単離

シロイヌナズナから 1 mm 以下の花芽を採集し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を調製した。この total RNA を以下の 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)、5'-RACE および reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) において cDNA 合成用の鋳型とした。

RNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1 (Takara) を用いて AATL1 および AATL2 の 3'-RACE を行った。Oligo dT-adapter primer (Takara) を用いて total RNA から合成した cDNA を PCR の鋳型とした。AATL1 は AATL1F1 プライマー (CTGCATCGTTCT-GTCTCAGC) と M13 primer M4 (GTTTTCCTCCAGTCACGAC; Takara)を用いて、AATL2 は AATL2F2 プライマー (GACCTGGAGTGACGATTATGG) と M13 primer M4 を用いて、94 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間を 35 サイクルする PCR を行った。これらの増幅産物を pT7Blue T-Vector (Novagen) へ挿入した後、塩基配列決定を行った。

5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Gibco) を用いて AATL1 および AATL2 の 5'-RACE を行った。AATL1 は AATL1R2 プライマー (CTCGACATATCGATTG) を用いて、AATL2 は AATL2R2 プライマー (ACATGTTAGCCATAGC) を用いて total RNA から cDNA を合成した。それぞれの cDNA に poly (C)+ を付加したものを鋳型として、AATL1 は AATL1R3 プライマー (CAGC-TTCGTGCAACTGAACC) と 5' RACE abridged anchor primer (GGCCACGCGTCGAC-TAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG; Gibco) を用いて、94 °C で 30 秒間、60 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間を 35 サイクルする PCR を行い、AATL2 は AATL2R3 プライマー (TAGGCTACAATAACTCCTCTCCACATTG) と 5' RACE abridged anchor primer を用いて、94 °C で 30 秒間、64 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間を 35 サイクルする PCR を行った。その後、それぞれの増幅産物を鋳型として、AATL1 は AATL1R3 プ

ライマー と abridged universal amplification primer (GGCCACGCGTCGACTAGTAC: Gibco) を用いて、*AATL2* は *AATL2R4* プライマー (TGGACTTTCTTGAGGGATGC) と abridged universal amplification primer を用いて、94 °C で 30 秒間、60 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間を 35 サイクルする PCR を行った。これらの増幅産物を pT7Blue T-Vector へ挿入した後、塩基配列決定を行った。

RNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1 を用いて、完全長コード配列を含んだ *AATL1* cDNA および *AATL2* cDNA を増幅した。Oligo dT-adapter primer を用いて total RNA から合成した cDNA を PCR の鋳型とした。*AATL1* は *AATL1F2* プライマー (CGGGATCCCGTCCAATGGACGAAAGACC) と *AATL1R1* プライマー (CCGCTCGAGCTACTTAGTTAGGCGGCTTG) を用いて、94 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 1.5 分間を 35 サイクルする PCR を行った。*AATL2* は *AATL2F2* プライマー (CGGGATCCAGGAGATATGGGGAACAGTG) と *AATL2R2* プライマー (TCCCCCGGGTGATCCATCTAAGAGAAGAAC) を用いて、94 °C で 30 秒間、60 °C で 30 秒間、72 °C で 1.5 分間を 35 サイクルする PCR を行った。*AATL1* cDNA はプライマー配列中の *Bam*HI サイトおよび *Xho*I サイトで、*AATL2* cDNA はプライマー配列中の *Bam*HI サイトおよび *Sma*I サイトで切断し、それぞれ pBluescript II KS-プラスミド (Stratagene) へ挿入した後、塩基配列決定を行った。*AATL1* cDNA が挿入されたクローンを pCAATL1、*AATL2* cDNA が挿入されたクローンを pCAATL2 と命名した。

***AATL1* ゲノミック DNA の単離**

AATL1 の 3'-RACE 増幅産物を *Hind*III サイトで切断することによって、*AATL1* 部分コード配列と poly (A)+ 配列に分断した。この部分コード配列を Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2 (Takara) を用いて ³²P-dCTP でラベルし、スクリーニング用のプローブとした。lambda ZAP II ベクターへ挿入されたシロイヌナズナ (Columbia) ゲノミック DNA のライブラリー (Stratagene) を定法 (Sambrook et al., 1989) に従ってプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。約 4 x 10⁵ プラークのスクリーニングによって 8 個の陽性ファージプラークを単離した。これらの陽性ファージを Stratagene の説明書に従って *in vivo* excision により pBluescript SK-プラスミド (Stratagene) の形態へ変換した。これらのゲノミック DNA クローンについて制限酵素マッピングと塩基配列決定を行った。*AATL1* 遺伝子の完全長コード領域と 5' 上流領域を含む 4.6 kbp のゲノミック DNA が挿入されたクローンを pGAATL1 と命名した。

DNA の塩基配列決定

DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を用い、ダイプライマー法あるいはダイターミネーター法によって DNA の塩基配列を決定した。

核酸のゲルプロット解析

定法 (Sambrook et al., 1989) に従って核酸のゲルプロット解析を行った。CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) によって葉からゲノミック DNA を抽出した。制限酵素で切断した 10 µg のゲノミック DNA を 0.7 % アガロースゲル電気泳動によって分離し、0.4 N NaOH によって Hybond-N+ ナイロンメンブレン (Amersham) へ転写した。ATA 法 (Kuhlemeier et al. 1988) によって各器官から total RNA を抽出した。20 µg の total RNA を 18 % ホルムアルデヒドを含んだ 1.2 % アガロースゲルで電気泳動し、0.03 N NaOH によって Hybond-N+ ナイロンメンブレンへ転写した。完全長のコード配列を含んだ *AATL1* cDNA および *AATL2* cDNA を Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2 によって ^{32}P -dCTP でラベルし、プローブを作成した。DNA あるいは RNA が転写されたメンブレンを 50 % ホルムアミド、5 X SSC、5 % SDS を含む緩衝液において 42 °C でプレハイブリダイゼーションした後、その緩衝液にプローブを加えて 16 時間ハイブリダイゼーションした。その後、DNA が転写されたメンブレンを 42 °C の 2 X SSC、1 % SDS を含む緩衝液において、RNA が転写されたメンブレンを 50 °C の 2 X SSC、0.1 % SDS を含む緩衝液において、それぞれ 2 回洗浄した。medical x-ray film (Fuji) を用いてメンブレンのオートラジオグラフィを行った。

形質転換シロイヌナズナの作成

pGAATL1 プラスミドを *EcoRI* で切断し、3.7 kbp と 0.9 kbp のゲノミック DNA 断片を得た。この 3.7 kbp の断片を pUC18 プラスミドの *EcoRI* サイトへ挿入することによって pGAATL1Δ プラスミドを作成した。pGAATL1Δ を *AvaI* で切断し、自己環状化することによって、*AATL1* の 5' 上流領域 (1.6 kbp) と部分コード配列 (17 bp) を含む pGAATL1pro プラスミドを作成した。pGAATL1pro を *HindIII* および *BamHI* で切断することによって、5' 上流配列と部分コード配列を切り出した。この断片を pBI101 ベクター (Clontech) の *HindIII*-*BamHI* サイトへ挿入することによって pAATL1-GUS ベクター (*AATL1::GUS* 融合遺伝子を含む) を作成した。

pCAATL1 プラスミドを *XhoI* で切断し、平滑化した後に、*BamHI* で切断することによって *AATL1* cDNA の完全長コード配列を得た。pBI121 ベクター (Clontech) を *SacI* で切断し、平滑化した後に、*BamHI* で切断することによって、ベクター中の *GUS* 遺伝子コード配列を削除した。これに *AATL1* cDNA の完全長コード配列を挿入することによって p35S-AATL1 ベクター (35S::*AATL1* 融合遺伝子を含む) を作

成した。pCAATL1 を鋳型とし、AATL1F3 プライマー (CGGGATCCATGAAAGGGT-ATCTTGAAGAAG) と AATL1R1 プライマーを用いて、94 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 1.5 分間を 35 サイクルする PCR を行った。これによって AATL1 cDNA のアミノ末端領域 (60 残基) を削除したコード配列を増幅した。この増幅産物を AATL1R1 プライマー配列中の XhoI サイトで切断し、平滑化した後に、AATL1F3 プライマー配列中の BamHI サイトで切断した。この断片を pBI121 の BamHI-SacI (平滑化) サイトへ挿入することによって p35S-ΔAATL1 ベクター (35S::ΔAATL1 融合遺伝子を含む) を作成した。

エレクトロポレーションによって pAATL1-GUS、p35S-AATL1 および p35S-ΔAATL1 をアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) の LBA4404 株へ導入した。これらの形質転換アグロバクテリウムを floral dip 法 (Clough and Bent, 1998) によってシロイヌナズナへ感染させた。感染個体から得られた種子を 50 µg/ml のカナマイシンと 100 µg/ml カルベニシリンを含んだ MS 寒天培地に播種し、形質転換されたシロイヌナズナを選抜した。

X-gluc 染色

Martin ら (1992) の方法に従って、形質転換体を 37 °C で 2 日間 X-gluc 染色した。芽生えおよび花芽は蒸留水を滴下したスライドグラスに載せ、カバーグラスで軽く押しつぶした。その他の器官は蒸留水を入れたプラスチックシャーレに置き、水中に沈めた。これらの試料をカメラ FDX および写真撮影装置 H-III を装着した実体顕微鏡 SMZ-U (Nikon) を用いて撮影した。

花芽の組織切片を以下の通りに作成した。花芽を X-gluc 染色した後、更に 50 % エタノールに溶かした 0.01 % サフラニンで染色した。これをエタノールシリーズで脱水した後、Technovit 7100 樹脂 (Kulzer) で包埋した。ミクロトームを用いて 12 µm の厚さの切片を作成し、これをスライドグラスに張り付け、ENTELLAN neu (Merck) を滴下してカバーグラスで封入した。作成した試料を C5810-01 color chilled 3 CCD camera (HAMAMATSU PHOTONICS) を取り付けた ECLIPSE E800M 顕微鏡 (Nikon) を用いて写真撮影を行った。

RT-PCR 解析

RNA PCR kit (AMV) ver. 2.1 (Takara) を用いて RT-PCR を行った。RNeasy plant mini kit (Qiagen) によって各器官から total RNA を調製し、これを逆転写反応の鋳型として用いた。AATL1F2 プライマーと AATL1R1 プライマーを用いて AATL1 の完全長コード配列を増幅した。AATL1F4 プライマー (CTGCATCGTTCTGTCTCAGC) と AATL1R4 プライマー (GTGAACCAGAAGTCGAAGGC) プライマーを用いて AATL1

の部分コード配列を増幅した。AAP2F1 プライマー (GCGGTACCAAGAGGAGATGGGTGAAA) と AAP2R1 プライマー (GCGAATTCGTTTCATGGTCCATAATCATC) プライマーを用いて *AiAAP2* の完全長コード配列を増幅した。EF1 α F1 プライマー (TCGAGACCACCAAGTACTACTGC) と EF1 α R1 プライマー (ATCATACCAGTCTCAACACGTCC) を用いて EF-1 α 遺伝子群の部分コード配列を増幅した。これら全てのプライマーセットについて、94 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 1.5 分間を 35 サイクルする PCR を行った。増幅産物を 1 % アガロースゲル電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイドで染色した。

結果

AATL 遺伝子群の単離

LIM8 cDNA と関連する塩基配列をデータベースにおいて検索したところ、シロイヌナズナに由来するいくつかのゲノミック DNA 塩基配列および Expressed Sequence Tag (EST) 塩基配列が見いだされた。これらの内、BAC クローン F28D8 に含まれている遺伝子断片のコード配列と BAC クローン F21J9 に含まれている遺伝子のコード配列が *LIM8* と特に高い相同性を示した。F28D8 に含まれている遺伝子断片に amino acid transporter-like protein 1 (*AATL1*)、F21J9 に含まれている遺伝子に *AATL2* と命名し、完全長のコード領域を含んだ *AATL1* のゲノミッククローンと *AATL1* および *AATL2* の cDNA クローンの単離を試みた (図 12)。

BAC クローン F28D8 の塩基配列をもとに設計したプライマーと、シロイヌナズナの花芽より調製した total RNA を用いて 3'-RACE を行い、*AATL1* の部分的なコード配列を得た。この部分的なコード配列をプローブに用いて、シロイヌナズナのゲノミックライブラリーをハイブリダイゼーションスクリーニングしたところ、4.6 kbp のゲノミック DNA が挿入されているクローンが単離された。このゲノミッククローンの塩基配列を決定したところ、アミノ酸トランスポーター様のコード配列とその 5' 上流配列 (1.6 kbp) が含まれていた。

単離した *AATL1* ゲノミッククローンの塩基配列と BAC クローン F21J9 の塩基配列をもとにして、*AATL1* と *AATL2* の完全長のコード配列を増幅するプライマーセットを設計した。これらのプライマーセットと花芽由来の total RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、1.6 kbp の *AATL1* cDNA および 1.3 kbp の *AATL2* cDNA が増幅された。その後、*AATL1* cDNA および *AATL2* cDNA の配列をもとにしてプライマーを設計し、*AATL1* については 5'-RACE を、*AATL2* については 5'-RACE と 3'-RACE を行った。これによって *AATL1* mRNA および *AATL2* mRNA の末端配

列を明らかにした。

AATL 遺伝子群についてサザン解析を行い、これらと関連する遺伝子の検索を試みた (図 13)。しかしながら、ハイブリダイゼーションによって交差認識される遺伝子は見いだされなかった。

