

所 属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科 分子生物学専攻 植物遺伝子機能学講座 (島本 功 教授)		
氏 名	皆見 政好	提 出	平成 12年 1月 6日
題 目	テッポウユリの減数分裂時期に発現が誘導される 熱ショックタンパク質の解析		
<i>LIM</i> (Lily messages Induced at Meiosis) は、減数分裂過程が同調して進行するテッポウユリ (<i>Lilium longiflorum</i>) の特徴を活かし同定された18種類の遺伝子であり、それらの多くは花粉母細胞特異的に転写される。これらのうち、<i>LIM18</i>遺伝子産物は、分子シャペロンとして機能するHSP70に高い相同性を示すことから、減数分裂細胞に見られる特徴的な事象 (遺伝子組み換え等) に関与することが期待された。本研究では、<i>LIM18</i>を含むHSP70様タンパク質の機能解析のために、免疫学的手法およびレポーター遺伝子を用いた方法により、発現様式、細胞内所在を調べた。更に、減数分裂特異的遺伝子の発現調節機構を明らかにするために、テッポウユリのゲノムDNAより<i>LIM</i>遺伝子のプロモーター領域を含む断片を単離し、それらの特徴づけを行った。 テッポウユリの花粉母細胞において発現するHSP70様タンパク質の解析 (1) 発現様式：テッポウユリの各組織の抽出物を二次元電気泳動法により分離後、抗<i>LIM18</i>ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、花粉母細胞の抽出物からは、花粉母細胞特異的なものと、花粉母細胞以外に葉、茎においても検出されるHSP70様タンパク質由来のシグナルが、それぞれ3個ずつ確認された。花粉母細胞特異的な3個のシグナルのなかのひとつは、抗<i>LIM18</i>モノクローナル抗体を用いた解析においても検出され、この発現様式は<i>LIM18</i>遺伝子の転写産物の消長と一致した。(2) 細胞内所在：抗<i>LIM18</i>ポリクローナル抗体を用いて、テッポウユリ花粉母細胞の抗体染色を行うと、核を含む細胞全体からシグナルが検出された。また、花粉母細胞を用いた細胞分画実験の結果から、この抗体に反応性を示すものは、細胞質のみならず核にも存在することが示された。更に、<i>LIM18::GFP</i>融合タンパク質をタバコBY-2細胞において発現させたところ、緑色蛍光は細胞質と核より検出され、<i>LIM18</i>は核移行能を持つHSP70様タンパク質であることが示唆された。以上の結果から、高等植物の減数分裂細胞の維持には、発現様式の異なる複数のHSP70様タンパク質が、核および細胞質において、異なる役割を担うこと、あるいは協調して働くことが必要であると考えられる。			

LIM遺伝子のプロモーター領域の単離および特徴づけ

(1) プロモーター領域の単離：ユリはゲノムサイズが大きい (1×10^8 bp) ため、PCRを原理としたVectorette法およびInverse PCR法を用いて、プロモーター領域を含むDNA断片の増幅を行った。この方法により、*LIM10*、*LIM12*（共に低分子量*Hsp*遺伝子）、*LIM15*（出芽酵母*Dmc1/Iscl*相同遺伝子）、および*LIM18*遺伝子に関して、それぞれ1309bp、1305bp、2962bp、1731bpの長さの断片を単離した。

(2) プロモーターの特徴づけ：植物細胞において構成的に発現する*CaMV 35S*遺伝子、あるいは*LIM10*、*LIM18*遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結した遺伝子、を遺伝子銃を用いて各細胞・組織に導入し、そのプロモーター活性を測定した。テッポウユリの花粉母細胞では、各遺伝子のプロモーター間に活性の差は見られなかったが、葉では、*CaMV 35S*遺伝子プロモーターのみが高い活性を示し、*LIM18*遺伝子プロモーターの活性の67倍となった。*LIM10*遺伝子プロモーターの活性は、プロモーターを全く含まないルシフェラーゼ遺伝子のみ、を導入した時の活性と同程度であった。タバコの葉においても、テッポウユリの葉を用いた結果と同様の傾向を示し、*LIM10*遺伝子プロモーターの活性は低く、*CaMV 35S*遺伝子プロモーターの活性は、*LIM18*遺伝子のそれより27倍高かった。タバコの茎では、これら*LIM*遺伝子のプロモーター活性は、*CaMV 35S*遺伝子プロモーター活性の、1/6以下であった。以上の結果から、*LIM*遺伝子のプロモーターの働きは、細胞・組織特異的に制御されており、体細胞組織では抑制されていると考えられる。

*LIM10*および*LIM18*遺伝子のプロモーターに、ルシフェラーゼ遺伝子 (*LUC*) あるいは β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*GUS*)、を連結させた遺伝子を導入した形質転換タバコを作成し、これらを用いて発現様式を調べた。*LIM18::LUC*植物体は、独立した形質転換体6系統、*LIM18::GUS*植物体は9系統を用いて、レポータータンパク質の活性測定を行ったところ、全ての植物体において、減数分裂細胞、一核性小孢子、二細胞性花粉を含むヤクから活性が検出された。一方、*LIM10::LUC*および*LIM10::GUS*植物体は、それぞれ6系統を用いて解析を行ったが、活性は減数分裂細胞、一核性小孢子を含むヤクからは検出されない、あるいは検出されても低いが、二細胞性花粉形成時期のヤク、成熟花粉から高い活性が検出された。テッポウユリの*LIM*遺伝子のプロモーターが、タバコの雄性配偶体形成過程においても働くことから、高等植物の生殖細胞形成時期に働く遺伝子の発現調節には、類似の制御機構が広く存在する可能性が示された。また、*LIM18*遺伝子のプロモーターは減数分裂時期より以降に、*LIM10*遺伝子のそれは二細胞性花粉形成時期より以降に働くことから、これらのプロモーターは異なる時期の生殖細胞における外来遺伝子発現系の構築に使用可能であると考えられる。

テッポウユリの減数分裂時期に発現が誘導される
熱ショックタンパク質の解析

皆見 政好

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

(島本 功 教授)

平成12年 1月 6日提出

目次

	頁
略語	3
緒言	4
第1章 テッポウユリの花粉母細胞において発現する HSP70様タンパク質の解析	8
序論	8
材料と方法	9
結果	14
考察	25
第2章 LIM遺伝子のプロモーター領域の単離および特徴づけ	29
序論	29
材料と方法	30
結果	38
考察	64
まとめ	69
参考文献	70
謝辞	86

略語

本文中に用いた略語を以下に示す。

CaMV 35S: cauliflower mosaic virus 35S
cDNA: complementary DNA
CTAB: cetyltrimethylammonium bromide
2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole
DTT: dithiothreitol
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EF-1 α : elongation factor-1 α
EGTA: ethyleneglycol bis(2-aminoethyl ether)tetraacetic acid
GFP: green fluorescent protein
GUS: β -glucuronidase
HEPES: 2- [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HSP: heat shock protein
HSC: heat shock cognate
HSE: heat shock element
IPTG: isopropylthio- β -D-galactoside
LUC: luciferase
MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, monohydrate
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PCR: polymerase chain reaction
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
SC: synaptonemal complex
SDS: sodium dodecylsulfate
X-Gluc: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide

緒言

高等植物の生殖細胞形成は、花芽形成の誘導に始まり、胞原細胞の分化、減数分裂、およびその後の成熟過程を経て、花粉および胚のうが形成される過程である。これら諸過程のなかでも減数分裂は、酵母から高等動植物に至るまで多くの真核生物の間で高度に保存されている分裂様式であり、有性生殖を行う生物の生殖細胞形成において重要な過程である。減数分裂過程では、1回のDNA複製が終了した後、続けて行われる減数第一分裂、減数第二分裂により、細胞当たりの染色体数が半減した生殖細胞が形成されるため、これら雌雄生殖細胞間の接合によって染色体数が倍加されることはない。また、減数分裂過程では、対合した相同染色体間で高頻度の遺伝子組み換えが行われるため、次世代の個体には遺伝的な多様性が高められることになる。

減数分裂の研究は、減数分裂過程の各時期に特徴的な異常を示す変異体を単離し、単離した変異体を遺伝学的・分子生物学的方法により解析することが比較的容易な酵母を中心に進められてきた。現在までに、酵母では体細胞分裂から減数分裂への移行を制御する遺伝子 (Watanabe et al., 1988; Watanabe and Yamamoto, 1994)、相同染色体の対合や遺伝子組み換えに関与する遺伝子 (Hollingsworth et al., 1990; Bishop et al., 1992; Shinohara et al., 1992; Sym et al., 1993; Chua and Roeder, 1998; Leu et al., 1998) 等、減数分裂の開始やその進行過程を制御する多数の遺伝子が単離されており、これらの遺伝子の構造、発現調節機構、機能が明らかにされてきた (Engebrecht et al., 1991; Roeder, 1995, 1997; Haber, 1998)。

一方、高等真核生物では減数分裂過程に異常を示す変異体を単離し解析することが難しいため、各生物種の有する特性を活かした生化学的・形態学的解析が主に行われてきた。例えば、減数分裂のステージ毎に均一な細胞集団を得ることが可能なテッポウユリ花粉母細胞を用いた生化学的な解析から、相同的遺伝子組み換えが行われる減数第一分裂時期に、DNA 巻き戻しタンパク質、RecA 様タンパク質等、遺伝子組み換えに関与すると考えられる種々のタンパク質の活性が上昇することが明らかになっている (Hotta and Stern, 1978; Hotta et al., 1985a)。また、テッポウユリ花粉母細胞には、対合した相同染色体間にシナプトネマ構造 (SC: synaptonemal complex) と呼ばれる特徴的な構造体が出現するが、単離した SC を抗原に用いて抗体を作成し、免疫学的手法により SC の構成成分を単離・分析することで、相同染色体対合の制御機構ならびに遺伝子組み換え機構を明らかにすることが試みられた (Ohshima et al., 1992)。ラットの精母細胞を用いた研究では、抗 SC 抗体を用いた免疫スクリーニングにより、

SC の構成タンパク質をコードする遺伝子、*Scp1*、*Scp2* および *Scp3* が単離され、それらの遺伝子産物の構造、発現様式、細胞内局在が調べられている (Moens et al., 1987; Meuwissen et al., 1992; Lammers et al., 1994; Offenberger et al., 1998)。マウスの精母細胞系を用いた研究では、Higashitani ら (1990a, 1990b) によって、DNA 連結酵素と DNA 鎖交換タンパク質の活性がマウスの精巣の減数第一分裂時期の細胞で高いことが見出されている。この様な種々の生物材料を用いた生化学的アプローチにより、減数分裂進行の素過程とそれに関わる遺伝子およびタンパク質の研究が進められたきたが、酵母における減数分裂研究に比べると、単離されている減数分裂特異的遺伝子の数が少なく、また、単離した遺伝子の解析方法が限られていることから、減数分裂進行過程の制御機構に関する知見が乏しい。

減数分裂進行過程で起こる諸反応を解明するためには、減数分裂時期特異的に転写が誘導される遺伝子を同定しその機能を解析することが有効なアプローチのひとつと考えられる。Kobayashi ら (1994) は、テッポウユリ花粉母細胞の減数分裂がヤク内で同調して進行することに着目し、減数分裂時期のテッポウユリ花粉母細胞由来の cDNA ライブラリーをサブトラクト法によるスクリーニングを行うことで、減数第一分裂時期に発現が誘導される cDNA (*LIM1* ~ *LIM18*: Lily messages Induced at Meiosis) を 18 個単離した (表 1)。これらのなかには、既知の遺伝子と相同性を示さないものも含まれていたが、*LIM15* の様に、この相同遺伝子 (*Dmc1/Isc2*) が、酵母の減数分裂時期の組み換え過程に必要であることが示されたものが存在した (Bishop et al., 1992; Kobayashi et al., 1993)。従って、転写産物が減数分裂細胞特異的に蓄積する他の *LIM* 遺伝子もまた、減数分裂進行過程において重要な働きを担うことが予想された。

減数分裂過程は、主に減数第一分裂時期に高頻度の相同遺伝子組み換えが行われること、あるいは染色体数を半減させる分裂様式を示すという点において、体細胞分裂とは異なる生物学的重要性を含んでいるが、これらの制御機構を調べるうえで、HSP70 (heat shock protein 70) 様タンパク質をコードする *LIM18* 遺伝子は解析対象に適した遺伝子であると考えられた。*Hsp70* 遺伝子は、単離された当初は外的ストレスに対して細胞の耐性を高めるために機能すると考えられていたが、現在ではこの他にも生理的条件下にある細胞において分子シャペロンとして様々な過程に関与することが明らかになっている (Schlesinger, 1990; Vierling, 1991; Hendrick and Hartl, 1993; Boston et al., 1996; Hartl, 1996; Miernyk, 1997)。例えば、HSP70 は合成途中あるいは合成終了後のタンパク質の折りたたみ (Beckmann et al., 1990; Frydman et al., 1994)、分子集合体の形成と分解 (Smith et al., 1992, 1995)、細胞質タンパク質の各オルガネラへの輸送

(Kang et al., 1990; Imamoto et al., 1992) 等の過程に関与する。また、真核生物では *Hsp70* 遺伝子はファミリーを形成しており、そのメンバーは発現様式の違いによって、ストレスによって発現が誘導される *Hsp70* 遺伝子サブファミリーと、ストレス非依存的に細胞内で恒常的に発現している *Hsc70* (heat shock cognate 70) 遺伝子サブファミリーに分けられる。更に、各サブファミリーのメンバーのなかには、発生過程の特定の時期あるいは組織で発現誘導される遺伝子も存在する (Bensaude et al., 1983; Kurtz et al., 1986; Zakeri et al., 1988; Wisniewski et al., 1990, 1993; Duck and Folk, 1994; Christians et al., 1995)。このような発現様式・機能の報告、および減数分裂細胞において観察される特徴的な事象には、種々のタンパク質の働きが必要であることを考えあわせると、*LIM18* は高等植物ではこれまで報告されていない、減数分裂特異的な分子シャペロンとして働く可能性が高いと思われた。そこで、第 1 章では、高等植物の減数分裂過程で発現する *HSP70* 様タンパク質の働きを明らかにするために、テッポウユリ、タバコを材料に用いて、*LIM18* 分子の特徴づけおよび抗 *LIM18* 抗体を用いた免疫学的解析を行った。

生化学的あるいは免疫学的解析に加え、減数分裂特異的遺伝子の機能を、アンチセンス、強制発現実験等の分子生物学的方法を用いて調査するためには、減数分裂細胞で働くプロモーターが必要である。しかし、高等植物では、単離されている減数分裂特異的遺伝子の数が少ないこともあり、このような特性を示すプロモーターの同定、およびこれを用いた発現調節機構、機能の詳細な解析は行われていない。Klimyuk と Jones (1997) は、*LIM15* に相同性を示すシロイヌナズナの *AtDMC1* 遺伝子を単離し、その遺伝子のプロモーターが減数分裂細胞で働くことを示した。しかしながら、これは細胞分裂が盛んな体細胞組織でも働くこと (Doutriaux et al., 1998) から、その働きは減数分裂特異的に厳密な制御を受けていないと考えられる。これに対し、*LIM* 遺伝子の多くは、それらの転写産物が主に花粉母細胞に蓄積すること (Kobayashi et al., 1994) から、*LIM* 遺伝子の発現制御領域は減数分裂細胞特異的に機能することが予想された。従って、第 2 章では、減数分裂細胞で働くプロモーターを単離するために、*LIM18* および他の *LIM* 遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片を、テッポウユリのゲノム DNA より単離し、その特性解析を行った。

表1 LIM遺伝子産物の特徴

遺伝子産物	相同タンパク質および構造上の特徴
LIM1	FIL1、HML7、N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM2	FIL1、HML7、N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM3	FIL1、N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM4	N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM5	LIM13、核局在シグナルあり、N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM6	N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM7	なし
LIM8	なし
LIM9	セリンプロテアーゼ
LIM10	低分子量HSP、EMPR
LIM11	低分子量HSP
LIM12	低分子量HSP
LIM13	LIM5、核局在シグナルあり、N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM14	グリシン、セリンが多い、N末端領域は疎水性アミノ酸が多い
LIM15	RecA、DMC1/ISC2、RAD51
LIM16	なし
LIM17	なし
LIM18	HSP70

作表は、Kobayashi ら (1993, 1994)、Ogata ら (1999)、Mousavi ら (1999) の報告を参考にした。

第1章 テッポウユリの花粉母細胞において発現する HSP70 様タンパク質の解析

序論

熱ショックタンパク質 70 (HSP70) は、熱等の外的ストレスから細胞を保護するだけでなく、生理的状态にある細胞の分化・増殖にも、分子シャペロンとして重要な働きを担っている (Schlesinger, 1990; Vierling, 1991; Hendrick and Hartl, 1993; Boston et al., 1996; Hartl, 1996; Miernyk, 1997)。高等植物の *Hsp70* 遺伝子ファミリーのメンバーのなかには、その発現が発生段階および器官特異的に制御されているものが存在し、生殖細胞あるいは胚が形成される過程では、*Hsp70* 遺伝子の転写産物、遺伝子産物が蓄積する (Duck et al., 1989; Frova et al., 1989; Hopf et al., 1992; Duck and Folk, 1994; DeRocher and Vierling, 1995; Gagliardi et al., 1995; Prändl et al., 1995)。これらの研究は、発現様式に主眼を置いたものが多く、例えばトウモロコシでは、熱誘導による遺伝子発現が一核性小孢子形成時期には見られるが、これより後の時期になると低くなること (Frova et al., 1989; Gagliardi et al., 1995)、大部分の高等植物の成熟花粉では熱誘導性が消失している、あるいは極めて低いこと (Mascarenhas and Crone, 1996) 等が報告されている。この他に、セイヨウアブラナでは、HSP70 の細胞内の局在が花粉形成の段階あるいは熱ストレスに応じて変化し、HSP70 の働きが雄性配偶体形成に重要であることを示唆する知見が得られている (Gordewener et al., 1995)。しかしながら、上記に述べた雄性配偶体形成の研究は、減数分裂時期より後のステージの細胞・組織を対象にしており、高等植物の減数分裂細胞は解析に必要な量を集めることが困難なこともあり、減数分裂細胞における *Hsp70* 遺伝子あるいはその遺伝子産物の発現様式、機能は明らかになっていない。

テッポウユリは、ヤク内で減数分裂の進行が約一週間と長い時間を要し、同調して進行する (Erickson, 1948)。また、花粉母細胞の減数分裂のステージとつぼみの大きさに対応関係がみられるため、つぼみを大きさにより選別した後、ヤク内の花粉母細胞を絞り出すことによって、ステージ毎に分別した細胞を大量に調製することが出来る。本章では、減数分裂細胞における HSP70 様タンパク質の機能を推察するために、大腸菌に生産させた組み換え LIM18 タンパク質を抗原に用いて抗体を作成後、抗 LIM18 抗体を用いて免疫学的解析を行った。更に、タバコ培養細胞 (BY-2) を用いて LIM18 の細胞内局在を調べたので、これらの解析結果に基づいて考察を試みた。

材料と方法

試薬

制限酵素、アルカリフォスファターゼ等の DNA 修飾酵素は、宝酒造社から購入した。ナイロンメンブレンは PVDF (Amersham 社) を用いた。X 線フィルムは、RX (富士フィルム社) を用いた。その他、生化学試薬は和光純薬社、ナカライテスク社より購入した。キット等については文中に適宜記載した。

大腸菌の菌株

プラスミド DNA の調製等には XL1-Blue 株あるいは DH5 α 株を、組み換えタンパク質の発現には M15 (pREP) 株 (Qiagen 社) を用いた。それぞれの菌株の遺伝子型を以下に示す。

XL1-Blue 株 : *recA1*, *lac*⁻, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, {F', *proAB*, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15}

DH5 α 株 : *supE44*, Δ *laqU169*(ϕ 80*laqZ* Δ M15), *hsdR17*, *reqA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

M15 (pREP) 株 : *Nal*^s, *Str*^s, *rif*^s, *lac*⁻, *ara*⁻, *gal*⁻, *mtl*⁻, F⁻, *recA*⁺, *uvr*⁺.

植物材料

ユリは、*Lilium longiflorum* cv. Hinomoto (テッポウユリ) を用いた。花粉母細胞の減数分裂の時期は、酢酸オルセイン染色による核の形態観察を光学顕微鏡下で行うことにより決定した。花粉母細胞の減数分裂の時期に従いつばみをその長さによって分別し (Erickson, 1948)、花粉母細胞をホワイトの培養液 (Ito and Stern, 1967) の中に絞り出した。絞り出した花粉母細胞をホワイトの培養液で数回洗浄しタペート細胞を取り除いた。

培地の組成

大腸菌の培養には、LB 培地あるいは Super 培地、野生型のタバコ BY-2 細胞の培養には NT 培地を用いた。それぞれの培地の組成を以下に示す。

LB 液体培地 : 1% バクトトリプトン、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム。水酸化ナトリウムを添加して pH を 7 に調整した。

Super 液体培地 : 3.2% バクトトリプトン、2% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム。水酸化ナトリウムを添加して pH を 7 に調整した。

固形培地は同じ組成で、濃度が 1.5% になるように寒天を加えた。

NT 液体培地：Murashige-Skoog 培地（Murashige, 1974）に、3% ショ糖、25mM MES、3 μ M チアミン塩酸塩、550 μ M ミオイノシトール、1.3mM リン酸二水素カリウム、1 μ M 2,4-D を加えた後、水酸化カリウムを添加して pH を 5.7 に調整した。固形培地は同じ組成で、濃度が 0.9% になるように寒天を加えた。

細胞抽出物の調製

SDS-PAGE 解析用の細胞抽出物は次の方法で調製した。15 個のつぼみより取り出した減数分裂前のヤクとヤクより絞り出した花粉母細胞、1.5g の葉および 3.0g の茎を、0.5~1.0ml の SDS-PAGE 用サンプル緩衝液〔125mM トリス-塩酸（pH 6.8）、200 μ M DTT、20% グリセロール、4.1% SDS、0.001% ブロモフェノールブルー〕に懸濁し、ガラスホモジェナイザーを用いてすりつぶした。この懸濁液を 95℃、5 分間煮沸した後、4℃、10,000 $\times$ g で 15 分間遠心を行い不溶性成分を沈降させ、上清を細胞抽出物として使用した。

二次元電気泳動用の細胞抽出物はフェノール抽出法（Barent and Elthon, 1992）により調製した。15~20 個のつぼみより絞り出した花粉母細胞、0.6g の葉および 0.6g の茎を液体窒素下で凍結させ、乳鉢を用いて粉末状になるまですりつぶした。この粉末に 1mM の EDTA および 3ml の水飽和フェノールを加え、4℃で 2 分間激しく攪拌した。この懸濁液を 4℃、10,000 $\times$ g で 10 分間遠心した後、上清のフェノール溶液を回収し、メタノールに溶解した 0.1M 酢酸アンモニウム溶液 15ml に加え混合し、-20℃で 2 時間静置した。タンパク質抽出物を、4℃、10,000 $\times$ g で 20 分間の遠心により沈降させ回収し、これを 1.2ml のメタノールに懸濁した。懸濁液を、4℃、10,000 $\times$ g で 20 分間遠心した後の沈降物を真空条件下で乾燥後、1% SDS 溶液に再懸濁した。最終的に、不溶性物質を遠心により取り除いた残りの上清を実験に用いた。

タンパク質の電気泳動

一次元の SDS-PAGE は Laemmli（1970）の方法に基づいて行った。

二次元電気泳動は、Mini-PROTEAN II 2-D CELL（Bio-Rad 社）を用いて、O'Farrell（1975）の方法に基づいて行った。一次元目の等電点電気泳動は、Bio-Lyte 5/7 と Bio-Lyte 3/10（Bio-Rad 社）を 4 : 1 の比率で混合した。二次元目の SDS-PAGE は 10% のアクリルアミドゲルを用いて行った。

銀染色

銀染色は、銀染色 II キットワコー（和光純薬社）を用いて付属のプロトコールに従って行った。

ウエスタンブロット解析

ウエスタンブロット解析は、Immun-Lite™ II Chemiluminescent Protein Detection System (Bio-Rad 社) を用いて、付属のプロトコールに従って行った。電気泳動終了後、タンパク質を PVDF メンブレン (Amersham 社) に転写した。転写後、メンブレンを TBS 溶液 [100mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、0.9% 塩化ナトリウム] で洗浄し、ブロッキング溶液 (5% non-fat dry milk を含んだ TBS 溶液) に浸して 8~12 時間ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、TTBS 溶液 (0.2% Tween 20 を含んだ TBS 溶液) で洗浄し、TTBS 溶液で希釈した一次抗体を反応させた。反応終了後、メンブレンを TTBS 溶液で洗浄し二次抗体を 1 時間反応させた。メンブレンを TTBS で洗浄し、発光反応を行いシグナルを X 線フィルムで検出した。抗 LIM18 ポリクローナル抗体、抗 LIM18 モノクローナル抗体 (mAb7A3)、抗 LIM13 ポリクローナル抗体、抗 LIM10 モノクローナル抗体、抗 GFP モノクローナル抗体 (Clontech 社) および抗 H2B 抗体 (横浜市立大、田中一郎博士より供与) は、それぞれ、2000 倍、2 倍、500 倍、2 倍、2 倍および 2 倍希釈して使用した。

組み換え LIM18 タンパク質の精製と抗 LIM18 抗体の作成

抗原に用いる組み換え LIM18 タンパク質の調製は、QIA expressionist キット (Qiagen 社) を用い、付属のプロトコールに従って行った。pBluescript SK-LIM18 プラスミド (Kobayashi et al., 1994) を *KpnI* で処理することにより、LIM18 遺伝子のコーディング領域を含んだ cDNA 断片を切り出し、この断片を pQE30 の *KpnI* 部位に組み込んだ発現ベクター (pQE30::LIM18) を構築した。大腸菌 M15 (pREP) 株を pQE30::LIM18 で形質転換し、この形質転換体を 400ml の 25 μ g/ml のカナマイシンおよび 100 μ g/ml のアンピシリンを含む Super 液体培地で培養した。培養液の OD₆₀₀ が 0.6 になった時点で、最終濃度が 2mM になるように IPTG を加え、4 時間培養を続け発現を誘導した。発現誘導後、回収した菌体を、30ml の緩衝液 A [8M グアニジン塩酸、0.1M リン酸二水素ナトリウム、0.01M トリス-塩酸 (pH 8.0)] に懸濁し、超音波破碎した後、室温で 1 時間攪拌した。遠心分離を行って上清を回収し、これを Ni-NTA 担体カラム (担体容量 8ml) に通した。80ml の緩衝液 A [8M グアニジン塩酸、0.1M リン酸二水素ナトリウム、0.01M トリス-塩酸 (pH 8.0)]、40ml の緩衝液 B [8M 尿素、0.1M リン酸二水素ナトリウム、0.01M トリス-塩酸 (pH 8.0)]、20ml の緩衝液 7.4 [8M 尿素、0.1M リン酸二水素ナトリウム、0.01M トリス-塩酸 (pH 7.4)]、40ml の緩衝液 7.0 [8M 尿素、0.1M リン酸二水素ナトリウム、0.01M ト

リス-塩酸 (pH 7.0)]、60ml の緩衝液 C [8M 尿素、0.1M リン酸二水素ナトリウム、0.01M トリス-塩酸 (pH 6.3)] を用いて順次カラムを洗浄した。洗浄後、緩衝液 D [8M 尿素、0.1M リン酸二水素ナトリウム、0.01M トリス-塩酸 (pH 5.9)] で組み換え LIM18 タンパク質を溶出した。以上の方法により、400ml の培養液より 12mg の組み換えタンパク質を精製した。精製した組み換えタンパク質をウサギおよびマウスに免疫し、定法に従って抗 LIM18 ポリクローナル抗体と、2 種類の抗 LIM18 モノクローナル抗体 (mAb7A3、mAb4C12) を作成した。

BY-2 細胞の形質転換

LIM18::GFP 発現プラスミドの構築：LIM18 遺伝子の 5'側の領域を、pBluescript SK-LIM18 プラスミド (Kobayashi et al., 1994) を *Xba*I および *Bst*XI で処理することにより切り出した。LIM18 遺伝子の残りの 3'側の領域は、プライマーに 18-ford と 18-back を用いた PCR により増幅した。使用したプライマーの配列を次に示す。

