

オーキシン化合物による毛状根誘発遺伝子発現調節の解析

(07660443)

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究C）研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 田中 伸和
(広島大学遺伝子実験施設・助教授)

研究代表者 : 田中伸和 (広島大学遺伝子実験施設・助教授)

研究経費

平成7年度	1,100千円
平成8年度	600千円
平成9年度	500千円
計	2,200千円

研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

1. 山川雅之, 田中伸和, 山下一郎
日本産毛根病菌のpRi1724 T-DNAの転写解析
第5回植物細胞分子生物シンポジウム (広島), 平成8年7月
2. 渡邊信明, 田中伸和, 山下一郎
pRi1724 T-DNA上の毛状根誘発に関与する遺伝子の解析
第15回日本植物細胞分子生物学会 (熊本) 大会・シンポジウム, 平成9年7月
3. 山川雅之, 田中伸和, 山下一郎
pRi1724 T-DNAの*rolB*遺伝子の転写解析
第15回日本植物細胞分子生物学会 (熊本) 大会・シンポジウム, 平成9年7月

(3) 出版物
なし

研究成果

本研究では、日本産*Agrobacterium rhizogenes* MAFF301724株が保有するpRi1724 *rolB*遺伝子のオーキシン化合物による転写制御に関する研究を行った。始めに、pRi1724 T-DNAのright borderを決定し、新規ORFXの発見と転写を確認した。次に、pRi1724のcore T-DNAの上に存在する不定根分化遺伝子群の転写状況をnorthern blottingおよびRT-PCR法を用いて解析した。その結果、全てのORFの転写が確認された。しかし、ORF10(*1724rolA*)、12(*1724rolC*)および13aでは、逆鎖に転写産物があることが確認され、隣接したORFからread throughされた転写産物の可能性が考えられた。*1724rolB*プロモータのオーキシン化合物による転写促進をアジュガ毛状根で調べたところ、オーキシンであるNAA添加培地移植後6時間以内に転写の活性化が起こり、12時間目までにはピークに達することが分かった。*1724rolB*遺伝子上流から約1200 bpのDNA断片を単離し、GUS遺伝子上流に繋いだプラスミドを構築し、これを導入したタバコ毛状根内でのGUS活性を測定した。その結果、この領域にプロモータ活性があることが確認された。また、本プロモータの発現部位を組織化学的なGUS染色によって調べたところ、根の表皮と根毛部分での発現が見られた。しかし、その活性はCaMV35Sプロモータに比較すると10分の1程度であった。GUS遺伝子上流に繋いだ*1724rolB*プロモータ領域を上流から順次deletionしたプラスミドを作製し、これを導入したタバコ毛状根におけるプロモータ活性を調べた。その結果、プロモータ活性は986-678 bpで急激に減少し、この位置に転写活性化領域があると考えられた。オーキシンでの転写活性化は678-540 bpで消失したので、この領域に活性化の領域、すなわちシス因子の存在が示唆された。一方、pRiA4の*rolB*遺伝子プロモータ内でオーキシンにより活性化されるシス因子(ACTTTA)のmotifを含む配列が見いだされており、これと類似した*1724rolB*プロモータ内の配列を3回繰り返した合成DNAを用い、Yeast One-Hybrid法によってタバコcDNAライブラリーからこの配列に結合するトランス因子の単離を試みている。

なお、さらに詳細な報告を以下に記す。

I. 緒言

生物は出現以来、途方もなく長い時間をかけて多様な種を創り出してきた。すなわち、多様な生息場所・状態に適応するためにその形態を変化し、また、変化したその形態がさらに新しい生息場所・状態に適応するといった変異と淘汰の繰り返しで、現存する生物種が生まれてきたと推測される。したがって、同じ多細胞真核生物といっても、植物と動物とは形態が大きく異なり、ライフサイクルにおいても著しく異なっている。特に、植物と動物が異なる点の1つは、前者のほとんどは移動できず、その一生を同一箇所で過ごすのに対し、後者は自由に移動できることであろう。形態の違いは外見に留まらず、体内の器官同士の連絡も大きく異なり、どちらも管状の器官が体内に張り巡らされて、各種の栄養物などの交換をするが、実際の形態や機能は大きく異なっている。また、体内の恒常性を保つために必要な微量生体分子、すなわちホルモンに両者の共通性は現在見いだされていない。

植物細胞の構造は、一部のオルガネラを除けば、酵母や動物細胞のそれと基本的に同じ構造をしていると言ってよい。また、植物細胞の生命維持を行うべきハウス・キープング遺伝子や細胞分裂を司る遺伝子群も、酵母や動物細胞と類似のものが続々と見いだされてきており、形だけでなく質的にも共通であることが示唆されてきている。さらに、外界からの刺激に対する反応、すなわちシグナル伝達系の大枠には、原核、真核生物を問わず類似性・共通性が見いだされてきている。しかしながら、前述の通り、細胞の生命現象を調節すべきホルモンには共通なものはなく、調節のシグナル伝達機構を動かす物質には、両者の形態と同様の差異があると考えられている。

植物の生長や細胞分裂を調節する物質は、植物生長調節物質と呼ばれ、特に植物細胞由来のものを植物ホルモンと総称している。これらには、オーキシン類、サイトカイニン類、ジベレリン類、アブシジン酸類、エチレン及びブラシノライド類が知られ、各々が特有の生理活性を持っている¹⁾。これらのうち、植物の生長や細胞分裂にはオーキシン類とサイトカイニン類が重要とされ、その生理作用の

解明に多大な努力がそそぎ込まれてきた。しかし、多大の努力にもかかわらず、これらの物質の多様な機能の本質は、現在も十分に理解されているとは言い難い。特に、分子レベルでの理解は十分に得られておらず、上記のいずれの植物生長調節物質による刺激のメカニズムはまだ闇の中である。

オーキシン類化合物は、多様な生理作用を持つことが知られている¹⁾。たとえば、個体レベルでは、伸長生長、屈性、維管束分化、カルス分化、着果及び果実の肥大生長、落葉、発根、花芽形成促進、頂芽優先など、数多くの生理作用が観察される。また、細胞レベルでは、膜結合型のproton-ATPase活性を上昇することが知られており、細胞外への急激なプロトン放出により酸性度が上昇し、このため非共有結合型のセルロースが緩み細胞の縦方向の伸長、すなわち酸生長が起こるといわれている。また、分子レベルでは、核酸やタンパク質の生合成が高まることが知られており、オーキシン類化合物により遺伝子発現の調節や促進が起こることにより、上記の個体レベルでの反応が観察されるのは疑いない。以前から、オーキシン類化合物による分子レベルでの反応は、直ちに起こるものとしばらくたってから起こるものがあることが知られていた¹⁾。ただし、しばらくたってから起こる反応の中には、オーキシンによって最初に生じた反応によって派生したものも含まれるので、これらとは区別する必要がある。直ちに起こる反応では、核酸、タンパク質の合成を伴わないものがあると考えられてきた。一方、最近の分子生物学的手法により、オーキシンによって転写制御される遺伝子が少しずつ単離されてきた。これらは、数分以内に直ちに転写が起こる遺伝子と数時間かかってから転写が起こる遺伝子に大別されるようである²⁾。しかし、上記のオーキシンによる反応と遺伝子の転写調節を直接結びつけるには至っていない。また、これらの知見からオーキシン類化合物によるシグナル伝達の根幹を説明するには至っていない。

ところで、土壌細菌である*Agrobacterium*属細菌は、植物に感染し癌腫を形成させる病原菌であるが、その形成メカニズムは極めてユニークである³⁾。すなわち、該細菌はその菌体内に巨大なプラスミドを有し、該プラスミドの一部であるT-DNA上に植物を癌化させる遺伝子群がコードされている。該細菌が植物に感染すると

き、該プラスミドの一部であるT-DNAが植物細胞に送り込まれ、染色体に挿入される。植物を癌化させる遺伝子群は植物細胞内でのみ発現し、感染細胞、すなわち形質転換細胞は癌化の道をたどるのである。該プラスミドのT-DNA上に存在する癌化遺伝子群は、植物ホルモン生合成遺伝子群、機能不明であるが植物ホルモンの機能制御に関わる遺伝子群、機能不明であるが前記2つの遺伝子群の機能に関与しその強度を調節する遺伝子群、*Agrobacterium*属細菌が資化できるアミノ酸誘導体を生合成する遺伝子群、そして全く機能不明な遺伝子群とに大別できる。一方、これらの癌化遺伝子群による形質転換細胞は、不定形の腫瘍を形成するものと不定根を分化するものに大別され、それ故、腫瘍形成を生じるプラスミドは tumor-inducing (Ti)、不定根分化を起こすプラスミドはroot-inducing (Ri)と呼ばれている。Riプラスミド上の不定根形成に関与する癌化遺伝子群は特にrooting locus (*rol*) 遺伝子と呼ばれており、遺伝子破壊による不定根分化能の変異から、*rolA*、*rolB*、*rolC*、*rolD*の存在が報告されている⁴⁾。これらのうち特に不定根分化に重要とされているのは*rolB*遺伝子であり、本遺伝子は単独で不定根分化能がある⁴⁾。しかしながら、本遺伝子は、オーキシン類化合物を生合成するものではない。ところで、細胞内に過剰に存在するオーキシン類化合物はアミノ酸や糖の誘導体などの結合により不活性化されることが知られている。本遺伝子はこのような不活性型オーキシン類化合物のうち、グルコシドが結合したオーキシン類化合物よりグルコシドを切り離す触媒機能を持つグルコシダーゼであるという提案がなされた⁵⁾。しかし、その後の入念な研究により、*rolB*遺伝子で形質転換された植物体での遊離オーキシン量は非形質転換対照植物のそれと差が見られないこと、グルコシダーゼ活性測定に使用されたグルコシド結合オーキシン化合物は植物体内には通常存在しないことなどが報告され⁶⁾、グルコシダーゼ説はほぼ否定されたと言って良い。一方、*rol*遺伝子群あるいは*rolB*遺伝子で形質転換された細胞では、通常の3000倍から100,000倍にオーキシン感受性が上昇すると報告されている^{7,8)}。この感受性は、オーキシン添加によるproton-ATPase活性を測定したものであり、*rolB*遺伝子のオーキシニングナル伝達系との関係を示唆するものである。その後、*rolB*タンパク質はオーキシン化合物結合能がある膜結合タンパク質であること⁹⁾、さらにprotein

tyrosine phosphatase (PTPase) 活性があること¹⁰⁾などが報告され、オーキシシグナル伝達系との関連が推測されるようになっている。一方、*rolB*遺伝子自体がオーキシシグナル伝達系によって転写促進されることが報告されており¹¹⁾、オーキシシグナル伝達にリンクしている可能性がますます高くなった。

本研究では、植物の生長、特に細胞伸長や分裂に非常に重要な植物生長調節物質であるにもかかわらず、未だに十分な解明がなされていないオーキシシグナル伝達の一部を解明することを目的としている。具体的には、日本で発見されたアグロバクテリウム属細菌(*Agrobacterium rhizogenes* MAFF301724株¹²⁾)が保有するRiプラスミドpRi1724 T-DNA¹³⁾上に存在する*rolB*遺伝子(1724*rolB*)¹⁴⁾のプロモータ領域を解析することにより、プロモータ内のオーキシシグナルに反応する領域(シス因子)を見いだす。ついで、オーキシシグナルで何らかの調節を受け、このシス因子に結合するタンパク質(トランス因子)をスクリーニングし、オーキシシグナル伝達との関わりを見いだすことを目的とする。なお、最近pRiA4の*rolB*遺伝子プロモータのオーキシシグナルに反応するシス因子を用いてNtBBF1というトランス因子が採られている¹⁵⁾。そこで、本研究では、上記シス因子及びトランス因子と異なるものを取得できるかを検討している。

日本産アグロバクテリウムを使用した理由を以下に記す。これまで解析されてきたRiプラスミド及び不定根分化遺伝子群は全て外国産の菌株由来である。特に、前述の*rolB*遺伝子の解析を含めて*A. rhizogenes* A4株のpRiA4¹⁶⁾について知見がもっとも多く、A4株及びpRiA4を標準とした形で解析が進められてきている。アグロバクテリウムは感染細胞にopineと総称される非タンパク態アミノ酸誘導体を生産させ、これを感染菌が消費できることが知られている³⁾。そして、opineを生合成させる遺伝子は巨大プラスミドのT-DNA上にコードされている。巨大プラスミドは、前述の癌化遺伝子の存在の違いの他に、生合成させるopineでも分類される。Riプラスミドではagropine型、mannopine型、cucumopine-mikimopine型⁴⁾の存在が知られており、pRiA4はagropine型であるが、日本産pRi1724はcucumopine-mikimopine型である¹⁷⁾。pRiA4は2つのT-DNAを持つことが知られ、一方(TR-DNA)にはagropine合成遺伝子のほかに、オーキシシグナル生合成遺伝子がコードされている⁴⁾。もう一方

(TL-DNA)には不定根分化遺伝子群がコードされている。pRiA4で形質転換された細胞内ではオーキシンが生合成されることにより不定根の誘発が活発となるため、強病原性プラスミドと呼ばれている⁴⁾。mannopine型及びcucumopine-mikimopine型は、TR-DNAを持たないため、pRiA4に比べ発根能が低く、弱病原性プラスミドと呼ばれている。前述の通り、これまでRiプラスミド、T-DNAおよび不定根分化遺伝子に関する知見の多くはpRiA4に関するものであり、本プラスミドによって得られた結果がそのまま全てのRiプラスミドに当てはまるものと考えられてきた。しかし、少ないながらも、pRiA4以外のRiプラスミドからの知見には、pRiA4では得られなかったものが存在する。したがって、pRiA4での知見と比較すべきデータの取得が必要とされるのである。最近、報告者らは、少なくとも6種のタバコ属植物の染色体中に存在するRiプラスミドT-DNAと相同性が高い領域(cellular T-DNA)¹⁸⁾の起源がpRi1724もしくはその近縁プラスミドであることを見出している¹⁹⁾。pRi1724のようなT-DNAを一つしか持たない弱病原性Riプラスミドが強病原性Riプラスミドより以前より存在したと考えるほうが自然であり、cellular T-DNAの起源として少なくとも数千万年前から存在したであろうpRi1724を使用した研究には意義があると思われる。さらには、pRi1724の全塩基配列を決定する研究も進行中であり、この点からも意義付けられる。