***AATL* 遺伝子群の配列解析**

AATL1 mRNA は 519 アミノ酸残基の、*AATL2* mRNA は 441 アミノ酸残基のタンパク質をコードする ORF を有することが見いだされた (図 14)。疎水性プロットを作成したところ、*AATL* タンパク質群はいずれも 11 回の予測膜貫通性部位が検出され、膜タンパク質であることが予測された (図 15A)。相同性検索を行ったところ、*AATL* タンパク質群は *AtAAP1/NAT2* から *AtAAP5* が含まれる amino acid/auxin permease (AAP) ファミリーのメンバーと相同性を示すことが見いだされた (表 1)。

AATL タンパク質群とその関連タンパク質群の間で分子系統解析を行った (図 16)。その結果、*AATL1* は *LIM8* と最も類似しており、これらは新規のサブグループを形成していることが示された (図 16E)。一方、*AATL2* はシロイヌナズナのリジン/ヒスチジントランスポーターである *AtLHT1* や *Nicotiana sylvestris* の推定アミノ酸トランスポーターである *NsAAP1* と近縁であり、これらは同じサブグループに属していることが示された (図 16E)。また、*LIM8* と *AATL1* のグループ (図 16E) は、オーキシントランスポーターを含むグループ (図 16A)、プロリントランスポーターを含むグループ (図 16B)、基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターを含むグループ (図 16C) よりも、リジン/ヒスチジントランスポーターを含むグループ (図 16D) と近縁であることが示された。

AATL1 と *LIM8* はアミノ末端からカルボキシル末端まで良く類似しており、*LIM8* と同様に、*AATL1* のアミノ末端領域についてもセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んでいることが明らかになった (図 14、15B)。一方、*AATL2* と *LIM8* は膜貫通性領域において類似性が見られたが、アミノ末端領域が互いに異なっていた (図 15B)。

***AATL* 遺伝子群の mRNA の蓄積様式**

RNA ゲルプロットによって *AATL* 遺伝子群の mRNA の蓄積様式を解析した (図 17)。*AATL1* mRNA の蓄積は花芽において見られたが、開花した花ではほとんど見られなかった。一方、*AATL2* mRNA の蓄積は花芽においてほとんど見られなかったが、開花した花ではわずかに見られた。栄養器官において、*AATL1* mRNA の蓄積は根と花茎で見られたのに対して、*AATL2* mRNA の蓄積は葉で見られた。テッポウユリ *LIM15* の相同遺伝子である *AtDMC1* についても解析を行ったところ、*AtDMC1*

mRNA は花芽において蓄積していたが、開花した花では蓄積量が減少していた。また、*AtDMC1* mRNA は果実や根においても蓄積が観察された。

シロイヌナズナにおける *AATL1::GUS* 融合遺伝子の発現様式

AATL1 遺伝子の 5' 上流配列と部分コード配列 (17 bp) を含むゲノミック DNA を *GUS* 遺伝子のコード配列に連結して融合遺伝子 (*AATL1::GUS*) を作成した。バイナリーベクターの T-DNA 配列に挿入された *AATL1::GUS* 融合遺伝子をアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入し、形質転換体を作成した。*AATL1::GUS* を含んだ形質転換シロイヌナズナについて X-gluc 染色を行い、*GUS* の発現様式を観察した (図 18)。*GUS* の発現は芽生えにおいて胚軸や幼根の基部で見られたが、胚軸と根の細胞伸長領域、茎頂、根端、子葉では見られなかった (図 18A)。根における *GUS* の発現は栄養成長期の植物体でも観察された (図 18B)。生殖成長期の植物体では花芽においてのみ発現が観察された (図 18C)。花芽と花の集合を分解して詳細に調べたところ、*GUS* の発現は花芽が 0.4 mm 程度に発達してから開花するまでの間に葯で特異的に観察された (図 18D、E、F)。他の花器官である花糸、雌蕊、花弁、萼において *GUS* の発現は観察されなかった。

葯における *GUS* の詳細な発現様式を解析するため、X-gluc 染色した花芽の組織切片を作成して観察を行った (図 19)。その結果、*GUS* は葯特異的に発現していることが確認され、更に葯の全ての組織で発現していることが明らかになった (図 19A、B)。次に、時期的な特異性を明らかにするため、葯の発生段階に従って発現様式を調べた。その結果、葯の全ての組織が形成された段階では、いずれの組織においても *GUS* の発現は観察されなかった (図 19C)。その後、小孢子母細胞の減数分裂開始付近から減数分裂期を通して、葯の全ての組織で *GUS* の発現が観察された (図 19D、E、F、I、J)。そして、四分子から分離した小孢子 (花粉粒) が体細胞分裂を経て成熟する過程においても葯全体で *GUS* の発現は継続していたが、花粉粒が成熟して葯が裂開する段階ではほとんど *GUS* の発現は見られなかった (図 19G、H、K、L)。

35S::*AATL1* および 35S::*ΔAATL1* を導入したシロイヌナズナの解析

カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターに、*AATL1* cDNA の完全長コード配列あるいはアミノ末端領域 (60 残基) を欠失したコード配列を連結して、35S::*AATL1* 融合遺伝子および 35S::*ΔAATL1* 融合遺伝子を作成した (図 20A)。バイナリーベクターの T-DNA 配列に挿入された 35S::*AATL1* および 35S::*ΔAATL1* をアグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入し、形質転換体を作成した。

形質転換体における導入遺伝子の発現を確認するため、葉および花茎より調製し

た total RNA を鋳型に用いて RT-PCR 解析を行った (図 20B)。その結果、独立した 2 つの 35S::*AATL1* 導入系統 (#1、#2) について、葉と花茎で野生型よりも著しい *AATL1* 完全長コード配列の増幅が観察され、外来性の完全長 *AATL1* mRNA の蓄積が示された。また、独立した 3 つの 35S::*ΔAATL1* 導入系統 (#1 から #3) について、葉と花茎で野生型よりも著しい *AATL1* 部分コード配列の増幅が観察され、外来性の欠失変異 *AATL1* mRNA の蓄積が示された。

基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターをコードする *AtAAP2* 遺伝子の発現を RT-PCR によって解析した (図 20B)。その結果、葉ではいずれの 35S::*AATL1* 導入系統においても *AtAAP2* mRNA の蓄積が消失しており、花茎では *AATL1* mRNA の蓄積がより多い方の 35S::*AATL1* 導入系統 (#2) において *AtAAP2* mRNA の蓄積が消失していることが観察された。一方、いずれの 35S::*ΔAATL1* 導入系統においても葉と花茎で *AtAAP2* mRNA の蓄積に顕著な変化は見られなかった。

形質転換体の形態を観察したところ、いずれの 35S::*AATL1* 導入系統も野生型よりロゼット葉の枚数が増加しており、複数のロゼット型シュートが重なっている様な形態が見られた (図 21A、B)。また、35S::*AATL1* 導入系統は複数の花芽を同時に形成することと、野生型と比較して花成誘導、花茎伸長、開花の全ての過程において著しい遅延が観察された (図 21D、E)。しかしながら、35S::*AATL1* 導入系統は稔性や種子の発芽率については異常が見られなかった。一方、いずれの 35S::*ΔAATL1* 導入系統も野生型との形態的な違いを見いだせなかった (データ省略)。

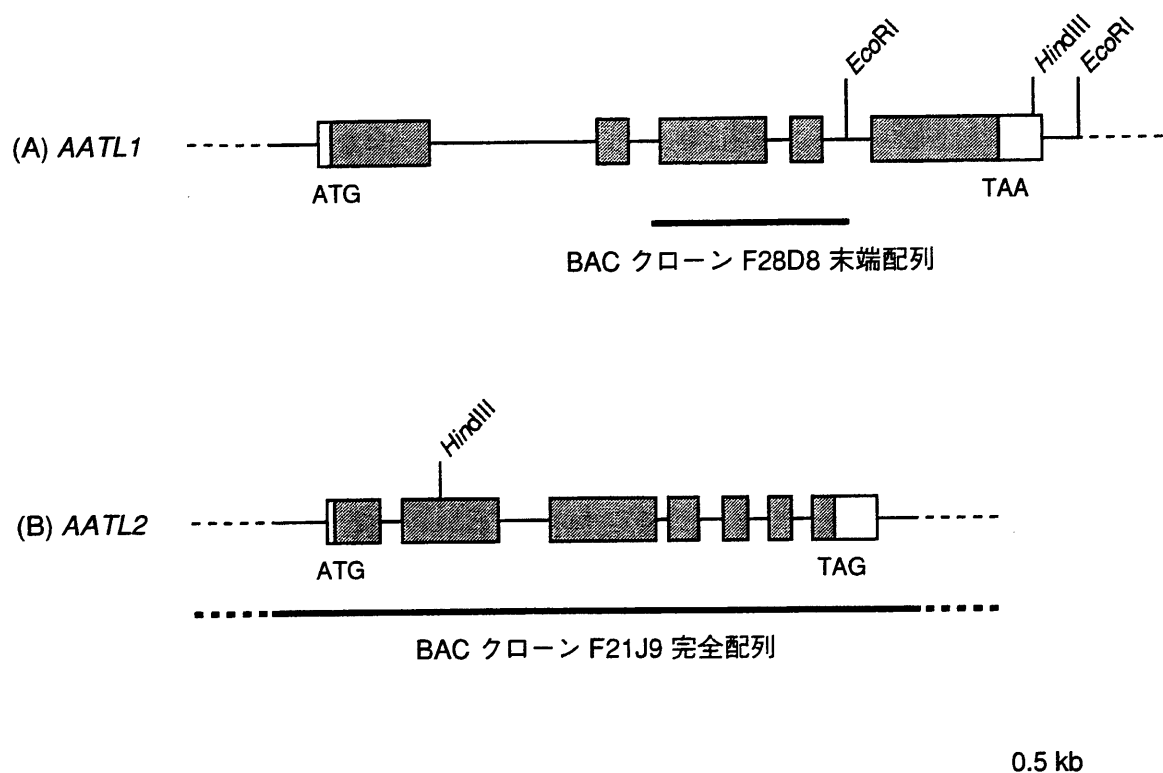


図 12 *AATL* 遺伝子群とそれらに対応する BAC クローンの模式図

AATL 遺伝子群のエクソンを箱で示し、コード配列を灰色で示した。これらに対応するゲノミック DNA の BAC クローンを太線で示した。翻訳開始コドン、翻訳終止コドンおよびゲノミックサザン解析に用いた制限酵素サイトを示した。(A) BAC クローン F28D8 の末端配列をもとにプライマーを設計し、3'-RACE を行った。この増幅産物をプローブに用いて *AATL1* 遺伝子のゲノミッククローンをハイブリダイゼーションスクリーニングによって単離した。*AATL1* ゲノミッククローンの配列をもとにプライマーセットを設計し、RT-PCR によって *AATL1* cDNA を増幅した。更に、5'-RACE によって *AATL2* mRNA の 5' 末端配列を決定した。(B) BAC クローン F21J9 の完全配列をもとにプライマーセットを設計し、RT-PCR によって *AATL2* cDNA を増幅した。更に、5'-RACE および 3'-RACE によって *AATL2* mRNA の末端配列を決定した。

AATL1

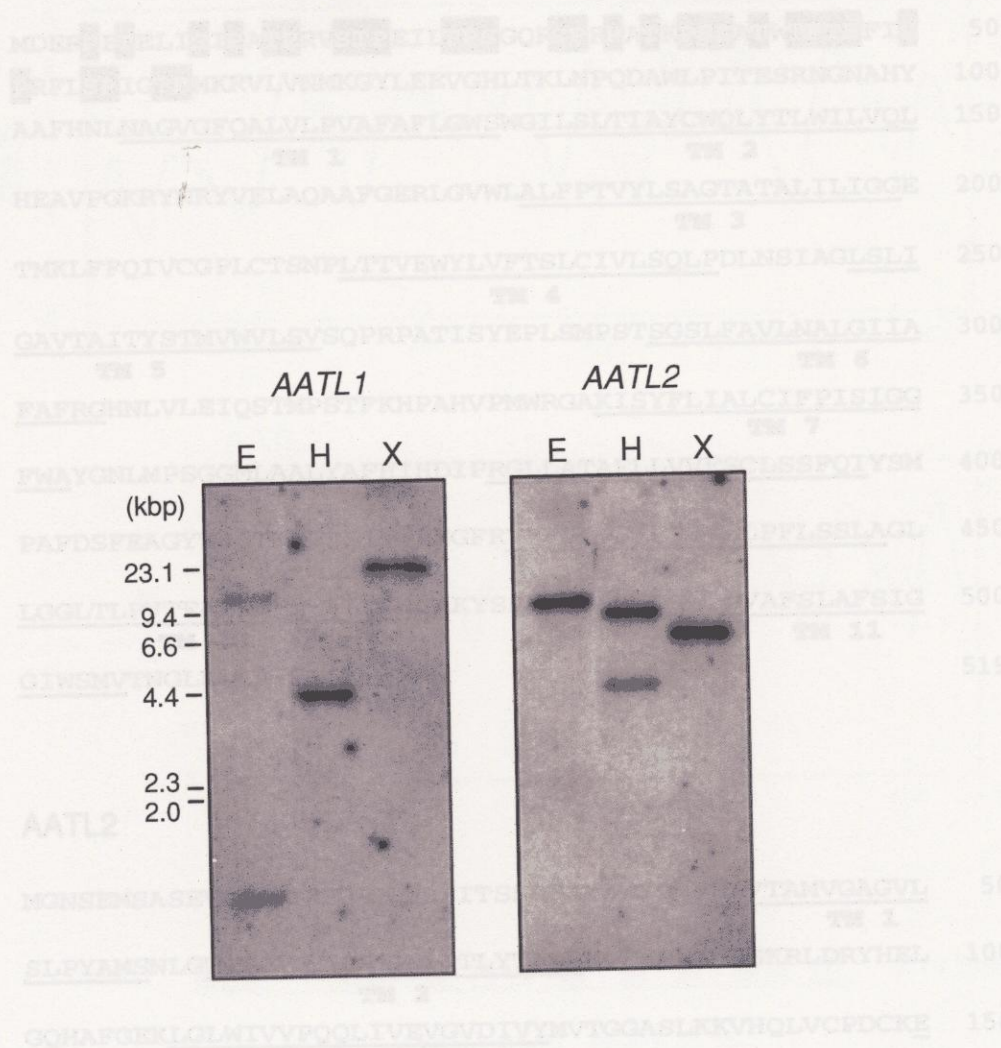


図 13 AATL 遺伝子群のゲノミックサザン解析

シロイヌナズナのゲノミック DNA を *Eco*RI (E)、*Hind*III (H)、*Xba*I (X) で切断した。完全長のコード配列を含んだ AATL1 cDNA/AATL2 cDNA を用いてハイブリダイゼーションを行った。AATL1 は第 4 イントロンに *Eco*RI サイトが、AATL2 は第 2 エクソンに *Hind*III サイトが存在している。