18-ford : 5'-TTGTGCCAGGGAATTGGTG-3'

18-back : 5'-ACCAGATCTACCTCCTCAATCTTCGGTCC-3'

増幅した断片の *Bg*II 部位を平滑末端化した後、*Bst*XI で処理した。これら LIM18 遺伝子を含む断片を *Bst*XI 部位で結合させた後、pGFP2 (ロックフェラー大、Pius Spielhofer 博士と Nam-Hai Chua 博士より供与) の *Xba*I および平滑末端化した *Xho*I 部位に挿入した。続けて、*Sph*I および *Aat*II で処理することにより、*CaMV* 35S 遺伝子プロモーター::LIM18::GFP を含む断片を切り出した。この断片の両端を平滑末端化した後、バイナリーベクター pBI101 (Clontech 社) の *Sma*I および平滑末端化した *Eco*RI 部位にサブクローニングした。

LIM13::GFP 発現プラスミドの構築：報告されているプラスミド (Ogata et al., 1999) を *Xba*I および *Sac*I で処理することにより、*CaMV* 35S 遺伝子プロモーター::LIM13::GFP を含む断片を切り出した。この断片をバイナリーベクター pBI121 (Clontech 社) の *Xba*I および *Sac*I 部位にサブクローニングした。

GFP のみを発現するプラスミドの構築：pGFP2 を *Xba*I および *Sac*I で処理することにより GFP 遺伝子を含む断片を切り出し、この断片を pBI121 の *Xba*I および *Sac*I 部位にサブクローニングした。

発現ベクターは、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム LBA4404 株 (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) に導入した。BY-2 細胞の形質転換は、Matsuoka と Nakamura (1991) の方法に準じて行った。形質転換 BY-2 細胞の選抜・培養には、NT 培地に、カナマイシンは 50 μ g/ml、カルベ

ニシリンは $250\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように加えた培地を用いた。

細胞分画

テッポウユリ花粉母細胞の細胞質と核画分の分画は Higashitani ら (1990a) の方法を参考にして行った。30～50 個のつぼみより絞り出した花粉母細胞を、緩衝液 B [20mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、10% グリセロール、0.2mM EGTA、0.1mM PMSF、0.5mM DTT、0.3 M ショ糖、10mM 塩化マグネシウム] で 3 回洗浄後、4ml の同緩衝液に懸濁した。細胞をガラスホモジェナイザーを用いてすりつぶした後、4℃、 $4,000 \times g$ で 10 分間遠心した。この時の上清を細胞質画分として用いた。沈降物を緩衝液 B で 2 回洗浄した後、1ml の緩衝液 B に懸濁した。この溶液を、緩衝液 B で希釈した 30% パーコールに重層し、4℃、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心した。沈降物を緩衝液 B で 2 回洗浄後、ショ糖と塩化マグネシウムを含まない緩衝液 B に再懸濁し、この懸濁液を核画分として使用した。

BY-2 細胞の細胞質と核画分の分画は、Busk と Pages (1997) の方法を参考にして行った。BY-2 細胞 0.4～0.6g にこれと同重量の緩衝液 A [10mM HEPES (pH 7.8)、10mM 塩化カリウム、10mM 塩化マグネシウム、5mM EDTA、1mM DTT、0.2mM PMSF、25% グリセロール] を加え、ガラスホモジェナイザーを用いて細胞を破碎した。細胞破碎液を、ミラクロス (Calbiochemistry 社) を通して 4℃、 $3,000 \times g$ で 15 分間遠心し、上清を細胞質画分として用いた。沈降物を緩衝液 A で 2 回洗浄した後、緩衝液 A に再懸濁し、これを核画分として用いた。

結果

組み換え LIM18 タンパク質の精製および抗 LIM18 抗体の作成

LIM18 遺伝子の cDNA 断片を発現ベクターに組み込み、LIM18 遺伝子産物をヒスチジンタグを連結した組み換え LIM18 タンパク質として大腸菌で大量発現させた。発現誘導処理を行った大腸菌をグアニジン塩酸を含む緩衝液を用いて可溶化した後、ヒスチジンタグを持つ組み換え LIM18 タンパク質を、変性条件下で Ni-NTA 担体を用いたカラムクロマト法で精製した。最終精製標品を SDS-PAGE 後、クマシー染色によってタンパク質を検出した。LIM18 遺伝子の cDNA 断片を組み込んだ発現ベクターを導入した大腸菌由来の精製タンパク質の分子量は、組み換え LIM18 タンパク質の予想される分子量 (69kDa) と一致した (図 1)。予想される分子量より低分子のタンパク質の存在も多数見られたが、これらのタンパク質は発現ベクターのみで形質転換を行った大腸菌由来の精製タンパク質には検出されないことから、組み換え LIM18 タンパク質の分解産物、あるいは、タンパク質の翻訳過程が終止コドンの前で終了し完全長の組み換えタンパク質が作られなかったものであると判断した。この精製組み換え LIM18 タンパク質を、ウサギおよびマウスに免疫し、定法に従って抗 LIM18 ポリクローナル抗体と 2 種類の抗 LIM18 モノクローナル抗体 (mAb7A3、mAb4C12) を作成した。また、抗 LIM18 モノクローナル抗体 mAb7A3 と mAb4C12 の間で、反応性に違いは認められなかったため、本研究では mAb7A3 を用いた解析の結果を示した。

テッポウユリにおける HSP70 様タンパク質の発現様式

減数分裂前の若い時期のヤク、減数分裂時期 (レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期、ディプロテン・ディアキネシス期、四分子期) の花粉母細胞、未成熟花粉、成熟花粉、葉、茎および根より調製した細胞抽出物に対して抗 LIM18 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、減数分裂前の若い時期のヤクから成熟花粉の細胞抽出物中には分子量が 68kDa、69kDa、70kDa と異なる 3 種類のタンパク質が、その他の細胞・組織の抽出物中には分子量 70kDa のタンパク質のみが検出された (図 2)。

真核生物においては、*Hsp70* 遺伝子はファミリーを形成していること (Vierling, 1991; Hendrick and Hartl, 1993; Boston et al., 1996; Miernyk, 1997)、および図 2 において複数のタンパク質が検出されたことから、抗 LIM18 ポリクローナル抗体が、LIM18 遺伝子産物以外の *Hsp70* 遺伝子ファミリーのメンバーに反応性を持つことが考えられた。そこで、より詳細に HSP70 様タンパ

ク質の発現様式を調べる目的で、種々の細胞・組織の抽出タンパク質を、二次元電気泳動法により分離後、ウエスタンブロット解析を行った。抗 LIM18 ポリクローナル抗体を用いた時には、パキテン期の花粉母細胞の抽出物中に、等電点 (pI) の異なる、分子量 68kDa から 70kDa の移動度を示す 6 個のシグナルが検出された (図 3)。レプトテン期、ザイゴテン期および四分子期の細胞抽出物を用いても同様の結果が得られたこと (データ省略) から、複数の HSP70 様タンパク質が減数分裂細胞において発現していることが示唆された。これらのシグナルのうち一つ (e のタンパク質) は、そのタンパク質の蓄積する組織・時期が、LIM18 遺伝子の転写産物の消長 (Kobayashi et al., 1994) に一致したことに加えて、抗 LIM18 モノクローナル抗体 (mAb7A3) を用いた解析によっても、花粉母細胞特異的に検出された。以上のことから、タンパク質 e は LIM18 由来のシグナルであり、その他のタンパク質は、抗 LIM18 抗体が交叉認識した LIM18 とは異なる HSP70 様タンパク質であると思われる。

テッポウユリにおける HSP70 様タンパク質の細胞内所在

減数分裂細胞における HSP70 様タンパク質の細胞内所在を調べる目的で、細胞の切片に対して、抗 LIM18 ポリクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体染色を行った。その結果、シグナルはタペート細胞に比較し花粉母細胞から強く検出された。また、花粉母細胞では核を含む細胞全体よりシグナルが検出された (図 4)。次に、ザイゴテン期の花粉母細胞より核および細胞質画分を調製後、ウエスタンブロット解析を行った。この実験では、核と細胞質に局在するマーカータンパク質として、それぞれヒストン H2B、細胞質型低分子量 HSP に分類される LIM10、を同時に検出した。図 5 に示した様に、ヒストン H2B は核画分に、LIM10 は細胞質画分に主に蓄積することが確認された。これに対し、抗 LIM18 ポリクローナル抗体に反応性を示すタンパク質は、細胞質画分のみならず核画分にも検出され、図 4 において観察された HSP70 様タンパク質の細胞内所在の結果と一致した。

LIM18 の細胞内所在

図 4、5 の実験では、LIM18 以外の HSP70 様タンパク質にも交叉反応性を示す抗体を用いているため、LIM18 自身の細胞内所在を明確にしたものではない。そこで、GFP (green fluorescent protein) をレポーター遺伝子に用いて、LIM18 分子の細胞内所在を調べることにした。初めに、カリフラワーモザイクウイルス 35S 遺伝子 (CaMV 35S: cauliflower mosaic virus 35S) のプロモーターの下流に、LIM18::GFP 融合遺伝子を連結させたプラスミドを遺伝子銃を用いてタマ

ネギ表皮細胞に導入し、強制発現させ観察実験を行った。しかしこの時、融合タンパク質の発現量が過剰であること等の理由により、GFP のみを発現させた細胞、あるいは LIM18::GFP 融合タンパク質を発現させた細胞との間に、観察像の明瞭な違いは見られなかった（データ省略）。

このため、より生理的環境に近い条件下で、細胞内所在の調査を行うために、タバコ BY-2 細胞にアグロバクテリウムを用いて LIM18::GFP 融合遺伝子を導入した形質転換 BY-2 細胞を作成し、これを用いた検討を行った。この際、核局在性を示すマーカータンパク質として LIM13::GFP 融合タンパク質（Ogata et al., 1999）を発現する BY-2 細胞も作成し、あわせて観察実験を行った。形質転換 BY-2 細胞における融合タンパク質の安定性を、ウエスタンブロット解析により調べたところ、分子量 100kDa の LIM18::GFP 融合タンパク質が検出された（図 6、レーン 6）。このタンパク質以外にも、分子量 70kDa 以下のタンパク質が複数検出されたが、これらは野生型および GFP 遺伝子のみを導入した BY-2 細胞の抽出物中にも存在したこと（図 6、レーン 4、5）から、抗 LIM18 ポリクローナル抗体が交叉認識した BY-2 細胞由来の HSP70 様タンパク質およびその分解産物であると考えられた。抗 GFP モノクローナル抗体を用いた場合には、100kDa のタンパク質のみが検出されたこと（図 6、レーン 3）から、LIM18::GFP 融合タンパク質の大部分は BY-2 細胞において、分解されずに安定に存在すると思われた。

GFP のみあるいは LIM13::GFP 融合タンパク質を発現している BY-2 細胞において、緑色蛍光はそれぞれ主に細胞質、核より検出された（図 7）。これに対し、LIM18::GFP 融合遺伝子を導入した BY-2 細胞では、これらの細胞の中間的な観察像を示し、緑色蛍光は細胞質と核に見られた。この結果に加え、形質転換 BY-2 細胞より細胞質画分および核画分を分画後、ウエスタンブロット解析を行ったところ、GFP は細胞質画分に、LIM13::GFP 融合タンパク質は核画分に多いことが示された（図 8）。LIM18::GFP 融合タンパク質は、両者の画分にはほぼ同量含まれていた。以上の結果から、LIM18 は核移行能を持つ分子であると考えられた。

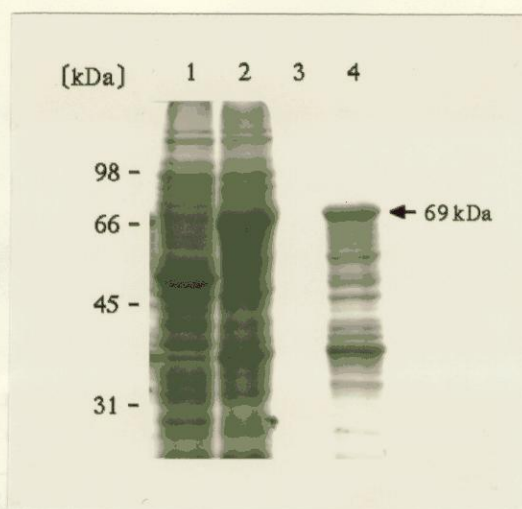


図1 組み換えLIM18タンパク質の精製

発現ベクター (pQE30) のみ (レーン1)、あるいは、pQE30::LIM18 (レーン2) を導入した大腸菌をIPTG処理後、細胞抽出物のSDS-PAGE解析を行った。レーン3およびレーン4は、それぞれレーン1、レーン2の抽出物をNi-NTA担体を用いて精製したタンパク質を泳動した。タンパク質はクマシー染色により検出した。矢印は組み換えLIM18タンパク質を示している。

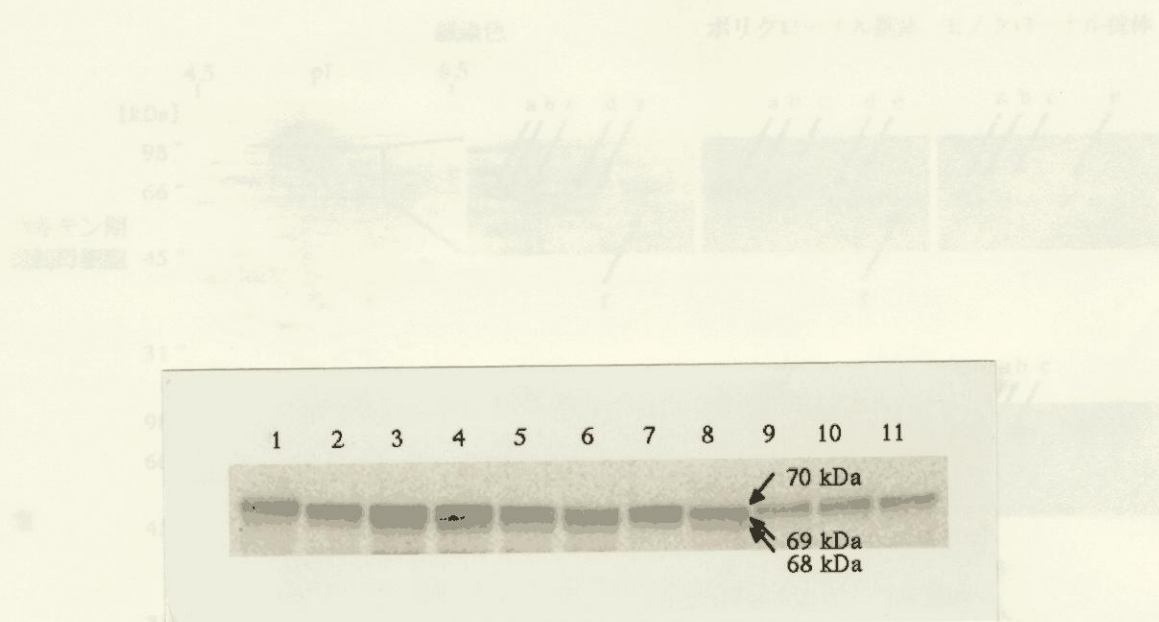


図2 テッポウユリにおけるHSP70様タンパク質の発現様式

テッポウユリの種々の組織より抽出したタンパク質 ($5\mu\text{g}$) を、7.5%のアクリルアミドを含むSDS-PAGEゲルにより分離後、抗LIM18ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。泳動した試料は以下の通り。減数分裂前の若い時期のヤク (レーン1)、レプトテン期の細胞 (レーン2)、ザイゴテン期の細胞 (レーン3)、パキテン期の細胞 (レーン4)、ディプロテン・ディアキネシス期の細胞 (レーン5)、四分分子期の細胞 (レーン6)、未成熟花粉 (レーン7)、成熟花粉 (レーン8)、葉 (レーン9)、茎 (レーン10)、根 (レーン11)。

図3 二次変異変異によるテッポウユリHSP70様タンパク質の発現様式
テッポウユリのパキテン期の花粉母細胞、葉および茎より抽出したタンパク質 ($5\mu\text{g}$) を、等電点電気泳動法により分離後、10%のアクリルアミドを含むSDS-PAGEゲルを用いて泳動した。タンパク質は染色法、抗LIM18ポリクローナル抗体および抗LIM18モノクローナル抗体 (mAb7A3) を用いたウエスタンブロット法により検出した。図内で見えなかった領域の拡大図を、それぞれのパネルの右に示す。同一の位置に泳動されるタンパク質は、同じ文字を用いて表示している。

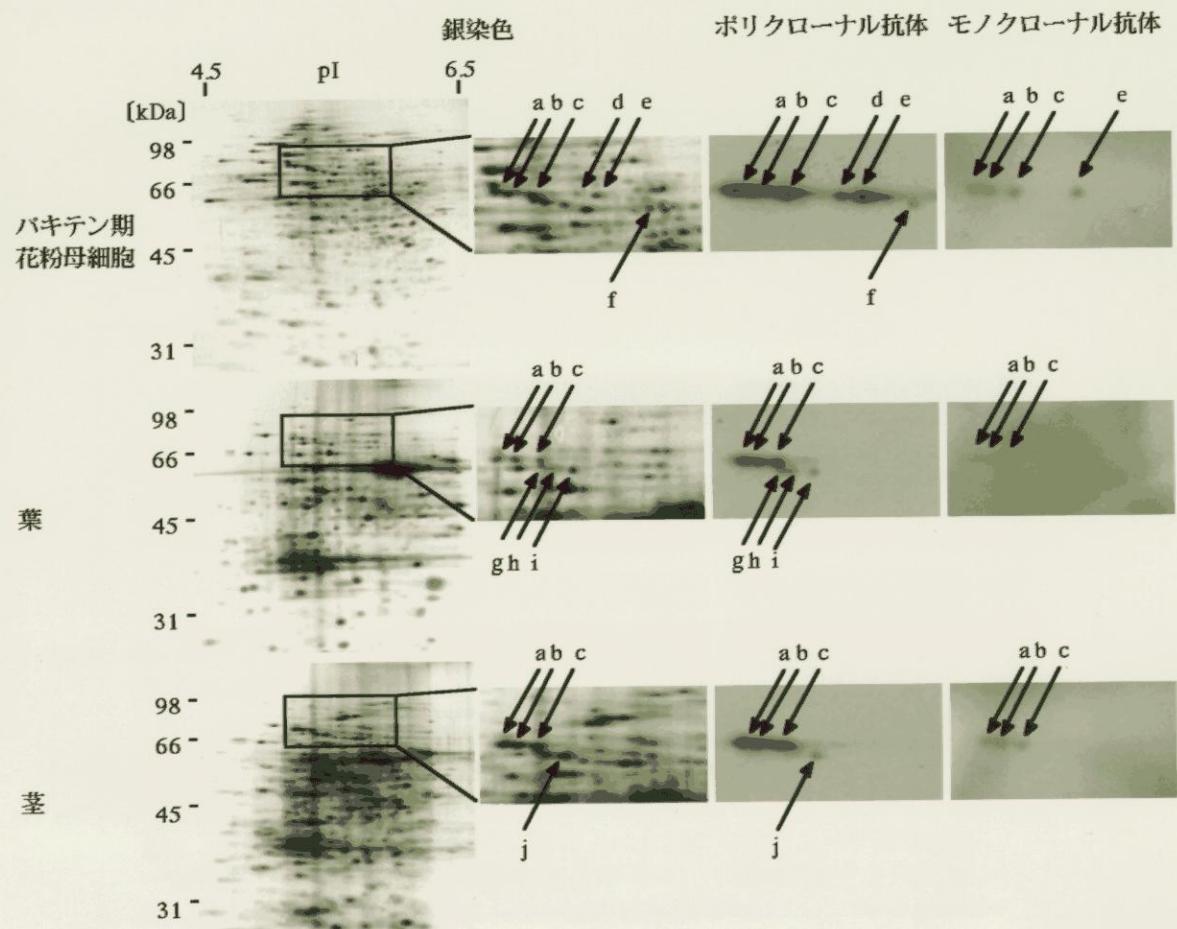


図3 二次元電気泳動法によるテッポウユリHSP70様タンパク質の発現解析
 テッポウユリのバキテン期の花粉母細胞、葉および茎より調製したタンパク質 (5 μ g) を、等電点電気泳動法により分離後、10%のアクリルアミドを含むSDS-PAGEゲルを用いて泳動した。タンパク質は銀染色法、抗LIM18ポリクローナル抗体および抗LIM18モノクローナル抗体 (mAb7A3) を用いたウエスタンブロット法により検出した。四角で囲んだ領域の拡大図を、それぞれのパネルの右に示す。同一の位置に泳動されるタンパク質は、同じ文字を用いて表示している。

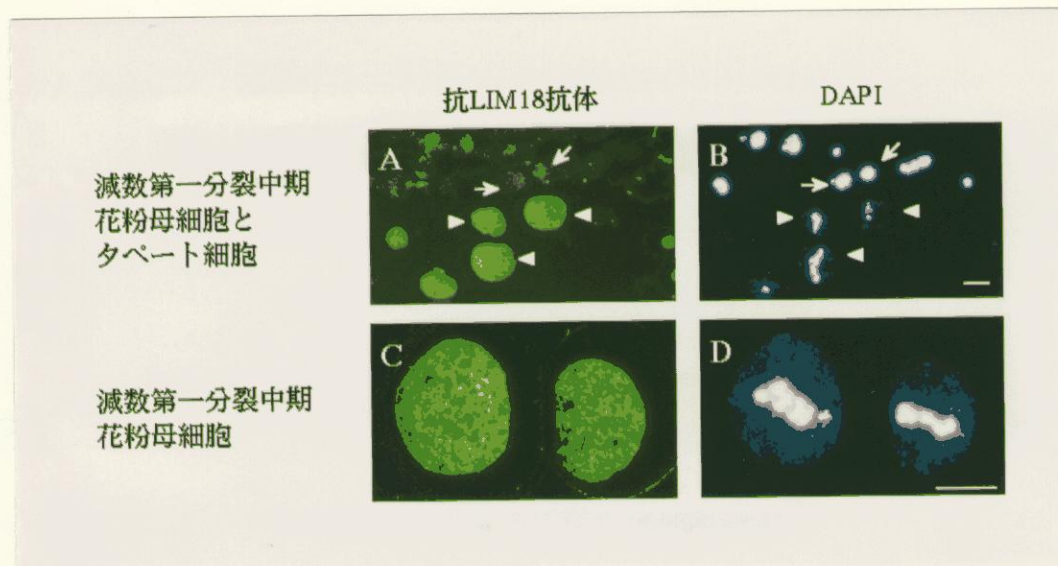


図4 テッポウユリの減数分裂細胞におけるHSP70様タンパク質の分布
 減数第一分裂中期の花粉母細胞およびタペート細胞の切片を作成後、
 抗LIM18ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。パネルAは花
 粉母細胞とタペート細胞、パネルCは花粉母細胞を間接蛍光抗体染色し
 た像。パネルBおよびDは、それぞれパネルAとCの細胞のDAPI染色を
 行った像。矢印はタペート細胞、矢じりは花粉母細胞を示している。パ
 ネルB、D中のスケールバーの長さは50 μ mを示している。

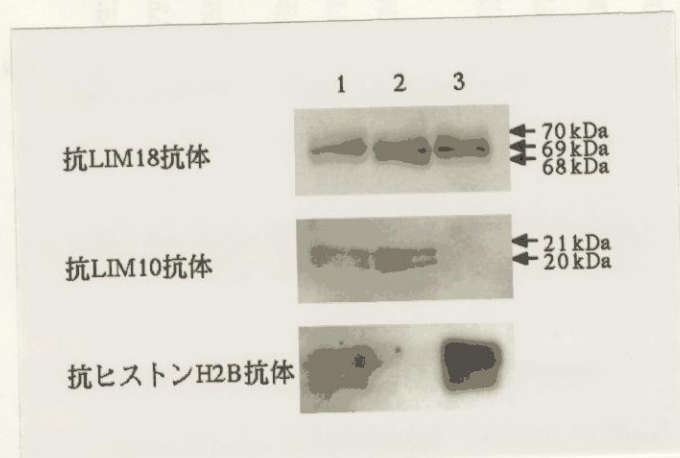


図5 テッポウユリ花粉母細胞の細胞分画実験

テッポウユリのザイゴテン期の花粉母細胞の全細胞抽出物（レーン1）、細胞質画分（レーン2）および核画分（レーン3）を電気泳動後、抗LIM18ポリクローナル抗体、抗LIM10モノクローナル抗体および抗ヒストンH2B抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。タンパク質はレーン当たり5 μ gを電気泳動に用いた。

解析を行いタンパク質を検出した。矢じり、矢印および星印はそれぞれ、GFP、LIM18::GFP、LIM13::GFPタンパク質を示している。

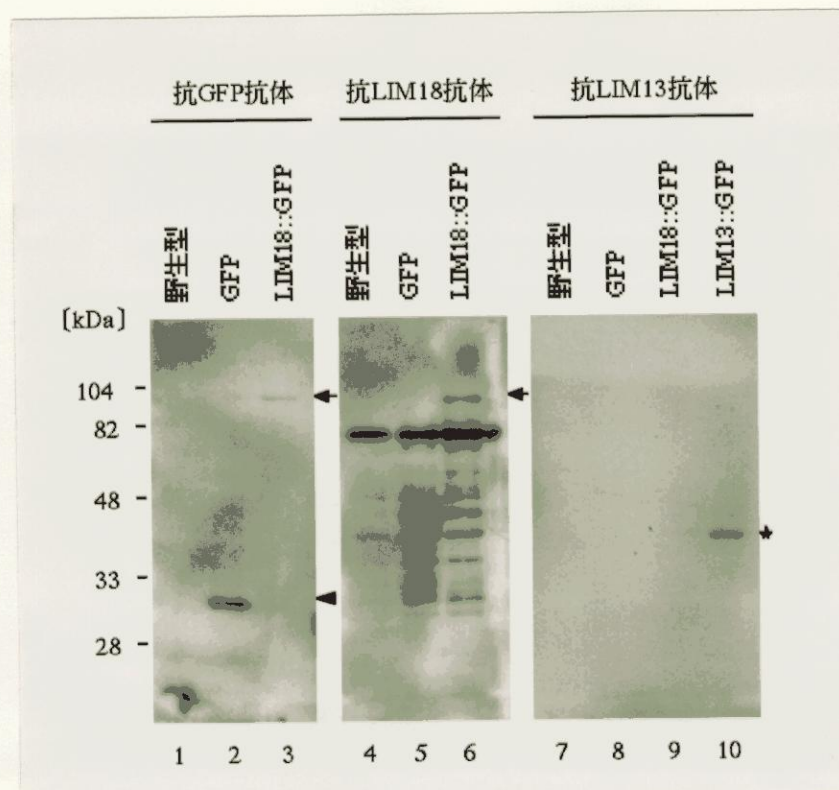


図6 *LIM::GFP*融合遺伝子を導入したタバコBY-2細胞における発現確認
野生型の細胞、*GFP*のみあるいは*LIM::GFP*を導入した形質転換細胞より細胞抽出物を調製後、抗*GFP*モノクローナル抗体、抗*LIM18*ポリクローナル抗体、抗*LIM13*ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行いタンパク質を検出した。矢じり、矢印および星印はそれぞれ、*GFP*、*LIM18::GFP*、*LIM13::GFP*タンパク質を示している。