II. 日本産*Agrobacterium rhizogenes* MAFF301724株の有するpRi1724 T-DNAの解析^{20,21)}

1. pRi1724 T-DNAのright borderの決定

1724*rolB*遺伝子のプロモータ領域の解析に先立ち、pRi1724 T-DNAの詳細な解析を行うこととした。

pRi1724の制限酵素切断地図の作製及びT-DNAとvirulence領域の決定は、すでに1994年に報告者らによって行われている¹³⁾(図1)。また、pRi1724 T-DNA上に*rolB*遺

伝子群のホモログの存在とそれらがコードされている領域を含めたT-DNAの塩基配列の一部が報告者らによって決定されている¹⁴⁾(図 2)。本研究では、始めに、T-DNAの植物細胞への転移開始に必須とされるright borderを見出し、pRi1724 T-DNAのより正確な解析を行った。

まず、形質転換細胞の染色体中にpRi1724 T-DNAのどこまでが実際に挿入されるかを少し詳しく解析するために、pRi1724 T-DNAを含むDNA断片をプローブとしてSouthern blotting分析を行った(図 3, 4)。すなわち、1724株を感染することによって得られたシソ科植物アジュガ(*Ajuga reptans* var. *atropurpurea*)毛状根の系統Ar-4およびAr-24²²⁾よりDNAを単離し、その10 μ gを*Bam*HIと*Eco*RIで切断して電気泳動し、Southern blotting分析の試料に供した。pRi1724 T-DNAの左部分を含む13.5 kbの*Bam*HI断片(pRTB5)をプローブとしたとき、Ar-4系統では、3.5 kbの*Bam*HI-*Eco*RI断片が、Ar-24では4.9 kb、2つの3.5 kbおよび1.5 kbの*Bam*HI-*Eco*RI断片が検出された(図 4-a)。したがって、Ar-4系統では1.5 kbの*Eco*RI断片の中に、Ar-24系統では3.5 kbの*Bam*HI-*Eco*RI断片のさらに右側にT-DNAと植物ゲノムDNAとの連結点があり、Ar-4ではT-DNAの全領域が挿入されていないと考えられた。さらには、2.5 kb、1.4 kbおよび0.5 kbのシグナルバンドがアジュガ非形質転換根にも見出されたため、pRi1724 T-DNAの左部分と相同性の高い領域がアジュガ染色体中に存在することが示唆された。次に、pRi1724の*rolA* (以下、*1724rolA*)、*rolB* (以下、*1724rolB*)および*rolC* (以下、*1724rolC*)が存在するT-DNAの中央部分(core T-DNA)が含まれる9.5 kbの*Bam*HI断片(pRTB9)をプローブにすると、両系統とも6.4 kb、1.8 kbおよび1.3 kbのシグナルバンドが検出された(図 4-b)。このことは、両系統が形態のみならず*rol*遺伝子群によって形質転換された真の意味での毛状根であることを示している。ここでも、非形質転換根で3.0 kb、1.5 kbおよび0.3 kbのバンドが検出された。T-DNAの右部分が含まれる5.5 kbの*Bam*HI断片(pRTB19)をプローブにすると、両系統とも1.4 kb、1.2 kb、0.8 kbのバンドが検出されたが、その右側に存在する2.1 kbのバンドのシグナルは検出されなかった(図 4-c)。したがって、pRi1724 T-DNAが植物ゲノムDNAと連結する点、すなわちright borderは2.1 kbの*Bam*HI-*Eco*RI断片中に存在することが推測された(図 2)。

pRi1724 T-DNAのright borderの位置を決定するために、既に報告者らが決定している1.2 kbの*EcoRI*断片までの塩基配列¹⁴⁾をさらに右側に広げることとし、0.8 kbの*EcoRI*断片及び1.0 kbの*EcoRI-PstI*領域の塩基配列を決定した(図 2)。この配列に対し、24 bpのT-DNA border consensus (5'-TGGCAGGATATATTC/GXG/AT/GTGTAAAT/C-3')配列²³⁾と相同性の高い配列の検索を行ったところ、1.0 kbの*EcoRI-PstI*断片中に5'-TGACAGGATATATTCTAAAGTAAT-3'の配列が見つかり(図 5)、その相同性は74%であった。この配列が真のright borderであるかを決定するために、前述のアジュガ毛状根系統Ar-4とAr-24およびキョウチクトウ科植物*Vinca minor* L.のpRi1724形質転換植物個体系統Vm-101とVm-102²⁴⁾よりゲノムDNAを単離した。これらのDNAを鋳型とし、T-DNA border consensusと相同性が高い配列の左側近傍にprimerを設計し、これらを用いたinverse PCRを行い、T-DNA border consensusと相同性が高い配列付近のDNA断片を単離した。この領域の塩基配列を決定することにより、形質転換植物ゲノム中のT-DNAの挿入領域を調べた。その結果、上述のT-DNA border consensusと相同性が高い配列を境にした右側で、pRi1724 T-DNAとゲノムより単離したDNAの間で両者の相同性は全く消失した(図 5)。このことは、pRi1724 T-DNAは上述のT-DNA border consensusとの相同配列より切り出されて植物細胞に移行し、植物ゲノムに挿入されたことを示すものである。以上より、T-DNA border consensusと相同性が高い24 bpの塩基配列はpRi1724の真のright borderであることが証明された。

このpRi1724 T-DNA right borderのすぐ右隣の塩基配列に、5'-GTGCCTTC-3'のoctanucleotideの10回繰り返し及び1塩基のみ異なるoctanucleotideの2回の繰り返し構造が見られた(図 5)。これは、pRi8196やpRi2659に見られるTSS (T-DNA transfer stimulator sequence)様配列²⁵⁾と類似している。これらのRiプラスミドには、TiプラスミドやpRiA4に共通して見られるoverdrive配列²³⁾は存在せず、その代わりにTSSが存在する。overdrive配列には*virC*と呼ばれる病原性遺伝子の翻訳産物が結合し、VirD1とVirD2と呼ばれるDNAに切れ目を入れる病原性遺伝子の翻訳産物が結合するための足場となると推定されており、T-DNAの植物細胞への移行に重要な役割を果たす配列である。TSSは、overdrive配列の代わりにVirCタンパクあるいは類似

のタンパク質を結合すると考えられる。pRi1724にも類似の配列が存在することが分かった。

2. 新規open reading frame Xの発見

pRi1724 T-DNA上のORF14とright borderの間に、Open reading frame (ORF)が1つ存在することを見出した(図 2)。このORFは984 bpで、328アミノ酸のタンパク質をコードしていると考えられた(図 6)。DNAおよびアミノ酸データベースをサーチしたが、本ORFと相同性があるものは見出されなかったので、取りあえずXと命名し、現在、その機能を調べるため、本ORFXを単離し植物細胞に導入する実験を行っている。いずれにしても、このORFXは、不定根分化に必須の遺伝子をコードしていないと推測されるが、何らかの機能をもつ遺伝子ではないであろうか。これまで調べられた弱病原性RiプラスミドであるpRi8196およびpRi2659では、ORF14とright borderの間にopine synthetaseが存在する²⁶⁾。pRi1724 T-DNAでも同様であるとすれば、ORFXはmikimopine synthetaseである可能性がある。近いうちに得られるであろう結果から判断したい。ORFXの開始コドンから73 bp上流には、TATA box様配列が存在し、また、下流には3カ所、ポリアデニレーション(poly(A)⁺)シグナルが存在し、このORFXの転写が推測された(図 6)。そこで、アジュガの毛状根系統Ar-4とAr-24から単離したpoly(A)⁺ RNAに対し、ORFX断片をプローブとしたnorthern blotting分析を行った。その結果、両系統でORFXの1.35 kbの転写産物が確認されたが、その発現量は、Ar-4の方がAr-24より多いようであった(図 7)。

III. pRi1724 T-DNA上の不定根分化遺伝子群の転写解析²¹⁾

トランスポゾンによる変異実験から、pRiA4 T-DNAでは、不定根分化に必要な遺伝子は*rolA* (以下、*A4rolA*)、*rolB* (以下、*A4rolB*)、*rolC* (以下、*A4rolC*)及び*rolD*と同定されている。さらに、各々の遺伝子の植物への導入実験から、*A4rolA*および

*A4rolB*が単独で不定根分化機能があることが明らかとなっている³⁾。報告者らのタバコ及びニンジンへの導入実験から、pRi1724 T-DNA上の不定根分化遺伝子群のhomologでも同様な結果を得ているが、その強度はpRiA4のそれらに比べるとかなり弱いようである。pRi1724の不定根分化遺伝子群では、*1724rolA*および*1724rolB*単独で不定根分化機能はあるものの、伸長機能が極めて弱い。また、pRiA4では、*A4rolB*単独で誘発される毛状根は、*A4rolA*および*C*の存在によって、正常根の形態に近くなり、さらにORF13と14の存在により、再び毛状根の形態と増殖能をもつ²⁷⁾。すなわち、特に*A4rolB*が不定根分化能が強く毛状根の形態を示すのに対し、*A4rolA*と*C*はその機能を打ち消し、さらにORF13と14は打ち消された機能を再現する。これらの遺伝子間での相互作用については全く不明であるが、興味ある問題である。一方、pRi1724では、ORF13と14の機能はpRiA4のそれらと類似しているものの、機能は弱いようである。pRi1724では、T-DNA上の他の遺伝子を必要としているのかも知れない。

このように、ヌクレオチドやアミノ酸の相同性から、pRi1724 T-DNA上の不定根誘発遺伝子群は、pRiA4 T-DNA上のそれらと類似しているが、機能的には弱いと推測される。これは、不定根分化遺伝子群の各々の発現量との関係があるのであろうか。これまで、RiプラスミドT-DNA上の遺伝子の転写についての研究が幾つかあるが、プローブが大きく、幾つかのORFが一度にカバーされたため、各々のORFの転写状況を一つずつ把握した研究は存在しない。そこで、pRi1724 T-DNA上の不定根分化遺伝子群の各々の転写状況をアジュガ毛状根系統Ar-4とAr-24から単離したRNAを用いて解析した。始めに、前述の2系統より単離したpoly(A)⁺ RNAを用い、PCRで作製した各ORFのDNA断片をプローブとしてnorthern blotting分析を行った。その結果、*1724rolA* (ORF10)、*1724rolB* (ORF11)、*1724rolC* (ORF12)、ORF13aおよびORF14の転写産物が確認された(図 8)。各々のサイズは、*1724rolA*では0.69と0.36 kb、*1724rolB*では1.2 kb、*1724rolC*では0.8 kb、ORF13aでは0.63 kb、ORF14では1.2 kbであった。ORF13の転写産物は確認できなかった。また、*1724rolABC*に比べ、ORF13aおよび14では、27時間の暴露ではシグナルは弱かった(図 8)。

各々のORFにおける転写方向を確かめること及びORF13の微量の転写の有無を

調べるため、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を行った。RT反応にはDNaseで染色体DNAを消化した1 μ gのtotal RNAを用い、各々のORFの5'側 (sense: S) primerもしくは3'側 (antisense: A) primerを用いた。次に、PCRでは、両方のprimerを用いた。その結果、*1724rolA*、*1724rolC*、ORF13、13aおよび14でRT反応にA primerを用いたときに各々のORFと同じサイズのDNAが増幅された(図 9-a)。一方、*1724rolB*では、DNAの増幅が見られなかった(図 9-a)。そこで、異なる位置にSおよびA primerを設計し(図 9-b, 10)、RT-PCRを行ったところ、予想されたサイズのDNAが増幅された(図 9-c)。驚いたことに、*1724rolA*、ORF13aおよび14では、RT反応にS primerを用いたときにもDNAの増幅が見られた。同様な結果は、poly(A)⁺RNAを鋳型に用いたときも観察された。そこで、これらのDNAがT-DNA由来のものであるかを確認するため、pRi1724 T-DNAをプローブとしてSouthern blotting分析を行った。その結果、RT反応にA primerを用いたときの増幅DNAはもとより、前述のS primerでの増幅断片にもhybridization signalが見られ、pRi1724 T-DNA由来であることが確認された(図 9-a)。以上より、塩基配列より推定されたORFは全て転写されていること、*1724rolB*はORFの3'側にsplicingもしくは何らかの変化が起き、ここを起点としたRT反応がうまく起きなかったこと、*1724rolA*、ORF13aおよび14では逆鎖での転写産物の存在の可能性があること、などが考えられた(図 11)。Ri plasmid T-DNAでは隣接するORFの位置が非常に近いため、逆鎖での転写産物は、隣接したORFからの転写産物のterminatorが十分に機能せず、read throughされている可能性が考えられた。

IV. オーキシシン化合物による*1724rolB*遺伝子の転写制御

1. *1724rolB*遺伝子のオーキシシン化合物による転写促進

northern解析、RT-PCR解析によって、*1724rolB*遺伝子の転写が確認された。ところで、*A4rolB*遺伝子はオーキシシン化合物によって転写促進されることが知られてい

