

植物細胞における外来遺伝子の
有用発現系の構築

2000 年

長屋 進吾

目 次

序 論

第1章 タバコ BY2 細胞から有用プロモーターの単離

第1節 緒 言

第2節 実験材料および実験方法

第3節 結 果

第1項 タバコ BY2 細胞の対数増殖期または細胞増殖停止期に高発現する遺伝子の単離

第2項 候補遺伝子のプロモーター領域の単離

第3項 候補プロモーターの発現解析

第4節 考 察

第2章 ウニ *Ars* インスレーターを用いた外来遺伝子発現の安定化

第1節 緒 言

第2節 実験材料および実験方法

第3節 結 果

第1項 *Ars* インスレーターが外来遺伝子発現に及ぼす影響

第2項 *Ars* インスレーターの転写活性化能

第3項 *Ars* インスレーターによる染色体上への導入位置およびコピー数に及ぼす影響

第4項 プロモーターに対する *Ars* インスレーターの向きや距離が position effect の抑制に及ぼす影響

第5項 *gypsy* インスレーターが外来遺伝子発現に及ぼす影響

第6項 発現量の増大が *Ars* インスレーターの外来遺伝子発現の安定化に及ぼす影響

第4節 考 察

第3章 *NtADH* プロモーターに存在する安定発現に寄与する機能領域

第1節 緒 言

第2節 実験材料および実験方法

第3節 結 果

第1項 *NtADH* プロモーターの安定発現性

第2項 欠失解析による機能領域の限定

第3項 ADH200 の他生物種による機能解析

第4項 ADH200 の転写活性化能

第5項 プロモーターに対する ADH200 の向きや距離が position effect の抑制に及ぼす影響

第4節 考 察

総合考察

謝 辞

参考文献

関連論文

序 論

21 世紀を目前に迎え、地球規模での食糧危機や環境悪化がより現実味を帯びた問題となっている。これらを解決する一つ的手段として、植物バイオテクノロジーに多大な期待が寄せられている。すでに食糧増産につながる農業の新技术として、害虫抵抗性や除草剤耐性を付与した遺伝子組み換え植物が実用化されている。遺伝子組み換え植物については、一般市民の中に安全性などに不安を唱える声も多いが、環境・食糧問題を解決する優れた基盤技術であることは言うに易い。このような有用形質を付与した遺伝子組み換え植物を作出するためには、染色体上へ導入した外来遺伝子が転写され、次いで翻訳および目的タンパク質の蓄積に到ることが必須である。過去数年間に渡る精力的な有用植物作出の試みから、多くの問題点が浮き彫りとなってきた。まず外来遺伝子を発現させるためにはプロモーターが必要であるが、その選択が非常に限られていることが挙げられる。付与したい有用形質に応じて、外来遺伝子の最適な発現時期や部位および量が異なるが、これらの要求を満たすだけのプロモーターを持ちえていないのが現状である。また外来遺伝子が染色体上に組み込まれているにもかかわらず、期待された発現が得られないことが頻繁に起こる。これは、外来遺伝子発現の不活性化が高頻度で生じることに起因している。そのため、目的に適した植物個体の選抜に多大な時間と労力が費やされている。現在は一遺伝子導入による分子育種が主流であるが、真に実用的な有用植物の作出には複数遺伝子の多重導入による機能向上が必要であり、効率的な形質転換植物作製技術の開発が急務となっている。本研究の目的である「植物細胞において外来遺伝子を効率良く発現させる技術の確立」は、その中核を担うものである。

植物細胞における外来遺伝子発現の不活性化はサイレンシングと呼ばれ、2 つに大別されている。一方は、導入された染色体上の位置により転写が影響を受ける position effect (Matzke and Matzke, 1998)、他方が転写後のサイレンシングである PTGS (post transcriptional gene silencing) である (Grant, 1999; Vaucheret et al., 1998)。PTGS は植物細胞で顕著に認められ、核内での転写活性に変化を生じることなく、細胞質で特定の RNA が急速に分解される現象である。これは免疫系を持たない植物が、ウィルスに対抗するために進化させた防御機構の一種と考えられている (Ratcliff et al., 1997)。精力的な研究の結果、現在では主に 3 つのモデルが提唱されている。Threshold モデルでは、細胞内 RNA 量には固有の上限値があるとするもので、この値を超えることが引きがねとなり特異的な

RNA の分解が生じる(Dehio and Schell, 1994; Smith et al., 1994)。次に aberrant RNA モデルでは、不完全な RNA が生成することにより、特異的な分解が生じる(Metzlaff et al., 1997; Schiebel et al., 1998)。最後は、宿主と相溶性のある遺伝子を導入した際に生じるサイレンシングで、特にコサプレッションと呼ばれている(van Blokland et al., 1994)。近年では PTGS に対して一部のウィルスが抵抗手段を持つことが示され、それに関与するタンパク質因子 P1/HC-pro (P1 and helper component-proteinase) が報告された。そしてこの戦略を利用し P1/HC-pro を植物体内で蓄積させることによって、PTGS が抑制されることが示された(Kasschau and Carrington, 1998)。このため、PTGS の抑制技術については、ヒントが見い出された状況と言える。

一方、position effect に関しては植物細胞での研究は乏しく、抑制技術を確立するには知見不足であることが否めない。植物細胞に外来遺伝子を導入するには、アグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法などがあるが、いずれも染色体上にランダムに挿入される。このため得られた形質転換体の個体間における外来遺伝子の発現が大きく異なることは、染色体構造は一様ではなく、遺伝子発現に対して影響を与えうることを意味している。したがって position effect を抑制し、外来遺伝子の発現を安定化させるためには、染色体構造が遺伝子発現に与える影響を理解することが肝要である。染色体は遺伝情報の伝達媒体としては最も大きく、最もよく観察することができる。しかしより大きい構造物の理解は困難であり、最も小さく基本的な構造単位の理解が先行している。その基本構造単位は、ヌクレオソームコアと呼ばれており、146 bp の DNA がヒストンオクタマーを 1.75 周巻く構造をとる。ヒストンオクタマーは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子から構成される。これらのヒストンは N 末端塩基性ドメインと C 末端球状ドメインより成り、後者はヒストンフォールドと呼ばれる共通の構造をとり、このドメインを介してヒストンオクタマー、さらにはヌクレオソームコアを形成する。そしてさらに未知の様々な因子群と相互作用して次々に高次な構造をとり、最終的な高次複合体産物が染色体となる。この構造は、長大な染色体 DNA を核内に収納するために必須であるとともに、DNA の複製、再構成、組み換え等、核内で起こるすべての諸現象にも大きく関わっている。このような染色体構造は、遺伝子発現に対してどのような影響を与えるのであろうか。これまでの知見から、裸の DNA の転写活性を 1 とすると、ヌクレオソーム構造形成により転写活性は 1/50 に低下し、さらに遺伝子発現が不活性化状態であるヘテロクロマチン構造の形成により 1/2,500 まで低下すると言われており、転写因子や基本転写装置等のタンパク質因子の DNA への接近が困難になるためと考えられている(Bird and

Wolffe, 1999)。一方、遺伝子発現が活性化状態であるユウクロマチン構造では、裸の DNA の転写活性を大幅に上回ることから、転写に対して効率的な DNA-ヌクレオソーム構造が存在することがわかる。

position effect の抑制には、外来遺伝子を周辺の染色体環境から独立させることが必須と考えられる。これまで植物細胞では上述の目的を達成するため MAR (matrix attachment region) を用いた研究が行われてきた(Holmes-Davis and Comai, 1998)。MAR は核膜と結合することにより、隣接した染色体環境から独立性を保証する DNA 配列であり、一種の染色体上の境界領域として機能すると考えられている。このためレポーター遺伝子の前後に MAR を付加し、染色体上に導入した形質転換体について解析が行われてきた。それらの解析結果を表 1-1 にまとめた(Allen et al., 1996; Allen et al., 1993; Breyne et al., 1992; Holmes-Davis and Comai, 1998; Mlynarova et al., 1994)。

表1-1 MARによるposition effectの抑制

Source of MARs	Promoter	Transgenic line number	copy number	copy number- dependent expression	Increase in level of expression
1) Soybean	nos	60	ND	ND	No
2) Human	nos	60	ND	ND	YES
3) Yeast	CaMV35S	30	18-160	NO	24-fold
4) Chicken	Lhca	46	1-3	NO	4-fold
5) Bean	β -phaseolin	20	1-2	YES	1.5-fold
6) Chicken	CaMV35S	60	1-3	NO	2-fold
7) Tobacco	CaMV35S	16	1-31	NO	140-fold
8) Tomato	HSC80	11-32	ND	NO	YES

ND : not determined.

MAR が染色体上の境界として機能するならば、外来遺伝子の発現が position effect から保護され、コピー数に依存した発現が認められるはずである。しかし異なる MAR およびプロモーターによる解析結果は統一性が乏しく、抑制技術の確立には到っていないのが現状である。一方 MAR とは異なる染色体上の境界領域としてインスレーターが報告されている。インスレーターは、ショウジョウバエの熱ショック *hsp70* (heat shock protein 70) 遺伝子の研究により見い出された。*hsp70* 遺伝子は、scs 及び scs' (specialized chromatin structure) と呼ばれる DNaseI 高感受性領域によって挟まれた構造をとっている。scs-scs' を欠失させると、非熱ショック下においても *hsp70* 遺伝子が発現することから、これらの領域が周辺の影響から *hsp70* 遺伝子を保護している可能性が示唆された。さらに、これらの領域を遺伝子の両側に付加し染色体上へランダムに導入しても position effect を受けないことが示され、外来遺伝子を周辺の影響から保護できることが明らかとなった(Kellum and Schedl, 1991)。このような活性を持

つ DNA 断片は、絶縁体の意味からインスレーターと名付けられ、染色体上の境界領域として機能すると考えられている。これまでにショウジョウバエをはじめ、ヒト、ニワトリなど主に動物細胞から単離されている(Udvardy, 1999)。しかも興味深いことにニワトリ β -globin インスレーターが、他生物種であるヒト erythroid 細胞およびショウジョウバエにおいても機能することが報告され、高度に保存された機構の上に成り立っている可能性も示唆されている(Chung et al., 1993)。

本研究では、「植物細胞において効率良く外来遺伝子を発現させる技術の確立」を目指し、1) 有用プロモーターの単離、2) position effect の抑制、の両局面から解析を行った。

第 1 章では、1) 有用プロモーターの単離について述べた。プロモーターの単離・解析は頻繁に行われるところであるが、遺伝子発現系への利用を念頭に置いた研究例は少ない。そこで本研究では遺伝子発現系へ利用しうる有用プロモーターの単離を行い、発現時期、部位および量など多様な要求に対するプロモーターの選択肢の一つとなることを目的とした。単離するプロモーターの発現様式として、対数増殖期または細胞増殖停止期の細胞に発現する、の二つのカテゴリーを選択した。解析宿主としては、植物体から増殖各期の細胞を得ることが困難であるため、タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2) を選択した。単離の概念としては、各期に多量に発現している内在性遺伝子は期待される発現を示すプロモーターを有している可能性があると考え、まず高発現遺伝子の単離を行った。つぎにこれら対象遺伝子のプロモーター領域の単離を行った結果、各期のプロモーターが各 2 種、合計 4 種単離された。これらのプロモーターは、レポーター遺伝子を用いた解析から期待された発現様式を示した。これらの結果から、対数増殖期または細胞増殖停止期の細胞に発現する有用プロモーターが単離された。

第 2 章では、2) position effect の抑制について述べた。上述したように position effect を抑制するためには、周辺の転写環境の影響を遮断することが必要である。このため我々は近年ウニから単離され、他生物種であるショウジョウバエにおいても機能することが報告された *Ars* インスレーターに着目した(Akasaka et al., 1999)。解析宿主としては、多数の形質転換体が取得でき、かつ同一条件下で解析できることが必要であることから、タバコ BY2 細胞を選択した。レポーター遺伝子に *Ars* インスレーターを付加して染色体上に導入した形質転換体について発現を解析したところ、遺伝子発現の不活性化が抑制された。これらの結果は、インスレーターが植物細胞において外来遺伝子の発現安定化に寄与することを初めて示したもので、position effect 抑制技術の確立に一石を

投じる知見である。

第3章では、第1章において単離した *NtADH* (*Nicotiana tabacum alcohol dehydrogenase*) プロモーターの下流に連結したレポーター遺伝子の発現を安定化させる結果が、position effect を抑制することに起因すると考え解析を行った。その結果、*NtADH* プロモーターには、発現の安定化に寄与する機能領域が存在することを示した。

本研究で得られた基礎的知見は、タバコ BY2 細胞における遺伝子発現系の構築に直接的に反映されるだけに留まらず、植物体における遺伝子発現系の構築にも有益な示唆を与えるものと考えられた。

第1章 タバコ BY2 細胞から有用プロモーターの単離

第1節 緒言

外来遺伝子発現系へ利用しうる有用プロモーターの単離を行った。試みとしてタバコ BY2 細胞の対数増殖期または細胞増殖停止期に高発現している遺伝子を単離し、それらが保有すると考えられるプロモーターを単離した。次にレポーター遺伝子を用いた解析を行い、植物細胞で汎用されるウィルス由来の CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S プロモーター(Benfey et al., 1990)と比較・検討を行った。

第2節 実験材料および実験方法

使用菌株

Escherichia coli

DH5 α . *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.
プラスミド cDNA ライブラリーの宿主として用いた。また全ての遺伝子の構築の宿主として用いた。

XL1-Blue MRA(P2) Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *recA1*, *lac* (P2 lysogen)。ファージゲノムライブラリーの宿主として用いた。

Agrobacterium tumefaciens

EHA105。タバコ BY2 細胞の形質転換に用いた。

使用植物

Nicotiana tabacum L.cv. Bright Yellow 2(Nagata, 1987)。

ベクター

pBluescriptII SK-(Short et al., 1988)。amp^r, *lacZ*。

pBI101.2(Bevan, 1984)。km^r, promoter-less β -glucuronidase (GUS) cassette in the *Agrobacterium* binary vector。

培地

大腸菌およびアグロバクテリウムの培養には、LB 培地 (1% tryptone、0.5% yeast extract、0.5% NaCl) を使用した。平板培地には、1.5%の精製寒天末を加えた。必要に応じて、アンピシリン 100 mg/l、カナマイシン 100 mg/l を加えた。

タバコ BY2 細胞の培養には、改変 LS 培地を用いた(Nagata, 1987)。平板培地には、0.3%の gellan-gum を加えた。必要に応じて、カナマイシン 100 mg/l、カルベニシリン 250 mg/l を加えた。またプロトプラスト化したタバコ BY2 細胞の培養には、上記培地の sucrose 濃度を 1%とし、浸透圧調節のために mannitol を終濃度 0.4 M として使用した。

タバコ BY2 細胞の RNA の調製

植物組織の RNA 分離の方法に従った(Logemann et al., 1987)。

タバコ BY2 細胞のゲノム DNA の調製

CTAB 法により行った(Murry and Thompson, 1980)。

大腸菌からプラスミド DNA の調製

アルカリ SDS 法により行った。

タバコ BY2 細胞の cDNA ライブラリーの作成

pT7T3D (Pharmacia)、Uni-ZAPTM XR アームベクター (Stratagene) を用いた。

タバコ BY2 細胞のゲノムライブラリーの作成

EMBL3/BamHI ベクター (Stratagene) を用いた。

ノザンハイブリダイゼーション

標準的な方法に従った(Church and Gilbert, 1984)。

サザンハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション溶液に 50% dextran sulfate 溶液を終濃度 10%になるように加えて行った。

β -glucuronidase (GUS) 活性測定

Jefferson らの方法により行った(Jefferson et al., 1987)。GUS lysis buffer (10 mM EDTA、0.1% TritonX-100、0.1% Sarcosyl、10 mM β -mercaptoethanol、50 mM Na-

phosphate buffer, pH7.0) 中で細胞を破碎した。遠心した後、上清を粗酵素液とした。得られた粗酵素液中のタンパク質 1 mg が 1 分間に基質 4MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) を分解し、反応生成物 4-MU (4-methylumbelliferone) の量 (pmol) を GUS 比活性 (pmol/min/mg protein) とした。

タバコ BY2 細胞における一過性発現実験

改変 LS 培地で 4 日間培養したタバコ BY2 細胞を酵素液 (0.1% pectlyase, 1% cellulase, 0.4 M mannitol, pH 5.5) により処理しプロトプラスト化した。 3×10^6 個の細胞に対し、DNA 10 μ g をエレクトロポレーション (BIO-RAD) により 200V, 250 μ F, 400resistance の条件下で導入し、24 時間後に活性測定を行った。

形質転換 BY2 細胞における安定性発現実験

An の方法により行った (An, 1985)。形質転換後、カナマイシン耐性カルスを液体培養し、 β -glucuronidase (GUS) 活性測定を行った。

第 3 節 結 果

第 1 項 タバコ BY2 細胞の対数増殖期または細胞増殖停止期に高発現する遺伝子の単離

対数増殖期に高発現する遺伝子の cDNA の単離は、次のように行った。改変 LS 培地にて培養 3 日目の対数増殖期のタバコ BY2 細胞から mRNA を調製し、大腸菌宿主のプラスミド cDNA ライブラリーを pT7T3D ベクターを用いて作製した。候補遺伝子を単離するため、ライブラリー作製時に用いた全 mRNA を鋳型に α - 32 P-dCTP で標識した一本鎖 cDNA プロブを作製した。cDNA を保持する大腸菌ライブラリー 1,000 クローンについて、コロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。蓄積 mRNA 量がシグナルの強弱に反映される考え、強いシグナルを有するクローンを選択した。一次スクリーニングで得られた 50 クローンについて、ノザン・サザンハイブリダイゼーションを行い、蓄積 mRNA 量が多く、染色体上のコピー数が少ない 3 種の候補遺伝子の cDNA を得た。

細胞増殖停止期に高発現する遺伝子の単離は、次のように行った。改変 LS 培地にて培養 7 日目の細胞増殖停止期のタバコ BY2 細胞から mRNA を調製し、Uni-ZAPTM XR アームベクターを用いてファージ cDNA ライブラリーを作

製した。細胞増殖期と細胞増殖停止期の全 mRNA を用い、 α - ^{32}P -dCTP で標識した一本鎖 cDNA プローブを作製して、ディファレンシャルスクリーニングを行い、細胞増殖停止期にシグナルが増加する 3 つの候補遺伝子の cDNA を得た。

スクリーニングの結果、対数増殖期または細胞増殖停止期に高発現する候補遺伝子の cDNA が各々 3 種類単離された。cDNA をプローブとしたノザンハイブリダイゼーションの結果、対数増殖期に高発現する遺伝子として単離された遺伝子 27、29、38 は対数増殖期に強く発現していた。また細胞増殖停止期に高発現する遺伝子として単離された遺伝子 12、18、28 は、増殖期に比べて増殖停止期に強く発現することが明らかとなった (図 1-1)。

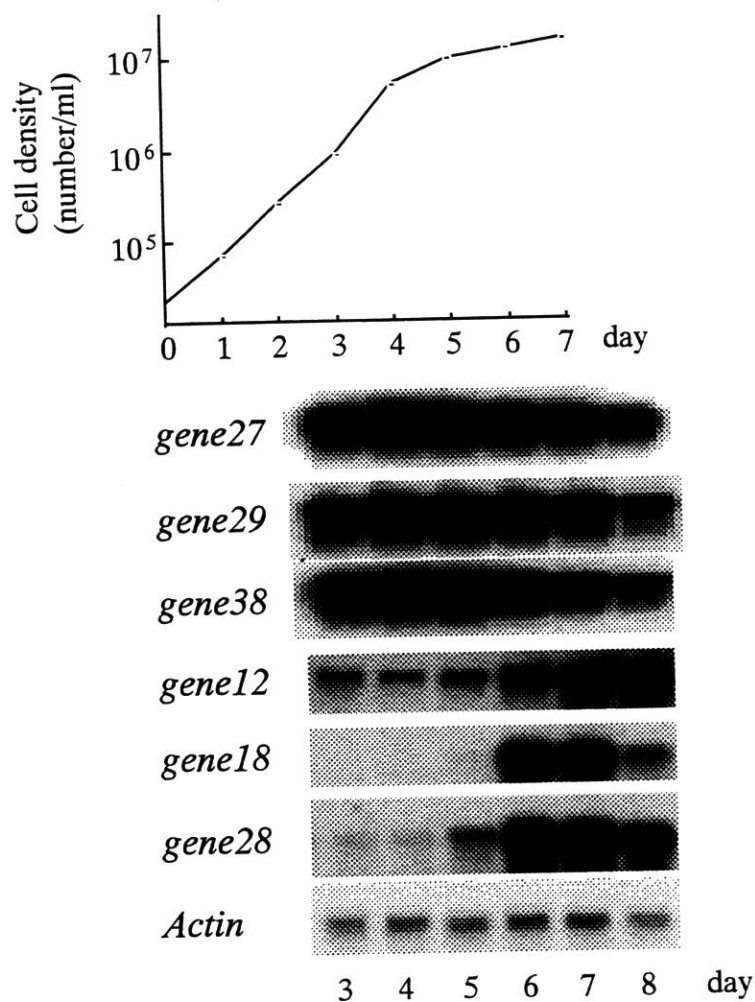


図1-1 各候補遺伝子の発現

タバコBY2細胞の培養3~8日目の全RNA 5 μg について、各候補遺伝子のcDNAをプローブとしたノザンハイブリダイゼーションを行った。レーン番号は培養日数を示している。対照として培養の各期を通じて一定に発現する*Actin*を用いた。グラフはタバコBY2細胞の増殖曲線を示している。

次に各候補遺伝子の塩基配列を決定し、相同性検索を行った（表 1-2）。その結果、遺伝子 27 は機能未知の遺伝子であった。

表1-2 各候補遺伝子の相同性検索

遺伝子番号	相同遺伝子	相同性	遺伝子記号
<i>gene27</i> : <i>Arabidopsis</i> cDNA clone 108C1T7		84%	<i>Nt108</i>
<i>gene29</i> : sweet potato F ₁ -ATPase δ -subunit		79%	<i>NtATPD</i>
<i>gene38</i> : tobacco elongation factor 1- α		92%	-----
<i>gene12</i> : tobacco extensin		90%	-----
<i>gene18</i> : tobacco alcohol dehydrogenase		67%	<i>NtADH</i>
<i>gene28</i> : tomato pectin esterase		70%	<i>NtPES</i>

Blast searchにより、塩基配列の相同性検索を行った。遺伝子番号: 単離したcDNAの番号、相同遺伝子: 最も高い相同性を示した遺伝子名、相同性: 塩基配列の相同性、遺伝子記号: 後の解析で用いた記号。また——は、本研究では未解析であることを示す。

第2項 候補遺伝子のプロモーター領域の単離

各候補遺伝子の cDNA の 5'上流領域の DNA 断片を取得するため、各 cDNA の 5'末端領域をプローブとして約 100 万個のタバコ BY2 細胞のファージゲノムライブラリーをスクリーニングした。その結果、プローブとした cDNA の 5'上流領域の DNA 断片が、対数増殖期に高発現する遺伝子 27 (*Nt108*) については約 1 kb、29 (*NtATPD*) については約 1.5 kb 取得した。また細胞増殖停止期に高発現する遺伝子 18 (*NtADH*) については約 2.5 kb、28 (*NtPES*) については約 1.8 kb の 5'上流領域の DNA 断片を取得した。

