

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科 分子生物学専攻 植物分子遺伝学講座 (島本 功 教授)		
氏名	一色 正之	提出	平成11年 1月 7日
題目	スプライシングによるイネ <i>waxy</i> 遺伝子の発現制御		
<p>要旨</p> <p><u><i>waxy</i> 遺伝子のスプライシング・シス因子突然変異体の解析</u></p> <p>イネ <i>waxy</i> 遺伝子はアミロース生合成に必要な酵素GBSSをコードしており、発現量の異なる二つの対立遺伝子座が知られている。主にインディカに分布し、発現量が多く、ばさばさした米の原因となるのが Wx^a である。それに対して、主にジャポニカに分布しており、発現量が低く、もちもちした米になるのが Wx^b である。しかし、この発現量の違いはイネの食味といった育種上重要な問題にもかかわらず、原因は全く解明されていなかった。</p> <p>我々は Wx^a と Wx^b の発現量の違いを解析するため、それぞれの遺伝子のプロモーター及び5'UTRのシーケンスを比較した。その結果、Wx^b の5'UTRにある第1イントロン5'スプライス部位の+1GがTに1塩基変異していることを発見した。そこで、Wx^b のRNA解析を行うと、第1イントロンがスプライスされない転写産物と Wx^b の1/10程度のスプライスされたmRNAが存在した。また、Wx^b のスプライス部位を特定したところ、変異を持つオリジナルの部位の他に2ヶ所の新しい部位でのスプライシングが確認された。さらに Wx^a と Wx^b のそれぞれのプロモーターから第1イントロンを含む翻訳開始点までの領域にGUSレポーター遺伝子をつけた融合遺伝子を作製し、それぞれの第1イントロスプライス部位に突然変異を導入し、プロトプラストに導入してスプライシングの解析を行った。この結果、プロモーターには関係なく、+1GがTに変異するとスプライシング効率は低下した。これらの結果から、第1イントロン5'スプライス部位の1塩基の変異がジャポニカ Wx^b のスプライシング効率を低下させ、Wx^a に比較して低発現になる原因であることが明らかになった。</p> <p><u><i>waxy</i> 遺伝子のスプライシングに影響する突然変異体 <i>dull</i> の解析</u></p> <p><i>dull</i> はジャポニカ品種の金南風から得られた、胚乳で低アミロースの表現形を示す突然変異体である。<i>dull</i> は <i>waxy</i> 遺伝子とは異なる遺伝子座にあることから、<i>waxy</i> 遺伝子の発現制御に関わるトランス因子であろうと予測されていた。</p> <p>まず、胚乳の <i>waxy</i> mRNA への影響を調べると、<i>du-1, du-2</i> ともに Wx^b で見られる第1イントロンがスプライスされていない転写産物は金南風と同じであるのに対して、スプライスされたmRNAの量が減少していた。このことから、<i>du-1, du-2</i> はスプライス部位に変異をもつ Wx^b のスプライシングが阻害されているか、スプライスされたmRNAの安定性が低下しているかのどちらかであると推測された。そこで、<i>dull</i> と Wx^a をもつインディカ品種のラベルを交配し、その自殖後代で <i>dull</i> の変異が Wx^a に影響するかどうかをノーザン解析によって調べた。この結果、<i>dull</i> は Wx^b には影響するが、Wx^a には影響が見られなかった。Wx^a と Wx^b はそのコーディング領域の塩基配列にほとんど違いがないことから、<i>dull</i> は <i>waxy</i> mRNA の安定性</p>			

ではなく、 Wx^b のスプライシングに影響のある因子の変異であることが明らかになった。

さらに、スプライシング因子には組織特異性を示すものが知られているため、花粉で *dull* の影響を見た。 *Waxy* タンパク質は *du-1* ではその変異の影響が顕著になり、 *du-2* では変異の影響がほとんどなかった。 RT-PCR 解析では、 Wx^b のスプライス部位の選択性が *du-1* と *du-2* では異なっていた。 これらのことから、 *du-1*, *du-2* は組織特異性をもつスプライシング因子の突然変異体であると考えられる。

SRタンパク質による *waxy* 遺伝子のスプライシング制御

SR (セリン-アルギニンリッチ) タンパク質はN末側のRNA結合ドメインとC末側のRSドメインを特徴とするスプライシング因子であり、スプライシングにおけるスプライソソームの構築やスプライス部位の選択など様々なスプライシング制御を行っている。植物ではシロイヌナズナで複数のSRタンパク質が単離されているが、機能解析は進んでいない。

我々はイネからヒトASF/SF2と相同な遺伝子 *osSR1*, *osSR2* およびシロイヌナズナ *RSp31* と相同な *osSR3* の3つのcDNAを単離し、機能解析を行うため、それぞれのcDNAにCaMV35Sプロモーターをつけ、イネのプロトプラストに基質となる遺伝子とともに導入してスプライシングへの影響を調べた。その結果、*osSR3* は5'スプライス部位に変異を持つ Wx^b の第1イントロンのスプライシングを促進し、スプライス部位の選択を変えることがわかった。イネ *waxy* 遺伝子の第1エクソンにはプリンリッチスプライシングエンハンサーに似た配列があることから、その影響をみるためにエンハンサーの配列を変異させたコンストラクトを作製し、解析を行った。その結果、変異により *osSR3* によるスプライシングの促進が低下したことから、*osSR3* はプリンリッチエンハンサーを介して選択的スプライシングを行っていることが示唆された。

スプライシングによる
イネ *waxy* 遺伝子の発現制御

一色 正之

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学講座
(島本 功 教授)

平成11年1月7日提出

序論

イネ *waxy* 遺伝子は胚乳、胚嚢および花粉で特異的に発現し、澱粉の一成分であるアミロースの生合成に重要な役割を持つ澱粉顆粒結合性澱粉合成酵素(Granule-bound starch synthase; GBSS)をコードしている。GBSS はグルコースが α -1,4 結合で連なった直鎖状の分子に ADP グルコースを基質としてグルコース単位を付加し、アミロースを合成する。イネにおいて GBSS が欠損した *waxy* 変異体はモチ米と呼ばれ、アミロースは全くつくられず、胚乳中の澱粉は全てアミロペクチンより成る。イネ *waxy* 遺伝子はコーディング領域に 12 個のイントロンが存在し(Hirano and Sano, 1991; Umeda et al., 1991)、非翻訳領域に 1.1kb の第 1 イントロンを持っている(Wang et al., 1995)。また、イネ *waxy* 遺伝子のプロモーター解析によると、発現には転写開始点(+1)より -640 までの領域が重要であった(Nakajima and Shimamoto, 1994)。

イネの *waxy* 遺伝子には二つの対立遺伝子 Wx^a と Wx^b が知られている。 Wx^a は主にインディカイネに存在し、 Wx^b はジャポニカイネに見られる。 Wx^b と Wx^a はコーディング領域において 2 塩基の違いしかなく、第 10 エキシソンの塩基置換において 1 アミノ酸の違い (Wx^a : セリン, Wx^b : プロリン) がある。しかし、澱粉合成酵素で保存されている活性に必要と思われるドメインは第 5 エキシソンまでにコードされていると考えられており(Sako et al., 1998)、この 1 アミノ酸の置換は両者の酵素活性には影響がないと考えられる。ところが、 Wx^a と Wx^b にはいくつかの異なった性質があり、 Wx^b の発現量が Wx^a の 1/10 以下であること(Sano, 1984; Sano et al., 1986)と、弱低温により発現量が増加する弱低温感受性を持っていること(Sano et al., 1985; Hirano and Sano, 1998)などが挙げられる。これらの性質は Wx^b のプロモーター部分、あるいは転写開始点付近の塩基配列が異なっているためではないかと考えられていたが、Wong ら(1995)の解析により、低アミロースの栽培品種にはすべて第 1 イントロンが含まれた転写産物が存在することが報告された。そこで、当研究室の森野和子氏により Wx^b のプロモーター、第 1 エキシソン、第 1 イントロン、第 2 エキシソンの一部のシーケンスが行われ、三菱化学(株)の中島みどり氏により決定されていた Wx^a と比較された。この結果、第 1 イントロンの 5' スプライス部位の共通保存配列である +1G が T に 1 塩基置換していた。この変異は Wx^b を持つ 5 つの異なった栽培品種に保存されていたが、 Wx^a を持つ品種では変異は存在しなかった(Isshiki et al., 1998)。これらの結果から、 Wx^b の低発現の原因は +1G の変異によるスプライシング異常によるものではないかと考えられた。

動物においてはイントロンの認識機構については詳しく解析されており(Ruby and Abelson, 1991; Sharp, 1994; Madhani and Guthrie, 1994; Chabot, 1996)、幾つかのシス配列が知られている。スプライス部位の共通配列はよく保存されており、5' スプライス部位は AG/GTAAGT、3' スプライス部位は NCAG/となっている。このほか、3' スプライス部位の直前にポリピリミジン配列をもち、イントロン内にスプライシングの中間体(投げ縄イントロン)を形成するために必要なブランチ部位 CTPuAPy が存在する。

mRNA 前駆体のスプライシングはスプライソソームと呼ばれるリボ蛋白質複合体の中で行われる。スプライソソームは核内低分子 RNA(snRNA)とタンパク質との複合体である数種の低分子核内リボ蛋白質(snRNP)から成る。このうち、snRNA はスプライス部位やブランチ部位の認識に関与していることが分かっている。U1 snRNA は 5' スプライス部位の認識に、U2 snRNA はブランチ部位の認識に、U5 snRNA は U1 と共にスプライス部位を認識し、エキソンの再結合の際にエキソン同士をそろえておく役割があるのではないかと考えられている。また、U6 snRNA はイントロン切り出しのための触媒作用をになっていると想像されている。他にも U4 snRNA がスプライソソームの中に含まれているが、U6 と複合対を形成し、スプライソソームに集合させる役割があるのではないかと考えられている。この他にもスプライシングに関わる非 snRNP 因子として SR タンパク質 (セリン-アルギニンリッチタンパク質) が知られている。スプライシングの反応は ATP と Mg^{2+} を要求する 2 段階の過程で行われている。反応の第 1 段階では、5' スプライス部位での切断が起こると同時に、切断されたイントロンの 5' 末端のグアノシン残基がイントロン内のブランチ部位アデノシン残基の 2'OH との間で 2'-5'リン酸ジエステル結合を形成する。このとき、切り出された 5'側エキソンと下流側エキソンのついた投げ縄イントロンが生ずる。第 2 段階ではイントロンの切り出しと前後のエキソンの再結合が行われる。この反応は哺乳類、酵母、植物に保存されていると考えられる。

Pre-mRNA スプライシングに必須のトランス因子のうち、SR タンパク質はその機能の多様性と重要性により多くの解析が行われている (Manley and Tacke, 1996)。その構造的特徴は N 末側に存在する 1 または 2 個の RNA 認識モチーフ形の RNA 結合ドメインと C 末側の様々な長さのアルギニン-セリンリッチドメインである。SR タンパク質の機能は大きくふたつに分けられる。その一つ、基本的なスプライシング機構において U1 snRNP に特異的な 70kD タンパク質(U1-70K)や U2AF の 35kD サブユニット (U2AF³⁵) と相互作用して正しいスプライス部位を認識させる (Wu and Maniatis, 1993)。また二番目に、選択的スプライシングにおいても中心的な役割を持っており、スプライシング制御因子として知られる多くのスプライシングエンハンサーと結合し、弱いスプライス部位を活性化する (Manley and Tacke, 1996)。スプライシングエンハンサーとして良く知られているのはプリンリッチエンハンサーである。このタイプのエンハンサーの多くは下流側のエキソンにあり、弱い 3' スプライス部位を活性化するものである (Zahler et al., 1993; Zahler and Roth, 1995; Tacke et al., 1997)。しかし、これまで 2 例の報告しかないが、二つの 5' スプライス部位の選択に関与している例もある (Humphrey et al., 1995; Heinrichs et al., 1998)。

植物のスプライス部位共通配列は脊椎動物に類似しているものの、動物に必須のシス因子であるイントロン 3' スプライス部位直前のポリピリミジン配列は存在しない (Luehrsen et al., 1994; Simpson and Filipowicz, 1996)。ただし、植物のイントロンは AU リッチであることから、AU-GC ジャンクションがイントロンの認識に不可欠であると報告されている (Goodall and Filipowicz, 1989; McCullough and Schuler, 1993;

Luehrsen and Walbot, 1994)。また、植物にヒトの β -グロビンを導入したところ、スプライシング効率が低下し、新規のスプライス部位を使うといった現象もあり、植物と哺乳類ではイントロンの認識に異なる機構や因子が関与している可能性がある(Luehrsen et al., 1994; Simpson and Filipowicz, 1996)。また、動物と同じようにシロイヌナズナからSRタンパク質の単離が行われており、ASF/SF2や9G8のホモログが得られているが(Lazar et al, 1995; Golovkin and Reddy, 1998)、それと同時に動物にはない保存配列を持ったRsp31ファミリーが得られている(Lopato et al., 1996)。しかし、植物においては動物で一般的に用いられているHela細胞の核抽出液を使ったようなスプライシングの*in vitro*の解析系が作られておらず、スプライシングの機構の解析があまり進んではない。

waxy 遺伝子発現に影響を与え、胚乳において低アミロースの表現形を示す人為的変異株である *dull* 変異体がジャポニカ・イネで知られている(Okuno et al., 1983)。*dull* 変異体のアミロース含量は野生型ジャポニカ・イネと *waxy* 変異体の中間型を示し、モチ米と同じく白濁した胚乳になる。*dull* 変異体は粳米の一品種、金南風の受精卵をN-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU)で処理することにより得られた。この種子を選抜し、相補性試験を行った結果、*du-1*~*5*の五つの異なった遺伝子座があることが判明した。*dull* 変異体の特徴を列挙すると次のようになる(Yano et al., 1988)。