る¹¹⁾。これは、*A4rolB*遺伝子のプロモータ領域にオーキシン類化合物によって転写調節される配列、すなわちシス因子が存在するからである²⁸⁾。また、オーキシン添加によって不定根の分化能が高められることも知られている。そこで、*1724rolB*遺伝子もオーキシンによって転写促進されるかを、pRi1724 T-DNAによって形質転換されたアジュガ毛状根を用いて行った。植物ホルモン無添加のMurashige-Skoog(MS)液体培地で20日間振とう培養後、増殖した毛状根を10⁻⁵ Mのナフタレン酢酸(NAA)を添加したMS液体培地に移植し、引き続き振とう培養し、経時的(0、6、12、24、48、72時間後)にサンプリングした。コントロールとして同様に20日間培養したアジュガ毛状根をNAA無添加のMS培地移植し、そこからサンプリングした。これらのサンプルから単離したpoly(A)⁺ RNAに対し、*1724rolB*遺伝子をプローブとしてnorthern blotting分析を行った。その結果、*1724rolB* mRNAは常時転写されており、移植直後もその転写産物は確認できた。しかし、そのままNAA無添加の培地で培養を続けても、転写量にほとんど変動はなかった。一方、NAA添加培地で培養すると、移植6時間後には*1724rolB*の転写産物のシグナルが強くなり、12時間後以降では強度はほぼ一定になった(図 12)。すなわち、*1724rolB*遺伝子も*A4rolB*遺伝子と同様にオーキシン類化合物で転写促進されることが明らかとなった。

2. *1724rolB*遺伝子の転写開始点の決定

*1724rolB*遺伝子はオーキシン化合物によって転写促進されることが分かった。そこで、本遺伝子のプロモータ領域にはオーキシンの存在により転写が調節される領域が存在すると考えられた。*1724rolB*遺伝子のプロモータを詳細に解析するために、本遺伝子の転写開始点の決定をprimer extension法で行った。すなわち、翻訳開始点から+55bpと+76bpの位置に2種類のビオチン化したantisense primer (11PE2: 5'-biotin- GTTGAAGGAATAGTGATCGAGGAGC -3' および 11PE3: 5'-biotin-TGAGATCTCGTGTTGAAAGCGTTG-3') を設計し(図 10, 13)、non-RI法でprimer extensionを行った。アジュガ毛状根系統Ar-4およびAr-24より単離したtotal RNAをRQ1 DNaseで処理することによってゲノムDNAを完全消化し、上記の2種類の

antisense primerを用いてmRNAの5'末端に向かい、reverse transcriptaseでcDNAを伸長させた(図 13)。同時にこれらのprimerを用いたシーケンス反応を行った。これらを電気泳動して、cDNAとシーケンス・ラダーと比較したところ、どちらのprimerを用いた実験でも、両毛状根系統とも5'-GGCACAGTCTC配列の最後のCの位置にシグナルが見られた(図 13)。すなわち、mRNAはこの逆鎖の5'-GAGACTGTGCCの最初のGが転写開始点であることが判明した。このGは翻訳開始点から44 b上流のところ位置し、さらにこの上流の翻訳開始点から76 上流の位置には(転写開始点から32 b上流)にTATTというTATA-box様配列が存在していた(図 10, 13)。

3. *1724rolB*プロモータの特徴

転写開始点が決定できたので、次に*1724rolB*遺伝子のプロモータの解析を行った。翻訳開始点より1202 bp (*1724rolC*のORFの一部を含む) 上流までを単離し、GUS遺伝子とNOSターミネータの上流に連結したバイナリー・ベクターを作製した(図 10, 14)。これを*A. rhizogenes* DC-AR株 (MAFF301724株由来、pRi1724保有、km^S)²⁹⁾に導入し、タバコ*Nicotiana tabacum* SR-1の培養植物葉にリーフ・ディスク法で接種し、カナマイシン含有MS固形培地で培養して、カナマイシン耐性毛状根を取得した。また、比較のため、カリフラワー・モザイク・ウイルス35Sプロモータで制御されるGUS遺伝子を同様にDC-AR株に導入し、これを接種することで毛状根を取得した。なお、コントロールとしては、DC-AR2株接種で得られた毛状根を用いた。これらのカナマイシン耐性毛状根の多くは、*1724rolB*プロモータもしくは35Sプロモータで制御されるGUS遺伝子が染色体に組み込まれているはずである。なお、これらの毛状根は増殖にオーキシンを必要とせず、オーキシンによる*1724rolB*の転写促進を観察するためには好都合であった。これらの毛状根をNAA無添加および添加MS培地で24時間培養し、4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronido (4-MUG)を用いた蛍光法によるGUS活性の測定を行った。その結果、*1724rolB*プロモータが導入された毛状根で顕著なGUS活性が見られた(図 15)。しかし、この活性は35Sプロモータをのそれに比べると約10分の1程度であった。一方、GUS遺伝子を導入しなか

った毛状根でのGUS活性はほとんど見られなかった。また、NAAを添加して培養した*1724rolB*プロモータは無添加と比較してGUS活性が数倍上昇することが観察された(図 18)。しかし、その活性の上昇は*A4rolB*に比べ低いものであり、オーキシン化合物による*1724rolB*プロモータの活性化の度合いはそれほど高くないようであった³⁰⁾。

4. 組織化学的染色法(X-Glucによる染色)によるGUS活性の観察による*1724rolB*遺伝子発現部位の評価

前述のように*1724rolB*翻訳開始点から1202b上流までのプロモータ領域をGUS遺伝子上流につないだバイナリー・ベクター(図 14)で形質転換したタバコ毛状根を用い、この*1724rolB*プロモータが毛状根のどの組織で発現するかをX-Glucを用いた組織化学的染色法で調べた。同時に35Sプロモータで制御されるGUS遺伝子を組み込んだ毛状根とGUS遺伝子を組み込まなかった毛状根も併せて観察した。その結果、35Sプロモータで制御されるGUS遺伝子を組み込んだ毛状根では、維管束部分及び先端部分を中心に染色された。一方、*1724rolB*プロモータで制御されるGUS遺伝子を組み込んだ毛状根では、表皮及び根毛部分が染色されていた(図 16)。また、controlの毛状根ではX-Glucによる染色がみられなかった。この結果、*1724rolB*プロモータは、35Sとは異なる組織で発現することがわかった。さらに、この発現部位は*A4rolB*遺伝子で観察された維管束部分、特に師管部及び生長点部分とも異なっていた²⁸⁾。

5. *1724rolB*プロモーターの転写制御領域の検索

GUS遺伝子を制御する*1724rolB*プロモータをExoIIIで上流から順次deletionしたバイナリー・ベクターを作製した(図 17)。これらを*A. rhizogenes* DC-AR2株を介して、*N. tabacum*に導入し、deletedプロモータで制御されるGUS遺伝子を組み込んだ毛状根を誘発した。これらのGUS活性を調べることで、*1724rolB*プロモータのどの領域

にオーキシンによって転写が促進される部分があるかを調べた。deletedプロモータ-GUSを組み込んだ毛状根をNAA無添加もしくは添加MS培地に接種し、24時間培養後、これらのGUS活性を4-MUG法を用いた蛍光法で測定した。同時に35Sプロモータで制御されるGUS遺伝子を組み込んだ毛状根とcontrolとしてGUS遺伝子を持たない毛状根のGUS活性も測定した。

その結果、測定した1724*rolB*プロモータ領域を持つ毛状根でcontrolに比べて明らかに高いGUS活性が測定された(図 18)。各々のクローン間では活性値にばらつきが見られたが、一連のdeletionされたプロモータ領域に活性の差異の傾向があると判断された(図 18)。GUS活性はプロモータ領域が678bpまでのものと986bpまでのもの間で著しい差がみられた。すなわち、プロモータ活性はプロモータ領域の986-678 bpの間で急激に低下し、ここに転写自体を制御する因子が存在するようである。この領域は、pRiA4で報告されている623-471 bpに存在すると考えられる同様な制御領域よりも上流に存在する。

また、678bpのものはオーキシンによる転写促進が観察されたが、540bpまでのものではオーキシンでの促進効果がみられなかった(図 18)。A4*rolB*遺伝子では、オーキシンで転写制御を受けるシス因子(ACTTTA)が312-307 bpの位置に存在する³⁰⁾。1724*rolB*では、ORFのスタートコドンがA4*rolB*のそれより上流にあるため(その分1724*rolB*はアミノ酸配列のN末側が長くなっている)、268-263 bpに同じ配列が存在する。本研究では、1724*rolB*プロモータにおいても本配列がオーキシンによって転写活性化されるシス因子であるか調べていないが、678-540 bpの領域でオーキシンによる転写促進活性が消失してしまうため、A4*rolB*シス因子と同じ本配列の活性が検出しにくいのかも知れない。なお、1724*rolB*プロモータの678-540 bpには上記のACTTTAのmotif配列は存在しなかった(図 10)。また、このmotifと類似した配列(ACTTAAおよびACTTGTA)が存在したが、いずれも1塩基異なるか多いので、本motifに結合するとされるトランス因子NtBBF1タンパク質の結合は期待できない。したがって、ACTTTA配列とは異なるオーキシンによる転写促進活性を持つシス因子が存在するのかも知れない。これは、前述したオーキシンによるA4*rolB*と1724*rolB*遺伝子の転写促進時間の相違と関係するのかもしれない。また、オーキシ

ンに素早い反応をする*PS-IAA4/5*や*GH3*遺伝子のプロモータに存在するオーキシン応答性エレメント(AuxRE)のオーキシン結合motifであるTGTCCCATやTGTCTC配列も見られなかった³¹⁾。そもそも、ここで単離した*1724rolB*プロモータは、反対方向に*1724rolC*プロモータとしても活性を持ちbidirectional な役割を持っている。*A4rolB*プロモーターでは、オーキシンで転写促進を受けるシス因子が312-307 bpの部分に存在すると報告されている。一方、*1724rolB*プロモーターではこれよりかなり上流領域にオーキシンで転写制御される領域が存在するようである。678-540 bpの位置にオーキシンで転写促進されるシス因子が存在すると考えられた。

986-678 bpの領域は隣接した*1724rolC*遺伝子に近く、この遺伝子発現に重要な領域である可能性があるため、更に詳しい解析が必要である。

V. 酵母One-Hybrid Systemを用いたシス因子ACTTTA配列に結合するトランス因子の探索

すでに、*A4rolB*プロモータ領域でオーキシンに対する反応ドメインが幾つか推定されており、特に、翻訳開始点から312-307bp上流にシス因子ACTTTAが決定された¹⁵⁾。この配列を中心にトランス因子が結合することは間違いないことも証明された。 λ ZAPIIタンパク発現ライブラリーからシス因子に結合するNtBBF1というトランス因子が単離され、オーキシン添加時の*A4rolB*発現調節に関わっていることが示唆されている¹⁵⁾。一方、*1724rolB*遺伝子上流にもACTTTAというシス因子を含む領域が存在する。ただし、*1724rolB*の翻訳開始が*A4rolB*のそれより上流から開始すると考えられるので、*1724rolB*では翻訳開始点から268-263bp上流の位置である(図 10)。酵母One-Hybrid System³²⁾を用いて、このシス因子に結合するトランス因子をスクリーニングすることにした。酵母One-Hybrid Systemは、シス因子を数回繰り返した配列を酵母の選択あるいはレポーター遺伝子、例えばヒスチジン合成遺伝子(*HIS3*)などの上流に組み込む。一方、スクリーニングすべきシス因子結合遺伝子すなわちトランス因子の遺伝子を含むcDNAを転写活性化ドメイン、例えば

GAL4遺伝子のVP16遺伝子の転写活性化ドメインなどと結合したライブラリーを作製し、前述の酵母に導入し、適当な選択培地でスクリーニングする。シス因子にトランス因子が結合すれば、選択あるいはレポーター遺伝子発現が活性化され、選択培地でコロニー形成が見られたり、レポーター遺伝子の発現に区別され、選抜されるという仕組みである。本法では、cDNAを λ gt11ベクターなど繋いだライブラリーで発現させたタンパク質とシス因子を含むDNA配列との結合によってトランス因子のスクリーニングするサウス・ウェスタン法で採れないようなトランス因子を単離することも可能である。本研究では、1724*rolB*プロモータ中に存在するのACTTTA配列を含むTTCGGCCAACTTTAAGCTCT(図 10)を3回繰り返した配列の5'側に*EcoRI*部位(GAATTC)と塩基(TA)を、3'側に*XbaI*部位(CTAGAT)と2塩基(TA)を付加したDNA(75塩基)およびその相補鎖を合成した。これを、酵母プラスミドベクターpHISiの*HIS3*遺伝子の最小プロモータの上流の*EcoRI-XbaI*部位に挿入したpHRB1を作製した(図 19)。このプラスミドを用いて酵母YM4271株の*HIS3*遺伝子の部分と相同組み換えによって導入し、YYM1株を作製した(図 19)。一方、タバコ培養細胞BY-2株より単離されたmRNAを鋳型として作製されたcDNAと転写活性化ドメインVP16と結合したライブラリー(京都大学大学院理学研究科 町田泰則教授より分譲)を上記酵母菌株に導入し、ヒスチジン無添加の合成培地上でコロニーを形成させた。現在、出現したコロニーのうち、増殖が速いものを選択し、これが上記DNA配列に結合するcDNA-VP16による*HIS3*の転写活性化によるものかを調べ、シス因子に結合するトランス因子のスクリーニングを行っている。

VI. 考察

本研究では、日本産*Agrobacterium rhizogenes* MAFF301724株が保有するpRi1724 T-DNAの*rolB*遺伝子(1724*rolB*)のオーキシンによる転写制御機構の解明に挑んだ。特に、1724*rolB*プロモータ内でオーキシン化合物によって転写活性化される配列(シス因子)を決定するに至るための基礎的なデータの取得を行った。残念ながら、