第3項 候補プロモーターの発現解析

得られた DNA 断片が転写活性を有するか調べるため、pBI101.2 をベクターとして各融合遺伝子を構築した (図 1-2)。

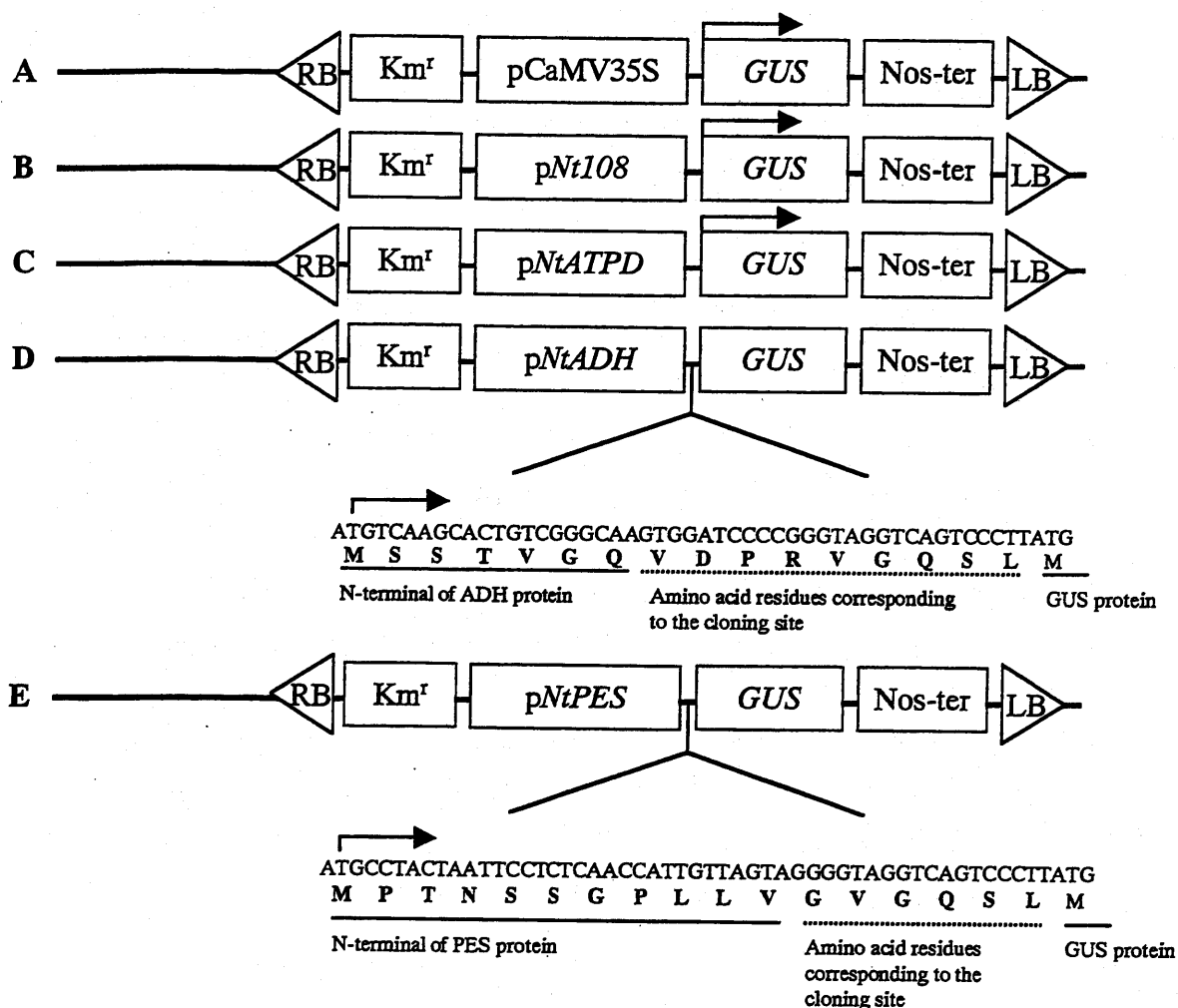


図1-2 各融合遺伝子の構築図

矢印は、翻訳開始点を示す。A～Cは、*GUS*遺伝子のATGから翻訳される。DおよびEは、*GUS*タンパク質のN末端に、それぞれのタンパク質のN末端の数アミノ酸残基およびクローニング部位由来の残基が付加されている。 km^r : *NPTII*遺伝子、*GUS*: β -glucuronidase遺伝子、Nos-ter: nopaline synthase terminator, RB: right border, LB: left border。

次にプロトプラスト BY2 細胞を用いた一過性発現実験を行った (表 1-3)。

表1-3 各融合遺伝子の一過性発現

Constructs	GUS specific activity (pmol/min/mg protein)
pCaMV35S-GUS	54.5 ± 7.7
pNt108-GUS	115 ± 24.1
pNtATPD-GUS	46.5 ± 2.4
pNtADH-GUS	7,720 ± 1,450
pNtPES-GUS	570 ± 2.4

培養4日目のタバコBY2細胞をプロトプラスト化した。エレクトロポレーションにより各融合遺伝子を導入し、24 時間後にGUS活性測定を行った。各4回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

対照として用いた pCaMV35S-GUS 遺伝子と比べて、pNt108-GUS 遺伝子は約 2 倍、pNtATPD-GUS 遺伝子は同程度の GUS 活性を示した。また pNtADH-GUS 遺伝子では約 140 倍、pNtPES-GUS 遺伝子では約 10 倍であった。

一過性発現実験において転写活性が認められたことから、次に各融合遺伝子をタバコ BY2 細胞の染色体上へ導入し、形質転換体を取得した。形質転換体の GUS 活性は、個体間で大きく異なるため各融合遺伝子につき独立した 2 個体を取得し、培養経過による GUS 活性の動態を解析するため、液体培養 3 日目と 7 日目の GUS 活性の測定を行った (表 1-4)。

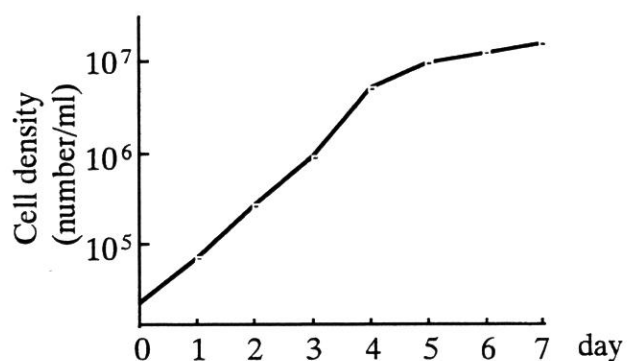
表1-4 各融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞のGUS活性

Transformants	GUS specific activity (pmol/min/mg protein)	
	3 d-old	7 d-old
pCaMV35S- <i>GUS</i> - 1	4,640 ± 722	4,870 ± 1,050
- 2	490 ± 10	463 ± 58
p <i>Nt108-GUS</i> - 1	133,300 ± 11,600	84,300 ± 5,690
- 2	99,700 ± 11,200	104,000 ± 10,000
p <i>NtATPD-GUS</i> - 1	7,870 ± 378	6,670 ± 152
- 2	4,570 ± 152	4,970 ± 57
p <i>NtADH-GUS</i> - 1	28,300 ± 1,170	282,000 ± 30,200
- 2	98,100 ± 9,360	178,000 ± 35,200
p <i>NtPES-GUS</i> - 1	16,000 ± 950	173,000 ± 11,500
- 2	6,500 ± 1,180	36,700 ± 2,520

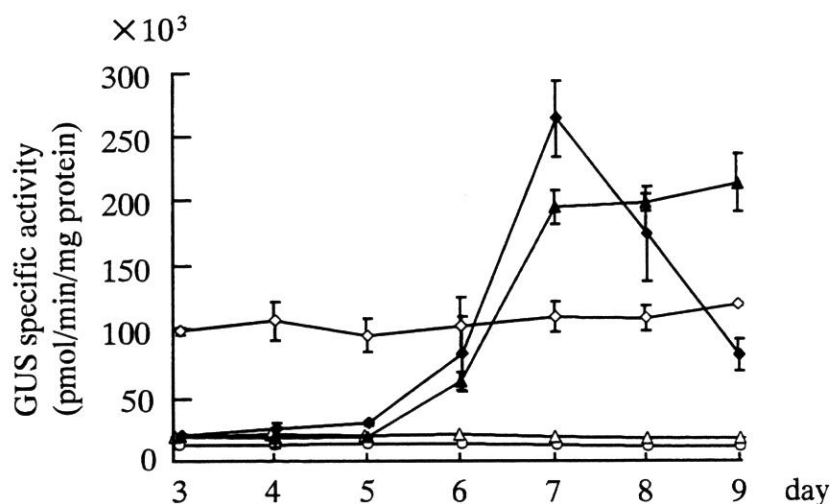
独立した2個体の培養3および7日目のGUS活性測定を行った。
各3回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

その結果、p*Nt108-GUS* 遺伝子および p*NtATPD-GUS* 遺伝子は、3日目と7日目のGUS活性は同程度であった。また p*NtADH-GUS* 遺伝子および p*NtPES-GUS* 遺伝子は、細胞増殖停止期である7日目に発現が上昇した。この結果は、培養経過中の各遺伝子のmRNAの蓄積量と一致していた(図1-1)。次に、培養3~9日目までのGUS活性の経時変化およびGUS遺伝子をプローブとしたノザンハイブリダイゼーションを行った(図1-3)。なお解析には、表1-4の独立した2個体の形質転換体のうち、-1の個体を用いた。

(A)



(B)



(C)

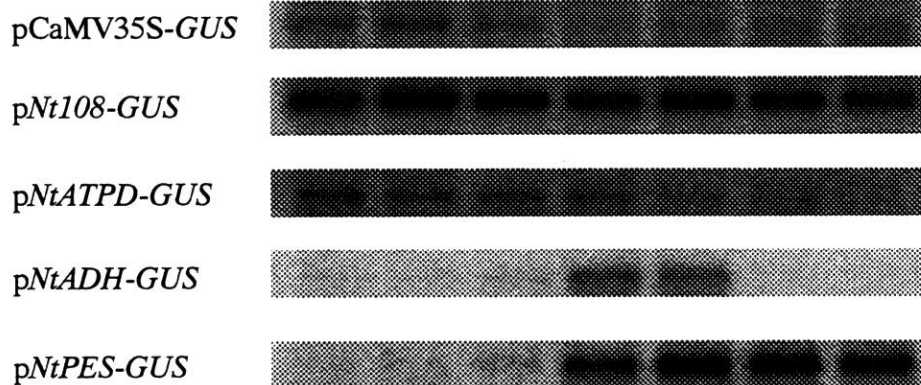


図1-3 形質転換BY2細胞のGUS活性およびmRNAの蓄積の経時変化

(A) タバコBY2細胞の増殖曲線。

(B) 各融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞のGUS活性の経時変化を測定した。各3回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

—○—, pCaMV35S-GUS; —◇—, pNt108-GUS; —△—, pNtATPD-GUS;
—◆—, pNtADH-GUS; —▲—, pNtPES-GUS.

(C) GUS遺伝子をプローブとして、ノザンハイブリダイゼーションを行った。各レーンには、全RNA 5 μ gを用いた。

対照として用いた pCaMV35S-*GUS* 遺伝子と比べて、p*Nt108-GUS* 遺伝子は約 20 倍、p*NtATPD-GUS* 遺伝子は同程度であった。また p*NtADH-GUS* 遺伝子および p*NtPES-GUS* 遺伝子は培養後期の *GUS* 活性増加時には、それぞれ対照の約 50 倍、約 40 倍であった。また p*NtADH-GUS* 遺伝子は培養 6 および 7 日目に *GUS*mRNA が蓄積し、7 日目の *GUS* 活性値は約 280 nmol/min/mg protein であった。一方それと比較して、p*Nt108-GUS* 遺伝子および p*NtPES-GUS* 遺伝子の *GUS*mRNA は多量に蓄積していたが、*GUS* 活性は低い値を示した。このため p*NtADH-GUS* 遺伝子から転写された mRNA は、他の融合遺伝子由来の mRNA よりも効率良く *GUS* タンパク質へ翻訳される可能性が示唆された。p*NtADH-GUS* 遺伝子は、*GUS* 遺伝子に *ADH* 遺伝子の cDNA の開始コドンを含む 5'末端領域が付加されているため融合タンパク質が生産される。この 5'末端領域が *GUS* タンパク質への翻訳に影響を与えるか調べるため、CaMV35S プロモーターの下流に 5'末端領域が付加された *GUS* 遺伝子を連結し、一過性発現実験を行った (図 1-4)。その結果、対照とした pCaMV35S-*GUS* 遺伝子の約 10 倍の *GUS* 活性値を示した。このため *ADH* 遺伝子の cDNA の 5'末端領域が *GUS* タンパク質への翻訳効率に影響を与える可能性が考えられた。

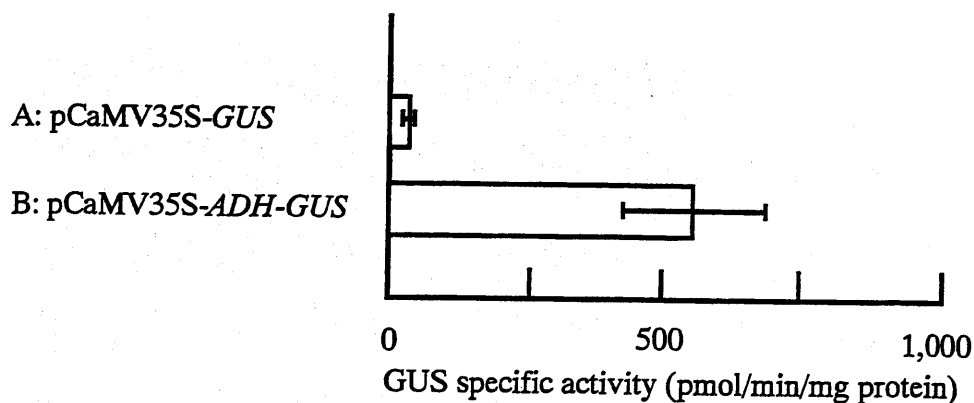


図1-4 *ADH*遺伝子のcDNAの5'末端領域が*GUS*タンパク質の生産に与える影響
プロトプラストBY2細胞に各融合遺伝子を導入し、24時間後に*GUS*活性測定を行った。
各3回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

第四節 考 察

4 種の内在性プロモーターを単離した。各プロモーター-*GUS* 遺伝子を導入した形質転換 BY2 細胞の解析から、特徴的な発現様式を示し、対照とした CaMV35S プロモーターに匹敵する転写活性を有していた (図 1-3)。このため単離したプロモーターは、外来遺伝子発現系に利用しうる有用プロモーターであると考えられた。なお形質転換体の *GUS* 活性は個体間で大きく変動するが、対照として用いた pCaMV35S-*GUS* 遺伝子を導入した形質転換体は、平均的な活性を示す個体である。

また 4 種のプロモーターのうち *NtADH*、*NtPES* プロモーターは、細胞増殖停止期に発現が増加し、その発現制御機構は興味深い (図 1-3B、C)。*NtADH* 遺伝子は、これまでに報告されているタバコ *ADH* 遺伝子との相同性が 67 % であり、異なる遺伝子であると考えられる (表 1-2)。*ADH* 遺伝子の解析はシロイヌナズナやトウモロコシで詳細に行われ、嫌気条件による誘導およびそれに関するシス配列 ARE (anaerobic response element) や結合タンパク質因子が報告されている (DeLisle and Ferl, 1990; Dolferus et al., 1994; Kyozuka et al., 1994)。しかし我々が単離した *NtADH* プロモーター内には ARE 配列が存在しなかった。タバコ BY2 細胞の培養後期には、細胞濃度が 30~50 g (dry weight) / l となり、かなりの高濃度となる。このため溶存酸素濃度の低下が予想されるが、嫌気的条件も含め、どのような因子に応答するのか解析する必要がある。また *NtPES* 遺伝子は、細胞壁酵素の一種であると考えられているが、細胞増殖停止期に高発現している理由は不明である。今回単離されたプロモーターについてシスエレメントや制御因子の解析が進めば、人為的な on-off 制御系への利用の可能性が開ける。

今回の解析から目的タンパク質の生産には、転写制御以外にも重要な要素が示された。図 1-4 の結果から、*GUS* 遺伝子に *ADH* 遺伝子の cDNA の 5' 末端領域を付加することで、プロモーターが同一であるにもかかわらず *GUS* 活性値が約 10 倍増加した。可能性としては、翻訳効率の向上の他に、融合タンパク質の比活性や安定性の増加が挙げられる。しかしウエスタン解析によりタンパク質量が約 10 倍増加していることから、比活性の増加によるものではないと予想される。また *GUS* タンパク質は元来安定であることから、さらに飛躍的に安定化するとも考えにくい。これ以上の解析を行っていないため断定できないが、付加した 5' 末端領域により翻訳効率が向上したと考えるのが妥当ではないだろうか。プロモーターの選択により、転写量を 10 倍にすることは容易ではない。また、植物細胞に特有の過剰量の mRNA が起因となる PTGS も知

られており、mRNA の蓄積量をあまりに増加させるのは得策ではない。このように目的タンパク質の生産には、より効率良く翻訳させることも重要であることが示された。

一過性発現実験と形質転換体を用いた安定性発現実験の GUS 活性値に大きな隔たりが認められた。これは一過性発現実験では細胞壁を消化し、プロトプラスト化したタバコ BY2 細胞を用いている。このため、両者の活性値の異なりは、細胞の置かれている状況に起因すると考えられた。一過性発現実験において *pNtADH-GUS* 遺伝子は、*pCaMV35S-GUS* 遺伝子の 140 倍という非常に高い GUS 活性値を示した。さらにウエスタン解析においても *pCaMV35S-GUS* 遺伝子では GUS タンパク質の検出は不可能であるが、*pNtADH-GUS* 遺伝子では検出可能であった (data not shown)。植物細胞に他生物種のタンパク質を発現させる場合、数ヶ月に及んで形質転換体を作製しその解析により生産の有無を確認している。しかし *NtADH* プロモーターによる一過性発現系を用いれば、目的タンパク質の生産の有無がウエスタン解析により確認できることから飛躍的な時間短縮が期待できる。

本研究により単離された 4 種の有用プロモーターは、タバコ BY2 細胞における外来遺伝子発現系には直接的に貢献できると考えられる。今後は植物体にも利用可能であり、新たなプロモーターの選択肢の一つと成りえるか解析する必要がある。

また今回有用プロモーターが取得されたことから、用いた単離法が有効であることが示された。今後は種々の目的に応じたプロモーターの取得に利用可能であろう。

第2章 インスレーターを用いた外来遺伝子発現の安定化

第1節 緒言

真核生物の染色体は、遺伝子発現が活性化状態であるユウクロマチン構造と不活性化状態であるヘテロクロマチン構造が混在している(Pardue and Hennig, 1990)。これらの転写に関して対極ともいえる構造は、ヒストンのアセチル化や DNA のメチル化および DNaseI 感受性に顕著な異なりが認められる。ヒストンのアセチル化は、コアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) の N 末端テイル内の進化上よく保存されている特定のリジン残基がアセチル化される現象である(Brownell and Allis, 1996; Turner and O'Neill, 1995)。ヒストンのアセチル化は可逆的な反応であり、*in vivo* で HAT (histone acetyltransferase) と HDAC (histone deacetylase) とのバランスによって制御されている(Hong et al., 1993)。ヌクレオソーム中のヒストンがアセチル化されるとヒストンの正電荷が中和され、負電荷を持つ DNA との親和性が減少し、弛緩した構造となって転写が起こりやすくなると考えられる。この構造を呈する DNA は DNaseI により容易に消化されることから DNaseI 高感受性状態と呼ばれ、遺伝子発現が活性化状態である指標とされている。また反対に脱アセチル化されると転写が起こりにくくなると考えられ、この構造は DNaseI に非感受性である。DNA のメチル化は DNA methylase により行われ、動物細胞では C (シトシン) G (グアニン) 配列のシトシンだけがメチル化される(Tasheva and Roufa, 1994)。また植物細胞ではこれに加え、CNG (N は A, C, G, T のいずれか) 配列のシトシンもメチル化されるため、動物細胞に比べ多様性が認められる(Finnegan et al., 1996)。シトシンのメチル化による転写に対する直接的な影響は、メチル基が物理的な障害となり転写因子等の DNA への結合が困難になることが挙げられる。例えばヒトにおいて同定された転写因子の認識配列の多くに CG 配列が含まれており、methyl-CpG 配列となることにより、結合能の低下や消失が確認されている(Bird and Wolffe, 1999)。また methyl-CpG 配列結合タンパク質が同定され、HDAC と結合することが示された。このため、DNA のメチル化が HDAC をリクルートしヒストンの脱アセチル化を介して転写抑制を行う図式が提唱されている(Razin, 1998)。このようにユウクロマチン構造とヘテロクロマチン構造は明らかに異なっているが、近年酵母において ATP 存在下で SWI/SNF (switch/sucrose non fermentation) ファミリー等が染色体構造の変換を担うことが見いだされ、これらはヌクレオソームリモデリング因子と呼ばれている(Kingston and Narlikar,

1999)。長大な染色体を核内に納めるためには凝縮した構造をとる必要があるが、一方では様々な状況に迅速に対応してその構造を弛緩し遺伝子発現を行う環境を作り出すことが必要である。このため、ヌクレオソームリモデリング因子がこのような機能を果たすと考えられていた。ところが酵母の解析では、SWI/SNFの変異により全遺伝子のわずか 6%にしか変化が生じず、さらに驚くべきことにそれらの遺伝子の多くが SWI/SNF により負に制御されていた(Holstege et al., 1998)。現在では SWI/SNF が腫瘍抑制遺伝子である Rb (retinoblastoma) と結合することや、ヒトにおける類似のリモデリング因子も HDAC を含むことが示され、遺伝子発現の抑制に関与する知見が蓄積している(Kingston and Narlikar, 1999; Muchardt and Yaniv, 1999)。従ってつぎの仮説が考えられている。ヌクレオソームリモデリング因子による染色体構造変化は、当初予想された不活性型から活性化型への移行のみを触媒するのではなく、逆への移行もあり得る可逆的な変化である。染色体構造の活性化型もしくは不活性型の位相を決定しているのは、つぎにリクルートされる因子に依存する。つまり構造変化に方向性はなく、異なる構造への変化をヌクレオソームリモデリング因子が触媒する。そしてヌクレオソーム構造が弛緩した状態を形成し、次のリクルートされる因子であろう HAT または HDAC の反応がより効率良く行われる。HAT がリクルートされた場合には、ヒストンのアセチル化や転写因子および基本転写装置により活性化型構造が固定される。一方 HDAC がリクルートされた場合には、ヒストンの脱アセチル化、DNA-ヒストンの親和性増加およびヒストン-ヒストン相互作用の強化により、不活性型構造が固定される。いまのところ仮説の範疇ではあるが、これが染色体構造変化に関与するヒストンのアセチル化とヌクレオソームリモデリング因子の作用機構と考えられている(Kingston and Narlikar, 1999)。

染色体 DNA に上述の因子が作用し、ユウクロマチン構造やヘテロクロマチン構造が形成される。これらの異なる構造を呈する領域が染色体上に混在して存在しているのは、種々の因子の拮抗した結果の産物なのだろうか。それとも何らかの機構によりその領域は規定されているのだろうか。近年パン酵母の HM 座に存在するサイレンサー E および I に SIR (silent information regulator) タンパク質が結合し、ヘテロクロマチン構造が形成され遺伝子発現が抑制されることが示された(Braunstein et al., 1996; Hecht et al., 1995)。しかもその構造が隣り合う染色体にも伝搬することが示された(Loo and Rine, 1994; Singh and Klar, 1992)。またショウジョウバエでも類似の現象が認められ、PRE (polycomb response element) 配列を認識する *polycomb* 遺伝子群がヘテロクロマチン構造を形成し、さらに伝搬することが示された(Pirrotta, 1997)。ヘテロクロマチン構造が無制限に伝搬することは秩序ある遺伝子発現制御にとっては大きな問題である。しか

し実際には、無制限に伝搬することはなく構造上の境界領域が存在することが明らかとなった。この境界領域はインスレーターと呼ばれ、ユウクロマチン構造とヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制できると考えられている。インスレーターは染色体上の境界と成りえることから、その配列に挟まれた領域は染色体構造による影響を受けないと予想される。実際最初に単離された scs-scs' インスレーターは、position effect を抑制する活性を示した(Kellum and Schedl, 1991)。このようにインスレーターは、ユウクロマチン構造またはヘテロクロマチン構造の両者の影響を抑制する活性を持ち、それに挟まれた領域の発現は正にも負にも影響を受けないと考えられている (図 2-1)。

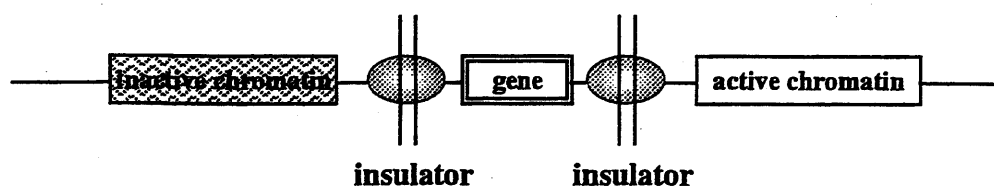


図2-1 インスレーターによる position effect 抑制
インスレーターが染色体の境界領域として機能することにより、
周辺の染色体構造が転写に与える影響を抑制する。

インスレーターは染色体の境界領域として機能する他に、もう一つ存在意義があると考えられている。遺伝子発現制御には、転写開始点から 5' 上流数 kb のプロモーター領域に存在するシスエレメントが重要な役割を担っている。これらのエレメントは数塩基からなり、遺伝子に対して一定の方向性および距離を有している。しかし高等真核生物では、エンハンサーと呼ばれるエレメントが別に存在し、遺伝子発現制御に多様性を持たせている。これらは、プロモーター領域内のシスエレメントと異なり、遺伝子内のエキソン、イントロンや 5' 上流、3' 下流に存在し、その長さも数 kb に達するなど多岐に渡っている。さらに、その方向性や距離に関係なく影響を与えることができる。ショウジョウバエを例にとると、25~50 kb 離れても機能することがある。真核生物の染色体は長大であり、遺伝子が存在しない DNA 領域が圧倒的な割合を占めることから、容易には隣接する遺伝子へ影響を与えることはないが、50 kb にも渡り影響を与える場合には、無視できない問題となる。ところが、実際の染色体上では、近接する遺伝子に対して選択的に影響を与えていることから、その影響力を限定する何らかの機構の存在が示唆されており、現在ではインスレーターが影響力を限定する機構の一つを担っているだろうと考えられている。この機構については、ショウジョウバエの *gypsy* インスレーターがもっとも解析が進