- 1) アミロース含量が全澱粉中の3~9%に低下。
- 2) アミロペクチンの構造に変化なし。
- 3) *waxy* 遺伝子と異なる遺伝子座にある(*wx*は第6、*du-1*は第7、*du-4*は第4染色体)。
- 4) 全て劣性遺伝子。
- 5) 2つの *dull* があると相加的にアミロース含量を低下させる。

以上のような解析は行われていたが、どのような機構で *dull* 変異体が *waxy* 遺伝子の発現を制御しているかについての知見は少なく、転写、スプライシング、翻訳の各段階で制御を行っているのではないかと仮定されているにすぎなかった。しかし、*dull* 変異体が第1イントロン5'スプライス部位に変異のある *Wx^d*を持つ金南風から得られたことを考えると、実際に *dull* 変異体の中に *waxy* 遺伝子のスプライシングに影響を与えているものが存在しているのかが問題となる。そこで、我々は *dull* 変異体の mRNA の解析を行い、*du-1* 及び *du-2* は *Wx^d* のイントロンのスプライシングに影響する因子ではないかと示唆される結果を得た。

この研究において、我々は *Wx^d* の低発現の原因が第1イントロンの5'スプライス部位保存配列の1塩基の変異によるものであることをあきらかにし、*dull* 突然変異体のうち、*du-1* と *du-2* が *Wx^d* のスプライシングに影響を与えるトランス因子の突然変異体であることを示した。さらに、イネからSRタンパク質をコードしているcDNAを単離し、*Wx^d* のスプライシングに対する影響を調べた。

材料と方法

材料

ジャポニカイネ品種の金南風とその突然変異体である EM12(*du-1*)と EM2(*du-2*) [Yano et al., 1988]、インディカイネ品種のラベルなどすべての植物は温室にて 14 時間明、10 時間暗の状態で作られたものである。Wx^a-*gus* はキヌヒカリにエレクトロポレーションで導入され(Shimamoto et al., 1989)、その M₂ 個体と *dull* 突然変異体を交配することにより、*dull* 突然変異体に Wx^a-*gus* を導入した。この自殖後代 F₂ 種子において Wx^a-*gus* / Wx^a-*gus* : *du/du* となるものを選抜した。開花後 15 日目の種子を RNA 解析に用いた(胚乳、胚、糊粉層等を含む)。また、花粉は開花直前に採取し、解析に用いた。

RNA 単離

ノーザン解析用 RNA 単離には ATA 法を用いた(Nagy et al., 1988)。抽出バッファーは 300mM NaCl, 50mM トリスバッファー(pH8.0), 5mM EDTA(pH8.0), 2%(W/V) SDS, 10mM β-メルカプトエタノール, 1mM アウリントリカルボン酸(ATA)の溶液を調整した。

種子の RT-PCR 用 RNA 単離はフェノール-SDS 法を応用して行った(Shirzadegan et al., 1991)。抽出バッファーは 100mM 塩化リチウム, 1%SDS, 100mM トリスバッファー(pH9.0), 10mM EDTA のように調整した。抽出バッファーとフェノールを 2:1 の割合で混合し使用した。

花粉とプロトプラストからの RNA 単離はグアニジン・チオシアン酸塩法によった(Chomczynski and Sacchi, 1987)。抽出バッファーの組成は 4M グアニジン・チオシアン酸塩, 25mM クエン酸ナトリウム(pH7.0), 0.5% サルコシル, 0.1M β-メルカプトエタノールである。

ノーザン解析

電気泳動は 10 μg の全 RNA を用いた。泳動後 Hybond-N⁺(Amersham)にトランスファーした。ノーザンハイブリダイズバッファーは 5×SSC, 5×デンハルト, 20mg/ml サケ精液製 DNA, 0.5% SDS のように調整した。プローブには *waxy* cDNA (1.3kb, *Bgl*III 断片)、*waxy* 第 1 イントロン(770bp, *Bgl* II 断片)、RBE1 (1.4kb, *Eco*R I 断片)、AGPP (1.6kb, *Eco*R I 断片)、osSR1 3'UTR (350bp, *Bgl* II-*Not* I 断片)、osSR2 3'UTR (350bp, *Ban* II-*Not* I 断片)、osSR3 3'UTR (350bp, *Hinf* I-*Not* I 断片)とコントロールとしてアクチン(400bp, PCR 産物)を使用した。プローブは Multiprime DNA labelling systems (Amersham)によってラベルした。ラベルしたプローブは Micro spin column または ProbeQuant G-50 micro columns(ともに Pharmacia Biotech)にてフリーの RI を除いた。メンブレンのハイブリダイズは 65°C, 一晩行った。メンブレンは洗浄後、オートラジオグラフィにて検出した。

RT-PCR

センスプライマー(Pre Wx int1); 5' -ACCATTCCTTCAGTTCTTTG-3' は第1エキソンの転写開始点に設定した。アンチセンスプライマー(Post 1857); 5' -TCCGTAGATCTTCTCACCGG-3' は第5エキソンに設定した。このプライマーペアでラベルの cDNA を増幅した場合、729bp の断片が生成される。

逆転写反応は RNA PCR Kit (Takara) を用いて行った。一度の逆転写反応には 50ng のポリ(A)+RNA または 1 μ g の全 RNA を使用した。この時プライマーにはランダム 9mer を使用した。PCR 反応はサーマルサイクラーモデル 9600 (PERKIN ELMER) を使用した。定量的に RT-PCR を行うためにあらかじめ、9,11,13,15 サイクルで RT-PCR を行い、入れた RNA 量と検出された PCR 産物の量の間に関係のあるサイクルを探した。その結果、PCR 反応条件は 98°C, 15 秒-58°C, 1 分-72°C, 10 分×13 サイクルが最適であったため、この条件を使用した。RT-PCR の結果は 1.5% アガロースゲルで泳動後 Hybond-N⁺ にトランスファーした。メンブレンは ³²P ラベルした waxy cDNA (プライマー Pre Wx int1-Post1857 でインディカ waxy cDNA により増幅された断片) をプローブとしてサザン解析を行い、バンドを検出した。RT-PCR 産物は、TA Cloning Kit (Invitrogen) または pGEM-T vector system (Promega) によってクローニングした

コンペティティブ RT-PCR

コンペティター DNA は pGEM-T vector (Promega) にクローニングした waxy cDNA の第2エキソンにある *Bal* I サイトに 61 塩基の DNA 断片を挿入することによって作製した。コンペティター RNA はコンペティター DNA に T7 ポリメラーゼを作用させて作製した。コピー数は O.D.₂₆₀ と分子量より計算した。試料の全 RNA は登熟中の種子とやくから抽出した。RT-PCR には全 RNA 500ng と所定のコピー数のコンペティター RNA を加え、RNA PCR kit (Takara) を用いて行った。PCR プライマーはエキソン1の 5'-ACCATTCCTTCAGTTCTTTG-3' とエキソン5の 5'-TCCGTAGATCTTCTCACCGG-3' を用いた。RT-PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、定量を行った(Gilliland et al., 1990)。

GUS 解析

抽出バッファの組成は 50mM リン酸ナトリウムバッファ(pH7.0), 10mM β -メルカプトエタノール, 10mM EDTA, 0.1% サルコシル, 0.1% トリトン X-100 である。GUS 解析バッファは抽出バッファに溶解した 20mM 4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロニドである。反応停止バッファは 0.2M 炭酸ナトリウムである。種子を 10% 次亜塩素酸ナトリウムで 1 時間殺菌後、よく洗浄し、抽出バッファを加えて乳鉢で粉砕する。10 秒間遠心し、上清を取り、Coomassie protein assay reagent (PIERCE) にてタンパク質の定量を行う。測定溶液は、140ml 抽出バッファ、20ml 試料、30ml メタノール、10ml 解析バッファのように混合した。測定溶液を 37°C でインキュベートし、

30分毎に50mlを取り、1mlの反応停止バッファーを加えて励起光を測定する。励起波長は363nm、発光波長は447nmである。

ウエスタン解析

タンパク質は成熟した種子とやくから抽出した(Kawasaki et al., 1996)。抽出バッファーはウエスタンブロットのために10% SDS-PAGEにて20 μ gのタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Millipore)にトランスファーした。プロッティングはイネ WAXY タンパク質に対する抗体で行った(Hirano, 1991)。検出は ECL western blotting detection kit (Amersham)によって行った。バンドの強度は Densitograph (ATTO)にて解析した。

SR タンパク質遺伝子の単離

イネ SR タンパク質遺伝子 osSR1, osSR2 の単離はシロイヌナズナ SR1(Lazar et al., 1995)の RNA 結合ドメインを参考にして作製したディジェネレートプライマー PRE-PNP; 5'-GARTTYGAYGAYGCNMGNGAYGC-3' と POST-AUX; 5'-RTGRTCYTTNARRTCYTGCG-3'を用いてイネ種子の RNA から RT-PCR を行い、得られた断片をもとに日本晴の種子 cDNA ライブラリーからスクリーニングを行った。また、osSR3 はイネ EST を検索することにより得られたクローン (アクセッション No. D15104) に全長が含まれていた。

コンストラクトの作製

35S-osSR1 および 35S-osSR2 は得られた cDNA クローンから *Not* I サイトで切り出され、CaMV 35S プロモーターと Nos ターミネーターを持つ pSN221 ベクターの *Not* I サイトにライゲーションした。また、35S-osSR3 は EST クローンから *Sal* I と *Not* I で切り出され、pSN221 の *Sal* I - *Not* I サイトにライゲーションした。Wx^b-gus のエンハンサー配列の変異導入は、次のように行った。プロモーターと第1エクソンの領域は 5'-GCCCAAGCTTAGAAACACACACCAC-3' と 5'-CAAGAAGGTGATGAACAACAGAACAACAAGC-3'のプライマーにより PCR で増幅した。上流のプライマーには *Hind* III サイトがつくっており、下流のプライマーにはエンハンサー配列の変異を導入した。第1イントロンから第2エクソンの領域は 5'-GTTTCATCACCTTCTTGATCTGCAAGTTATAC-3' と 5'-TGGGATCCGGTGAGAGCCGACAT-3'のプライマーを使用した。下流側のプライマーには *Bam* HI サイトをつくっている。それぞれの PCR 産物はオーバーラップした領域によりつなぎあわせられ、*Hind* III - *Bam* HI 処理され、pBI221 の *Hind* III - *Bam* HI サイトに導入した。

プロトプラストの形質転換

OC 培養細胞から得られた 5×10^6 個のプロトプラストが所定量のプラスミド DNA

と混合され、Gene Pulser (Bio-Rad)を用いてエレクトロポレーションされた(Shimamoto et al., 1989)。30℃で一晩静置後 GUS 解析あるいは RNA 単離を行った。

結果

I. waxy 遺伝子のスプライシング・シス因子突然変異体の解析

1. Wx^b は第 1 イントロン 5' スプライス部位に変異をもつ。

Wx^b のタンパク質量は Wx^a の約 10 倍の発現量を持っている (Sano, 1984; Sano et al., 1986)。そこで、胚乳における waxy の転写産物をみると、 Wx^a では 2.3kb に強い 1 本のシグナルが現われているが、 Wx^b においては弱い 2.3kb のシグナルとともに 3.4kb にもシグナルが現われる (図 1a)。この大きさは第 1 イントロンを含んだ転写産物と考えられ、第 1 イントロンをプローブにノーザン解析を行うと、この 3.4kb のバンドにハイブリダイズすることがわかる (図 1b)。このように Wx^b として知られる発現量の低い対立遺伝子座は第 1 イントロンを含んだスプライシングに異常のある転写産物が生成されていた。

このスプライシング異常の原因は第 1 イントロン 5' スプライス部位の共通保存配列である +1G が T に 1 塩基置換していたためと考えられることから、この +1G の変異が Wx^b の転写産物のスプライシングにどのような影響を与えているのかを確かめるため、定量的な RT-PCR 解析を行った。 Wx^a はオリジナルなサイト (サイト I) でのみスプライシングが行われており、その効率は 100% である (図 2a)。これに対して Wx^b ではスプライシングされていないバンドとともにスプライス産物が 2 本のバンドとして現われている (図 2a)。このうち 1 本はサイト I と同じ大きさであるが、もう 1 本はオリジナルなサイトより約 100 塩基短いスプライシング産物 (サイト II) である。これらの転写産物の量をみると、 Wx^a に比べてサイト I は 9%、サイト II は 8.5%、スプライシングされていないものは 8.4% であった。これらの結果は、 Wx^b のスプライシング効率は Wx^a の 17.5% しかないことを示している。