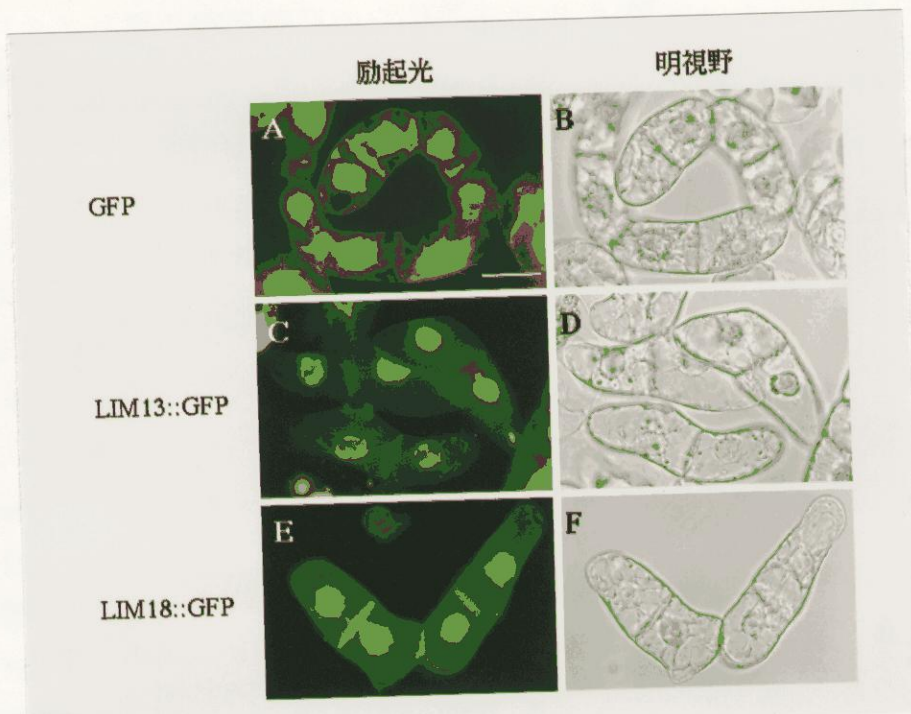


図7 形質転換BY-2細胞におけるLIM::GFP融合タンパク質の局在
 左のパネル (A、C、E) は緑色蛍光を観察した像。同じ細胞を明視野で
 観察した像を右のパネル (B、D、F) に示す。パネルA中のスケールバーの
 長さは $20\mu\text{m}$ を示しており、パネルAからFの細胞は全て同じ倍率で観察し
 た。

考察

テッポウユリにおける HSP70 様タンパク質の発現

本稿では、減数分裂進行過程における HSP70 様タンパク質の機能を推察するために、大腸菌に生産させた組み換え LIM18 を抗原に用いて抗体を作成後、減数分裂解析を行った。テッポウユリのパキテン期の抽出物を二次元電気泳動後により分離後、抗-LIM18 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、6 個のシグナルが検出された（図 3）。このうち 3 個（d、e、f）はパキテン期の細胞特異的に、この他の 3 個（a、b、c）はパキテン期以外の細胞以外に葉、茎からも検出された。抗-LIM18 モノクローナル抗体を用いた場合は、パキテン期の細胞抽出物からは、抗-LIM18 ポリクローナル抗体で検出された 3 個のシグナルのうち、1 個（d）のみが検出された。従って、e、f は細胞特異的に検出されるシグナルである。一方、a、b、c は細胞特異的に検出されるシグナルではない。トマトおぼろ（Tomato）の HSP70 様タンパク質は、熱ストレスにより発現誘導される（Vierling, 1991; Hendrick and Hartl, 1993; Boston et al., 1996; Hartl, 1996; Miernyk, 1997）。そこで、LIM18 の熱ストレス応答性の有無を検討するために、テッポウユリの減数分裂細胞を 42℃で 20～120 分間処理した後、細胞抽出物を調製し、抗-LIM18 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、LIM18 の量的増加は認められなかった（データ省略）。従って、LIM18 の発現に関しては、そのプロモーター領域内に、熱誘導性の遺伝子発現に関与する熱ショックエレメント（HSE: heat shock element）様配列が確認された（第 2 章図 13）が、その発現は熱等のストレスにより誘導されるのではなく、組

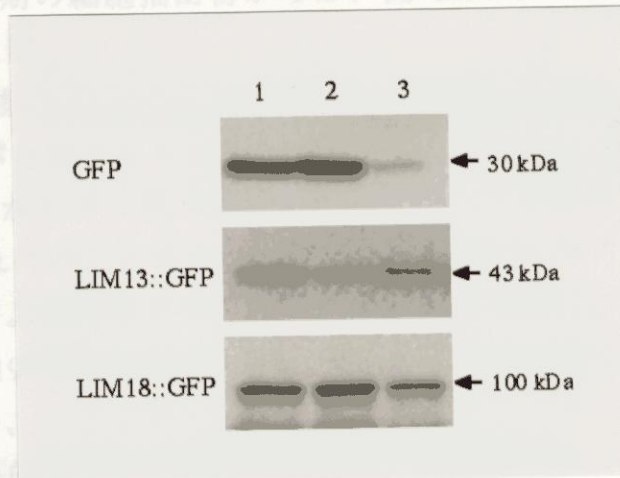


図8 形質転換BY-2細胞の細胞分画実験

形質転換細胞の全細胞抽出物（レーン1）、細胞質画分（レーン2）および核画分（レーン3）を電気泳動後、GFP、LIM13::GFP、LIM18::GFP タンパク質を、それぞれ、抗GFPモノクローナル抗体、抗LIM13ポリクローナル抗体、抗LIM18ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析により検出した。タンパク質はレーン当たり5μgを電気泳動に用いた。

考察

テッポウユリにおける HSP70 様タンパク質の発現

本章では、減数分裂進行過程における HSP70 様タンパク質の機能を推察するために、大腸菌に生産させた組み換え LIM18 を抗原に用いて抗体を作成後、免疫学的解析を行った。テッポウユリのパキテン期の抽出物を二次元電気泳動法により分離後、抗 LIM18 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、6 個のシグナルが検出された (図 3)。このうち 3 個 (d、e、f) はパキテン期の細胞特異的に、この他の 3 個 (a、b、c) はパキテン期の細胞以外に葉、茎からも検出された。抗 LIM18 モノクローナル抗体を用いた場合は、パキテン期の細胞抽出物からは、抗 LIM18 ポリクローナル抗体で認識された 3 個のシグナル (d、e、f) のうち e のみが検出された。従って、e は LIM18 遺伝子産物由来のシグナルであり、LIM18 は減数分裂細胞特異的に働く HSP70 様タンパク質であると考えられる。

パキテン期の細胞からは、抗 LIM18 ポリクローナル抗体に認識されるシグナルが 6 個検出されたが、これらが全て異なる HSP70 様タンパク質なのか、あるいは、トマトおよびエンドウにおいて観察された様に、リン酸化等の修飾 (Nover and Scharf, 1984; Miernyk et al., 1992) を受けた同じ分子由来のタンパク質を含むのか否か、詳細は明らかではない。しかし、マウスの減数分裂細胞には、減数分裂特異的なもの (HSP70-2) と、体細胞であるセルトリ細胞においても存在する HSP70 様タンパク質 (HSC71 と HSC74) が含まれること (Allen et al., 1988a, 1988b; Rosario et al., 1992) から、テッポウユリの減数分裂細胞には、複数の HSP70 様タンパク質が発現していると思われる。高等真核生物の減数分裂細胞の維持には、減数分裂細胞特異的なものを含む、複数種の HSP70 様タンパク質が関与しており、各々のタンパク質が異なる役割を担うこと、あるいは協調して働くことが必要であると考えられる。

ある種の HSP70 様タンパク質は、熱ストレスにより発現誘導される (Vierling, 1991; Hendrick and Hartl, 1993; Boston et al., 1996; Hartl, 1996; Miernyk, 1997)。そこで、LIM18 の熱ストレス応答性の有無を検討するために、テッポウユリの減数分裂細胞を 42℃ で 20~120 分間処理した後、細胞抽出物を調製し、抗 LIM18 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、LIM18 の量的増加は認められなかった (データ省略)。従って、LIM18 遺伝子に関しては、そのプロモーター領域内に、熱誘導性の遺伝子発現に関与する熱ショックエレメント (HSE: heat shock element) 様配列が確認された (第 2 章、図 13) が、その発現は熱等のストレスにより誘導されるのではなく、組

組織・発生段階特異的に制御されると予想される。ヒマワリの低分子量 *Hsp* 遺伝子のひとつである *Ha hsp17.6 G* は、熱依存的な発現誘導を示さないが、そのプロモーター領域内には HSE 様配列が存在する (Carranco et al., 1997, 1999)。このシス配列は種子の登熟過程における遺伝子発現に必要なことから、*LIM18* 遺伝子の HSE 様配列もまた、組織・発生段階特異的な発現調節に関与している可能性がある。*LIM18* と同様に、抗 *LIM18* 抗体に反応性を示す他のタンパク質も、減数分裂細胞では熱処理によって量的変動を示さなかった (データ省略)。以上の結果から、減数分裂細胞において発現する HSP70 様タンパク質は、外的ストレスに対して細胞の防御機能を高めるために働くというよりは、むしろ生理的条件下における減数分裂過程の進行に関与すると考えられる。

HSP70 様タンパク質の細胞内所在

テッポウユリの減数分裂細胞の抗体染色および細胞分画実験の結果から、抗 *LIM18* ポリクローナル抗体に反応性を示す HSP70 様タンパク質は、細胞質のみならず核内にも分布することが明らかになった (図 4、5)。図 4 の実験では、細胞切片に対して種々の染色を行っているため、DAPI 染色においてシグナルが観察された部位が、抗体染色される事実は、核内の HSP70 様タンパク質のなかには、染色体上に分布するものが存在することを示唆している。しかし、これらの実験に用いた抗 *LIM18* ポリクローナル抗体は、*LIM18* を含め、これ以外の *Hsp70* 遺伝子ファミリーのメンバーも交叉認識するため、図 4、5 の結果は、*LIM18* 自身の細胞内局在のみを反映したものではないと考えられる。

LIM18 を特異的に認識する抗体を得るために、*LIM18* と *Hsp70* 遺伝子ファミリーの他のメンバーとの間で保存性が低い領域を抗原に用いて、抗体作成を試みたが、*LIM18* のみを認識する抗血清は得られなかった。そこで、*GFP* をレポーター遺伝子に用いて、*LIM18* の細胞内局在を調査した。タバコ BY-2 細胞において、*LIM18::GFP* 融合タンパク質を発現させた時、*GFP* のみを導入した細胞に比較し、緑色蛍光は核においてより強く観察された (図 7)。BY-2 細胞は、細胞内が大きな液胞で占められているため、緑色蛍光が核あるいは細胞質どちらに由来するのか判別しにくい。細胞分画実験により *LIM18::GFP* 融合タンパク質は細胞質と核に蓄積することが確認された (図 8)。*LIM18::GFP* 融合タンパク質の分子量は 100kDa であり、この大きさのタンパク質は受動拡散によって核内に移動しないと考えられること (Grebenok et al., 1997) から、*LIM18* は核移行能を有し、細胞質と核、両方で機能する分子であると推測される。

HSP70 様タンパク質のなかには、タンパク質の核への移行過程で働くもの

(Imamoto et al., 1992; Okuno et al., 1993)、微少管の構成成分であるチューブリンと結合するもの (Marchesi and Ngo, 1993)、染色体の分配時に機能するセントリントパク質と結合するもの (Uzawa et al., 1995)、タンパク質同士が会合し複合体を形成する過程で働くもの (Smith et al., 1992, 1995) が知られている。以上のことから、核内に分布する HSP70 様タンパク質は、核で機能するタンパク質を細胞質から核へ輸送する過程や、分子集合体の形成と分解に関与し、その結果、相同的遺伝子組み換え、遺伝子組み換えが行われる時期に観察される細胞骨格・染色体構造の変化に直接的あるいは間接的に関与していることが予想される。実際に、高等動物においてこの考えを支持する結果が報告されている。マウスの HSP70-2 は、LIM18 にアミノ酸レベルで 74% の高い相同性を示す HSP70 様タンパク質であるが、これはパキテン期の精母細胞の細胞質と核に分布し、核内の HSP70-2 はシナプトネマ構造に局在する (Allen et al., 1996)。Hsp70-2 遺伝子破壊マウスでは、対合した相同染色体が分離する過程に異常を呈し、減数分裂過程の進行がディプロテン・ディアキネシス期で停止してしまうため、正常な生殖細胞が形成されずに不稔となる (Dix et al., 1996, 1997; Zhu et al., 1997; Eddy, 1999)。LIM18 の構造、発現様式および細胞内所見は、HSP70-2 のそれらと類似することから、LIM18 は HSP70-2 に類似した機能を担っていると考えられる。今後、LIM18 遺伝子の機能を抑制・阻害した、形質転換植物を用いて解析を行うことにより、以上の可能性を検討することが可能である。

LIM18 は、小胞体等の細胞内小器官への移行シグナルはなく、C 末端側に EEVD 配列が存在することから、細胞質型の HSP70 様タンパク質に分類される (Hartl, 1996; Miernyk, 1997)。当初、この構造的な特徴から、LIM18 は減数分裂細胞の細胞質において、分子シャペロンとして合成途中あるいは合成終了後のタンパク質の折りたたみ等の過程に関与すると予想されたが、これ以外にも、本研究により核内において働く可能性が示された。テッポウユリの減数分裂細胞の核に分布する、LIM18 以外の HSP70 様タンパク質の機能にも興味をもたれるが、それを明らかにするためには、各々の HSP70 様タンパク質を同定し、これらが相互作用する分子の単離等を行うことが必要である。

高等植物の Hsp 遺伝子について

高等植物の Hsp70 様遺伝子のなかには、その遺伝子産物の構造が LIM18 に類似性の高いものがある。ハウレンソウ、シロイヌナズナ、トマト、エンドウおよびダイズには、LIM18 のアミノ酸配列に 80% 以上の相同性を示すタンパク質が存在する (Lin et al., 1991; Roberts and Key, 1991; Wu et al., 1994; DeRocher

and Vierling, 1995; Sun et al., 1996; Li et al., 1999)。しかし、これらのタンパク質を含め、他に報告されている HSP70 様タンパク質のなかに、減数分裂細胞に蓄積することが確認されているものはない。高等植物の減数分裂細胞で発現する *Hsp* 遺伝子の研究は、低分子量 *Hsp* および *Hsp90* 遺伝子の構造、発現様式が調査されているのみである (Dietrich et al., 1991; Atkinson et al., 1993; Marrs et al., 1993)。

これまでの *Hsp70* 遺伝子の機能に関する研究は、ストレスとの関連性に着目したものが多く (Vierling, 1991; Hendrick and Hartl, 1993; Boston et al., 1996)。例えば、*Hsp70* 遺伝子を過剰発現させた細胞では、変性したタンパク質の再生能が強くなること (Forreiter et al., 1997)、傷害を受けた光化学系 II の回復能が上昇すること (Schroda et al., 1999) が報告されている。また、細胞内の HSP70 の発現量の減少により、熱ストレスへの耐性能が低下する (Lee and Schöffl, 1996)。このような働きは、HSP70 が分子シャペロンとして一時的に、標的タンパク質に結合・作用することにより行われると考えられる (Vierling, 1991; Hendrick and Hartl, 1993; Boston et al., 1996; Hartl, 1996; Miernyk, 1997)。しかし、出芽酵母のミトコンドリアのエンドヌクレアーゼ *Endo.SceI* では、HSP70 が最終構造体に含まれ、酵素の性質の制御に関与していることが明らかになっている (Morishima et al., 1990; Mizumura et al., 1999)。従って、テッポウユリの減数分裂細胞で発現する HSP70 様タンパク質に関しても、分子シャペロンとしての機能以外に、それ自身が何らかの活性を持つのか否か等、様々な可能性を考慮に入れた解析を行う必要があると考えられる。

第2章 LIM 遺伝子のプロモーター領域の単離および特徴づけ

序論

高等植物の雄性生殖細胞の形成過程は、特定の器官（被子植物ではヤク）において行われ、減数分裂時期の遺伝子組み換え、花粉有糸分裂等、細胞・組織の形態および生理的環境が著しく変化する過程であり、これらの事象には空間的・時間的に制御された遺伝子発現を伴うと考えられる（Mascarenhas, 1990; Scott, 1993）。これまでに、ヤクあるいは花粉において活性化される遺伝子は多数単離されているが（Albani et al., 1990, 1992; Koltunow et al., 1990; Twell et al., 1990, 1991, 1993; van Tunen et al., 1990; Xu et al., 1993; Eyal et al., 1995; Huang et al., 1996; Oldenhof et al., 1996; Custers et al., 1997; Hamilton et al., 1998; Zabaleta et al., 1998）、それらの多くは減数分裂過程が終了した後の一核性小胞子において一過的に発現する遺伝子（Koltunow et al., 1990; Oldenhof et al., 1996; Custers et al., 1997）、1回目の花粉有糸分裂が行われる時期あるいはその後に転写が誘導される遺伝子（Twell et al., 1990, 1991; van Tunen et al., 1990; Albani et al., 1992; Eyal et al., 1995; Huang et al., 1996）、これら両方の時期すなわち一核性小胞子が形成されてから、1回目の花粉有糸分裂が終了した後の期間において、転写産物が検出される遺伝子（Albani et al., 1990; Koltunow et al., 1990）に分類される。特に、成熟花粉において発現する遺伝子は、解析に用いる材料を確保することが比較的容易なこともあり研究が進展しており、発現制御に関与するシス領域が限定されている（Twell et al., 1991; Eyal et al., 1995; Zabaleta et al., 1998）。

これに対し、減数分裂時期に活性化される遺伝子に関しては、シロイヌナズナの *A9*、*AtDMC1*、*ArLIM15*（Paul et al., 1992; Sato et al., 1995; Klimyuk and Jones, 1997; Doutriaux et al., 1998）、タバコの *CCaMK*（Poovaiah et al., 1999）が報告されているが、発現の時期・組織特異性を規定するシス配列および転写制御因子に関する解析は行われていない。減数分裂細胞において働くプロモーターは、遺伝子の機能・発現調節機構の解析に利用可能なだけでなく、減数分裂細胞に人為的に新たな機能を付与する等、減数分裂細胞を用いた遺伝子発現系の開発につながるため、その様な特性を持つプロモーターを得ることは、応用的な観点からも重要であると考えられる。そこで、本章では減数分裂時期に機能するプロモーターを単離するために、その遺伝子の多くが減数分裂細胞特異的に発現する *LIM* より発現制御領域を複数同定し、これらの特性を一過的発現実験および形質転換植物を用いた方法により調査した。

材料と方法

植物材料

タバコは、*Nicotiana tabacum* cv. SR1 を用いた。雄性配偶体形成過程における発生段階の決定は Koltunow ら (1990) の報告を参考にし、最終的には、ヤク内より絞り出した細胞を光学顕微鏡下で観察することにより決定した。各ステージとつぼみの長さとの関係は、減数分裂時期は 6-8mm、一核性小孢子形成時期は 9-15mm、二細胞性花粉形成時期は 17mm 以上であった。

プライマーの配列

使用したプライマーの名称および配列を表 2 に示す。

テッポウユリのゲノム DNA の調製

テッポウユリの花粉母細胞からの DNA の抽出は、CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) により行った。ザイゴテン期の花粉母細胞 1~1.5ml に海砂と液体窒素を加え、乳棒と乳鉢を用いて細胞をすりつぶし、3ml の 2% CTAB 溶液 [100mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、20mM EDTA、1.4 M 塩化ナトリウム、2% CTAB] を加え更に混和し、それを 65℃で 30 分間インキュベートした。次に、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 3ml 加え 5 分間転倒混和した。混和後、20℃、7,700 × g で 20 分間遠心を行い上清を得た。上清 800 μl を微量遠心チューブに分注し、更に、1% CTAB 溶液 [50mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、10mM EDTA、1% CTAB] 1ml を加え転倒混和した。室温で 1 時間放置後、20℃、4,000 × g で 10 分間遠心を行い沈澱を回収した。それに 1M 塩化セシウムを 600 μl 加え、45℃に保温し沈澱を溶解させた。溶解後、それに 100% エタノールを 1,200 μl 加え、20℃、8,500 × g で 5 分間遠心し沈澱を得た。それを 70% エタノールで洗浄して、600 μl の TE 緩衝液 [10mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、1mM EDTA] に溶解し、更に RNase 処理を行い、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) 処理を 3 回繰り返し、エタノール沈澱後、TE 緩衝液に溶解し DNA を得た。

Vectorette 法および Inverse PCR 法

Vectorette 法 (Isegawa et al., 1992) および Inverse PCR 法 (Ochman et al., 1988; Triglia et al., 1988) は、それぞれ LA PCR *in vitro* Cloning Kit (宝酒造社)、LA PCR Kit Ver.2.1 (宝酒造社) を用いて行った。それぞれの方法の原理およびプロモーター領域単離方法の概略を、本文の結果の項と図 9、10 に示す。

LIM10 遺伝子のプロモーター領域の単離：ゲノム DNA を *Bam*HI 処理後、キットに添付のカセットを付加したものを、PCR の鋳型に用いた。PCR はカセットプライマー C1 とプライマー 10Pro1 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 30 秒－64℃で 1 分－72℃で 2 分の反応を 30 サイクル行った。更に、この反応液を鋳型として Nested-PCR を行った。PCR はカセットプライマー C2 とプライマー 10Pro2 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 30 秒－66℃で 1 分－72℃で 2 分の反応を 30 サイクル行った。得られた断片を pT7Blue T-vector (Novagen 社) にサブクローニング後、塩基配列を決定した。最後に、未処理のゲノム DNA を鋳型として、プライマー 4S-44 および 10Pro1 を用いて PCR を行った。PCR は 94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－64℃で 1 分－72℃で 2 分の反応を 25 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。増幅した断片を、pBluescript KS (Stratagene 社) の *Sma*I 部位にサブクローニング後（以下、このプラスミドを pLIM10:::-1309 とする）、塩基配列を決定しこの断片が *LIM10* 遺伝子の 5'上流-1309 までの領域を含むことを確認した。

LIM12 遺伝子プロモーター領域の単離：ゲノム DNA を *Hinc*II 処理後、自己環状化したものを、PCR の鋳型に用いた。PCR はプライマー 12Pro2 および 12Pro3 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－55℃で 5 分－72℃で 4 分の反応を 30 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。更に、この反応液を鋳型として Nested-PCR を行った。PCR はプライマー 12Pro1 および 12Pro4 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－59℃で 1 分－72℃で 3 分の反応を 25 サイクル行い、続けて 72℃で 7 分間反応させた。得られた断片を pBluescript KS の *Sma*I 部位にサブクローニング後、塩基配列を決定した。最後に、未処理のゲノム DNA を鋳型として、プライマー 12-inter-7 および 12Pro2 を用いて PCR を行った。PCR は 94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－55℃で 1 分－72℃で 3 分の反応を 25 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。更に、この反応液を鋳型として Nested-PCR を行った。PCR はプライマー 12-inter-8 および 12Pro1 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－50℃で 1 分－72℃で 5 分の反応を 25 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。増幅した断片を、pBluescript KS の *Sma*I 部位にサブクローニング後、塩基配列を決定しこの断片が *LIM12* 遺伝子の 5'上流-1305 までの領域を含むことを確認した。

LIM18 遺伝子プロモーター領域の単離：ゲノム DNA を *Eco*RI 処理後、キットに添付のカセットを付加したものを、PCR の鋳型に用いた。PCR はカセットプライマー C1 とプライマー 18Pro1 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 30 秒－62℃で 1 分－72℃で 2 分の反応を 30 サイクル行った。更に、この反

応液を鋳型として Nested-PCR を行った。PCR はカセットプライマー C2 とプライマー 18Pro2 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 30 秒-62℃で 1 分-72℃で 2 分の反応を 30 サイクル行った。得られた断片を pT7Blue T-vector にサブクローニング後、塩基配列を決定した。次に、未処理のゲノム DNA を鋳型としてプライマー 18PrimA および 18Pro2 を用いて PCR を行った。PCR は 94℃で 5 分間変性した後、94℃で 30 秒-52.5℃で 1 分-72℃で 2 分の反応を 25 サイクル行った。増幅した断片を、pT7Blue T-vector にサブクローニング後（以下、このプラスミドを pLIM18:::-399 とする）、塩基配列を決定しこの断片が *LIM18* 遺伝子の 5'上流-399 までの領域を含むことを確認した。

続けて、5'上流のより長い領域を単離するために以下の反応を行った。ゲノム DNA を *XhoI* 処理後、キットに添付のカセットを付加したものを、PCR の鋳型に用いた。PCR はカセットプライマー C1 とプライマー 18Pro3 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 30 秒-66℃で 1 分-72℃で 2 分の反応を 30 サイクル行った。更に、この反応液を鋳型として Nested-PCR を行った。PCR はカセットプライマー C2 とプライマー 18Pro4 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 30 秒-62℃で 1 分-72℃で 2 分の反応を 30 サイクル行った。得られた断片を pBluescript KS の *SmaI* 部位にサブクローニング後、塩基配列を決定した。最後に、未処理のゲノム DNA を鋳型として、プライマー P64-19 および 18Pro3 を用いて PCR を行った。PCR は 94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分-64℃で 1 分-72℃で 2 分の反応を 25 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。増幅した断片を、pBluescript KS の *SmaI* 部位にサブクローニング後（以下、このプラスミドを pLIM18:::-1731 とする）、塩基配列を決定しこの断片が *LIM18* 遺伝子の 5'上流-1731 から-196 の領域を含むことを確認した。

LIM15 遺伝子プロモーター領域の単離：シロイヌナズナの *LIM15* 相同遺伝子 (*ArLIM15*、*AtDMC1*) には、イントロンが含まれていることが報告されている (Sato et al., 1995; Klimyuk and Jones, 1997) ため、*LIM15* 遺伝子にもイントロンが含まれているか否かを調べた。初めに、未処理のゲノム DNA を鋳型として、プライマー 15Pro4 および 15Pro8 を用いた PCR により、*LIM15* 遺伝子のコーディング領域の増幅を行った。94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分-58℃で 1 分-72℃で 3 分の反応を 30 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。得られた断片を pT7Blue T-vector にサブクローニングし、部分的に塩基配列を決定したところ、*LIM15* 遺伝子はイントロンを持つことが明らかになった (図 14)。従って、イントロン領域内にある制限酵素 (*XbaI*) およびプライマーを用いてプロモーター領域の単離を行った。

ゲノム DNA を *Xba*I 処理後、自己環状化したものを、PCR の鋳型に用いた。PCR はプライマー 15Pro2 および 15Pro9 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－55℃で 1 分－72℃で 3 分の反応を 30 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。更に、この反応液を鋳型として Nested-PCR を行った。PCR はプライマー 15Pro1 および 15Pro10 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－55℃で 1 分－72℃で 5 分の反応を 30 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。得られた断片を pBluescript KS の *Sma*I 部位にサブクロニング後、塩基配列を決定した。最後に、未処理のゲノム DNA を鋳型として、プライマー 15Pro2 および 15Pro11 を用いて PCR を行った。PCR は 94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－50℃で 1 分－72℃で 5 分の反応を 25 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。更に、この反応液を鋳型として Nested-PCR を行った。PCR はプライマー 15Pro1 および 15Pro14 を用いて、94℃で 5 分間変性した後、94℃で 1 分－55℃で 1 分－72℃で 5 分の反応を 25 サイクル行い、続けて 72℃で 5 分間反応させた。増幅した断片を、pBluescript KS の *Sma*I 部位にサブクロニング後、塩基配列を決定しこの断片が *LIM15* 遺伝子の 5' 上流-2962 までの領域を含むことを確認した。

プロモーター領域の配列の解析

プロモーター領域の配列の解析には、農林水産省農業生物資源研究所が作成した解析プログラム (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>)、および Blast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を利用した。

RT-PCR

植物体の各組織からの全 RNA の抽出および逆転写反応は、それぞれ、RNeasy (Qiagen 社)、RNA PCR kit (AMV) Ver.2.1. (宝酒造社) を用いて、付属のプロトコールに従って行った。全 RNA 0.5 μ g にランダムプライマーを混合し容量 10 μ l の反応液で cDNA を合成させた後、この中から 1 μ l を次に示す PCR の鋳型として使用した。

PCR の反応液の容量は 10 μ l、反応の温度設定は

- | | | |
|-----------|----------|---------------------|
| 1) 変性 | 94℃、5 分 | |
| 2) 変性 | 94℃、30 秒 | |
| 3) アニーリング | 55℃、30 秒 | |
| 4) 伸長反応 | 72℃、30 秒 | 2) から 4) のサイクルを繰り返す |
| 5) 伸長反応 | 72℃、5 分 | |