本研究期間内にシス因子の決定およびこれに結合するトランス因子の単離という最終目標にまでは達することができなかった。今後も引き続きこの研究を継続することによって1724*rolB*プロモータのシス因子およびトランス因子の単離を試みる予定である。なお、本研究期間中に、イタリアの研究グループによって、A4*rolB*プロモータ内でオーキシン応答シス因子(ACTTTA)の決定ならびに本因子に結合するトランス因子NtBBF1が単離されたとの報告が出ている¹⁵⁾。1724*rolB*プロモータ内にも上記シス因子と同一の配列を含む領域翻訳開始点から上流の268-263 bpの位置に存在し、この部分が同様にシス因子である可能性はある。しかし、本研究では、1724*rolB*プロモータ内のこの配列のオーキシン応答性に関しては確認していない。一方、1724*rolB*プロモータの翻訳開始点から678-540 bpの領域にオーキシン応答性に関与する配列が存在する可能性が示唆されたため、この領域の更なる解析を進め、ACTTTAとは異なるmotifのシス因子の探索を試みるつもりである。

オーキシンによる*rolB*遺伝子の転写促進機構はどのような意味があるのだろうか。A4*rolB*および1724*rolB*遺伝子ともオーキシンによる転写活性の上昇はオーキシン添加後数時間で観察される。これは、オーキシンに素早い反応をする*parB*、*PS-IAAA/5*や*GH3*遺伝子のプロモータに存在するオーキシン応答性とは異なると考えられる。緒言でも述べたように、オーキシンシグナル伝達系は現在未解明である。しかし、これまで得られてきた知見を基にすると、オーキシン→オーキシンレセプター(ABP1?)→ドッキングタンパク質?→Gタンパク質?→???→トランス因子(NtBBF1など)→*rolB*プロモータのシス因子→*rolB*遺伝子の転写促進という経路が考えられる。あるいは、植物細胞内に浸透したオーキシンが直接トランス因子に結合し、*rolB*遺伝子の転写促進をする可能性もある。転写・翻訳されたRoIBタンパク質は、細胞膜に結合し、オーキシンと結合することによって何らかの機能(protein tyrosine phosphatase ?)を持ち、オーキシンシグナル伝達系を攪乱するのであろう。最近、報告者らは酵母Two-hybrid systemを用いて1724RoIBタンパク質と相互作用する遺伝子の探索を試み、動物や酵母のシグナル伝達系で重要な役割を担うと考えられる遺伝子のホモログを単離している(未発表)。RoIBタンパク質は、オーキシンのシグナルによってup regulationされ、存在するオーキシンを独占する。一方では、

オーキシンシグナル伝達系に干渉し、不定根分化の経路にそのシグナルを注ぎ込むことによって旺盛な不定根誘発が見られるのではあるまいか。

なお、オーキシンによる*A4rolB*遺伝子の転写促進は6-10時間程度を要するのに対し、*1724rolB*遺伝子では6時間以内に起こるので、両者の転写促進機構に相違があることも考えられる。また、組織化学的染色法による*1724rolB*プロモータと*A4rolB*プロモータの発現部位の相違から、両プロモータ間に本来の転写制御の違いが存在することも考えられる。発現部位の違いがあるものの両遺伝子の不定根分化機能が同一であることはいかなる理由によるものであろうか。

参考文献

1. 倉石 晋 (1994) 植物ホルモン (第2版) , 東京大学出版会, pp22-54.
2. F. Sitbon, C. Parrot-Rechenmann (1997) Expression of auxin-regulated genes. *Physiol. Plant.*, **100**: 443-455.
3. S. B. Gelvin (1990) Crown gall disease and hairy root disease. –A sledgehammer and a tackhammer–. *Plant Physiol.*, **92**: 281-285.
4. F. F. White, V. P. Sinkar (1987) Molecular analysis of root induction by *Agrobacterium rhizogenes*. In “T. Hohn, J. Schell (eds) Plant DNA infection agents. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 149-177.
5. J. J. Estruch, J. Schell, A. Spena (1991) The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *EMBO J.*, **10**: 3125-3128.
6. O. Nilsson, O. Olsson (1997) Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plant.*, **100**: 463-473.
7. W. H. Shen, A. Petit, J. Guern, J. Tempe (1988) Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3417-3421.
8. C. Maurel, N. Leblanc, H. Barbier-Brygoo, C. Parrot-Rechenmann, M. Bouvier-Durand, J. Guern (1994) Alterations of auxin perception in *rolB*-transformed tobacco protoplasts. *Plant Physiol.*, **105**: 1209-1215.
9. F. Filippini, F. L. Schiavo, M. Terzi, P. Costantino, M. Trovato (1994) The plant oncogene *rolB* alters binding of auxin to plant cell membranes. *Plant Cell Physiol.*, **35**: 767-771.
10. F. Filippini, V. Rossi, O. Marin, M. Trovato, P. Costantino, P. M. Downey, F. L. Schiavo, M. Terzi (1996) A plant oncogene as a phosphate. *Nature*, **379**: 499-500.
11. I. Capone, M. Cardarelli, M. Trovato, P. Costantino (1989) Upstream non-coding region which confers polar expression to Ri plasmid root inducing gene *rolB*. *Mol. Gen. Genet.*, **216**: 239-244.
12. 塩見敏樹, 白川 隆, 竹内昭士郎, 大泉利勝, 植松清次 (1987) *Agrobacterium rhizogenes* biovar1によるメロン毛根病. *日植病報*, **53**: 454-459.
13. N. Tanaka, A. Oka (1994) Restriction endonuclease map of the root-inducing plasmid (pRi1724) of *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 297-299.
14. N. Tanaka, T. Ikeda, A. Oka (1994) Nucleotide sequence of *rol* region of the mikimopine-type root-inducing plasmid pRi1724. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 548-551.
15. A. De Paolis, S. Sabatini, L. De Pascalis, P. Costantino, I. Capone (1996) A *rolB* regulatory

- factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. *Plant J.*, **10**: 215-223.
16. G. A. Huffman, F. F. White, M. P. Gordon, E. W. Nester (1984) Hairy-root-inducing plasmid: Physical map and homology to tumor-inducing plasmids. *J. Bacteriol.*, **157**: 269-276.
 17. A. Isogai, N. Fukuchi, M. Hayashi, H. Kamada, H. Harada (1990) Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry*, **29**: 3131-3124.
 18. F. F. White, D. J. Garfinkel, G. A. Huffman, M.P. Gordon, E. W. Nester (1983) Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature*, **301**: 348-350.
 19. 田中伸和 (1997) RiプラスミドT-DNAの挿入を受けたタバコ属植物—植物病原細菌と宿主の進化を迎えるか? — *化学と生物*, **35**: 405-407.
 20. N. Tanaka, I. Yamashita (1998) The sequence of in the vicinity of the right border of the T-DNA of pRi1724: a new open reading frame and a TSS-like sequence. (submitted)
 21. N. Tanaka, M. Yamakawa, I. Yamashita (1998) Characterization of transcription of genes involved in hairy root induction on pRi1724 core-T-DNA in two *Ajuga reptans* hairy root lines. (submitted)
 22. T. Matsumoto, N. Tanaka (1991) Production of phytoecdysteroids by hairy root cultures of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 1019-1025.
 23. P. Zambryski (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu. Rev. Genet.*, **22**: 1-30.
 24. N. Tanaka, M. Takao, T. Matsumoto (1994) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of *Vinca minor* L. *Plant Tiss. Cult. Lett.*, **11**: 191-198.
 25. G. Hansen, J. Tempe, J. Brevet (1992) A T-DNA transfer stimulator sequence in the vicinity of the right border of pRi8196. *Plant Mol. Biol.*, **20**: 113-122.
 26. P. Filetici, L. Spano, P. Costantino (1987) Conserved regions in the T-DNA of different *Agrobacterium rhizogenes* root-inducing plasmid. *Plant Mol. Biol.*, **9**: 19-26.
 27. I. Capone, L. Spano, M. Cardarelli, D. Bellincampi, A. Petit, P. Cositantino (1989) Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.*, **13**: 43-52.
 28. I. Capone, G. Frugis, P. Costantino, M. Cadarelli (1994) Expression in different populations of cells of the root meristem is controlled by different domains of the *rolB* promoter. *Plant Mol. Biol.*, **25**: 681-691.
 29. 田中伸和, 高尾実里, 松本 武, 町田泰則 (1993) エレクトロポレーションによる *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 株の形質転換. *日植病報*, **59**: 587-593.
 30. I. Capone, M. Cardarelli, D. Mariotti, M. Pomponi, A. De Paolis, P. Costantino (1991)

Different promoter regions control level and tissue specificity of expression of *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene in plants. *Plant Mol. Biol.*, **16**: 427-436.

31. 蝶野真喜子 (1997) オーキシン応答配列に結合する転写因子 ARF1. *化学と生物*. **35**: 854-855.
32. 矢部尚登, 米田好文 (1996) Two-hybrid 法および One-hybrid 法とその変法. 植物のシグナルトランスダクション—分子機構と実験法— (蓮沼仰嗣, 平野 久編), 現代化学増刊 30, 東京化学同人, pp30-38.

図の説明

図 1

pRi1724の制限酵素(*Bam*HI)切断物理地図. 番号は*Bam*HI断片のサイズの大きいほうから順番を示している. T-DNAはTransferred-DNA, *vir*は病原性領域を示す.

図 2

pRi1724 T-DNAの制限酵素切断地図および決定された塩基配列より推定されたOpen Reading Frame (ORF). 制限酵素地図内の数字は切断片のサイズを表す. RBはright borderを表す.

図 3

アジュガ毛状根系統Ar-4およびAr-24のT-DNA挿入領域ならびにRT-PCRで増幅されたDNA断片を調べるSouthern blotting分析用プローブ. 中央の矢印はプローブ(pRTB106およびpRTB5, 9, 19)の領域を示す. 下の太線は実際にAr-4およびAr-24のゲノムに挿入されたT-DNA領域を示す.

図 4

アジュガ毛状根系統Ar-4およびAr-24のT-DNA挿入領域を調べるためのSouthern blotting分析. 各々のDNAは*Bam*HI-*Eco*RIで切断されている. (a) pRTB5 (13.5 kb *Bam*HI断片)での結果. ▲印はアジュガゲノムDNAに元々存在するDNA配列. ●印はT-DNAとゲノムDNAとが連結しているDNA断片を示す. (b) pRTB9 (9.5 kb *Bam*HI断片)での結果. ▲印はアジュガゲノムDNAに元々存在するDNA配列. (c) pRTB19 (5.5 kb *Bam*HI断片)での結果. 左の数字はpRIB106の*Bam*HI-*Eco*RI断片のサイズを示している. VはベクターpBR329を示す.

図 5

pRi1724 T-DNAのright borderおよびその付近の配列およびアジュガ(Ar-4)と *Vinca minor* (Vm-101, 102)形質転換細胞ゲノムDNAのright border近傍の配列. 影付きの配列はDNAの相同配列を示す. ボックスはpRi1724 T-DNAのright border, 実線の矢印はTSS繰り返し配列を表す. なお, 破線の矢印は8塩基のうち1塩基が異なる繰り返し配列.

図 6

ORFXの塩基ならびにアミノ酸配列。*は終始コドン，ボックスはTATA配列，下線はpoly(A)付加配列を示す。

図 7

ORFXからの転写産物のnorthern blotting分析。レーン1はコントロールとして非形質転換アジュガ培養植物根，レーン2はアジュガ毛状根系統Ar-4，レーン3はアジュガ毛状根系統Ar-24からのpoly(A)⁺ RNAを使用。プローブはPCRで合成したORFXのDNA断片を用いた。

図 8

pRi1724 T-DNA上の各ORFの転写産物のnorthern blotting分析。Laneはアジュガ毛状根系統Ar-4もしくはAr-24，左の数字は暴露時間，各写真の左側の数字は転写産物のサイズ(kb)を表す。プローブはPCRで合成した各ORFのDNA断片を用いた。

図 9

pRi1724 T-DNA上の各ORFの転写産物のRT-PCR分析。(a) 上は逆転写にantisense primerを，下は逆転写にsense primerを使用し，PCRで増幅したDNA断片を，pRIB106をプローブとしたSouthern blotting分析によって確認した。レーン1, 2, 3, 4, 5, 6は各々ORF10 (*1724rolA*), 11 (*1724rolB*), 12(*1724rolC*), 13, 13a, 14の結果である。なお，左の数字はDNAのサイズ表す。(b) ORF11 (*1724rolB*)に設計したsenseおよびantisense primerの名称と位置および増幅されてくるDNA断片のサイズ。矢印はprimerとその方向を示す。(c) (b)に示したprimerを用い，RT-PCRを行い，増幅したDNAをSouthern blotting分析した結果。レーン1, 2はprimer 11-1 (A)を，レーン3, 4はprimer 11-2 (A)を，レーン5, 6はprimer 11-1 (S)を，レーン7, 8はprimer 11-2 (S)を逆転写に用いた。また，レーン1, 3はprimer 11-1 (S)を，レーン2, 4はprimer 11-2 (S)を，レーン5, 7はprimer 11-1 (A)を，レーン6, 8はprimer 11-2 (A)をPCRに用いた。なお，左の数字はDNAのサイズ表す。プローブはPCRで合成した*1724rolB*のDNA断片を用いた。

図 10

*1724rolB*遺伝子およびそのプロモータ領域の塩基ならびにアミノ酸配列。矢印はRT-PCR, primer extensionならびに*rolB*プロモータ単離に使用したprimerとその方向を示す。○で囲んだ塩基は*1724rolB* mRNAの転写開始点，ボックスはTATA様配列を示す。下線は*A4rolB*でオ

一キシシンによって調節を受けるシス因子と相同で酵母One-Hybridに用いた配列を示す。

図 11

pRi1724 T-DNAのORFの転写産物のnorthern blotting分析およびRT-PCR分析による解析結果。下のRT-PCRの結果では、転写産物の方向を示す。

図 12

1724rolB遺伝子のオーキシシン(NAA)による転写促進。NAA添加培地に移植後、経時的にアジュガ毛状根をサンプリングし、単離したpoly(A)⁺ RNAを使用してnorthern blotting分析を行った。

図 13

Primer extension法による1724rolB遺伝子の転写開始点決定。上の図は転写開始点Cおよびその上流に存在するTATA様配列を表す。その下は、使用したprimerとその位置を表す。下の写真はprimer extensionで検出されたシグナルならびに比較のDNAシーケンスを表す。矢印は転写開始点の塩基を表す。