また、 Wx^b のスプライス部位を特定するために 12 個の独立の cDNA をシーケンシングした (図 2b)。このうち 6 つの転写産物はサイト I でスプライスされており、そのうち 3 つが変異した +1U で、3 つが 1 塩基上流にシフトした G でスプライスされていた。この 1 塩基上流にシフトしたものは新たにスプライス部位保存配列である GU が形成されていた。サイト I でスプライスされたものは 1 塩基の違いしかいないため RT-PCR ではその量的なものはわからない (図 2c)。また、サイト II でスプライスされた cDNA は 6 つ得られており、オリジナルのサイトから約 100 塩基上流にシフトした第 1 エキソン内にある GU が新しいスプライス部位として使われている (図 2c)。これらの結果から、 Wx^b は変異のあるオリジナルの部位と、ふたつのクリプティックスプライス部位が活性化されていることがわかった。ただし、これらのスプライシング産物は 5'UTR での変化であるため、全て正常な WAXY タンパク質に翻訳されていると考えられる。また、第 1 イントロンがスプライスされないものは、第 1 イントロン内に複数の ATG 翻訳開始コドンが存在するため、正常な WAXY タンパク質への翻訳は起こらないと考えられる (Isshiki et al., 1998)。

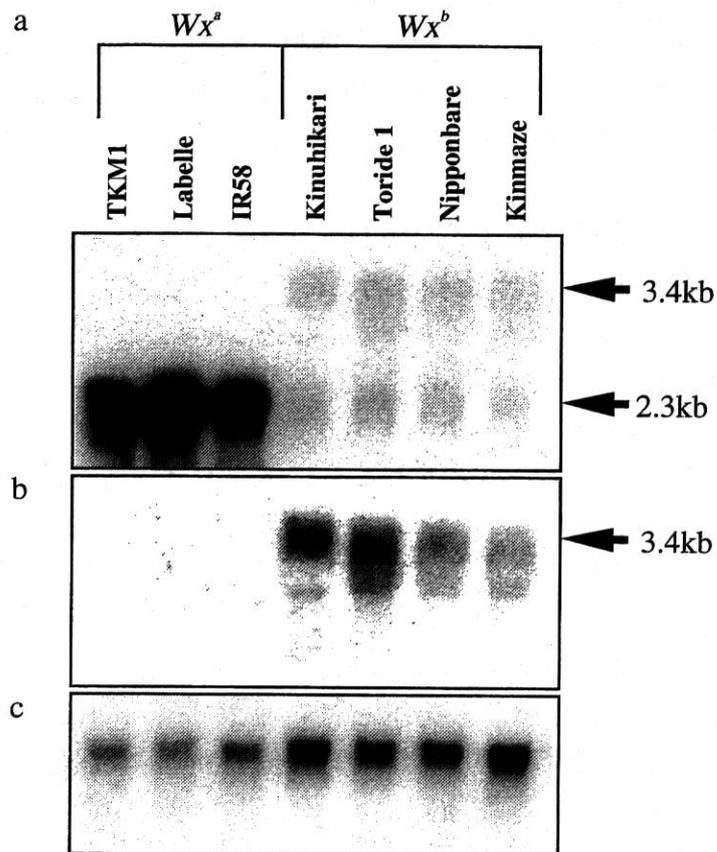


図1. 胚乳における Wx^a と Wx^b の発現。

Wx^a と Wx^b をもつ栽培品種のノーザン解析。全RNAは開花後15日目の登熟中の種子より抽出した。使用したプローブはa; Wx cDNA、b; Wx 第1イントロン、c; イネ *actin 1* である。

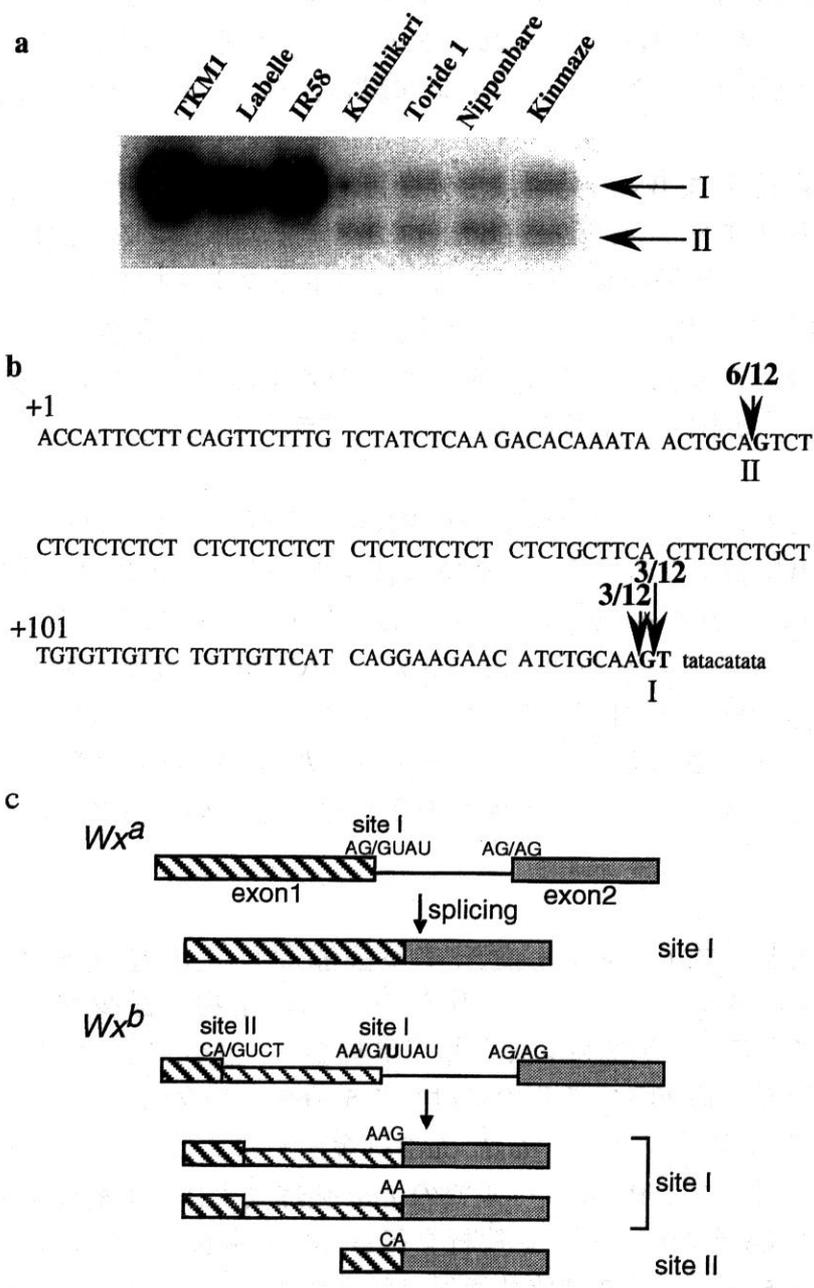


図2. Wx^a と Wx^b の転写産物。

(a) Wx^a と Wx^b 転写産物のRT-PCR解析。(b) Wx^b cDNAのシーケンスによって決定されたスプライス部位。分母にシーケンスを行った全cDNAの数を、分子に矢印で示された位置でスプライスされていたcDNAの数を現わしている。(c) Wx^a と Wx^b の転写産物の模式図。aで示された Wx^b のサイトIにおけるRT-PCR産物はスプライス部位が1塩基異なった2種類のcDNAを含んでいる。

2. Wx^b の低発現の原因はスプライス部位の変異にある。

我々は Wx^b の低発現量の原因が第1イントロンのスプライス部位の変異にあるのではないかと考え、 Wx^a と Wx^b それぞれの5'スプライス部位に変異を導入したGUSレポーター遺伝子を用いたコンストラクトを作製し、スプライシングの状況を解析した。

当研究室の井沢毅博士は Wx の発現に十分な領域であることがわかっている640bpのプロモーターと第1エクソン、第1イントロン、第2エクソンの翻訳開始点までの領域に *gus*レポーター遺伝子がないコンストラクトを作製し、それぞれ Wx^a と Wx^b の配列に加えて、 Wx^a のスプライス部位をGからTに変異させたものと、 Wx^b の変異を持つスプライス部位のTをGに変えたものの4種類のコンストラクト(図3a)をイネの液体培養した細胞から得られたプロトプラストに導入した(Isshiki et al., 1998)。

この遺伝子導入されたプロトプラストからRNAを単離し、RT-PCR解析(図3b)を行なった結果、 Wx^a -*gus*のスプライス部位に変異を導入するとスプライシング効率が低下し、それに対して Wx^b -*gus*のスプライス部位をTからGに変異させるとスプライシング効率が上昇することがわかった。また、 Wx^a -*gus*に変異を導入したものと Wx^b -*gus*においては Wx^b の胚乳で見られたように第1イントロンがスプライスされないバンドとスプライスされた2本のバンドが見られる。これらの結果から、 Wx^b の低発現の原因は第1イントロンの1塩基の変異によるものであると結論づけられた。

II. *waxy* 遺伝子のスプライシングに影響する突然変異体 *dull* の解析

1. *dull* 突然変異体はスプライシングされた Wx^b 転写産物を減少させる。

du-1, *du-2* は低アミロース突然変異体として単離され、胚乳におけるアミロース含有量は野生型の金南風が約20%であるのに対して5~6%しか含んでいない(Yano et al., 1988)。WAXYタンパク質を見ると、*du-1*, *du-2* は金南風に比較して31%, 34%に低下している(図9a)。そこで、RNAレベルでの *dull* 突然変異体の影響を見るために、胚乳から単離したRNAを使いノーザン解析を行った。金南風(WT)の持つ Wx^b 遺伝子は第1イントロン5'スプライス部位共通保存配列に変異を持っているため、第1イントロンがスプライシングされた2.3kbの成熟した Wx mRNAと、第1イントロンを持った3.4kbの転写産物の2つのバンドが現われる。これに対して、*du-1*, *du-2* においては、第1イントロンをスプライシングしていない3.4kbのバンドは野生型と変わっていないが、スプライシングされた2.3kbの転写産物の量は5分の1まで減少している(図4a)。 Wx^b には3つの異なったスプライス部位が存在するため(図2c)、*du-1*, *du-2*でスプライス部位の使われ方に変化がないかどうかを確かめるため、コンペティティブRT-PCRを行った(図4b)。その結果、スプライシング効率は野生型の20~25%に低下していたが、サイトIとサイトIIは同じ効率で低下していた。

さらに、他の遺伝子のスプライシングあるいはプロセシングに影響があるのかを調

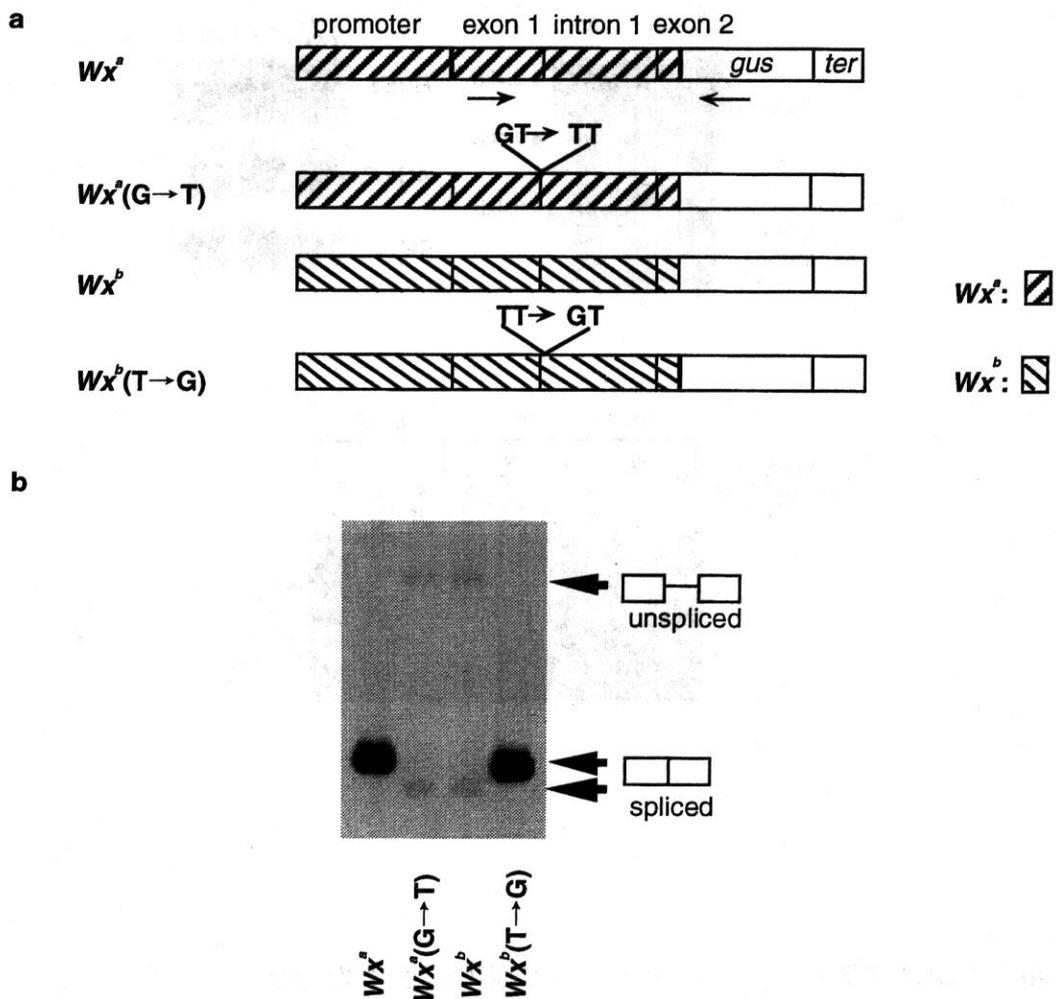


図3. 変異を導入した Wx^a と Wx^b 融合遺伝子のトランジェント解析。
 (a) 解析に用いたコンストラクト。 Wx^a と Wx^b それぞれのプロモーターから翻訳開始点までの領域に *gus* レポーター遺伝子を融合させた。 $Wx^a(G \rightarrow T)$ は Wx^a 第1イントロン5'スプライス部位のGTをTTに変異させたものであり、 $Wx^b(T \rightarrow G)$ は Wx^b TTをGTに変異させたものである。RT-PCRに用いたプライマーは矢印で示した。(b) RT-PCR解析。1.5kbのバンドは第1イントロンがスプライスされていないもの。0.4kbと0.5kbのバンドはスプライスされた転写産物。