で行った。この時、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼおよび *EF-1 α* 遺伝

子の cDNA の増幅には、それぞれ、プライマーセットとして、GUS 5'RT と GUS 3'RT、F-LUC+と R-LUC+、EF-1 α - 5'RT と NT,EF-1 α , 3'RT を使用した。PCR 産物の検出には反応液 4 μ l を電気泳動に用いた。

プラスミドの構築

LIM10 遺伝子プロモーター::ルシフェラーゼ融合遺伝子を持つプラスミドの構築：pLIM10:::-1309 を *KpnI* で処理後、平滑末端化し、続けて *NcoI* で処理することにより、プロモーター領域を含む断片を切り出した。この断片を、pBI221-LUC+の *NcoI* および平滑末端化した *HindIII* 部位にサブクロニングし、このプラスミド（以下、pLIM10prom::221::LUC+とする）を、一過的発現実験に用いた。次に、pLIM10prom::221::LUC+を *PvuII* で処理し、**LIM10 遺伝子プロモーター::ルシフェラーゼ融合遺伝子を含む断片を切り出した。**この断片をバイナリーベクター pBI101 (Clontech 社) の *SmaI* および平滑末端化した *EcoRI* 部位にサブクロニングし、このプラスミドを形質転換体の作成に用いた。

LIM10 遺伝子プロモーター:: β -グルクロニダーゼ融合遺伝子を持つプラスミドの構築：pLIM10:::-1309 を *BstXI* で処理後、平滑末端化し、続けて *PstI* で処理することにより、プロモーター領域を含む断片を切り出した。この断片を、pBI221 (Clontech 社) の *SmaI* および *PstI* 部位にサブクロニングした（以下、このプラスミドを pLIM10prom::221::GUS とする）。次に、pLIM10prom::221::GUS を *PvuII* で処理し、**LIM10 遺伝子プロモーター:: β -グルクロニダーゼ融合遺伝子を含む断片を切り出した。**この断片を pBI101 の *SmaI* および平滑末端化した *EcoRI* 部位にサブクロニングし、このプラスミドを形質転換体の作成に用いた。

LIM18 遺伝子プロモーター::ルシフェラーゼ融合遺伝子を持つプラスミドの構築：pLIM18:::-399 を *KpnI* 処理後、平滑末端化し、続けて *PpuMI* で処理した。pLIM18:::-1731 を *XhoI* 処理後、平滑末端化し、続けて *PpuMI* で処理した。これらの処理を行ったプラスミドからプロモーター領域を含む断片を回収後、それぞれの断片を *PpuMI* 部位で結合させ、単離したプロモーターの全長および **LIM18 遺伝子のコーディング領域（+48 の *KpnI* 部位より 5'上流域）を含む断片を作成した。**この断片を pBI221-LUC+の平滑末端化した *HindIII* 部位にサブクロニングし、このプラスミド（以下、pLIM18prom::221::LUC+とする）を一過的発現実験に用いた。次に、pLIM18prom::221::LUC+を *PvuII* で処理し、**LIM18 遺伝子プロモーター::ルシフェラーゼ融合遺伝子を含む断片を切り出した。**この断片を pBI101 の *SmaI* および平滑末端化した *EcoRI* 部位にサブクロニングし、このプラスミドを形質転換体の作成に用いた。

LIM18 遺伝子プロモーター:: β -グルクロニダーゼ融合遺伝子を持つプラスミドの構築: pLIM18::399 を *KpnI* 処理後、平滑末端化し、続けて *PpuMI* で処理した。pLIM18::1731 を *HindIII* および *PpuMI* で処理した。これらの処理を行ったプラスミドからプロモーター領域を含む断片を回収後、それぞれの断片を *PpuMI* 部位で結合させ、単離したプロモーターの全長および *LIM18* 遺伝子のコーディング領域 (+48 の *KpnI* 部位より 5'上流域) を含む断片を作成した。この断片を pBI221 の *HindIII* および平滑末端化した *BamHI* 部位にサブクロニングした、(以下このプラスミドを pLIM18prom::221::GUS とする)。次に、pLIM18prom::221::GUS を *PvuII* で処理し、*LIM18* 遺伝子プロモーター:: β -グルクロニダーゼ融合遺伝子を含む断片を切り出した。この断片を pBI101 の *SmaI* および平滑末端化した *EcoRI* 部位にサブクロニングし、このプラスミドを形質転換体の作成に用いた。

ルシフェラーゼ遺伝子のみを持ちプロモーター領域が含まれないプラスミドの構築: pBI221-LUC+を *HindIII* で処理することにより、*CaMV 35S* 遺伝子のプロモーター領域を取り除いた。これを、自己環状化したプラスミドを一過的発現実験に用いた。

形質転換タバコの作成

バイナリーベクターをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム LBA4404 株 (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) に導入後、Horsch ら (1985) の方法に基づいて葉に感染させた。形質転換体の選抜・培養には、Murashige-Skoog 培地 (Murashige, 1974) にカナマイシンは 50 μ g/ml、カルベニシリンは 250 μ g/ml の濃度になるように加えた培地を用いた。感染させた葉由来の再生個体を T0 世代とし、自家受精を繰り返した植物体を順番に、T1、T2、T3 世代とした。解析には、T1 から T3 世代の植物体を用いた。

一過的発現実験

内部標準用のプラスミドとして、*CaMV 35S* 遺伝子のプロモーターの下流に、ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) のレニラルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミド、およびプロモーター活性測定用のプラスミドとして、それぞれの遺伝子のプロモーターの下流に、ホタル (*Photinus pyralis*) のファイヤーフライシフェラーゼ遺伝子を連結させたプラスミド、を同時に遺伝子銃を用いて種々の細胞・組織に導入後、それぞれのプラスミドがコードするレポータータンパク質の活性測定を行った (図 15)。

遺伝子銃は、PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery system (Bio-Rad 社) を

用いて、付属のプロトコールに従って行った。金粒子（直径 $1.6\mu\text{l}$ ）への DNA の吸着方法を次に示す。金粒子を、50%グリセロールに懸濁し、濃度を 60mg/ml に調整した。これを $25\mu\text{l}$ ずつチューブに分注し、激しく攪拌しながら順次、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA を $2\mu\text{l}$ 、 2.5M 塩化カルシウムを $25\mu\text{l}$ 、 0.1m スペルミジンを $10\mu\text{l}$ 加え、更に攪拌を 2~3 分間行った。1 分間静置後、遠心し上清を捨てた。金粒子を、 $200\mu\text{l}$ の 70% エタノールおよび $200\mu\text{l}$ の 100% エタノール、それぞれの溶液により 1 回ずつ洗浄し、最後に $30\mu\text{l}$ の 100% エタノールに懸濁した。この溶液 $6\mu\text{l}$ を 1 回の遺伝子導入実験に用いた。遺伝子を導入した後、24~28 時間経過した試料より細胞抽出物を調製し、活性測定を行った。

活性測定は、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System（Promega 社）を用いて、付属のプロトコールに従って行った。試料に Passive lysis 緩衝液を加え、乳鉢を用いて試料の破碎を行った後、これを 4°C 、 $10,000 \times g$ で 5 分間遠心し上清を回収した。この上清 $10\mu\text{l}$ と LARII 溶液 $50\mu\text{l}$ を混合し、フォトンカウンター（Berthold 社、Lumat LB9501）を用いて 10 秒間測定を行った。この時のカウント数を、ファイヤーフライルシフェラーゼの活性値とした。続けてこの溶液に、Stop&Glo™ 試薬 $50\mu\text{l}$ を加え混和し、フォトンカウンターを用いて 10 秒間測定を行った。この時のカウント数を、レニラルシフェラーゼの活性値とした。ファイヤーフライルシフェラーゼの活性値を、レニラルシフェラーゼの活性値で除した数値をプロモーターの活性とした。

形質転換体の β -グルクロニダーゼ活性の測定

形質転換体の細胞、組織の β -グルクロニダーゼ活性の測定は、GUS-Light™（Tropix 社）を用い、付属のプロトコールに従って行った。 $0.05\sim 0.2\text{g}$ の試料に $100\sim 200\mu\text{l}$ の Lysis 緩衝液を加え乳鉢あるいはガラスホモジェナイザーを用いて試料の破碎を行った後、これを 4°C 、 $10,000 \times g$ で 5 分間遠心し上清を回収した。回収した上清を Lysis 緩衝液により 10 倍に希釈後、この希釈液 $10\mu\text{l}$ と 100 倍希釈した基質を含む溶液 $70\mu\text{l}$ を混合し、 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた。反応終了後、アクセレーター溶液 $100\mu\text{l}$ を加え混和し、フォトンカウンターを用いて 5 秒間測定を行った。上清のタンパク質の濃度を、プロテインアッセイキット I（Bio-Rad 社）を用いた色素結合法により定量した。活性測定に使用した上清に含まれるタンパク質量当たりのフォトンカウンターの値を活性（counts/sec/ng protein）とした。

形質転換体のルシフェラーゼ活性の測定

形質転換体の細胞、組織のルシフェラーゼ活性の測定は、Luciferase Reporter

Gene Assay (Boehringer Mannheim 社) を用い、付属のプロトコールに従って行った。試料 0.05~0.2g に 100~200 μ l の Lysis 緩衝液を加え乳鉢あるいはガラスホモジェナイザーを用いて試料の破碎を行った後、これを 4℃、10,000 $\times$ g で 5 分間遠心し上清を回収した。回収した上清を Lysis 緩衝液により 10 倍に希釈後、この希釈液 10 μ l と基質溶液 50 μ l を混和し、フォトンカウンターを用いて 10 秒間測定を行った。上清のタンパク質の濃度を、DC Protein Assay キット (Bio-Rad 社) を用いた Lowry 法により定量した。活性測定に使用した上清に含まれるタンパク質量当たりのフォトンカウンターの値を活性 (counts/sec/ng protein) とした。

組織染色

β -グルクロニダーゼ活性は、X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) を基質として用いた活性染色 (Jefferson et al., 1987; Nishihara et al., 1993) により検出した。ヤクより絞り出した細胞あるいは花粉を固定液 [0.25% パラホルムアルデヒド、0.125mM EDTA、100mM リン酸水素二ナトリウム/リン酸二水素ナトリウム (pH 7.0)] に浸し、室温で 20 分間処理する。その後、100mM リン酸水素二ナトリウム/リン酸二水素ナトリウム (pH 7.0) で 3 回洗浄し、染色液 [0.1% Triton X-100、20% メタノール、10mM β -メルカプトエタノール、2mM X-Gluc、50mM リン酸水素二ナトリウム/リン酸二水素ナトリウム (pH 7.0)] 中で 37℃、36~40 時間反応させた。

結果

LIM 遺伝子のプロモーター領域の単離方法の概略

ユリはゲノムサイズが非常に大きい (1×10^{11} bp) ため (Johnson, 1994)、ゲノムライブラリーをスクリーニングする方法により、LIM 遺伝子のプロモーター領域を単離する方法は現実的ではないと考えられた。そこで、PCR を原理とした Vectorette 法および Inverse PCR を併用することにより、プロモーター領域を含む DNA 断片の増幅を行った。図 9、10 に各方法の原理およびプロモーター領域単離方法の概略を示す。

Vectorette 法および Inverse PCR 法ともに、ゲノム DNA を制限酵素で処理後、カセット付加あるいは自己環状化の操作段階において、本来、プロモーター領域には存在しない DNA 断片 (図 10、×で示した断片) が挿入されてしまい、この断片がプロモーター領域に結合したキメラ DNA が増幅されてしまう問題が生じた。このため、キメラ断片とプロモーター領域のみが増幅された目的の断片を区別するために、増幅された断片の配列を決定後、この領域内にプライマーを設定し、これと LIM 遺伝子の cDNA 領域内のプライマーを用いて、制限酵素処理を行わないゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。最終的に得られた断片の配列を決定し、この断片が cDNA の 5' 上流域に存在することを確認後、LIM 遺伝子のプロモーター領域を含む断片とした。この方法により、LIM10、LIM12 (共に低分子量 Hsp 遺伝子)、LIM15 (出芽酵母 *Dmc1/Isc2* 相同遺伝子) および LIM18 遺伝子に関して、それぞれ、1309bp、1305bp、2962bp、1731bp の長さのプロモーター領域を含む断片を単離した (図 11、12、13、14)。

LIM 遺伝子のプロモーター領域の配列

単離した 4 種類の LIM 遺伝子のプロモーター領域いずれにおいても、TATA box 様配列等の既知のシス配列、あるいは特徴的な配列が存在したので以下にそれらを示す。

LIM10 および LIM12 遺伝子のプロモーター領域には、Hsp 遺伝子の熱ストレスによる発現誘導に寄与するシス配列 HSE (heat shock element、nGAAn と nTTCn が交互に 3 個以上並んだ配列、n は任意の塩基) (Fernandes et al., 1994) に類似の配列が、LIM10 遺伝子では -144 と -114 に、LIM12 遺伝子では -156 に存在した (図 11、12)。LIM10 遺伝子には、カリフラワーモザイクウイルス 35S 遺伝子 (*CaMV 35S*: cauliflower mosaic virus 35S) の発現の際にエンハンサーとして働く、TGACG 配列およびこれの逆向きの配列 (Lam et al., 1989) が、そ

れぞれ-281 と-591 に、光誘導性遺伝子 *rbcS* の 5'上流域に存在する I box (GATAAG) (Giuliano et al., 1988; Donald and Cashmore, 1990; Terzaghi and Cashmore, 1995) が-366 と-30 に、光以外にも植物ホルモン等、種々の刺激により発現誘導される遺伝子のシス配列として働く G box (CACGTG) (Donald and Cashmore, 1990; Foster et al., 1994) が-329 に確認された (図 11)。これらの他に、AT に富む対称配列 (AAATTATAATATTAAAATTT) が-577 から-558 に、エリシターによる発現誘導に関与する TTGACC 配列 (Raventos et al., 1995; Rushton et al., 1996) が-121 に存在した。

LIM12 遺伝子には、TATA box 様配列の近傍に、CCAAT box が-89 に、TTGACC 配列およびこれの逆向きの配列が、それぞれ-122 と-106 に存在した (図 12)。この他に、I box の逆向きの配列が-1294 に、対称配列 (ACTCTAGTCTAGAGT) が-948 から-934 に見られた。また、*LIM10* および *LIM12* 遺伝子のプロモーター配列の比較を行ったところ、それぞれの遺伝子の開始コドンより 5'上流約 270bp の領域において、配列の 71%が同一であった (図 11)。

LIM18 遺伝子のプロモーター領域には、I box の逆向きの配列が-1416 に、G box が-1192 に、TGACG 配列の逆向きの配列が-1570 と-1518 に見られた (図 13)。また、HSE に類似の配列は、-1287、-868 および-226 の 3ヶ所に存在した。49bp の繰り返し配列が、-684 から-636 と-635 から-587 との間において見られ、このうち 26bp の配列は-546 から-521 にも存在した。この他に、ヤク・花粉関連遺伝子 (トマトの *LAT52*、*LAT56* 遺伝子、シロイヌナズナの *PSST*、*55 kDa*、*TYKY* 遺伝子) の発現制御に関与する、Pollen box のコア配列 (TGTGGTT) (Twell et al., 1991; Zabaleta et al., 1998) が-733 に見られた。

LIM15 遺伝子のプロモーター領域内には、Pollen box のコア配列およびこれの逆向きの配列が、それぞれ-2954 と-1168 の 2ヶ所に、2個の CCAAT box およびこれの逆向きの配列が、それぞれ-318、-61 と-273 に、TTGACC 配列およびこれの逆向きの配列が、それぞれ-1796 と-201 に存在した (図 14)。また、シロイヌナズナ *LIM15* 相同遺伝子 (*ArLIM15*) の転写開始点から 5'上流 300bp までの領域内には、6bp の配列 (AAAGTG) が 3ヶ所にある (Sato et al., 1995) が、*LIM15* 遺伝子にもこの配列および逆向きの配列が、それぞれ-431 と-392 に見られた。

一過的発現実験による *LIM* 遺伝子プロモーターの特性の調査

LIM 遺伝子プロモーターの活性の細胞・組織特異性を調査するために、プロ

モーターの下流にホタル (*Photinus pyralis*) のファイヤーフライルシフェラーゼ遺伝子を連結させた融合遺伝子を、遺伝子銃を用いてテッポウユリおよびタバコの各細胞・組織に導入後、レポータータンパク質の活性測定を行った。この実験では、遺伝子の導入効率の違いによる活性の変動を補正するために、内部標準用として、体細胞において構成的に発現する *CaMV 35S* 遺伝子のプロモーター (Wilkinson et al., 1997) の下流にウミシイタケ (*Renilla reniformis*) のレニラルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミド、を同時に各細胞・組織に導入した。それぞれのレポータータンパク質の活性を測定後、ファイヤーフライルシフェラーゼの活性値を、レニラルシフェラーゼの活性値で除した数値をプロモーターの活性とした (図 15)。

テッポウユリの花粉母細胞では、プロモーターを含まずファイヤーフライルシフェラーゼ遺伝子のみを持つプラスミドを導入した時の活性に比較して、*CaMV 35S*、*LIM10* および *LIM18* 遺伝子のプロモーターの活性は 100 倍以上高い数値を示した (図 16、パネル A)。これに対し、葉では *CaMV 35S* 遺伝子プロモーターのみが高い活性を示し、*LIM18* 遺伝子プロモーターの活性の 67 倍となった。*LIM10* 遺伝子プロモーターの活性は、プロモーターを含まないファイヤーフライルシフェラーゼ遺伝子のみを持つプラスミドを導入した時の活性の大きさと差はなかった。タバコの葉においても、テッポウユリの葉を用いた時の結果と同様の傾向を示し、*LIM10* 遺伝子のプロモーターの活性はプロモーターを含まないプラスミドを導入した時の活性と同程度であり、*CaMV 35S* 遺伝子のプロモーター活性は、*LIM18* 遺伝子のそれより 27 倍高かった (図 16、パネル B)。莖では、*LIM10* および *LIM18* 遺伝子プロモーターの活性は、それぞれ *CaMV 35S* 遺伝子のプロモーター活性の、1/16 以下、1/6 以下であった。以上の結果から、*LIM10* および *LIM18* 遺伝子のプロモーターの働きは、細胞・組織特異的に制御されており、体細胞組織では抑制されていると考えられた。

形質転換タバコを用いた *LIM* 遺伝子プロモーターの特性の調査

タバコは、雄性配偶体の形成過程がつぼみの伸長に伴い比較的同調した状態で進行するため、つぼみの大きさを指標にして、発生段階の各ステージにある細胞を得ることが可能である (Koltunow et al., 1990)。そこで、単離した *LIM10* および *LIM18* 遺伝子のプロモーターの下流に、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼあるいは β -グルクロニダーゼ遺伝子を連結させた融合遺伝子を導入した形質転換タバコを作成し、これを用いてプロモーターの性状解析を行った。以下、*LIM10* 遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼあるいは β -グルクロニダーゼを連結した融合遺伝子を導入した形質転換タバコを、それぞれ

LIM10::LUC 植物体、*LIM10::GUS* 植物体と記載する。*LIM18*、*CaMV 35S* 遺伝子のプロモーターを用いて作出した形質転換体も、これに準じて表記する。

LIM10 遺伝子プロモーターの特性

LIM10::LUC、*LIM10::GUS* 植物体、それぞれ独立した形質転換体 6 系統を用いて、種々のステージにあるヤク、成熟花粉、葉、茎および根より細胞抽出物を調製し、レポータータンパク質の活性測定を行った。その結果、植物体間で活性の発現様式が異なる系統、あるいは発現様式が類似するものの活性レベルに違いがある系統（例えば、*LIM10::LUC* 植物体では 6-4、10-4、3-5-2、8-3-3、1-5-2、*LIM10::GUS* 植物体では 1-5-5、20-2）が存在した（図 18、19）。しかし、調べた全ての形質転換体において見られた共通の特徴として、ヤクの活性は、減数分裂時期から一核性小孢子形成時期では野生型のヤクの活性と同程度もしくは数倍高い程度であるが、二細胞性花粉形成時期以降ではつぼみの伸長に伴い上昇した。また、この活性は、7 系統の植物体（*LIM10::LUC* 植物体では 6-4、10-4、3-5-2、11-1、*LIM10::GUS* 植物体では 1-5-5、20-2、12-2）の成熟花粉においても維持されていた。野生型の植物体では、上記の細胞・組織において、ルシフェラーゼ活性は 0.002 以下、 β -グルクロニダーゼ活性は 0.2 以下の数値を示した（図 17）。二細胞性花粉を含むヤクの活性に比較し、茎あるいは根の活性が高い植物体（*LIM10::GUS* 植物体では系統 2-5-1、19-3）、明瞭な組織特異性を示さない植物体（*LIM10::LUC* 植物体では系統 11-1、*LIM10::GUS* 植物体では系統 18-4-1）も観察されたが、レポーター遺伝子の種類に関係なく、12 系統全ての植物体において、ヤクの活性とつぼみの大きさとの間には相関が認められたことから、*LIM10* 遺伝子プロモーターは、少なくともヤクにおいては発生段階特異的にその働きが制御されていると考えられた。

つぼみを構成する器官におけるプロモーター活性の特異性を調べるために、葉、茎、根に比較してヤクにおいて 140 倍以上高い活性を示す *LIM10::LUC* 植物体（系統 3-5-2）を用いて、大きさの異なるつぼみおよび開花した花より、ヤク、めしべ、がく、花弁、花糸および成熟花粉を分別後、これらのルシフェラーゼ活性を測定した。つぼみ長が 7mm、13mm の時は、いずれの器官においても活性は低い、長さが 30mm、39mm のつぼみ由来のヤクと開花した花の成熟花粉の活性は、他の器官の活性に比較し 70 倍以上高い測定値を示した（図 20）。

次に、*LIM10::GUS* 植物体（系統 20-2）のヤクより絞り出した細胞および成熟花粉に対して、X-Gluc を基質とした活性染色を行った。この時、比較対照として、野生型および図 17 に示した活性特性を持つ *CaMV 35S::GUS* 植物体

(系統 A8-8) を用いた。*LIM10::GUS* 植物体では、減数分裂細胞、一核性小胞子は染色されないが、二細胞性花粉および成熟花粉から β -グルクロニダーゼ活性が検出された。野生型と *CaMV 35S::GUS* 植物体では、同時期の細胞において活性は確認されなかった (図 21)。以上のことから、*LIM10* 遺伝子プロモーターは雄性配偶体形成過程において特異的に働き、二細胞性花粉、成熟花粉においてその働きが活性化されることが示唆された。

LIM18 遺伝子プロモーターの特性

LIM18::LUC 植物体は 6 系統、*LIM18::GUS* 植物体は 9 系統を用いてヤク、成熟花粉、葉、茎および根におけるレポータータンパク質の活性測定を行った。その結果、植物体間で活性の発現様式が異なる系統、あるいは発現様式が類似するものの活性レベルに違いがある系統 (例えば、*LIM18::GUS* 植物体では 13-1-2-1、28-3、25-4、26-3) が存在した (図 22、23)。ヤクにおける活性が、二細胞性花粉形成時期より後の段階において上昇する現象は、*LIM10* 遺伝子プロモーターを導入した形質転換体の解析結果にも見られた共通の特徴である。しかし、*LIM10::LUC*、*LIM10::GUS* 植物体とは異なり、*LIM18::LUC*、*LIM18::GUS* 植物体では、調べた 15 系統全ての植物体の減数分裂時期のヤクより活性が検出された。更に、*LIM18::GUS* 植物体 (系統 13-1-2-1) において、ヤクより絞り出した減数分裂細胞、一核性小胞子、二細胞性花粉および成熟花粉、いずれの細胞からも β -グルクロニダーゼ活性が検出された (図 21)。以上のことから、*LIM18* 遺伝子プロモーターは、雄性配偶体形成過程において減数分裂時期から成熟花粉が作られる期間を通して、活性化されていることが示唆された。減数分裂時期のヤクの活性が、葉、茎、根に比べ 50 倍以上高い *LIM18::LUC* 植物体 (系統 7-2-1) において、長さが 8mm のつぼみではめしべの活性は、減数分裂時期のヤクの活性の 24% の測定値を、長さが 13mm のつぼみでは、めしべの活性がヤクのそれより約 2.2 倍高い数値を示した (図 24)。従って、*LIM18* 遺伝子プロモーターは雄性配偶体形成器官であるヤクのみならず、雌性配偶体形成過程においても働く可能性が考えられた。

レポーター遺伝子の転写産物の消長

形質転換体におけるレポータータンパク質の活性の変動と、レポーター遺伝子の転写産物の消長との相関を明確にするために、同一のつぼみより分取したヤクと、葉、茎を用いて、活性測定および RT-PCR 実験を行った。*LIM10::LUC*、*LIM10::GUS* 植物体では、つぼみの長さが 18mm 以上の時、ヤクにおける活性の上昇と転写産物の蓄積が見られた (図 25)。また、ペプチド鎖伸長因子 1 α

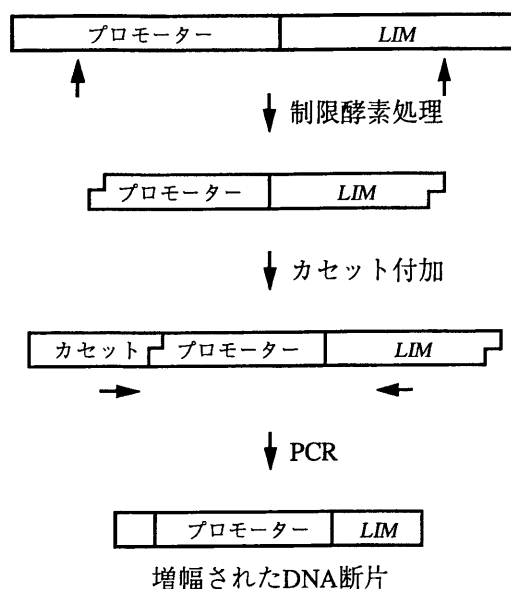
遺伝子 (*EF-1 α* : elongation factor-1 α) の転写産物の量は、種々の時期のヤク、葉および茎の間で差は認められなかった。

LIM18::GUS 植物体では、つぼみ長が 6-8mm の時のヤクでは、この時期以外のヤク、葉、茎に比較し、*EF-1 α* 遺伝子の転写産物量は少ないが、 β -グルクロニダーゼ遺伝子の転写産物は検出された (図 26)。これに対し、活性の低い葉と茎では β -グルクロニダーゼ遺伝子の転写産物は検出されなかった。いずれの *LIM* 遺伝子プロモーターを用いて作出した形質転換体においても、レポータータンパク質の活性の変動の様式と、転写産物の消長は一致したことから、検出されたレポータータンパク質の活性は転写産物の消長を反映したものであると考えられた。

表2 プライマーの名称と配列

名称	配列
10Pro1	5'-ACGCTGGCGACTTCGAGTCGAACCGTCAG-3'
10Pro2	5'-GCGGCGAGCAAAGTATCATATTCCTCTCTT-3'
4S-44	5'-ATGCATGCACATGTAAGTCCTGCGT-3'
12Pro1	5'-GAATCCATGGATTTCAAGTGG-3'
12Pro2	5'-ATGATCCACTTCGAACTTCG-3'
12Pro3	5'-TCTCTGATCGCCAAGCTCAA-3'
12Pro4	5'-AACCAACTGACGGAGTTCC-3'
12-inter-7	5'-TAACATCGTCIAATAACTT-3'
12-inter-8	5'-AATGTCTGAATCTTATCATG-3'
15Pro1	5'-AAGCTTTCTGCGATCTGAGAAAGCGACAGG-3'
15Pro2	5'-GGCGCTCCTCGAACTTGACATCCACCAT-3'
15Pro4	5'-TTCGATCTCACTCTTAGTTACGCTC-3'
15Pro8	5'-CTGCAGCCTCACAGATCTTGTCCAC-3'
15Pro9	5'-TATCTGTCCTGATGGATAGC-3'
15Pro10	5'-GGATTGCTTCGAGTCCATAG-3'
15Pro11	5'-TCTAGATCTAGGATTACACAT-3'
15Pro14	5'-ATATCCTATGTGGTTAGACATGG-3'
18Pro1	5'-ATCATTGGCTTGTCACGGGTGCCGGAGATC-3'
18Pro2	5'-GGTCGCTGAAGTGACGGCCGATCAGCCGC-3'
18Pro3	5'-ATGACTCGCGCACTCTCTGGATCGTTTCGAG-3'
18Pro4	5'-AGTGAGGTCGCCATGGTTCTCCGTTGCGAG-3'
18PrimA	5'-GAATTAATCCGTAGAGTCC-3'
P64-19	5'-ATGTACGAACTATTGCACACTCTTGAG-3'
GUS 5'RT	5'-GGAAGTGATGGAGCATCAGG-3'
GUS 3'RT	5'-AAGTCCGCATCTTCATGACG-3'
R-LUC+	5'-TAGCTGATGTAGTCTCAGTG-3'
F-LUC+	5'-GAACGTGAATTGCTCAACAG-3'
EF-1 α - 5'RT	5'-TCGAGACCACCAAGTACTACTGC-3'
NT,EF-1 α , 3'RT	5'-AACTTCAGTGGTCAGACCAGTG-3'