図 14 AATL タンパク質群の予測アミノ酸配列

AATL1 および AATL2 の予測膜貫通性部位 (TM1 から TM11) を下線で示した。AATL1 の 1 から 60 残基までのセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基を白抜き文字で示した。

AATL1

MDERPETELISIPATPRVSTPEILTPSGQFSPRPATKPSSATWTPTSFIS	50
PRFLSPICTPMKRVLVNMGYLEEVGHLTKLNPQDAWLPITESRNGNAHY	100
AAFHNLNAGVGFOALVLPVAFALGWSWGILSLTIAYCWQLYTLWLVLQ	150
<u> TM 1 TM 2 </u>	
HEAVPGKRYNRYVELAQAAFGERLGVWLALFPTVYLSAGTATALILIGGE	200
<u> TM 3 </u>	
TMKLFFQIVCGPLCTSNPLTTVEWYLVFTSLCIVLSQLPDLNSIAGLSLI	250
<u> TM 4 </u>	
GAVTAITYSTMVWVLSVSQPRPATISYEPLSMPSTSGSLFAVLNALGIIA	300
<u> TM 5 TM 6 </u>	
FAFRGHNLVLEIQSTMPSTFKHPAHVPMWRGAKISYFLIALCIFPISIGG	350
<u> TM 7 </u>	
FWAYGNLMPSSGMLAALYAFHIHDIPRGLLATAFLLVVFSCLSFQIYSM	400
<u> TM 8 </u>	
PAFDSFEAGYTSRTNKPCSIWVRSGFRVFFGFVSFFIGVALPFLSSLAGL	450
<u> TM 9 </u>	
LGGLTLPVTFAYPCFMWVLIKKPAKYSFNWYFHWGLGWLGVAFSLAFSIG	500
<u> TM 10 TM 11 </u>	
GIWSMVTNGLKLFKPPN	519

AATL2

MGNSEMSASEVAAAKQKNVDDWLPITSSRNAKWWYSAFHNVTAMVGAGVL	50
<u> TM 1 </u>	
SLPYAMSNLWGPVGTIMVMSWIITLYTLWQMDEMHEIVPGKRLDRYHEL	100
<u> TM 2 </u>	
GQHAFGEKLGLWIVVPOQLIVEVGVDIVYMTGGASLKKVHQLVCPDCKE	150
<u> TM 3 </u>	
IRTFWIMIFASVHFVISHLPNFNSISIIISLAAVMSLTYSTIAWAASVH	200
<u> TM 4 TM 5 </u>	
KGVHPDVDYSPRASTDVGKVFNFNLALGDVAFAYAGHNVVLEIQATIPST	250
<u> TM 6 </u>	
PEMPKVPMPWRGVIVAYIVVAICYFPVAFGLGYIFGNSVDDNILEKPK	300
<u> TM 7 </u>	
IWLIAMANMFVVIHVGISYQIFAMPVFDMLETVLVKKMNFNPSFKLRFIT	350
<u> TM 8 </u>	
RSLYVAFTMIVAICVPFFGGLLGFFGGFAFAPTTYLPCIMWLVLKPKR	400
<u> TM 9 TM 10 </u>	
FGLSWTANWFCCIIVGVLLTILAPIGGLRTIIINAKTYKFFS	441
<u> TM 11 </u>	

図 14 AATL タンパク質群の予測アミノ酸配列

AATL1 および AATL2 の予測膜貫通性部位 (TM 1 から TM 11) を下線で示した。AATL1 の 1 から 60 残基までのセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基を白抜き文字で示した。

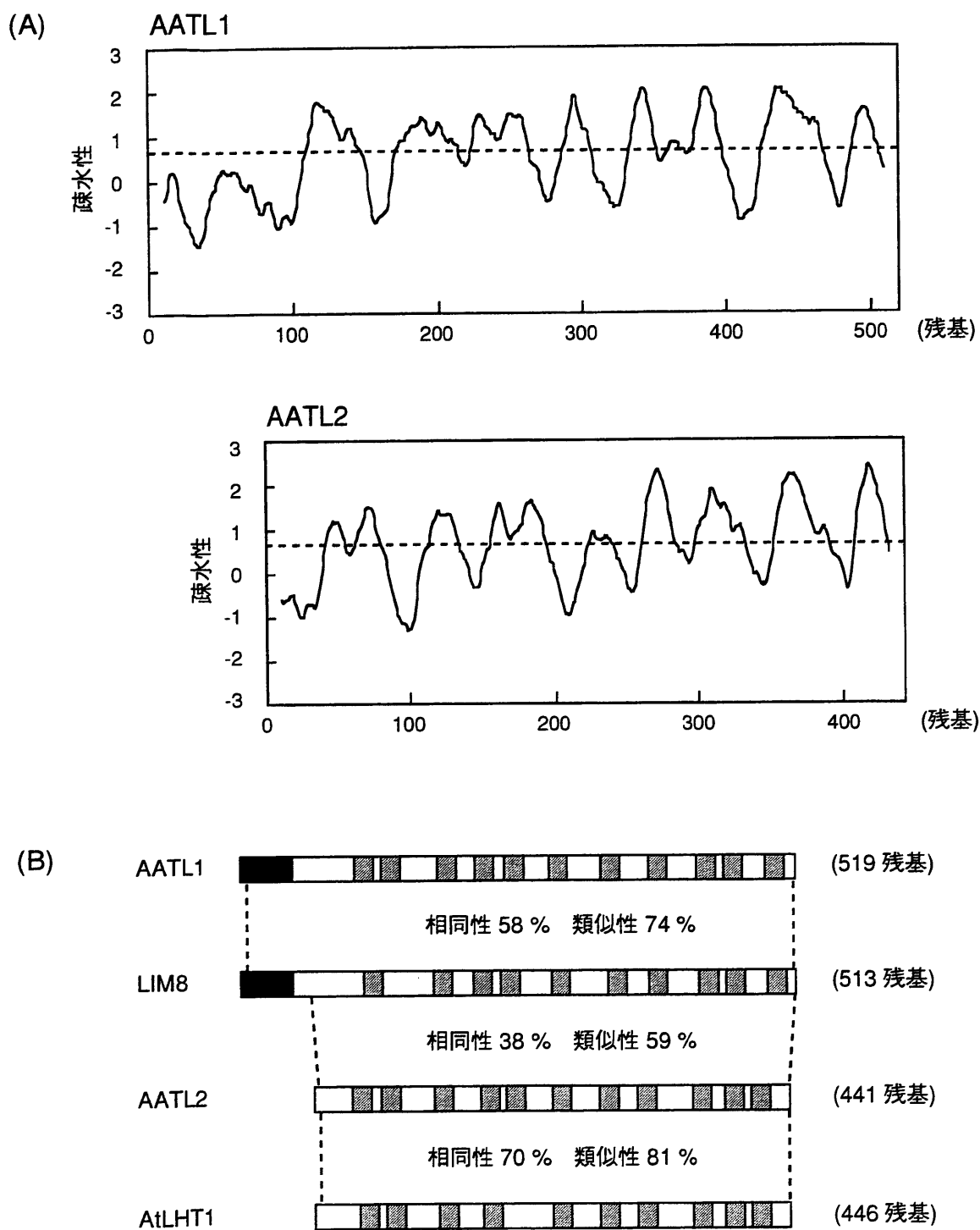


図 15 AATL タンパク質群の一次構造解析

(A) Kyte と Doolittle (1982) の方法に従って疎水性プロットを作成した。0.7 (破線) 以上の疎水性を示すところが膜貫通性部位として検出された。(B) AATL タンパク質群と LIM8、AtLHT1 の模式図に疎水性プロットから予測された膜貫通性部位 (灰色) と AATL1 および LIM8 に特徴的なセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んだ領域 (黒色) を模式図に示した。

表 1 AATL 遺伝子群と関連する遺伝子群^a

種	遺伝子	タンパク質機能	参考文献
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtAAPI/NAT2</i> ^b	中性、酸性アミノ酸トランスポーター	Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993
	<i>AtAAP2</i> ^b	中性、酸性アミノ酸トランスポーター	Kwart et al., 1993
	<i>AtAAP3</i> ^b	非特異的アミノ酸トランスポーター	Fischer et al., 1995
	<i>AtAAP4</i> ^b	中性、酸性アミノ酸トランスポーター	Fischer et al., 1995
	<i>AtAAP5</i> ^b	非特異的アミノ酸トランスポーター	Fischer et al., 1995
	<i>AtAAP6</i> ^b	中性、酸性アミノ酸トランスポーター	Rentsch et al., 1996
	<i>AtProT1</i> ^b	プロリントランスポーター	Rentsch et al., 1996
	<i>AtProT2</i> ^a	プロリントランスポーター	Rentsch et al., 1996
	<i>AtLHT1</i>	リジン、ヒスチジントランスポーター	Chen and Bush, 1997
	<i>AtAUX1</i> ^b	オーキシントランスポーター	Bennett et al., 1996
	<i>F2J7.5</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC079281 ^c
	<i>F11P17.1</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC002294 ^c
	<i>F12B7.20</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC011020 ^c
	<i>F22I13.20</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AL035539 ^c
	<i>F26A9.9</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC016163 ^c
	<i>F26K24.19</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC016795 ^c
	<i>F28J7.9</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC010797 ^c
	<i>K2A18.5</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AB011474 ^c
	<i>K16L22.8</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AB016871 ^c
	<i>MRO11.15</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AB005244 ^c
	<i>T23G18.9</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC011438 ^c
	<i>T27I1.3</i>	推定アミノ酸トランスポーター	AC004122 ^c
	<i>At2g36590</i>	推定プロリントランスポーター	AC006264 ^c
	<i>AtLAX1</i>	推定オーキシントランスポーター	AL137189 ^c
	<i>At2g21050</i>	推定オーキシントランスポーター	AC005770 ^c
	<i>T32E8.2</i>	推定オーキシントランスポーター	AC012193 ^c
	<i>At2g39130</i>	未知	AC005770 ^c
	<i>At2g41190</i>	未知	AC004261 ^c
	<i>F3L24.20</i>	未知	AC011436 ^c
	<i>F3L24.21</i>	未知	AC011436 ^c
	<i>F5E19.80</i>	未知	AL391147 ^c
	<i>F8M21.130</i>	未知	AL353993 ^c
	<i>F28P10.190</i>	未知	AL049655 ^c
	<i>K5K13.9</i>	未知	AB025615 ^c
	<i>T7H20.220</i>	未知	AL162508 ^c
	<i>T7H20.230</i>	未知	AL162508 ^c