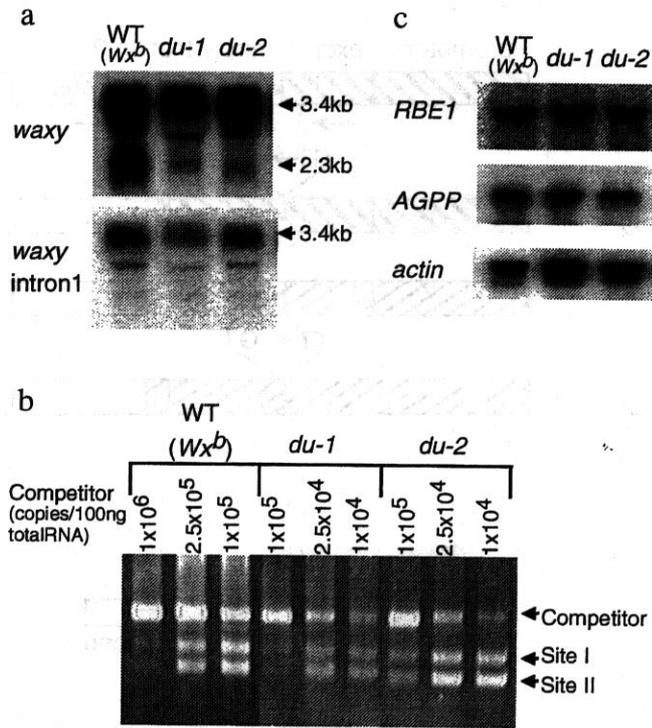


図4. *du-1*と*du-2*の種子における *Wx^b*とその他の遺伝子の発現。

(a)*du-1*と*du-2*における *Wx^b* のノーザン解析。(b)*du-1*と*du-2*における *Wx^b* のコンペティティブ RT-PCR解析。(c)*du-1*と*du-2*における *RBE1*、*AGPP*、*actin*のノーザン解析。

べるため、胚乳で澱粉合成にかかわっている二つの酵素をコードしている遺伝子、枝つけ酵素遺伝子 (*RBE1*) [Kawasaki et al., 1993]と ADP グルコースピロホスホラーゼ遺伝子 (*AGPP*) [Anderson et al., 1989]の発現を調べた (図 4c)。その結果、*du-1*, *du-2* によって *RBE1*, *AGPP* の発現は全く影響を受けていない。以上のことから、*du-1*, *du-2* は *Wx^b* pre-mRNA のスプライシングに影響のある因子か、スプライシングされた成熟した *Wx* mRNA の安定性を保持するための因子の変異の可能性が考えられる。

2. *dull* 突然変異体は *Wx^b* のスプライシングに影響する。

Wx^a と *Wx^b* はコーディング領域の塩基配列がほとんど変わらない。もし、*du-1*, *du-2* が *Wx^a* の転写産物を減少させるならば、*du-1*, *du-2* は成熟した *Wx* mRNA の安定性を制御している因子の突然変異体である。しかし、*du-1*, *du-2* が *Wx^a* の転写産物に影響を与えなければ、*du-1*, *du-2* は *Wx^b* のスプライシングに影響する因子の突然変異体である。この仮説を確かめるために以下の実験を行った。

最初に、*Wx^a* の持つ正常な第 1 イントロンのスプライシングへの影響を見るために、遺伝学的な解析を行った (図 5a)。*du-1*, *du-2* と *Wx^a* を持つインディカイネ品種のラベルとを交配し、 F_2 種子における *dull* の分離を調べた。もし、*dull* が *Wx^a* に影響を与えるのであれば、 F_2 種子において野生型と *du* は 3:1 で現われると考えられる。しかし、*dull* が *Wx^b* にのみ影響を与えるとすると、染色体の異なる 2 劣性遺伝子の変異となり、野生型と *du* は 15:1 で現われる。この解析の結果、*du-1*, *du-2* ともに野生型と突然変異体の分離は 15:1 であった (表 1)。

続いて、分子レベルで *dull* が *Wx^a* に影響を与えないことを示すために、自殖後代である F_3 種子において *Wx^a* / *Wx^b* : *du/du* の分離世代を示すグループを選抜し、一粒づつ RNA を単離し、*waxy* 遺伝子の発現についてノーザン解析を行った (図 5b)。この結果、*du-1*, *du-2* は *Wx^a* の発現に全く影響を与えておらず (図 6a レーン 3, 6、図 6b レーン 3, 4)、*Wx^b* にのみ影響を与えていた (図 6a レーン 5, 7、図 6b レーン 1, 5, 7, 9)。このことから、*du-1*, *du-2* は *Wx^a* には影響を与えず、*Wx^b* のスプライシングに影響を与えていると考えられる。

さらに、*Wx^a* のプロモーターから第 1 エキソン、第 1 イントロン、第 2 エキシソンの翻訳開始点までの領域に *gus* をつけた融合遺伝子 (図 7a) を導入したジャポニカイネと *du-1*, *du-2* を交配し、 F_2 種子において *Wx^a-gus* をホモにもち、低アミロースの表現形を示すものを選抜して解析を行った。胚乳における導入遺伝子 *Wx^a-gus* と内在性の *waxy* 遺伝子の発現を見ると、*du-1*, *du-2* は第 1 イントロン 5' スプライス部位に変異を持つ内在性の *Wx^b* 転写産物には影響があるが、正常な第 1 イントロンをもつ *Wx^a-gus* の転写産物には全く影響がなかった (図 7b)。この結果から、*du-1*, *du-2* は *Wx^b* のスプライシングのみに影響を与えることが示された。

これらの結果から、*du-1*, *du-2* は *Wx* mRNA の安定性にかかわる因子の変異ではなく、*Wx^b* のようなスプライス部位に変異を持った pre-mRNA のスプライシングに必要な因子の変異であることが示された。

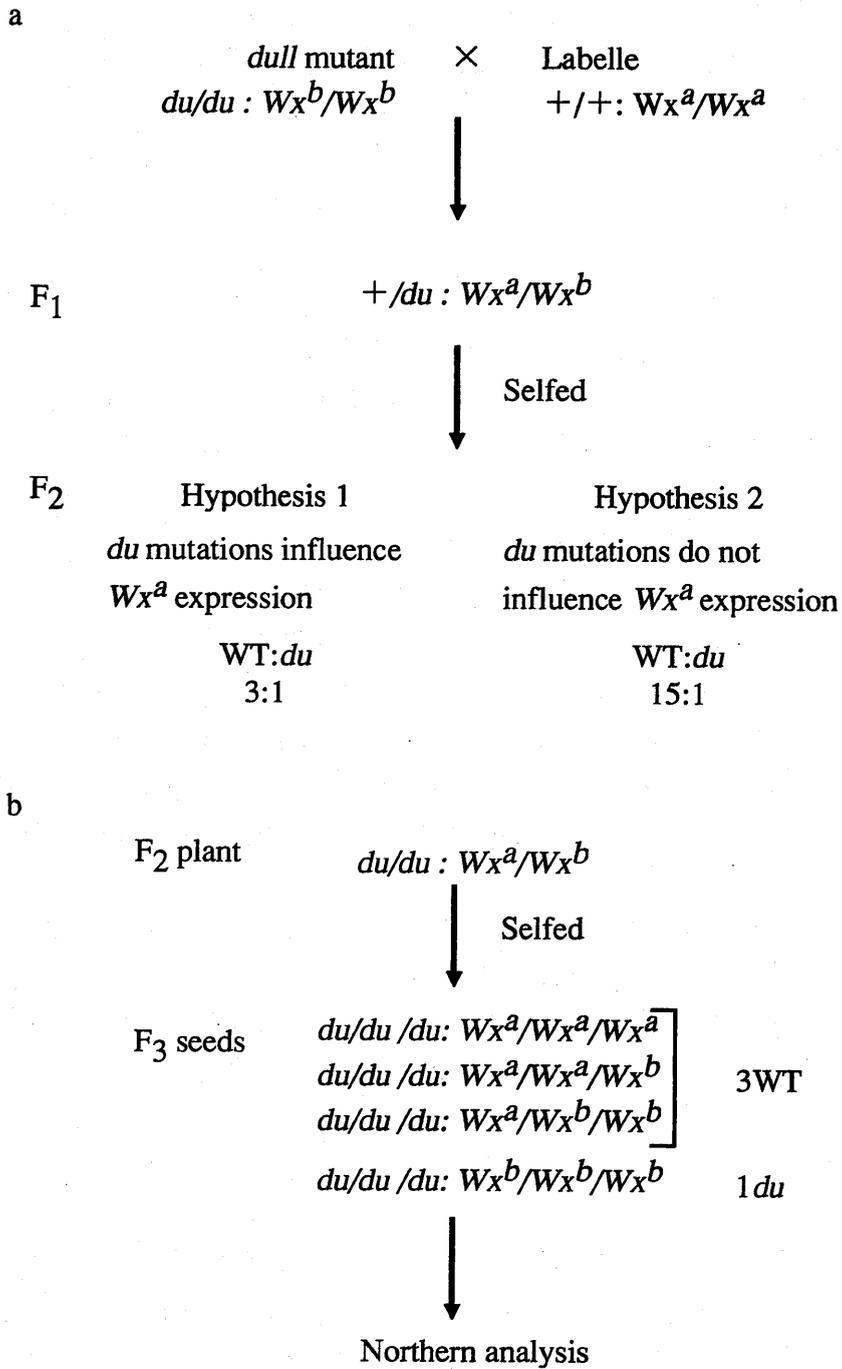


図5. *dull*が W_x^a に与える影響の遺伝学的解析。
 (a) *dull*とラベルの交配によるF₂種子の分離解析。(b) F₃種子のノーザン解析による分子レベルでの解析。

表1. *du-1*, *du-2*とラベルを交配したF₂種子の分離。

Cross	<i>dull</i> in F ₂ seeds			χ^2 (15:1)
	WT	<i>dull</i>	Total	
<i>du-1x</i> Labelle	371	25	396	0.003
<i>du-2x</i> Labelle	431	32	463	0.345

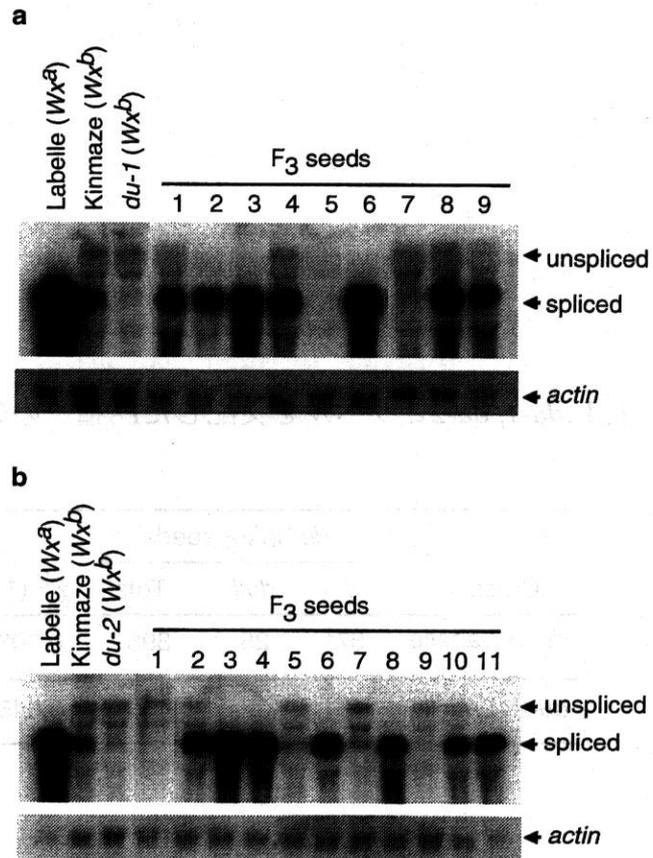


図6. $du-1$ と $du-2$ における Wx^a 転写産物への影響。
 (a) $du-1$ における Wx^a と Wx^b が分離したF₃種子における Wx のノーザン解析。
 全RNAは種子1粒ずつから抽出した。(b) $du-2$ における Wx^a と Wx^b が分離したF₃種子における Wx のノーザン解析。