A Vectorette法



B Inverse PCR法

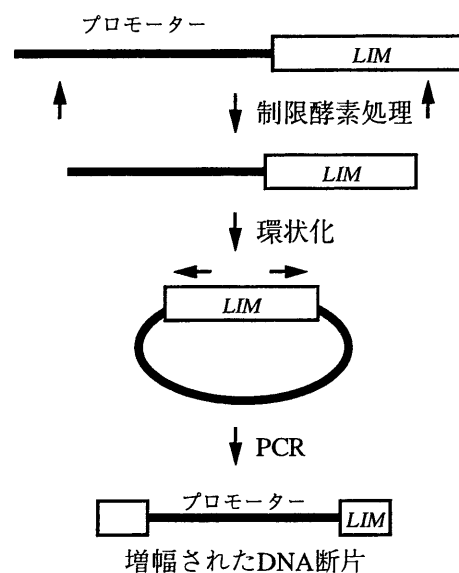


図9 プロモーター単離方法の原理

A Vectorette法

初めに、*LIM*遺伝子のcDNA領域と、プロモーター領域を含むゲノムDNAを制限酵素で切断する。次に、キットに添付のカセットを付加する。最後に、カセット部分とcDNA領域内に設定したプライマーを用いてPCRを行い、プロモーター領域を含む断片を増幅する。

B Inverse PCR法

初めに、*LIM*遺伝子のcDNA領域と、プロモーター領域を含むゲノムDNAを制限酵素で切断する。次に、制限処理を行って得られたDNA断片を自己環状化する。最後に、cDNA領域内に設定したプライマーを用いてPCRを行い、プロモーター領域を含む断片を増幅する。

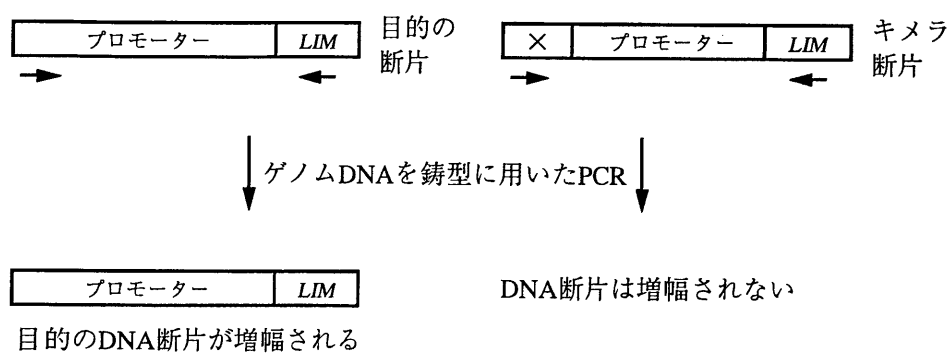


図10 増幅されたDNA断片の選別方法

A

```

ATGCATGCACATGTAAGTCTGCTACTCATATAAAAAAGTGAACATACACACGAGTATGGTTTGGCTTCCACCTAGTCATCGTATATTCAGATTGTCA -1210
      4S-44
AACACGATATATTTGCATACATATCTCCGAATGTTTGTGCATATCAAAAAGTACATGTGTACCACTAACAACTATGTGCACATAATATGTCAACCTTC -1110
ACTTCAACTTACAACCCATGTATGCATACCTTTTATATCTACATGGAACCTATATATAGAAATTTGAACATAATATCCAGCTTCATTAATATTGTT -1010
AGCTTAACATGCATCTCTACTTCATTTATGCATCTTGATGTTCCCATTTGATGAATCTTCTCACTAATAATCATCACACATCTAGCCTCTTCACACAGAGA -910
GCATCACACATCAACAGTCTTCAAAATTCAGTGTCCAACAACACGGATCTTATTTGTGCATCAGTTAACACCTCGGTACCCACTTCACCAAGATCATAA -810
CACATTATTGGCCTTCAAAATTCATGCCCCAACACCAATCATGTGCTACATCAATCATGTGCTACATCAGTTATCACCCCCGTTCTAGCTGCATCT -710
TCCAAAGGCTGCTTACGCACCCCGCAATGGTAGAATGATCAAGCTGGTTTGTCTCTATAAGTGAGTAGAGAAACACATGAATCAGGCTCCACAAACACATA -610
CTGTATTTCTTTTCTTAACGTCATTTTAAACAAATTATAATTTAAATTTTCTTAAGGTCAGAGATTACCACACATAAAAAAGTAAATTTTAGTATCTT -510
      TGACG配列
TAAACTCATATAAAATAGAAATGACAAAATATTAATAATCATAGACAAACCAACCAATTCACATTTATCTAAATGAAATATCAAAATATGACAAATAA -410
TTAAAAAATAATCGCATGGTTTTCAGAAATGGAGGGGTAGTAAGTAAGTATCATCTCAAATAACGCGCGGGGACGTTGTAATTCATTTTGT -310
      I box      G box
CGGTAGAAACACAGCTCGTTTCTTACTATGACATACCAACCTTACGTAATACATTCGTTCCATCAACATGATCGGAATTGACACAGAAAACCTCGGTTTC -210
      TGACG配列
AAATTTTACCGGTTTCAATCTCGACCGCTAGCGCGCGAAGGCAGACCTCTGCCACCCATGAAAGCAGGAGCTTCCATCTCTTCTTGACCTTTGT -110
      TTGACC配列
GAAGCATCGAGACCTCTTCCCTCAGTCTTTATATATAAATCCCCAACCCACTCCCAATTCACCGTCTCCATCGAACAACAGATAGTGGACCTCAAAGAAA -10
TCAAGATCTATGGTTGAGCTCACAAGAGAGGAATATGATATCTTCTCGCGCGGTCCACAACTGACGGTTGCACTCGAAGTGGCGAGCGTCCCCA 91
      NcoI      10Pro2      10Pro1

```

B

LIM10	TTACGTA. . ATACATTTCGTTCCATCAACATGATCGGAATTGACACAGAAA	-220
LIM12	TTACGTCCC AAACTTCCCTACGTTAAACACGGTGGATATTGACACAGAAA	-221
LIM10	ACCTCGGTT. CAAATTTACCGGTTTCAATCTCGACCGCTAGCCGGCCGA	-171
LIM12	ACCCCGCTTT CGAATCGGACCGGTT. CAGTTTGAACCCATAGCCGGGCGA	-172
LIM10	AGGCAGACCTCTGCCACCEATGAAAGCACGAGAAGCTTCCATCCTTTCT	-121
LIM12	ACGCCACTT. TCCCTCAGGAAAGCGGAGAAGCTTCCATCCCCTTCT	-123
LIM10	T. GACCCCTTTGTGAAGCATCGAGACCTCTTCCCTCAGTCTTTATATAAAC	-72
LIM12	TTGACCCATCAGGAAGGTCAGAGGCTCTTCTCCCAATCTCTATATAAAC	-73
LIM10	CCCCAACCCACT. . CCCAATTCACCGTCTCCATCGAACACAGATAAGT	-24
LIM12	CTCCCTCCCCAGGCCGAACTCATTCTTCTCCATCGAATCCCTAATCAAC	-23
LIM10	GGACCTCAAAGAAATCAAGATCC	-1
LIM12	AGCCCTCAAACCACTGAA. ATCC	-1

図11 LIM10遺伝子のプロモーターの構造

A LIM10遺伝子のプロモーター領域の構造

シス配列を下線で、プライマーの位置を矢印で示している。開始コドン（ATG）とTATA box様配列は四角で囲んでいる。下線が記してある塩基の上のドット（・）は、HSEのコア配列（nGAAnnTTCn）のGAA/TTC部分の配列）に一致した塩基であることを意味する。開始コドンのAを+1としている。形質転換体の作成には、-1にあるNcoIあるいは-25にあるBstXIより5'上流域を用いた。

B LIM10およびLIM12遺伝子のプロモーター配列の比較

AATGTCCTGAATCTTATCATGAGTGTGTTGAGTAAATTCATATATATTTCCGAGTATAATAGTTGATGGGATAGCTAATATTTGTAAATTTTATAGACTTAGG -1206
 12-inter-8 I box
 GCTCACATAATCTGAGCATCTTCTATTATTTATTTATTCGCAACTTGTATTGACAACCTTTGTTTGTAAATTGAGTAGTCGAGTTATTTTCCAAATAGTTCTATT -1106
 TATATTGTTATGOCCTCATTTTGTATTATCTTATTGAGATTCAATGTCATAGGGATCTGACAATATTTTCCACTGATTGTCAATAAGATAATGCAACCCCT -1006
 CCACTTTTATTTTATACAGATGATATCATCTTAATGTGTGAGACTAAAGAGGAATTAACCTCTAGTCTAGAGTGATGAGAGAAGCACTTGAGTCTAGATTG -906
 TTTTAGAATAAGTCGGATGGAACCTGAATAGACCGAATGCAACTTCAGTAACATAGGAGCAATGATCATAAGTTGGTAAAAATCGATGACATGGTGATCC -806
 CTAAGTGTGACCGATTTTGCTTCCTGGGCTTGATTAATTAGCAAGATTGAGAGATCATATTTGTGCTGCTCCCTAAATAAAAGTAGACTGGCTCAAGTAG -706
 TGGAGTGCACTCTGACATATTTATGTGAGGATATCAACAAAATTGAAAGGGAAGCTTTATAGGATAGTTGTAAGACCTGCATTGCTCTATGTGACAGAATGT -606
 TGGGTAAGTAAAGAACACACATTTATAAAATGAGTTAGCTGAAATGAGAATGCTAAGATAGATGTGGGGAAGACTAGGAAAGACAAAATAAAAAATG -506
 ATCTTATTTGAGAAAAGGTACGCACAACATCTATCGAGGACAAATTGAGGGAGAATAGACTAAGATGGTTTGGTCACATCAAAAGTAAGCATGTAGATGC -406
 ACAGATTAGAAAGAGTGAGGGAGGGACCACTAAATTGACATTGATAAATAATAAAAAATGAATACATAGCTGAATAGAGAAACAAAATTCATGTAAC -306
 TAAATAAATTGAGATTAAACCATGCAATTGCTTCTTTTACGTCCCAAACCTTCCCTACGTTAAACACGGTGGATATTGACACAGAAAACCCCGCTTTTGAAT -206
 CGGACCGGTTTCAGTTTGAACCCATAGCCGGGCGAACCGCGACTTTCCCTCAGGAAAGCGGGAAGCTTCCATCCCTTCTTTTGACCCATCAGGAAGG -106
 TTGACC配列
 GTCAAGGCCCTCTCTCCCAATCTTTATATAAACTCCCTCCCGCAGGCGAACTCATTTCTTCCATCGAATCCCTAATCAACAGCCCTCAAAACCACTGA -6
 TTGACC配列 CCAAT box 12Pro1
 AATCCATGTAATTCGAAGTTGCAAGTGGATCATTTCTCTGATCGCAAGCTCAACCAACTGACGGAGTTCCCTCGCCAAACCGCAACCAACCCCTCCGCGCCCC 95
 12Pro2 12Pro3 12Pro4
 TTTTCGTTCCCGAGCGCCCGCCCATGCTCGCGCCGCCACCGACATCAAGGACATGCCCGCGCCCTACGTTCTTCAATCATCGACATGCCCGGTGTGCAATCC 195
 GAAGAGATCAAGATCGACGTGGAGGAAGGAACATGCTGGTGATCAGTGGCGAGCGGAAGCGGGAGGAGGAGGAGAGGTAACCTGGAGATGCAGCGCC 295
 GGATGGGGAAGATGATGCGGAAGTTCAAGCTGCTGGAATGCGAACTCGGGTGCAATCTCGCGGGTGTGCAAGAATGGGGTGCTTACTGTCACTGTGCA 395
 GAAGCTTCGCTCGCAGGAGCCAAAGGCCATTGAGATCAAAATCGCTTGAGGGATTAGGGTTTCTGCTGTGATTGTTCGATTTCGGGGGATTTCGTTCTGT 495
 TCTTTTATTCAGCTTCTGTTTGTGTGATTTGCTCAACATACTAAGATGATTGAGGTGTAGGTAGCTGATTCTAGGATGTTCTCGTTAACATTTGTT 595
 GTTTCCTGTAAGAAAAGATTGCTGAATAAAATGCAATTCGAGTTT *HincII* 695

図12 LIM12遺伝子のプロモーターの構造

シス配列を下線で、プライマーの位置を矢印で示している。開始コドン (ATG) とTATA box様配列は四角で囲んでいる。下線が記してある塩基の上のドット (・) は、HSEのコア配列 (nGAAnnTTCn)のGAA/ITC部分の配列)に一致した塩基であることを意味する。開始コドンのAを+1としている。ゲノムDNAを、+586にある*HincII*で処理後、自己環状化したDNAをInverse PCRの鋳型に使用した。

ATGTACGAAC TATTGCACACTCTTGAGGGCTCCCTACGCTGCCTAAGCTATGTGCTTTTCACTTCTCTACTCGACATGCACTCTCACATTGGAGGGGTGT -1632
 P64-19 →
 CGCAGGGCTCATACTCTGCGCTCCTTCTCAAAGGTTTCTCOCTCACAGGTTTCTCTCCACGTCAACCAAGCTCAAAAATTGCGGGGCCAGGCCGCTG -1532
 TGACG配列
 AGGATATTTTGGCGTCATTAGTTGTGATGATGAATTATTCATTCCTAAATCTGTGATGAATGCTTGATTTTTTCATCATTTATCTTATGTATTTC -1432
 TGACG配列
 TCCAAACTTGTATTGCTTATCATGCACAAAGAGTTTAACTTACATTAGTGACATCAAGCAAAATACATGGAATACAGTTAACAAATGATTAAATGTTG -1332
 I box
 TTATAATTGTGCACAATTATTTGCTGGTCACCTAGTCATCTTCTTTCATGAATCCTCCACTGATGAGATCCTCCCTCAATGAGTTCATTTCTCAAACAAGT -1232
 TAOCATTACCCGTAGAAGGAAAGAGGAAGAAAATAAACCGTGATGATGACCAAAGTAATGAAAGAGAGAACACGATAAATGATGTTGAGAAAACA -1132
 G box
 ATCCCAAAATATATGATACGATATTGAAATACTTATTTGAGAAACCCAAACAAACAGCATGCACTGACATAGGAATATTGTGACTTTTGTGTGCCCTT -1032
 GCAAGGTGATTGACGATAGATCATAATCAACATCCTTACACTTTTACCGTTGCGCCACCATCCCTTTGTTCCTCCTTCCCTCTTTGGAAGATGTTTCTCG -932
 TTATCTTTGCTACTTTCTTCATAAATAGACATGATCATTTTGGCGTAAATCATTTTGTGTGTAATTTAGCGAAATTCACCCAGACCATCCAT -832
 GTGCACCACGACAAATTTATCCCGAGACATTTGTGSCATAAAGTTACTAATGACTTGATAGCCTAGTGGTTGGGACTTGGATGGTTATCAATGAGGTCTG -732
 TGGTTTCGAGTCTCGGAAACTACTGGAACAGCCTCCATTTAATAAATAGGAATGCTGGGTACATTTCTGTCCCGGTAAAGCCTGCGCAAGCGAGATAGG -632
 Pollen box
 AATGCTGCGTACATTTCTGTGCCCGTAAAGCCTGCGCAAGCGAGAAATACGGATTATCCCATTTGGGGGTAAAAATTAATCCCTACATTTCTGTGCC -532
 CGTAAGCCTGCACAAGCGAGAAAAATACGGATTATCCCATTTGGGGGTAAAAATTAATCCCTACCAACATGTTTGTGTGCTGCTGCTAACTGGGCCAA -432
 TAATAACCTGCAATCCTCTGTAAACTGGAATAATTAATCCGTAGAGTCCCATCCCGTTAGAGAAACGAAACTATACTGCTGCAAGGGGCTACTGGG -332
 18PrimA →
 CCCACCAATTTTACCCGCTCTGCGCCCATTTAGCTAACCCAGCTGCGCAACGAGAACCATGGCGAAGCTCACTCGGCTGGATACATGGAGAGGCGAG -232
 18Pro4 ←
 GGTCTTCTCGAACGATCCAGAGAGTGGCGAGTCATCCAGATGAAGTAACATTAGATCCCAAGCTCCATCCCACTAATCGAACGTCACAAATCACC -132
 18Pro3 ←
 GCTGGAGCATTTGCAAAAACAAACCTTATTTATAAATAGCCCCCTCCCAAGCATCAACTTCAGTGTCCACTCCAGCTCACAAGGCTCTCACTGTAGC -32
 CAACACAGTCAGCTCAGATCAATTCAAATCCATGCGGGCAAGACAGAGTTCCGGCGATCGGAATGACCTCGGTACCACCTACTCCTGGTGGAGTGG -69
 KpnI
 TGGCAGCACGATCGGGTGGAGATCATCGCAACGATCAGGGCAATCGCAACACTCCCTCCTACGTTGCCCTTCACTGACACTGAGAGGCTCATCGGTGATG -169
 CGGCGAAGAATCAGGTGCGCATGAACCCCAACCAACCGTCTTCG -214

図13 LIM18遺伝子のプロモーターの構造

シス配列を下線で、プライマーの位置を矢印で示している。開始コドン (ATG) とTATA box様配列は四角で囲んでいる。下線が記してある塩基の上のドット (・) は、HSEのコア配列 (nGAAnnTTCn)のGAA/TTC部分の配列) に一致した塩基であることを意味する。二重線は26bpの繰り返し配列を示している。開始コドンのAを+1としている。形質転換体の作成には、+48にあるKpnIより5'上流域を用いた。

ATATCCTATGIGGTTAGACATGGATTTCCTCAATAACAATTATTTTAGATCCAATGAGTATCATAGATATACCATTGGTTACACATTCATATTTATCACA -2863
 Pollen box 15Pro14
 AAATATTTCTTAATTTAACCATTTAATACCATATATGTATGGATAATCAAGTGGTATTGAGCACAAATGAGTGGGGGATTTTATAAACACCTTAAATCAAGA -2763
 AATAATTTATAAGACCAATCCATAATAGGAGGGATAAATAAGCCCCCTCCCTAGTAGTTTGGAGTGGTAACAATGAGGTGATTTGGGTATACAAAATCTC -2663
 AAACACCCCACTTGTCTTCACATACCCAATTATGCAACCCCGTGTTCACCCCAATCTTTTAAATTTTAGTCGACTTCTAAAGTGGAGGTGATATTTTTT -2563
 ATGTATGTTCAATATCCATGGTCATATAATCGTTGGGCACCGTGTGGCTAAAGATAAAATTTTATGCOCTTAGGTATATGGTGAGCCATATATCCCTCC -2463
 TTCCCTCCTGCACTACTAATCCCTCTCTCTCTCTCTGTACTTACCATACAAACCTCCCTCCCTCCTAGATCCAATGTCCACATCCCTTACTTTAATGAT -2363
 GCTTTGGTAGGTAAATCATCTCTCAAGCGCTCTTCATCTCTTTATTTTACCGCTCGAGAAAGATATTTTTTATGAATCTCAAGGTGACTATGCAATTG -2263
 AATTGAAGGTCTCTTGAGGTAGGAAATCTAATATATCAAGGATGCCAAATTTGCTAAATCTTGGTTGGCCATCTTTGAATATCCAATCAACCAATAACAAA -2163
 AATATTTAAATCATCTCTTCAACGGGTACATAAAATTTCAACTTAGTTTTOCCACTTTTTCGACTAGAGAGTTGATCAAATCCGATTCAAAGGTGGT -2063
 CGACCAAAATATGTAAAAAAATATGAGTTGTGTGTTAAATCAACAATCTCAACTCAAGTGGCATTAACCTAATATAATATGCATATCCCTCTCATCAG -1963
 ACTCTTATTTTAAATATTTATTTTATAATATTTTCTATTTTGGTAGGTGACTTAGAAAAGGAGATATGGAGCAAAACAGAGGGTGTGGAAAGTAA -1863
 ATGTATCTTAAATATTTATTTGGAGACTGTAAAGGAGTCTCCAAAGTGGATGGTTTTTGTCAACATTTGACCCATGGGTGGTGTACCAAGAGTGCCTAT -1763
 ACACCTAAAGGGGAGTAATATATGACTGATCGGAACTTTGGTCTCCAAAAGATTAGTTGATCAGAAGGGAGAAGAACTATTAAAGAATCCAAAGG -1663
 TGAAC配列
 AGGATTTATGAGAAGACACAATCTTCCTTAACCTTCACAGCATAAACACATGATTTTGTGATTCAACAAAAGAATGGACCAAAATCTGCTAAATTAAGAAA -1563
 GATACCTTATTTGTGCAATATAAGGTATAACTGAGGGTATTAAAACTAAATATCTTTTATGAGATTGACAACTAGATGAAGGACCAAAATCTGCTA -1463
 AATTGAGAAAGATACTTTATTTGTGCAATGTGAGTTATAATTTGGGGCATCAAAACTGAATATATTTTAAACGAGGTGTATGGACTAGATGAACCAAGTG -1363
 AAGTTTTCATTCATAAAATATGTGAGAACTCATGGATCAACTTAAGGAGCATGAGGACAAAATCCCTACCTAAATTCACCTTATGTATGATGATTTT -1263
 TTAATCATTTCTGTGTATTTTGAATATTTAGTTTGTGACATCTACATTAATTAAGCTCAAAATTCCTTTTTCACGACATCAACATTTAAATCAACCCAC -1163
 ATAAATATTTGAAATATATAATTCATCTTACCAATATTTAAATACAAATAATGCATATAGTACACACAACCAAAATTTACAGTTCAAATTTAACTATCA -1063
 Pollen box
 CATAAAACAAAATTAACCTTAACTTCTCAACATTTGAAATATAACTTAAGGAGTGAATTTGTCCCGACAATCCCAATATGTCTTTATGAAATGCTTTTC -963
 TCAATCTGATGTGTCTCTATGTTTTTTTATATAAGTATGAGCATGTGCATTATTOGAATACATGGCCACTTGAGACCAATGTATGTAATGTTTAC -863
 TTGTATATAGTCTTAAACAAATGGTAACACACCATGGTTGACTTTATATCCATCATGTTCATCTTCACAAGCATAATATGGAGAATGATGGAGTTTCC -763
 ATACTCAACATTAATATCTCCACGCTCCATGTCTTAGTGGTGTGATGCATCATCAAATCATGTTTGGAGGACCTGAACGCTCATTTTACATCCTCTCT -663
 TATATGACTCATACTTAGTAAGTAATTTTTTTGTGTACGTGTGTGACGGTGTGAAGCCTAAGACATTAGTGGCATTTGGGAGACATATTTATCTCTG -563
 AGGTAACAGTTGATGTTATGTCAACTCTTATTGAATCATATTTACTGATGACATATTTCCAGAGCAAGATTATCAATAAAGGAGACCAGCTTAATA -463
 AATTGAGATCATTTTGAACCATGGTGCCCAAGTGTATATATGTCGAAGTATATATGAAACCAACACTTTAAGAATGATAACAACACCTTATAC -363
 ATTAATAAACCATTACTTAACCTGTTGAACATTTATTCATTTTCCATGCATACATCAAGACTTCTTAACATATTTGCTCCCGAGGOCATTTGGATGCTT -263
 CCAAT box
 CCAGTGGATCACTACTGAAGTTGTACCGAATGCTACGACCGACATCACTGATCAACCGTCAAGATGTGATGCGGATCCCAACGATGAATAAACT -163
 CCAAT box
 CTATACAATTTCTTACCTGCAGTTCCGTGCTTATATATGGAACCCCACTGCAACGCCACCTCATTCAAATTTCAAACCCCTCACGCTCTCCCTCTGCT -63
 TGAAC配列
 CCCAATTTCTGCTTTCTGATCTCACTCTTAGTTACGCTCCCGTCCGCTTCTCAGATCGCAGAAATGTTGGATGTCAAGTGAGCCGATCGATCTCTCTCTCT 38
 CCAAT box
 CTCCTTTCTCAATTAAGCGCGATCCAGCTAACATATCTGTCTGATGATGAGTTCGAGGAGCGCGCGTTGAGAGCCCGCGAGCTCCAGCTGC 138
 15Pro1
 TCGACCGCGAGGAGGCGAAGAGGAGGAGGAGTTCCTTCGAGTCCATAGATAAACGTTGAGTTCTCTGCOCTAGTCTGCTGATCTTTTCCCA 238
 15Pro2
 GTTTTGTAGTGAATCTTGTCTGACGCTCCCTAGATCGTGGCTAATTTGGTAGGTAGCTGAGAAATCAGCGGATTTGAGCTCTTTTCTTCTGCTGCT 338
 15Pro9
 TTTTGTGATCGTTTATGATGCTCTGTTTGAATCTGTAATATAAGCTCCAAAGCTCTGCTATTTGGCTGATATTCAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 438
 15Pro10
 ACTCCTGGCNAATTTTGTCTAGAATAGATTTGTTCTTATAGTATAGCTAAGCATCGGTGTGATTTCAACTCTCTCTGCTGCTGCTTCAAGNAATTTTATGTA 538
 XbaI

図14 LIM15遺伝子のプロモーターの構造

シス配列を下線で、プライマーの位置を矢印で示している。開始コドン (ATG) とTATA box様配列は四角で囲んでいる。開始コドンのAを+1としている。点線はプロモーター単離の過程において見いだされたイントロン配列を示している。イントロン領域内のNは配列が未決定の塩基を意味している。ゲノムDNAを、+475にあるXbaIで処理後、自己環状化したDNAをInverse PCRの鋳型に使用した。