んでおり図 2-2 に示した。ショウジョウバエの *yellow* 遺伝子の 5' 上流には複数のエンハンサーが存在し、エンハンサーとプロモーター間に *gypsy* インスレーターが位置すると、インスレーターとプロモーター間にあるエンハンサーは機能するが、インスレーターよりも遠位にあるエンハンサーは遮断される (図 2-2A) (Corces and Geyer, 1991)。このようにインスレーターは、方向性のあるエンハンサー遮断活性を有し、染色体上でエンハンサーの影響力を限定していると考えられている。*gypsy* インスレーター配列には *su* (Hw) (suppressor of Hairy wing) タンパク質の結合配列が連続して存在しており、エンハンサー遮断は、*su* (Hw) タンパク質だけで引き起こされる。しかし方向性のあるエンハンサー遮断には、*su* (Hw) タンパク質に結合する *mod* (mdg4) (modifier of mdg4) タンパク質が必要である (Geyer and Corces, 1992)。*mod* (mdg4) タンパク質が欠失している場合には、*su* (Hw) タンパク質によりインスレーターとプロモーター間にあるエンハンサーも同様に機能を失う (図 2-2B) (Gerasimova and Corces, 1998; Geyer and Corces, 1992)。

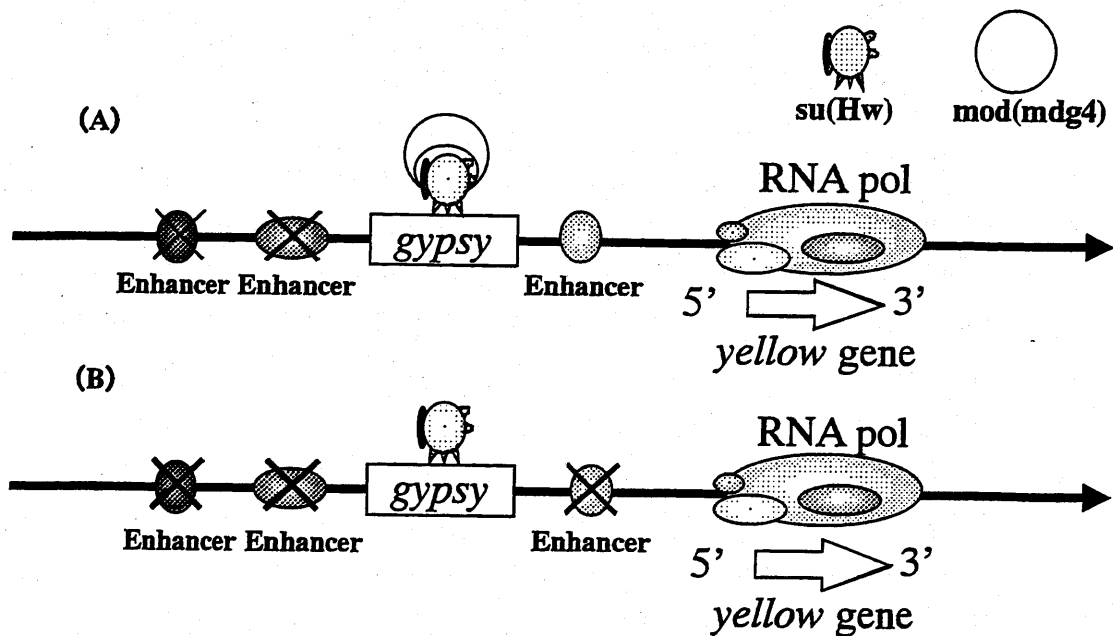


図2-2 ショウジョウバエ *gypsy* インスレーターのエンハンサー遮断
yellow 遺伝子の 5' 上流のエンハンサーのうち、*gypsy* インスレーターより
 遠位の場合だけ遮断される。しかし *mod* (mgd4) タンパク質の欠失
 により方向性を失い全てのエンハンサーを抑制する。

ショウジョウバエをはじめ様々な生物種からインスレーターが同定されており、表 2-1 にまとめた(Bi and Broach, 1999; Cuvier et al., 1998; Donze et al., 1999; Fourel et al., 1999; Gaszner et al., 1999; Sun and Elgin, 1999; Zhong and Krangel, 1999; Zhou et al., 1999)。

表2-1 同定されたインスレーター

Element	Locus	Organism	A: Enhancer blocking	B: Protection of a transgene	C: Insulate heterochromatin	D: Associated protein
HMR-R	<i>HMR</i> locus	Yeast	ND	ND	+	SMC, SMC3
HMR-L	<i>HMR</i> locus	Yeast	ND	ND	+	ND
UAS _{ye}	<i>TEF</i> gene	Yeast	ND	ND	+	Rap1
STARs	Telomeres	Yeast	ND	ND	+	Tbflp, Reb1p
<i>Fab-7</i>	<i>Abdominal-B</i> locus	<i>Drosophila</i>	+	ND	ND	ND
<i>Fab-8</i>	<i>Abdominal-B</i> locus	<i>Drosophila</i>	+	ND	ND	ND
<i>scs</i>	<i>hsp70</i> gene	<i>Drosophila</i>	+	+	-	Zw5
<i>scs'</i>	<i>hsp70</i> gene	<i>Drosophila</i>	+	+	-	BEAF-32
<i>gypsy</i>	Transposable element	<i>Drosophila</i>	+	+	+	su(Hw), mod(mdg4)
<i>eve</i> promoter	<i>even-skipped</i> gene	<i>Drosophila</i>	+	ND	ND	GAGA
β -globin	β -globin locus	Chicken, Human	+	+	ND	CTCF
Repeat organizer	rRNA gene	<i>Xenopus</i>	+	ND	ND	CTCF
<i>sns</i>	Early histone gene	<i>Sea urchin</i>	+	ND	ND	ND
HS2-6	<i>TCRa/δ-Dad1</i> locus	Human	+	ND	ND	ND
BEAD1	<i>TCRa/δ</i> locus	Human	+	ND	ND	CTCF

Elementはインスレーターを示す。Locusは同定された領域を示す。Organismは生物種を示す。Aは、形質転換体におけるエンハンサー遮断活性を示す。Bは、position effectを抑制する活性を示す。Cは、ヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制する活性を示す。Dは、関与するタンパク質を示す。+は活性を有し、-は有さない。NDは、not determined。

その活性を A~C に分類すると、position effect 抑制とエンハンサー遮断を兼ね備えるインスレーターはわずか 3 種である。研究の経緯上、明確な区分けがなされていないが、染色体上の境界領域として機能し position effect 抑制やヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制する場合には境界領域の意味から boundary、またエンハンサー遮断だけを示す場合には絶縁体の意味から insulator とするほうが好ましいと思われる。しかし現状ではまとめてインスレーターとしていることが多いため、ここでも統一してインスレーターとする。これらインスレーターの機構を解明するために様々な研究が行われてきた。しかし配列間の比較では、ほとんど相同性はなく際立った特徴は浮かび上がっていない。また、インスレーターへ結合するタンパク質も単離されているが、あるインスレーターに重要な働きをすると考えられるタンパク質が、他のインスレーターには必要ないこともある。またエンハンサーの影響力を限定し遺伝子を保護するためには、膨大な数のインスレーターが必要となるが、染色体に複数存在するとの報告もなく単離数も少ないのが現状である。このように機構については、確立された説がなく混沌とした状態であるが、応用的には非常に重要である。近年、遺伝子治療や品種改良を目的として、動・植物細胞への有用遺伝子導入が盛んに行わ

れている。ところが、染色体上にランダムに遺伝子を導入すると、position effect を受けて正常に遺伝子発現が行われなない。これらの問題を解決するために、動物細胞ではインスレーターの利用が試みはじめられている (Chung et al., 1993; Kellum and Schedl, 1991; Roseman et al., 1993)。また興味深いことに他生物種間における報告もあり、ニワトリ β -globin インスレーターが、ヒト erythroid 細胞およびショウジョウバエで機能した (Chung et al., 1993)。このためインスレーターが高度に保存された機構の上に成り立っている可能性もある。

これらの知見を踏まえ、我々はウニから新たに単離され、他生物種であるショウジョウバエにおいてもエンハンサーを遮断することが示された *Ars* インスレーターを選択し (Akasaka et al., 1999)、植物細胞において position effect を抑制し安定発現に寄与するか解析を行った。解析手法としては、position effect とインスレーターの関連に焦点を当てるため、CaMV35S プロモーターを-90 bp まで欠失し転写活性を低くした p35S core プロモーターを使用した (Fang et al., 1989)。植物細胞には過剰量の RNA に起因する PTGS が知られているため、転写活性を低くしたプロモーターを用いることによりその影響を排除しようと考えた。具体的には、*Ars* インスレーターを p35S core (-90 bp) -*GUS* 遺伝子の 5' 上流、3' 下流または両側に付加し、タバコ BY2 細胞の染色体上へ導入した。独立した形質転換体を 50 個体取得し、*GUS* 遺伝子の発現のばらつきを解析した。

第2節 実験材料および実験方法

DNA

Ars インスレーター (Akasaka et al., 1999)。ウニ *Arylsulfatase* 遺伝子の転写開始点から 5' 上流約 2.5 kb に同定された 576 bp の DNA 断片。*Ars* 遺伝子の第 1 インtron に存在する *Ars* エンハンサーを遮断する。

gypsy インスレーター (Corces and Geyer, 1991)。ショウジョウバエの *gypsy* レトロトランスポゾン内に同定された。position effect 抑制およびエンハンサー遮断を示す。

CaMV35S コアプロモーター (-90 bp) (Fang et al., 1989)。

pCaMV35S-*LUC* (*luciferase*) (Millar et al., 1992)。プロトプラスト BY2 細胞を用いた一過性発現実験の内部標準として用いた。

GUS 活性染色

アグロバクテリウム感染法によりタバコ BY2 細胞を形質転換後、選択培地上 (100 mg/l カナマイシン、250 mg/l カルベニシリン) に成育した耐性カルスを新たな選択培地に移した。2 回植え替え (約 2 週間ごと) した後に、GUS 活性染色および活性測定を行った (耐性カルス取得から約 7 週間後)。この時、顕微鏡でアグロバクテリウムが存在しないことを確認した。GUS 活性染色は、約 0.5 g の形質転換 BY2 細胞をエッペンドルフチューブに入れ、100 μ l の GUS 染色液 (1.9 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide、50 mM Na-phosphate buffer、pH7.0) を加え、37°C で 1 晩反応させた。その後 96 穴のマイクロタイタープレートに移し、写真撮影を行った。

LUC (luciferase) 活性測定

GUS/LUC lysis buffer (2 mM EDTA、5% glycerol、2 mM DTT、100 mM Na-phosphate buffer、pH7.0) 中で細胞を破碎した。遠心した後、上清を粗酵素液とした。得られた粗酵素液に発光基質であるルシフェリンを加え、ルミノメーターにより 10 秒間の発光量を測定した。ルシフェラーゼ標品を用いて検量線を作製し、発光量から粗酵素液 1 mg 中に含まれるルシフェラーゼタンパク質量 (fmol) を算出し、LUC activity (fmol/mg protein) とした。なお一過性発現実験において GUS 活性と LUC 活性を同時に測定する必要がある場合には、上記の GUS/LUC lysis buffer で細胞破碎後、GUS 活性測定を行った。

第3節 結果

第1項 *Ars* インスレーターが外来遺伝子発現に及ぼす影響

pBI101.2 をベクターとして、各融合遺伝子を構築した (図 2-3)。

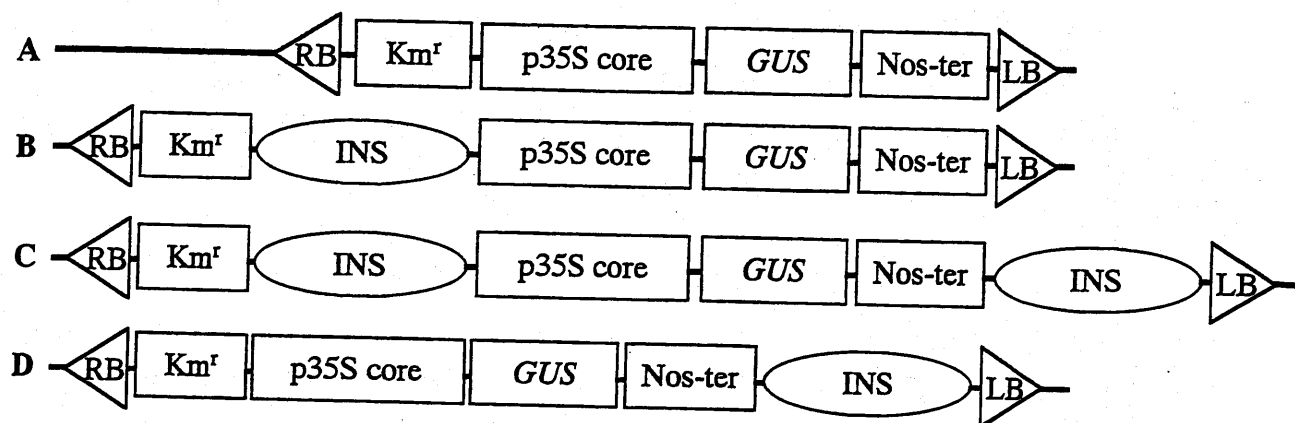
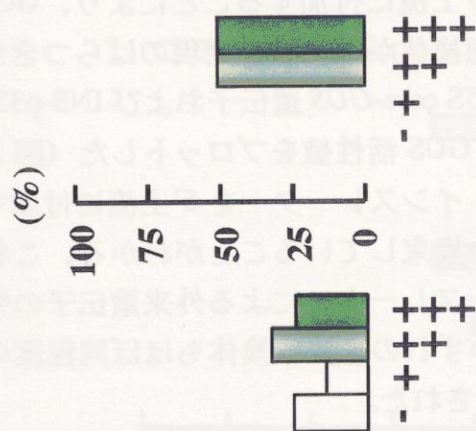
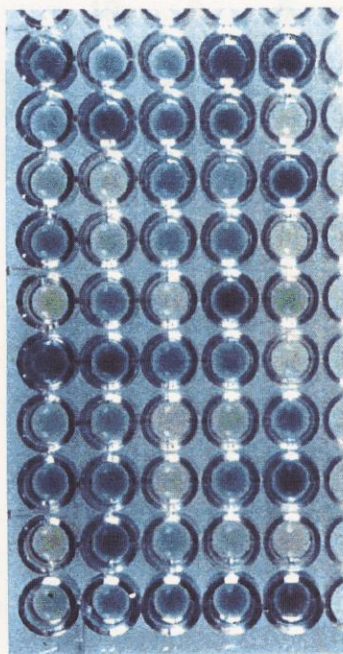


図2-3 各融合遺伝子の構築図

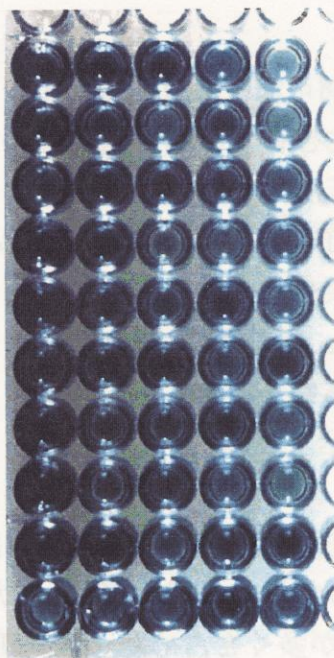
p35S core: CaMV35Sプロモーターを-90 bpまで欠失したプロモーター、*km^r*: *NPTII*遺伝子、*GUS*: β -glucuronidase遺伝子、Nos-ter: nopaline synthase terminator、RB: right border、LB: left border、INS: *Ars* insulator。

次に各融合遺伝子をタバコ BY2 細胞の染色体上に導入し、独立した形質転換体を 50 個体取得し、導入した *GUS* 遺伝子の発現を *GUS* 活性染色により調べた。細胞内に *GUS* タンパク質が蓄積している場合には、基質を加えることにより青色の沈殿が生じる。p35S core-*GUS* 遺伝子では、約 60%の形質転換体に染色が認められ、残りの 15%は弱い染色、また 25%は染色が認められず発現のばらつきが生じた (図 2-4A)。ところが *Ars* インスレーターを p35S core-*GUS* 遺伝子の 5'上流に付加すると、全形質転換体に染色が認められた (図 2-4B)。また両側に付加した場合でも同様に全形質転換体に染色が認められた (図 2-4C)。また 3'下流に付加した場合では、染色されない形質転換体が認められ、発現のばらつきが生じた (図 2-4D)。これらの結果から、*Ars* インスレーターを外来遺伝子の 5'上流または両側に付加することにより、position effect を抑制し発現が安定化することが示唆された。

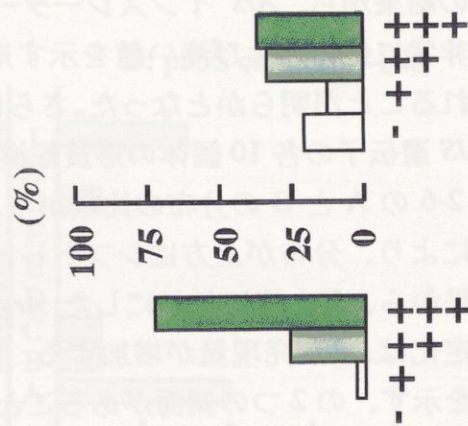
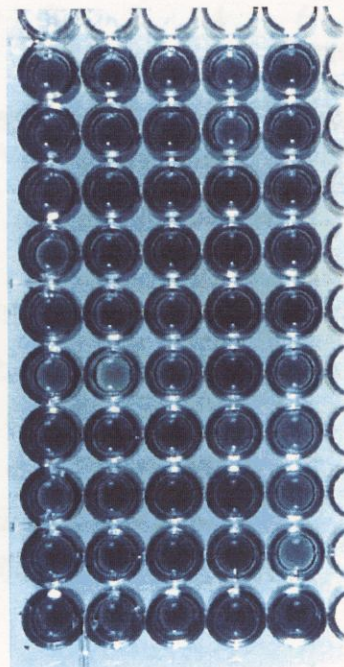
A: p35S core-*GUS*



B: INS-p35S core-*GUS*



C: INS-p35S core-*GUS*-INS



D: p35S core-*GUS*-INS

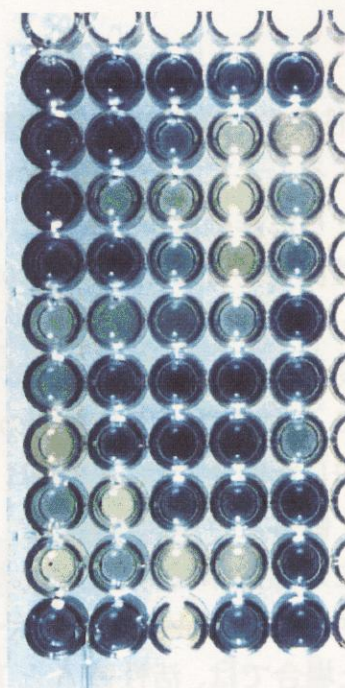


図2-4 形質転換BY2細胞のGUS活性染色

各融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞を50個体独立に取得し、GUS活性染色を行った。染色の程度を4段階に分け(+++：濃青色、++：青色、+：薄青色、-：白色)、その割合をヒストグラムにより示した。

GUS 活性染色により活性の有無は簡便に判別可能であり、*Ars* インスレーターを付加することにより、明らかに GUS 活性を有する形質転換体の割合が増加した。さらに詳細な解析を行うため、形質転換体を無作為に 10 個体選出し、GUS 活性測定を行った。p35S core-GUS 遺伝子では、A:6 個体、B:3 個体、H:1 個体であった (図 2-5A)。活性値 A は、活性染色により白色または非常に薄い青色の沈殿が認められる程度の弱い活性である。活性値 B 以上の値を示す場合には、GUS 活性染色により青色の沈殿が認められる。*Ars* インスレーターを 5' 上流に付加した場合には、A や H の活性値を示す個体が認められず、B-E の活性値を示す個体だけが認められた (図 2-5B)。また両側に付加した場合には、A の活性を示す個体は認められないが、高い活性値の I を示す個体も認められ、GUS 活性値の上限と下限には大きな差が認められた (図 2-5C)。また 3' 下流に付加した場合には、活性値 A と I を示す個体が多くを占めた (図 2-5D)。これらの結果から、*Ars* インスレーターを 5' 上流に付加することにより、GUS 活性が非常に低いおよび高い値を示す形質転換体が消失し、発現のばらつきが抑制されることが明らかとなった。さらに p35S core-GUS 遺伝子および INS-p35S core-GUS 遺伝子の各 10 個体の形質転換体の GUS 活性値をプロットした (図 2-6)。図 2-6 の A と B の分布の比較から、*Ars* インスレーターを 5' 上流に付加することにより、分布が上方にシフトし、かつ集束していることがわかる。これらの結果から、5' 上流に付加にした *Ars* インスレーターによる外来遺伝子の発現の安定化は、1) 発現量が増加する、2) いずれの形質転換体もほぼ同程度の活性値を示す、の 2 つの側面があることが示された。

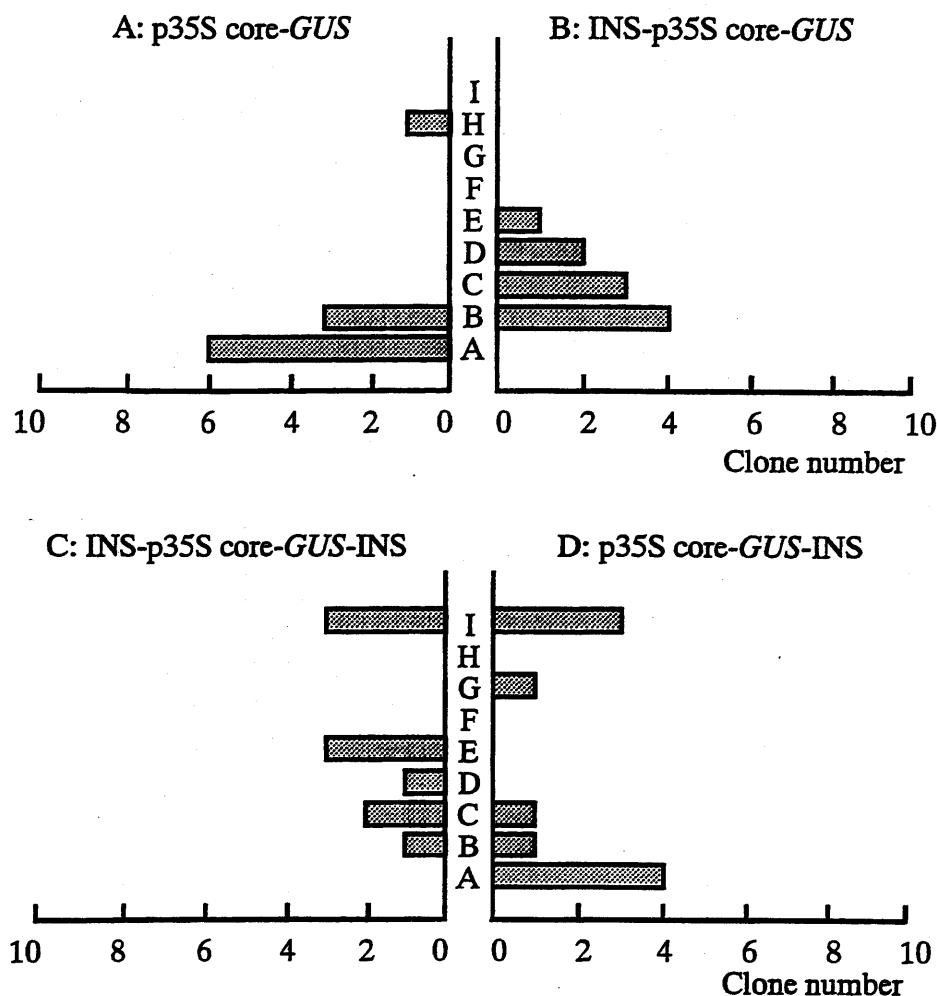


図2-5 形質転換BY2細胞のGUS活性値

各融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞を無作為に10個体選出し、GUS活性測定を行った。縦軸は活性値、横軸は個体数を示している。A:~500、B:501~1,000、C:1,001~1,500、D:1,501~2,000、E:2,001~2,500、F:2,501~3,000、G:3,001~3,500、H:3,501~4,000、I:4,001 (pmol/min/mg protein)~。