次のページへ続く

種	遺伝子	タンパク質機能	参考文献
<i>Atriplex hortensis</i>	AhProT	推定プロリントランスポーター	AF274032 ^c
<i>Lilium longiflorum</i>	LIM8 ^b	推定アミノ酸トランスポーター	Kobayashi et al., 1994
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LeProT1	プロリントランスポーター	Schwacke et al., 1999
	LeProT2	プロリントランスポーター	Schwacke et al., 1999
	LeProT3	プロリントランスポーター	Schwacke et al., 1999
<i>Medicago truncatula</i>	MtLAX1	推定オーキシントランスポーター	AJ299397 ^c
	MtLAX2	推定オーキシントランスポーター	AJ299398 ^c
	MtLAX3	推定オーキシントランスポーター	AJ299399 ^c
<i>Nicotiana sylvestris</i>	NsAAP1 ^b	推定アミノ酸トランスポーター	Lalanne et al., 1995
<i>Oryza sativa</i>	OsProT	推定プロリントランスポーター	AB022783 ^c
	P0407B12.25	推定アミノ酸トランスポーター	AP002843 ^c
<i>Ricinus communis</i>	RcAAP1 ^b	塩基性アミノ酸トランスポーター	Marvier et al., 1998
	RcAAP2 ^d	推定アミノ酸トランスポーター	Bick et al., 1998
	RcAAP3	非特異的アミノ酸トランスポーター	Neelam et al., 1999
<i>Vicia faba</i>	VfAAP2	芳香族アミノ酸トランスポーター	Montamat et al., 1999
<i>Zea mays</i>	ZmAUX1	推定オーキシントランスポーター	AJ011794 ^c

a 分子系統解析の結果からいずれも AAAP ファミリーのメンバーと考えられた。

b Young ら (1999) によって AAAP ファミリーのメンバーとして報告されている。

c DDBJ/NCBI/EMBL のアクセッションナンバーを示した。

d コード配列の全長が明らかにされていない。

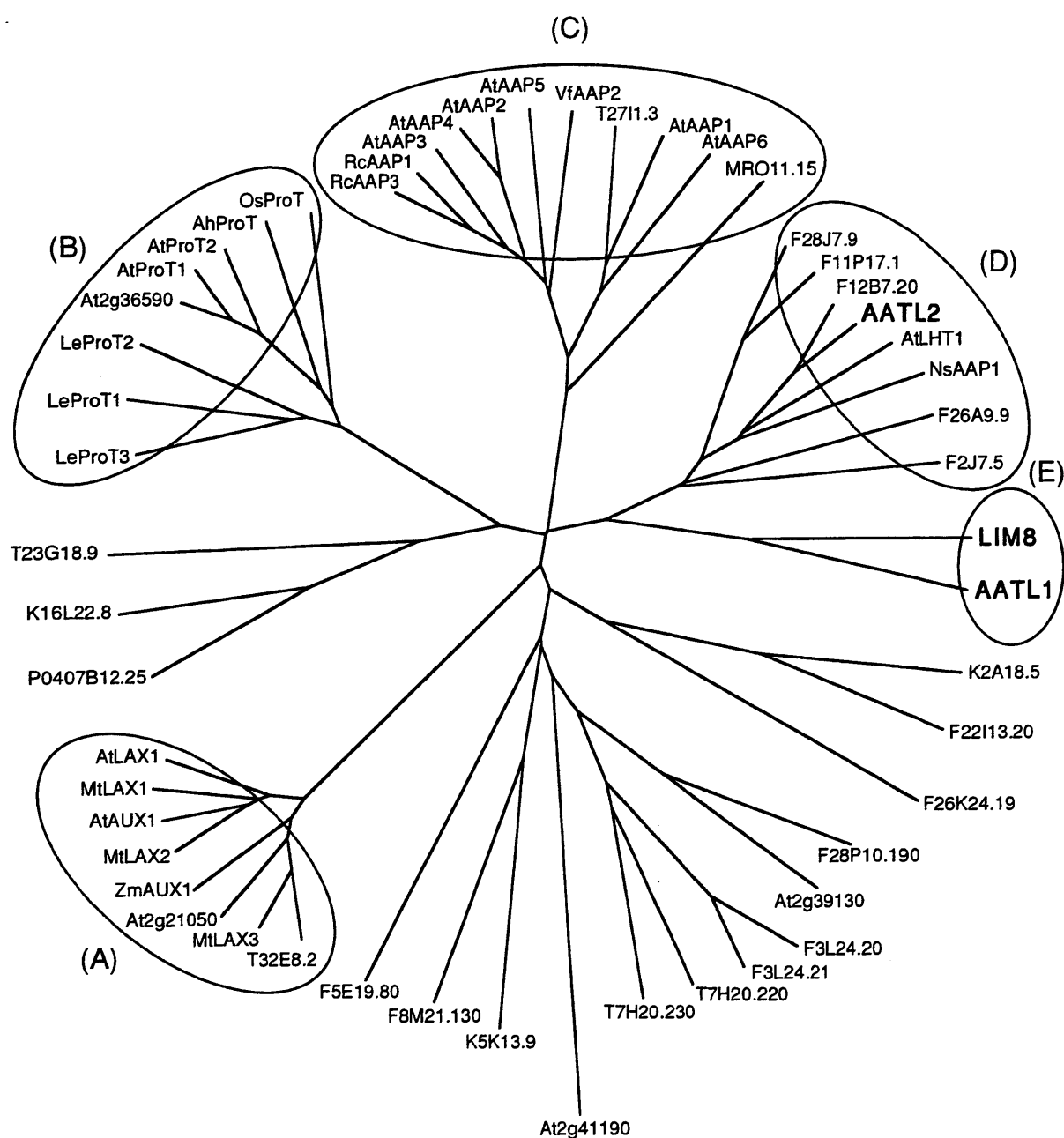


図 16 AATL タンパク質群とその関連タンパク質群との分子系統比較

AATL タンパク質群とその関連タンパク質群との間で予測アミノ酸配列のマルチプルアライメントを行い、分子系統樹を作成した。枝の長さは系統的な距離と比例している。LIM8、AATL1、AATL2 は文字を強調して示した。オーキシントランスポーターを含むグループ (A)、プロリントランスポーターを含むグループ (B)、非特異的アミノ酸トランスポーターを含むグループ (C)、リジン/ヒスチジントランスポーターを含むグループ (D)、LIM8 と AATL1 のグループ (E) を楕円で囲んだ。各々の遺伝子に関する情報は表 1 に記した。

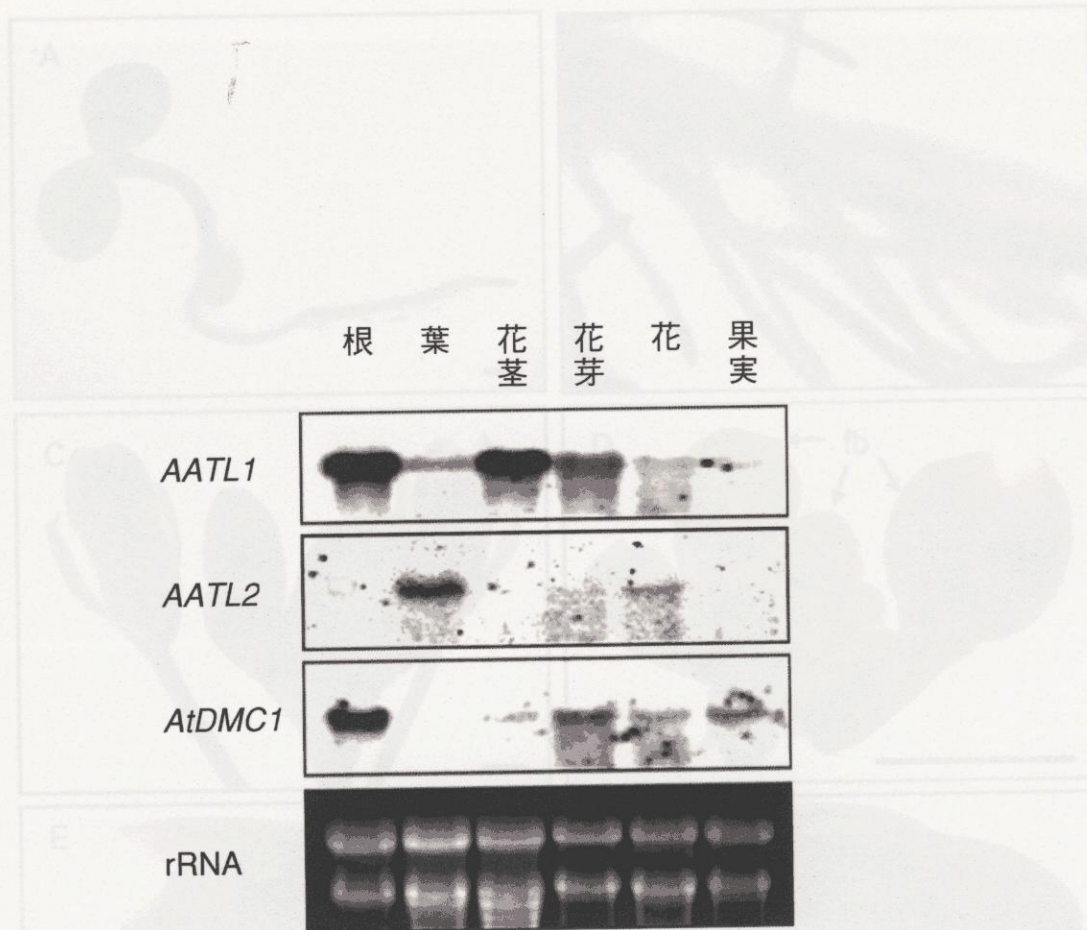


図 17 AATL 遺伝子群の mRNA の蓄積様式

シロイヌナズナの各部位から調製した total RNA を用いて RNA ゲルブロット解析を行った。シロイヌナズナ *LIM* 相同遺伝子の対照として、*LIM15* の相同遺伝子である *AtDMC1* を示した。rRNA を全レーンの対照として示した。

図 18 形質転換シロイヌナズナにおける AATL::GUS 融合遺伝子の発現様式
AATL::GUS 融合遺伝子を含む形質転換体を X-gluc 染色した。発芽から 3 日目の芽生え (A)、発芽から 14 日目の個体の根 (B)、開花した花と花芽 (C)、若い花序 (D)、花芽 (E)、開花した花 (F) を観察した。花芽 (fb)、葯 (a)、花糸 (f) を矢印で示した。スケールバーは 0.5 mm を示す。

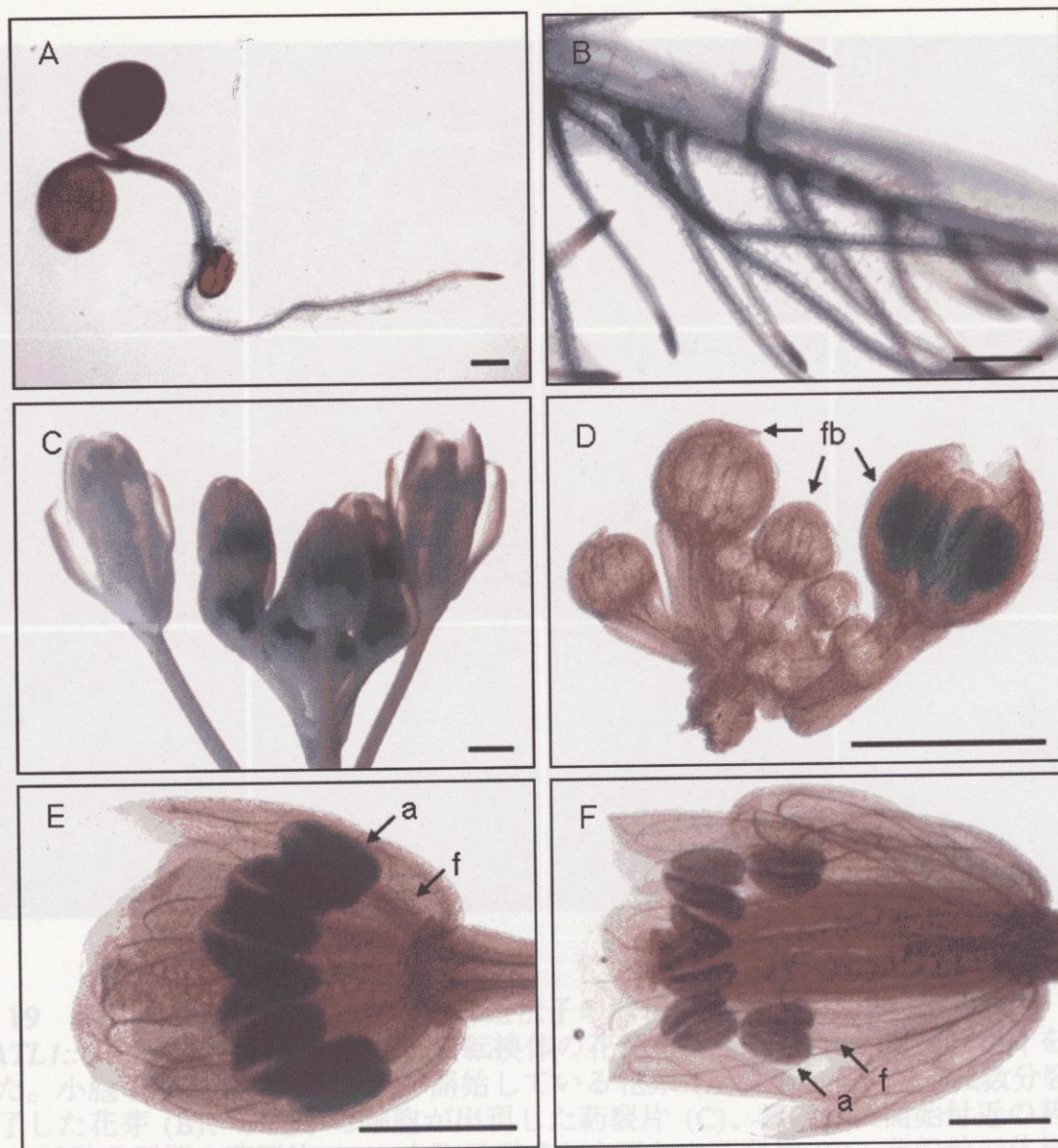


図 18 形質転換シロイヌナズナにおける *AATL1::GUS* 融合遺伝子の発現様式
AATL1::GUS 融合遺伝子を含む形質転換体を X-gluc 染色した。発芽から 3 日目の芽生え (A)、発芽から 14 日目の個体の根 (B)、開花した花と花芽 (C)、若い花序 (D)、花芽 (E)、開花した花 (F) を観察した。花芽 (fb)、葯 (a)、花糸 (f) を矢印で示した。スケールバーは 0.5 mm を示す。