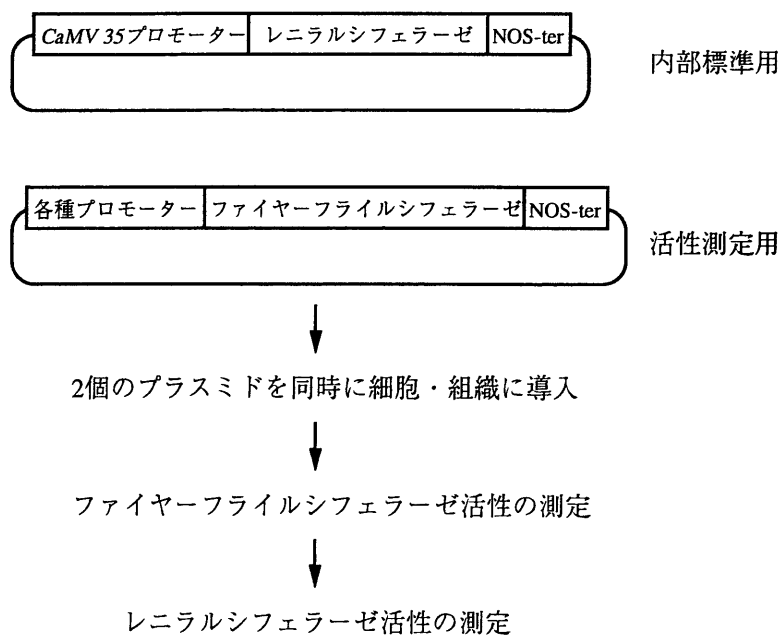
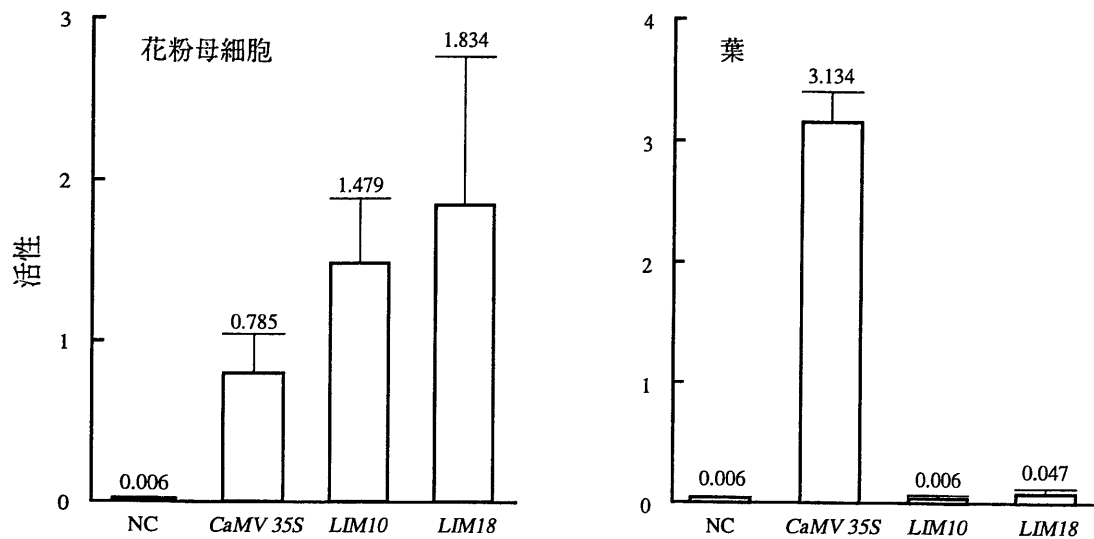


図15 一過的発現実験

NOS-terはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターを示している。

A テッポウユリ



B タバコ

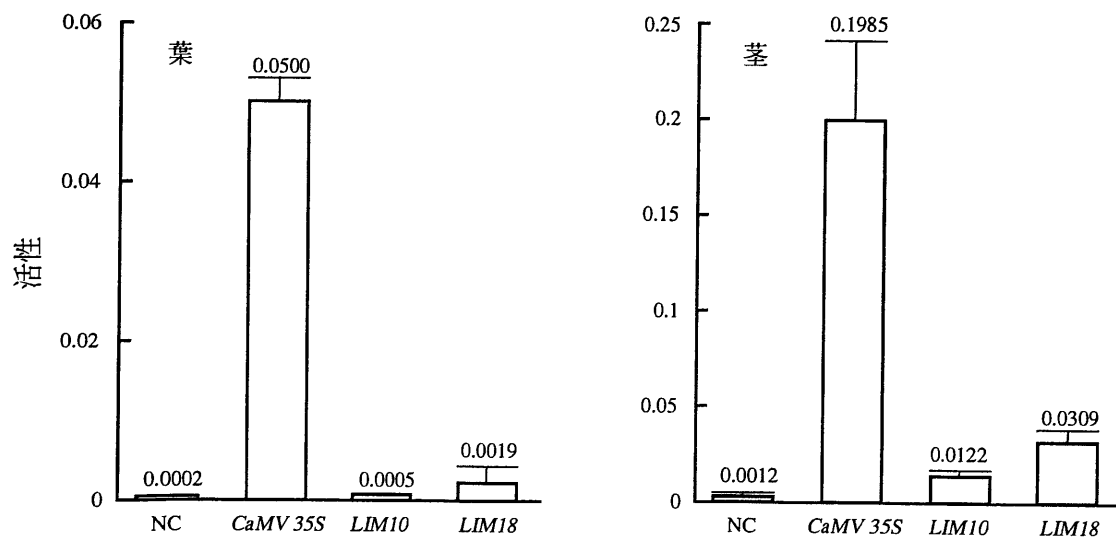
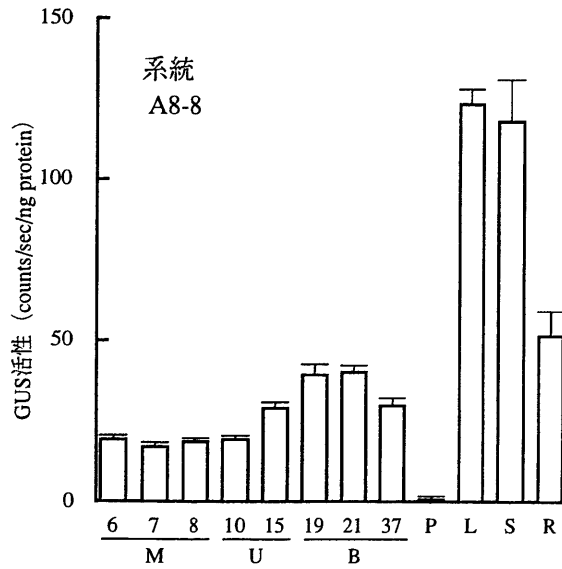


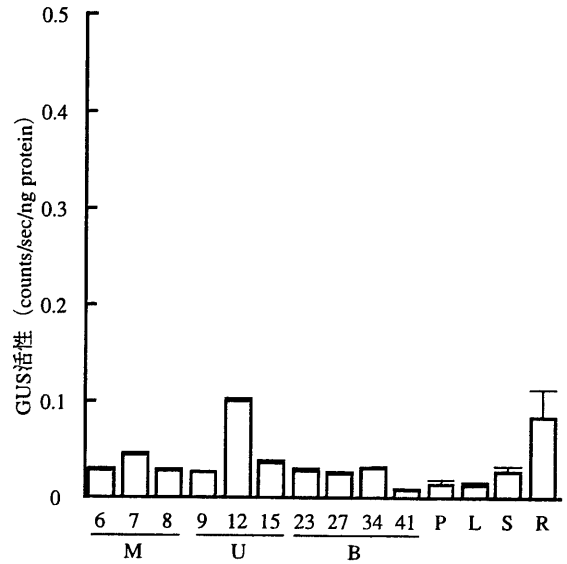
図16 LIM遺伝子プロモーター活性の測定

プロモーター::レポーター融合遺伝子を、遺伝子銃を用いてテッポウユリ (パネルA) およびタバコ (パネルB) の細胞、組織に導入後、レポータータンパク質の活性測定を行った。NCはプロモーター領域を含まない、ファイヤーフライルシフェラーゼ遺伝子のみを持つプラスミドを導入したことを示している。図中の各棒の上の数値は、活性の平均値を示している。

A *CaMV 35S::GUS*植物体



B 野生型



C 野生型

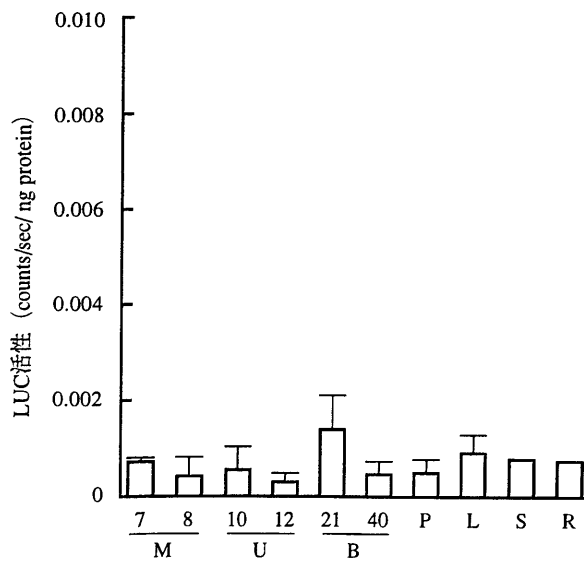


図17 野生型および*CaMV 35S::GUS*植物体におけるレポータータンパク質の活性

減数分裂時期 (M)、一核性小孢子形成時期 (U)、二核性花粉形成時期 (B) のつぼみより取り出したヤク、成熟花粉 (P)、葉 (L)、茎 (S)、根 (R) より抽出物を調製し、 β -グルクロニダーゼ活性 (パネルA、B)、あるいはルシフェラーゼ活性 (パネルC) の測定を行った。横軸の数値は、ヤクを採取したつぼみの長さ [mm] を示している。

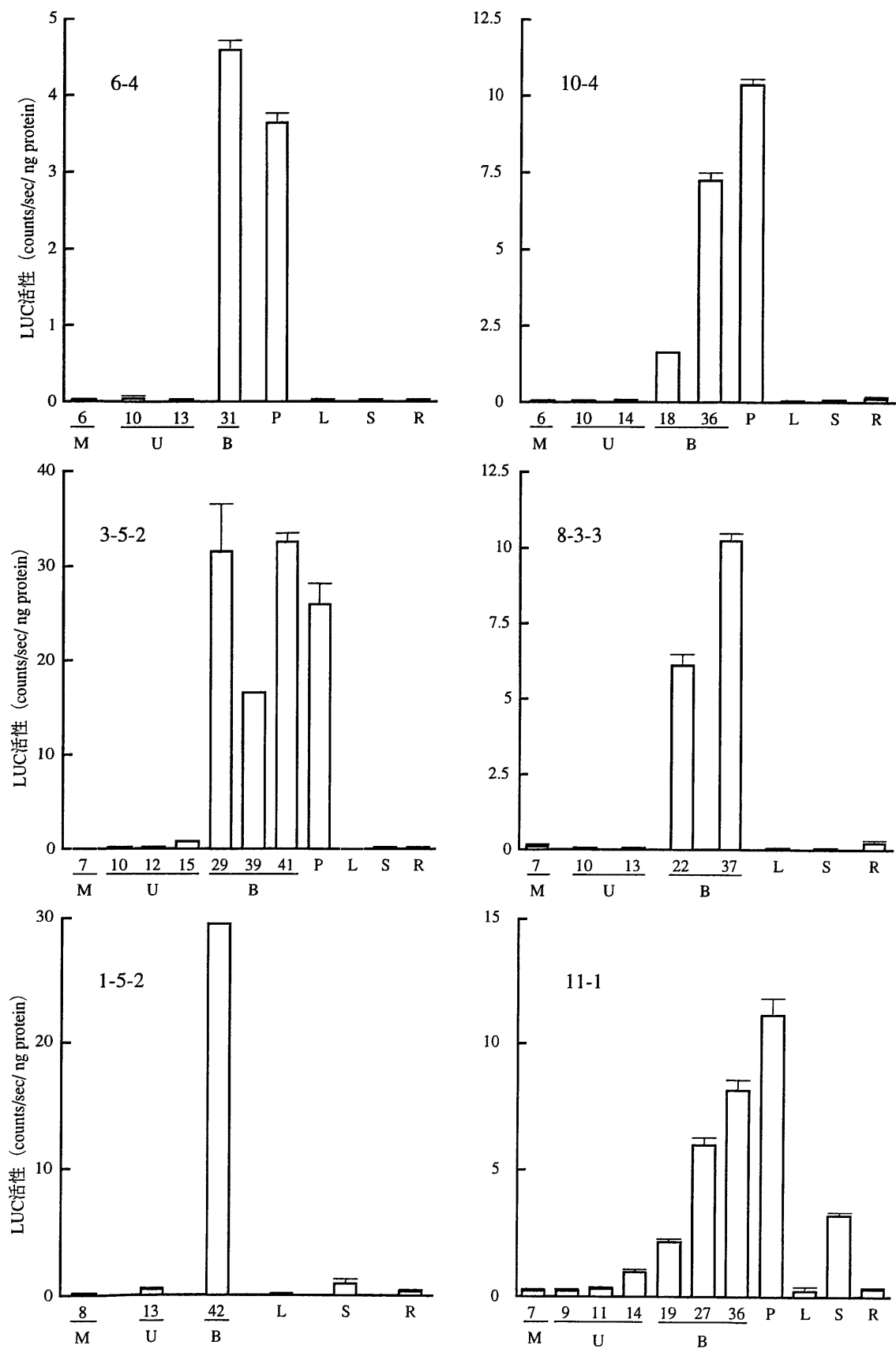


図18 *LIM10::LUC*植物体におけるルシフェラーゼ活性の測定

減数分裂時期 (M)、一核性小胞子形成時期 (U)、二核性花粉形成時期 (B) のつぼみより取り出したヤク、成熟花粉 (P)、葉 (L)、茎 (S)、根 (R) より抽出物を調製し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。横軸の数値は、ヤクを採取したつぼみの長さ [mm] を示している。グラフの中のハイフン (-) を用いて表示した数値は、解析に使用した植物体の系統を表している。

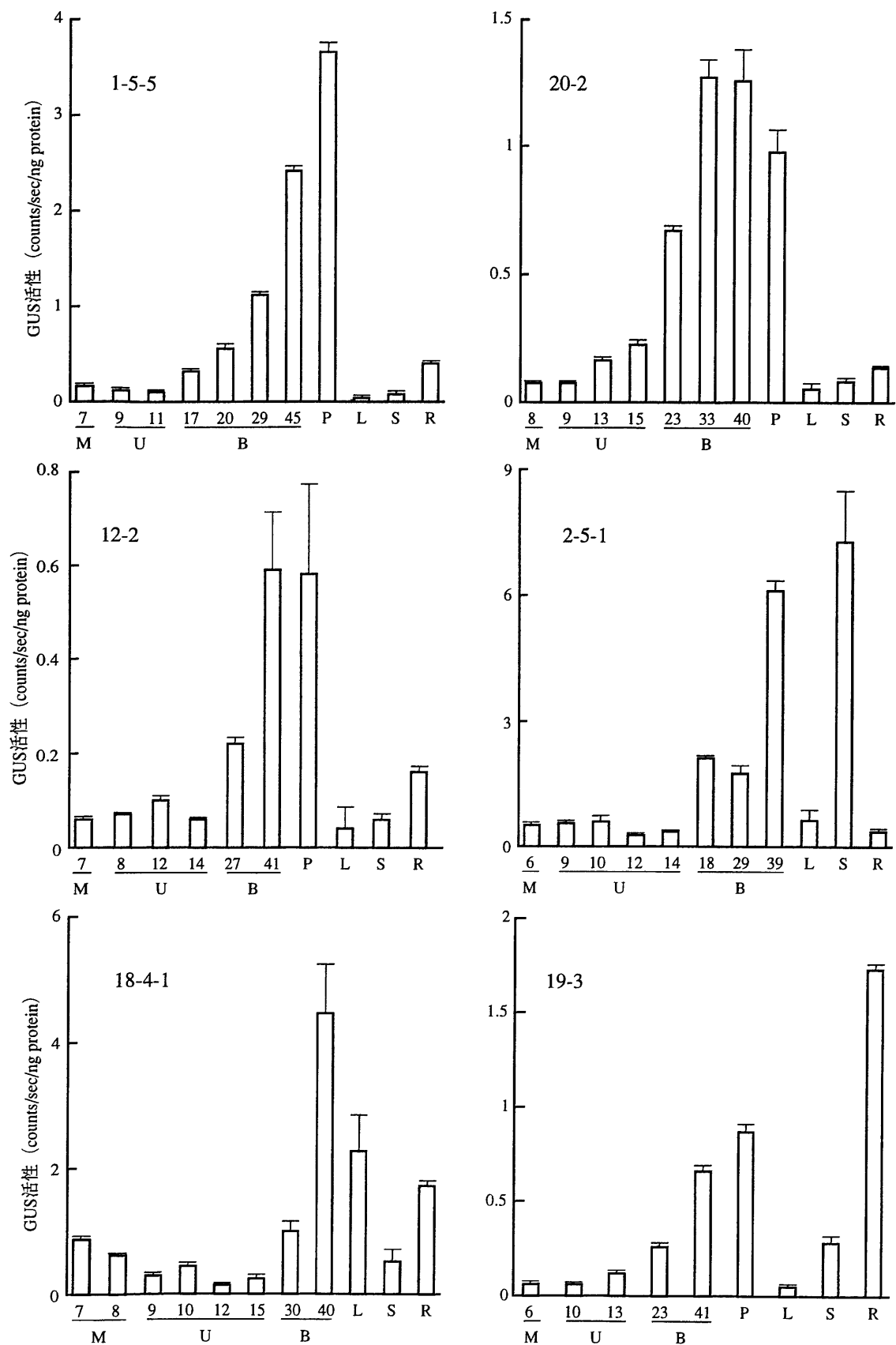


図19 *LIM10::GUS*植物体における β -グルクロニダーゼ活性の測定

減数分裂時期 (M)、一核性小孢子形成時期 (U)、二核性花粉形成時期 (B) のつばみより取り出したヤク、成熟花粉 (P)、葉 (L)、茎 (S)、根 (R) より抽出物を調製し、 β -グルクロニダーゼ活性の測定を行った。横軸の数値は、ヤクを採取したつばみの長さ [mm] を示している。グラフの中のハイフン (-) を用いて表示した数値は、解析に使用した植物体の系統を表している。

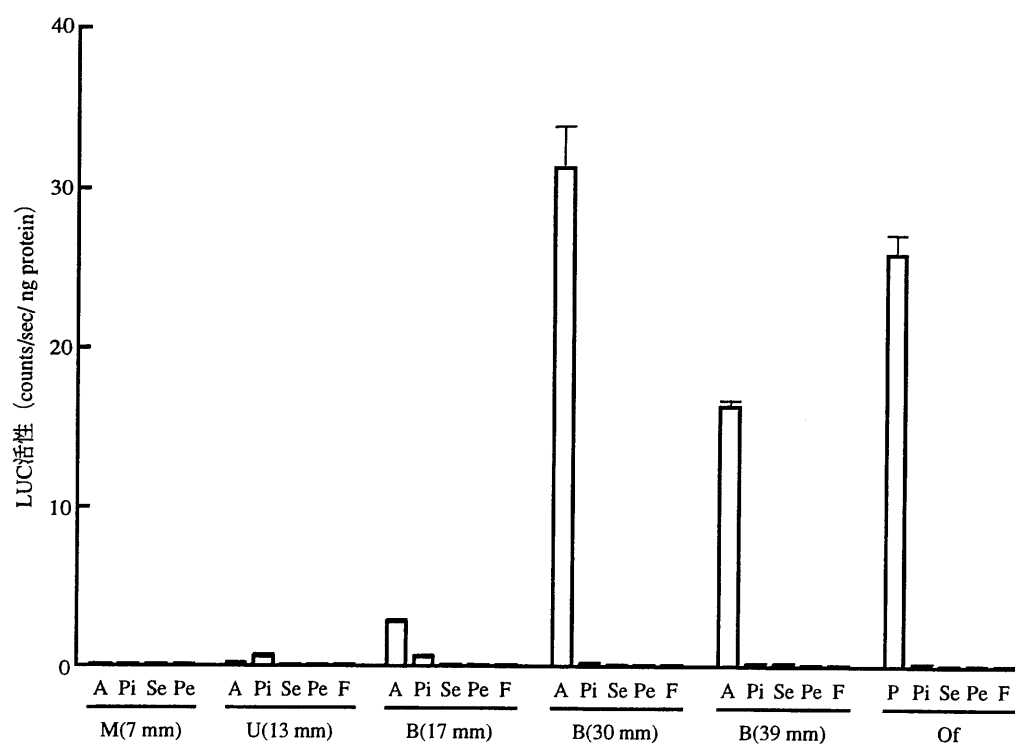


図20 *LIM10::LUC*植物体のつぼみにおける活性の特異性

減数分裂時期 (M)、一核性小孢子形成時期 (U)、二核性花粉形成時期 (B) および開花した花 (Of) より、種々の器官と花粉を分別後、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。A、Pi、Se、Pe、F、Pはそれぞれヤク、めしべ、がく、花弁、花糸、成熟花粉に対応する。横軸の括弧内の数値はつぼみの長さ [mm] を表している。植物体は系統3-5-2を用いた。

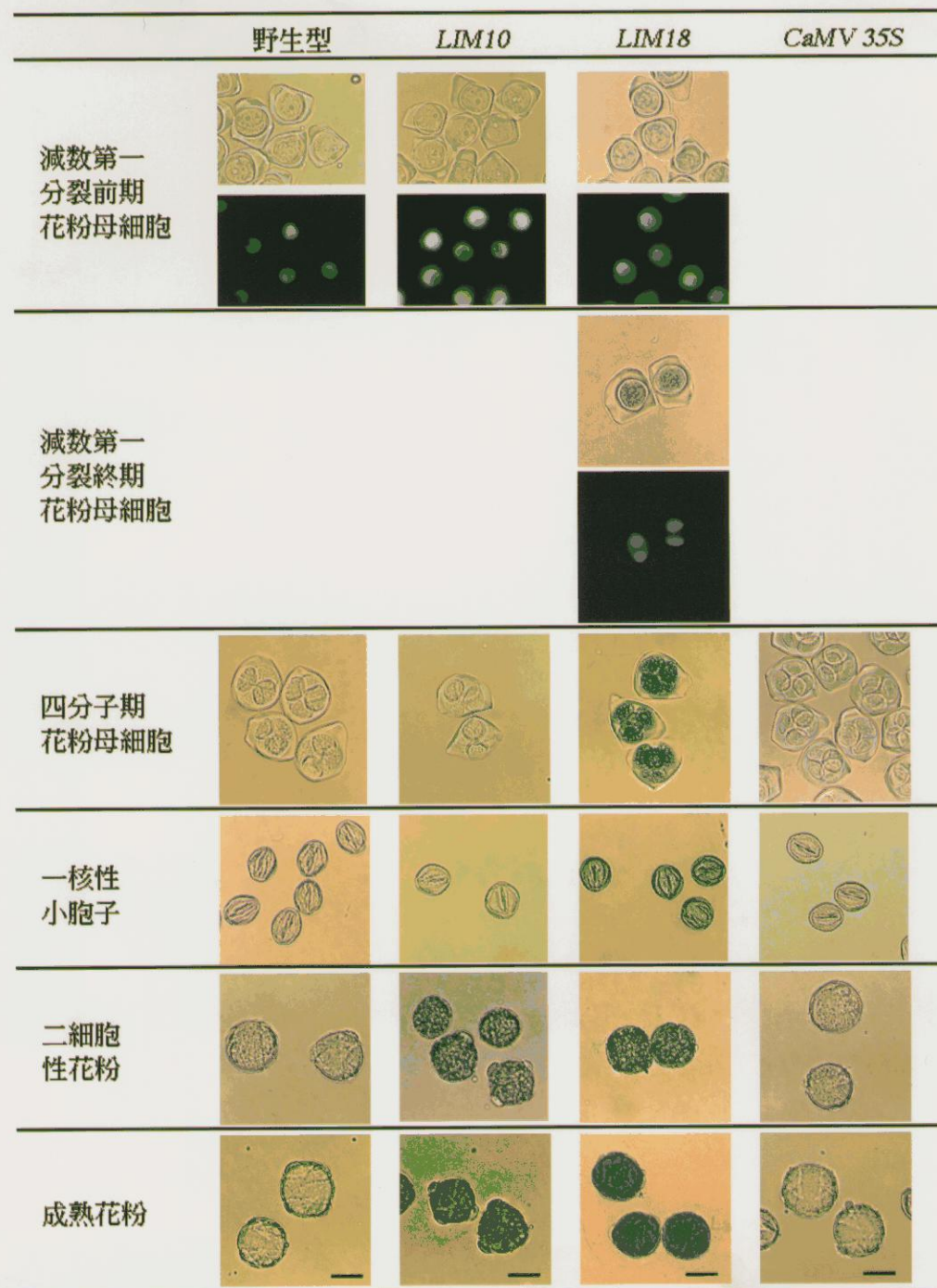


図21 LIM::GUS植物体の活性染色

発生段階の異なる時期のヤクより絞り出した細胞および成熟花粉に対して、X-Glucを基質に用いた活性染色を行った。比較対照として野生型およびCaMV 35S::GUS植物体を使用した。一核性小孢子および二細胞性花粉は、つぼみの長さがそれぞれ9~12mm、25~30mmのヤクより絞り出した。減数第一分裂前期および減数第一分裂終期の花粉母細胞において、それぞれ上段は明視野像、下段はDAPI像を示している。この他のパネルは全て明視野像を示している。CaMV 35S::GUS植物体は系統A8-8、LIM10::GUS植物体は系統20-2、LIM18::GUS植物体は系統13-1-2-1を用いた。成熟花粉のパネル中のスケールバーの長さは10 μ mを示しており、全ての細胞は同じ倍率で観察した。

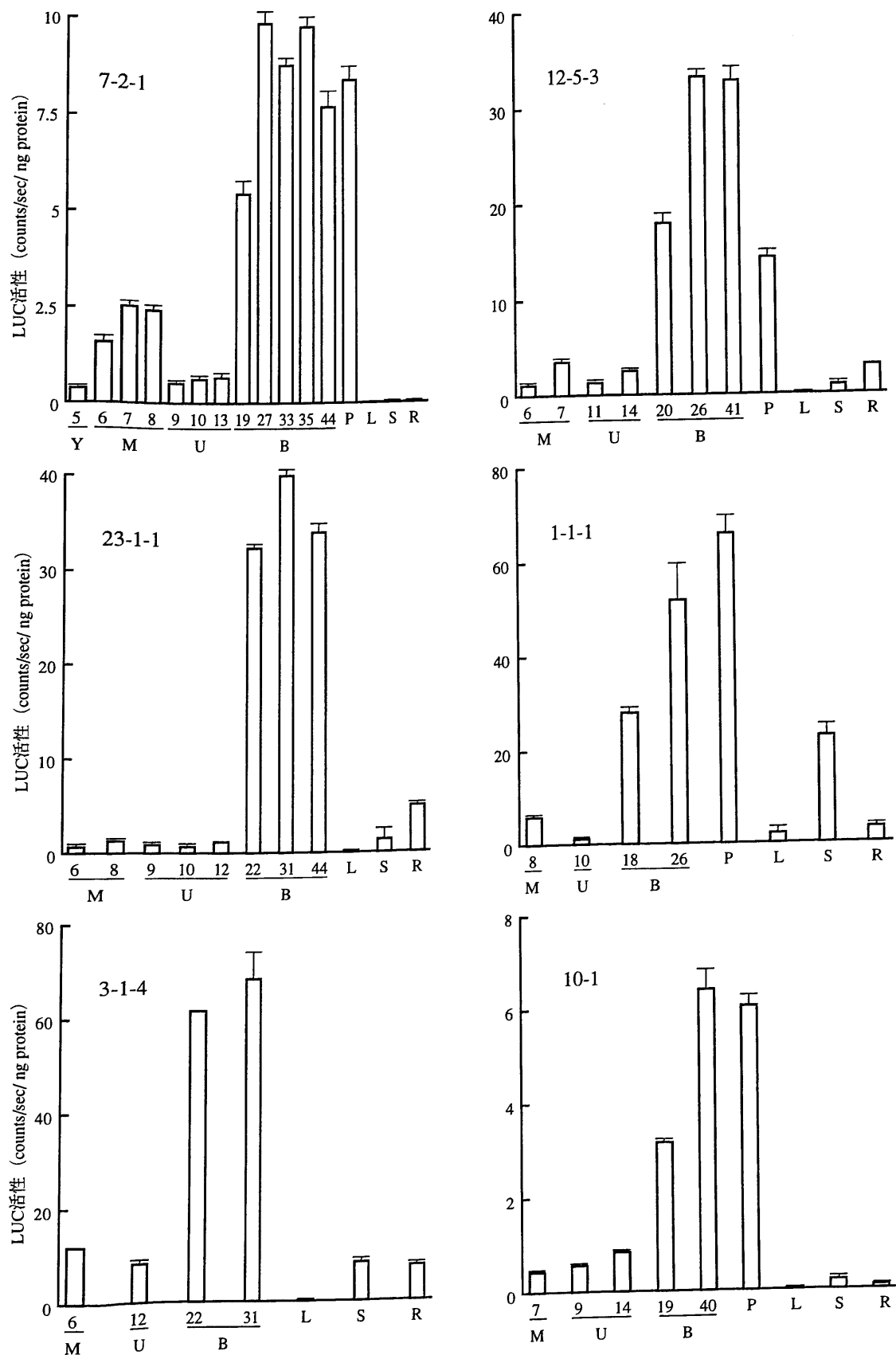


図22 *LIM18::LUC*植物体におけるルシフェラーゼ活性の測定

減数分裂前の時期 (Y)、減数分裂時期 (M)、一核性小孢子形成時期 (U)、二核性花粉形成時期 (B) のつぼみより取り出したヤク、成熟花粉 (P)、葉 (L)、茎 (S)、根 (R) より抽出物を調製し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。横軸の数値は、ヤクを採取したつぼみの長さ [mm] を示している。グラフの中のハイフン (-) を用いて表示した数値は、解析に使用した植物体の系統を表している。