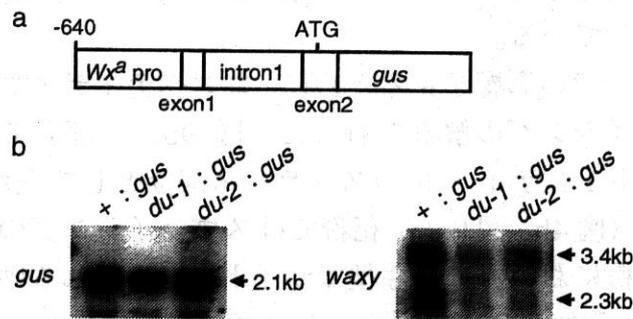


図7. *du-1*と*du-2*における導入遺伝子 Wx^a -*gus*のプライミング。

(a) Wx^a -*gus*コンストラクト。 Wx^a のプロモーターから翻訳開始点までの領域に *gus*レポーター遺伝子を融合させた。(b) Wx^a -*gus*を導入した *du-1*と *du-2*のノーザン解析。左側は *gus*をプローブにしたもの。右側は *Wx* cDNAをプローブにしたもの。+: Wx^a -*gus*は Wx^a -*gus*をホモにもつ金南風、*du-1*: Wx^a -*gus*は Wx^a -*gus*をホモにもつ *du-1*、*du-2*: Wx^a -*gus*は Wx^a -*gus*をホモにもつ *du-2*を表わす。

3. *dull* 突然変異体の影響は胚乳と花粉で異なっている

スプライシング因子には SR タンパク質のように組織特異的な作用を持つものが知られているため、*dull* 突然変異体に関しても組織によって影響が異なっているのではないかと考え、胚乳と花粉において *dull* が *waxy* 遺伝子の発現にどのような影響があるかを調べた。まず、花粉におけるアミロース蓄積量をヨード染色により確認すると、*du-1* はアミロース量が減少しているが、*du-2* は野生形とあまりかわらなかった。(図 8)。そこで、花粉における WAXY タンパク質量を胚乳のタンパク質量と比較すると(図 9a)、*du-1* は胚乳では野性型の 31%であったものが、花粉では 11%となり、その影響が花粉では強調されている。これに対して、*du-2* は胚乳では *du-1* とほぼ同じレベルの野性型の 34%となっているが、花粉では 74%となり、*du-2* の変異の影響が花粉では小さい事を示している。

さらに、RNA レベルでの影響を見るために、コンペティティブ RT-PCR により定量的に花粉でのスプライシングの解析を行った(図 9b)。胚乳では野性型、*du-1*、*du-2* すべてにおいてサイト I とサイト II のスプライス部位として使われる効率はほぼ 1:1 であったのに対して(図 4b, 図 9c)、花粉ではスプライシングの状況がかなり異なっていた(図 9b)。花粉においては野性型でサイト I の使われる効率が低くなっている。さらに、*du-1* と *du-2* それぞれのスプライシングの状況が変わっており、*du-1* ではサイト II がほとんど使われておらず、*du-2* においてはサイト I がほとんど使われていなかった(図 9c)。この結果から、*Du-1* と *Du-2* タンパク質は花粉では *Wx^b* 第 1 イントロンのスプライシングへの役割が異なっており、*Du-1* はサイト II の選択に、*Du-2* はサイト I の選択に必要なのではないかと考えられる。これらの結果から、*du-1*、*du-2* はイントロン 5' スプライス部位に変異を持つ *Wx^b* 転写産物のスプライシングを促進するために必要であり、組織特異的なスプライシング制御を行う因子の突然変異であると結論される。

III. SR タンパク質による *waxy* 遺伝子のスプライシング制御

1. イネ SR タンパク質遺伝子の単離

イネ SR タンパク質遺伝子 *osSR1* (図 10a) および *osSR2* (図 10b) はヒト ASF/SF2(Krainer et al., 1991) およびシロイヌナズナ SR1(Lazar et al, 1995) と高い相同性をもつタンパク質をコードしており、その構造的特徴は 2 つの RNA 結合ドメインによる(図 11a)。この領域の ASF/SF2 に対する相同性は *osSR1* で 55%、*osSR2* で 50% であるが、RS ドメインにおいてはアルギニン-セリンリッチであることが特徴であるため、相同性は 20% 程度である。また、SR1 には ASF/SF2 にはない特徴的な PSK ドメインが C 末側にあり、植物に特徴的ではないかと考えられていたが、*osSR1* および *osSR2* にはそのようなドメインは存在しなかった。*osSR3* (図 10c) はシロイヌナズナ *Rsp31*(Lopato et al., 1996) の相同遺伝子としてイネ EST より得られた。その構造的特徴は N 末側に 1 つの RNA 結合ドメインをもち、RS ドメインとの間に機能不明な保存領域が存在する(図 11a)。この中間領域は動物には知られておらず、イネとシロイヌ

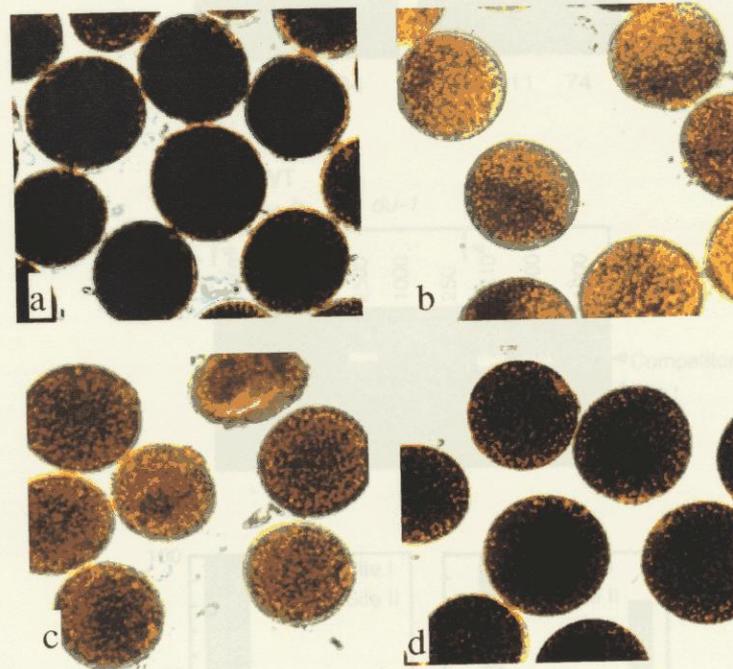


図8. ヨード染色による花粉のアミロース含有量の比較。
 (a)金南風、(b)*waxy*変異体、(c)*du-1*、(d)*du-2*。

図9. スプライシング効率とダスプライス部位選択に対する *du-1* と *du-2* の組織特異的な影響。
 (a)胚乳と花粉におけるWAXYタンパク質量。WAXYタンパク質の相対量は図の下に示した。(b)*du-1* と *du-2* の花粉における *wx^d* のコンパティタイプ RT-PCR解析。(c)*du-1* と *du-2* におけるスプライス部位の使用効率の組織特異性。

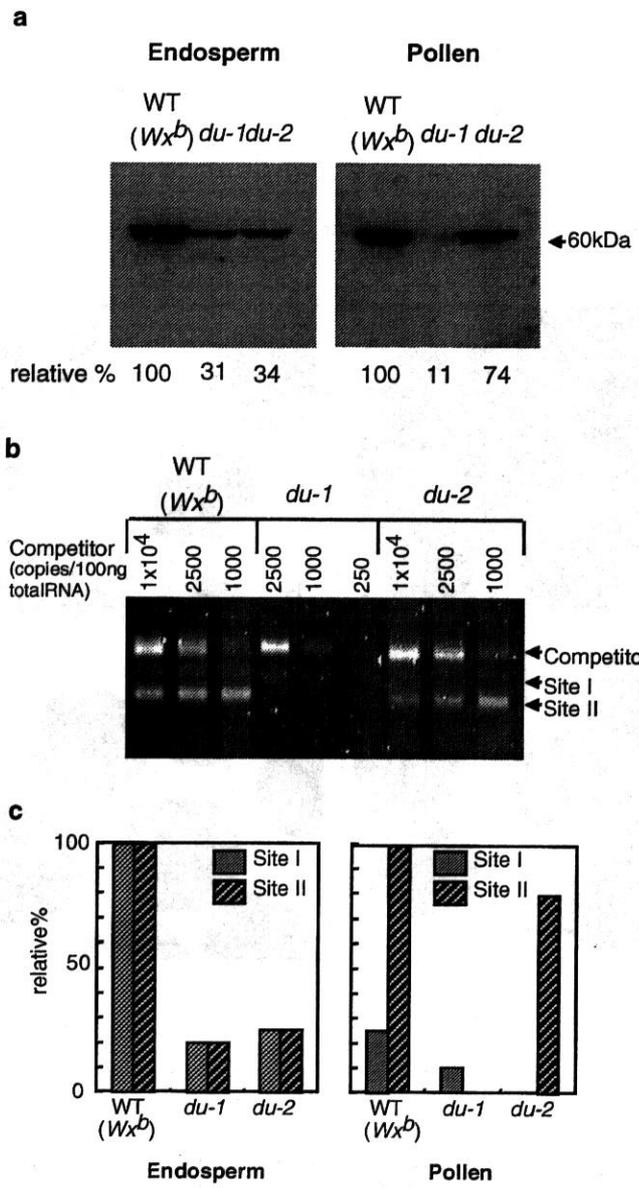


図9. スプライシング効率と 5'スプライス部位選択に対する *du-1* と *du-2* の組織特異的な影響。
 (a) 胚乳と花粉における WAXY タンパク質量。WAXY タンパク質の相対量は図の下に示した。
 (b) *du-1* と *du-2* の花粉における *Wx^b* のコンペティティブ RT-PCR 解析。
 (c) *du-1* と *du-2* におけるスプライス部位の使用効率の組織特異性。

a

```

ATGAGTAGGC GCTGGAGCAG GACAAATTAT GTCCGGGAACC TCCCGGGCGA CATCAGGGAG AGGGAGGTAG AGGATCTGTT CTACAAGTAT GGCCGCATTG 100
M S R R R W S R T I Y V G N L P G D I R E R E V E D L F Y K Y G R I V
TTGATATTGA CTGGAAGATC CCCCAGAGCG CGCTGTTT TGCTTTTGTGAGTTCGAAG ATCCCCGTGA TGCTGAAGAT GCAATCCGTG GACGGGATGG 200
D I D L K I P P R P P G F A F V E F E D P R D A E E A I R G R D G
CTATAATTTT GATGGGAACC GTTTGAGGGT GGAACCTTCA CATGGTGGGA GAGGTAACCTC TTCCCTCTTT AACAACTCTG GTGGAGGGGG ACCTCGTGGG 300
Y N F D G N R L R V E L A H G G R G N S S S F N N S G G G G R R G
GGTGTATCTA GGCATACAGA GTATCGCGTT CTGGTTACTG GACTACCTTCTTCAGCATCA TGGCAAGACC TAAAGGACCA TATGCGAAAT GCTGTGTGAT 400
G V S R H T E Y R V L V T G L P S S A S W Q D L K D H M R N A G D V
TTTGTACTCT TGAAGTGTAC CGTGAGGGTG GTGGTACTAT AGGAATTGTAGACTACACAA ACTATGATGA CATGAAGTAT GCTATCAGGA AACTTGTATG 500
C Y S E V Y R E G G G T I G I V D Y T N Y D D M K Y A I R K L D D
TTCTGAATTT AAGAATGCCT TCTCAAAGGC CTATATAAGG GTGAAGGAGTATGATGAAA GCGCAGCCGT TCATACTCAC GAAGCCGAAG CCGAAGTCCA 600
S E F K N A F S K A Y I R V K E Y D G K R S R S Y S R S R S R S R
GGTCGACGCT ACAGCAGAAG CAGGAGTCCA AGCAAGTCTC CCAAGGGAAAGTCA TCACGACGC CGTTCAGCAT CTAGATCTCG ATCGAGATCA GCTTCTCCCG 700
G R S Y S R S R S P S K S P K G K S S R R S A S R S R S A S S R
GTTCAAGATC AGAGTCAAA GGGCGCTCTC CATCAAGATC ACCAGCAAGA TCTCAGTCTC CAAATACCTC TCCTGCCAAT GGTGATGCGC CAAGCCCAA 800
S R S E S K G R S P S R S P A R S Q S P N T S P A N G D A A S S P K
GAAACGACGC CAAAGCAGGA GCCCCCAA GAAACGTAGC CCAAGCAGGA GCCCATCACG TTCCTGATCT CCTGATGCCA AGTCCGAATG ATGCTGATGT 900
K R S P S R S P P K K R S P S R S P S R S P D A K S E
GCTTCTGGG GACGGAGTGT CGAGGAATCA TGGCTCTGAA ACGTTTGACATCTGCGCC CTCGACTACT TCTGAATCGC TTTCCAAAGT ACTATTTTCA 1000
ACGTTCACTG CTCTTTCAGA TTAATGGATG ATACTGTACG CCTATTTATAGATTTGAACT TGGGATTTGT CTTTGTTC A TTTTGACACT GT 1092