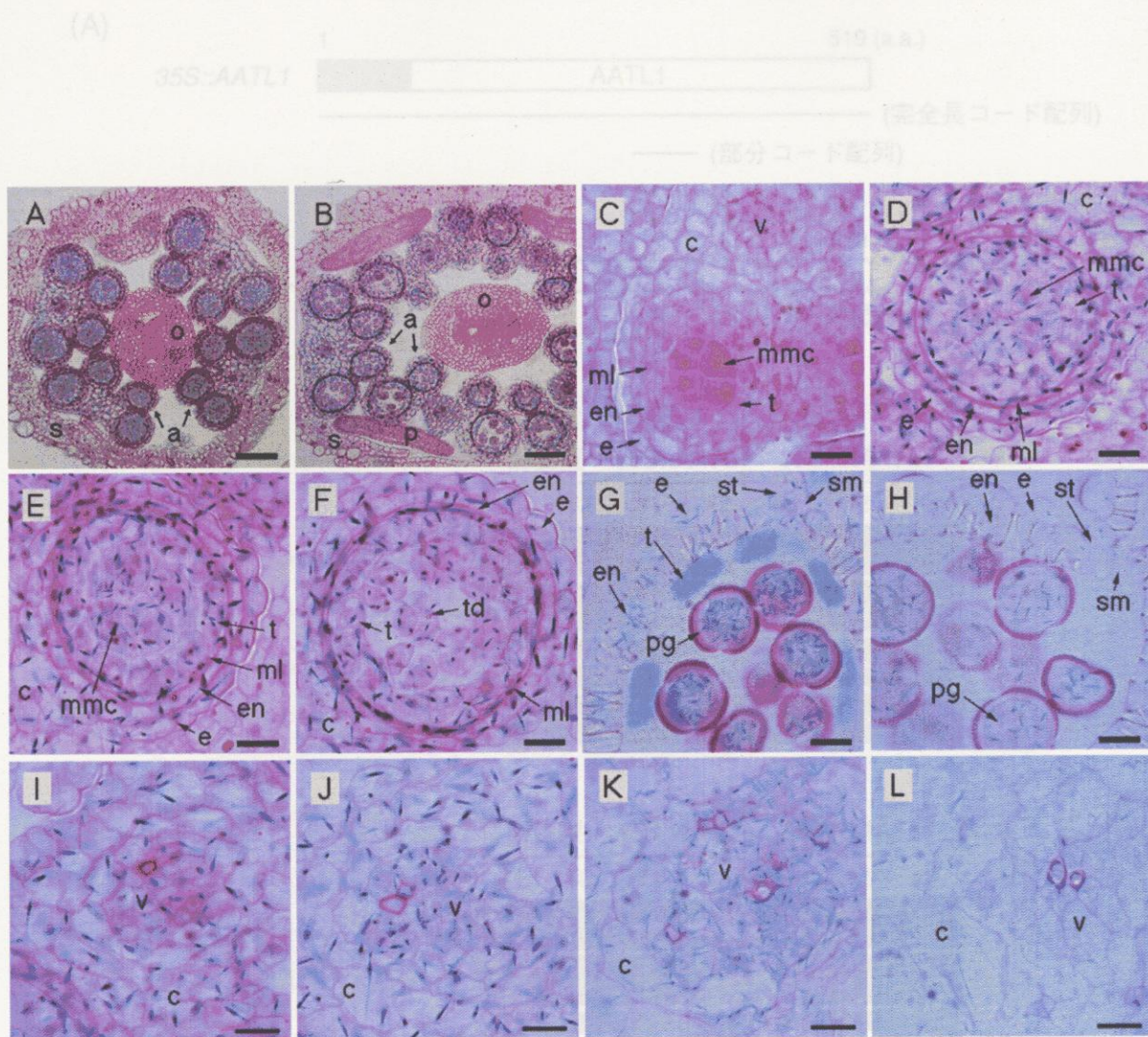


図 19 葯における *AATL1::GUS* 融合遺伝子の発現様式

AATL1::GUS 融合遺伝子を含む形質転換体の花芽を X-gluc 染色した後、切片を作成した。小孢子母細胞で減数分裂が開始している花芽 (A)、小孢子形成 (減数分裂) が完了した花芽 (B)、小孢子母細胞が出現した葯裂片 (C)、減数分裂開始付近の葯裂片 (D)、減数分裂期の葯裂片 (E)、小孢子形成が完了した葯裂片 (F)、花粉粒で体細胞分裂が起こっている葯裂片 (G)、成熟花粉粒を含む葯裂片 (H)、減数分裂開始付近の葯の維管束 (I)、減数分裂期の葯の維管束 (J)、花粉粒で体細胞分裂が起こっている葯の維管束 (K)、成熟花粉を含む葯の維管束 (L) を観察した。葯 (a)、子房 (o)、萼 (s)、花弁 (p)、表皮 (e)、内皮 (en)、中間層 (ml)、タペート (t)、小孢子母細胞 (mmc)、葯隔 (c)、維管束 (v)、四分子 (td)、ストミウム (st)、セプタム (sm) を図中に示した。A および B のスケールバーは 50 μ m を、C から L のスケールバーは 10 μ m を示す。

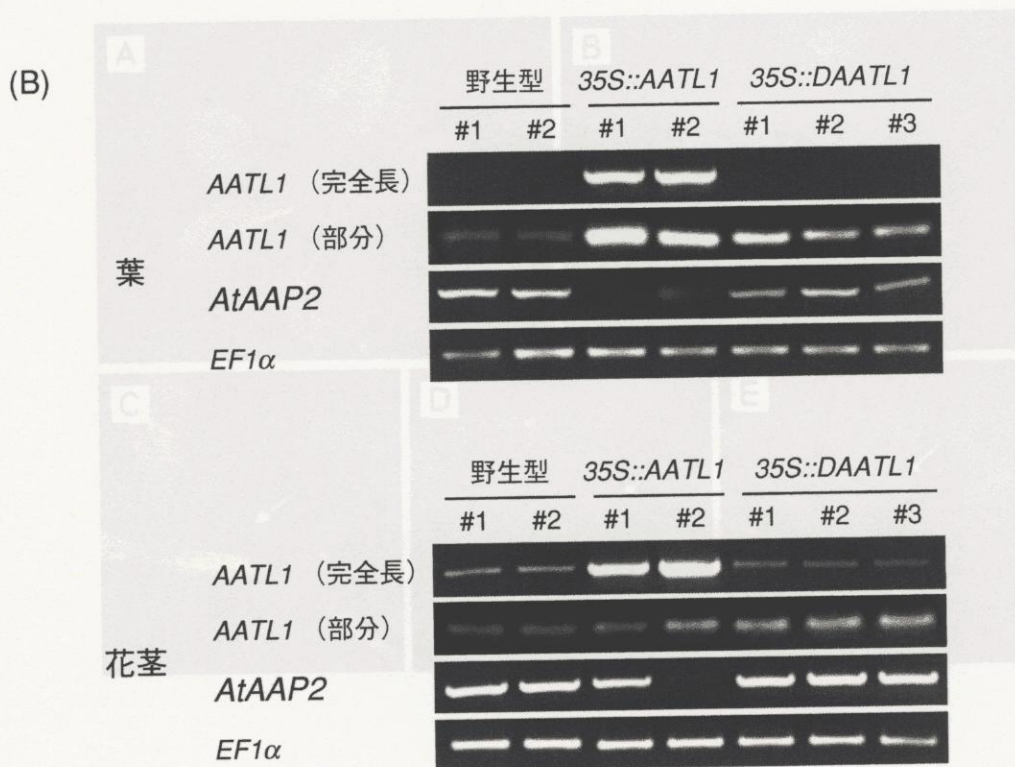
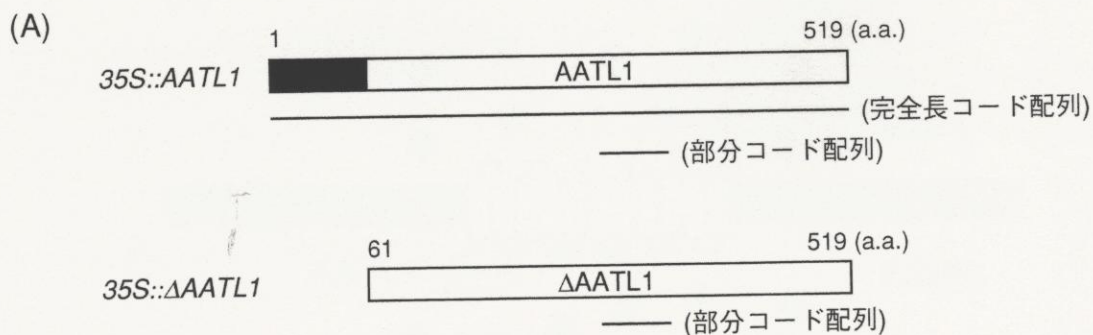


図 20 35S::AATL1 および 35S::ΔAATL1 導入植物の作成と RT-PCR 解析
(A) 形質転換植物の作成に用いた 35S::AATL1 および 35S::ΔAATL1 が発現するタンパク質の模式図を示した。ΔAATL1 は AATL1 の 1 から 60 残基までのセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んだ領域 (黒色) を欠失している。RT-PCR によって増幅した mRNA 配列に対応する部分を線で示した。(B) 独立した 2 つの野生型個体、独立した 2 系統の 35S::AATL1 導入植物および独立した 3 系統の 35S::ΔAATL1 導入植物の、葉と花茎から total RNA を調製して RT-PCR 解析を行った。内在性と外来性の AATL1 mRNA は完全長コード配列と部分コード配列の増幅によって検出した。外来性の ΔAATL1 mRNA は部分コード配列の増幅によって検出した。AtAAP2 は基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子である。EF1α は全レーンの対照として示した。

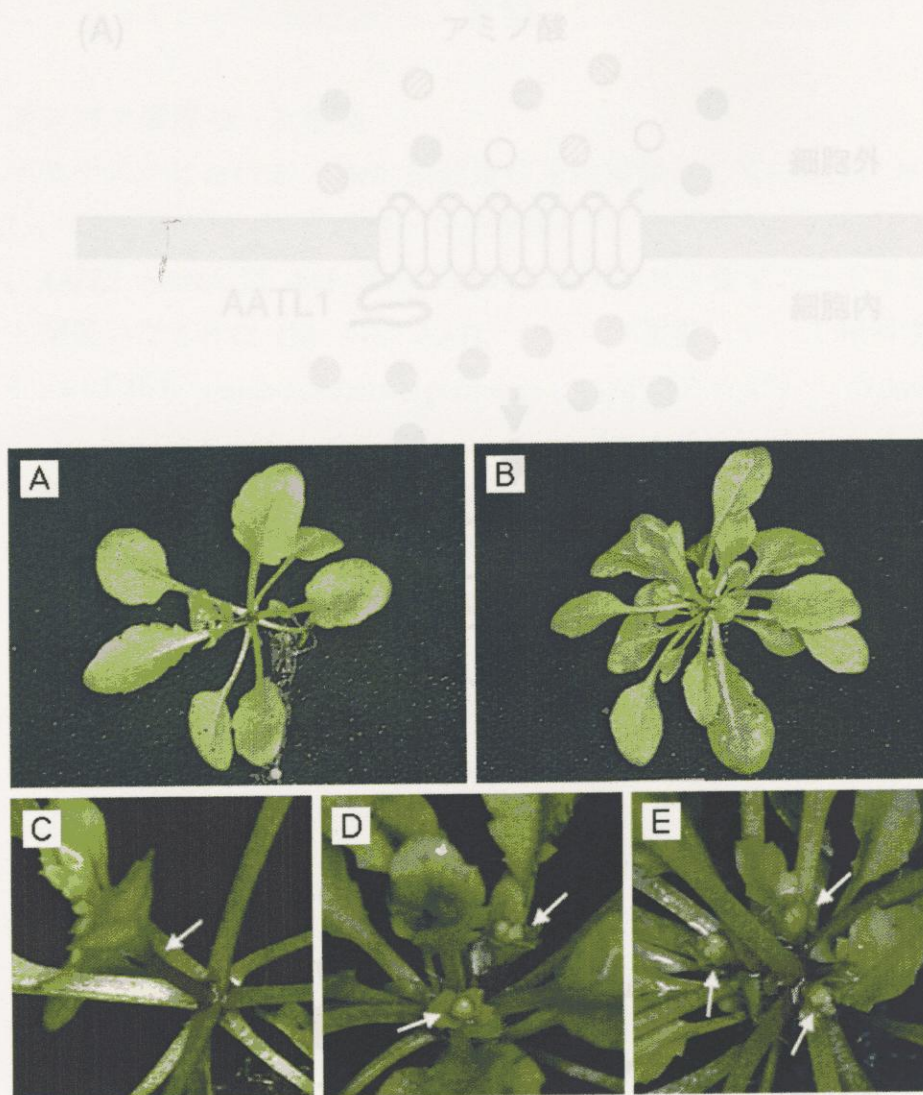


図 21 野生型と 35S::AATL1 融合遺伝子を含むシロイヌナズナの表現型
同条件で栽培した野生型 (A) と形質転換体 (B) の全体像および野生型 (C)
と独立した 2 系統の形質転換体 (D、E) の拡大像を示した。拡大像の矢印
は花芽を形成したシュートを示す。