さらに p35S core-*GUS* 遺伝子および INS-p35S core-*GUS* 遺伝子の各 10 個体の形質転換体の GUS 活性値をプロットした (図 2-6)。図 2-6 の A と B の分布の比較から、*Ars* インスレーターを 5' 上流に付加することにより、分布が上方にシフトし、かつ集束していることがわかる。これらの結果から、5' 上流に付加にした *Ars* インスレーターによる外来遺伝子の発現の安定化は、1) 発現量が増加する、2) いずれの形質転換体もほぼ同程度の活性値を示す、の 2 つの側面があることが示された。

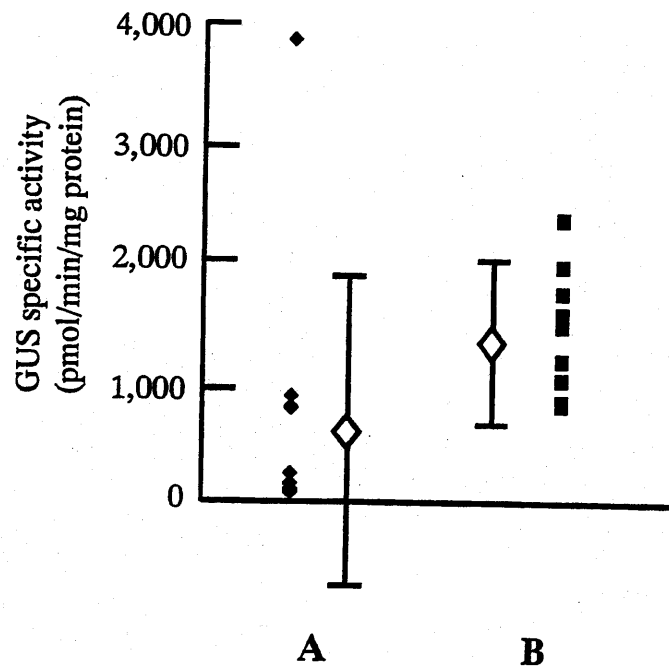


図2-6 *Ars*インスレーターの付加による発現のばらつきの抑制
A: p35S core-*GUS*遺伝子、B: INS-p35S core-*GUS*遺伝子を導入した10個体の形質転換BY2細胞のGUS活性値をプロットした。

表 2-2 に各融合遺伝子を導入した 10 個体の形質転換体の平均値および標準偏差を示した。また pCaMV35S-*GUS* 遺伝子についても同様に示した。

表2-2 形質転換BY2細胞の平均GUS活性値および標準偏差

Constructs	N	Average GUS activity (pmol/min/mg protein)	SD
A: p35S core- <i>GUS</i>	10	660	1,200
B: INS-p35S core- <i>GUS</i>	10	1,200	500
C: INS-p35S core- <i>GUS</i> -INS	10	3,200	2,900
D: p35S core- <i>GUS</i> -INS	10	3,100	4,000
E: pCaMV35S- <i>GUS</i>	10	4,000	3,200

N: 独立した個体数、SD: 標準偏差。

対照として用いた p35S core-*GUS* 遺伝子では、10 個体の平均値 $\pm$ 標準偏差は、660 $\pm$ 1,200 pmol/min/mg protein であった (表 2-2A)。しかし、*Ars* インスレーターを 5'上流に付加した INS- p35S core-*GUS* 遺伝子では、1,200 $\pm$ 500 pmol/min/mg protein であった (表 2-2A)。A と B の 2 群の平均値は Kruskal-Wallis

検定および Mann-Whitney 検定によって有意に差が認められた ($P<0.05$)。また 2 群の分散についても Bartlett 検定によって、有意に差が認められた ($P<0.05$)。

第 2 項 *Ars* インスレーターの転写活性化能

Ars インスレーターは、position effect を抑制し発現の安定化に寄与した。これらの機能が転写活性化によるものか調べるため、プロトプラスト BY2 細胞を用いた一過性発現実験を行った (図 2-7)。

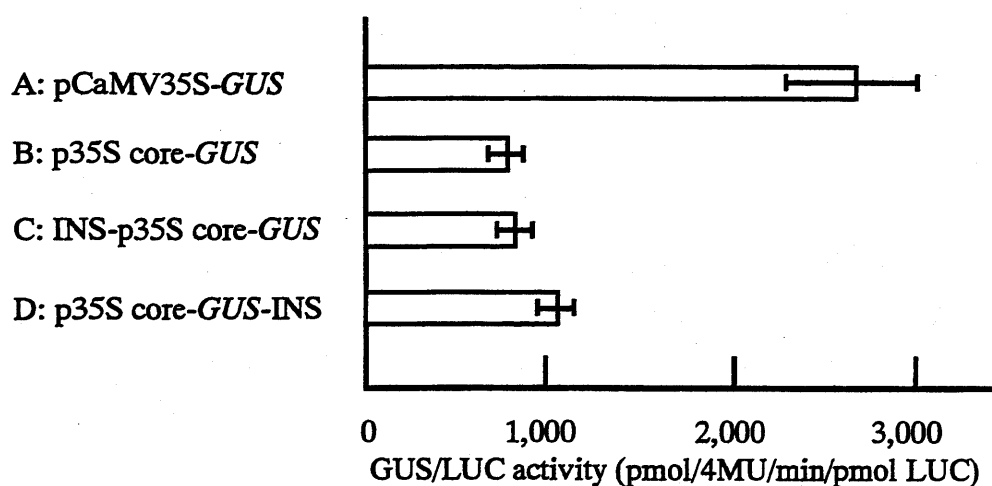


図2-7 *Ars*インスレーターが転写に与える影響
プロトプラストBY2細胞に各融合遺伝子を導入し、24時間後にGUS活性測定を行った。
内部標準としてpCaMV35S-LUCを用いて、GUS活性値を標準化した。
各3回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

pCaMV35S-*GUS* 遺伝子では、約 2,500 の値が得られた (図 2-7A)。一方 p35S core-*GUS* 遺伝子では、CaMV35S プロモーターの約 20% の 700 程度の値を示した (図 2-7B)。INS-p35S core-*GUS* 遺伝子では、*Ars* インスレーターを付加したことによる大きな GUS 活性値の変化は認められず、p35S core-*GUS* 遺伝子とほぼ同程度の活性を示した (図 2-7C)。このため *Ars* インスレーターは、転写活性化を担わないことが示唆された。また *GUS* 遺伝子の 3' 下流に *Ars* インスレーターを付加した場合では、わずかに GUS 活性値の上昇が認められた (図 2-7D)。

第3項 *Ars* インスレーターによる染色体上への導入位置およびコピー数に及ぼす影響

Ars インスレーターを p35S core-*GUS* 遺伝子の 5' 上流に付加することにより *GUS* 遺伝子発現のばらつきが抑制された。*Ars* インスレーターを付加することにより、染色体上の導入位置やコピー数の変化が生じるか調べるため、独立した形質転換体を実験的に 10 個体選出し、サザン解析を行った (図 2-8)。INS-p35S core-*GUS* 遺伝子 (図 2-8A) と p35S core-*GUS* 遺伝子 (図 2-8B) では、バンドの分布に変化は認められず、またコピー数の変化も認められなかった。このため *Ars* インスレーターによる発現の安定化は、染色体上の特定の領域に導入されやすいことや、コピー数が変化することに起因するものではないと考えられた。

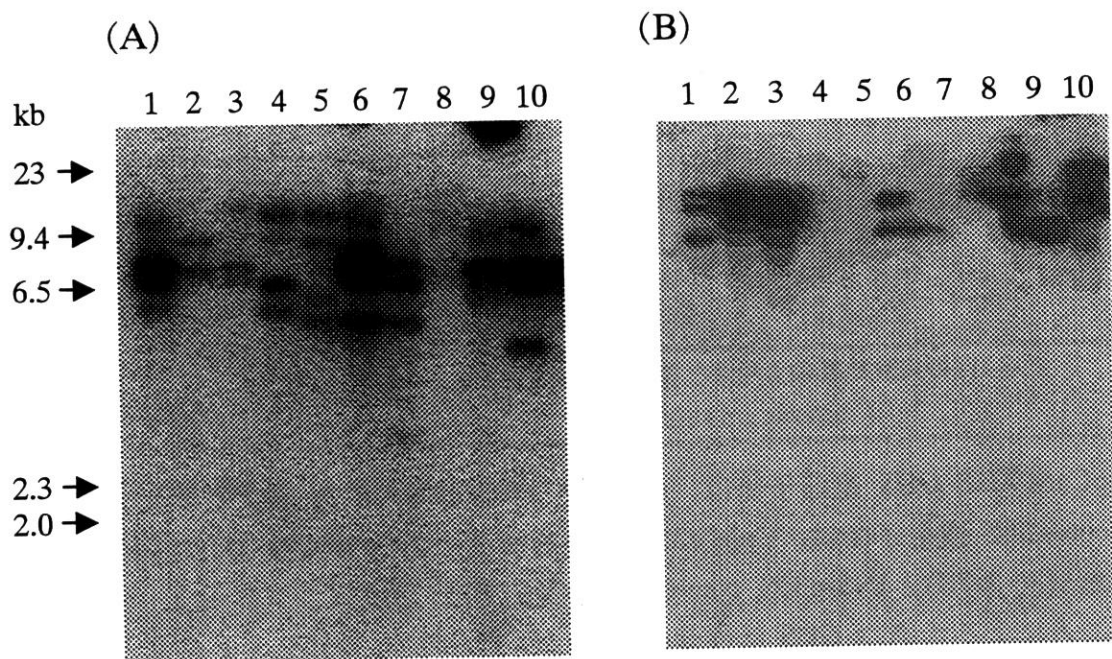


図2-8 *Ars*インスレーターが導入位置またはコピー数に与える影響
独立した10個体について、*GUS*遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。
(A) : インスレーター有り、(B) : インスレーター無し。各レーンには、ゲノムDNA 40 μ gを
導入遺伝子を一ヶ所だけ切断する制限酵素 (*Hind*III) により消化して用いた。

第4項 プロモーターに対する *Ars* インスレーターの向きや距離が及ぼす影響

Ars インスレーターを p35S core-*GUS* 遺伝子の 5'上流に付加することにより *GUS* 遺伝子発現のばらつきが抑制された (図 2-4B)。次に 35S コアプロモーターに対する *Ars* インスレーターの向きや距離が、position effect の抑制に与える影響を解析した (図 2-9)。解析には図 2-4 などと同様に各融合遺伝子を導入した独立した 50 個体の形質転換体について *GUS* 活性染色を行った。十分な染色 (図 2-4 のヒストグラムにおいて示した++や+++の染色) が全形質転換体に認められた場合には、position effect が抑制されるとして+と示した。したがって *Ars* インスレーターを p35S core-*GUS* 遺伝子の 5'上流に付加した場合には、position effect が抑制されるため+と示した (図 2-9A)。また 1 個体でも十分な染色が認められない場合には、position effect が抑制されないとして-と示した。対照として用いた p35S core-*GUS* 遺伝子の 5'上流にλDNA/*Hind*III 断片 (564 bp) を付加した場合には、position effect の抑制は認められなかった (図 2-9B)。 *Ars* インスレーターを逆向きに付加した場合には、position effect の抑制が認められた (図 2-9C)。また *Ars* インスレーターとプロモーター間の距離を離すため、λDNA/*Hind*III 断片 (564 bp) を挿入した場合においても、position effect の抑制が認められた (図 2-9D)。このため *Ars* インスレーターの position effect 抑制は、プロモーターに対する方向に依存せず、また距離に関しては数百 bp 程度離れても機能することが明らかとなった。次に 578 bp の *Ars* インスレーターを 5'上流から欠失したインスレーター (3'下流領域の 219 bp) を用いて同様の解析を行った。その結果、position effect の抑制は認められず、機能を発揮するためには欠失インスレーターでは不十分であることが明らかとなった (図 2-9E)。

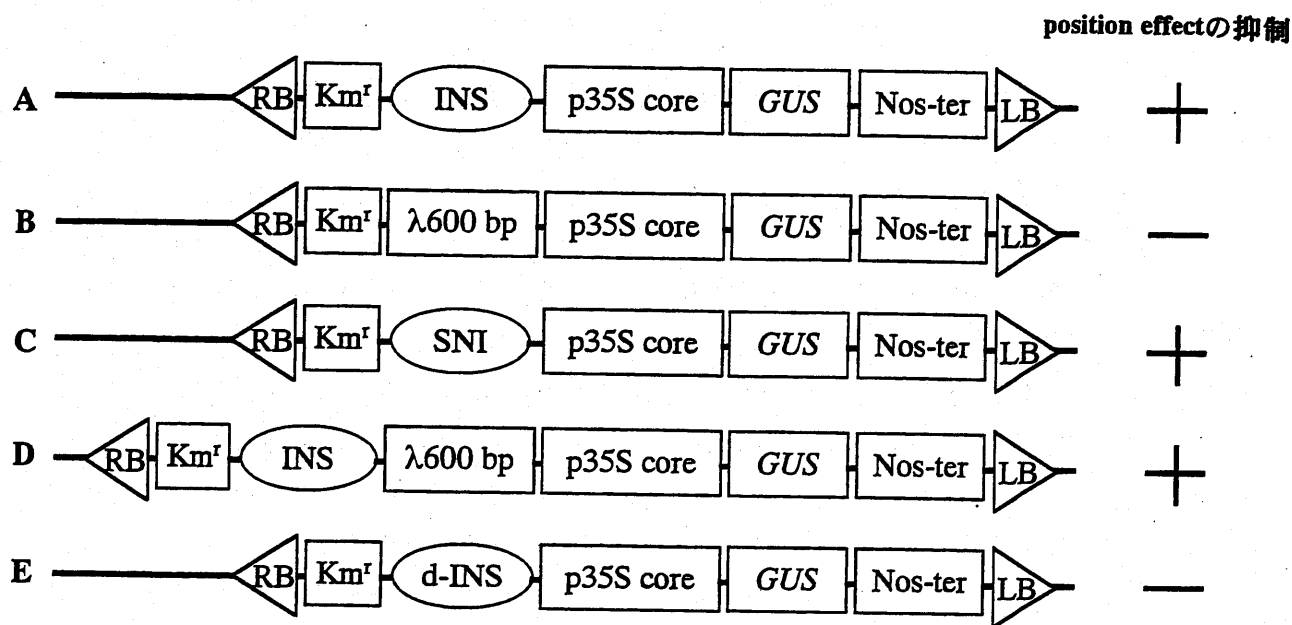
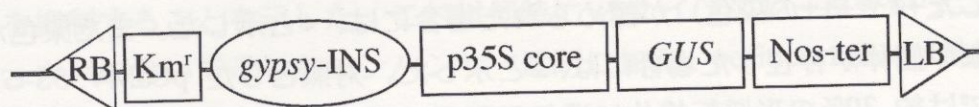


図2-9 プロモーターに対する*Ars*インスレーターの向きや距離がposition effectの抑制に及ぼす影響
 INS: *Ars* insulator, SNI: 逆向きの*Ars* insulator, λ600 bp: 564 bpのλDNA/*Hind*III断片、
 d-INS: 約 600 bpの*Ars* insulatorを3'下流領域の約 200 bpに欠失したinsulator。各融合遺伝子を導入
 した独立した50個体の形質転換体についてGUS活性染色を行った。全形質転換体に染色が認められた
 場合は、position effectが抑制されたとして+で示した。また染色が認められない個体が存在した
 場合には、position effectが抑制されないとして-で示した。

第5項 *gypsy* インスレーターが外来遺伝子発現に及ぼす影響

Ars インスレーターは植物細胞において機能したが、他のインスレータ
 ーも同様に機能するのだろうか。このためショウジョウバエから単離された
gypsy インスレーターを p35S core-*GUS* 遺伝子の 5'上流に付加して同様の解析を
 行った (図 2-10)。その結果独立した 10 個体の *GUS* 遺伝子の発現には、ばら
 つきが認められた (図 2-10B)。このため *gypsy* インスレーターは、植物細胞で
 は position effect の抑制に寄与しないことが明らかとなった。

(A)



(B)

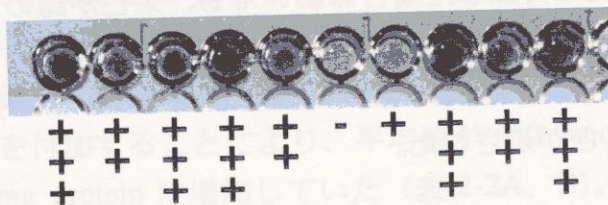


図2-10 *gypsy*インスレーターが導入遺伝子発現に及ぼす影響

(A) 融合遺伝子の構築図。 *gypsy*-INS: *gypsy* insulator.

(B) 独立した10個体の形質転換体のGUS活性染色。

染色の程度を4段階に示した (+++: 濃青色, ++: 青色, +: 薄青色, -: 白色)。

第6項 発現量の増大が *Ars* インスレーターの外来遺伝子発現の安定化に及ぼす影響

Ars インスレーターは、35S core プロモーターの発現を安定化させた。次に転写活性の強力な CaMV35S プロモーターの発現の安定化を試みた(図 2-11)。各融合遺伝子を導入した形質転換タバコ BY2 細胞を独立に 50 個体取得し、GUS 活性染色を行った。全形質転換体に十分な染色(図 2-4 のヒストグラムにおいて示した++や+++の染色)が認められた場合には、+と示した。また染色が認められない個体が存在した場合には、-と示した。対照とした pCaMV35S-*GUS* 遺伝子では約 30%の形質転換体に遺伝子発現の不活性化が生じ、発現のばらつきが認められる(図 3-2A、図 2-11A)。また *Ars* インスレーターを pCaMV35S-*GUS* 遺伝子の 5' 上流や両側に付加した場合においても、染色が認められない個体が約 30 % 存在し、発現のばらつきが認められた(図 2-11B、C)。このため、*Ars* インスレーターは転写活性が強力な CaMV35S プロモーターの発現を安定化させることはできないことが示された。

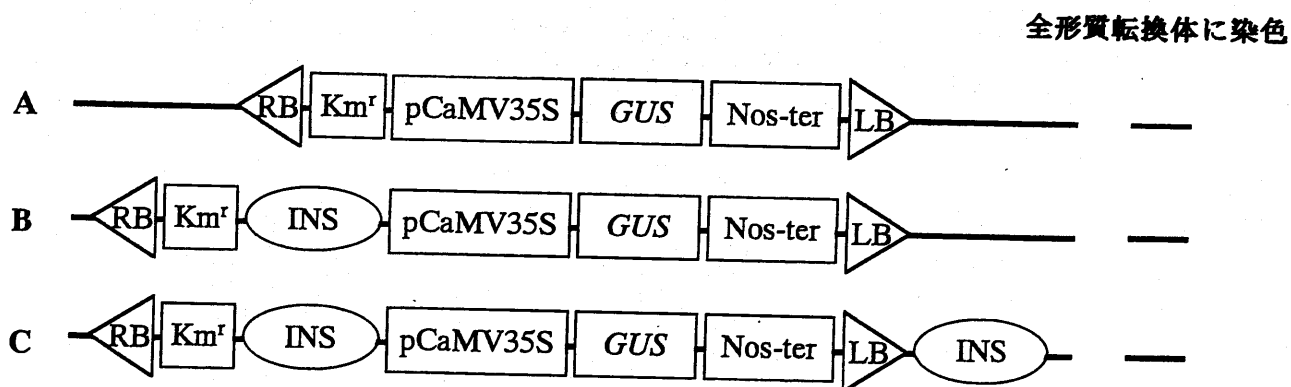


図2-11 発現量の増大が *Ars* インスレーターの外来遺伝子発現の安定化に及ぼす影響
p35S: CaMV35S プロモーター。各融合遺伝子を導入した独立した50個体の形質転換体について GUS 活性染色を行った。全形質転換体に染色が認められた場合は、+で示した。また染色が認められない個体が存在した場合には、-で示した。

第4節 考 察

植物分子育種において外来遺伝子発現の不活性化を抑制することは重要な課題である。これまで知られている不活性化の現象として、形質転換体間の発現のばらつきや成育に伴い発現が消失していくことが挙げられる。今回の解析により、初めて植物細胞においてインスレーターが形質転換体間の発現のばらつきを抑制することを示した。これは同時に *Ars* インスレーターがウニやシヨウジョウバエにおいて示したエンハンサー遮断に加え、position effect 抑制を示すことを意味している。

対照とした p35S core-*GUS* 遺伝子とその 5'上流に *Ars* インスレーターを付加した INS-p35S core-*GUS* 遺伝子についての独立した各 50 個体の GUS 活性染色の比較は、*Ars* インスレーターが position effect を抑制し発現の安定化に寄与することを示した (図 2-4A, B)。また各 10 個体の GUS 活性測定では、*Ars* インスレーターを付加することにより、平均値が 660 pmol/min/mg protein から 1,200 pmol/min/mg protein に増加していた (表 2-2A, B)。しかし *Ars* インスレーターは、一過性発現実験において転写活性化を示さなかった (図 2-7)。したがって平均値の増加は、次のように解釈できる。p35S core プロモーターは染色体上で position effect により正にも負にも影響を受けている。正に影響を受けた場合にはプロモーターが持つ本来の転写活性を超える活性を示し、本研究において解析した場合には図 2-5A の活性値 H の個体が該当すると考えられる。また負に影響を受けた場合には、ほとんど転写活性を示すことができず、図 2-5A の活性値 A の個体が該当すると考えられる。しかし *Ars* インスレーターを p35S core プロモーターの 5'上流に付加することで、position effect が抑制されプロモーターは正にも負にも影響を受けなくなる。このため p35S core プロモーター本来の転写活性が発揮され、図 2-5B の活性値 B~E の個体のみが認められる。したがって、5'上流に付加した *Ars* インスレーターによる発現の安定化は、プロモーターの転写活性の増加によるものではなく、position effect 抑制によるプロモーターの転写活性の安定化に起因しており、そのため形質転換体間の発現のばらつきが抑制されると考えられる。また *Ars* インスレーターを両側に付加した場合には、遺伝子発現が不活性化した形質転換体は認められないが、図 2-5C の活性値 I のように高い活性値を示す形質転換体が多く見られ、5'上流だけに付加する方がより発現のばらつきは抑制される結果であった (図 2-5B, C)。この高い活性値を示す現象は、*Ars* インスレーターを 3'下流にのみ付加した場合にも認められた (図 2-5D)。このため活性値の増加は、3'下流に付加した *Ars* インスレーターによる可能性が考えられる。これまで類似の現象として MAR

をターミネーターの 3'下流に導入することで発現量が増加したことが報告されており、それは MAR による転写終結反応の効率化によるものと考えられている(Holmes-Davis and Comai, 1998)。このため *Ars* インスレーターにおいても同様の現象が生じている可能性があり、一過性発現実験においても 3'下流に付加した場合に若干の活性値の増加が認められたのは、転写終結反応の効率化によるものかもしれない(図 2-7D)。また *Ars* インスレーターを 5'上流のみに付加した場合ではコピー数に変動は認められなかった(図 2-8)。しかし両側に付加した場合ではコピー数が増加する傾向が見られた(data not shown)。このため *Ars* インスレーターを両側に付加することによるコピー数の増加も、解析結果を複雑にしている一因の可能性もある。

ウニにおいて *Ars* インスレーターはエンハンサー遮断を示すが、インスレーターの向きを逆にするとその活性は消失した(Akasaka et al., 1999)。このため、植物細胞における position effect 抑制についてもプロモーターに対する向きによる影響を解析したところ、その向きに関係なく機能することが明らかとなった(図 2-9C)。 β -globin インスレーター (1.2 kb) は position effect 抑制およびエンハンサー遮断の両活性を有している。最近欠失解析からエンハンサー遮断に必須な領域が 42 bp にまで限定され、さらに領域内の CCCTC 配列に結合する zinc finger タイプのタンパク質である CTCF (CCCTC-binding factor) が機能を果たすことが示された(Bell et al., 1999)。これまでプロモーター領域内に CTCF 結合配列が見い出され、CTCF タンパク質の機能として転写の活性化および不活性化が報告されている(Blackwood and Kadonaga, 1998; Burcin et al., 1997; Filippova et al., 1996; Klenova et al., 1993; Lobanenko et al., 1990; Vostrov and Quitschke, 1997)。CTCF タンパク質の二つの異なる機能は、エンハンサー遮断という一つの機能に集約されるかもしれない。つまり CTCF 結合配列の上流に転写活性化に機能する正のシスエレメントが存在する場合、CCCTC 配列を欠失させると正のシスエレメントが機能し転写活性化が生じる。このため CTCF タンパク質は転写不活性化に機能すると解釈される。逆に負のシスエレメントが存在する場合、CCCTC 配列を欠失させると転写抑制が生じるため CTCF タンパク質は転写活性化に機能すると解釈される。これが CTCF タンパク質が転写の活性化と不活性化という二面性を示す理由ではないだろうか。また限定された 42 bp では position effect を抑制できないことが示され、隣接する G (グアニン) または C (シトシン) の連続した 250 bp の配列が加わることにより position effect 抑制を示した(Bell et al., 1999)。このため position effect 抑制とエンハンサー遮断は異なる機構によることが示唆されている。*Ars* インスレーターも、ウニにおけるエンハンサー遮断にはその向きが重要であったが、植物染色体にお