```

b

```

ATGAGCAGGC GGTGGAGCCG GACGATCTAC GTGGGGAATC TCCCTGGTGA CATCAGGGAG AGGGAGGTGG AGGATCTCTT CTACAAGTAT GGCCGAATTG 100
M S R R R W S R T I Y V G N L P G D I R E R E V E D L F Y K Y G R I V
TTGATATTGA CTGGAAGATC CCTCCGAGGC CACCAGGCTA TGCTTTTGTG GAGTTTGAAG ATCCCTCGTGA TGCTGAAGAA GCAATGCTGT GCAGGGATGG 200
D I D L K I P P R P P G Y A F V E F E D P R D A E E A C A G A R S D G
TTATACTTTT GATGGACATC GTCTAAGGGT TGAACCTGCT CACGGTGGGA GAGGTAATGG TGGTTCCTCC TTTGACCGCC CCAGCAACTT TGGTGTGGA 300
Y N F D G H R L R V E P A H G G R R G N G G S S F D R P S N F G G G
GGACCCCGTG GTGTGTCCAG GCACTCAGAA TACCGTGTTC TGGTTACTGG TTTGCCITCT TCTGCATCAT GGCAAGATTT AAAGGACCAAT ATGCGCAAAG 400
G R R G V S R H S E Y R V L V T G L P S S A S W Q D L K D H M R K A
CTGGTGTGTT TTTTCTCA GAAGTGTATC GCGAGGGCGG CGGTACTGTA GGGATTGTGG ACTACACAAA CTATGATGAC ATGAAATATG CTATAAAGAA 500
G D V C F S E Y R E G G G T I G I V D Y T N Y D D M K Y A I K K
ACTTGTATGAC AGTGAATCA GGAATGCCTT TTCTAAAGGT CACATAAGGG TGAAGGAATA TGATGGCAAG CCGGCCCGCT CCTATTACG TAGCCGAAGC 600
L D D S E F R N A F S K G H I R V K E Y D G K R A R S Y S R S R S
CCAAGTCGTA GCCGAAGCAA AAGCAGGAGT CTAAGTAAAT CTCTAGAAC TGGCCGTTCA GCATCCCGAT CTCGATCTCG ATCAAGGCTT GTTCTTCCCG 700
P S R S R S K S R S L S K S P R T R R S A S R S R S R S R S R S R
GTTCAAGGTC AGCATCAAAA GGGCGCTCTC CATCAAGATC ACCAGCAAGA TCCAATCTC CAAATGCTC TCCTGCAAAT GGTGAAGCAT CAAGCCCAA 800
S R S A S K R S P S R S P A R S K S P N A S P A N G E A S S P K
GAAACGAGC CAAAGCAGGA GCCCATCTCG TTCACGGTCT CCTGATGCGA AATCTGAATA GAAGTATAT GCTGATGTA GCAGTGACAG GGACTTCTCA 900
K R S P S R S P S R S R S P D A K S E
TGACCGCTA TTTGCTGTC TTGATGTCCG ATTACATCCG AATCTTAGCT GTGGTCAAT GAAGCTCCAT TAAATTTGAT ACTATGAATT TGTAGTAATG 1000
AAAACATCAA ACTATGCACT TCATGTGCC TTCTGTGGCT GGCTCTGTC CCTTGGGTTT TTGGTAGTTC GCCGAATGCT ACTATCTGGA TTAATTTTAC 1100
TCAAAACATA TGTCGGATG TTAATGATTT CCAATGTCAGT TATTTCTTGG CACCCCAAAA AAAAGCGGCC GCGAATTAAT CACTAGTGC GCGCCCTGCA 1200
GGTCGACCAT ATGGGAGA 1218

```

c

```

ATGAGGCCCG TGTTCTGTTG GAACTCGAC TACGACACCC GCCACTCCGA GCTCGACCGC CTCTTCTACC GCTACGGCAG GATCGACCCG ATCGACATGA 100
M R P V L F V G N L D Y D T R H S E L D R L F Y R Y G R I D R I D M K
AGTCAGGATT TGCTTTTGTG TACTTTGAGG ATGAGCGTGA TGGTGTGAG GCCATACGAG CCCTTGATGG CTATCCTTTT GGCCCTGGGA GCGCAGGCT 200
S G F A F V Y F E D E R D G D E A I R A L D G Y P F G P G R R R L
TTCGGTGGAG TGTCACGGG GTGATCGTGG TTCCAGCGGT GATGGCTATA GCAAACACC TGTAATACT AAACCCAGGA AGACACTATT TGTCTAATC 300
S V E W S R G D R G S R R D G Y S K P P V N T K P T K T L F V I N
TTTGACCCCA TCAACACCAG AGTCACTGAT ATCGAAAGGC ATTTGCAACC ATTTGAAAG CTTTGAATG TTCGGATCAG GAGGAACITTT GCTTTTGTGC 400
F D P I N T R V T D I E R H F E P F G K L S N V R I R R N F A Y V Q
AGTTTGAAC ACAGGAAGAG GCCAAGAAAG CACTTGAAGC TACTCATTCT ACCAAGTTGT TGGACAGGCT GATTTCTGTT GAGTATGCTC TCAGGGATGA 500
F E T Q E E A T K A L E A T H S T K L L D R V I S V E Y A F R D D
TACAGAACGA GGTGACAGGT ATGATGGTGC AAGAGGTGGC TATGGTAGCG GAGATGATAG TCCATATCGT CGATCAGTTA GTCCAGTGA CAGGTACCGC 600
T E R G D R Y D G A R G G Y G R R D D S P Y R H S V S P V Y R S R
CCAAGTCCTG ACTACGGTCG TCAAAGGAGT CCTGTGTACG GTTCGATGA CAGGAGTCTT GITAATGATC GCTATCGAAG CCGATCTCCT GTCCGGCAT 700
P S R P D Y G R Q R S P V Y G S Y D R S P V N D R Y R S R S P V Y R S R
CAAGATCCCC ACTTGCCAAC AGAAGAGCTT ATGATTGACA GAGTTTCTC AAGGGTGGTT GGCTGGTTGC TGAAGGGITTT GCATCTGCCT CTCTAGATCT 800
R S P L A N R A Y D
TTAGCAGTGA TAGCAAGAAC TTGTCTCTC CGTACTATAT ATATAATTTA GATATGGTA CTCATGGGTG GTTCGTAGTC GAAGTCAAAA TCTTTTACCT 900
TTTGTGACC TGGAACTCCG TAGTAGTATA ATTAGATAT GATGTGTGT GCATCAAGGC AAACTCTGT GCGATGTACC TGTGCCCAA CGTTTCTAT 1000
GACTACCGCA CTTTATATTT CAAAAAAA AAAAAA 1096

```

図10. osSR cDNA塩基配列。
 (a)osSR1、コードしていると予想されるアミノ酸数は296。(b)osSR2、予想されるアミノ酸数286。(c)osSR3、予想されるアミノ酸数245。

ナズナで相同性は 68% と高く保存されており、植物に特徴的なドメインといえる。

それぞれの発現の組織特異性を見るために、根、葉、登熟中の種子から単離した RNA を用いてノーザン解析を行った。その結果、osSR1 は葉と種子で発現量が多かったが、根で 3kb、葉で 2.4kb と 0.8kb の大きさの異なる転写産物が現われたことから、osSR1 自身が選択的スプライシングを受けている可能性がある (図 11b)。また osSR2 は osSR1 と異なった発現をしており、根で多く発現している (図 11c)。osSR3 は種子で多く発現しているが、根で 2.8kb、1.5kb の大きさの異なるバンドが現われており、やはり選択的スプライシングを受けている可能性がある (図 11d)。

2. イネ SR タンパク質は *waxy* 遺伝子のスプライシングに影響する

植物においては動物のような *in vitro* の解析系が存在しないため、これまで単離されたシロイヌナズナの SR タンパク質についてはその機能が明確ではなかった。そこで、スプライス部位保存配列に変異を持ち、弱い 2 つの 5' スプライス部位が形成されている Wx^b 遺伝子を用いて *in vivo* で解析ができないかと考え、イネのプロトプラストに遺伝子を導入してトランジェント解析を行った。イネ SR タンパク質遺伝子はそれぞれカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで発現させ、レポーター遺伝子として、それぞれの第 1 イントロンを含む Wx^a -*gus*、 Wx^b -*gus* を用いた (図 12)。

Wx^a -*gus* に osSR1 と osSR2 を加えると、GUS 活性が低下した。これは osSR1 および osSR2 が Wx^a の第 1 イントロンのスプライシングを阻害しているためだと考えられる。しかし、osSR3 は Wx^a のスプライシングにほとんど影響しなかった (図 13a)。一方、スプライス部位に変異をもつ Wx^b -*gus* に対しては、osSR1 と osSR2 は Wx^a -*gus* と同じく抑制に働いたが、osSR3 はスプライシング効率を約 5 倍に上昇させた (図 13b)。このとき、osSR3 によって Wx^b のスプライス部位の選択性に影響があるかどうかを調べるために形質転換したプロトプラストから RNA を単離し、RT-PCR を行った。その結果、osSR3 を加えないとき、 Wx^b -*gus* の二つの RT-PCR 産物 (図 2c) は、オリジナルのスプライス部位であるサイト I より約 100 塩基上流にシフトしたサイト II がよりつかわれているが、osSR3 を加えることによって、サイト I でスプライスされるものが増えていた (図 13c)。これらのことから、osSR3 は Wx^b の第 1 イントロンのスプライシングにおいてスプライシング効率を上昇させると同時にスプライス部位の選択も変える役割をしていることがわかった。

3. osSR3 はエンハンサー依存的に働く

waxy 遺伝子の第 1 エキソンにはプリンリッチエンハンサー (Watakabe et al, 1993) として知られるスプライシングエンハンサーに似た配列 (GGAAGAAC) が存在する。この配列に SR タンパク質が結合することにより、 Wx^b のような弱い 2 つの 5' スプライス部位を持った pre-mRNA のスプライシングに影響を与えるのではないかと考え、 Wx^b -*gus* および Wx^a -*gus* のこの領域をピリミジンリッチに変化させたコンストラクトを作製し (図 14a)、osSR3 の影響を調べた。この結果、エンハンサー配列を置換し

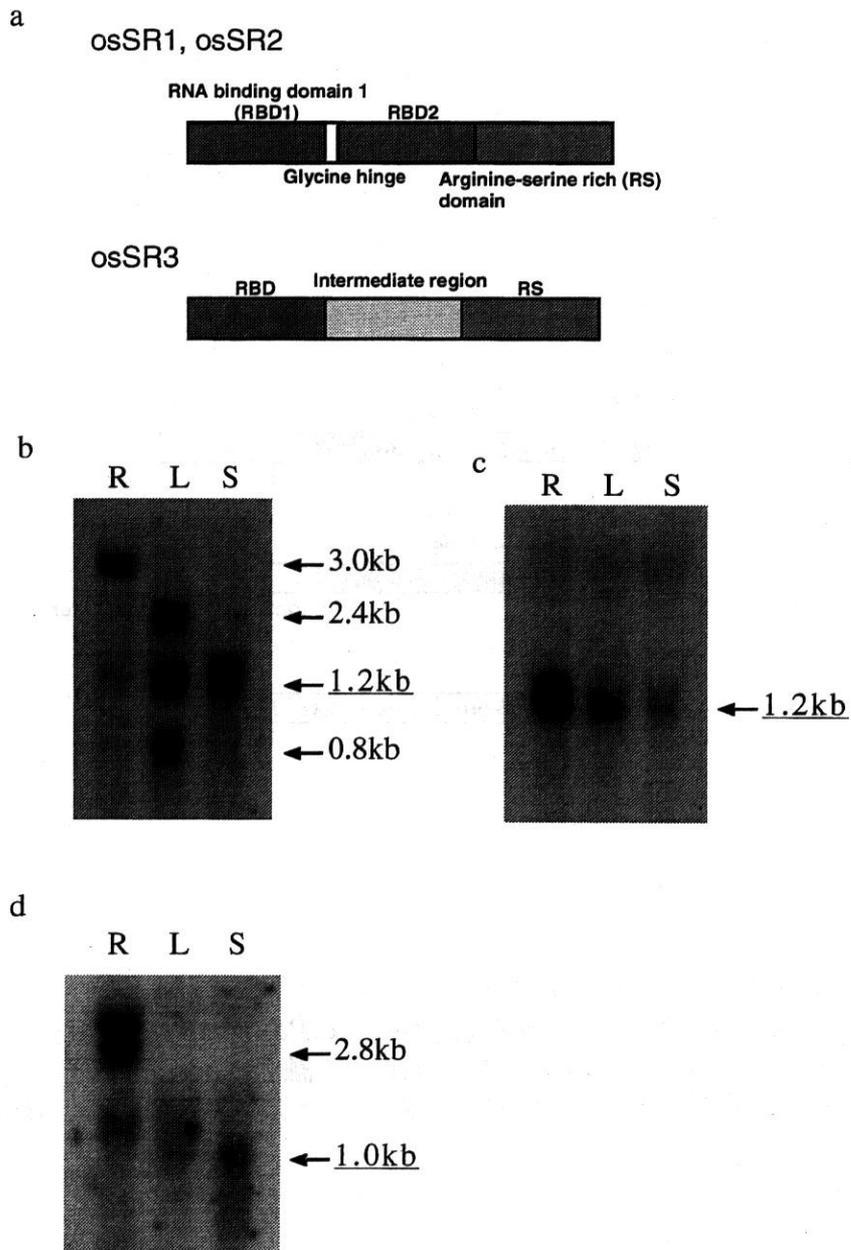


図11. osSRの構造と発現の組織特異性。
 (a)予想されるosSRのタンパク質の構造的特徴。(b-d)異なった組織におけるosSRのノーザン解析。R: Root、L:Leaf、S:Seed(DAP15)。使用したプローブはa: osSR1、b: osSR2、c: osSR3である。下線で示した大きさの転写産物が今回単離されたcDNAに対応するものである。