図 22 35S::AATL1 による AIAAP2 の発現抑制機構に関するモデル

(A) AATL1 はアミノ酸トランスポーターとして機能しており、AATL1 の過剰発現によって細胞内に過剰なアミノ酸が蓄積したため、それによって生じるシグナルによって AIAAP2 の発現が抑制された可能性を示している。(B) AATL1 はアミノ酸センサーとして機能しており、AATL1 の過剰発現によって遺伝子発現を調節するシグナルが増幅されたため、AIAAP2 の発現が抑制された可能性を示している。

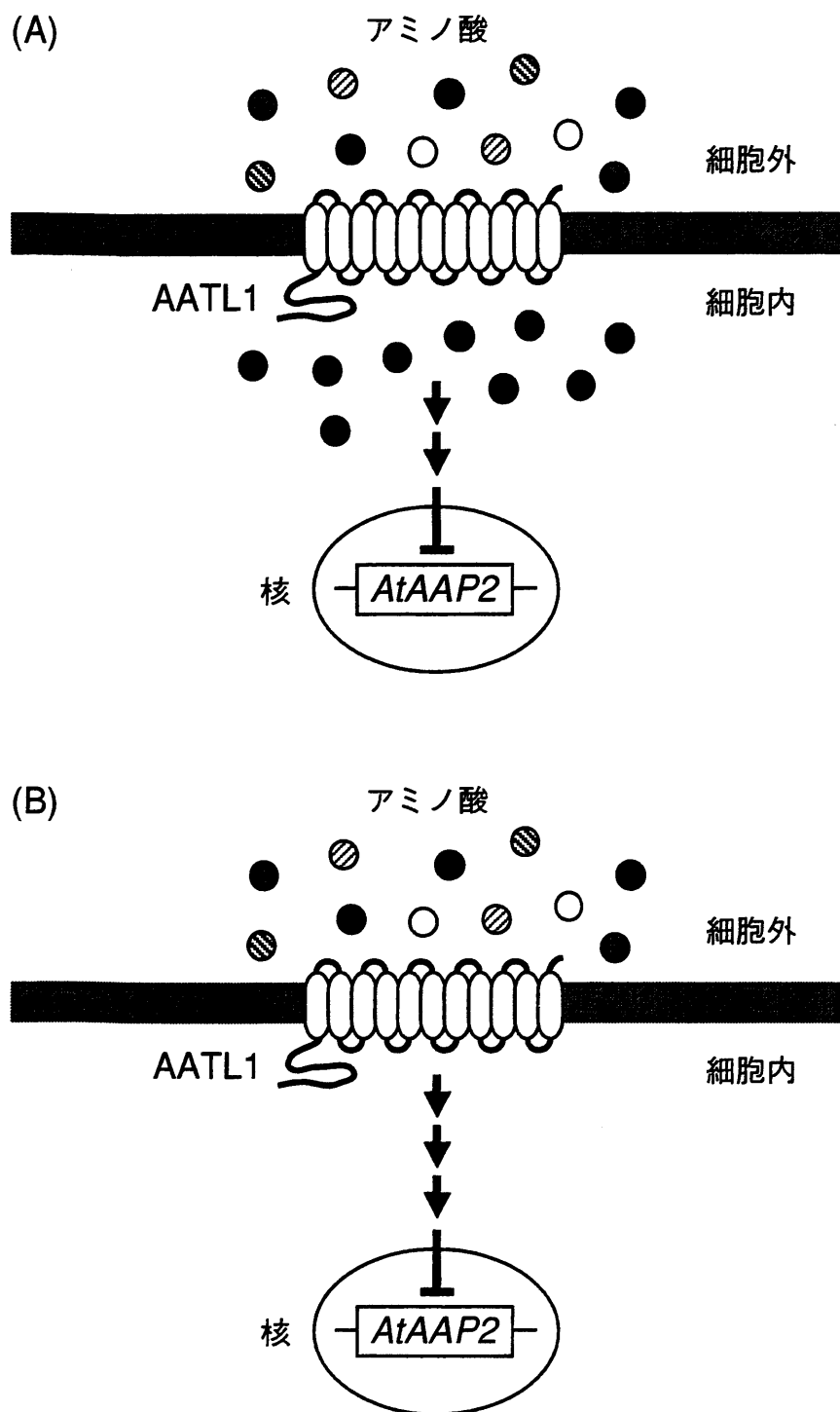


図 22 35S::AATL1 による *AtAAP2* の発現抑制機構に関するモデル

(A) AATL1 はアミノ酸トランスポーターとして機能しており、AATL1 の強制発現によって細胞内に過剰なアミノ酸が蓄積したため、それに由来するシグナルによって *AtAAP2* の発現が抑制された可能性を示している。(B) AATL1 はアミノ酸センサーとして機能しており、AATL1 の強制発現によって遺伝子発現を制御するシグナルが増幅されたため、*AtAAP2* の発現が抑制された可能性を示している。

考察

AATL タンパク質群の一次構造

シロイヌナズナにおける *LIM8* 相同遺伝子の候補として *AATL1* および *AATL2* を同定し、それぞれの cDNA クローンを単離した。*AATL1* mRNA は 519 アミノ酸残基の、*AATL2* mRNA は 441 アミノ酸残基のタンパク質をコードする ORF を有することが見いだされた (図 14)。*AATL* タンパク質群について相同性検索を行ったところ、いずれも amino acid/auxin permease (AAP) ファミリー (Young et al. 1999) のメンバーと相同性を示すことが見いだされた (表 1)。AAP ファミリーのメンバーは疎水性プロットの解析から 11 回膜貫通型の膜タンパク質であると考えられている (Young et al., 1999)。また、*NAT2* は実験によって 11 回膜貫通型の膜タンパク質であることが示唆されている (Chang and Bush, 1997)。*AATL* タンパク質群について疎水性プロットを作成したところ、いずれも 11 回の予測膜貫通性部位が検出された (図 15A)。これらのことから、*AATL* タンパク質群は他の AAP ファミリーのメンバーと同様に 11 回膜貫通型の膜タンパク質であると考えられた。

本研究を開始した当初、高等植物における AAP ファミリーのメンバーはシロイヌナズナから単離された基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターの *AtAAP1/NAT2* から *AtAAP5*、*Nicotiana sylvestris* から単離された推定アミノ酸トランスポーターの *NsAAP1* およびテッポウユリから単離された機能未知の *LIM8* だけであった。現在では、様々な植物種から推定のものを含めて数多くのアミノ酸トランスポーターおよびオーキシントランスポーターが単離されている。これらは基質特異性によって、基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーター、プロリントランスポーター、リジン/ヒスチジントランスポーター、オーキシントランスポーターに分類されている。また、シロイヌナズナにおいて全ゲノム塩基配列の解読が行われたことにより、AAP ファミリーのメンバーと考えられる数多くのタンパク質が同定されている (The Arabidopsis genome Initiative, 2000)。

AATL タンパク質群とその関連タンパク質群との間で分子系統解析を行った (図 16)。その結果、*AATL1* は *LIM8* と最も類似しており、これらは新規のサブグループを形成していることが示された (図 16E)。一方、*AATL2* はシロイヌナズナのリジン/ヒスチジントランスポーターである *AtLHT1* や *Nicotiana sylvestris* の推定アミノ酸トランスポーターである *NsAAP1* と近縁であり、これらは同じサブグループに属していることが示された (図 16D)。また、*LIM8* と *AATL1* のグループ (図 16E) は、オーキシントランスポーターを含むグループ (図 16A)、プロリントランスポーターを含むグループ (図 16B)、基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターを含むグループ (図 16C) よりも、リジン/ヒスチジントランスポーターを含むグループ

(図 16D) と近縁であることが示された。

AATL タンパク質群と LIM8 の一次構造を詳細に調べたところ、AATL1 と LIM8 はアミノ末端からカルボキシル末端までよく類似しているが、AATL2 と LIM8 はアミノ末端領域が著しく異なっていることが見いだされた (図 15B)。第一章において、LIM8 は他の植物アミノ酸トランスポーターと比較してアミノ末端から第一予測膜貫通性部位までが長く、その領域 (60 残基) はセリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んでいることが見いだされていた。そして、LIM8 のアミノ末端領域と類似した配列は AATL1 にも保存されていることが見いだされた (図 14)。AATL1/LIM8 のアミノ末端領域は、既知の植物アミノ酸トランスポーターに存在しない機能的な特徴を AATL1/LIM8 に付与している可能性が考えられた。以上の一次構造の解析結果から AATL1 と LIM8 はともにアミノ酸トランスポーターと関連した機能を有し、互いに特性が類似していることが推察された。

AATL 遺伝子群の mRNA の蓄積様式

第一章において、LIM8 mRNA は葯および小孢子母細胞で蓄積していることが示されていた (図 5)。そこで、AATL 遺伝子群の mRNA が葯および小孢子母細胞を含む花芽で蓄積しているのかどうかを RNA ゲルブロットによって解析した (図 17)。その結果、AATL1 mRNA の蓄積は葯および小孢子母細胞を含む花芽において見られたが、開花した花ではほとんど見られなかった。一方、AATL2 mRNA の蓄積は花芽においてほとんど見られなかったが、開花した花においてわずかに見られた。これらのことから、AATL1 は LIM8 と同様に小孢子形成過程で機能する可能性あると考えられた。

LIM8 mRNA は根、茎、葉において蓄積していないことが示されていた (図 5)。しかしながら、AATL1 mRNA は根と花茎で著しく蓄積していることが示された (図 17)。これと同様のことは、遺伝子組換え酵素 RecA の類似タンパク質をコードするテッポウユリの LIM15 と、そのシロイヌナズナの相同遺伝子である AtDMC1 の間でも観察された。LIM15 mRNA は根、茎、葉において蓄積していないことが示された (図 5)。これに対して、AtDMC1 mRNA は根で著しく蓄積していることが示された (図 17)。また、AtDMC1 mRNA は懸濁培養細胞においても著しく蓄積していることがこれまでに報告されている (Doutriaux et al., 1998)。これらのことから、シロイヌナズナの small spore 形成に関連する遺伝子は small spore 母細胞以外の場所でも mRNA が蓄積し得ると考えられている。現在のところ、AtDMC1 タンパク質が花芽以外の器官で発現しているかどうかは明らかになっていない。しかしながら、AtDMC1 に T-DNA が挿入されたホモ接合変異体は、稔性の低下が見られるものの、その他の発生過程は正常であることが報告されている (Couteau et al., 1999)。以上のことから、

AATL1 は花芽だけでなく栄養器官においても mRNA の蓄積が見られるが、小孢子形成過程だけで機能する可能性があると考えられた。

シロイヌナズナにおける *AATL1::GUS* 融合遺伝子の発現様式

一次構造の特徴と mRNA の蓄積様式から、*AATL1* は *LIM8* と同様に小孢子形成過程で機能する可能性が考えられた。そこで、*AATL1* 遺伝子の発現様式を詳細に解析するために、*AATL1* 遺伝子の 5' 上流配列および部分コード配列 (17 bp) を含むゲノミック DNA と *GUS* 遺伝子の融合遺伝子 (*AATL1::GUS*) を用いて組織化学的な発現様式の解析を行った (図 18)。その結果、*AATL1::GUS* を導入したシロイヌナズナにおいて、花芽で *GUS* の発現が観察された (図 18C)。更に、*GUS* の発現は花芽が 0.4 mm 程度に発達してから開花するまでの間に葯で特異的に観察された (図 18D、E、F)。他の花器官である花糸、雌蕊、花弁、萼において *GUS* の発現は観察されなかった。Peirson ら (1996) が報告したシロイヌナズナの花芽の大きさと小孢子形成および花粉成熟の段階の関係を指標にしたところ、*GUS* は減数分裂前から花粉成熟が完了するまでの間で発現していることが示唆された。

葯における *GUS* の詳細な発現様式を解析するため、花芽の組織切片を作成して観察を行った (図 19)。その結果、*GUS* は葯特異的に発現していることが確認され、更に葯の全ての組織で発現していることが明らかになった (図 19A、B)。また、Sanders ら (1999) の報告を指標にして葯の発生段階を同定したところ、*GUS* は減数分裂期と花粉体細胞分裂期を通して発現していることが明らかになった (図 19D-L)。内在性の *AATL1* は *AATL1::GUS* と同じか類似した様式で発現していることが示唆された。第一章において、*LIM8* タンパク質は減数分裂期の小孢子母細胞で特異的に発現することが示されていた (図 6A、7)。このことから、*AATL1::GUS* は内在性 *AATL1* の発現様式を精確に再現していないことが考えられた。これまでに、*LIM15* の相同遺伝子である *AtDMC1* の mRNA は孢子母細胞特異的に蓄積しているのに対して、*AtDMC1* 5' 上流領域と *GUS* の融合遺伝子は葯および子房の全体で発現していることが報告されている (Klimyuk et al., 1997)。また、雄蕊および雌蕊の形成に必要な *AGAMOUS* (*AG*) 遺伝子の発現様式を、*GUS* との融合遺伝子によって再現するためには、*AG* の 5' 上流領域だけでなくコード領域も必要であることが報告されている (Sieburth and Meyerowitz, 1997)。これらのことから、内在性の *AATL1* は *LIM8* と同様に減数分裂期の小孢子母細胞で特異的に発現している可能性があると考えられた。

