

細井 和雄, 姚 陳娟  
 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
 生体システム栄養科学部門摂食機能制御学講座  
 口腔分子生理学分野)

Suppression of aquaporin 5 gene expression by endotoxin via cross-coupling of transcription factors

Kazuo Hosoi and Chenjuan Yao (Department of Molecular Oral Physiology, Subdivision of Stomatology, Division of Biosystem and Nutritional Science, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, 3-18-15, Kuramoto-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8504, Japan)

Current address of C.Y.: Departments of Medicine & Physiology, 1246 Health Sciences East Tower, University of California San Francisco, San Francisco, CA 94143-0521, USA (for study leave)

## メンデルの法則における不完全優性と植物の遺伝子量効果

### 1. はじめに

F1 雑種が両親の表現型の中間の表現型を示し、メンデルの法則の一種の例外とも考えられる不完全優性 (incomplete dominance) は、しばしば花の色を例にして記述されている。例えば、Thomas Hunt Morgan (1926) の古典的な遺伝学の教科書<sup>1)</sup>では、赤色花と白色花のオシロイバナの F1 雑種は桃色花をつけ、その自家受粉した次の世代では赤色花：桃色花：白色花が 1：2：1 の割合で分離する例が記述されている。James D. Watson らの教科書<sup>2)</sup>でもキンギョソウの花の色での同様の記述があり、日本の高校の教科書では、1935 年に今井喜孝らが最初に記述して以来、主にマルバアサガオの例<sup>3,4)</sup>が記載されている (図 1)。ここで記述されたキンギョソウやマルバアサガオでも、変異により白色花を賦与する花の色に係わる遺伝子に関して、赤色花の野生型と白色花の変異型のヘテロの場合は中間色の桃色花をつけるが、これらの現象の分子機構には不明な点が多い。

オシロイバナの花の色素は花の主要色素であるアントシアニンではなく、生合成系路も未解明の点が多いバタレイン<sup>5)</sup>であり、不完全優性に係わる変異も全く解明されていない。キンギョソウの場合も、アントシアニン色素生合

成系<sup>5)</sup>遺伝子の中で、後述の *CHS* (*chalcone synthase*) 遺伝子の半優性 (semidominant) 変異の場合以外に、*F3H* (*flavonoid 3-hydroxylase*) 遺伝子の劣性 (recessive) 変異との関連も示唆されているが<sup>6)</sup>、後者の詳細は不明である。マルバアサガオでは、不完全優性に係わる白色花変異は *CHS* 遺伝子内に DNA 型トランスポゾンが挿入した無発現変異 (null mutation) である<sup>3)</sup>。最近我々は、マルバアサガオの *CHS* 遺伝子がヘテロの状態では mRNA 量、タンパク質量、花弁に蓄積するアントシアニン色素量が各々野生型の約半分になるため不完全優性を示すことを明らかにした<sup>4)</sup>。換言すれば、マルバアサガオの不完全優性は活性化遺伝子数 (量) に従って表現型や遺伝子生成物の量が変わる遺伝子量効果 (gene dosage effect) のためであった。さらに、我々は相同組換えを介したノックインターゲティングによりイネの DNA メチル化酵素の一つ *MET1a* (*methyltransferase 1a*) 遺伝子の発現も遺伝子量効果を示すことを見出した<sup>7)</sup>。これらの結果を踏まえて、従来ほとんど問題にされてこなかった植物の内在性遺伝子発現の遺伝子量効果の問題について述べる。