ける position effect 抑制には重要ではなかった。これらの結果も、position effect 抑制とエンハンサー遮断が異なる機構によりもたらされることを支持している。 β -globin インスレーターの position effect 抑制には GC 配列が重要であることが示されたが、*Ars* インスレーターも領域内に特徴的な GC 配列が 4 個所認められる。このうちの 2 個所を欠失させたインスレーター (3'下流領域の 219 bp) が position effect を抑制できるか解析を行ったところ、発現の安定化が認められず欠失インスレーターでは不十分であることが示された (図 2-9E)。この結果から *Ars* インスレーター内の GC 配列が重要であることが示唆されたことから、塩基置換解析や結合タンパク質因子の単離などを行い position effect 抑制との関連を解析する必要がある。

次に *Ars* インスレーターとプロモーター間の距離の影響について解析したところ、約 600 bp の λ DNA 断片を挿入した場合でも変わらず position effect を抑制し発現の安定化が認められた (図 2-9D)。このため発現の安定化に機能するためには、*Ars* インスレーターの向きは重要ではなくプロモーターの 5'上流の比較的近傍に存在することが必要と考えられる。今後はその機能を果たしうる距離が何 kb まで及ぶのか解析する必要がある。

インスレーターは他生物種でも機能したことが報告されているため、高度に保存された機構の上に成り立っている可能性もある。我々の解析においても、ウニ *Ars* インスレーターが植物細胞で機能した。さらに他のインスレーターを用いて普遍性を明らかにしようと試みた。ショウジョウバエのトランスポゾン内に同定された gypsy インスレーターを用いた解析を行ったが、発現の安定化に寄与しなかった (図 2-10B)。gypsy インスレーターがショウジョウバエ以外の生物種で機能した報告はされておらず、また我々の解析においても機能を示さなかった。この結果は、他の生物種には *su* (Hw) および *mod* (*mdg4*) タンパク質が存在しない可能性も一因と考えられる。今後インスレーターの普遍性をより明らかにするためには、*scs-scs'*インスレーター (Kellum and Schedl, 1992) や *Ars* インスレーターと同様に GC の連続配列が存在する β -globin インスレーター (Chung et al., 1993) など他のインスレーターを用いた解析が必要である。

Ars インスレーターは、形質転換体間の発現のばらつきを抑制した。今後は、成育に伴う発現の不活性化を抑制するか解析する必要がある。この観点からの解析が一例だけ報告されている (Pikaart et al., 1998)。 β -globin インスレーターをレポーター遺伝子の両側に付加し、ヒト erythroid 細胞にシングルコピー導入した形質転換体を作製した。 β -globin インスレーターを付加しない場合、数ヶ月の培養によりレポーター遺伝子の発現が低下する。しかし付加している場合には発現の低下が認められず、成育に伴う発現の不活性化がインスレータ

一により抑制された。この両形質転換体の外来遺伝子部分における DNaseI 感受性、ヒストンのアセチル化、DNA のメチル化について解析した。その結果、発現の不活性化に対応して DNaseI 感受性が低下し、さらにヒストンは脱アセチル化されていた。しかし DNA のメチル化については、差異が認められなかった。インスレーターの成育に伴う発現の不活性化に対する抑制機構は明らかではないが、少なくとも現象としてはヒストンの脱アセチル化は抑制するが、DNA のメチル化は抑制しないことが示唆された。今後 *Ars* インスレーターについても同様の解析が必要と考えられる。しかし、ヒストンのアセチル化や DNA のメチル化を遺伝子発現の指標にして良いのか疑問視する声もある。酵母やショウジョウバエにおいて *HDAC* 遺伝子 (またはホモログ) を破壊し、ヒストンの脱アセチル化の機能の一部を不能にした解析がなされた。予想される結果として、ヒストンのアセチル化の増加による転写抑制の解除が考えられる。しかし実際には予想に反して転写抑制の増強が認められた (De Rubertis et al., 1996)。このためヒストンのアセチル化が遺伝子発現に影響を与えうるのか未だ議論の余地がある。また従来 HAT の基質はヒストンと考えられていたが、転写因子や基本転写装置がアセチル化されることが示された (Gu and Roeder, 1997; Imhof et al., 1997)。このためヒストンのアセチル化は副産物的なものでしかないのかもしれない。また DNA のメチル化に関しても、転写反応が生じていない領域がメチル化されるだけであり、メチル化は遺伝子発現の不活性化の原因ではなく結果であるとの主張も根強い。しかし一方では、*HDAC* や *DNA methylase* の阻害剤を用いることにより、不活性化していた外来遺伝子が発現を取り戻すことも事実である (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998)。このように DNaseI 感受性以外に何を遺伝子発現の指標とするべきなのかすら定まっておらず、混沌とした状況である。今後のヒストンのアセチル化や DNA のメチル化の研究の進展が待たれる。また成育に伴う発現の不活性化について別の観点から興味深い報告がなされている (Francastel et al., 1999)。 β -globin 遺伝子座の 5' 上流領域には特に DNaseI 高感受性な領域 (hypersensitive site) が数ヶ所存在している。そのうちの HS2 と呼ばれる領域はエンハンサーとして知られている。外来遺伝子に HS2 を付加し、染色体上の特定の領域に導入した形質転換体を作製した。また HS2 を付加していない外来遺伝子についても同様に導入した。両形質転換体の外来遺伝子の発現を数ヶ月に渡り調べた結果、HS2 を付加していない場合では発現の低下が認められるが、付加している場合では発現は維持された。その原因を調べるため両外来遺伝子部分を解析したところ、DNaseI 感受性には差が認められたが、DNA のメチル化には認められなかった。この解析結果は上述の結果と良く一致している。しかしこの報告ではさらに別の観点から解析を行い、核内

での外来遺伝子の存在する位置が大きく異なっていることを見い出した。染色体上の同一領域に外来遺伝子を導入していることから、核内での位置が異なることは付加した HS2 の影響と考えられる。核内の位置と転写に関しては、核に蛍光ラベルした塩基を取り込ませると数百のスポット状の蛍光が認められることから、核内では一様に転写が行われているわけではなく限られた区画で行われることが示されている(Cook, 1999)。また転写因子等は転写が行われる区画に、ヘテロクロマチン形成に関与する SIR タンパク質はそれ以外の区画に、各々豊富に存在している(Cockell and Gasser, 1999)。そしてこれらの区画と染色体構造の関係は、ユウクロマチン構造部分は転写が行われる区画に、ヘテロクロマチン構造部分はそれ以外の区画に位置していることから、核内での位置が染色体構造を左右する重要な因子の一つである可能性が示唆されている(Csink and Henikoff, 1996; Francastel et al., 1999; Lamond and Earnshaw, 1998; Milot et al., 1996)。さらに HS2 の機能解析を行うため、領域内に存在する数種の転写因子の結合配列に変異を加えて同様の解析を行ったところ、HS2 を付加していない場合と同様に培養経過に伴い外来遺伝子部分が転写が行われていない区画に移動していくことが示された。このため HS2 に結合する転写因子が染色体を転写が行われる区画にリクルートすることによりユウクロマチン構造を保持し、その結果発現が維持されることが考えられる。一方 HS2 を付加していない場合では、転写が行われない区画へ移動およびヘテロクロマチン構造の形成が生じ、発現が不活性化されると考えられる。これは成育に伴う外来遺伝子発現の不活性化を説明するのに非常に魅力的な仮説である。また第2章の緒言の表 2-1 で示したが、scs-scs'インスレーターはヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制できないにもかかわらず、position effect を抑制することができる。この現象は scs-scs'インスレーターが HS2 のような機能を有し、形成されたヘテロクロマチン構造の伝搬は抑制できないが、核内で転写が行われる区画にリクルートすることにより、ユウクロマチン構造を保持し position effect を抑制する可能性も考えられる。他のインスレーターについてもこの観点から解析を行えば、新たな知見が得られるかもしれない。

Ars インスレーターが、35S core プロモーターの発現を安定化させたが植物分子育種を考える場合、より高い発現レベルで安定化することが望ましい。このため転写活性の強力な CaMV35S プロモーターの発現の安定化を試みた。INS-pCaMV35S-GUS 遺伝子および INS-pCaMV35S-GUS-INS 遺伝子をタバコ BY2 細胞の染色体上に導入し解析を行った。しかし対照とした pCaMV35S-GUS 遺伝子と類似の傾向を示し、約 30%の形質転換体に遺伝子発現の不活性化が生じた(図 2-11)。35S core プロモーターと CaMV35S プロモーターでは約 600 bp 程

度の長さの差があるが、*Ars* インスレーターとプロモーター間の距離を変えた実験から、距離による影響はないと予想される。またその他の相違点としては、転写活性の違いが考えられる。植物細胞には過剰量の mRNA に起因した PTGS があることが知られている (Grant, 1999; Matzke and Matzke, 1998; Vaucheret et al., 1998; Wassenegger and Pelissier, 1998)。このため CaMV35S プロモーターを用いた場合には、強力な転写活性により PTGS が引き起こされ、解析結果を複雑にしているのかもしれない。今後は、CaMV35S プロモーター以外のプロモーターと *Ars* インスレーターによる解析を行い、より高いレベルでの発現安定化を試みる必要がある。また PTGS 抑制技術との併用による発現安定化も重要である。今後は応用的に重要な植物体における発現のばらつきや成育に伴う発現の不活性化の抑制について解析する必要がある。また植物細胞以外に形質転換動物やウィルスベクターを用いたヒトの遺伝子治療などへの利用も視野に入れ研究を行う必要がある。

第 3 章 *NtADH* プロモーターに存在する安定発現に寄与する機能領域

第 1 節 緒 言

Ars インスレーターが植物細胞で機能し、position effect を抑制し発現の安定化に寄与した。この結果は、植物染色体上においてもインスレーター様の発現安定化に寄与する機能領域の存在を示唆している。

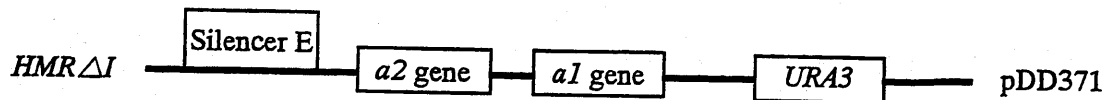
Ars 遺伝子の発現は、通常抑制状態であるが、分化過程の特定の段階に急激な転写活性化が起こり、全 mRNA の 1% に達するほど多量に蓄積される。これまでに転写活性化を担うエンハンサーが、*Ars* 遺伝子の第一イントロン内に同定された(Akasaka et al., 1999)。また *Ars* インスレーターは、エンハンサーよりも 5' 上流領域に位置していた。両者の位置的關係から、*Ars* インスレーターはエンハンサーにより誘導された転写活性化の影響が外部に波及しないように遮断しているのではないかと推測される。この仮説から、非常に厳密な制御を受けている遺伝子の周辺にはインスレーター様の発現安定化に寄与する機能領域が存在している可能性があると考え、第一章において単離したプロモーターについて解析を行った。

第 2 節 実験材料および実験方法

DNA

3'boundary(Donze et al., 1999)。パン酵母の HM 座のサイレンサー E と I 間の約 3.5 kb は、ヘテロクロマチン構造を呈し、遺伝子発現が抑制されている。このサイレンサーによるヘテロクロマチン構造は約 7 kb 程度まで伝搬するが、サイレンサー E と I に隣接する DNA 領域がその伝搬を抑制する、つまりインスレーターとして機能することが明らかとなった。3'boundary は、サイレンサー I の 3' 下流に隣接する約 1 kb の DNA 断片であり、その領域内にはトランスポゾンや tRNA 遺伝子などが含まれる。

pDD371(Donze et al., 1999)。サイレンサー遮断解析に用いた酵母のベクターであり、サイレンサー I を欠失した HM 座を有する。URA3 を選択マーカーとして有している。*a2* 遺伝子領域内に制限酵素部位が付加されており、DNA 断片を導入することができる。



使用菌株

Saccharomyces cerevisiae

下記の2種の菌株をサイレンサー遮断解析に使用した。

JRY19 MATa can1 his4-519 leu2-3.112 trp1 ura3-52.

ROY113 MAT@ trp1-1 ade2-1 leu2-3.112 his3-11 ura3-1 hmr::bgl-bclΔ.

プライマー

表 3-1 PCR 反応に用いたプライマーの塩基配列と対応する遺伝子領域

primer	sequence	region	gene
1:	5'-CGGAATTCGGGTCAAAACATCGTTAGGT-3'	-214~-194	<i>NtADH</i>
2:	5'-CGGAATTCCTTAATAAATCAAATCGATTT-3'	-193~-173	<i>NtADH</i>
3:	5'-CGGAATTCCTTATTACTCGACAAAAC-3'	-146~-126	<i>NtADH</i>
4:	5'-CGGAATTCAGCCAAAAACCGGTTTCGA-3'	-104~-84	<i>NtADH</i>
5:	5'-CGGAATTCCAACTTTTCGATTTACGAT-3'	-34~-14	<i>NtADH</i>
6:	5'-CGGATATCCCTGAAAATATAGAATCGTG-3'	-1~-20	<i>NtADH</i>
7:	5'-CGGATATCTTTGTTTTGTGTTACTGTTT-3'	-105~-125	<i>NtADH</i>
8:	5'-AAGGATCCACTTGCCCGACAGTGC-3'	+141~+156	<i>NtADH</i>
9:	5'-CGGAATTCAAAAATACCAATATATCGG-3'	-205~-185	<i>NtPES</i>
10:	5'-CGGATATCAGACTAAAAGCAGCACCAAA-3'	-6~-25	<i>NtPES</i>

1) オリゴの合成領域は TATA ボックスの最初の T をゼロとして 5' 上流側は-, 3' 下流側を+として示す。

2) 下線部で示した領域は制限酵素の認識配列を示している。

ADH プロモーターの欠失解析 (図 3-3A) には、1~5 と 8 のプライマーを用いて PCR を行ない、各種断片を合成して用いた。ADH200、ADH100 は、6 または 7 と 1 を用いた (図 3-1 C、D)。PES200 には、9 と 10 を用いた (図 3-1 E)。

エンハンサー遮断解析

赤坂らの方法に従った(Akasaka et al., 1999)。ウニに *LUC* 遺伝子をレポーター遺伝子とした種々の融合遺伝子をパーティクルガンで導入し、24 時間後に活性測定を行った。導入に際して融合遺伝子のベクター部分を一ヶ所だけ切断する制限酵素により消化し、直鎖状化しておく。またウニの染色体 DNA も同じ制限酵素で消化しておく。両者を混合し導入することにより、効率良く相同組み換えが起こり、ウニ染色体上へ導入される。エンハンサーは *Ars* エンハンサー、プロモーターは *Ars* プロモーターを用いた。*Ars* エンハンサーが機能する場合、*Ars* プロモーターの転写活性は約 60 倍に増加する。これを利用して解析対象である DNA 断片をエンハンサーとプロモーターの間に挿入し、*LUC* 活性によりエンハンサーとプロモーターの相互作用の遮断を評価した。

サイレンサーによるヘテロクロマチン構造伝搬の抑制の解析

Donze らの方法に従った(Donze et al., 1999)。パン酵母の HM 座にはサイレンサー E と I に挟まれて接合型に關与する *a1* 遺伝子が存在する。このサイレンサー E と *a1* 遺伝子を用いて解析を行う。具体的には、サイレンサー I を欠失し、E だけ保持するプラスミド pDD371 に解析したい DNA 断片をサイレンサー E と *a1* 遺伝子の間に導入する。このプラスミドを接合型が α 型である α 型細胞 ROY113 へ導入する。つぎに *a1* 遺伝子を発現し a 型細胞 JRY19 と接合させ、接合した場合にのみ栄養要求性によりプレート上に成育できる。pDD371 に導入した DNA 断片が、サイレンサー E によるヘテロクロマチン構造伝搬を抑制する場合、*a1* 遺伝子が発現し、a 型細胞 JRY19 とは接合できず成育できない。逆に、導入した DNA 断片がヘテロクロマチン構造伝搬を抑制できない場合、*a1* 遺伝子が抑制され a 型細胞 JRY19 と接合し成育することができる。このように導入した DNA 断片がサイレンサー E によるヘテロクロマチン構造伝搬を抑制するかどうかを接合能の有無により評価することができ、成育しない場合には抑制活性を示し、成育する場合には抑制活性を示さない。

第3節 結果

第1項 *NtADH* プロモーターの安定発現性

pBI101.2 をベクターとして、各融合遺伝子を構築した (図 3-1)。

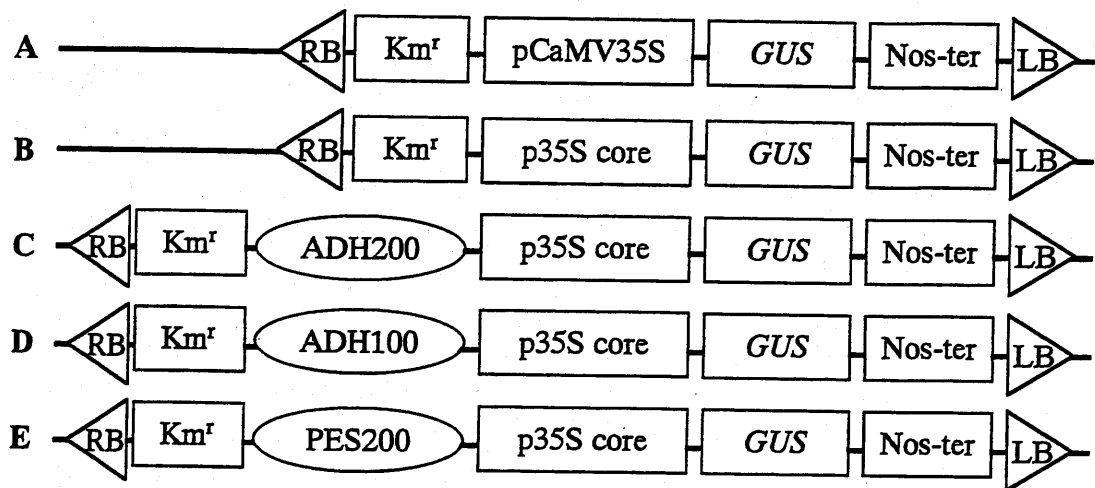
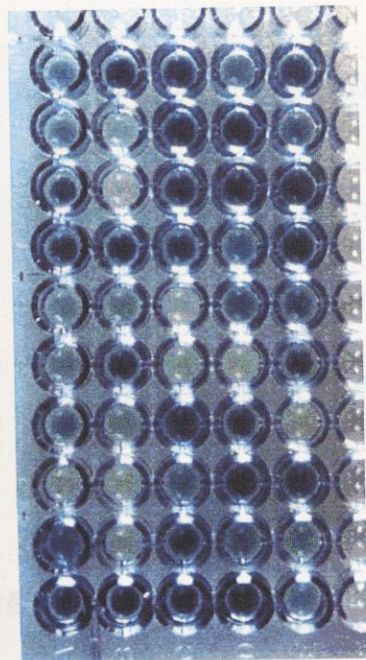


図3-1 各融合遺伝子の構築図

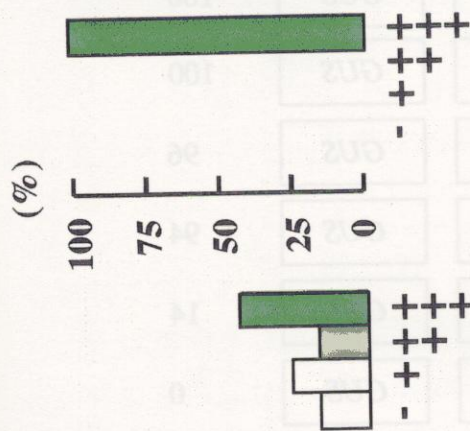
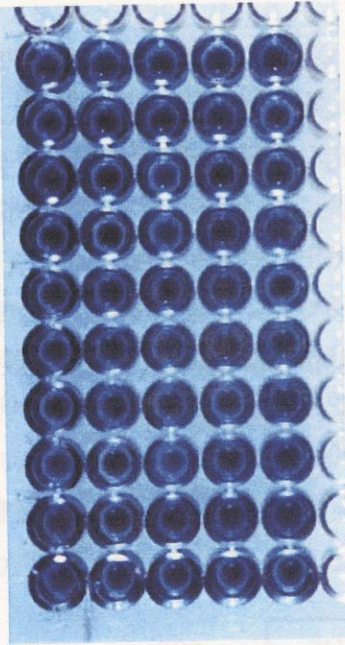
p35S core: CaMV35Sプロモーターを-90 bpまで欠失したプロモーター、*km^r*: *NPTII*遺伝子、*GUS*: *β-glucuronidase*遺伝子、Nos-ter: nopal synthase terminator、RB: right border、LB: left border、ADH200: *NtADH*プロモーターのTATAボックスの5'上流約 200 bp、ADH100: ADH200の3'上流約 100 bp、PES200: *NtPES*プロモーターのTATAボックスの5'上流約 200 bp。

pCaMV35S-*GUS* 遺伝子を導入した多数の独立した形質転換 BY2 細胞について *GUS* 活性染色を行うと、顕著なばらつきが認められた。また約 30%の個体には染色が見られず、*GUS* 遺伝子発現の不活性化が生じた (図 3-2 A)。第 2 章の結果から、プロモーター内に発現の安定化に寄与する機能領域が存在する場合には、position effect を抑制し全形質転換体に発現が認められるはずである。そこで第 1 章において単離されたプロモーター (*pNt108*、*pNtATPD*、*pNtADH*、*pNtPES*) について、下流に連結した *GUS* 遺伝子の発現を安定化させることを指標として解析を行った。その結果、*Nt108*、*NtATPD* プロモーター (data not shown)、*NtPES* プロモーター (図 3-2 D) では多くの個体で *GUS* 活性が認められなかったが、*NtADH* プロモーターでは、全形質転換体に発現が認められた (図 3-2 B)。同様の実験を 3 回繰り返したが、いずれにおいても *NtADH* プロモーターの場合のみ全形質転換体に発現が認められた。このため、*NtADH* プロモーターには発現の安定化に寄与する機能領域が存在すると考え、次の解析を行った。

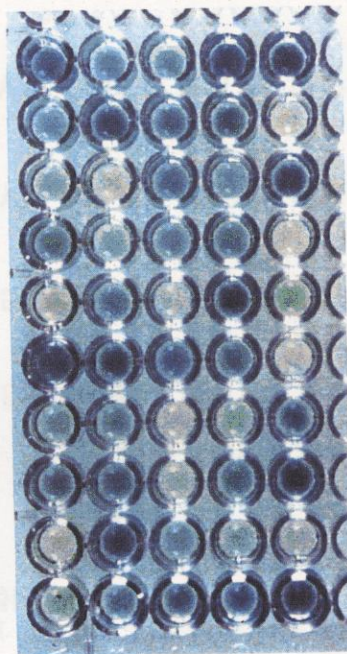
A: pCaMV35S-*GUS*



B: pNtADH-*GUS*



C: p35S core-*GUS*



D: pNtPES-*GUS*

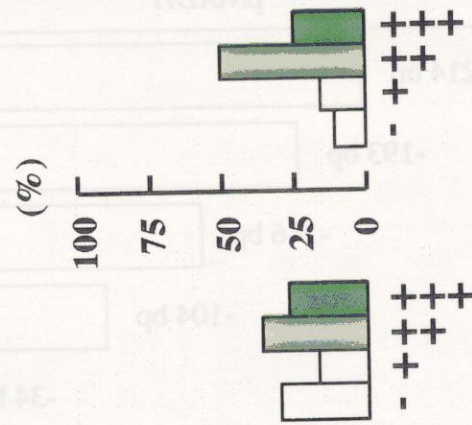
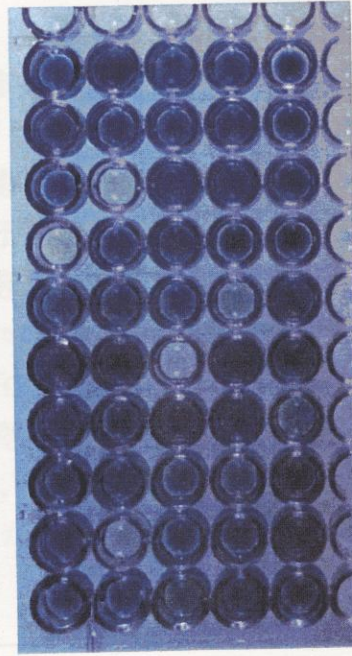