35S::*AATL1* および 35S::*ΔAATL1* を導入したシロイヌナズナの解析

AATL1 遺伝子の機能を分子遺伝学的に解析することを試みた。そこで、35S::*AATL1* 融合遺伝子によって、完全長の *AATL1* を強制発現する形質転換シロイヌナズナを

作成した。また、AATL1 が機能するためには、セリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んだアミノ末端領域 (60 残基) が必要であるのかどうかについて興味を持たれた。そこで、35S:: Δ AATL1 融合遺伝子によって、そのアミノ末端領域を欠失した AATL1 (Δ AATL1) を強制発現する形質転換シロイヌナズナを作成した。これらの形質転換体について RT-PCR 解析を行ったところ、35S::AATL1 導入植物では独立した 2 つの系統 (#1、#2) について、葉と花茎で外来性の完全長 AATL1 mRNA の蓄積が示された。また、35S:: Δ AATL1 導入植物では独立した 3 つの系統 (#1、#2、#3) について、葉と花茎で外来性の欠失変異 AATL1 mRNA の蓄積が示された。

形質転換体の形態を観察したところ、いずれの 35S::AATL1 導入系統も野生型よりロゼット葉の枚数が増加しており、複数のロゼット型シュートが重なっている様な形態が見られた (図 21A、B)。また、35S::AATL1 導入系統は複数の花芽を同時に形成することと、野生型と比較して花成誘導、花茎伸長、開花の全ての過程において著しい遅延が観察された (図 21D、E)。これらのことから、35S::AATL1 は形質転換体において何らかの機能を発現したことが示唆された。一方、いずれの 35S:: Δ AATL1 導入系統も野生型との形態的な違いを見いだせなかった (データ省略)。このことから、AATL1 が機能発現するためには、セリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んだアミノ末端領域が必要であることが示唆された。

AATL1 がアミノ酸トランスポーターに関連した機能を有するのであれば、AATL1 の強制発現によって個体内のアミノ酸局在様式が変化して、他のアミノ酸トランスポーター群の発現様式に変化が現れることが予想された。そこで、基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターをコードする AtAAP2 の発現様式を RT-PCR によって解析した (図 20B)。その結果、葉ではいずれの 35S::AATL1 導入系統においても AtAAP2 mRNA の蓄積が消失しており、花茎では AATL1 mRNA の蓄積がより多い方の 35S::AATL1 導入系統 (#2) において AtAAP2 mRNA の蓄積が消失していることが観察された。このことから、AATL1 タンパク質はアミノ酸トランスポーターとして機能しており、AATL1 の強制発現によって細胞内に過剰なアミノ酸が蓄積したため、それに由来するシグナルによって AtAAP2 の発現が抑制された可能性が考えられた (図 22A)。また、他の AAP ファミリーの遺伝子についても発現様式が変化していることが予想された。35S:: Δ AATL1 導入植物はいずれの系統においても葉と花茎で AtAAP2 mRNA の蓄積に顕著な変化は見られなかった。このことから、AATL1 が機能発現するためにはアミノ末端領域が必要であることが示唆された。

近年、出芽酵母から単離されたアミノ酸トランスポーター様の Ssy1p はアミノ酸センサーとして機能することが報告されている (Didion et al., 1998; Iraqui et al., 1999; Klasson et al., 1999)。Ssy1p はアミノ酸輸送能を有しておらず、細胞外のアミノ酸を感知し、そのシグナルを細胞内へ伝達することによってアミノ酸輸送系およびアミ

ノ酸合成系の遺伝子発現を制御していると考えられている。また、出芽酵母から単離されたグルコーストランスポーター様の Snf3p と Rgt2p はグルコースセンサーとして機能することが報告されている (Liang and Gaber, 1996; Ozucan et al., 1996)。Ssy1p はアミノ末端領域が他のアミノ酸トランスポーター群よりも長く、Snf3p と Rgt2p はカルボキシル末端領域が他のグルコーストランスポーター群よりも長いことが示されている。そして、Snf3p と Rgt2p のカルボキシル末端領域は遺伝子発現の制御に必須であることが明らかにされている。これらのことから、AATL1 タンパク質はアミノ酸センサーとして機能しており、AATL1 の強制発現によって遺伝子発現を制御するシグナルが増幅されたため、AtAAP2 の発現が抑制された可能性も考えられた(図 22B)。

総括

これまでに、高等植物における減数分裂と小孢子形成の全体像を理解するため、テッポウユリの小孢子母細胞で転写誘導される 18 種類の Lily messages Induced at Meiosis (*LIM*) 遺伝子に対応する cDNA 群が単離されていた。本研究では、*LIM* 遺伝子の一つである *LIM8* とそのシロイヌナズナ相同遺伝子である *AATLI* について機能解析および 5' 上流領域の特徴付けを行った。

1) テッポウユリの小孢子母細胞で発現する *LIM8* 遺伝子

LIM8 タンパク質は amino acid/auxin permease (AAAP) ファミリーに属することが示され、アミノ酸トランスポーターと関連した機能を有することが考えられた。*LIM8* のアミノ末端領域 (60 残基) は既知のアミノ酸トランスポーター群と異なり、セリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んでいることが見いだされた。また、出芽酵母のヒスチジン輸送系変異株において、基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターである AtAAP1 から AtAAP5 は生育相補ができるのに対して、*LIM8* は生育相補ができなかった。これらのことから、*LIM8* は AtAAP 群とは特性の異なるタンパク質であることが示された。

LIM8 遺伝子について発現様式の解析を行ったところ、mRNA レベルにおいてもタンパク質レベルにおいても *LIM8* は減数第一分裂前期から減数分裂完了時までの小孢子母細胞で特異的に発現していることが明らかになった。また、*LIM8* タンパク質は減数分裂完了時の前後で蓄積量が著しく増加することが示された。テッポウユリの小孢子母細胞と、小孢子母細胞を含む葯について遊離アミノ酸の動態を調査したところ、減数分裂完了時の前後で、分枝側鎖アミノ酸であるバリンとロイシンの含量および組成比が上昇することが明らかになった。この要因の一つとして、*LIM8* が小孢子母細胞あるいは葯の構成細胞へバリンとロイシンを取り込んでいる可能性が考えられた。

LIM8 タンパク質は疎水性プロットの解析から、他の AAAP ファミリーのアミノ酸トランスポーターと同様に 11 回膜貫通型の膜タンパク質であることが推察された。更に、小孢子母細胞の細胞分画によって、*LIM8* はミクロソーム画分への局在が示された。そこで、組織免疫染色実験を行ったところ、*LIM8* に由来するシグナルは小孢子母細胞の原形質膜と細胞壁が存在する場所から特異的に検出された。これらのことから、*LIM8* は小孢子母細胞の原形質膜に局在することが示唆された。

LIM8 遺伝子の 5' 上流領域 (0.6 kbp) をインバース PCR 法によって単離した。この 5' 上流領域について *GUS* との融合遺伝子をテッポウユリの小孢子母細胞へ導入したところ、*GUS* の一過性発現によってプロモーター活性が示された。更に、*LIM8*

遺伝子 5' 上流領域とホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*F-luc*) の融合遺伝子をテッポウユリの小胞子母細胞と葉へ導入したところ、小胞子母細胞では葉よりも約 40 倍高い *F-luc* 活性が示された。このことから、*LIM8* 遺伝子 5' 上流領域 (0.6 kbp) は小胞子母細胞で特異的に活性化されることが示唆された。

2) *LIM8* 遺伝子と相同なシロイヌナズナの *AATL1* 遺伝子

LIM8 遺伝子と高い相同性を示すシロイヌナズナのゲノミック塩基配列に amino acid transporter-like protein 1 (*AATL1*) と命名し、これに対応するゲノミッククローンおよび cDNA クローンを単離した。*AATL1* は *LIM8* と同様に、セリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んだアミノ末端領域 (60 残基) を有することが見いだされた。そして、分子系統解析から *AATL1* と *LIM8* は AAAP ファミリーにおいて新規のサブグループを形成していることが示された。

AATL1 mRNA は小胞子形成の起こる花芽で蓄積していることが示された。また、*AATL1* 遺伝子 5' 上流領域と *GUS* の融合遺伝子 (*AATL1::GUS*) はシロイヌナズナの花芽において、葯の全ての組織で小胞子形成過程と花粉成熟過程を通して発現することが示された。そして、内在性の *AATL1* 遺伝子は *AATL1::GUS* 融合遺伝子と同じか類似した様式で発現していることが推察された。これらのことから、小胞子形成過程において *AATL1* は *LIM8* と同様の役割を担っていることが示唆された。

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと完全長 *AATL1* コード配列の融合遺伝子 (*35S::AATL1*) を導入した形質転換シロイヌナズナではロゼット葉の枚数が増加し、頂芽優性が減少することが観察された。更に、*35S::AATL1* 導入植物では葉と花茎において基質特異性の範囲が広いアミノ酸トランスポーターをコードする *AtAAP2* の発現が消失することが示された。このことから、1) *AATL1* タンパク質はアミノ酸トランスポーターとして機能しており、*AATL1* の強制発現によって細胞内に過剰なアミノ酸が蓄積したため、それに由来するシグナルによって *AtAAP2* の発現が抑制された可能性と、2) *AATL1* タンパク質はアミノ酸センサーとして機能しており、*AATL1* の強制発現によって遺伝子発現を制御するシグナルが増幅されたため、*AtAAP2* の発現が抑制された可能性が考えられた。また、セリン残基、スレオニン残基、プロリン残基に富んだ 60 残基のアミノ末端領域を欠失した *AATL1* は完全長 *AATL1* と同様な表現型の変化を引き起こせないことが観察された。このことから *AATL1* の機能発現にはアミノ末端の 60 残基が重要であると考えられた。

参考文献

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410
- Anderson, L.K., Offenberg, H.H., Verkuijlen, W.M.H.C. and Heyting, C. (1997). RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6868-6873
- Bai, X., Reirson, B.N., Dong, F., Xue, C. and Makaroff, C.A. (1999). Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 417-430
- Bate, N. and Twell, D. (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol. Biol.* 37, 859-869
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B. and Feldmann, K.A. (1996). *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948-950
- Bernstein, R.L. and Henke, R.R. (1982). Rapid proline uptake in cultured tobacco cells and inhibition by a proline analog. *FEBS Lett.* 141, 283-286
- Bhatt, A.M., Lister, C., Page, T., Fransz, P., Findlay, K., Jones, G.H., Dickinson, H.G. and Dean, C. (1999). The *DIF1* gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the *REC8/RAD21* cohesin gene family. *Plant J.* 19, 463-472

Bick, J.A., Neelam, A., Hall, J.L. and Williams, L.E. (1998). Amino acid carriers of *Ricinus communis* expressed during seedling development: molecular cloning and expression analysis of two putative amino acid transporters, RcAAP1 and RcAAP2. *Plant Mol. Biol.* 36, 377-385

Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. (1991). *Protein Methods*. (New York: Wiley-Liss Inc). pp. 131-132

Carpenter, A.T.C. (1988). Thoughts on recombination nodules, meiotic recombination, and chiasmata. In *Genetic Recombination*, R. Kucherlapati and G.R. Smith, eds. (Washington D.C.: American Society for Microbiology), pp. 529-548

Caryl, A.P., Armstrong, S.J., Jones, G.H. and Franklin, F.C. (2000). A homologue of the yeast *HOP1* gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asyl*. *Chromosoma* 109, 62-71

Chang, H.C. and Bush, D.R. (1997) Topology of NAT2, a prototypical example of a new family of amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* 272, 30552-30557

Chaudhury, A.M., Lavithis, M. Taylor, P.E. Craig, S., Singh, M.B., Signer, E.R., Knox, R.B. and Dennis, E.S. (1994). Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analysis of premeiotic developmental mutants. *Sex. Plant Reprod.* 7, 17-28

Chen, L. and Bush, D.R. (1997). LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 115, 1127-1134

Claros, M.G. and Heijne, G.V. (1994). TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 685-686

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-

mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16, 735-743

Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D. and Doutriaux, MP. (1999). Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of *Arabidopsis*. Plant Cell 11, 1623-1634

Dawson, J., Wilson, Z.A., Aarts, M.G.M., Braithwaite, A.F., Briarty, L.G. and Mulligan, B.J. (1992). Microspore and pollen development in six male-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana*. Can. J. Bot. 71, 629-638

Didion, T., Regenberg, B., Jorgensen, M.U., Kielland-Brandt, M.C. and Andersen, H.A. (1998). The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 27, 643-650

Doutriaux, MP., Couteau, F., Bergounioux, C. and White, C. (1998). Isolation and characterisation of the *RAD51* and *DMC1* homologs from *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Gent. 257, 283-291

Dunwell, J.M. (2000). Transgenic approaches to crop improvement. J. Exp. Bot. 51 Spec., 487-496

Engelman, D.M., Steitz, T.A. and Goldman, A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices into amino acid sequences of membrane proteins. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15, 321-353