### 2. *CHS* 遺伝子と不完全優性

花の主要色素アントシアニンはフラボノイド色素であり、4-クマロイル-CoA と 3 分子のマロニル-CoA からカルコンを生合成する *CHS* (カルコン合成酵素) は、フラボノイド生合成経路の最初の反応を司る酵素 (first committed enzyme) である<sup>3,5,6)</sup>。キンギョソウの *CHS* 遺伝子については、劣性の無発現変異と共に半優性変異が知られており、後者は不完全優性を示す。キンギョソウの花の色に係わる *CHS* 遺伝子は遺伝学的には *Nivea* (*Niv*) 遺伝子とも呼ばれているが、この遺伝子の各々の *niv* 変異の構造を図 1a に示す。即ち、無発現変異 *niv-527* はプロモーターや構造遺伝子の 1 部を欠いた欠失 (deletion) 変異で白色花をつけるが、この白色花変異体と赤色花を咲かせる野生型を交雑して得られる F1 雑種は野生型と同じ赤色花をつける。ところが、*CHS* 遺伝子内に逆反復配列 (inverted repeats) が生じた半優性変異 *niv-525* や *niv-572* をもつために白色花をつける変異体と赤色花の野生型を交雑して得られる F1 雑種は野生型よりも淡い色の花をつける<sup>8)</sup>。換言すれば、*niv-527* は劣性変異であるが、*niv-525* や *niv-572* は野生型に対して部分的に優性 (partial dominant) を示す変異であって、キンギョソウの花で同じように不完全優性の形質を示しても、劣性の *F3H* 遺伝子の変異とは、分子機構が異なると考えられる<sup>6)</sup>。無発現変異 *niv-527* は F1 雑

種において、1コピーの野生型 *CHS* 遺伝子さえあれば、野生型と変わらない赤色花を示すアントシアニン色素を合成して花弁に蓄積するのに十分な量の mRNA や酵素を生成できると考えられている<sup>8)</sup>。一方、半優性変異 *niv-525* や *niv-572* の場合は、これら半優性変異型の *CHS* 遺伝子から生じた生成物が野生型 *CHS* 遺伝子の正常な発現を妨げるために、換言すれば、野生型 *CHS* 遺伝子の活性はトランスに (*in trans*) 抑制されるために、F1 雑種では野生型と変異型の間の表現型を示すと考えられている<sup>8)</sup>。これ以上に詳細な解析は、1990 年代初頭には行われてはいないが、おそらく逆反復配列の転写産物である二重鎖 RNA 分子から生じた短い二重鎖 RNA 分子である siRNA (small interfering RNAs)<sup>9)</sup> が、野生型 *CHS* 遺伝子の mRNA に作用して、*CHS* の発現を抑制する遺伝子サイレンシング (gene silencing) を起こし、花弁を野生型と同じような赤色にするのに十分な量の *CHS* タンパク質が生成できなくなったためなのではないかと考えられている。現在、不完全優性を示す花の色の変異の中では、これら半優性変異 *niv-525* や *niv-572* は、今回明らかになったマルバアサガオの花弁の色素生合成に係わる *CHS-D* 遺伝子の劣性変異と共に、変異遺伝子の構造がよく解析されている数少ない例である。

マルバアサガオの場合は、図 1b に示すように、花弁のアントシアニン色素の生合成に関与する *CHS-D* 遺伝子がトランスポゾンの挿入により不活性化された劣性の無発現変異であり<sup>3)</sup>、この変異体の白色の花弁では、*CHS-D* 遺伝子の mRNA、カルコン合成酵素、アントシアニン色素の何れの蓄積も観察されなかった。これに対して、劣性の無発現変異体と野生型の F1 雑種では、花弁の *CHS-D* mRNA、カルコン合成酵素、アントシアニン色素の蓄積量が全て野生型の花弁の約半分であり、結果として F1 雑種の花の色は野生型と変異体の中間の淡い色となっていた<sup>4)</sup>。即ち、活性な *CHS-D* 遺伝子のコピー数に応じた遺伝子量効果を示した結果、不完全優性を示したものと思われる。同じ花弁のアントシアニン色素生合成に関与する *CHS* 遺伝子でも、キンギョソウの場合は、上記の無発現変異 *niv-527* と野生型 *Niv* のヘテロの場合から明らかのように、1コピーの野生型 *CHS* 遺伝子だけで十分な活性をもち、2コピーもつ野生型ホモの場合と同様の赤色花をつけるのに対して、マルバアサガオでは、1コピーの野生型 *CHS* 遺伝子しかもたない無発現変異と野生型のヘテロの場合は活性が不十分であるために、2コピーの野生型ホモの場合と比べて約半分の活性しかもたない遺伝子量効果を生み、淡

赤色の花を咲かせる不完全優性の原因になっている。なお付言すれば、キンギョソウ *CHS* 遺伝子の半優性変異による不完全優性の場合、遺伝子量効果の場合とは異なり、野生型 *CHS* 遺伝子の活性の抑制の程度により、残存する *CHS* 遺伝子の発現量が決まるものと思われる。