図 14

1724rolBプロモータの単離とプロモータ活性の検出法。

図 15

GUS蛍光測定を用いた1724rolBプロモータ活性の評価。ControlはpRi1724で形質転換したタバコ毛状根, pBMY1は1724rolBプロモータ-GUSを導入したタバコ毛状根, pBI121は35Sプロモータ-GUSを導入したタバコ毛状根各々5本ずつのGUS活性を4-MUGを用いて測定した。GUS活性は、pmol/min/mg proteinで算出した。

図 16

組織化学的なGUS活性検出による1724rolB遺伝子の発現部位の評価。1724rolBプロモータ-GUSを導入したタバコ毛状根をX-Glucによって染色した。

図 17

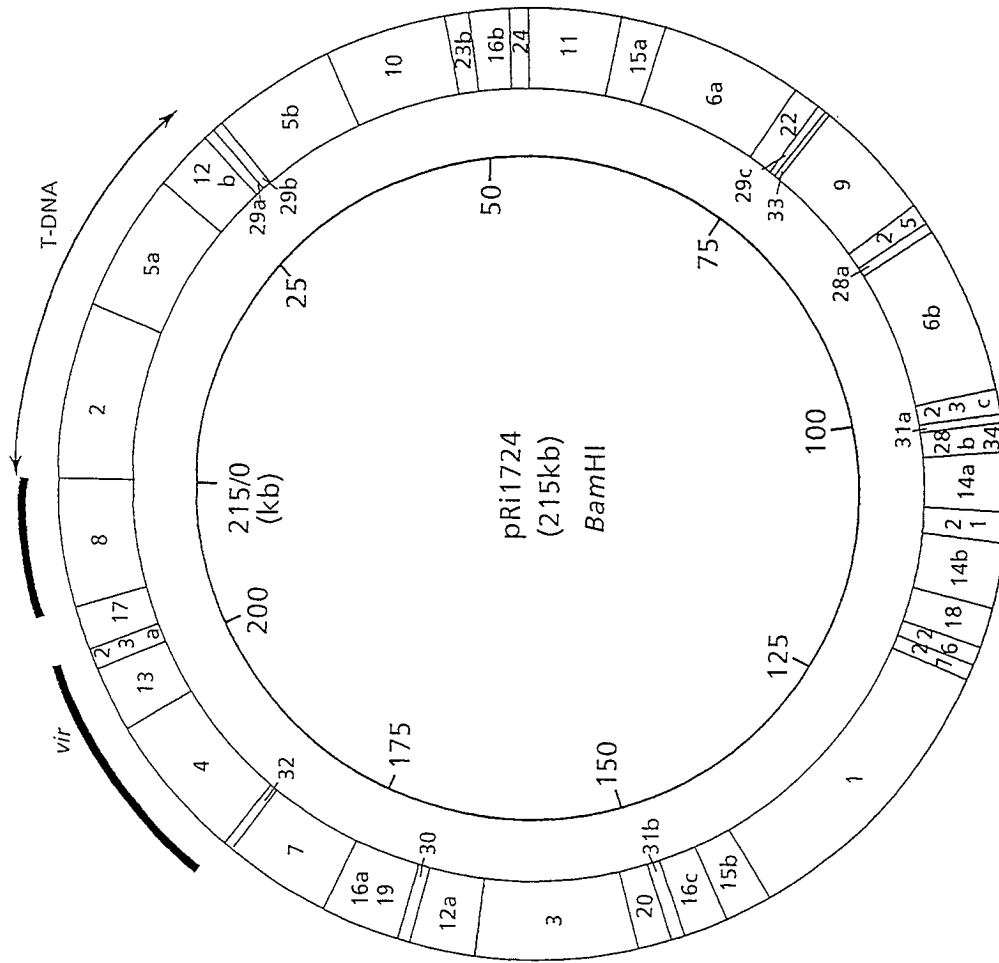
1724*rolB*プロモータ配列の上流からのdeletion. 各線の右側にプラスミドの名称を記した. 線の下に数字は翻訳開始点からの塩基数を示す.

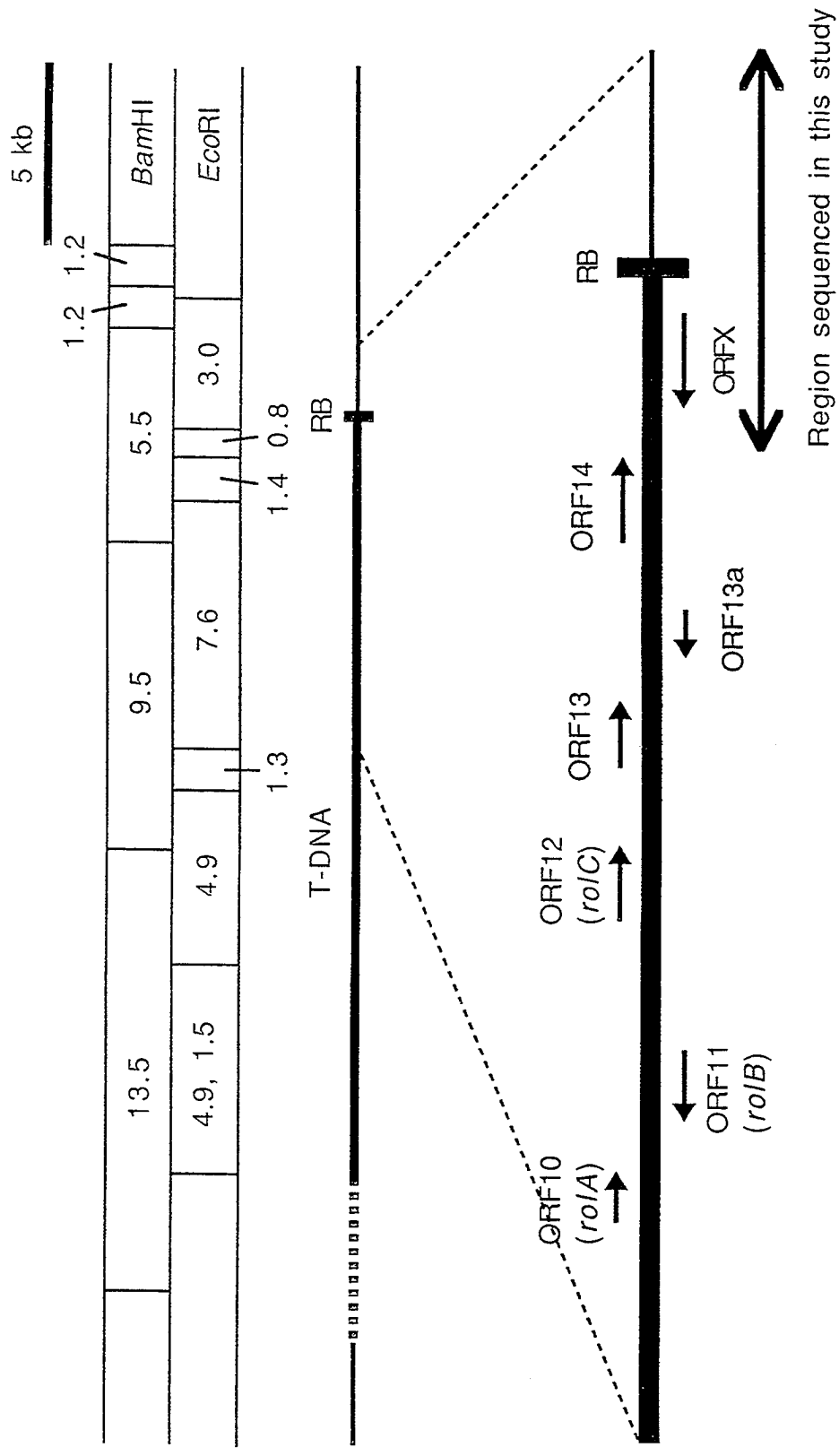
図 18

deletionした1724*rolB*プロモータのGUS活性. Deletionしたプロモータ-GUS配列を導入したタバコ毛状根各5本ずつのGUS活性を4-MUGを用いて測定した. 白抜きの棒は測定24時間前にMS液体培地で培養した各毛状根のGUS活性, 黒棒は測定24時間前にNAA添加MS液体培地で培養した各毛状根のGUS活性を示す. GUS活性は, pmol/min/mg proteinで算出した.

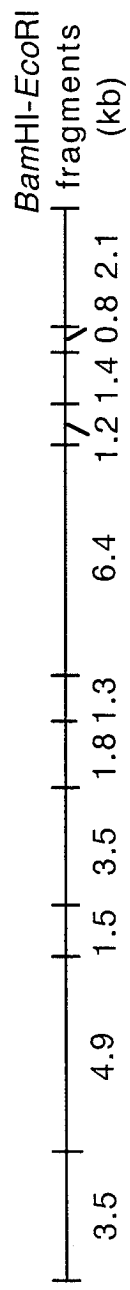
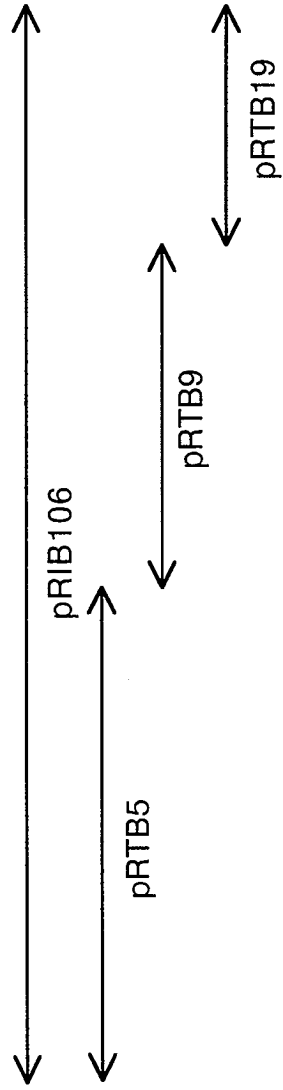
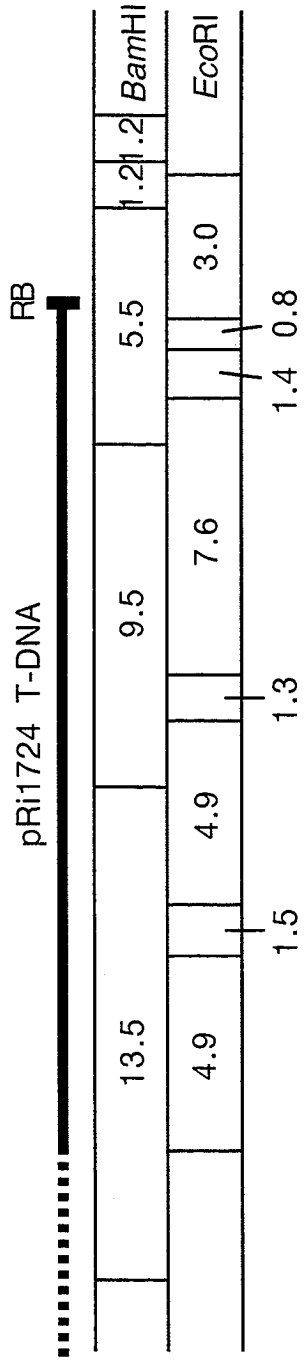
図 19

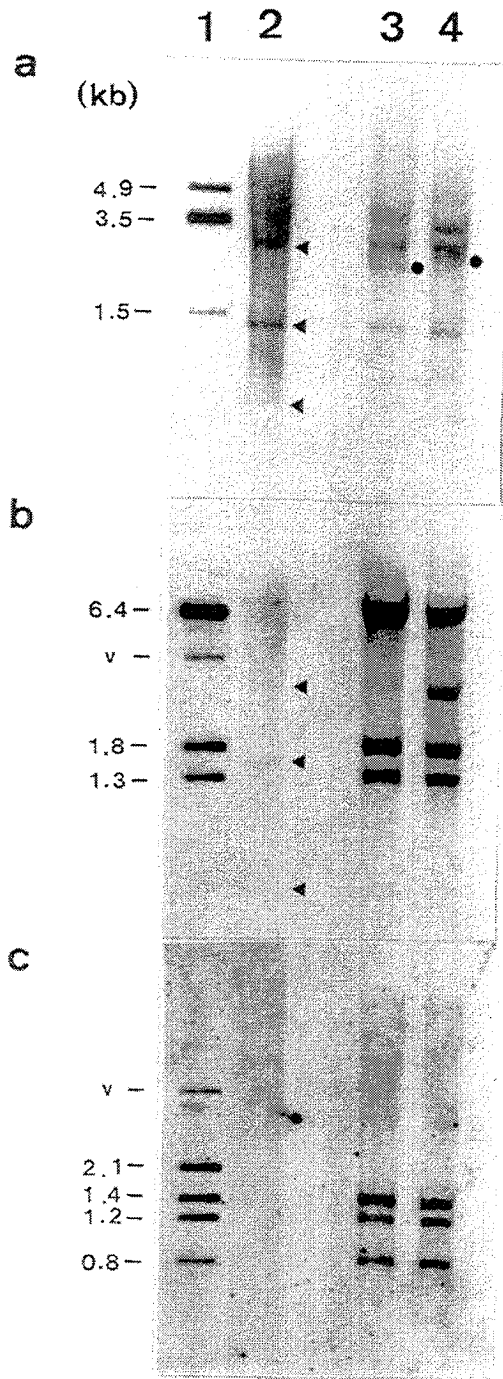
酵母One-Hybrid Systemの概要.