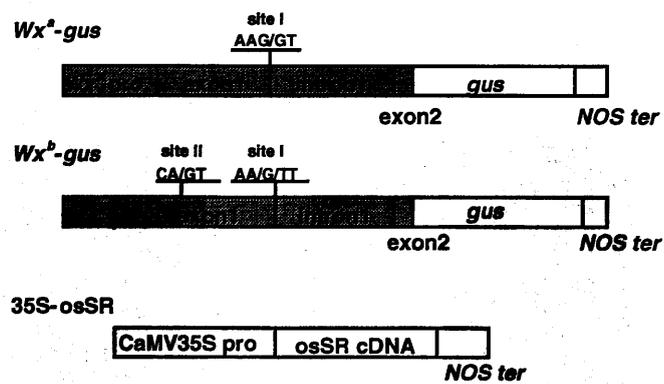


図12. トランジェント解析用コンストラクト。

Wx^a -gus、 Wx^b -gusはそれぞれ Wx^a と Wx^b のプロモーターから翻訳開始点までの領域にgusレポーター遺伝子を融合した。それぞれのosSR遺伝子はカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターに融合させた。

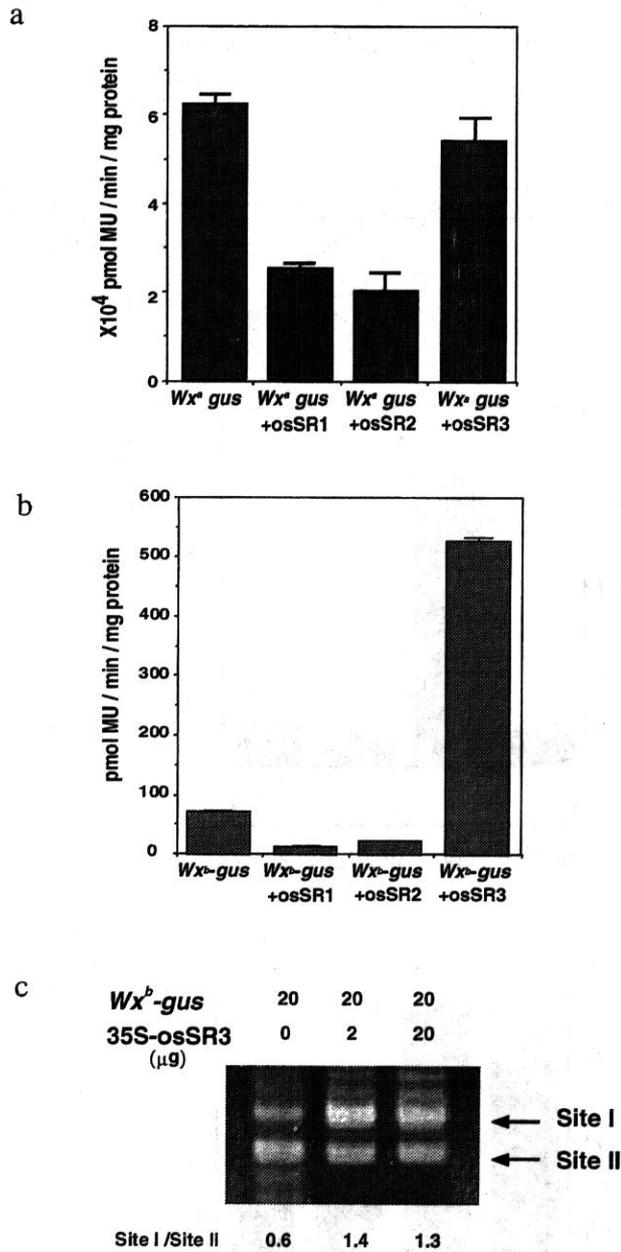


図13. イネプロトプラストにおけるosSRのWx pre-mRNAへの影響。
 (a) *Wx^a-gus*に対するosSRの影響。 *Wx^a-gus* 20 μgに対して35S-osSRを10 μg加えた。
 (b) *Wx^b-gus*に対するosSRの影響。 *Wx^b-gus* 20 μgに対して35S-osSRを10 μg加えた。
 (c) osSR3の*Wx^b*第1イントロン5'スプライス部位の選択性的変化。RT-PCRにより検出。サイトIには2種類の転写産物が含まれている。

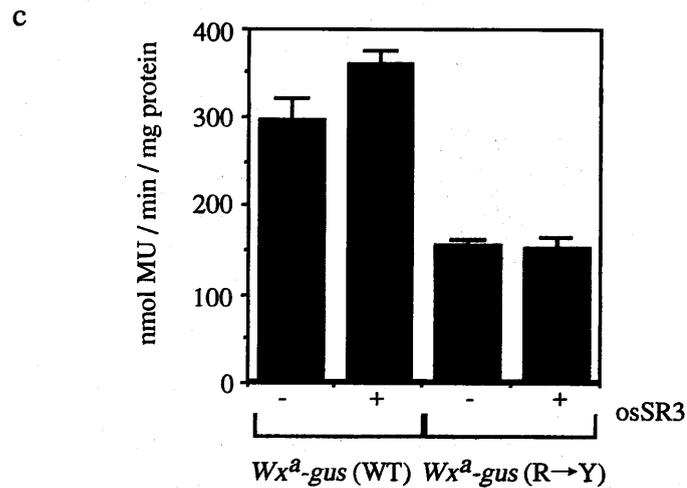
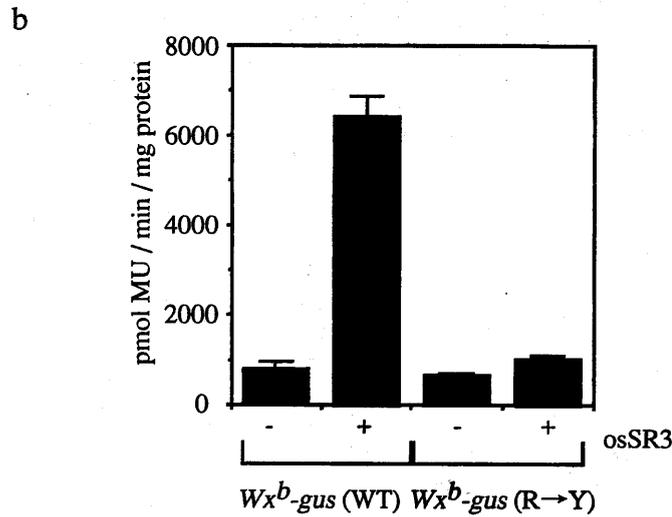
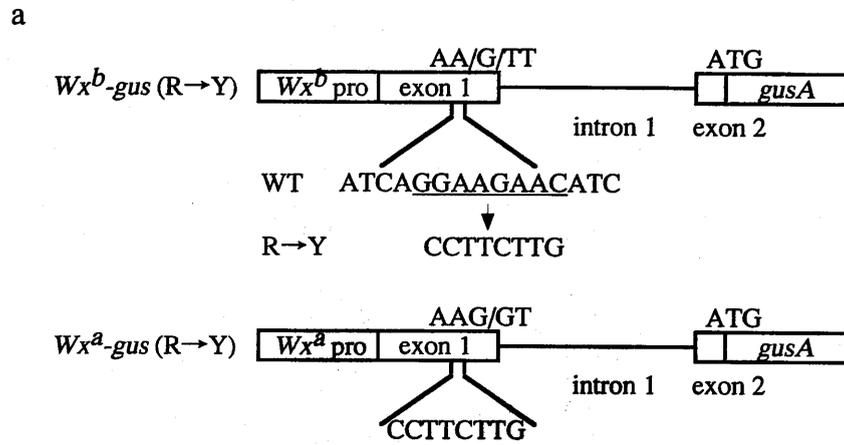


図14. プロトプラストにおけるプリンリッチ配列と osSR3 の相互作用。
 (a) 変異を導入したコンストラクト。R→Y はプリンリッチ配列をピリミジンリッチ配列に変異させたもの。(b) $Wx^b\text{-gus}$ のプリンリッチ配列と osSR3 の相互作用。(c) $Wx^a\text{-gus}$ のプリンリッチ配列と osSR3 の相互作用。gus コンストラクトは $20\ \mu\text{g}$ 使用。- は osSR3 無添加、+ は 35S-osSR3 を $2\ \mu\text{g}$ 添加。

たコンストラクトでは Wx^b -gus、 Wx^a -gus にかかわらず活性が低下しており、構成的スプライシングに影響があった (図 14b,c)。さらに Wx^b -gus のエンハンサー配列に変異を導入した Wx^a -gus (R→Y) に osSR3 を加えてもその活性は 1.5 倍にしかならず、野生型に osSR3 を加えたときの 7.8 倍の活性上昇に比べて著しく osSR3 によるスプライシングの活性化が抑制されていた (図 14b)。また、 Wx^a -gus においてはエンハンサー配列の有無にかかわらず osSR3 によるスプライシングの活性化は見られず、 Wx^a のような正常なスプライス部位をもつものに対しては影響がないことを示している。これらの結果から、osSR3 は胚乳においてエンハンサーを介して Wx^b のスプライシングに関与している可能性がでてきた。

今後、このような Wx^b -gus を使ったトランジェントの解析系が植物におけるスプライシング機構の解析に十分用いることができると考えられる。

考察

1. スプライス部位突然変異体

我々は Wx^b は Wx^a の第1イントロンの5'スプライス部位の共通保存配列に1塩基の変異を持つスプライシング変異体であることを明らかにした。 Wx^b の低発現量の原因はこの5'スプライス部位の変異によってスプライシング効率が低下したために生じたものであった。

現在知られている限りにおいて、イントロンの5'スプライス部位である GT の G (+1G とする) に変異を持つ正常な遺伝子の存在は知られていない(Senapathy et al., 1990)。この+1G は真核生物のイントロンにおいて100%保存されている。スプライス部位に対して変異を導入するという研究はしばしばなされてきており、+1G が変異するとスプライシングが不可能になったり、新たな5'スプライス部位(cryptic 5'splice site) が形成されると報告されている。例えば、Carle-Urioste ら(1994)は変異を導入したトウモロコシ Bz2 イントロンをレポーター遺伝子に結合させトウモロコシのプロトプラストを用いてトランジェント解析を行っているが、+1G が+1T に変異しても全くスプライシングは起こらなかった。しかし、MaCullough ら(1996)の報告ではタバコにおいて β -コングリシニンの第4イントロンの5'スプライス部位+1G を A に変異させたところ、新規に UU の部位でスプライシングが起こっている。Aebi ら(1987)はウサギ β グロビンイントロンの5'スプライス部位の+1G に変異を導入して *in vitro* でスプライシングの実験を行い、+1A や+1C の変異を導入した場合には正常なスプライシングは全くこらなかつたが、+1T の変異を導入した場合にはスプライシング効率は低下するが、1塩基上流にシフトして GT を形成し、正常なスプライシングが起こると報告した。また、+1G の変異体ではどの置換においても+1 の位置で開裂が起こり、スプライシングの中間体である投げ縄イントロンを形成することを示した。ただし、+1 の変異体は3'側の切り出しは起こらなかつたことから、+1G は3'側の切り出しを促進するためには必要であるが、イントロンの5'側を認識するためには+1 の G よりもスプライス部位付近の塩基配列が U1snRNA の認識部位と相補性が高ければよいと考察している。しかし、*in vivo* の実験では必ずしもこの結果を再現できず、全く新しい5'スプライス部位によりスプライシングが起こってしまった。我々が解析を行った Wx^b は5'スプライス部位に変異を持ち、その結果低効率ながらも変異を持つオリジナルのスプライス部位 UU と新規に1塩基上流にシフトした GU と約100塩基上流にシフトした GU がスプライス部位として認識されている。この変異は幸いなことに5'UTR にあるため、エクソン内へのシフトであれば翻訳に影響を与えず、さらに澱粉合成における最終段階の酵素をコードしていたため、植物の生存や稔性にも影響なく野生型ジャポニカとして定着してしまった。これは現在植物においてあまり進展のないスプライシングの *in vivo* の実験系としてたいへん有用であると考えられる。