図3-2 形質転換BY2細胞のGUS活性染色
各融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞を50個体独立に取得し、GUS活性染色を行った。染色の程度を4段階に分け
(+++：濃青色、++：青色、+：薄青色、-：白色)、その割合をヒストグラムにより示した。

第2項 欠失解析による機能領域の限定

NtADH プロモーター断片 -2.4 kb (TATA ボックスの 5'上流) について欠失解析を行った (図 3-3 A)。その結果、TATA ボックスの 5'上流-214 bp までの欠失では、全形質転換体に発現が認められた。次に-193 bp まで欠失を行うと、発現に若干のばらつきが生じ、-104 bp まで欠失すると GUS 活性を有する個体は激減した。このため TATA ボックスの 5'上流-214~-1 bp (ADH200) および-214~-105 bp (ADH100) が発現安定化に必要な領域と考え、次の解析を行った。

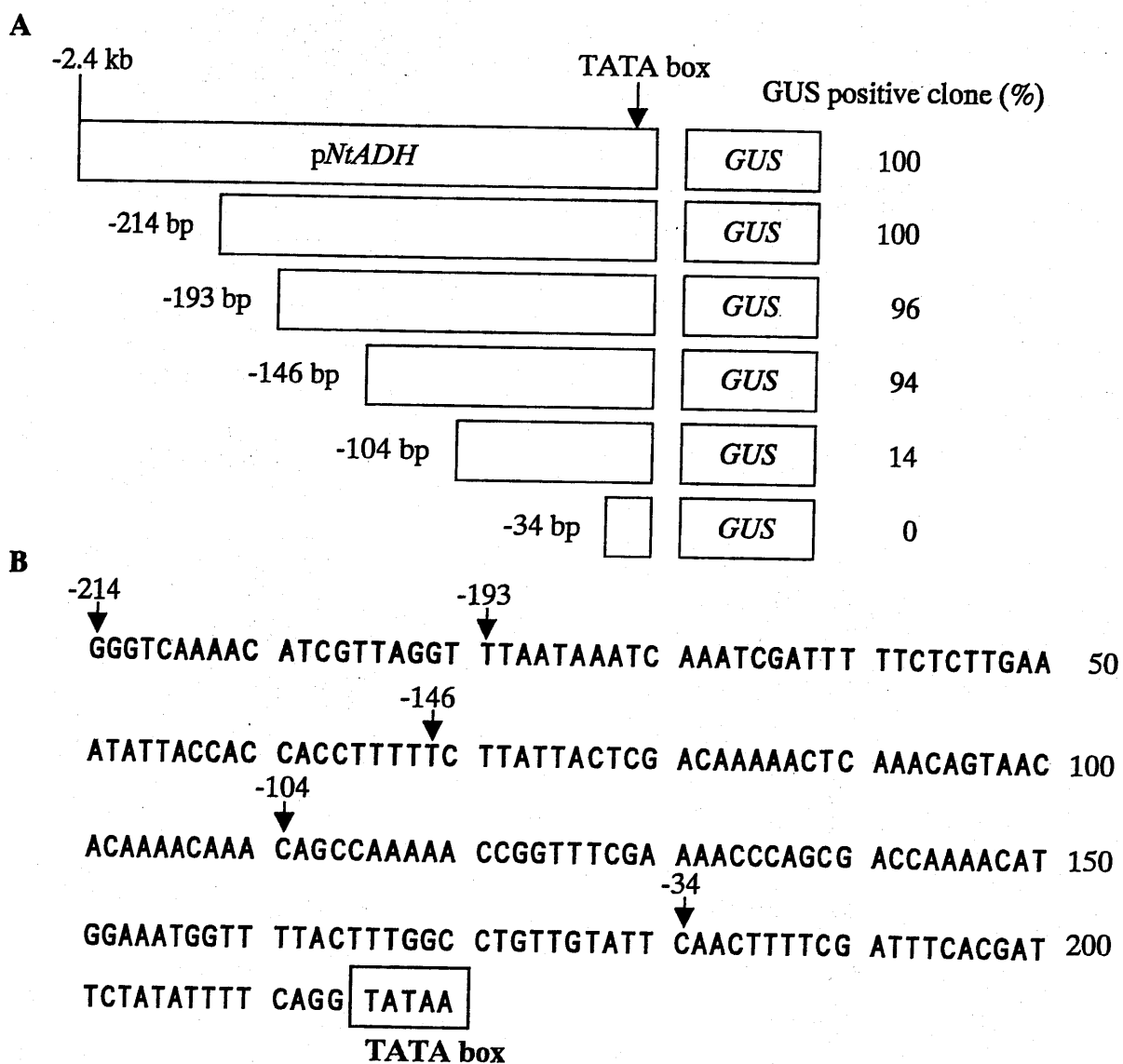
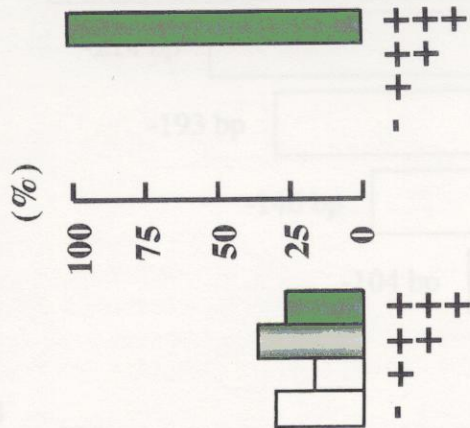
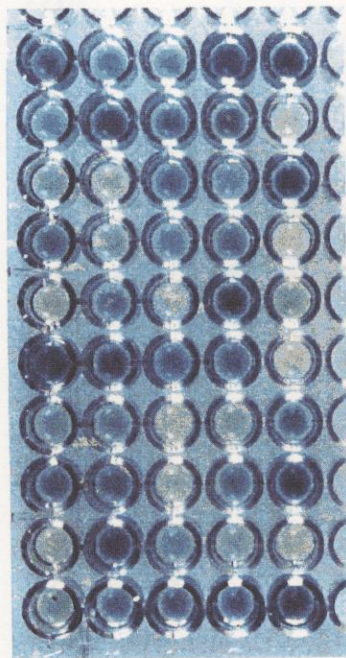


図3-3 *NtADH*プロモーターの欠失解析

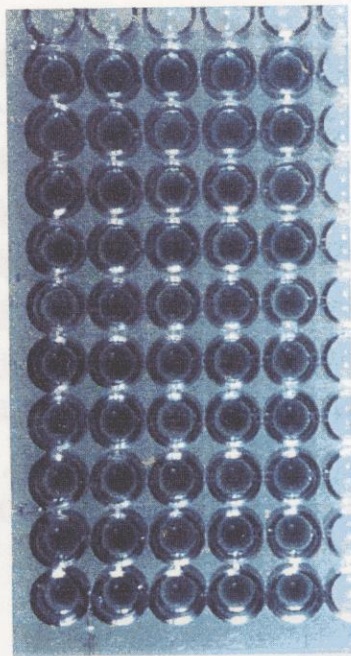
A:各融合遺伝子を導入した独立した50個体の形質転換BY2細胞を取得した。GUS活性染色を行い、染色された形質転換体の割合を示した。B:各欠失に対応する領域の塩基配列。

限定された TATA ボックスの 5'上流領域 -214~-1 bp (ADH200) と-214~-105 bp (ADH100) が遺伝子発現の安定化に寄与するか調べるため、*Ars* インスレーターの評価方法と同様に p35S core-*GUS* 遺伝子の 5'上流に付加し、タバコ BY2 細胞の染色体上に導入し解析を行った。その結果、ADH200-p35S core-*GUS* 遺伝子では全形質転換体に *GUS* 遺伝子が発現し、顕著な発現の安定化が認められた (図 3-4B)。また、ADH100-p35S core-*GUS* 遺伝子においても、ADH200 には劣るものの同様に発現の安定化が認められた (図 3-4 C)。対照として行った、*NtPES* プロモーターの TATA ボックスの 5'上流領域-205~-6 bp (PES200) を用いた PES200-p35S core-*GUS* 遺伝子では、多くの個体に *GUS* 活性が認められず、PES200 には発現の安定化が認められなかった (図 3-4 D)。このため、ADH200 が安定発現化能を有すると考えた。

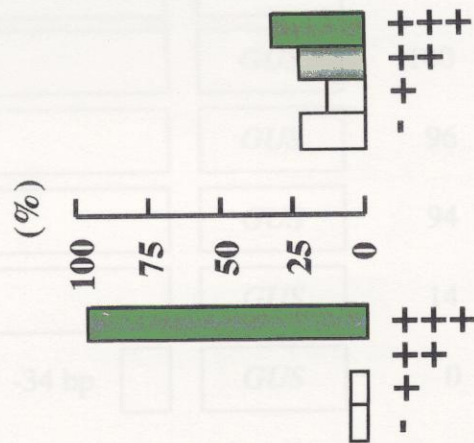
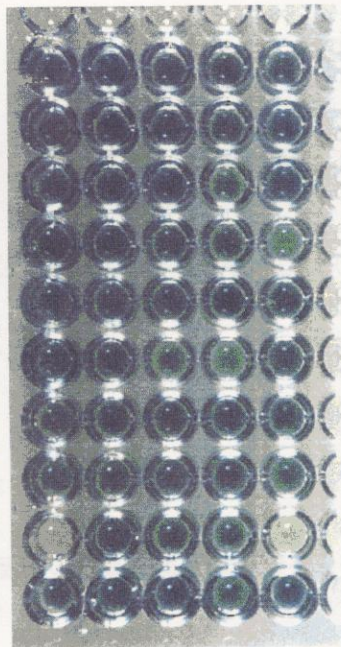
A: p35S core-*GUS*



B: ADH200-p35S core-*GUS*



C: ADH100-p35S core-*GUS*



D: PES200-p35S core-*GUS*

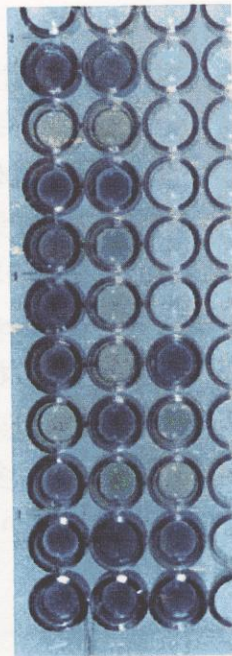


図3-4 形質転換BY2細胞のGUS活性染色

各融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞を50個体独立に取得し、GUS活性染色を行った。染色の程度を4段階に分け(+++：濃青色、++：青色、+：薄青色、-：白色)、その割合をヒストグラムにより示した。

第3項 ADH200 の他生物種による機能解析

我々が限定した ADH200 は、position effect を抑制し発現を安定化させていることが予想される。これらの機能は、報告されているインスレーターと類似している。このため、ADH200 がインスレーターとしての活性を有しているか解析を行った。インスレーターの解析方法として、エンハンサー遮断またはサイレンサーによるヘテロクロマチン構造伝搬を抑制する活性が指標として用いられている(Kellum and Schedl, 1992)。植物細胞では適当な実験系がないためエンハンサー遮断解析ではウニを用いて解析を行った(Akasaka et al., 1999)。またサイレンサーによるヘテロクロマチン構造伝搬の抑制の解析では酵母を用いて行い、ADH200 の他生物種における機能を解析した(Donze et al., 1999)。

まずウニにおけるエンハンサー遮断解析の結果を述べる。p*Ars-LUC* 遺伝子では*Ars* プロモーターの転写活性が弱いため LUC 活性は低い値であった(図 3-5A)。しかし*Ars* エンハンサーを付加した Enhancer-p*Ars-LUC* 遺伝子では、約 60 倍と大幅に LUC 活性値が増加した(図 3-5B)。エンハンサーとプロモーター間に*Ars* インスレーターが位置する Enhancer-INS-p*Ars-LUC* 遺伝子では、エンハンサーを遮断し p*Ars-LUC* 遺伝子と同程度の LUC 活性値を示した(図 3-5C)。なお同じ長さの DNA 断片を*Ars* インスレーターの代わりに挿入してもエンハンサーは遮断さなかった(data not shown)。またエンハンサーの外側にインスレーターを付加した INS-Enhancer-p*Ars-LUC* 遺伝子では、エンハンサーは影響を受けないことから、インスレーターは単なるサイレンサーではなく、方向性を有しエンハンサーとプロモーターの間に位置する場合にのみエンハンサーを遮断した(図 3-5D)。また我々が限定した ADH200 がエンハンサーとプロモーター間に位置する Enhancer-ADH200-p*Ars-LUC* 遺伝子では、p*Ars-LUC* 遺伝子と同程度の LUC 活性値を示した(図 3-5F)。このため ADH200 は*Ars* インスレーターと同様にエンハンサーを遮断することが示された。またエンハンサーの 5' 上流に ADH200 が位置する ADH200-Enhancer-p*Ars-LUC* 遺伝子では、エンハンサー付加時と比べ約 50%の活性低下が認められた(図 3-5G)。これらの結果から、ADH200 はウニにおいてエンハンサーを遮断することが明らかとなった。

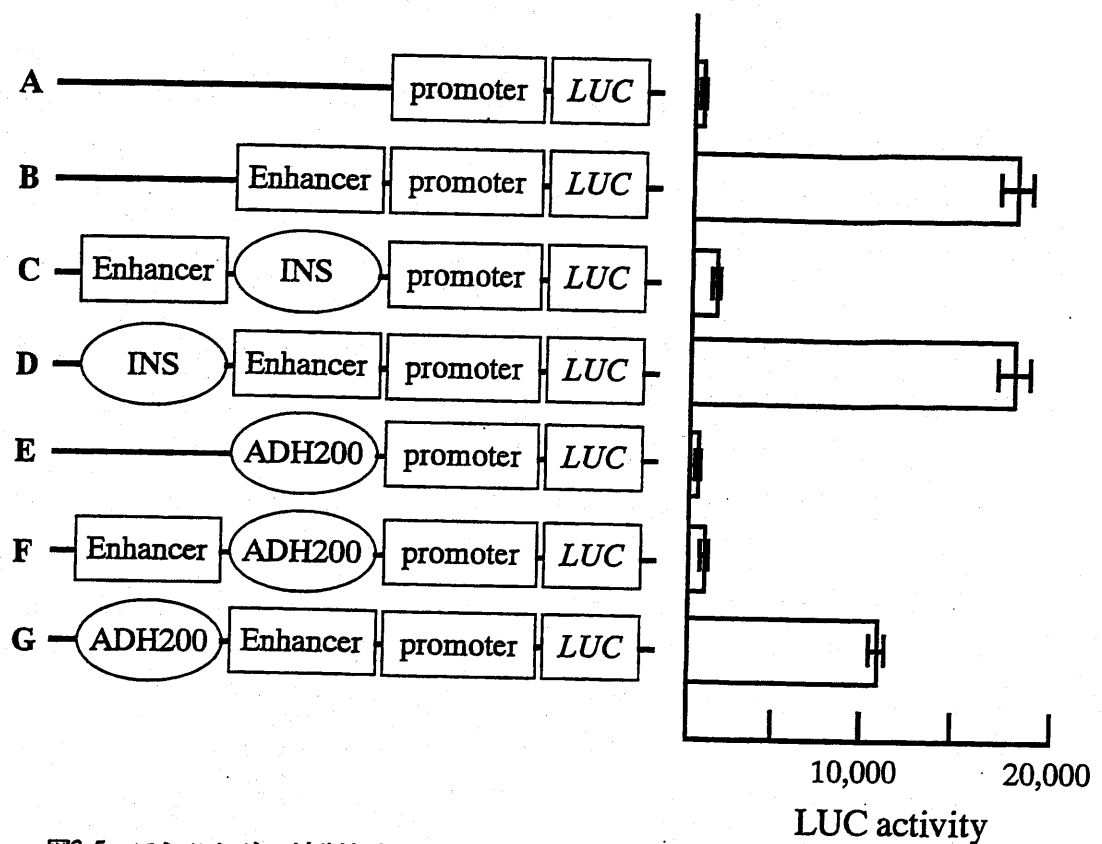


図3-5 エンハンサー遮断解析

各融合遺伝子をウニにパーティクルガンを用いて導入し、24 時間後にLUC活性測定を行った。Enhancer: *Ars* enhancer、promoter: *Ars* promoter、INS: *Ars* insulator、ADH200: *NtADH*プロモーターのTATAボックスの5'上流約 200 bp、LUC: *luciferase*。各3回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

また酵母の解析では HM 座に存在するサイレンサー E を用いて、サイレンサーによるヘテロクロマチン構造伝搬の抑制を解析した (図 3-6)。この解析には、ADH200 に加え、*gypsy* インスレーターおよび *Ars* インスレーターについても行った。対照としたサイレンサー I に隣接しその影響を遮断している 3'boundary を用いた場合、サイレンサー E を遮断し *a1* 遺伝子が発現するため、酵母は成育できなかった。一方 ADH200、*gypsy* インスレーターおよび *Ars* インスレーターは、酵母の成育が認められた。このため ADH200、*gypsy* インスレーターおよび *Ars* インスレーターは酵母においてヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制できないことが示された。

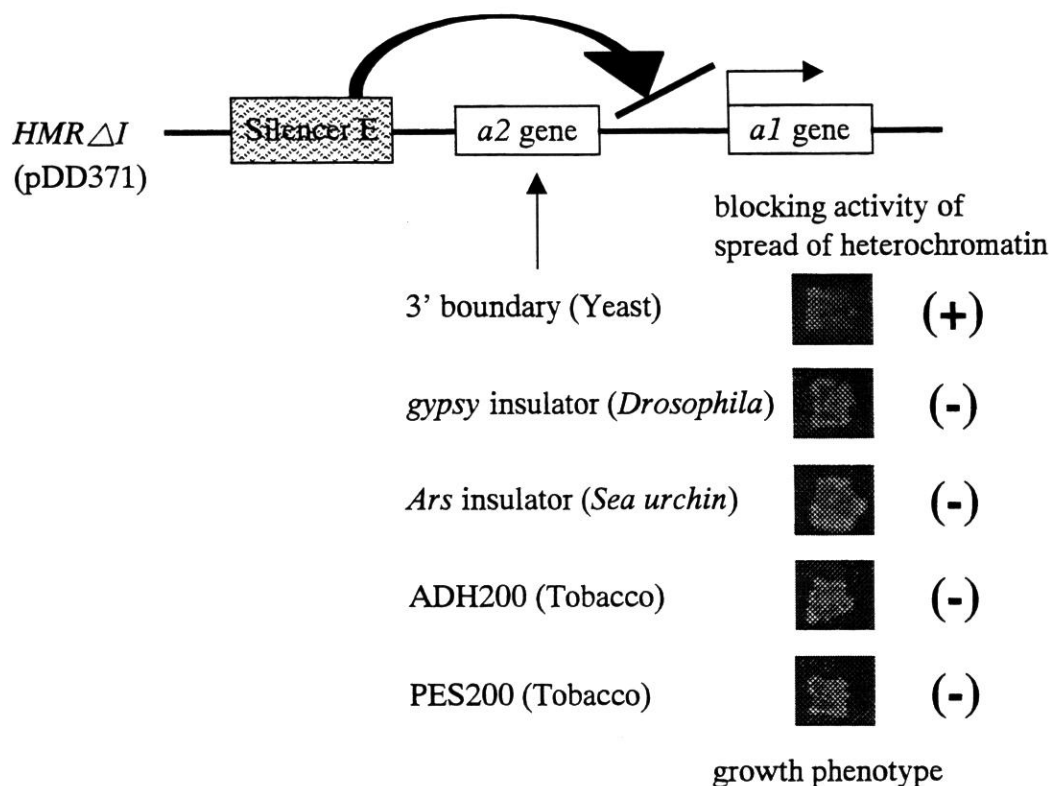


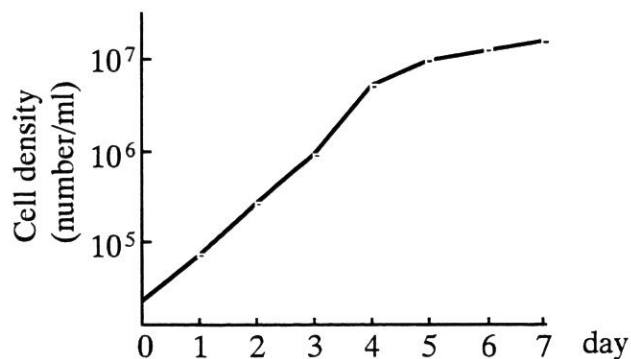
図3-6 サイレンサーEによるヘテロクロマチン構造伝搬の抑制の解析
*a2*遺伝子領域に各DNA断片を挿入した。導入したDNA断片がヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制する場合には、*a1*遺伝子が発現し酵母は成育できない。また抑制できない場合には、成育することができる。酵母の成育を指標として、ヘテロクロマチン構造伝搬の抑制活性を評価する。ヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制する活性を有する場合には (+)、有さない場合には (-) で示した。

第4項 ADH200 の転写活性化能

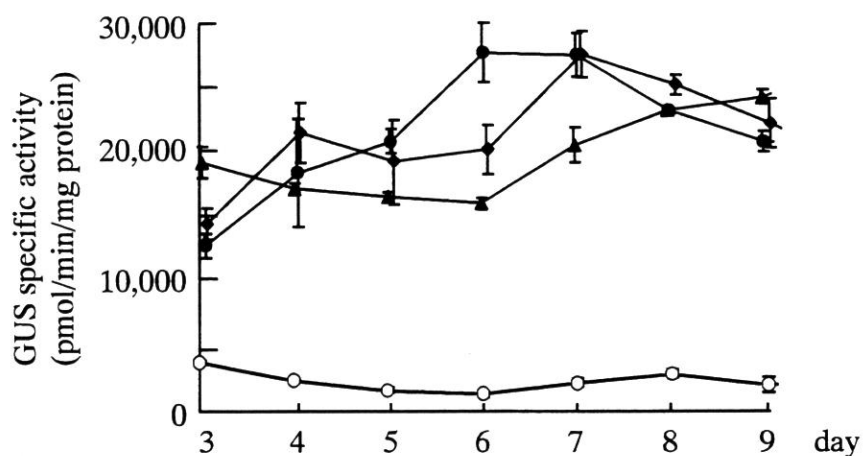
第2章の結果(図2-7)やこれまでの知見から、インスレーターは転写の活性化も不活性化も担わない、いわば中立の存在である(Bell and Felsenfeld, 1999)。ADH200 が転写を活性化するか調べるため、ADH200-p35S core-*GUS* 遺伝子を導入した形質転換 BY2 細胞の *GUS* 活性測定を行った(図3-7)。p35S core-*GUS* 遺伝子では、独立した10個体について調べたところ 500 pmol/min/mg protein 前後の活性値を示すことが多く、もっとも高い場合でも約 4,000 pmol/min/mg protein であった(図2-6A)。図3-7の解析には、高い *GUS* 活性を示す形質転換体を選出し対照として用いた。35S core プロモーターの発現様式は、培養5~6日目に若干活性が低下するが、培養経過を通じてほぼ一定に発現を示した(図3-7B、C)。次にADH200を付加したADH200-p35S core-*GUS* 遺伝子を導入した形質転換体から無作為に選出した3個体について解析を行ったところ、いずれも約 20,000 pmol/min/mg protein 前後の高い活性値を示した(図3-7B)。p35S core-*GUS* 遺伝子が 500 pmol/min/mg protein 前後の活性値を示すこ

とが多いことを考えると、約 40 倍の活性増加であった。またその発現様式は、個体間の異なりがあるが第 1 章で解析した *NtADH* プロモーターのような培養 6 ~7 日目だけに特異的に発現するものではなく (図 1-3C)、p35S core プロモーターの発現様式と類似していた (図 3-7C)。このため ADH200 による大幅な転写活性化が、領域内に存在するであろうシスエレメントによるものかどうかは、形質転換 BY2 細胞を用いた解析から判断することができなかった。

(A)



(B)



(C)

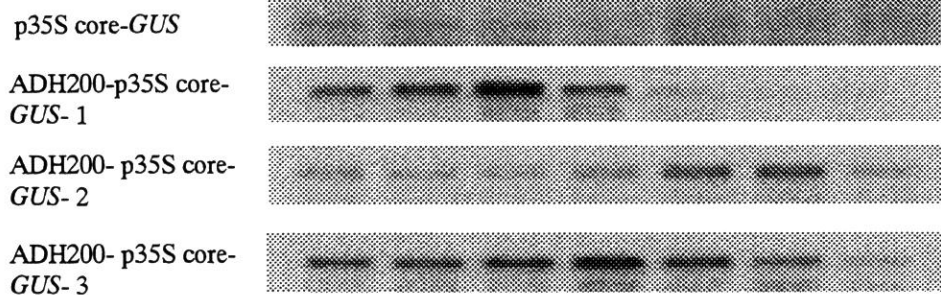


図3-7 形質転換BY2細胞のGUS活性およびmRNAの蓄積の経時変化

(A) タバコBY2細胞の増殖曲線。

(B) 各融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞のGUS活性の経時変化を測定した。各3回の実験結果の平均値と標準偏差を示した。

—○—, p35S core-GUS; —●—, ADH200-p35S core-GUS-1;
—▲—, ADH200-p35S core-GUS-2; —◆—, ADH200-p35S core-GUS-3.