Erickson, R.O. (1948). Cytological and growth correlations in the flower bud and anther of *Lilium longiflorum*. Am. J. Botany 35, 729-739

Eyal, Y., Curie, C. and McCormick, S. (1995). Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes. *Plant Cell* 7, 373-384

Fischer, W.N., Kwart, M., Hummel, S. and Frommer, W.B. (1995). Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 270, 16315-16320

Fischer, W.N., Andre, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitzkreuz, K. and Frommer, W.B. (1998). Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.* 3, 188-195

Frommer, W.B., Hummel, S. and Riesmeier, J.W. (1993). Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5944-5948

Glover, J., Grelon, M., Craig, S., Chaudhury, A. and Dennis, E. (1998). Cloning and characterization of *MS5* from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis. *Plant J.* 15, 345-356

Gasser, C.S. and Fraley, R.T. (1989). Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244, 1293-1299

Golubovskaya, I.N. (1989). Meiosis in maize: mei genes and the concept of genetic control of meiosis. *Adv. Genet.* 26, 149-192

Haber, J.E. (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell* 95, 583-586

Hamilton, D.A., Roy, M., Rueda, J., Sindhu, R.K., Sanford, J. and Nascarenhas, J.P. (1992). Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant*

Mol. Biol. 18, 211-218

Hamilton, D.A., Schwarz, Y.H. and Mascarenhas, J.P. (1998). A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol. Biol.* 38, 663-669

Harrington, H.M. and Henke, R.R. (1981). Amino acid transport into cultured tobacco cells: I. lysine transport. *Plant Physiol.* 67, 373-378

Hartung, F. and Puchta, H. (2000). Molecular characterisation of two paralogous *SPO11* homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 28, 1548-1554

He, C., Tirlapur, U., Cresti, M., Peja, M., Crone, D.E. Mascarenhas, J.P. (1996). An *Arabidopsis* mutant showing aberrations in male meiosis. *Sex. Plant Reprod.* 9, 54-57

He, C. and Mascarenhas, J.P. (1998). *ME11*, an *Arabidopsis* gene required for male meiosis: isolation and characterization. *Sex. Plant Reprod.* 11, 199-207

Higashitani, A., Tabata, S., Endo, H. and Hotta, Y. (1990a). Purification of DNA ligases from mouse testis and their behavior during meiosis. *Cell Struct. Funct.* 15, 67-72

Higashitani, A., Tabata, S., Ogawa, T., Ogawa, H., Shibata, M. and Hotta, Y. (1990b). ATP-independent strand transfer protein from murine spermatocytes, spermatides, and spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 186, 317-323

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 297-300

Hotta, Y., Tabata, S., Bouchard, R.A., Pinon, R. and Stern, H. (1985). General recombination mechanisms in extracts of meiotic cells. *Chromosoma* 93, 140-151

Hsu, L.C., Chiou, T.J., Chen, L. and Bush, D.R. (1993). Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7441-7445

Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., De Craene, J.O., Boles, E., Urrestarazu, A. and Andre, B. (1999). Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGPI* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol. Cell Biol.* 19, 989-1001

Isegawa, Y., Sheng, J., Sokawa, Y., Yamanishi, K., Nakagomi, O. and Ueda, S. (1992). Selective amplification of cDNA sequence from total RNA by cassette-ligation mediated polymerase chain reaction (PCR): application to sequencing 6.5 kb genome segment of hantavirus strain B-1. *Mol. Cell Probes.* 6, 467-475

Ito, M. and Stern, H. (1967). Studies of meiosis *in vitro*: I. *in vitro* culture of meiotic cells. *Dev. Biol.* 16, 36-53

Izawa, T., Foster, R. and Chua, N.H. (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* 230, 1131-1144

John, M.E. and Petersen, M.W. (1994). Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen-specific polygalacturonase mRNA: tissue and temporal specificity of its promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 26, 1989-1993

Klasson, H., Fink, G.R. and Ljungdahl, P.O. (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane

components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5405-5416

Klimyuk, V.I. and Jones, J.D.G. (1997). *AtDMC1*, the *Arabidopsis* homologue of the yeast *DMC1* gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. *Plant J.* **11**, 1-14

Kobayashi, T., Kobayashi, E., Sato, S., Hotta, Y. Miyajima, N., Tanaka, A. and Tabata, S. (1994). Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes. *DNA Res.* **1**, 15-26

Kriete, G., Niehaus, K., Perlick, A.M., Puhler, A. and Broer, I. (1996). Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. *Plant J.* **9**, 809-818

Kuhlemeier, C., Fluhr, R. and Chua, N.H. (1988). Upstream sequences determine the difference in transcript abundance of pea *rbcS-3A* genes. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 405-411

Kwart, M., Hirner, B., Hummel, S. and Frommer, W.B. (1993). Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **4**, 993-1002

Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132

Lalanne, E., Vedel, F. and Paepe, R.D. (1995). Isolation of a *Nicotiana sylvestris* cDNA (accession No.: U31932) encoding an amino acid transporter homologous to *Arabidopsis thaliana* amino acid permeases. *Plant Physiol.* **109**, 722

Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, P.M., Fang, R.X. and Chua, N.H. (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7890-7894

Li, Z.C. and Bush, D.R. (1990). Δ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves: I. evidence for carrier-mediated, electrogenic flux through multiple transport systems. *Plant Physiol.* 94, 268-277

Li, Z.C. and Bush, D.R. (1991). Δ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves: II. evidence for multiple aliphatic, neutral amino acid symports. *Plant Physiol.* 96, 1338-1344

Liang, H. and Gaber, R.F. (1996). A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*. *Mol. Biol. Cell* 7, 1953-1966

Malone, R.E. (1990). Dual regulation of meiosis in yeast. *Cell* 61, 375-378

Martin, T., Wöhner, R.V., Hummel, S., Willmitzer, L. and Frommer, W.B. (1992). The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*, S.R. Gallagher, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 23-43

Marvier, A.C., Neelam, A., Bick, J.A., Hall, J.L. and Williams, L.E. (1998). Cloning of a cDNA coding for an amino acid carrier from *Ricinus communis* (*RcAAP1*) by functional complementation in yeast: kinetic analysis, inhibitor sensitivity and substrate specificity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1373, 321-331

Matsuo, N., Minami, M., Maeda, T. and Hiratsuka, K. (2001). Dual luciferase assay for monitoring gene expression in higher plants. *Plant Biotechnol.* in press.

Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. and Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282, 662-682

Meyerowitz, E.M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Rev. Genet.* 21, 93-111

Minami, M., Hiratsuka, R., Ogata, S., Takase, H., Hotta, Y. and Hiratsuka, K. (2000). Characterization of a meiosis-associated heat shock protein 70. *Plant Biotechnol.* 17, 145-153

Mitchell, A.P. (1994). Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 58, 56-70

Montamat, F., Maurousset, L., Tegeder, M., Frommer, W. and Delrot, S. (1999). Cloning and expression of amino acid transporters from broad bean. *Plant Mol. Biol.* 41, 259-268

Morohashi, K., Takase, H., Hotta, Y. and Hiratsuka, K. (2000). Large-scale sequencing of meiosis-associated genes from a cDNA library of lily microsporocytes. *Plant Biotechnol.* 17, 131-135

Moses, M.J. (1968). Synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 2, 368-412

Mousavi, A., Hiratsuka, R., Takase, H., Hiratsuka, K. and Hotta, Y. (1999). A novel glycine-rich protein is associated with starch grain accumulation during anther development. *Plant Cell Physiol.* 40, 406-416

Murashige, T. and Skoog, T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with

tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* *15*, 473-497

Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acid. Res.* *8*, 4321-4325

Neelam, A., Marvier, A.C., Hall, J.L. and Williams, L.E. (1999). Functional characterization and expression analysis of the amino acid permease RcAAP3 from castor bean. *Plant Physiol.* *120*, 1049-1056

Ochman, H., Gerber, A.S. and Hartl, D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* *120*, 621-623

Ogata, S.I., Takase, H., Hiratsuka, K. and Hotta, Y. (1999). Mutational analysis of the signal for a nuclear localization of proteins which accumulate specifically during meiosis in lily microsporocytes. *Plant Cell Reports* *19*, 101-105

Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wolfl, S. and Johnston, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 12428-12432

Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* *12*, 357-358

Paul, W., Hodge, R., Smartt, S., Draper, J. and Scott, R. (1992). The isolation and characterisation of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. *Plant Mol. Biol.* *19*, 611-622

Peirson, B.N., Owen, H.A., Feldmann, K.A. and Makaroff, C.A. (1996). Characterization of

three male-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibiting alterations in meiosis. Sex. Plant Reprod. 9, 1-16

Poovaiah, B.W., Xia, M., Liu, Z., Wang, W., Yang, T., Sathyanarayanan, P.V. and Franceschi, V.R. (1999). Developmental regulation of the gene for chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in anthers. *Planta* 209, 161-171

Rao, K.V., Rathore, K.S., Hodges, T.K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D.P., Powell, K.S., Spence, J., Gatehouse, A.M. and Gatehouse, J.A. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* 15, 469-477

Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E. and Frommer, W.B. (1996). Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* 8, 1437-1446

Roeder, G.S. (1990). Chromosome synapsis and genetic recombination. *Trends Genet.* 6, 385-389

Roeder, G.S. (1995). Sex and the single cell: meiosis in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10450-10456

Roeder, G.S. (1997). Meiotic chromosome: it takes two to tango. *Genes Dev.* 11, 2600-2621

Ross, K.J., Fransz, P., Armstrong, S.J., Vizir, I., Mulligan, B., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. (1997). Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines. *Chrom. Res.* 5, 551-559

Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y.C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P. and Goldberg, R.B. (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex. Plant. Reprod.* *11*, 297-322

Schwacke, R., Grallath, S., Breitkreuz, K.E., Stransky, E., Stransky, H., Frommer, W.B. and Rentsch, D. (1999). LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* *11*, 377-391

Sears, E.R. (1976). Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Ann. Rev. Genet.* *10*, 31-51

Serrano, R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *40*, 61-94

Sieburth, L.E. and Meyerowitz, E.M. (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* *9*, 355-365

Smith, P.A. and King, R.C. (1968). Genetic control of synaptnemal complexes in *Drosophira melanogaster*. *Genetics* *60*, 335-351

Tanaka, J. and Fink, G.R. (1985). The histidine permease gene (*HIP1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *38*, 205-214

Taylor, J.H. and McMaster, R. (1954). Autoradiographic and microphotometric studies of

deoxyribose nucleic acid during microsporogenesis in *Lilium longiflorum*. *Chromosoma* 6, 489-521

Taylor, A.A., Horsch, A., Rzepczyk, A., Hasenkampf, C.A. and Riggs, C.D. (1997). Maturation and secretion of a serine proteinase is associated with events of late microsporogenesis. *Plant J.* 12, 1261-1271

Terasawa, M., Shinohara, A., Hotta, Y., Ogawa, H. and Ogawa, T. (1995). Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of the lily at various meiotic stages. *Genes Dev.* 9, 925-934

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680

Thorne, J.H. (1985). Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 317-343

Treacy, B.K., Hattori, J., Prud'homme, I., Barbour, E., Boutilier, K., Baszczynski, C.L., Huang, B., Johnson, D.A. and Miki, B.L. (1997). *Bnm1*, a Brassica pollen-specific gene. *Plant Mol. Biol.* 34, 603-611

Twell, D., Yamaguchi, J. and McCormick, S. (1990). Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* 109, 705-713

Twell, D., Yamaguchi, J., Wing, R.A., Ushiba, J. and McCormick, S. (1991). Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes Dev.* 5, 496-507

Wang, X., Dyer, J.H. and Zheng, L. (1993). Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 486-494

Yamamoto, M. (1986). Regulation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiol. Sci.* 3, 234-237

Yamamoto, M. (1996). Regulation of meiosis in fission yeast. *Cell Struct. Funct.* 21, 431-436

Yang, M., Hu, Y., Lodhi, M., McCombie, W.R. and Ma, H. (1999). The *Arabidopsis* *SKP1-LIKE1* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11416-11421

Young, G.B., Jack, D.L., Smith, D.W. and Saier, M.H.Jr. (1999). The amino acid/auxin: proton symport permease family. *Biochem. Biophys. Acta.* 1415, 306-322

Zabaleta, E., Heiser, V. and Brennicke, A. (1998). Promoters of nuclear-encoded respiratory chain Complex I genes from *Arabidopsis thaliana* contain a region essential for anther/pollen-specific expression. *Plant J.* 15, 49-59

謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導下さった奈良先端科学技術大学院大学植物遺伝子機能学講座の橋本隆先生、堀田康雄先生、平塚和之先生、高瀬尚文先生に心より感謝いたします。平素から研究に関するご助言およびご協力下さった同講座の皆様に感謝いたします。同大学の付属施設および共通機器類の使用に際してお世話になった伊勢恒夫氏、小川恵美子氏、塚本潤子氏に感謝いたします。組織免疫染色実験で共同研究して下さいった東京慈恵会医科大学の平塚理恵先生に感謝いたします。抗体作成にご協力していただいた(株)医学生物学研究所の玉井克之氏、池田雅子氏、井上尚子氏に感謝いたします。酵母 KY11 株を分譲していただいたキリンビール(株)基盤技術研究所の曾根秀隆氏に感謝いたします。最後に、大学院での生活を様々な形で支えてくれた両親の聡と和子、妻の直子に心より感謝します。