### 3. ノックインターゲティングによる 遺伝子量効果へのアプローチ

メンデルの観察に言及するまでもなく、多くの遺伝子の場合には野生型と劣性の無発現変異体との F1 雑種は野生型ホモと同じ遺伝形質を示して不完全優性を示さない。この点について考え得る理由は以下の二つに大別できよう。

(1) 多くの遺伝子に遺伝子量効果があるが、1コピーでも野生型と同じ表現型を賦与するに十分な量の遺伝子生成物を生じる。(2) 多くの遺伝子には遺伝子量効果が認められない。植物では、形質転換の際の導入遺伝子 (transgene) としてゲノムに組込んだレポーター遺伝子の遺伝子量効果に関する定量的解析が報告されている。例えば、部位特異的組換え系 Cre-lox を利用して、ゲノム上の予め組込んでおいた lox 部位に *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) レポーター遺伝子を組込んだ形質転換イネでは、1コピーの *GUS* 遺伝子をもつ系統に比べて2コピーの場合は *GUS* 遺伝子の発現が約2倍になる遺伝子量効果が観察されている<sup>10)</sup>。但し、この場合でもゲノム上の lox 部位以外にもランダムに多コピーの *GUS* 遺伝子が挿入した系統では、*GUS* 遺伝子のサイレンシングも観察されている<sup>10)</sup>。導入遺伝子が1コピーの場合は、遺伝子サイレンシングを起こさずに安定に発現するケースが多いため<sup>11)</sup>、導入遺伝子が1コピーの植物体を得るための工夫も提案されている<sup>10-12)</sup>。

導入遺伝子の発現がゲノム上の挿入部位やコピー数によって影響を受けずに常に再現的な結果を得られる最善の方法は、相同組換えを利用した遺伝子ターゲティングにより、ゲノム上の標的遺伝子内に予めデザインした構造通りに、1コピーだけの導入遺伝子を組込めるノックイン改変であろう<sup>7)</sup>。我々は、アグロバクテリアを介した形質転換において、ポジティブ選抜遺伝子をベクターの相同組換え領域の内部に組み込み、発現すると植物細胞を殺すネガティブ選抜遺伝子を T-DNA 領域内の相同組換え領域の外側に付加した (図 2a)、ポジティブ・ネガティブ選抜法による遺伝子ターゲティングを行った<sup>7,13,14)</sup>。これは、導入遺伝子を含む T-DNA 領域がゲノムにランダムに挿入された場合には、ネガティブ選抜遺伝子が発現して、そのような形質転換体を殺すことで効率的に除けるので、相同組換え領域