(C) GUS遺伝子をプローブとして、ノザンハイブリダイゼーションを行った。各レーンには、全RNA 5 μ gを用いた。

ADH200 による大幅な転写活性化が、領域内に存在するシスエレメントによるものか調べるため、一過性発現実験を行った。p35S core プロモーターの転写活性が低いことが予想されるため、これまで形質転換体では *GUS* 遺伝子をレポーターとして用いてきたが、一過性発現においては *LUC* 遺伝子をレポーターとした。pCaMV35S-*LUC* 遺伝子、p35S core-*LUC* 遺伝子および ADH200-p35S core-*LUC* 遺伝子を、プロトプラスト BY2 細胞にエレクトロポレーションにより導入した。DNA 導入後、4、8、12、24 時間後の *LUC* 活性測定を行った (図 3-8)。p35S core-*LUC* 遺伝子および ADH200-p35S core-*LUC* 遺伝子の両活性はほぼ同程度であり、ADH200 の付加による転写活性化は一過性発現においては認められないことが明らかとなった。

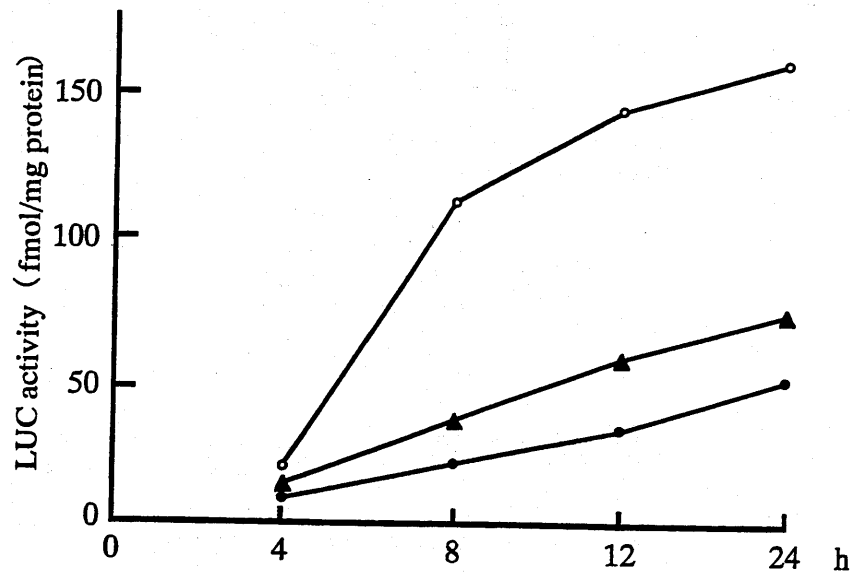


図3-8 各融合遺伝子の一過性発現実験

プロトプラストBY2細胞に各融合遺伝子をエレクトロポレーションを用いて導入し、4、8、12、24時間後の*LUC*活性を測定した。

縦軸は*LUC*活性、横軸は時間 (hour) を示す。

—○—, pCaMV35S-*LUC*; —●—, p35S core-*LUC*;

—▲—, ADH200-p35S core-*LUC*.

第5項 プロモーターに対する ADH200 の向きや距離が position effect の抑制に及ぼす影響

ADH200 を p35S core-*GUS* 遺伝子の 5' 上流に付加することにより position effect が抑制された (図 3-4B)。第2章の解析から *Ars* インスレーターにおける position effect の抑制は、35S プロモーターに対する向きには依存せず、また距離に関してはプロモーターから数百 bp 程度離れても機能することが明らかとなった。ADH200 の position effect 抑制についても、プロモーターに対する向きや距離による影響を解析した (図 3-9)。その際解析は図 2-9 と同様に行い、position effect の抑制が認められた場合を+、認められない場合を-として示した。p35S core-*GUS* 遺伝子の 5' 上流に ADH200 を付加した場合は、全形質転換体に *GUS* 遺伝子が発現し position effect の抑制が認められた (図 3-4B、図 3-9A)。しかし ADH200 を逆向きに付加した場合は、position effect の抑制が認められなかった (図 3-9B)。また ADH200 とプロモーター間の距離を離すため、約 200 bp の DNA 断片を挿入した場合においても、position effect の抑制が認められなかった (図 3-9C)。このため ADH200 の position effect 抑制は *Ars* インスレーターとは異なり、プロモーターに対する方向および距離に依存することが明らかとなった。また ADH200 とプロモーター間の距離に関しては数 bp の挿入による影響を解析したところ、5 bp の挿入には影響を受けず position effect の抑制が認められた (図 3-9D)。

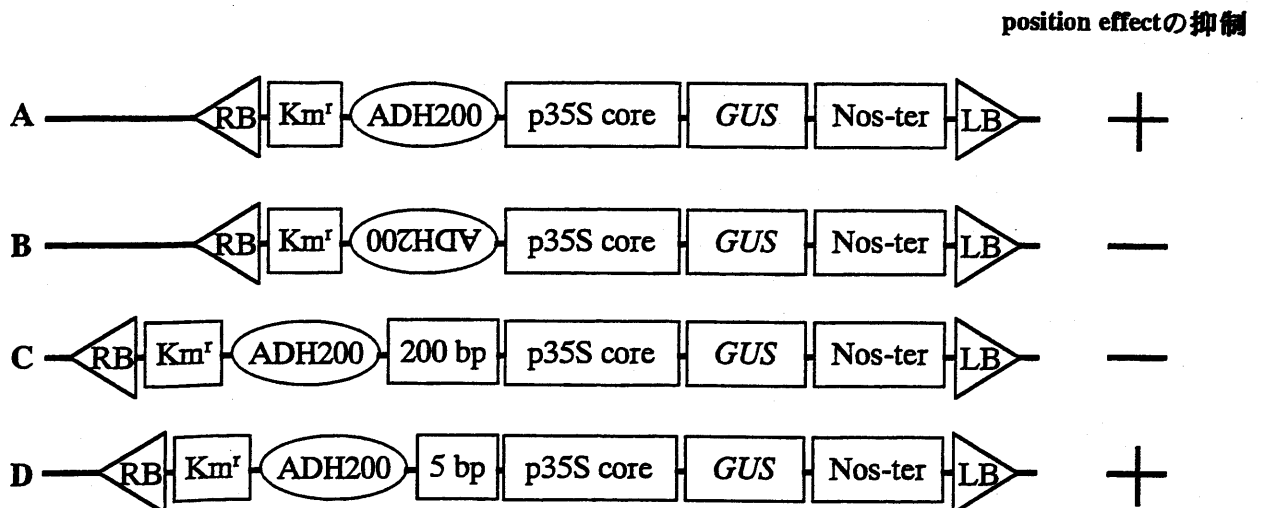


図3-9 プロモーターに対するADH200の向きや距離がposition effectの抑制に及ぼす影響
各融合遺伝子を導入した独立した50個体の形質転換体についてGUS活性染色を行った。
全形質転換体に染色が認められた場合は、position effectが抑制されたとして+で示した。
また染色が認められない個体が存在した場合には、position effectが抑制されないとして-で示した。
00ZHCV : 逆向きのADH200。

第4節 考 察

NtADH プロモーターの下流に連結した *GUS* 遺伝子を安定に発現させる機能は、TATA ボックスの 5' 上流領域の約 200 bp (ADH200) に限定された (図 3-3A)。ADH200 は p35S core-*GUS* 遺伝子の 5' 上流に付加することにより、position effect を抑制し *GUS* 遺伝子の発現を安定化させた (図 3-4A、B)。また他生物種であるウニにおいてエンハンサーを遮断した (図 3-5)。そして酵母においては *Ars* インスレーターや *gypsy* インスレーターと同じくヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制しなかった (図 3-6)。

ADH200 の position effect 抑制機構については、ADH200 が転写活性化を示すことから考察することができる。ADH200-p35S core-*GUS* 遺伝子を導入した形質転換 BY2 細胞では、ADH200 の付加により約 40 倍の大幅な *GUS* 活性値の増加が認められた (図 3-7B)。*NtADH* プロモーターの欠失解析から TATA ボックスの 5' 上流約 200 bp でも転写が行われることから、ADH200 領域内にはシスエレメントの存在が予想される (図 3-3A)。このため転写活性化がシスエレメントの付加によるものか調べるため、プロトプラスト BY2 細胞を用いた一過性発現実験を行った (図 3-8)。通常シスエレメントは、一過性発現か染色体上に組み込まれた安定性発現かを問わず転写を活性化することが知られている。しかし ADH200 は一過性発現実験において 35S core プロモーターの発現をわずかに 1.2 倍増加させるに留まった。また形質転換体における p35S core-*GUS* 遺伝子と ADH200-p35S core-*GUS* 遺伝子の発現様式には顕著な異なりが認められなかった (図 3-7)。これらの結果から、ADH200 による転写活性化はシスエレメントの付加が主たる影響ではなく、p35S core プロモーターが効率良く機能する転写環境の形成に起因すると考えられる。序論でも述べたが、染色体上では DNA がヌクレオソーム構造を呈することにより、転写抑制が生じている。しかし DNaseI 高感受性領域のような転写活性化状態の DNA-ヌクレオソーム構造が存在し、転写反応の効率良い鑄型となっている。したがって ADH200 も DNaseI 高感受性領域を形成することにより、転写活性化を引き起こすのではないだろうか。このためヌクレオソーム形成が不十分な一過性発現実験では、大幅な転写活性化を示すことができないと予想される。このように ADH200 は、何らかの機構により染色体構造に影響を与え、転写の安定化と活性化を行う機能配列である可能性が示唆された。今後は形質転換 BY2 細胞を用いて実際に ADH200 が DNaseI 高感受性領域の形成能を有するか解析する必要がある。また真核生物のヒストンは高度に保存され、ヌクレオソーム形成も類似の機構を有すると考えられることから、酵母をはじめ動物細胞を用いた解析も有効と考えられる。

DNaseI 高感受性領域の形成能を有する機能配列として、ニワトリおよびヒトの β -globin 遺伝子座の 5' 上流領域の LCR (locus control region) が知られている。外来遺伝子に LCR を付加して染色体上に導入すると、position effect の抑制および転写活性化が認められ、DNaseI 高感受性領域の形成が重要な機能を担っていると考えられている(Bulger and Groudine, 1999)。 β -globin LCR は、領域内に β -globin インスレーターや複数のエンハンサーを含んだ数 kb にも渡る複雑な機能配列であり、20~30 kb もの DNaseI 高感受性領域の形成能を有している(Martin et al., 1996)。ADH200 においても数 kb に渡り DNaseI 高感受性領域を形成し position effect を抑制するか調べるため、まず約 200 bp の DNA 断片を ADH200 とプロモーター間に挿入した解析を行った。その結果、GUS 遺伝子の発現にはばらつきが生じ、わずか 200 bp の挿入により position effect が抑制できないことが明らかとなった(図 3-9C)。このため ADH200 の position effect 抑制は、プロモーターの極く近傍に存在することが必要であることが示唆された。この結果は、*Ars* インスレーターがプロモーターから約 600 bp 離れても機能を有する結果と反するため、ADH200 と *Ars* インスレーターは異なる作用機構により position effect を抑制することが示唆された。またプロモーターとの距離に依存して活性を発揮する機能配列としてベント DNA が知られている。ベント DNA はその配列が特徴的であり、A (アデニン) または T (チミン) の連続が周期的に出現する。ADH200 の配列についても、A または T の周期的な配列が認められる(図 3-3B)。このため ADH200 がベント DNA であり、その機能を通じて position effect 抑制を行う可能性も考えられる。ベント DNA は、プロモーター領域内などに見い出され転写制御に関与している。その配列から特殊な折れ曲がり構造を呈し、その構造が基点となり順次ヌクレオソームが形成されると考えられている(Crothers et al., 1990)。したがってベント DNA による転写制御は、種々のシスエレメントと転写因子との結合をヌクレオソームの配置を制御することにより行われる。ベント DNA のこのような性質を用いて解析することができる。DNA はヌクレオソームを約 10 bp で一周するため、対象配列とシスエレメント間の距離を 5 bp 変化させることにより DNA とヌクレオソームの位相がずれる。したがって 5 bp 塩基挿入による周期的なシスエレメントの機能発揮が認められる場合には、ベント DNA によるヌクレオソームの配置に関与していると考えることができる。ADH200 についてもプロモーター間の距離を 5 bp 変化させたが、その影響を受けず position effect 抑制が認められた(図 3-9D)。このため ADH200 の position effect 抑制はベント DNA の機能によるものではないと示唆された。上述したように ADH200 の塩基配列は、A または T に富んだ配列である。このような配列について興味深い報告がなされている。in

vitro において AT が数十 bp 程度連続した配列は、ヌクレオソームの形成が不安定であることが示された(Kunkel and Martinson, 1981; Prunell, 1982)。さらに酵母やヒトにおいて *in vivo* で AT 配列はヌクレオソームの形成が不安定、つまり DNaseI 高感受性領域が形成され、その結果種々の転写因子の接近が容易になることが示された(Iyer and Struhl, 1995; Koch and Thiele, 1999)。さらに AT を GC に置換した GC 配列においても同様な結果が示された(Iyer and Struhl, 1995)。酵母の多くのプロモーターでは AT や GC 配列が認められるが、それらの配列の機能の一部は、ヌクレオソームの形成に関与しているのかもしれない。これらの知見から ADH200 における DNaseI 高感受性領域の形成は、AT 配列による局所的な形成である可能性が示唆された。

次に ADH200 とプロモーター間の距離は同一であるが、ADH200 の向きを反対にした解析を行ったところ、position effect は抑制できなかった(図 3-9B)。ADH200 の配列による DNaseI 高感受性領域の局所的な形成が position effect 抑制に必要十分である場合には、ADH200 のプロモーターに対する距離は重要であるがその向きは重要ではないはずである。しかし向きを逆にすることにより ADH200 の機能は失われたことから、DNaseI 高感受性領域の形成以外の因子の関与が考えられる。酵母においては転写因子をテロメア領域にリクルートすることにより、ヘテロクロマチン構造の形成を抑制または破壊することが示された(Aparicio and Gottschling, 1994)。このような知見から ADH200 領域に結合するタンパク質因子が機能発揮に必要であり、そのタンパク質因子がプロモーターとの距離に影響を受ける可能性が示唆された。このため ADH200 は、AT 配列による局所的な DNaseI 高感受性領域の形成にタンパク質因子の存在が加わることで、一種の染色体上の境界領域として機能し position effect を抑制することが示唆された。今後 ADH200 の結合タンパク質の単離やその結合配列の同定などを行う必要がある。

ADH200 は、ウニにおいて *Ars* エンハンサーを遮断した。第 2 章の緒言において *gypsy* インスレーターのエンハンサー遮断機構について述べたが、他のインスレーターも同様の機構を用いているのかは明らかではない。またエンハンサーの作用機構も同一ではないと予想され、これまでの知見をまとめると次の 1~4 に大別される。1) タンパク質とタンパク質の結合による制御。これは DNA の折り曲げを伴い、エンハンサー結合タンパク質と基本転写装置が直接結合することにより、プロモーター上で形成される巨大な転写開始複合体の形成が容易となり転写活性化が促される(Ptashne and Gann, 1997; Rippe et al., 1995; Wang and Gjaever, 1988)。2) タンパク質のリン酸化やアセチル化による制御。RNA polymerase II のカルボキシル末端のリン酸化による転写活性の増加や

ヒストンのアセチル化によるユウクロマチン構造の形成が挙げられる(Hebbes et al., 1994; Luger et al., 1997)。また多くのアクチベーターが HAT 活性を持ち、一方リプレッサーが HDAC 活性を持つことも報告されている(Brownell and Allis, 1996; Struhl, 1998; Wolffe and Pruss, 1996)。また HAT や HDAC の基質はヒストン以外にも考えられ、腫瘍抑制遺伝子である p53 (protein 53kDa) や基本転写因子である TFIIE (transcription factor IIE) や TFIIIF (transcription factor IIF) がアセチル化されることが報告されている(Gu and Roeder, 1997; Imhof et al., 1997)。このようにエンハンサーにリクルートされるアクチベーターやコアクチベーターがヒストンや転写因子のアセチル化を介して転写活性化が促される。3) ヌクレオソームのリモデリングによる制御。第 2 章の緒言で述べたように、ヌクレオソームリモデリング因子がヘテロクロマチン構造を変換し、転写因子等のタンパク質因子の接近を容易にすることにより転写活性化が促される(Hartzog and Winston, 1997; Kadonaga, 1998; Pazin and Kadonaga, 1997)。4) 核内での位置による制御。核内の核マトリックス周辺の区画などは転写因子が多く存在していることやユウクロマチン構造とヘテロクロマチン構造の核内での位置は対照的であり、前者は核マトリックス周辺など一定の位置に存在しているが、後者には局在が認められない(Csink and Henikoff, 1996; Francastel et al., 1999; Lamond and Earnshaw, 1998; Milot et al., 1996)。このためエンハンサーが転写因子等の豊富に存在する核内の区画にターゲットすることにより転写活性化が促される。このようにエンハンサーの転写活性化の機構は 1~4 に大別することができるが、近距離における転写活性化と遠距離におけるそれは異なる可能性があり、数十 kb にも渡る転写活性化をどのような機構により行っているか、我々は知りえていない。しかしこの点について新たな報告がなされた。ショウジョウバエの Chip タンパク質は染色体に存在し、遺伝学的な解析からエンハンサーとプロモーターの相互作用に必要であり、多くの遺伝子の転写活性化を行う。しかし、Chip タンパク質自身は、転写活性化に直接関与しないことからエンハンサーとプロモーター間の相互作用を橋渡しまたは安定化するような機能を持つことが示唆された(Morcillo et al., 1997; Morcillo et al., 1996)。今後解析が進めばエンハンサーが遠距離のプロモーターを活性化する機構が解明されるかもしれない。このようにエンハンサーについては様々な機能が報告されているが、基本的にはタンパク質因子の作用によると考えられることから、インスレーターはタンパク質因子の作用を阻害することにより、エンハンサーによる転写活性化を遮断すると予想される。その阻害に関しては主に 2 つのモデルに集約され、1) インスレーターに結合するタンパク質が阻害する、2) インスレーターが核膜付近で高次構造を形成し阻害する、ことが挙げられる。近年 2) のモデルに

ついて、通常エンハンサー遮断解析は染色体上に導入した形質転換体を用いた解析が行われるが、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた一過性発現実験から新しい知見が得られた(Dunaway et al., 1997)。この解析系では、DNA を導入した後 4 時間程度でヌクレオソーム構造が形成される。しかし DNA を導入した後、わずか 30 分程度でエンハンサー遮断が認められた。このためエンハンサー遮断には高次構造の形成は必須ではないと考えられ、現在 2) のモデルについては否定的である。また *gypsy* インスレーターについては *su* (Hw) および *mod* (*mdg4*) タンパク質、 β -globin インスレーターでは CTCF タンパク質、*scs-scs'* インスレーターでは BEAF-32 (boundary element-associated factor of 32 kDa) タンパク質がエンハンサー遮断に必要であることが報告されている(Bell et al., 1999; Gdula et al., 1996; Hart et al., 1997)。また染色体上に BEAF-32 は点在しており、その結合領域を調べたところエンハンサー遮断活性を有することが示された(Zhao et al., 1995)。このためインスレーターに結合するタンパク質がエンハンサー結合タンパク質の作用を阻害する 1) のモデルが有力である。またショウジョウバエの *eve* (*even-skipped*) プロモーターでは、TATA ボックス近傍の領域がエンハンサーを遮断することが示された(Ohtsuki and Levine, 1998)。これは *eve* プロモーター領域内の GAGA 配列にリクルートされる巨大なタンパク質複合体である GAGA 因子がエンハンサー結合タンパク質の作用を阻害すると考えられている(Ohtsuki and Levine, 1998)。このような知見から、インスレーターのエンハンサー遮断に関しては何らかのタンパク質因子が存在することが必要と考えられる。このため *ADH200* についても、結合タンパク質因子の単離・解析が必要である。ショウジョウバエの *ADH* 遺伝子の 5' 上流領域には、時期特異的な発現に機能する AAE (*adh* adult enhancer) エンハンサーが存在する(Corbin and Maniatis, 1989; Corbin and Maniatis, 1989)。またエンハンサーに結合するタンパク質として AEF-1 (adult enhancer factor 1) が単離された(Falb and Maniatis, 1992)。AEF-1 タンパク質の結合配列に変異を加えると、*Adh* 遺伝子の発現が 5~10 倍増加することや *in vitro* の結合実験において AEF-1 タンパク質はアクチベーターの AAE エンハンサーへの結合を阻害した。このため AEF-1 タンパク質は、AAE エンハンサーの活性を負に制御するリプレッサータンパク質と考えられている(Falb and Maniatis, 1992)。またヒトの *ADH* 遺伝子の 5' 上流領域にも AEF-1 タンパク質の結合が認められる(Falb and Maniatis, 1992)。AEF-1 タンパク質の結合配列は、ショウジョウバエでは 5'-GCAGCAACAACACGATC-3' 配列であり、ヒトでは 5'-TACACAAGCAAACAAA-3' 配列である(下線がコンセンサス配列)(Ren and Maniatis, 1998)。今回解析した *NtADH* プロモーターには、コンセンサス配列と一致する配列は認められないが、TATA ボックスの 5' 上流-100 bp 付近

に CAA 配列の繰り返し認められ、若干の相同性が認められる。*NtADH* プロモーターは通常抑制状態にあり培養後期の一瞬に急激な転写活性化が生じ、その後速やかに抑制状態に移行するが(図 1-3)、この遺伝子発現の抑制に ADH200 領域内に結合するリプレッサータンパク質が関与する可能性も考えられる。そしてこの種のタンパク質のホモログがウニにおけるエンハンサー遮断に機能したのかもしれない。

これまでにエンハンサーを遮断する DNA 断片は数多く報告され、DNaseI 高感受性領域が頻繁に認められる。ショウジョウバエ *hsp70* 遺伝子の周辺に同定された *scs-scs'* インスレーターやニワトリおよびヒトの β -globin インスレーターも領域内に DNaseI 高感受性領域を有する(Chung et al., 1993; Kellum and Schedl, 1992)。また *TCR α* (*T cell receptor α*) 遺伝子の 3' 下流領域やウニの *early histone* 遺伝子の 3' 末端領域なども DNaseI 高感受性領域でありエンハンサーを遮断する(Palla et al., 1997; Zhong and Krangel, 1999)。エンハンサー遮断にはタンパク質因子が必要であることは明らかであろうが、DNaseI 高感受性領域が必要であるかは明らかではない。しかしエンハンサーの機能がヒストンやヌクレオソーム構造を介する場合には、それ自身が存在しない領域には機能を果たさない可能性もある。このため何らかの必要性があって DNaseI 高感受性領域が形成されているかもしれない。また DNaseI 高感受性領域以外にも、エンハンサーを遮断する DNA 断片の報告がなされている。*gypsy* インスレーターは DNaseI 高感受性領域が関与することなく、ほとんど全てのエンハンサーを遮断する(Corces and Geyer, 1991; Rollins et al., 1999)。その他、アフリカツメガエルの rRNA 遺伝子間のスペーサー領域も報告されている(Robinett et al., 1997)。このように、エンハンサーを遮断するという現象は頻繁に認められ、我々が解析した ADH200 もその一例であると想像される。ADH200 のエンハンサー遮断はタンパク質因子によるものか、もしくは DNaseI 高感受性領域の形成によるものか、または両者によるものか明らかではない。今後はこの観点からの解析も必要である。

酵母の HM 座を用いたヘテロクロマチン構造の伝搬の抑制について解析を行った。その結果 HM 座に隣接する 3' boundary はヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制したが、*gypsy* インスレーター、*Ars* インスレーターおよび ADH200 は抑制しなかった(図 3-6)。可能性として、酵母には活性発揮に必要なタンパク質が存在しないことも考えられる。また酵母と他の真核生物のヘテロクロマチン構造形成に関与するタンパク質が異なる可能性もある。今後はショウジョウバエの PRE を用いたヘテロクロマチン構造の伝搬の抑制について解析を行う必要がある。また *gypsy* インスレーターなどは、活性発揮に必要なタンパク質が判明していることから、それらのタンパク質を酵母に発現させた場合に機能す