A restriction endonuclease map of and ORFs coded on pRi1724 T-DNA






```

pri1724 1: ACGAGCCACCTGCCCTCAGACCTACTGTTTCCTGGCTGGAAGGAAGTAGGTACGACGT 60
Ar-4 1: ..... 60
Vm-101 1: ..... 60
Vm-102 1: ..... 60

pri1724 61: CCTATTAAACGAATAGGTTTGACAGGATATATTCATAAGTAATGAGCCCTTCGTGCCITCG 120
Ar-4 61: ..... GACATCAGAGCGATATT.TGT..A.A.GG.GTCT.TGGG. 120
Vm-101 61: ..... ACC..GT.GGGT.TC.C.TTGT..T.A.A.CATT...A 120
Vm-102 61: ..... G.TGGCGCGCGCCGAGTT.C.T...GTTG.A.AAGA 120

pri1724 121: TGCCTTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCC 180
Ar-4 121: A.T..C.CGTGA.AG.C.TA.C.TAATTCA.T..AGC.TTGTGGCTC.. 170
Vm-101 121: .TTT..TTAA.AACT..CT.C.TT.ATT..T..AT.AAG.A..T.GGT.T 170
Vm-102 121: G.GAGC.AATTTCCTTGCTGAAA.CTTGAGAAA.AGCCTAAGTGGG.AA 170

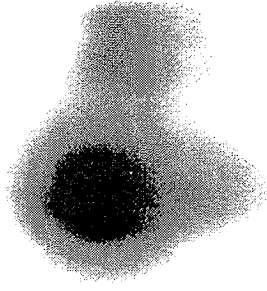
pri1724 181: CTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCCCTTCGTGCC 220

```

1 GGCATGCGGG GCCTCTTGCT CAAACAACCC TTATATTCTC CACTTCCAAG CCAACAAAGC TCAAGTGAAT TCGACATTGA 80
81 GAAAATCCGC AACTCCAGGT TCTTCAAATG TCTCGTCCC CCCACATCGA AATCGACGTC GCTGGACGCA CCATACGTGC 160
M S R S P H I E I D V A G R T I R A
161 GAGGTTAATG AGGGAACAAA ATCCCCAAGT GGTGGATCTT GTTACTCTC ATCTGCCGGT CACCAGCTTC GCGCTTCATC 240
R L M R E Q N P Q V V D L V Y S H L P V T S F A L H P
241 CAAACGTTTC GGGGGCGGGC TTCTTATTGC CTACGATGAT CACTCACACA GGAGAGAGCT ACATGGTTAA TCGCCACCCA 320
N V S G A G F L L P T M I T H T G E S Y M V N R H P
321 GGAGCGGTCT ATTTGTATGC CCCAGGACAG TCAATCGTCC TCACATACGG CGATACAAAC GAGAGCGCTC CCGTCAACAA 400
G A V Y L Y A P G Q S I V L T Y G D T N E S A P V N K
401 ATTTGCTGAG GTTTTCGAGG AAGACATGCC CGAACTTATG ACGATCGGAA AACTTGTTTA TGACCAAACCT CTTGCAAATG 480
F A E V F E E D M P E L M T I G K L V Y D Q T L A N V
481 TTGAGCATAA AGTAATAGGT GCCACAGTCC GACTGGCCGG GCCCCACGAC TTTATTTTGA CAGAGCGGCC CCCGCTTGAT 560
E H K V I G A T V R L A G P H D F I S T E R P P L D
561 CCCTGGAGG TCGTAGGCGG ATGGCGAAAA GCAGAAGCAA TTTTCTTGAC CGAAGCCAGG CGCGCGCTCT CCGGTGAGCC 640
P L E V V G G W R K A E A I F L T E A R R A L S G E P
641 CGCTGATATC TCTTCTAGCT TCTCAGGAGT TATCCCCAGC GGGATGGGAA CGGGGGGAAA CCTTCTTCCA GTTTGGATGC 720
A D I S S S F S G V I P S G M G T G G N L L P V W M H
721 ATCAATGGAG CTAATTGATG ACGGATGGGC CAAACACGCT TTATCGATTT GTTACCGACA CGCAAATCCC CGATATGACA 800
Q W S Y L M T D G P N T L Y R F V T D T Q I P D M T
801 CTCCCAATCA TGGTTGAGCT CTCCCGCAAT CATTACTGA GGCCTTTTAA CCATTTTCGAC TTTTGGGGG ACCTCGGCCT 880
L P I M V E L S R N H L L R P F N H F D F L G D L G L
881 CACAAAATTC AAGACATGGG GTGCGATCTA TTCTGCTGCA CTTGACGACC TGAATTCCTT TGCAGAGTTC AAGAGACTGA 960
T K F K T W G A I Y S A A L D D L N S L A E F K R L T
961 CAATCGCCCT CCTGACGCTA GTGAATCTCT TTCATCGAAG AGTTCAATTG CGTTTTCCGT TTTATCTTGG AAAGGCTTTT 104
I A L L T L V N L F H R R V Q L R F P F Y L G K A F
1041 TTGCACGGCT GCAAATATAG CACTCGGCTC GACCAGGATG AACTGACTT TTGAGCGGTA CTCAAACGAT AGCTTAAATA 112
L H G C K Y S T R L D Q D E T D F *
1121 TCTGCTTTTC ATTTCAATCG GCAATAATTT GCATGTTCCC GCGGTTTTCG TAAAATAAGA GTCACGGTAC CGTGACAACA 120
1201 ATACTATCAC CTTTGTATCT CTATCTTAAT TCATGCGTTA AGCTTACAAT ATTCGGCTTA TATTGTTGAT TTATGGTTAG 128
1281 TTTGATATT CCTCCACGAG AAATTGATGG TTCTTATTTT GATTCAAATT TTTTTTGAGG TGATTTTTTA GAGCGAAAAA 136
1361 TCAGGTGACA AAATAACAT ATTATTGATT ATAATGAGAC 1400

1 2 3

(kb)