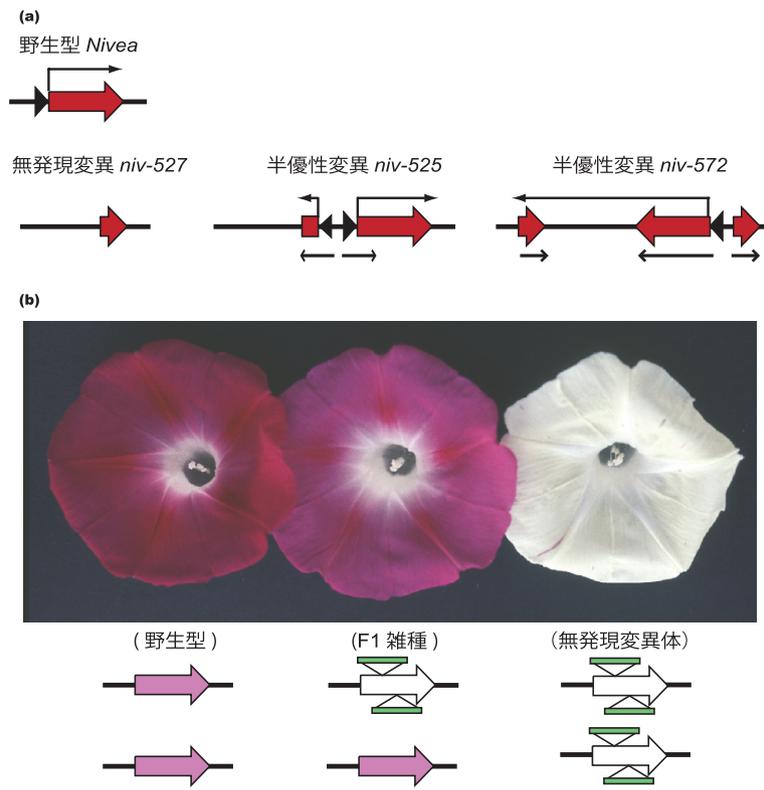


図 1

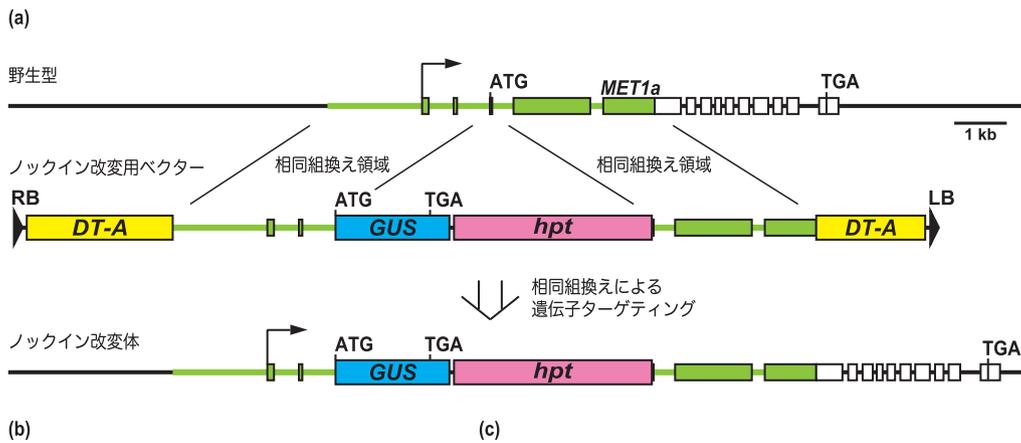


図 2

内で目的の組換えが起こったターゲット改変体を濃縮できる手法である。この手法の特徴は、1コピーの導入遺伝子が2対の染色体の一方だけに組込まれたヘテロの状態の形質転換体だけが得られることであり、標的遺伝子以外の部位にさらにランダムな挿入が起こった形質転換体を得られることはほとんどない<sup>7,13,14</sup>。我々はこの手法により、イネの二つの維持型 DNA メチル化酵素遺伝子の一つである *MET1a* の内在性プロモーターに *GUS* レポーター遺伝子をつなげたノックイン改変を行った (図 2a)<sup>7</sup>。この場合は、*MET1a* 遺伝子内に *GUS* 遺伝子やポジティブ選抜遺伝子を組込んで *MET1a* 遺伝子を破壊しているため、ノックイン・ノックアウト改変である。得られた *MET1a* 遺伝子の欠損変異体の表現型は野生型と変わらなかったが、これは、もう一つの維持型 DNA メチル化酵素遺伝子である *MET1b* 遺伝子が正常であれば、イネの通常の生育には十分であることを示唆しているものと思われる。図 2b に示すように、独立に得た複数のターゲット変異体の間で *GUS* 遺伝子の発現による (*GUS* タンパク質の生成量を反映する) *GUS* 染色の結果には再現性があり、しかも何れの系統でも *GUS* 遺伝子のコピー数に依存する遺伝子量効果を示した。実際、定量 PCR の結果も、*GUS* 遺伝子ばかりか *MET1a* 遺伝子の発現にも遺伝子量効果があり、*GUS* 遺伝子の発現は *MET1a* 遺伝子の発現を反映していた (図 2c)<sup>7</sup>。なお、*MET1a* プロモーター断片に *GUS* 遺伝子をつなげてランダムに挿入した場合は、*GUS* 遺伝子の発現は系統間で大きく異なり、遺伝子サイレンシングも観察された<sup>7</sup>。得られた *MET1a* 遺伝子のターゲット変異は無発現変異であり、何ら表現型を示さなかったにもかかわらず、*MET1a* 遺伝子の発現は遺伝子量効果を示した。この我々の報告が顕花植物での最初のノックインターゲットの成功例であり、このような植物の内在性遺伝子の発現の遺伝子量効果に関する報告はほとんどない。