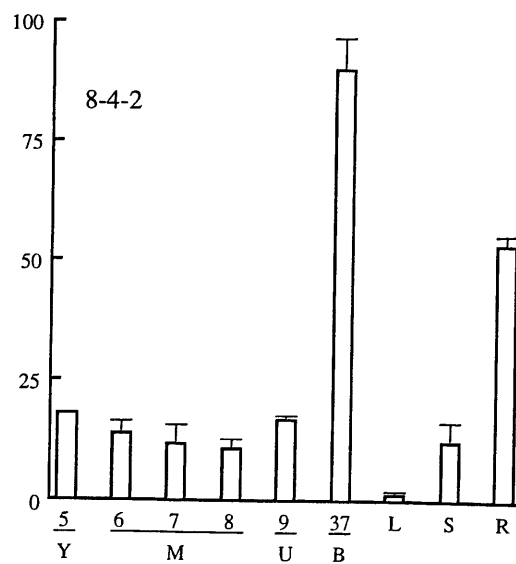
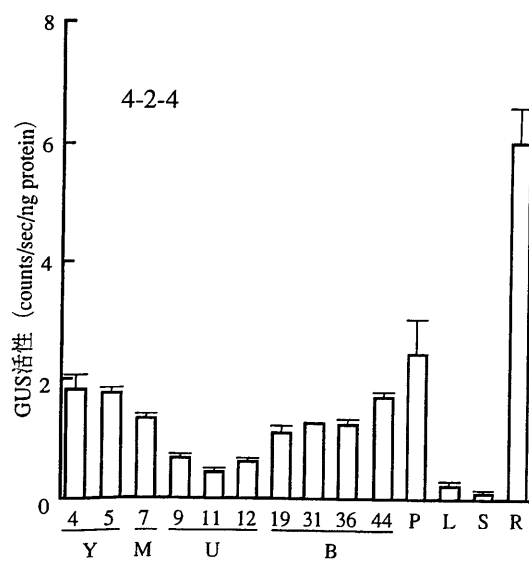
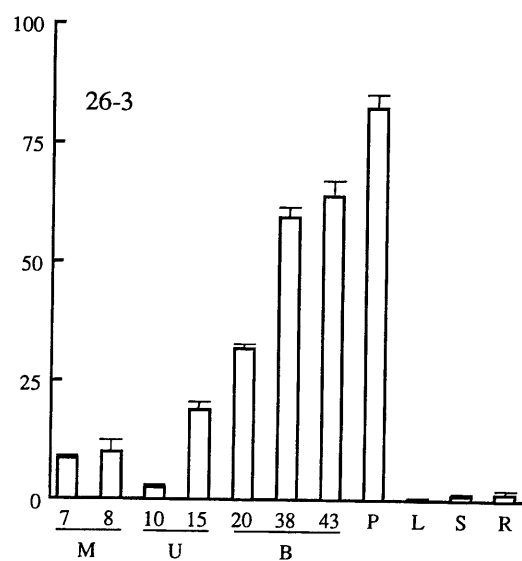
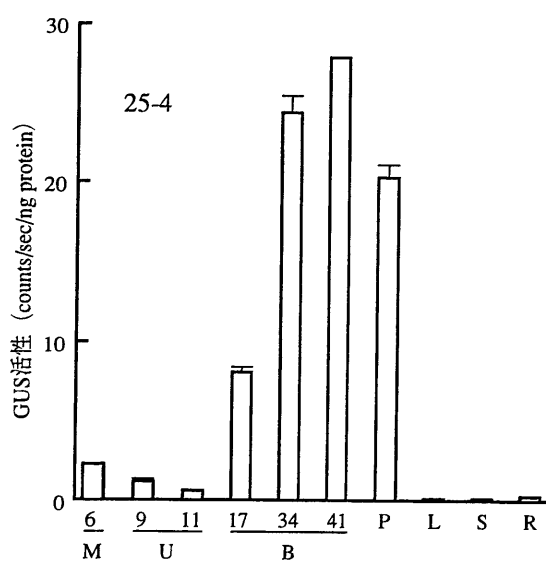
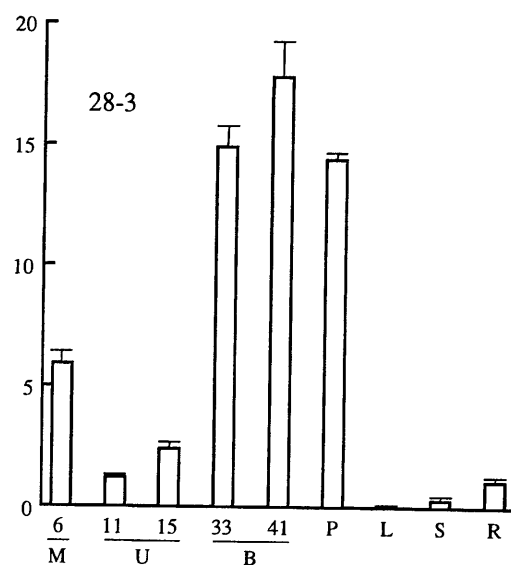
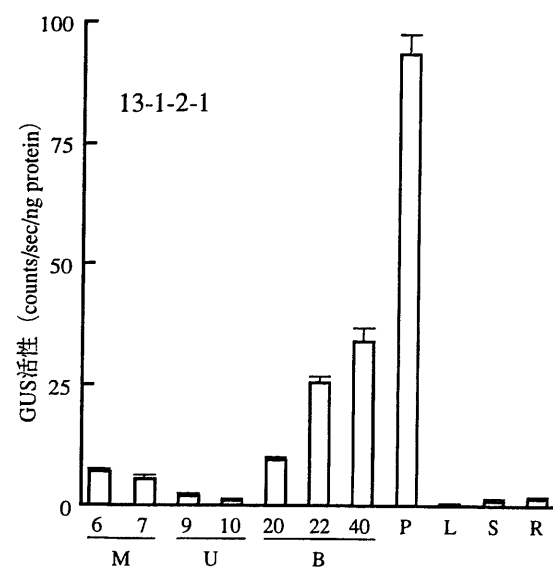


図23、その1

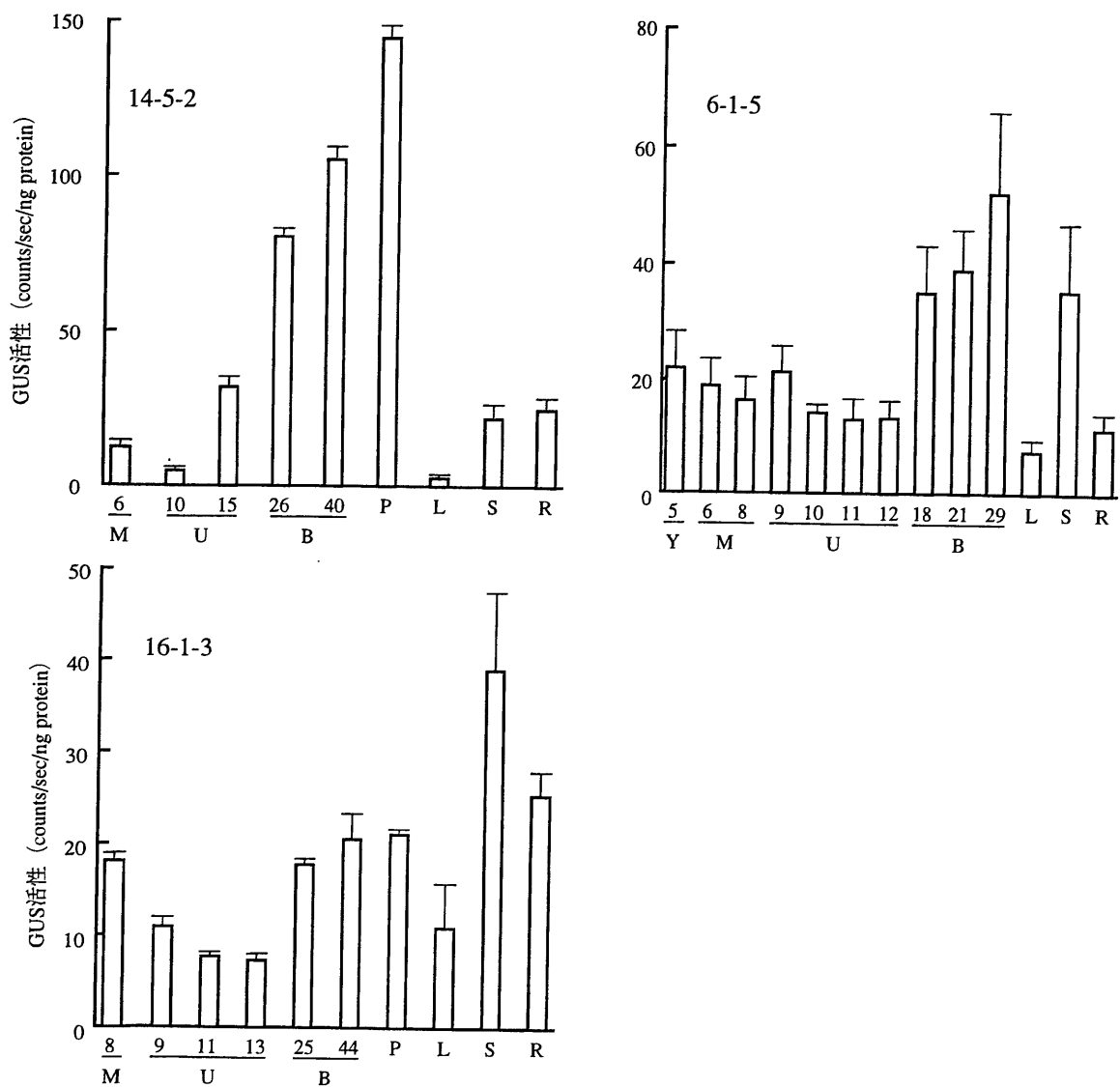


図23 *LIM18::GUS*植物体における β -グルクロニダーゼ活性の測定

減数分裂前の時期 (Y)、減数分裂時期 (M)、一核性小孢子形成時期 (U)、二核性花粉形成時期 (B) のつばみより取り出したヤク、成熟花粉 (P)、葉 (L)、茎 (S)、根 (R) より抽出物を調製し、 β -グルクロニダーゼ活性の測定を行った。横軸の数値は、ヤクを採取したつばみの長さ [mm] を示している。グラフの中のハイフン (-) を用いて表示した数値は、解析に使用した植物体の系統を表している。

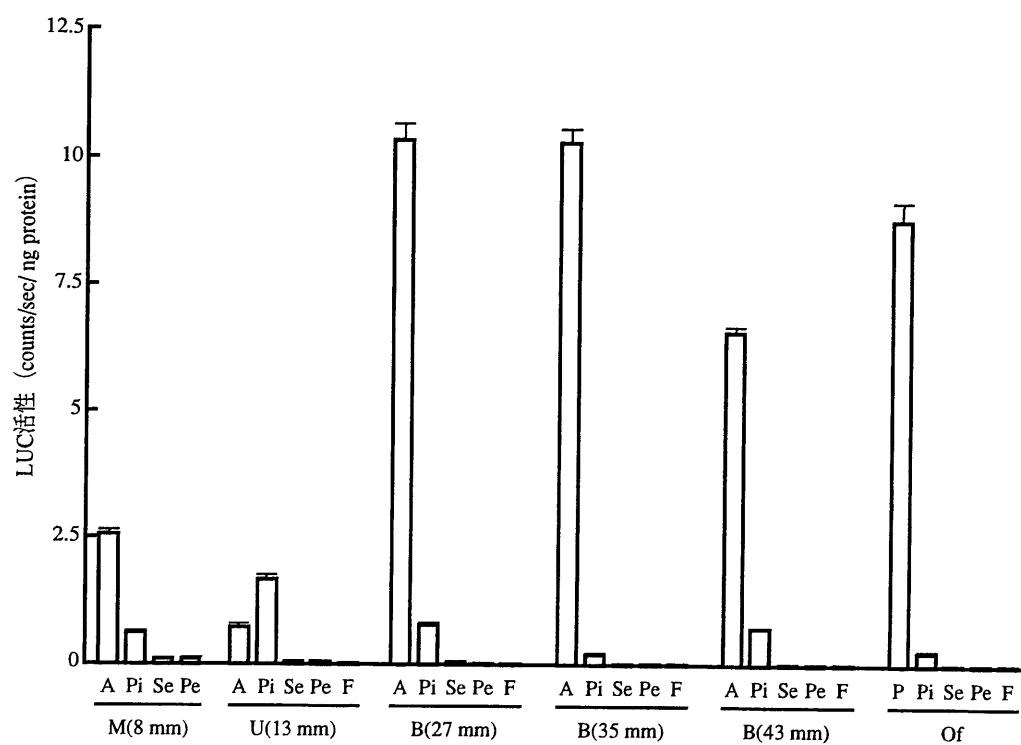
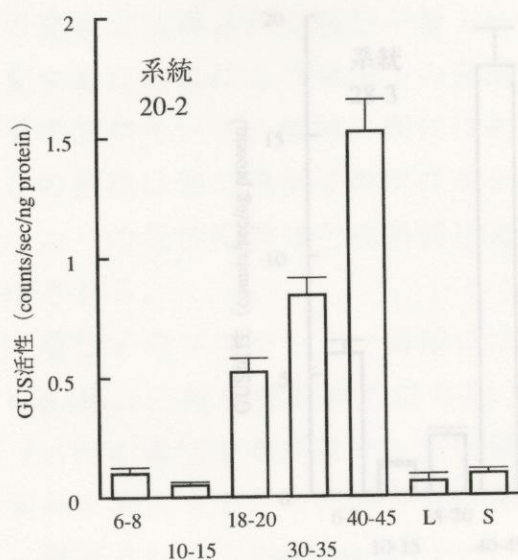


図24 *LIM18::LUC*植物体のつぼみにおける活性の特異性

減数分裂時期 (M)、一核性小孢子形成時期 (U)、二核性花粉形成時期 (B) および開花した花 (Of) より、種々の器官と花粉を分別後、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。A、Pi、Se、Pe、F、Pはそれぞれヤク、めしべ、がく、花弁、花糸、成熟花粉に対応する。横軸の括弧内の数値はつぼみの長さ [mm] を表している。植物体は系統7-2-1を用いた。

A *LIM10::GUS*植物体



B *LIM10::LUC*植物体

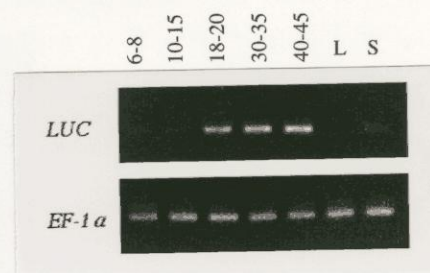
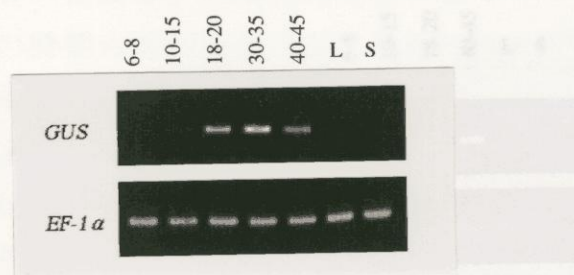
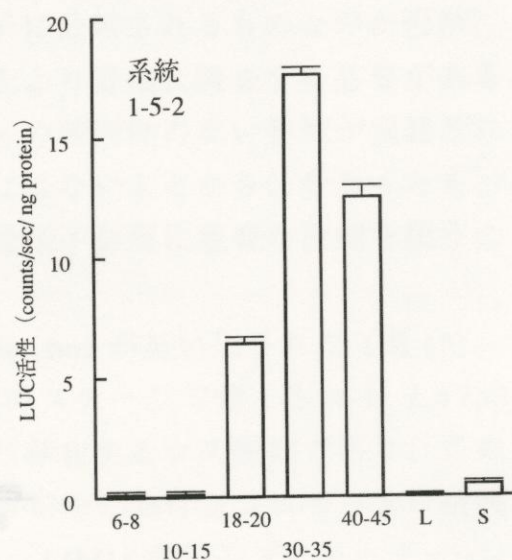
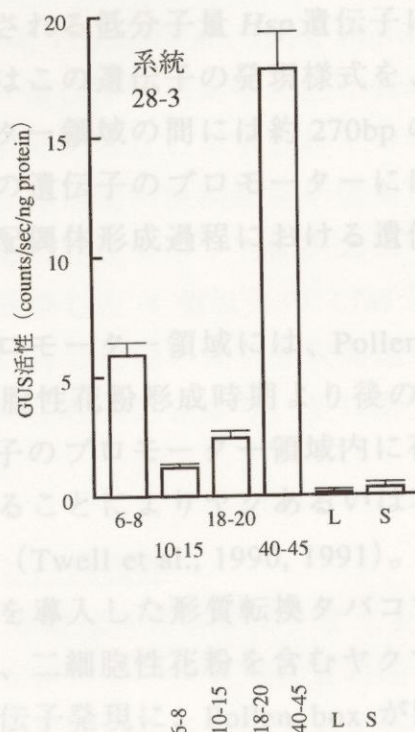


図25 *LIM10::GUS*および*LIM10::LUC*植物体におけるレポーター遺伝子の転写産物の検出

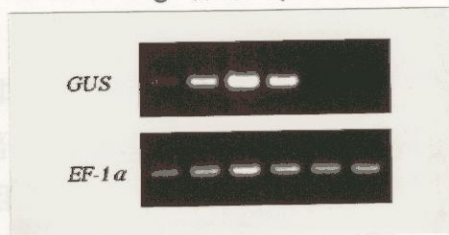
大きさの異なるつぼみより取り出したヤク、葉 (L) および茎 (S) に対して、レポータータンパク質の活性測定とRT-PCRによるレポーター遺伝子の転写産物の検出を行った。グラフの横軸の数値は、ヤクを採取したつぼみの長さ [mm] を示している。RT-PCRの増幅サイクル数は、*EF-1α* は30サイクル、*GUS* は28サイクル、*LUC* は25サイクルで行った。

LIM遺伝子のプロモーターの構造

LIM10 および LIM12 遺伝子のプロモーター領域には、HSE に類似した配列が見られた (図 11, 12) が、テッポウユリ花粉母細胞の熱ストレスによって LIM10 遺伝子産物の量的増加が見られなかった (未発表データ)。従って、LIM10 遺伝子に関しては非熱誘導型低分子量 Hsp 遺伝子であり、その発現が発生段階特異的に制御されていると予想される。LIM12 遺伝子がストレスによりその発現が誘導される低分子量 Hsp 遺伝子に分類されるものなのか否か、の判断をするためにはこの領域の発現様式をより詳細に調査する必要がある。両遺伝子のプロモーター領域の間には約 270bp の相同性の高い領域が確認されたが、この領域は他の遺伝子のプロモーターにはないことから、少なくとも、テッポウユリの雄性生殖形成過程における遺伝子発現に重要な役割を担うことが期待される。



LIM18 遺伝子のプロモーター領域には、Pollen box が見い出された (図 13)。Pollen box は、二細胞性花粉形成時期より後のステージで働くトマト LAT52 および LAT56 遺伝子のプロモーター領域内に存在するシス配列であり、この配列に変異を導入することによって花粉におけるプロモーター活性が抑制・阻害される (Twell et al., 1991)。LIM18 遺伝子プロモーター-レポーター融合遺伝子を導入した形質転換タバコでは、ヤクにおけるレポータータンパク質の活性は、二細胞性花粉を含むヤクで高くなった (図 22, 23) が、これはこの時期の遺伝子発現に関与する可能性を示唆していると思われる。



LIM15 遺伝子、および LIM16 遺伝子のプロモーター領域の間に顕著な相同性が見られた。この領域の構造に高い相同性を持つ LIM15 遺伝子のプロモーターには部分的に共通のシス配列が存在する例が報告されている (Eyal et al., 1995)。今回、両遺伝子のプロモーター領域には、AAAGTG 配列が存在することが明らかになったこと (図 14) から、減数分裂細胞の遺伝子発現制御に関与していると考えられる。

図26 LIM18::GUS植物体におけるレポーター遺伝子の転写産物の検出

大きさの異なるつぼみより取り出したヤク、葉 (L) および茎 (S) に対して、レポータータンパク質の活性測定とRT-PCRによるレポーター遺伝子の転写産物の検出を行った。グラフの横軸の数値は、ヤクを採取したつぼみの長さ [mm] を示している。RT-PCRの増幅サイクル数は、EF-1 α は30サイクル、GUSは33サイクルで行った。

マウスでは、cAMP応答性要素結合タンパク質 (CREB) の転写を調節する因子として CREM および CREB 遺伝子が単離されているが、これらの遺伝子にはそれぞれ精巣特異的なアイソフォームが存在する。両遺伝子の精巣特異的あるいはこれ以外

考察

LIM 遺伝子のプロモーターの構造

LIM10 および *LIM12* 遺伝子のプロモーター領域には、HSE に類似した配列が見られた (図 11、12) が、テッポウユリ花粉母細胞の熱ストレスによって *LIM10* 遺伝子産物の量的増加が見られなかった (未発表データ)。従って、*LIM10* 遺伝子に関しては非熱誘導型低分子量 *Hsp* 遺伝子であり、その発現が発生段階特異的に制御されていると予想される。*LIM12* 遺伝子がストレスによりその発現が誘導される低分子量 *Hsp* 遺伝子に分類されるものなのか否か、の判断をするためにはこの遺伝子の発現様式をより詳細に調査する必要がある。両遺伝子のプロモーター領域の間には約 270bp の相同性の高い領域が確認されたが、この領域は他の遺伝子のプロモーターにはないことから、少なくとも、テッポウユリの雄性配偶体形成過程における遺伝子発現に重要な役割を担うことが期待される。

LIM18 遺伝子のプロモーター領域には、Pollen box が見い出された (図 13)。Pollen box は、二細胞性花粉形成時期より後のステージで働くトマト *LAT52* および *LAT56* 遺伝子のプロモーター領域内に存在するシス配列であり、この配列に変異を導入することによりヤクあるいは花粉におけるプロモーター活性が抑制・阻害される (Twell et al., 1990, 1991)。*LIM18* 遺伝子プロモーター::レポーター融合遺伝子を導入した形質転換タバコでは、ヤクにおけるレポータータンパク質の活性は、二細胞性花粉を含むヤクで高くなった (図 22、23) が、これはこの時期の遺伝子発現に、Pollen box が関与する可能性を示唆していると思われる。

LIM15 遺伝子、およびこれのシロイヌナズナ相同遺伝子 *ArLIM15* のプロモーター領域の間に顕著な相同性は見られなかった。しかしながら、プロモーター領域の構造に高い相同性がない場合でも、類似した発現様式を示す遺伝子のプロモーターには部分的に共通のシス配列が存在する例が報告されている (Eyal et al., 1995)。今回、両遺伝子のプロモーター領域には、AAAGTG 配列が存在することが明らかになったこと (図 14) から、減数分裂細胞の遺伝子発現制御における、AAAGTG 配列の重要性が示唆される。

単離した 4 個の *LIM* 遺伝子のプロモーター領域には、体細胞組織における遺伝子発現制御に関与するシス配列 (G box、TGACG 配列等) が存在した。マウスでは、サイクリック AMP 応答遺伝子の転写を調節する因子として *CREM* および *CREB* 遺伝子が単離されているが、これらの遺伝子にはそれぞれ精巢特異的なアイソフォームが存在する。両遺伝子の精巢特異的あるいはこれ以外

の組織特異的なアイソフォームは、各々サイクリック AMP 応答遺伝子のプロモーター領域内の共通配列を認識し、転写調節を行うことが報告されている (Foulkes et al., 1992; Ruppert et al., 1992; De Cesare et al., 1999)。従って、*LIM* 遺伝子の発現もまた、G box、TGACG 配列等に配偶体形成過程特異的に働く転写制御因子が結合することにより、調節されている可能性がある。この他に、*LIM18* 遺伝子のプロモーター領域には 26bp の繰り返し配列が 3 ケ所に、*LIM10* および *LIM12* 遺伝子のプロモーター領域には対称配列が見られた。繰り返し配列や対称配列が遺伝子の発現制御に関わっている事例は報告されており (Fernandes et al., 1994; Foster et al., 1994; Fujiwara and Beachy, 1994)、ラットのプロエンケファリン遺伝子の精巢特異的な発現には、3 ケ所に繰り返し存在する 6bp の配列が必要であることが示されている (Liu et al., 1997)。いずれにしても、現時点では高等植物の生殖細胞形成過程、なかでも減数分裂時期特異的な遺伝子の発現誘導を規定するシス配列および転写制御因子は同定されていない。今後は、今回単離した 4 個以外の *LIM* 遺伝子のプロモーター領域、あるいはテッポウユリ以外の植物の減数分裂関連遺伝子を同定し、それらのプロモーター領域の配列の比較検討により、更に構造的な特徴を明らかにすることが重要である。

LIM 遺伝子プロモーターの特性

LIM10 および *LIM18* 遺伝子のプロモーターを導入した形質転換体では、葉、茎および根におけるレポータータンパク質の活性の発現様式が、それぞれのプロモーターを導入した植物の系統の間で異なるものが見られた (図 18、19、22、23)。この理由のひとつに、葉、茎、根では、プロモーターの働きが、プロモーター::*レポーター* 融合遺伝子が導入された染色体の位置による影響 (Position effect)、を受けたことによると考えられる。

これに対し、ヤクにおける活性の様式には、いずれの遺伝子のプロモーターを導入した形質転換体においても、それぞれ共通の特徴が見られた。もし、ヤクにおけるプロモーターの働きが、Position effect の影響を受けているのであれば、この様な共通性はないと予想される。従って、ヤクで検出された活性は、導入した *LIM* 遺伝子プロモーターの特性を反映していると考えられる。

LIM10 遺伝子プロモーターの特徴

LIM10>::GUS および *LIM10>::LUC* 植物体では、調べた形質転換体全ての系統において、二細胞性花粉を含むヤク、成熟花粉からレポータータンパク質の活性が検出された (図 18、19)。図 21 には、二細胞性花粉形成時期のヤクと成熟

花粉特異的に高い β -グルクロニダーゼ活性が検出された *LIM10::GUS* 植物体（系統 20-2）の活性染色実験の結果を示しているが、この他に、ヤク以外の組織から活性が検出された植物体（系統 19-3、1-5-5）においても、二細胞性花粉および成熟花粉が活性染色されることを確認している（データ省略）。この実験では、ヤクより取り出した細胞あるいは成熟花粉を固定処理後、緩衝液を用いて洗浄操作を行っているため、目的以外の細胞・組織の混入による結果への影響はほとんどないと考えられる。以上の結果に加え、ヤクおよび成熟花粉において特異的に高い活性を示す植物体は観察されるが、これら以外の細胞・組織のみからレポータータンパク質の活性が検出される植物体はないことから、*LIM10* 遺伝子のプロモーターは、タバコの雄性配偶体形成過程の二細胞性花粉形成時期より後のステージにおいて働くと考えられる。

LIM10 遺伝子の転写産物はテッポウユリにおいては減数分裂細胞特異的に蓄積する（Kobayashi et al., 1994）が、*LIM10* 遺伝子のプロモーターを導入した形質転換体では、レポータータンパク質の活性の上昇およびレポーター遺伝子の転写産物の蓄積が、減数分裂時期ではなく、これより後のステージの二細胞性花粉形成時期より見られた。このことは、*LIM10* 遺伝子の発現制御において、ヤクあるいは花粉という組織特異性を規定するシス配列と、発現の時期を規定するそれとは異なっており、単離したプロモーター領域内に、ヤク・花粉での遺伝子発現に必要なシス配列は含まれているが、減数分裂時期の遺伝子発現に必要なシス配列は含まれていない可能性を示唆している。今後、更に長いプロモーター領域を用いて解析を行うことにより、これを検証することが可能である。