1.35-

ORF

10

11

12

13

13a

14

Line

4 24

4 24

4 24

4 24

4 24

4 24

27 hours

0.69

1.2

0.8

1.2

7 days

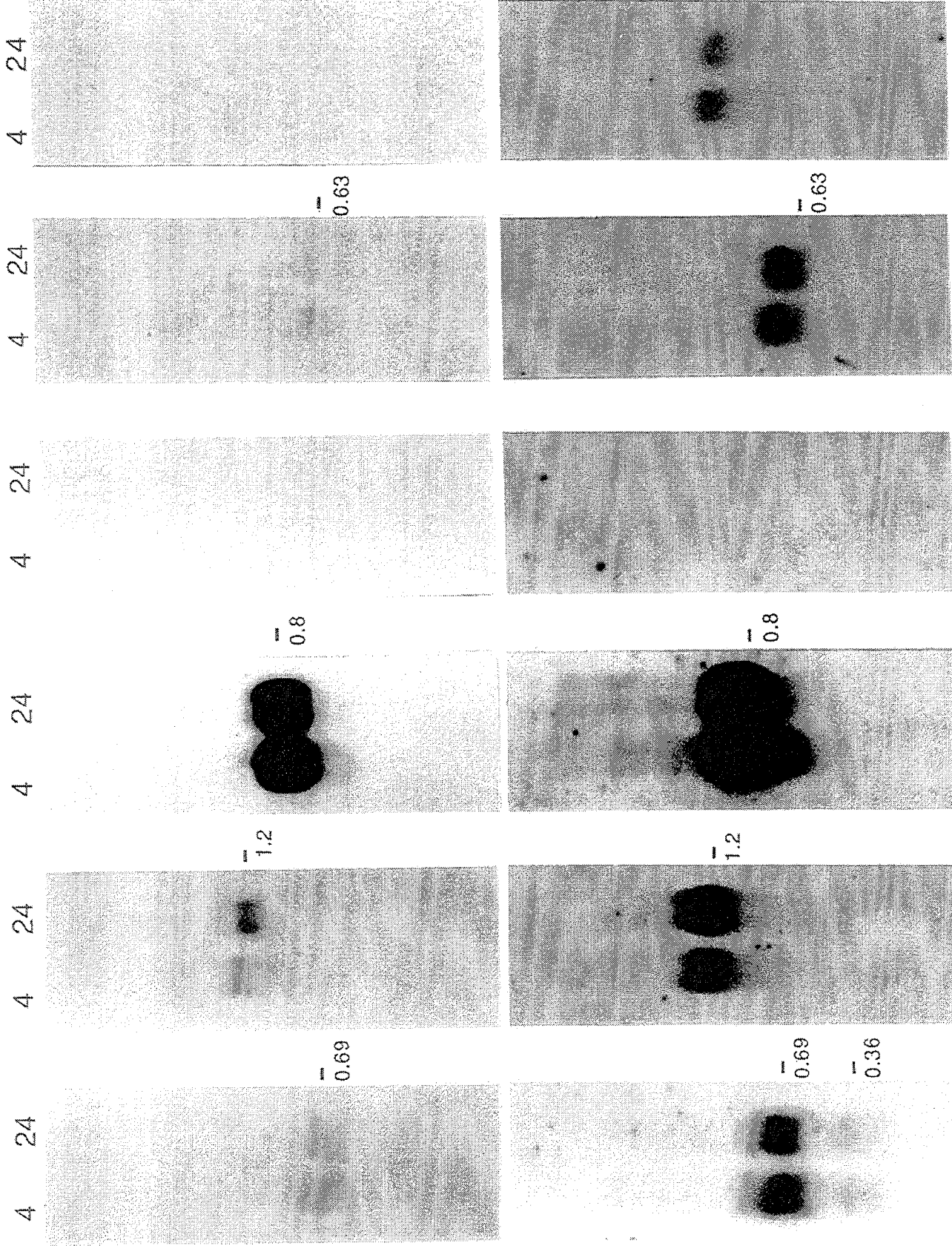
0.69

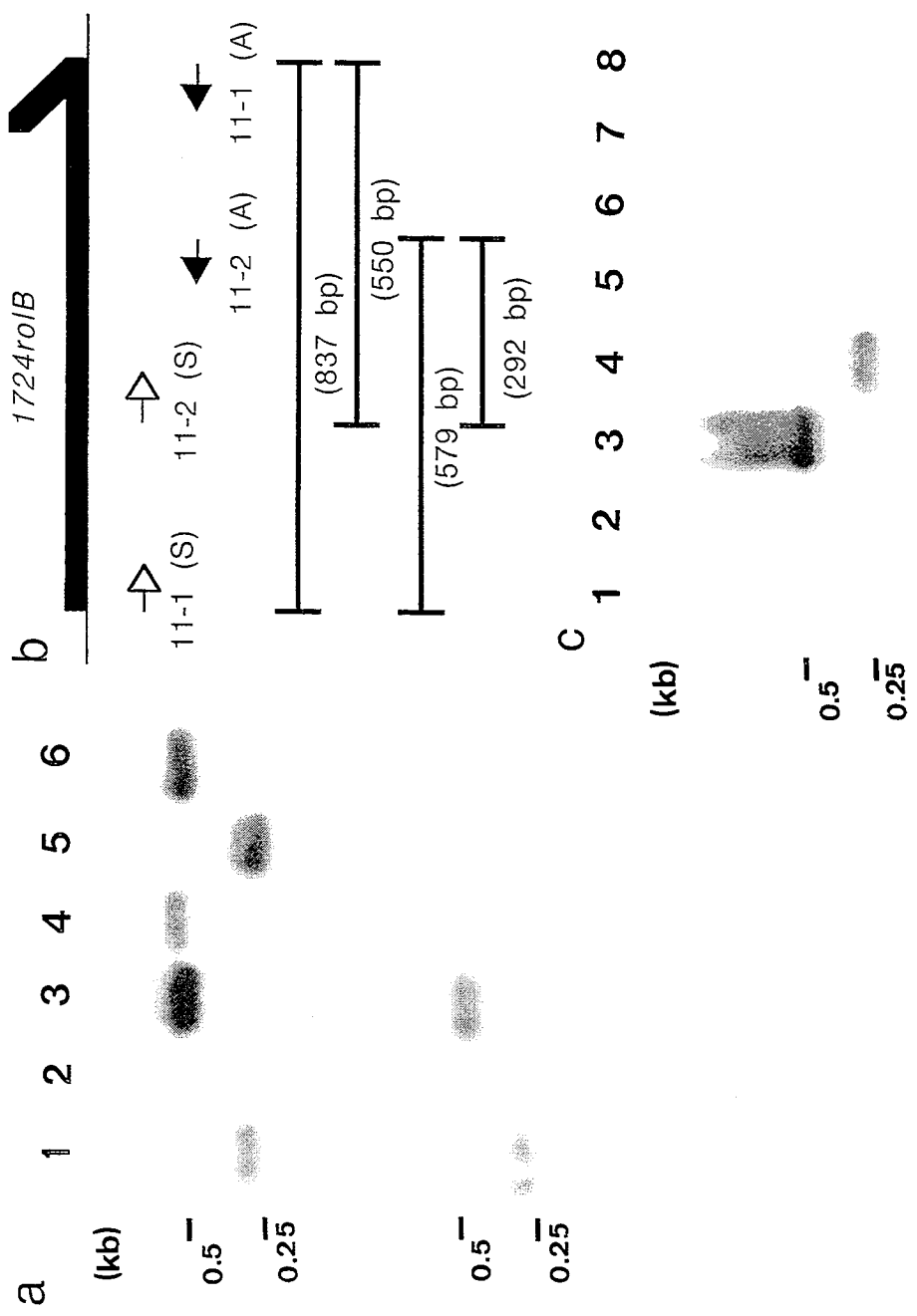
0.36

1.2

0.8

1.2





10 20 30 40 50 60 70
 TCCGTCAGGGGGTCCGCTCCTTTGAGGCGCTCTGGATGTGTTTCTTTAGCTCATCGCTGGACGATACGTGCCT

11 pro F ↗

85 95 105 115 125 135 145
 ACCTTAAGACTGGAAAAGAGAGACATAGGTCAAATTCGCCATGTTAGCAAAGTAGGAAATAATAGTGGCGTGC

1724 val C ←

160 170 180 190 200 210 220
 ACCAGAACTGGAAGCATCATTCCCTTTTATAGATGCTTTTGCTTATATGATTGAATATCAGTTAGGTATAGCTG

235 245 255 265 275 285 295
 CAAAACCAATATTCATAAATTATACGACTATAGATGTTCCACGTCTCACATTTGTAAAATAATTATAGACCGGC

310 320 330 340 350 360 370
 ACGTGTCTGTACTTAAAATGGCCTTTAAGGGTTTTGCATCTTTGCAAAGCACGGGTGGGAATAGGTTCTGCTGT

385 395 405 415 425 435 445
 CCAATAATGGTGTACATCGTCAATAGCATCTTTCTTTTTCTTTAATTATGGTCGCACGCGCCTACCTTTATTT

460 470 480 490 500 510 520
 ATGTTGCGAAAAGGCACTACTTTTTCAACCTGTGCACCACGTTAGGCCGTCTGCACCACACAGGTGTGCTTTTT

535 545 555 565 575 585 595
 CCATGGGATCTCATTCAAAGCACTTAAGTCCGACTCCTTCTTTTAGATAAATGCTATTTTCGGCCCATTTTG

610 620 630 640 650 660 670
 ATTTTGGGCCCTAAAACGATTGATGGGCTTCAAATCTAAAACCTGTATCAGGATGGCACCTATAGCAAGATCCG

685 695 705 715 725 735 745
 AATGGACTGTTTGCCTGGCGTGGCAATATTAAGTCGTATAGGTCCAAAGTGTATTTAATATTACAATTGCTATAT

760 770 780 790 800 810 820
 AATCCACATTTTATTGGCATAAGAGTAATTGCGTAATTGAAATAAATTATTTGTATGGGCAGACATATGCACCTT

835 845 855 865 875 885 895
 CAAAATATAACACATATATCAATAGATTTAATTGATATTGTCGGCAATAATTACATCTTAATTATAAATAGCATC

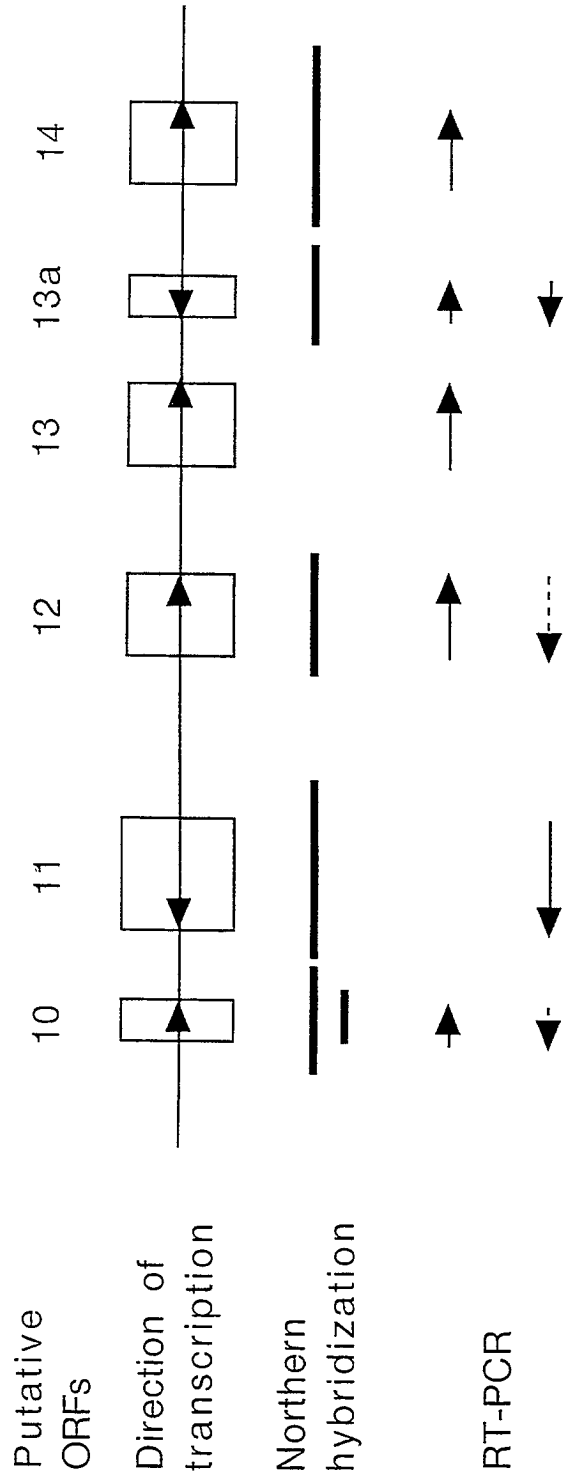
910 920 930 940 950 960 970
 GAGAGTGCAACCATAAACACGTTTTCCCGTGCAGCTTTCACGAAATCCTATATTCGGCCAACCTTAAAGCTCTACC

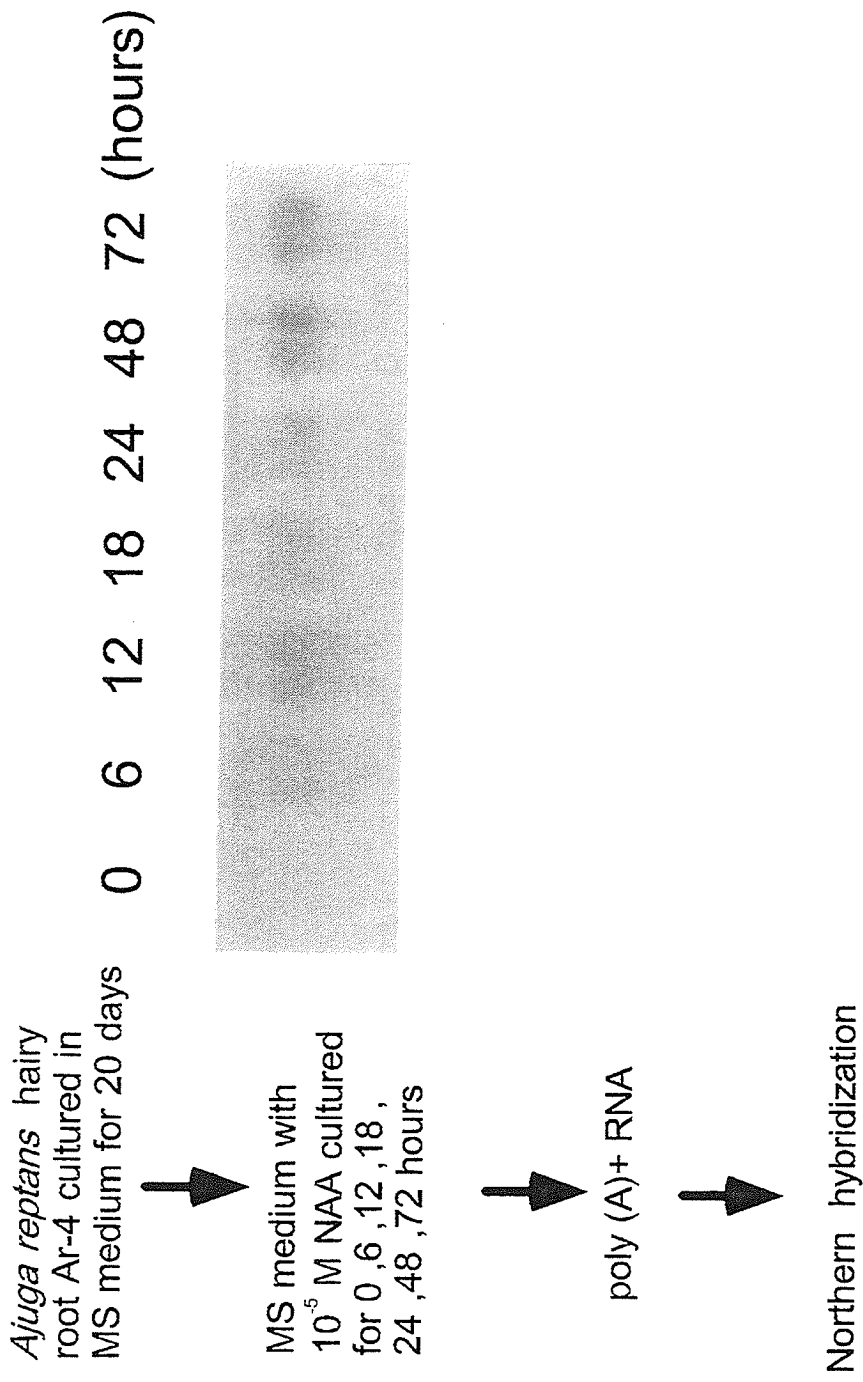
985 995 1005 1015 1025 1035 1045
 CCACCCTCCTCATTTTCATGTATCTTTTAGACATACTTCACTAAAGCCAAACAAAAAACAACAAAAAGCTAGGCC

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CACTACTATGACCTCGTGACCAATCAAGCGGGCATTATTTTTCGCTTGATCCAGGTTTTAAGGCCGCCATGTCCG

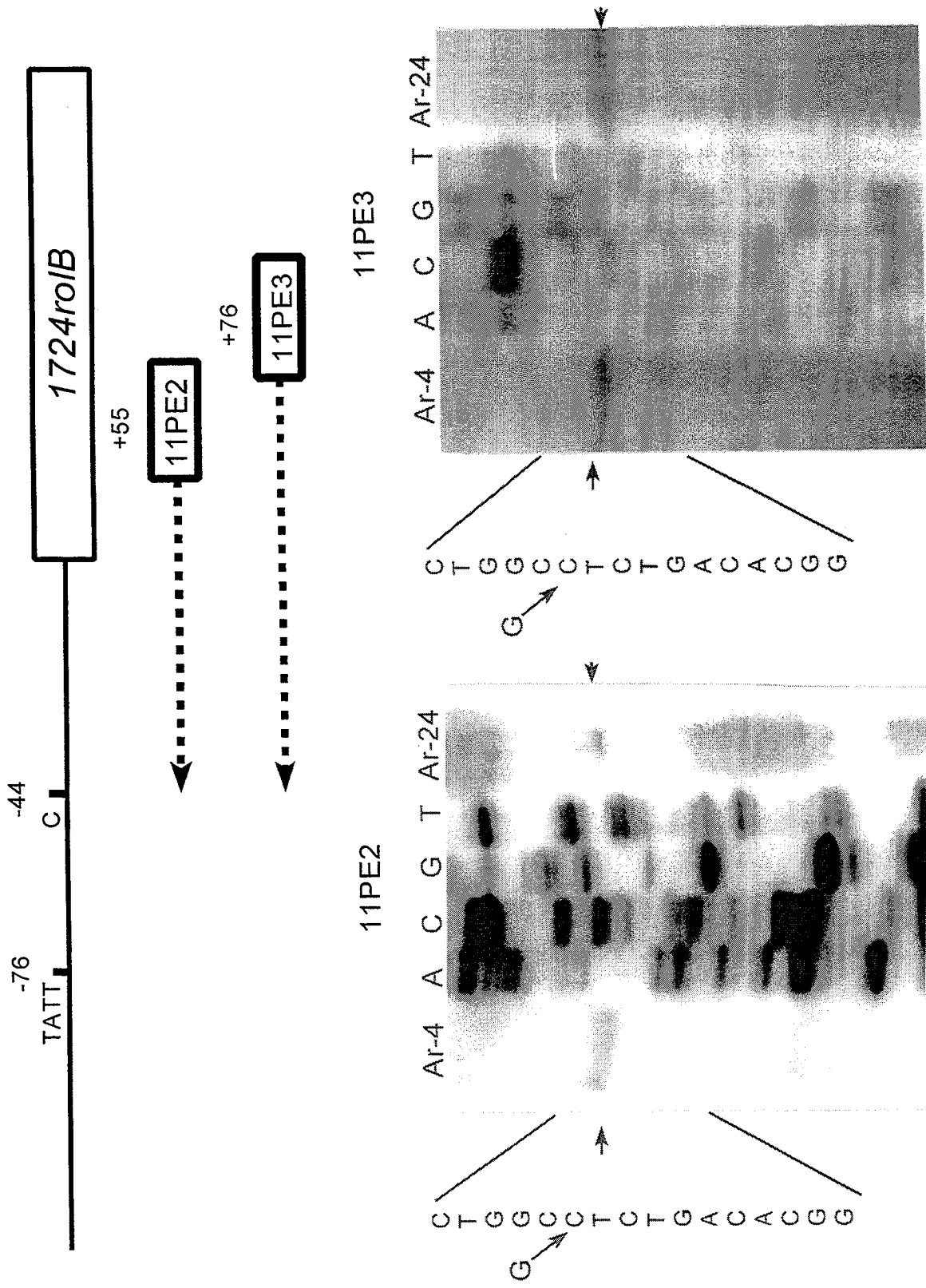
1135 1145 1155 1165 1175 1185 1195
 AGCATCGATTTTGTGCGATGGTGATTTATTCAGATTGCCTCTGGCTTTCCCGACCGGAGACTGTGCCTGATTG