#### 図 1 不完全優性を賦与する *CHS* 遺伝子の変異

(a) キンギョソウ *CHS* (*Nivea*) の変異。大きな赤矢印は *CHS* 遺伝子を、黒三角形はプロモーターを示す。下の小さな矢印は遺伝子の方向を、上の細い矢印は *CHS* 遺伝子の転写を示す。(b) マルバアサガオの不完全優性と *CHS* 遺伝子の変異。大きな矢印は *CHS* 遺伝子を、三角形は DNA 型トランスポゾン *Tip100* の挿入を示す。

#### 図 2 ノックイン改変と遺伝子量効果

(a) イネ *MET1a* 遺伝子のノックイン改変。ベクターは T-DNA 領域のみを示し、*hpt* と *DT-A* は各々ポジティブとネガティブ選抜遺伝子を示す。これらの選抜遺伝子の両脇の相同組換え領域で野生型ゲノムの対応する領域との間で相同組換えが起これば、ノックイン改変体が生じる。(b) 三つの独立に得たノックイン改変体 (L51, L83 及び L110) の胚での *GUS* 発現。(c) 定量 PCR による *MET1a* と *GUS* 遺伝子発現。\*の付いた発現量を 1.0 とした時の相対的発現量で示す。G/G, +/G, +/+ は各々ノックイン改変ホモ、ノックイン改変ヘテロ、野生型ホモの分離体を指し、(N) は日本晴 (対照) を示す。

## 4. 遺伝子量効果の普遍性

多くの遺伝子の場合には野生型と劣性の無発現変異体の F1 雑種は不完全優性の表現型を示さない。これらの場合は、既に述べたように、(1) 遺伝子量効果によって 1 コピーの場合は 2 コピーの野生型の約半量のタンパク質しか生成しなくても野生型と同じ表現型を賦与しているのであろうか、それとも (2) 遺伝子量効果が認められないのだろうか。この点については、2 倍体酵母での解析結果が最近報告されている<sup>15</sup>。酵母の 730 の内在性遺伝子を *GFP* (*green fluorescent protein*) 遺伝子と融合させて、各遺伝子について検討したところ、少なくとも 80% の遺伝子では、(1) 遺伝子量効果が認められ、ヘテロの状態では 1 コピーの遺伝子だけで 2 コピーある野生型と同じ表現型を賦与するに十分な量のタンパク質を生成していたが、(2) 5% 以下の遺伝子では、遺伝子量効果が認められず、遺伝子が 1 コピーだけでも、2 コピーある野生型と変わらない量のタンパク質を生成していた<sup>15</sup>。即ち、2 倍体酵母の大部分の遺伝子は、通常必要量の 2 倍の発現をしている。勿論、酵母の状況をそのまま植物に当てはめられるのか否かは議論のあるところでもあろうが、植物でも多くの遺伝子は遺伝子量効果により通常の必要量の 2 倍の遺伝子を発現しているために、野生型と劣性の無発現変異体との F1 雑種は不完全優性を示さずに野生型と同じ表現型を示すのかもしれない。もしもそうであって、図 1 の *CHS-D* 遺伝子がともに遺伝子量効果を示すのであれば、キンギョソウの *CHS* 遺伝子の方がより一般的で、マルバアサガオの場合は何らかの理由で発現活性が低下した例外的遺伝子なのかもしれない。

## 5. おわりに

本稿では、しばしば花の色を例にして記述されている不完全優性と主に植物の遺伝子量効果について述べた。ここで記述した遺伝子は *CHS* や *MET1a* など何れも酵素タン

バク質をコードする遺伝子であったが、複合体を形成して多くの遺伝子発現を制御する転写調節遺伝子に遺伝子量効果があれば、複合体形成のバランスが変化することで、多くの遺伝子の発現に影響を与え、多面的 (pleiotropic) な表現型を賦与し得るであろう<sup>16)</sup>。また、導入遺伝子については、コピー数が増えれば遺伝子サイレンシングが起こり得ることは良く知られており<sup>11)</sup>、これは外来性遺伝子の導入に伴う遺伝子量効果による過剰発現を抑制するためのものかも知れない。内在性遺伝子の遺伝子量効果とゲノム進化や育種との関連についても議論されている<sup>16)</sup>。即ち、遺伝子増幅や染色体の倍数化などはゲノム進化の重要な機構であり、それらによって生じた多重遺伝子族 (multigene family) 間の相互作用にも遺伝子量効果は関連していそうである。また、多くの遺伝子に遺伝子量効果があつて、1コピーで野生型と同様の表現型を賦与するに十分な遺伝子発現をしているのであれば、雑種強勢にも係わるものと思われる。従つて、本稿で論じた遺伝子量効果に係わる諸現象は、メンデルの観察や不完全優性に止まらず、遺伝子サイレンシングからゲノム進化、育種に至るまで広範な生物現象に深く係わる古くて新しい問題であろう。