発生段階特異的に発現制御を受ける低分子量 *Hsp* 遺伝子は報告されている（Carranco et al., 1997; Almoguera et al., 1998）が、高等植物において、二細胞性花粉形成時期より後の時期において、転写産物・遺伝子産物の蓄積が見られる低分子量 *Hsp* 遺伝子は同定されていない。アブラナの *Bgp1*、シロイヌナズナの *ACT4* および *ACT12* 遺伝子のプロモーターは、*LIM10* 遺伝子のそれと同様の発現様式を示す（Xu et al., 1993; Huang et al., 1996）が、これらのプロモーターの間には、構造上明らかな類似性はない。従って、配偶体形成過程（特に、二細胞性花粉形成過程）の遺伝子発現の調節に関与する新規のシス配列が、*LIM10* 遺伝子プロモーターには存在する可能性がある。

LIM18 遺伝子プロモーターの特徴

LIM18::GUS および *LIM18::LUC* 植物体では、調べた形質転換体全ての系統において、減数分裂細胞、一核性小孢子および二細胞性花粉を含むヤクからレ

ポータータンパク質の活性が検出された (図 22、23)。ヤク以外の細胞・組織のみから、レポータータンパク質の活性が検出される植物体はなかった。更に、発現様式に関係なく、ヤクおよび成熟花粉以外に茎、根の活性が高い *LIM18::GUS* 植物体 (系統 14-5-2、16-1-3) においても、図 21 に示した活性染色実験の結果と同様に、種々の時期のヤクから絞り出した細胞、成熟花粉から β -グルクロニダーゼ活性が検出された (データ省略)。以上の結果から、*LIM18* 遺伝子のプロモーターは、タバコの雄性配偶体形成過程において、減数分裂時期から成熟花粉が形成される期間を通して、機能していると考えられる。本研究では、雄性配偶体形成器官に主眼を置いた解析を行ったが、つぼみの長さが 13mm の時、めしべの活性がこの時期のヤクの活性に対して、約 2.3 倍高い値を示した (図 24)。このことは、*LIM18* 遺伝子プロモーターは雌性配偶体形成器官においても働いている可能性を示唆しており、このプロモーターの働きを制御するシス配列、転写制御因子等の解析を行うことにより、雄性および雌性配偶体形成器官における遺伝子発現制御機構への理解が深まると思われる。

減数分裂細胞における遺伝子発現

減数分裂細胞では、減数第一分裂の前期から染色体の凝集が始まり、染色体が強く凝集した状態で分裂過程が進行する。減数第一分裂終了後から減数第二分裂前期の間には、DNA 合成期がなく間期の時間も短いため、減数分裂過程の大部分の時期では、染色体は凝集した状態にある。従って、形態的には転写が行われにくいと予想される (Cryderman et al., 1999; Hennig, 1999)。しかし、*LIM18::GUS* 植物体では、減数第一分裂前期から四分子期の細胞において β -グルクロニダーゼ活性が検出された (図 21)。減数分裂時期に遺伝子の転写が誘導される現象は、種々の生物種において報告されており、出芽酵母では減数分裂期間中に、少なくとも 400 個以上の遺伝子に関して、転写産物の量的増加が見られる (Chu et al., 1998)。高等動物の減数分裂細胞では、減数分裂の進行過程を制御する、すなわち遺伝子組み換え、細胞周期、あるいは核構造の変化等の制御に関与する遺伝子の発現誘導が行われる (Eddy and O'Brien, 1998)。これに対し、体細胞では、有糸分裂時期に染色体の強い凝集と遺伝子の転写抑制現象が観察される (Prescott and Bender, 1962; Shermoen and O'Farrell, 1991; Hartl et al., 1993; Martines-Balbas et al., 1995)。以上に述べた様に、減数分裂細胞と体細胞の間では、染色体の構造が遺伝子発現に与える影響が異なり、それぞれの細胞種特異的な発現調節機構が存在すると思われる。それらの調節機構が異なる原因は明らかではないが、高等植物の減数分裂細胞では、減数分裂前の

DNA 合成期以外にも、減数第一分裂前期に DNA 合成が行われること (Hotta et al., 1985b) から、減数分裂時期の細胞には、染色体を部分的に脱凝集する機構が備わっている可能性が考えられる。

現在までに、高等植物の減数分裂関連遺伝子の発現調節機構の解析は、タバコの *CCaMK*、およびシロイヌナズナの *AtDMC1* のプロモーターを用いて行われている (Klimyuk and Jones, 1997; Poovaiah et al., 1999)。しかし、*CCaMK* 遺伝子プロモーター:: β -グルクロニダーゼ融合遺伝子を導入した形質転換タバコでは、 β -グルクロニダーゼ活性が減数分裂時期のヤクから検出されたが、この活性がヤク内の減数分裂細胞に含まれるか否かは調査されていない (Poovaiah et al., 1999)。また、形質転換体を用いた解析によって、*AtDMC1* 遺伝子プロモーターが、この遺伝子を単離した植物であるシロイヌナズナの減数分裂細胞で働くことは示されているが、他の植物において同様に機能することは確認されていない (Klimyuk and Jones, 1997)。本研究では、テッポウユリ由来の *LIM18* 遺伝子プロモーターが、タバコの減数分裂細胞で働くことを明らかにした。これは、高等植物の減数分裂関連遺伝子プロモーターが異種植物の減数分裂細胞において、働くことを示した初めての報告であり、減数分裂関連遺伝子の発現調節機構が、種々の植物の間で保存されていることを示唆している。今後、タバコ以外の植物を用いた *LIM* 遺伝子プロモーター解析、あるいは *LIM* 以外の減数分裂関連遺伝子プロモーターを用いて同様の解析を行うことにより、このことが明らかになると考えられる。

まとめ

本研究第1章では、減数分裂細胞を大量に調製することが可能なテッポウユリの特徴を活かし、生化学的・細胞学的方法により HSP70 様タンパク質の動態を調べた。その結果、減数分裂細胞には発現様式の異なる複数の HSP70 様タンパク質が存在すること、これらのなかには核内に局在するものが含まれることが示された。LIM18 自身も、タバコ培養細胞では、核移行能を持つことが明らかになった。以上の知見から、LIM18 を含め核内に分布する HSP70 様タンパク質は、減数分裂細胞において特異的に観察される相同染色体の対合と、この間で行われる遺伝子組み換え、およびそれに伴うタンパク質の動態、染色体構造等の変化に関与すると考えられる。高等植物では、減数分裂細胞を用いて HSP70 様タンパク質の発現様式、細胞内所在は解析されておらず、本研究により、減数分裂過程の進行に HSP70 様タンパク質が重要な役割を担っている可能性を、初めて示すことが出来た。

第2章では、減数分裂特異的遺伝子の発現制御機構を調べるために、テッポウユリのゲノム DNA より、*LIM10*、*LIM12*、*LIM15* および *LIM18* 遺伝子のプロモーター領域の単離を行った。*LIM18* 遺伝子のプロモーターに関しては、タバコの減数分裂細胞において働くことを確認した。このことは、減数分裂特異的遺伝子の発現制御機構が植物種間で保存されている可能性を示しているだけでなく、このプロモーターが、種々の植物の減数分裂細胞における外来遺伝子発現系の構築に使用可能であることを示唆している。また、同定されている減数分裂関連遺伝子が少ない現在の状況では、減数分裂細胞で働く遺伝子の発現制御機構を解析するうえで、本研究で行った *LIM* 遺伝子に着目したアプローチが、有効な方法のひとつであることを示している。

近年、高等植物におけるゲノムプロジェクトの進展、あるいは変異体に関する知見の蓄積に伴い、減数分裂時期に働く遺伝子の単離が行われつつある (Bai et al., 1999; Bhatt et al., 1999)。今後は、各種の植物、更には植物以外の生物 (酵母、線虫等) が持つ特徴を利用した解析を行うことにより、減数分裂進行過程の制御機構への理解が深まることが期待される。

参考文献

- Albani, D., Robert, L. S., Donaldson, P. A., Altosaar, I., Arnison, P. G., and Fabijanski, S. F. (1990). Characterization of a pollen-specific gene family from *Brassica napus* which is activated during early microspore development. *Plant Mol. Biol.* 15, 605-622.
- Albani, D., Sardana, R., Robert, L. S., Altosaar, I., Arnison, P. G., and Fabijanski, S. F. (1992). A *Brassica napus* gene family which shows sequence similarity to ascorbate oxidase is expressed in developing pollen. Molecular characterization and analysis of promoter activity in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 2, 331-342.
- Allen, R. L., O'Brien, D. A., and Eddy, E. M. (1988a). A novel hsp70-like protein(P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Mol. Cell Biol.* 8, 828-832.
- Allen, R. L., O'Brien, D. A., Jones, C. C., Rockett, D. L., and Eddy, E. M. (1988b). Expression of heat shock protein by isolated mouse spermatogenic cells. *Mol. Cell Biol.* 8, 3260-3266.
- Allen, J. W., Dix, D. J., Collins, B. W., Merrick, B. A., Selkirk, J. K., Poorman-Allen, P., Dresser, M. E., and Eddy, E. M. (1996). HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 104, 414-421.
- Almoguera, C., Prieto-Dapena, P., and Jordano, J. (1998). Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *Plant J.* 13, 437-446.
- Atkinson, B. G., Raizada, M., Bouchard, R. A., Frappier, J. R. H., and Walden, D. B. (1993). The independent stage-specific expression of the 18-kDa heat shock protein genes during microsporogenesis in *Zea mays* L.. *Dev. Genet.* 14, 15-26.
- Bai, X., Peirson, 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.

Barent, R. L., and Elthon, T. E. (1992). Two-dimensional gels: an easy method for large quantities of proteins. *Plant Mol. Biol. Report.* 10, 338-344.

Beckmann, R. P., Mizzen, L. A., and Welch, W. J. (1990). Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854.

Bensaude, O., Babinet, C., Morange, M., and Jacob, F. (1983). Heat shock proteins, first major products zygotic gene activities in mouse embryo. *Nature* 305, 331-333.

Bhatt, A. M., Lister, C., Page, T., Paul, F., 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.

Bishop, D. K., Park, D., Xu, L., and Kleckner, N. (1992). *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and the cell cycle progression. *Cell* 69, 439-456.

Boston, R. S., Viitanen, P. V., and Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32, 191-222.

Busk, P. K., and Pages, M. (1997). Microextraction of nuclear proteins from single maize embryos. *Plant Mol. Biol. Report.* 15, 371-376.

Carranco, R., Almoguera, C., and Jordano, J. (1997). A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *J. Biol. Chem.* 272, 27470-27475.

Carranco, R., Almoguera, C., and Jordano, J. (1999). An imperfect heat shock element and different upstream sequences are required for the seed-specific expression of a small heat shock protein gene. *Plant Physiol.* 121, 723-730.

Christians, E., Campion, E., Thompson, E. M., and Renard, J.-P. (1995). Expression of the *HSP70.1* gene, a landmark of early zygotic activities in the mouse embryo, is

restricted to the first burst of transcription. *Development* 121, 113-122.

Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.

Chua, P. R., and Roeder, G. S. (1998). Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. *Cell* 93, 349-359.

Cryderman, D. E., Tang, H., Bell, C., Gilmour, D. S., and Wallrath, L. L. (1999). Heterochromatic silencing of *Drosophila* heat shock genes acts at the level of promoter potentiation. *Nucl. Acids Res.* 27, 3364-3370.

Custers, J. M. B., Oldnhof, M. T., Schrauwen, J. A. M., Cordewener, J. H. G., Wullems, G. J., and van Lookeren Campagne, M. M. (1997). Analysis of microspore-specific promoters in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 35, 689-699.

De Cesare, D., Fimia, G. M., and Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcription activation. *Trends Biol. Science* 24, 281-285.

DeRocher, A., and Vierling, E. (1995). Cytoplasmic HSP70 homologues of pea: differential expression in vegetative and embryonic organs. *Plant Mol. Biol.* 27, 441-456.

Dietrich, P. S., Bouchard, R. A., Casey, E. S., and Sinibaldi, R. M. (1991). Isolation and characterization of a small heat shock protein gene from maize. *Plant Physiol.* 96, 1268-1276.

Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E. H., and Eddy, E. M. (1996). Targeted gene disruption of *Hsp 70-2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 3264-3268.

Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D. R., Brown, P. R., Goulding, E. H., Strong, B. D., and Eddy, E. M. (1997). HSP70-2 is

required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124, 4595-4603.

Donald, R. G. K., and Cashmore, A. R. (1990). Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *EMBO J.* 9, 1717-1726.

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

Duck, N., McCormick, S., and Winter, J. (1989). Heat shock protein hsp70 cognate gene expression in vegetative and reproductive organs of *Lycopersicon esculentum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 3674-3678.

Duck, N. B., and Folk, W. R. (1994). Hsp70 heat shock protein cognate is expressed and stored in developing tomato pollen. *Plant Mol. Biol.* 26, 1031-1039.

Eddy, E. M., and O'Brien, D. A. (1998). Gene Expression during Mammalian Meiosis. In *The Meiosis and Gametogenesis*. Handel, M. A. ed. (California: Academic Press), pp. 141-200.

Eddy, E. M. (1999). Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *J. Reprod. Fert.* 4, 23-30.

Engbrecht, J., Voelkel-Meiman, K., and Roeder, G.S. (1991). Meiosis-specific RNA splicing in yeast. *Cell* 66, 1257-1268.

Erickson, R. O. (1948). Cytological and growth correlations in the flower bud and anther of *Lilium longiflorum*. *Am. J. Bot.* 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.

Fernandes, M., O'Brien, T., and Lis, J. T. (1994). Structure and Regulation of Heat

Shock Gene Promoters. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Morimoto, R. I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) , pp. 375-393.

Forreiter, C., Kirschner, M., and Nover, L. (1997). Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*. *Plant Cell* 9, 2171-2181.

Foster, R., Izawa, T., and Chua, N.-H. (1994). Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* 8, 192-200.

Foulkes, N. S., Mellstrom, B., Benusiglio, E., and Sassone-Corsi, P. (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature* 355, 80-84.

Frova, C., Taramino, G., and Binelli, G. (1989). Heat-shock protein during development in maize. *Dev. Genet.* 10, 324-332.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., and Hartl, F. U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111-117.

Fujiwara, T., and Beachy, R. N. (1994). Tissue-specific and temporal regulation of a β -conglycinin gene: roles of the RY repeat and other *cis*-acting elements. *Plant Mol. Biol.* 24, 261-272.

Gagliardi, D., Breton, C., Chaboud, A., Vergne, P., and Dumas, C. (1995). Expression of heat shock factor and heat shock protein 70 genes during maize pollen development. *Plant Mol. Biol.* 29, 841-856.

Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V. S., Timko, M. P., Scolnik, P. A., and Cashmore, A. R. (1988). An evolutionary conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 7089-7093.

Gordewener, J. H. G., Hause, G., Gorden, E., Busink, R., Hause, B., Dons, H. J. M.,

- van Lammeren, A. A. M., van Lookeren Campagne, M. M., and Pechan, P. (1995). Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspore. *Planta* 196, 747-755.
- Grebenok, R. J., Pierson, E., Lambert, G. M., Gong, F.-C., Afonso, C. L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J. C., and Galbraith, D. W. (1997). Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J.* 11, 573-586.
- 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.
- Haber, J. E. (1998). Meiosis: avoiding inappropriate relationships. *Curr. Biol.* 8, R832-R835.
- Hartl, P., Gottesfeld, J., and Forbes, D. J. (1993). Mitotic repression of transcription *in vitro*. *J. Cell Biol.* 120, 613-624.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hendrick, J. P., and Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 349-384.
- Hennig, W. (1999). Heterochromatin. *Chromosoma* 108, 1-9.
- 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, spermatids, and spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 186, 317-323.

- Hollingsworth, N. M., Goetsch, L., and Byers, B. (1990). The *HOP1* gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosome. *Cell* 61, 73-84.
- Hopf, N., Plesofsky-Vig, N., and Brambl, P. (1992). The heat shock response of pollen and other tissues of maize. *Plant Mol. Biol.* 19, 623-630.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- Hotta, Y., and Stern, H. (1978). DNA unwinding protein from meiotic cells of *Lilium*. *Biochemistry* 17, 1872-1880.
- Hotta, Y., Tabata, S., Bouchard, R. A., Pinon, R., and Stern, H. (1985a). General recombination mechanisms in extracts of meiotic cells. *Chromosoma* 93, 140-151.
- Hotta, Y., Tabata, S., Stubbs, L., and Stern, H. (1985b). Meiosis-specific transcripts of a DNA component replicated during chromosome pairing: homology across the phylogenetic spectrum. *Cell* 40, 785-793.
- Huang, S., An, Y.-Q., McDowell, J. M., McKinney, E. C., and Meagher, R. B. (1996). The *Arabidopsis thaliana* *ACT4/ACT12* actin gene subclass is strongly expressed throughout pollen development. *Plant J.* 10, 189-202.
- Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S., and Yoneda, Y. (1992). Antibodies against 70-kDa heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J. Cell Biol.* 119, 1047-1061.
- 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, 467-75.
- Ito, M., and Stern, H. (1967). Studies of meiosis *in vitro*: *in vitro* culture of meiotic

cells. *Dev. Biol.* 16, 36-53.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. (1987). GUS fusion: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

Johnson, S. (1994). The Cell Nucleus. In *Molecular Biology of The Cell*. 3rd edition. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. ed. (New York: Garland Publishing, Inc.), pp. 335-399.

Kang, P.-J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A., and Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348, 137-142.

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., Hotta, Y., and Tabata, S. (1993). Isolation and characterization of a yeast gene that is homologous with a meiosis-specific cDNA from a plant. *Mol. Gen. Genet.* 237, 225-232.

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.

Koltunow, A. M., Truettner, J., Cox, K. H., Wallroth, M., and Goldberg, R. B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2, 1201-1224.

Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L., and Lindquist, S. (1986). An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* 231, 1154-1157.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the

head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

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.

Lammers, J. H. M., Offenberger, H. H., van Aalderen, M., Vink, A. C. G., Dietrich, A. J. J., and Heyting, C. (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1137-1146.

Lee, J. H., and Schöffl, F. (1996). An *Hsp70* antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 11-19.

Leu, J.-Y., Chua, P. R., and Roeder, G. S. (1998). The meiosis-specific Hop2 protein of *S. cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell* 94, 375-386.

Li, Q.-B., Haskell, D. W., and Guy, C. L. (1999). Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Mol. Biol.* 39, 21-34.

Lin, T.-Y., Duck, N. B., Winter, J., and Folk, W. R. (1991). Sequences of two *hsc70* cDNAs from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol. Biol.* 16, 475-478.

Liu, F., Tokeson, J., Persengiev, S. P., Ebert, K., and Kilpatrick, D. L. (1997). Novel repeat elements direct rat proenkephalin transcription during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 272, 5056-5062.

Marchesi, V. T., and Ngo, N. (1993). *In vitro* assembly of multiprotein complexes containing α , β , and γ tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 3028-3032.

Marrs, K. A., Casey, E. S., Capitant, S. A., Bouchard, R. A., Dietrich, P. S., Mettler, I.

J., and Sinibaldi, R. M. (1993). Characterization of two maize *HSP90* heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development. *Dev. Genet.* 14, 27-41.

Martines-Balbas, M. A., Dey, A., Rabindran, S. K., Ozato, K., and Wu, C. (1995). Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell* 83, 29-38.

Mascarenhas, J. P. (1990). Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 317-338.

Mascarenhas, J. P., and Crone, D. E. (1996). Pollen and the heat shock response. *Sex. Plant Reprod.* 9, 370-374.

Matsuoka, K., and Nakamura, K. (1991). Propeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 834-838.

Meuwissen, R. L. J., Offenberg, H. H., Dietrich, A. J. J., Riesewijk, A., van Iersel, M., and Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11, 5091-5100.

Miernyk, J. A., Duck, N. B., David, N. R., and Randall, D. D. (1992). Autophosphorylation of the pea mitochondrial heat-shock protein homolog. *Plant Physiol.* 100, 965-969.

Miernyk, J. A. (1997). The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends Plant Science* 2, 180-187.

Mizumura, H., Shibata, T., and Morishima, N. (1999). Stable association of 70-kDa heat shock protein induces latent multisite specificity of a unisite-specific endonuclease in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 274, 25682-25690.

Moens, P. B., Heyting, C., Dietrich, A. J. J., van Raamsdonk, W., and Chen, Q. (1987). Synaptonemal complex antigen location and conservation. *J. Cell Biol.* 105, 93-103.

- Morishima, N., Nakagawa, K.-I., Yamamoto, E., and Shibata, T. (1990). A subunit of yeast site-specific endonuclease *SceI* is a mitochondrial version of the 70-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 265, 15189-15197.
- 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. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.
- Murray, M. G., and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8, 4321-4325.
- Nishihara, M., Ito, M., Tanaka, I., Kyo, M., Ono, K., Irifune, K., and Morikawa, H. (1993). Expression of the β -glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment. *Plant Physiol.* 102, 357-361.
- Nover, L., and Scharf, K.-D. (1984). Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur. J. Biochem.* 139, 303-313.
- Ochman, H., Gerber, A. S., and Hartl, D. L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120, 621-623.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Offenberg, H. H., Schalk, J. A. C., Meuwissen, R. L. J., van Aalderen, M., Kester, H. A., Dietrich, A. J. J., and Heyting, C. (1998). SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucl. Acids Res.* 26, 2572-2579.
- 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.

Ohyama, T., Iwaikawa, Y., Kobayashi, T., Hotta, Y., and Tabata, S. (1992). Isolation of synaptonemal complexes from microsporocytes. *Plant Science* 86, 115-124.

Okuno, Y., Imamoto, N., and Yoneda, Y. (1993). 70-kDa heat shock protein colocalizes karyophilic proteins into the nucleus during their transport *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 206, 134-142.

Oldenhof, M. T., de Groot, P. F. M., Visser, J. H., Schrauwen, J. A. M., and Wullems, G. J. (1996). Isolation and characterization of a microspore-specific gene from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 31, 213-225.

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

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.

Prändl, R., Kloske, E., and Schöffl, F. (1995). Developmental regulation and tissue-specific differences of heat shock gene expression in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Mol. Biol.* 28, 73-82.

Prescott, D. M., and Bender, M. A. (1962). Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp. Cell Res.* 26, 260-268.

Raventos, D., Jensen, A. B., Rask, M.-B., Casacuberta, J. M., Mundy, J., and San Segundo, B. (1995). A 20 bp *cis*-acting elements is both necessary and sufficient to mediate elicitor response of a maize *PRms* gene. *Plant J.* 7, 147-155.

Roberts, J. K., and Key, J. L. (1991). Isolation and characterization of a soybean *hsp70* gene. *Plant Mol. Biol.* 16, 671-683.

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.

Rosario, M. O., Perkins, S. L., O'Brien, D. A., Allen, R. L., and Eddy, E. M. (1992). Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (P70) of mouse spermatogenic cells. *Dev. Biol.* 150, 1-11.

Ruppert, S., Cole, T. J., Boshart, M., Schmid, E., and Schutz, G. (1992). Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes. *EMBO J.* 11, 1503-1512.

Rushton, P. J., Tovar Torres, J., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I. E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO J.* 15, 5690-5700.

Sato, S., Hotta, Y., and Tabata, S. (1995). Structural analysis of *rec-A* like gene in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 2, 89-93.

Schlesinger, M. J. (1990). Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 12111-12114.

Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F.-A., and Beck, C. F. (1999). A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 11, 1165-1178.

Scott, R. (1993). Anther Development: A Molecular Perspective. In *The Molecular Biology of Flowering*. Jordan, B. R. ed. (UK: Cab International), pp. 141-184.

Shermoen, A. W., and O'Farrell, P. H. (1991). Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts. *Cell* 67, 303-310.

Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair

and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457-470.

Smith, D. F., Stensgard, B. A., Welch, W. J., and Toft, D. O. (1992). Assembly of progesterone receptor with heat shock proteins and receptor activation are ATP mediated events. *J. Biol. Chem.* 267, 1350-1356.

Smith, D. F., Whitesell, L., Nair, S. C., Chen, S., Prapapanich, V., and Rimerman, R. A. (1995). Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6804-6812.

Sun, S.-W., Chung, M.-C., and Lin, T.-Y. (1996). The structure and expression of an *hsc70* gene from *Lycopersicon esculentum*. *Gene* 170, 237-241.

Sym, M., Engebrecht, J., and Roeder, G. S. (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72, 365-378.

Terzaghi, W. B., and Cashmore, A. R. (1995). Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 445-474.

Triglia, T., Peterson, M. G., and Kemp, D. J. (1988). A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucl. Acids Res.* 25, 8186.

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.

Twell, D., Patel, S., Sorensen, A., Roberts, M., Scott, R., Draper, J., and Foster, G. (1993). Activation and developmental regulation of an *Arabidopsis* anther-specific promoter in microspores and pollen of *Nicotiana tabacum*. *Sex. Plant Reprod.* 6, 217-

Uzawa, M., Grams, J., Madden, B., Toft, D., and Salisbury, J. L. (1995). Identification of a complex between centrin and heat shock proteins in CSF-arrested *Xenopus* oocytes and dissociation of the complex following oocyte activation. *Dev. Biol.* 171, 51-59.

van Tunen, A. J., Mur, L. A., Brouns, G. S., Rienstra, J.-D., Koes, R. E., and Mol, J. M. M. (1990). Pollen- and anther-specific *chi* promoters from *Petunia*: tandem promoter regulation of the *chiA* gene. *Plant Cell* 2, 393-401.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579-620.

Watanabe, Y., Lino, Y., Furuhashi, K., Shimoda, C., and Yamamoto, M. (1988). The *S. pombe mei2* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *EMBO J.* 7, 761-767.

Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1994). *S. pombe mei2⁺* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* 78, 487-498.

Wilkinson, J. E., Twell, D., and Lindsey, K. (1997). Activities of *CaMV 35S* and *nos* promoters in pollen: implication for field release of transgenic plants. *J. Exp. Bot.* 48, 265-275.

Wisniewski, J., Kordula, T., and Krawczyk, Z. (1990). Isolation and nucleotide sequence analysis of the rat testis-specific major heat-shock protein (HSP70)-related gene. *Bioch. Biophys. Acta.* 1048, 93-99.

Wisniewski, J., Malezewski, M., Krawczyk, Z., and Gedamu, L. (1993). An upstream region of the rat spermatogenesis-specific heat-shock-like *Hst70* gene confers testis-specific expression in transgenic mice. *Eur. J. Biochem.* 212, 137-143.

Wu, S.-H., Wang, C., Chen, J., and Lin, B.-L. (1994). Isolation of a cDNA encoding a

70kDa heat-shock cognate protein expressed in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 25, 577-583.

Xu, H., Davies, S. P., Kwan, B. Y. H., O'Brien, A. P., Singh, M., and Knox, R. B. (1993). Haploid and diploid expression of a *Brassica campestris* anther-specific gene promoter in *Arabidopsis* and tobacco. Mol. Gen. Genet. 239, 58-65.

Zabaleta, E., Heiser, V., Grohmann, L., and Benniscke, 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.

Zakeri, Z. F., Wolgemuth, D. J., and Hunt, C. R. (1988). Identification and sequence analysis of a new member of the mouse *HSP70* gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. Mol. Cell. Biol. 8, 2925-2932.

Zhu, D., Dix, D. J., and Eddy, E. M. (1997). HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. Development 124, 3007-3014.

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻いただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の、堀田康雄名誉教授（現愛知淑徳大学）、島本功教授、平塚和之博士、高瀬尚文博士、ならびに、大変お世話になりました本学放射線実験施設安全管理担当者の伊勢恒男氏、植物遺伝子機能学講座の皆様、心より感謝致します。共同研究をして頂いた平塚理恵先生（東京慈恵会医科大学）、初谷紀之氏（新潟大学）、抗体作成に御協力頂いた蜂矢隆久博士、大矢和彦博士（株式会社医学生物学研究所）、抗体を提供して頂いた田中一郎博士（横浜市立大学）、プラスミドを提供して頂いた Pius Spielhofer 博士、Nam-Hai Chua 博士（ロックフェラー大学）に厚くお礼申し上げます。