るのか興味深い解析であろう。

これまでインスレーターは非常に特殊な DNA 配列であるという印象があった。しかし酵母においてプロモーター領域や構造遺伝子領域がインスレーターとして機能することが報告されている。パン酵母の *TEF* (*translational elongation factor*) 遺伝子のプロモーター (145 bp) は、ヘテロクロマチン構造の伝搬を抑制できることが明らかになった(Bi and Broach, 1999)。また HM 座に隣接する 3'boundary は同様の機能を示し、その領域内はトランスポゾンである TY1 LTR と tRNA 遺伝子が存在していた(Donze et al., 1999)。さらに両者は遺伝子発現が抑制されているテロメア領域に導入しても、機能することが報告された。これらの知見は、異なる様々な機構が結果としてインスレーターとしての活性を示しているように思える。また酵母のテロメア領域では従来の認識と異なり、ヘテロクロマチン構造が長距離に渡って一様に形成されているのではなく、数 kb の局所的な不活性領域が点在していることが明らかとなり、活性化領域と不活性化領域間にはインスレーターが存在していることが示唆された(Fourel et al., 1999; Pryde and Louis, 1999)。このように酵母においてはインスレーターが多く存在していると考えられる。酵母の染色体はコンパクトであり、遺伝子は隙間なく存在している。このようなゲノム構成を考えた場合、プロモーターや構造遺伝子がインスレーターと成りえることは、非常に有利な戦略と思われる。一方、動・植物細胞は長大なゲノムを有しているが、プロモーターや構造遺伝子をインスレーターとして利用しているのであろうか。今回 *NtADH* プロモーター領域がインスレーターとして機能している可能性が示されたが、植物細胞の遺伝子発現制御は転写開始点近傍の数 kb で調節されることが多い。また、動物細胞で見られる位置や方向に関係なく機能するエンハンサーやサイレンサーの報告もない。これらの知見は植物細胞が、酵母の遺伝子発現制御により近く、*NtADH* プロモーターのように転写開始点近傍でインスレーターを形成し、周辺の影響を遮断する戦略をとっているのかもしれない。

我々は植物細胞から初めて発現の安定化に寄与する機能領域を見い出した。そのモデルを提示するには、現在得られている知見はあまりに少ないが、想像される作用機構を図 3-10 に示した。

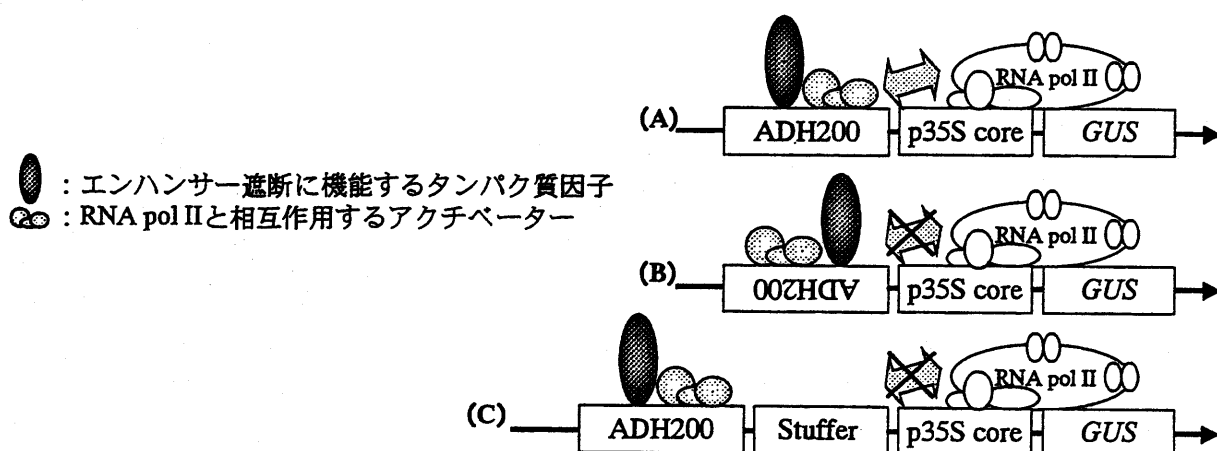


図3-10 ADH200のposition effect抑制機構に関するモデル

(A) ADH200のAT配列により局所的なDNaseI高感受性領域が形成される。次にアクチベーターと基本転写装置が相互作用し転写活性型構造が固定され、position effectが抑制される。

(B) ADH200が逆向きの場合、アクチベーターと基本転写装置の相互作用がエンハンサー遮断に機能するタンパク質因子に阻害され、転写活性型構造が固定できずposition effectは抑制できない。

(C) Steffer (200 bp) が挿入された場合、アクチベーターと基本転写装置の距離が離れ相互作用が困難となり、転写活性型構造が固定できずposition effectは抑制できない。

ADH200 の position effect 抑制機構はおそらく他のインスレーターとは異なり、はじめに AT 配列による DNaseI 高感受性領域の局所的な形成が起こり、次いで ADH200 領域に結合するアクチベーターが基本転写装置等と相互作用することにより、転写活性型構造が固定される。その結果インスレーターとして機能し、position effect 抑制およびプロモーターの転写活性の増大を担っていると推測している。このため ADH200 が逆向きの場合ではエンハンサー遮断に機能するタンパク質が相互作用を阻害し、また 200 bp の DNA 断片が挿入された場合においても距離が遠くなることにより相互作用が阻害される。このため転写活性型構造が固定できず、ADH200 は機能を発揮できないと考えている。これらのモデルはあくまでも推測にすぎないため、今後は更なる解析を行う必要がある。

ADH200 の position effect 抑制機構については明らかではないが、これらの機能はタバコ BY2 細胞を宿主とした有用物質生産系等への利用には非常に有益なものである。今後は *Ars* インスレーターと同様に、植物体における発現のばらつきや成育に伴う発現の不活性化の抑制について解析する必要がある。また植物細胞以外に形質転換動物やウィルスベクターを用いたヒトの遺伝子治療などへの利用も視野に入れ研究を行う必要がある。

総合考察

植物細胞における外来遺伝子発現の不活性化は、染色体構造による position effect と過剰量の RNA が起因となる PTGS と言われている。これらの知見の多くは、CaMV35S プロモーターを用いて顕著に発現が不活性化した形質転換体を対象とした解析により得られている。個々のメカニズムを解明することはもちろん重要であるが、形質転換体の作出において最も必要な知見は、ある頻度で必ず生じる不活性化が何に起因し、どのような手段により抑制できるかを明らかにすることであろう。しかし現状では不活性化の要因が、position effect であるのか、または PTGS であるのか、もしくは複合的なものなのか明らかでない。本研究では、タバコ BY2 細胞をモデル系に種々の遺伝子導入を行った多数の形質転換体を解析することによって、外来遺伝子の発現安定化に寄与できる知見の蓄積を行った。

まず、動物細胞で position effect を抑制することが報告されているインスレーターが植物細胞においても機能することを示した。またトレニア (*Torenia fournieri*) を宿主とした解析では、*Ars* インスレーターを付加した pCaMV35S-*GUS* 遺伝子を導入した形質転換体は、インスレーターを付加しない場合に比べて *GUS* 活性の高いクローンが多く見られた (農水省・野菜茶業試験場、間竜太郎、柴田道夫両博士私信)。この結果は、*Ars* インスレーターが植物体においても機能することを示唆している。しかし、タバコ BY2 細胞では、転写活性が強力な CaMV35S 全長プロモーターの発現をインスレーターによって安定化することはできなかった。この原因が植物特有に見られる PTGS であるなら、実用的な安定発現系の構築には、インスレーターによる position effect 抑制に加え、PTGS 抑制技術を併用しなければならない。植物ウイルス由来の因子 (P1/Hc-pro) の利用を始め、PTGS を抑制する技術の開発が待たれるところである。また、これまでに MAR による position effect の抑制が報告されてきたが、解析結果に統一性が認められない。しかし、MAR の効果を調べる実験のほとんどが CaMV35S プロモーターを用いているため、本研究におけるインスレーターの解析と同様に PTGS の影響が加わっていると考えれば、結果に統一性を求めるのは困難であろう。本研究の 35S コアプロモーターを用いた解析系により、既知の MAR の効果を調べる必要性を感じる。

また、本研究では外来遺伝子発現系に利用しうる有用プロモーターを単離する方法論を確立し、単離したプロモーターは汎用される CaMV35S プロモーターに匹敵する転写活性を有していた。これは、本単離法の有用性を示して

おり、今後、種々の目的に対応したプロモーターの取得に利用可能である。さらに、内在性の（ウイルス由来ではない）プロモーターの探索によって安定発現プロモーターが単離できる可能性も考えられる。実際、単離したプロモーターの中で、*NtADH* プロモーターは発現の不活性化が起こらないことが示された。この発現安定化に機能する領域を、TATA box の 5' 上流側 200 bp に限定した (ADH200)。発現安定化の分子メカニズムは非常に興味深い、ADH200 が *NtADH* 遺伝子の 5' 上流シス領域（発現に正に働く領域）と重複していることや植物における解析系の制限などを考えると、その説明は容易ではないと予想される。このような状況で、ADH200 がウニの解析系においてエンハンサー遮断活性を示したことが何らかの糸口になるかもしれない。いずれにしても、インスレーターや ADH200 の効果は、植物細胞におけるはじめての知見であり、植物染色体上での遺伝子発現を解析する新しい切り口になると共に、外来遺伝子の安定発現系構築の突破口を開く可能性を秘めている。また、*NtADH* 遺伝子の 5'UTR が高い翻訳効率を示すことも外来遺伝子発現系（目的タンパク質の高生産系）を考える上で重要な知見である。

序論でも述べたが、21 世紀に向けて植物バイオテクノロジーが果たすべき役割は大きい。環境・食糧問題を解決するために真に実用的な植物を分子育種する必要に迫られている。そのために、外来遺伝子を目的に応じて正しく発現させる系の開発が急務である。外来遺伝子の発現を正しく制御することは、現在、各方面で問題となっている遺伝子組換え植物の安全性を保証する上でも重要な要素である。本研究の成果を実用的な遺伝子発現系へと発展させることが、次の研究目標となる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御指導を賜りました新名 惇彦教授に心から御礼申し上げます。

直接御指導を賜りました吉田 和哉助教授、有益な御助言を頂きました関根 政実助手、加藤 晃助手に深く感謝致します。また貴重な御助言、御討論頂きました赤坂 甲治助教授、大山 隆助教授に深く感謝致します。

本研究の共同研究者として御協力頂きました、柴田 道夫博士（農水省・野菜茶業試験場）、間 竜太郎博士（農水省・野菜茶業試験場）、中井 勇太氏（現、味の素株式会社）、西川 純一氏（甲南大学）、鈴木 満恵氏、吉岡 光江氏、三原 加寿代氏ならびに新名研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

最後に博士課程への進学を快諾し、惜しみない援助をして頂いた父、ならびに母そして家族に心から感謝します。

参考文献

- Akasaka, K., Nishimura, A., Takata, K., Mitsunaga, K., Mibuka, F., Ueda, H., Hirose, S., Tsutsui, K., and Shimada, H. (1999). Upstream element of the sea urchin arylsulfatase gene serves as an insulator. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* 45, 555-65.
- Allen, G. C., Hall, G., Jr., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A. K., and Thompson, W. F. (1996). High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* 8, 899-913.
- Allen, G. C., Hall, G. E., Jr., Childs, L. C., Weissinger, A. K., Spiker, S., and Thompson, W. F. (1993). Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant Cell* 5, 603-13.
- An, G. (1985). High-efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology* 79, 568-570.
- Aparicio, O. M., and Gottschling, D. E. (1994). Overcoming telomeric silencing: a trans-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes Dev* 8, 1133-46.
- Bell, A. C., and Felsenfeld, G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* 9, 191-8.
- Bell, A. C., West, A. G., and Felsenfeld, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387-96.
- Benfey, P. N., Ren, L., and Chua, N. H. (1990). Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J* 9, 1685-96.
- Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12, 8711-21.
- Bi, X., and Broach, J. R. (1999). UASrpg can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes Dev* 13, 1089-101.
- Bird, A. P., and Wolffe, A. P. (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-4.

- Blackwood, E. M., and Kadonaga, J. T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 61-3.
- Braunstein, M., Sobel, R. E., Allis, C. D., Turner, B. M., and Broach, J. R. (1996). Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol* 16, 4349-56.
- Breyne, P., van Montagu, M., Depicker, N., and Gheysen, G. (1992). Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *Plant Cell* 4, 463-71.
- Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-84.
- Bulger, M., and Groudine, M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13, 2465-77.
- Burcin, M., Arnold, R., Lutz, M., Kaiser, B., Runge, D., Lottspeich, F., Filippova, G. N., Lobanenko, V. V., and Renkawitz, R. (1997). Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol Cell Biol* 17, 1281-8.
- Chung, J. H., Whiteley, M., and Felsenfeld, G. (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74, 505-14.
- Church, G. M., and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1991-5.
- Cockell, M., and Gasser, S. M. (1999). Nuclear compartments and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 9, 199-205.
- Cook, P. R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science* 284, 1790-5.
- Corbin, V., and Maniatis, T. (1989). The role of specific enhancer-promoter interactions in the *Drosophila* Adh promoter switch. *Genes Dev* 3, 2191-20.

Corbin, V., and Maniatis, T. (1989). Role of transcriptional interference in the *Drosophila melanogaster* Adh promoter switch. *Nature* 337, 279-82.

Corces, V. G., and Geyer, P. K. (1991). Interactions of retrotransposons with the host genome: the case of the gypsy element of *Drosophila*. *Trends Genet* 7, 86-90.

Crothers, D. M., Haran, T. E., and Nadeau, J. G. (1990). Intrinsically bent DNA. *J Biol Chem* 265, 7093-6.

Csink, A. K., and Henikoff, S. (1996). Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature* 381, 529-31.

Cuvier, O., Hart, C. M., and Laemmli, U. K. (1998). Identification of a class of chromatin boundary elements. *Mol Cell Biol* 18, 7478-86.

De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., and Spierer, P. (1996). The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* 384, 589-91.

Dehio, C., and Schell, J. (1994). Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5538-42.

DeLisle, A. J., and Ferl, R. J. (1990). Characterization of the *Arabidopsis* Adh G-box binding factor. *Plant Cell* 2, 547-57.

Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (1994). Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis* Adh gene. *Plant Physiol* 105, 1075-87.

Donze, D., Adams, C. R., Rine, J., and Kamakaka, R. T. (1999). The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 13, 698-708.

Dunaway, M., Hwang, J. Y., Xiong, M., and Yuen, H. L. (1997). The activity of the scs and scs' insulator elements is not dependent on chromosomal context. *Mol Cell Biol* 17, 182-9.

Falb, D., and Maniatis, T. (1992). A conserved regulatory unit implicated in tissue-specific gene expression in *Drosophila* and man. *Genes Dev* 6, 454-65.

- Falb, D., and Maniatis, T. (1992). *Drosophila* transcriptional repressor protein that binds specifically to negative control elements in fat body enhancers. *Mol Cell Biol* 12, 4093-103.
- Fang, R. X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S., and Chua, N. H. (1989). Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* 1, 141-50.
- Filippova, G. N., Fagerlie, S., Klenova, E. M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P. E., Collins, S. J., and Lobanenko, V. V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* 16, 2802-13.
- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8449-54.
- Fourel, G., Revardel, E., Koering, C. E., and Gilson, E. (1999). Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J* 18, 2522-37.
- Francastel, C., Walters, M. C., Groudine, M., and Martin, D. I. (1999). A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centrometric heterochromatin. *Cell* 99, 259-69.
- Gaszner, M., Vazquez, J., and Schedl, P. (1999). The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes Dev* 13, 2098-107.
- Gdula, D. A., Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (1996). Genetic and molecular analysis of the gypsy chromatin insulator of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9378-83.
- Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (1998). Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* 92, 511-21.
- Geyer, P. K., and Corces, V. G. (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev* 6, 1865-73.

Grant, S. R. (1999). Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. *Cell* 96, 303-6.

Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.

Hart, C. M., Zhao, K., and Laemmli, U. K. (1997). The scs' boundary element: characterization of boundary element-associated factors. *Mol Cell Biol* 17, 999-1009.

Hartzog, G. A., and Winston, F. (1997). Nucleosomes and transcription: recent lessons from genetics. *Curr Opin Genet Dev* 7, 192-8.

Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J* 13, 1823-30.

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583-92.

Holmes-Davis, R., and Comai, L. (1998). Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression. *Trends in Plant Science* 3, 91-97.

Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-28.

Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P., and Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 268, 305-14.

Imhof, A., Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* 7, 689-92.

Iyer, V., and Struhl, K. (1995). Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *EMBO J* 14, 2570-9.

- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6, 3901-7.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-91.
- Kadonaga, J. T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307-13.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-70.
- Kellum, R., and Schedl, P. (1992). A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer- blocking assay. *Mol Cell Biol* 12, 2424-31.
- Kellum, R., and Schedl, P. (1991). A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64, 941-50.
- Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-52.
- Klenova, E. M., Nicolas, R. H., Paterson, H. F., Carne, A. F., Heath, C. M., Goodwin, G. H., Neiman, P. E., and Lobanenko, V. V. (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol Cell Biol* 13, 7612-24.
- Koch, K. A., and Thiele, D. J. (1999). Functional analysis of a homopolymeric (dA-dT) element that provides nucleosomal access to yeast and mammalian transcription factors. *J Biol Chem* 274, 23752-60.
- Kunkel, G. R., and Martinson, H. G. (1981). Nucleosomes will not form on double-stranded RNA or over poly(dA).poly(dT) tracts in recombinant DNA. *Nucleic Acids Res* 9, 6869-88.
- Kyozuka, J., Olive, M., Peacock, W. J., Dennis, E. S., and Shimamoto, K. (1994). Promoter elements required for developmental expression of the maize Adh1 gene in transgenic rice. *Plant Cell* 6, 799-810.

Lamond, A. I., and Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547-53.

Lobanenkov, V. V., Nicolas, R. H., Adler, V. V., Paterson, H., Klenova, E. M., Polotskaja, A. V., and Goodwin, G. H. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5, 1743-53.

Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 163, 16-20.

Loo, S., and Rine, J. (1994). Silencers and domains of generalized repression. *Science* 264, 1768-71.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-60.

Martin, D. I., Fiering, S., and Groudine, M. (1996). Regulation of beta-globin gene expression: straightening out the locus. *Curr Opin Genet Dev* 6, 488-95.

Matzke, M. A., and Matzke, A. J. (1998). Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cell Mol Life Sci* 54, 94-103.

Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P. D., and Flavell, R. B. (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* 88, 845-54.

Millar, A. J., Short, S. R., and Hiratsuka, K. (1992). Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 324-337.

Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F., and Fraser, P. (1996). Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87, 105-14.

Mlynarova, L., Loonen, A., Heldens, J., Jansen, R. C., Keizer, P., Stiekema, W. J., and Nap, J. p. (1994). Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell* 6, 417-426.

- Morcillo, P., Rosen, C., Baylies, M. K., and Dorsett, D. (1997). Chip, a widely expressed chromosomal protein required for segmentation and activity of a remote wing margin enhancer in *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 2729-40.
- Morcillo, P., Rosen, C., and Dorsett, D. (1996). Genes regulating the remote wing margin enhancer in the *Drosophila* cut locus. *Genetics* 144, 1143-54.
- Muchardt, C., and Yaniv, M. (1999). The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin Cell Dev Biol* 10, 189-95.
- Murry, G. C., and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Reserch* 8, 4321-4325.
- Nagata, T. (1987). Interaction of plant protoplast and liposome. *Methods Enzymol* 148, 34-39.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-9.
- Ohtsuki, S., and Levine, M. (1998). GAGA mediates the enhancer blocking activity of the eve promoter in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 12, 3325-30.
- Palla, F., Melfi, R., Anello, L., Di Bernardo, M., and Spinelli, G. (1997). Enhancer blocking activity located near the 3' end of the sea urchin early H2A histone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2272-7.
- Pardue, M. L., and Hennig, W. (1990). Heterochromatin: junk or collectors item? *Chromosoma* 100, 3-7.
- Pazin, M. J., and Kadonaga, J. T. (1997). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein- DNA interactions? *Cell* 88, 737-40.
- Pikaart, M. J., Recillas-Targa, F., and Felsenfeld, G. (1998). Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* 12, 2852-62.
- Pirrotta, V. (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Curr Opin Genet Dev* 7, 249-58.

Prunell, A. (1982). Nucleosome reconstitution on plasmid-inserted poly(dA) . poly(dT). *EMBO J* 1, 173-9.

Pryde, F. E., and Louis, E. J. (1999). Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J* 18, 2538-50.

Ptashne, M., and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386, 569-77.

Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *science* 276, 1558-1560.

Razin, A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J* 17, 4905-8.

Ren, B., and Maniatis, T. (1998). Regulation of *Drosophila* Adh promoter switching by an initiator- targeted repression mechanism. *EMBO J* 17, 1076-86.

Rippe, K., von Hippel, P. H., and Langowski, J. (1995). Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription. *Trends Biochem Sci* 20, 500-6.

Robinett, C. C., O'Connor, A., and Dunaway, M. (1997). The repeat organizer, a specialized insulator element within the intergenic spacer of the *Xenopus* rRNA genes. *Mol Cell Biol* 17, 2866-75.

Rollins, R. A., Morcillo, P., and Dorsett, D. (1999). Nipped-B, a *Drosophila* homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics* 152, 577-93.

Roseman, R. R., Pirrotta, V., and Geyer, P. K. (1993). The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J* 12, 435-42.

Schiebel, W., Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H. L., and Wassenegger, M. (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* 10, 2087-101.

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16, 7583-600.

- Singh, J., and Klar, A. J. (1992). Active genes in budding yeast display enhanced in vivo accessibility to foreign DNA methylases: a novel in vivo probe for chromatin structure of yeast. *Genes Dev* 6, 186-96.
- Smith, H. A., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A., and Dougherty, W. G. (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 6, 1441-53.
- Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12, 599-606.
- Sun, F. L., and Elgin, S. C. (1999). Putting boundaries on silence. *Cell* 99, 459-62.
- Tasheva, E. S., and Roufa, D. J. (1994). Densely methylated DNA islands in mammalian chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol* 14, 5636-44.
- Turner, B. M., and O'Neill, L. P. (1995). Histone acetylation in chromatin and chromosomes. *Semin Cell Biol* 6, 229-36.
- Udvardy, A. (1999). Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO J* 18, 1-8.
- van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J. N. M., and Kooter, J. M. (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal* 6, 861-877.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Mourrain, P., Palauqui, J. C., and Vernhettes, S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16, 651-9.
- Vostrov, A. A., and Quitschke, W. W. (1997). The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J Biol Chem* 272, 33353-9.
- Wang, J. C., and Giaever, G. N. (1988). Action at a distance along a DNA. *Science* 240, 300-4.
- Wassenegger, M., and Pelissier, T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol Biol* 37, 349-62.

Wolffe, A. P., and Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84, 817-9.

Zhao, K., Hart, C. M., and Laemmli, U. K. (1995). Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell* 81, 879-89.

Zhong, X. P., and Krangel, M. S. (1999). Enhancer-blocking activity within the DNase I hypersensitive site 2 to 6 region between the TCR alpha and Dad1 genes. *J Immunol* 163, 295-300.

Zhou, J., Ashe, H., Burks, C., and Levine, M. (1999). Characterization of the transvection mediating region of the abdominal- B locus in *Drosophila*. *Development* 126, 3057-65.

関連論文

Nagaya, S., Nakai, Y., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K., and Shinmyo, A. Isolation of growth phase-specific promoters from cultured tobacco cells. J. Biosci. Bioeng. (accepted)

Nagaya, S., Yoshida, K., Kato, K., Akasaka, K., and Shinmyo, A. Protection from inactivation of a stably integrated transgene using an insulator in cultured tobacco cells. (in preparation)

Nagaya, S., Yoshida, K., Kato, K., and Shinmyo, A. 5' upstream region of *NtADH* gene can suppress variation of transgene expression in cultured tobacco cells. (in preparation)

特許取得事項

プロモーター 2 種 (*Nt108* プロモーター、*NtATPD* プロモーター) に関する特許申請

出願日：平成 10 年 2 月 6 日

出願番号：特許平 10-26253 号

名称：プロモーター遺伝子

発明者：新名 惇彦他

Ars インスレーターに関する特許申請

出願日：平成 10 年 12 月 9 日

出願番号：特許平 10-349625 号

名称：植物において外来遺伝子を安定に発現させる導入方法

発明者：新名 惇彦他

NtADH プロモーターに関する特許申請

出願日：平成 11 年 11 月 19 日

出願番号：特許平 11-329400 号

名称：植物において外来遺伝子の発現を安定化させる DNA 断片、外来遺伝子を安定に発現させる遺伝子導入方法、外来遺伝子を安定に発現させた形質転換植物

発明者：新名 惇彦他