- Morgan, T.H. (1926) The theory of the gene. Yale University Press, New Heaven.
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2008) Molecular biology of the gene. 6th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Habu, Y., Hisatomi, Y., & Iida, S. (1998) *Plant J.*, **16**, 371-376.
- Johzuka-Hisatomi, Y., Noguchi, H., & Iida, S. (2010) *J. Plant Res.*, **123**, 299-304.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008) *Plant J.*, **54**, 733-749.
- Martin, C. & Gerats, T. (1993) In *The Molecular Biology of Flowering* (Jordan, B.R. ed.), pp. 219-255, CAB International.
- Yamauchi, T., Johzuka-Hisatomi, Y., Fukada-Tanaka, S., Terada, R., Nakamura, I., & Iida, S. (2009) *Plant J.*, **60**, 386-396.
- Bollmann, J., Carpenter, R., & Coen, E.S. (1991) *Plant Cell*, **3**, 1327-1336.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. (2009) *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 94-108.
- Chawla, R., Ariza-Nieto, M., Wilson, A.J., Moore, S.K., & Srivastava, V. (2006) *Plant Biotechnol. J.*, **4**, 209-218.
- Butaye, K.M.J., Cammue, B.P.A., Delauré, S.L., & De Bolle, M.F.C. (2005) *Mol. Breed.*, **16**, 79-91.
- Oltmanns, H., Frame, B., Lee, L.-Y., Johnson, S., Li, B., Wang, K., & Gelvin, S.B. (2010) *Plant Physiol.*, **152**, 1158-1166.
- Terada, R., Johzuka-Hisatomi, Y., Saitoh, M., Asao, H., & Iida,

S. (2007) *Plant Physiol.*, **144**, 846-856.

- Johzuka-Hisatomi, Y., Terada, R., & Iida, S. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4727-4735.
- Springer, M., Weissman, J.S., & Kirschner, M.W. (2010) *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 368.
- Birchler, J.A., Riddle, N.C., Auger, D.L., & Veitia, R.A. (2005) *Trends Genet.*, **21**, 219-226.

定塚 (久富) 恵世<sup>1</sup>, 山内 卓樹<sup>2</sup>, 飯田 滋<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 静岡県立大学大学院薬学研究科

<sup>2</sup> 名古屋大学大学院生命農学研究科

<sup>3</sup> 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科

Incomplete dominance in Mendelian laws and gene dosage effects in plants

Yasuyo Johzuka-Hisatomi<sup>1</sup>, Takaki Yamauchi<sup>2</sup> and Shigeru Iida<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-Ku, Shizuoka 422-8526, Japan; <sup>2</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-Ku, Nagoya 464-8601, Japan; <sup>3</sup>Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-Ku, Shizuoka 422-8526, Japan)

## 暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素 ～ニトロゲナーゼとの構造的類似性から見る 酵素の多様性と進化～

### 1. はじめに

クロロフィル (Chl) は、光合成に必須のテトラピロール性色素である。地球上の生命が太陽エネルギーに依存していることを考えると、太陽の光を捕集する Chl は、まさに生命を支える色素である。Chl は、四つのピロール環と一つの5員環からなる環状構造の中央に Mg<sup>2+</sup> を配位するという共通した構造的特徴をもつ。このように複雑な分子が、光合成生物の細胞内でどのように生合成されるのか、その分子機構の解明は、植物生理学の重要課題の一つである。

プロトクロロフィリド (Pchl<sub>ide</sub>) 還元酵素は、Pchl<sub>ide</sub> の D 環の二重結合 (C17=C18) を立体特異的に還元し、Chl *a* の直接の前駆体クロロフィリド *a* を生成する (図 1 a)。Chl *a* 生合成経路の最後から 2 番目の反応であるが、この反応によって色素は Chl *a* としての光学的特性を獲得することから、Chl *a* の吸収スペクトルを決定づける最終反応と見なすことができる。この反応を触媒する酵素は 2