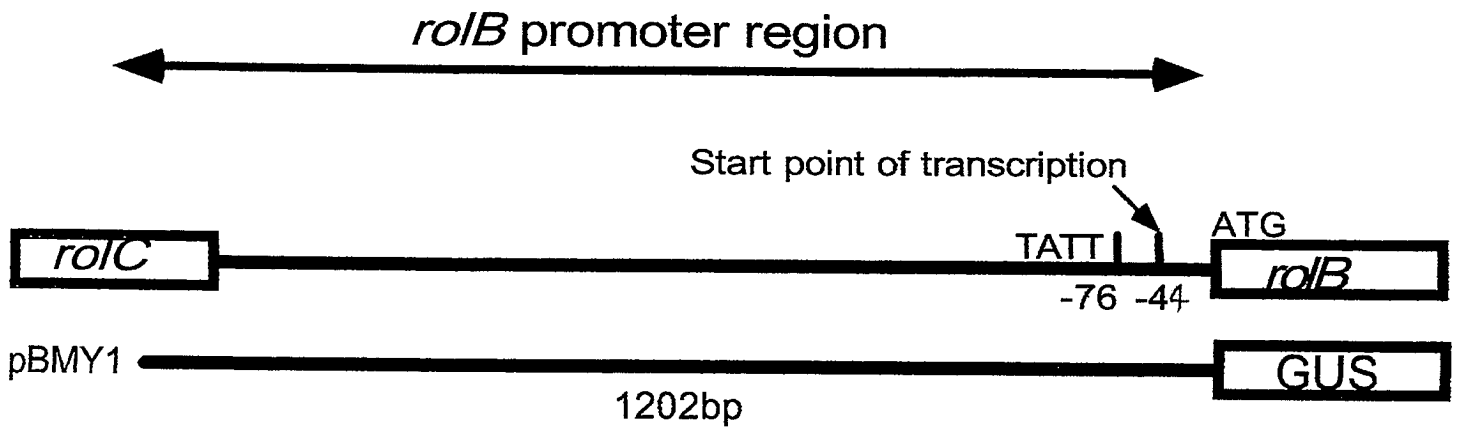
↑





Activation of 1724ro/B promoter by NAA





Agrobacterium rhizogenes strain DC-AR2

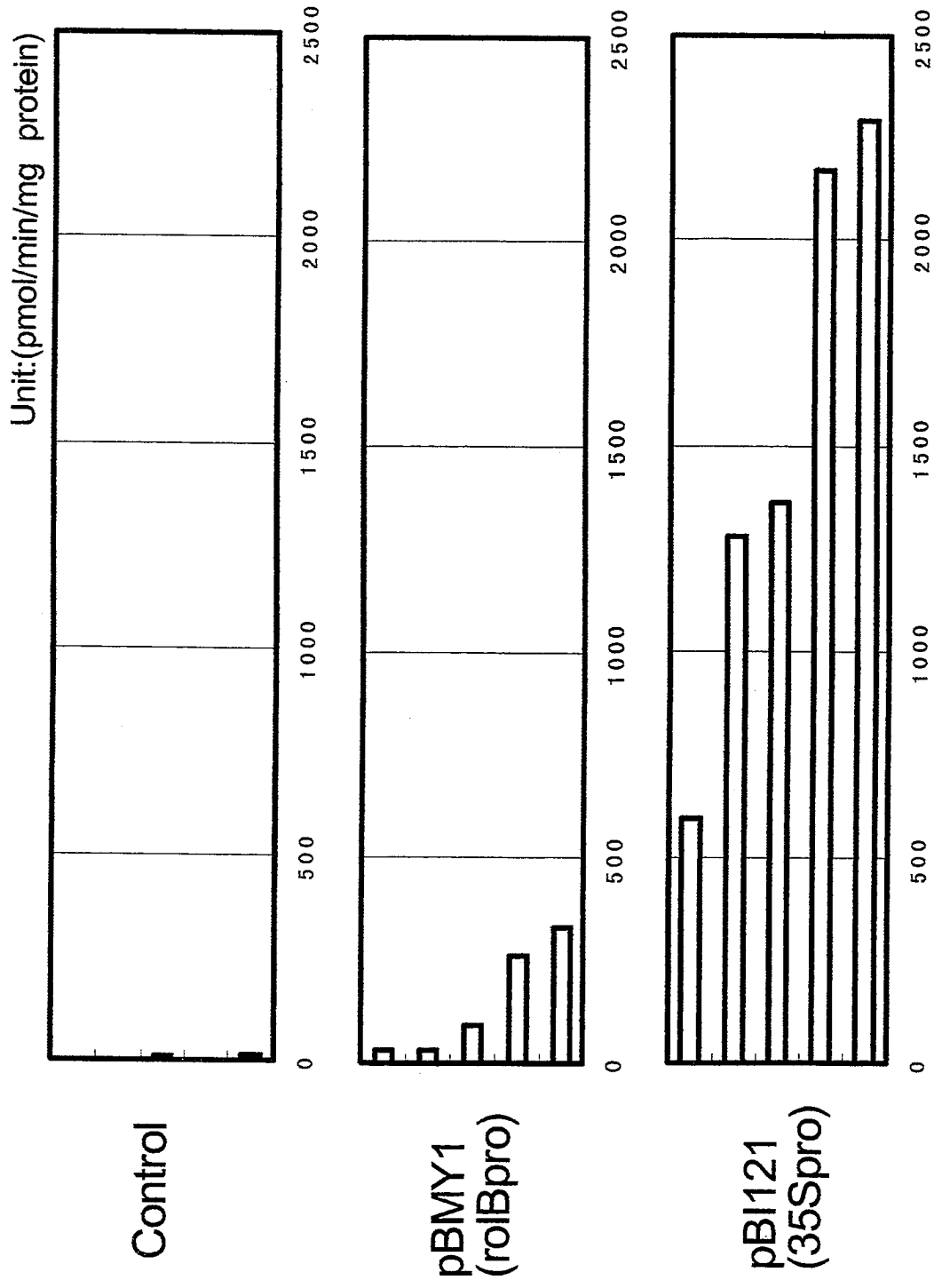
Infection of *Nicotiana tabacum* leaf disk

Hairy roots

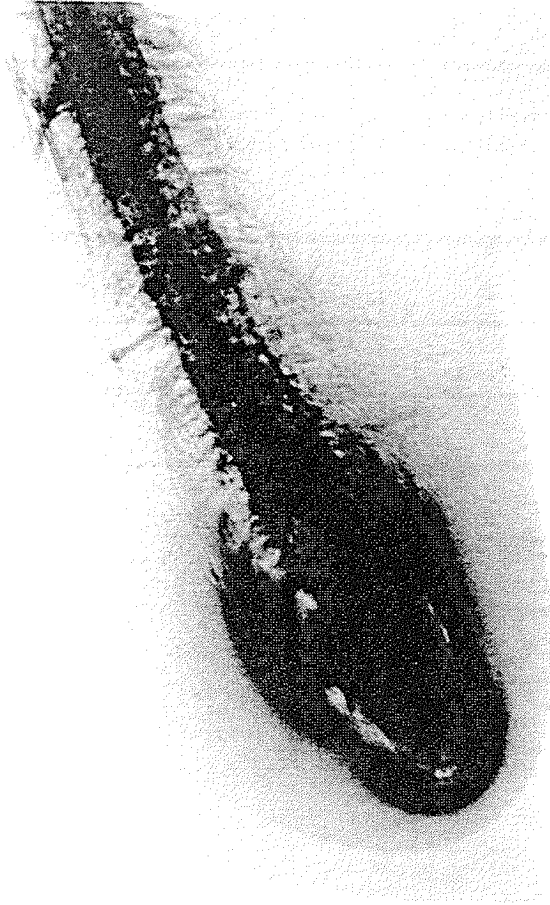
1724*roIB* promoter activity

Histochemical staining
(X-Gluc)

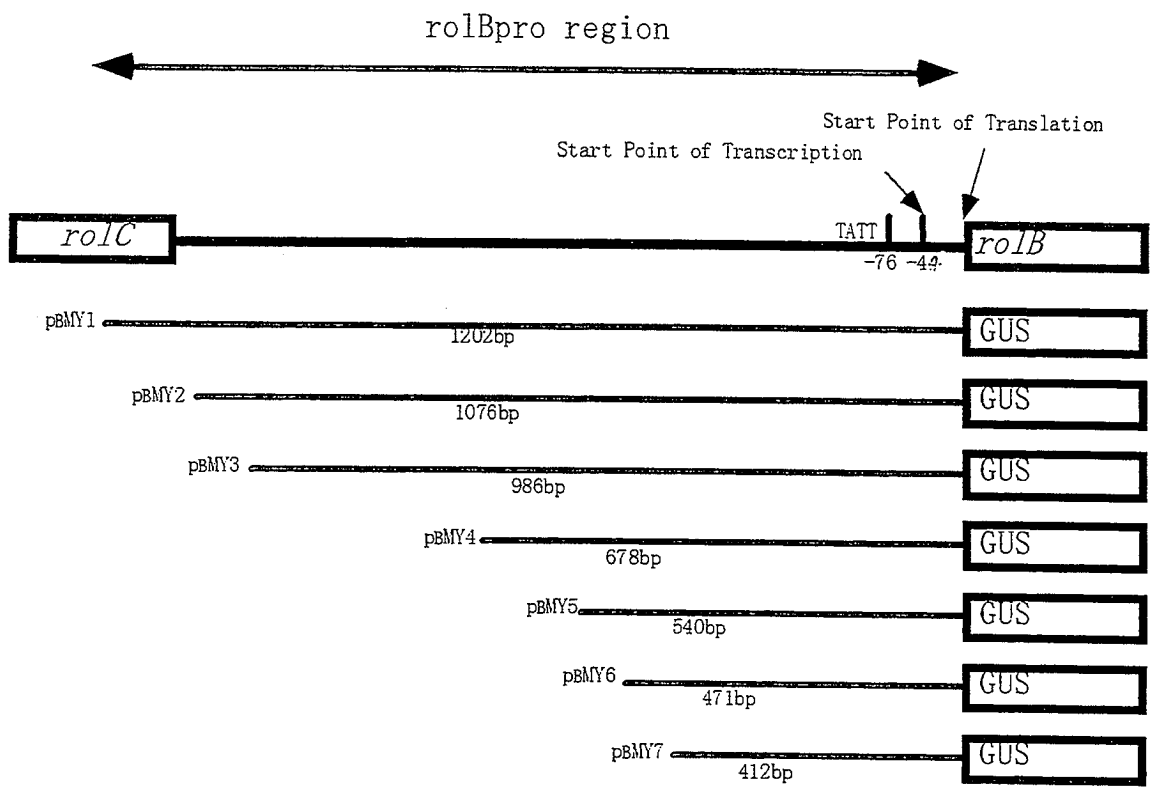
Fluorescent measurement
(4-MUG)

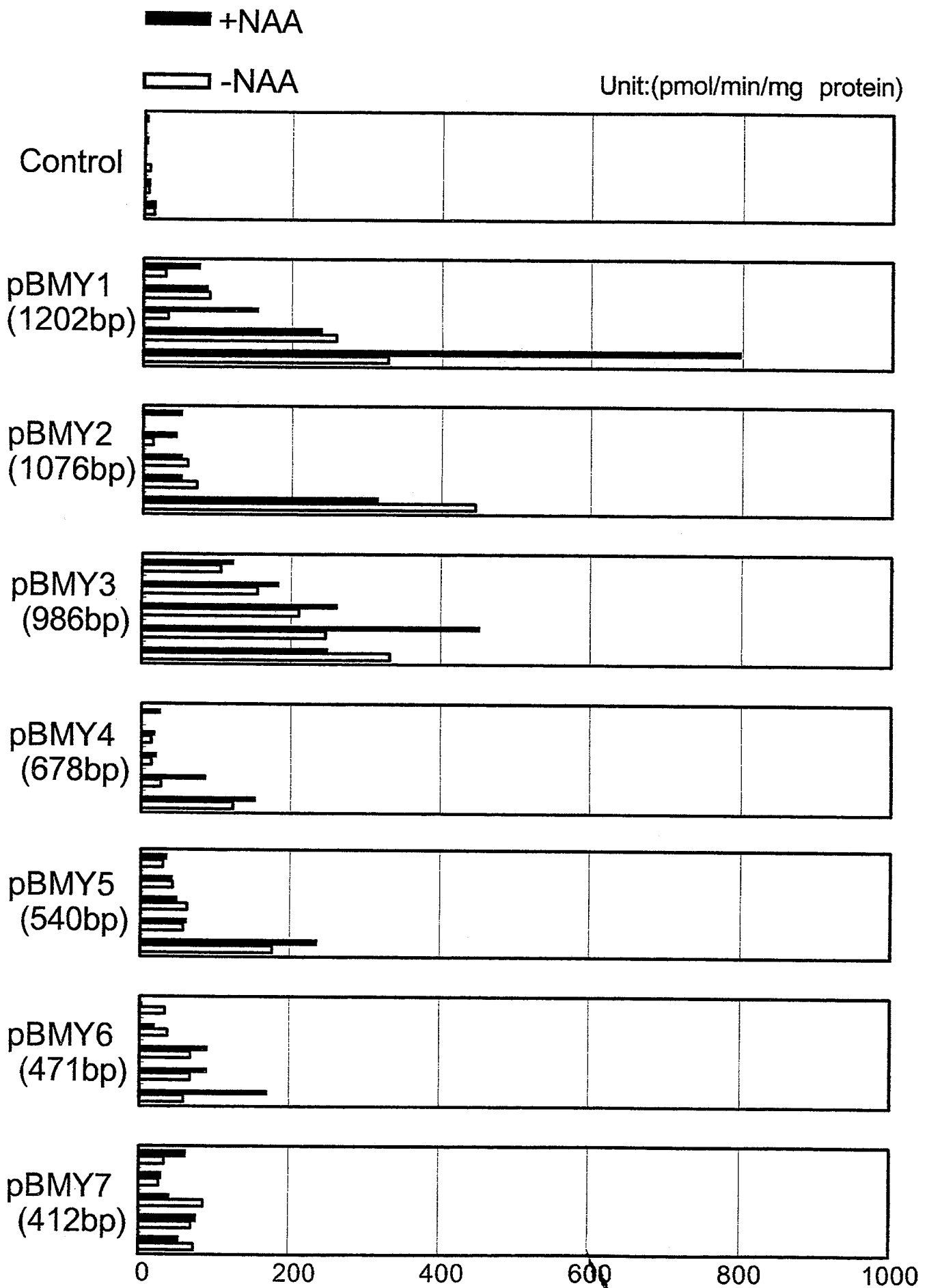


GUS activity in hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 with pBMY1



GUS staining of hairy root by
Agrobacterium rhizogenes DC-AR2 with pBMY1





Deleted *ro/B* promoter activity