Wx^b はスプライス部位の変異によりスプライシング効率が低下しているが、図2のRT-PCRの結果によるとスプライスされた転写産物とスプライスされなかつた転写

産物の量の合計は Wx^a に比べて 17.5% しか存在しない。これには二つの可能性が考えられる。一つはスプライスされなかった転写産物が不安定で、 Wx^a の 82.5% にあたる転写産物はすぐに分解されてしまうということである。 Wx^b の第 1 イントロンがスプライスされない転写産物はイントロン内に複数の翻訳開始コドンと終止コドンが存在する。このため、異常な翻訳をする mRNA は事前に分解されてしまう可能性がある。これは nonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれ、哺乳類の遺伝子において突然変異などにより正常な終止コドンより上流に終止コドンができてしまったときに、突然変異をもつ mRNA が分解されてしまうという現象であり (Hentze and Kulozik, 1999)、植物においても NMD の例が知られている (van Hoof and Green, 1996)。この機構についてはまだ不明な点が多く、哺乳類で現在も解析が進められている。また、もう一つの可能性はスプライシングが変異により阻害されたため、その遺伝子の転写が抑制されているのではないかということである。Tanaka ら (1990) は GUS レポーター遺伝子の N 末側にカタラーゼの第 1 イントロンとカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターをつなげたコンストラクトをイネに導入して GUS の転写をみると、カタラーゼのイントロンを持たないものに比べて数十倍に増加していた。このことはスプライシングが転写を上昇させる効果があることを示している。従って Wx^b においてもスプライシングの効率が低下したため、転写も低下している可能性が考えられる。

また、 Wx^b の特徴の一つである登熟期における弱低温による発現量の上昇もスプライス部位の変異に由来するものであると考えられる。最近、Sablowski と Mayerowitz (1998) はシロイヌナズナの花の形態形成遺伝子である *ap3* の温度感受性変異株についての報告を行い、その原因がスプライス部位の変異によるものであることを明らかにした。これは低温になることでスプライソソームが安定に pre-mRNA に結合することによるものと考えられている。したがって、 Wx^b を用いたスプライシング機構の解析は冷夏における米の食味の低下を予防するといった育種上のテーマを解決する糸口にもなりうる。

2. Du-1, Du-2 タンパク質の役割

du-1 と *du-2* は Wx^b の転写産物のスプライシングに影響する突然変異体であり、さらに、花粉と胚乳においてスプライス部位の選択性が異なるといった特徴を持っていた。

トウモロコシ、イネなどの穀物はその胚乳部分に蓄積される澱粉の品質によって食品や工業製品への用途の広がりが大きく変わってしまう。それゆえに、澱粉の生合成機構を詳細に解明するためにも多くの澱粉合成関連遺伝子の突然変異体が作出され、解析されてきた。特にトウモロコシでこのような研究が進んでおり、代表的なものは澱粉顆粒結合性澱粉合成酵素 (granule-bound starch synthase ; GBSS) の突然変異体でアミロースを合成できない、いわゆるモチと呼ばれる *waxy*、澱粉枝つけ酵素の突然変異でアミロース含有量が多くなる *amylose extender*、枝切り酵素の突然変異体である *sugary 1*、ADP グルコースピロホスホリラーゼの突然変異体 *shrunk-2* と *btittle-2* など

が知られており (Preiss, 1991; Nelson and Pan, 1995)、イネにおいても同様の突然変異体が存在する (Okuno et al., 1983; Satoh and Omura, 1981)。しかし、トウモロコシ、イネともにモチ、ウルチが存在するが、モチとウルチの中間の形質、すなわち低アミロースの形質を示すものはイネの *dull* 突然変異体しかなく、トウモロコシなどでは全く報告のないユニークなものであった。トウモロコシで *dull-1* という突然変異体があるが、N 末にユニークな配列をもつ starch synthase III のホモログの突然変異であり、表現型は高アミロースを示しており、イネの *dull* とは表現型が異なる (Gao et al., 1998)。また、イネにおいてもジャポニカ以外で作出されたとの報告はない。低アミロースの表現型から *waxy* 遺伝子の調節遺伝子ではないかと考えられていたが、その作用機構は不明であった。

イネにおける *waxy* 遺伝子には 2 つの対立遺伝子座 Wx^a , Wx^b が知られていたが、その違いは Wx^b が第 1 イントロン 5' スプライス部位に変異を持つスプライシング突然変異体であったことによる。トウモロコシや Wx^a を持つインディカイネで *dull* 突然変異体が発見されておらず、*dull* 突然変異体に導入した Wx^a は影響を受けず、*dull* 変異体中での *RBE1*, *AGPP* など正常なイントロンを持つものに対しては全く影響がないことから、*dull* はスプライシングに必要なスプライソソームを構築する snRNP のような重要なスプライシング因子の突然変異ではなく、 Wx^b のスプライス部位の突然変異によってはじめて観察できた特殊なスプライシング因子の突然変異であると考えられる。SR タンパク質は多様な機能を持つスプライシング因子であり、5' スプライス部位の認識、選択にかかわっていることは良く知られている。例えば、Zahler と Roth (1995) は SV40 に SRp55 を加えることにより、5' スプライス部位が近位から遠位に変わることを示した。また、4 種の SR タンパク質ファミリーそれぞれを HeLa 細胞の抽出液に加えてスプライシング試験を行い、選択的スプライシングに変化が起ることを示した (Zahler et al, 1993)。SR タンパク質の突然変異体としては、*Drosophila* における SRp55 の突然変異体があるが、null の突然変異体では致死になってしまうことから (Ring and Lis, 1994)、もし、*dull* が SR タンパク質のようなスプライシング因子の突然変異体であったとしても、かなりマイナーなものか、組織特異性の非常に強いものであると考えられる。

組織特異的な選択的スプライシングとして良く知られているのは、キイロショウジョウバエにおける性決定遺伝子群 *Sex-lethal(Sxl)*、*transformer(tra)*、*transformer-2(tra-2)*、*doublesex(dsx)* のスプライシングである。キイロショウジョウバエの体細胞の性は三本一組からなる常染色体と X 染色体の比によって決定され、この比が 1 だと性決定遺伝子群が働き雌になるが、0.5 だと遺伝子群が働かず雄になる。この時雌においては *Sxl* 及び *tra* 遺伝子は機能を持ったタンパク質をコードする mRNA が作られるが、雄では選択的スプライシングにより別の 3' スプライス部位が使われてしまい、機能を持ったタンパク質をコードする mRNA が作られない。さらに *dsx* 遺伝子は第 4 エキシンの選択が正常な *tra* 遺伝子産物と *tra-2* 遺伝子産物、及び SR タンパク質によってなされている。この 3 種のタンパク質が *dsx* 遺伝子の雌特異的スプライシングには不可欠である

(Tian and Maniatis, 1993; Heinrichs and Baker, 1995; Lynch and Maniatis, 1995)。 *du-1*, *du-2* は *tra*, *tra-2* のような非常に選択性の強いスプライシング因子をコードしている可能性もある。

du-1 と *du-2* は組織特異性があり、*du-1* は花粉においてその影響が強くなり、それに対して *du-2* は花粉での影響が減少する。*waxy* 遺伝子において花粉と胚乳においてスプライシングの効率が異なっている例としてはトウモロコシにおけるトランスポゾン挿入による突然変異体 *WxG* がある。*WxG* は第 8 イントロンに 5.6kb のトランスポゾンをもっており、胚乳においては正常なスプライシング産物は転写産物の 0.6% しかなく、それに対して花粉では 22% も存在する (Marillonnet and Wessler, 1997)。これらの結果は *du-1* や *du-2* のように胚乳と花粉において異なったスプライシング因子が働いていることを示している。

3. イネ SR タンパク質の機能

イネから単離された *osSR1* および *osSR2* は *Wx* 遺伝子の第 1 イントロンに対してスプライシングを阻害する働きをし、*osSR3* はプリンリッチエンハンサーを介して 5' スプライス部位に変異を持ち、2 つのクリプティックスプライス部位が使われている *Wx^b* 第 1 イントロンのスプライシングを促進すると同時にスプライス部位の選択性も変えた。

これまでシロイヌナズナから 6 種の SR タンパク質をコードした遺伝子が単離されている。*SR1* は RNA 結合ドメインを 2 つ持った ASF/SF2 タイプの SR タンパク質である。N 末側にプロリン, セリン, リジンを多く含む PSK ドメインを持っている。このドメインはサイクリン/p34-cdc2 によってリン酸化されるのではないかと考えられている (Lazar et al., 1995)。*Rsp31*, *Rsp35*, *Rsp41* は 1 つの RNA 結合ドメインと RS ドメインの間に他のタンパク質と相同性のない保存領域を持った SR タンパク質であり、植物にしか存在しない (Lopato et al., 1996)。*SRZ-22*, *SRZ-21* は U1-70K に結合するタンパク質として単離され、9G8 タイプのジンクフィンガーモチーフを持った SR タンパク質である。しかし、9G8 が持たないグリシンヒンジが存在することから、植物特異的な SR タンパク質ではないかと考えられている (Golovkin and Reddy, 1998)。しかし、これらの SR タンパク質の機能解析は動物で一搬に使われている S100 抽出物などを使った方法で行われているだけで、植物でのスプライシングに対する機能は明らかになっていない。我々は今回用いた *Wx-gus* のトランジェント解析により、植物の SR タンパク質の機能解析が飛躍的に進歩するのではないかと考えている。

ASF/SF2 タイプの *osSR1* と *osSR2* は *Wx* pre-mRNA のスプライシングを阻害したが、ASF/SF2 においても、 β -サラセミアやアデノウイルス E1a などの pre-mRNA に対してはスプライシングを促進するが (Caceres et al., 1994)、SV40 やアデノウイルス L1 に対してはスプライシングを阻害する (Romac and Keene, 1995; Wang and Manley, 1995)。このとき、ASF/SF2 が特異的に結合する配列がブランチポイントの近くに存在すると、ASF/SF2 がここに結合することによって、真に必要な因子の結合を阻害して

しまう。また、その阻害には RS ドメインが必要であるという報告がされている。このように、osSR1, osSR2 においても SR タンパク質を加えることによって、Wx のスプライシングに必須な因子が Wx pre-mRNA に結合できなくなっていると考えられる。

osSR3 は Wx^b の第 1 イントロンのスプライシングを促進したが、これにはスプライシングエンハンサーが関与していた。プリンリッチエンハンサーはイントロンの下流側のエクソンにあり、弱い 3' スプライス部位を認識させている。その代表例であるチキン心筋トロポニン T では SRp75, SRp55, SRp40, ASF/SF2 などがプリンリッチエンハンサーに結合し、SC35 は結合することができなかった。また、SRp40 はスプライシングを促進したが、SC35 はできなかった(Ramchatesingh et al., 1995)。これらの結果から、osSR3 はプリンリッチエンハンサーに結合し、スプライシングの促進とスプライス部位の認識を行っていると考えられる。しかし、エンハンサーを変異させてもスプライシング促進力は完全には失われていないことから、エンハンサーを介さず、スプライス部位を認識しているものもあると思われる。

osSR1, osSR2 と osSR3 の機能の違いはどのドメインに由来するのか。最近ドメインを置換することによってそれぞれの機能を解析しようとする試みがなされている。RS ドメインはタンパク質-タンパク質相互作用に機能しており、S100 抽出物における活性には RS ドメインが必要であることがわかっている(Caceres and Krainer, 1993; Zuo and Manley, 1993)。また、ASF/SF2 と SC35 の RS ドメインは機能的に置き換えが可能であった(Chandler et al., 1997)。さらに、RS ドメインだけを他の RNA 結合ドメインにつけても SR タンパク質の種類に関係なく、スプライシングは可能であった(Graveley and Maniatis, 1998)。これらのことから、RS ドメインは RNA 結合ドメインとは独立にスプライシングを促進するのに必要なドメインであることがわかる。しかし、ターゲットとなる pre-mRNA を認識するためには RS ドメインのリン酸化が重要である(Misteli et al., 1998; Xiao and Manley, 1998)。また、基質特異性や選択的スプライシングに関与しているのは RNA 結合ドメインである(Caceres and Krainer, 1993; Zuo and Manley, 1993)。osSR1, osSR2 は RNA 結合ドメインが 2 つあり、osSR3 には 1 つしかなく、さらに機能不明なドメインもあることから、RNA の認識において違いがあるものと考えられる。

植物のスプライシング機構はまだ十分に解明されていないが、今後この解析系を用いることによって、それぞれのドメインの機能や特異性などを徐々に明らかにすることができるだろう。

4. osSR3 は Du か？

osSR3 はイネプロトプラストにおいて Wx^b 第 1 イントロンの弱い 5' スプライス部位を活性化することができた。では、osSR3 は Du-1 あるいは Du-2 に相当するスプライシング因子なのか？

Du-1 と Du-2 は組織によって Wx^b 第 1 イントロンのスプライシングに対する影響が異なっている (図 15a)。Du-1 と Du-2 は胚乳においては影響力に違いはない。し

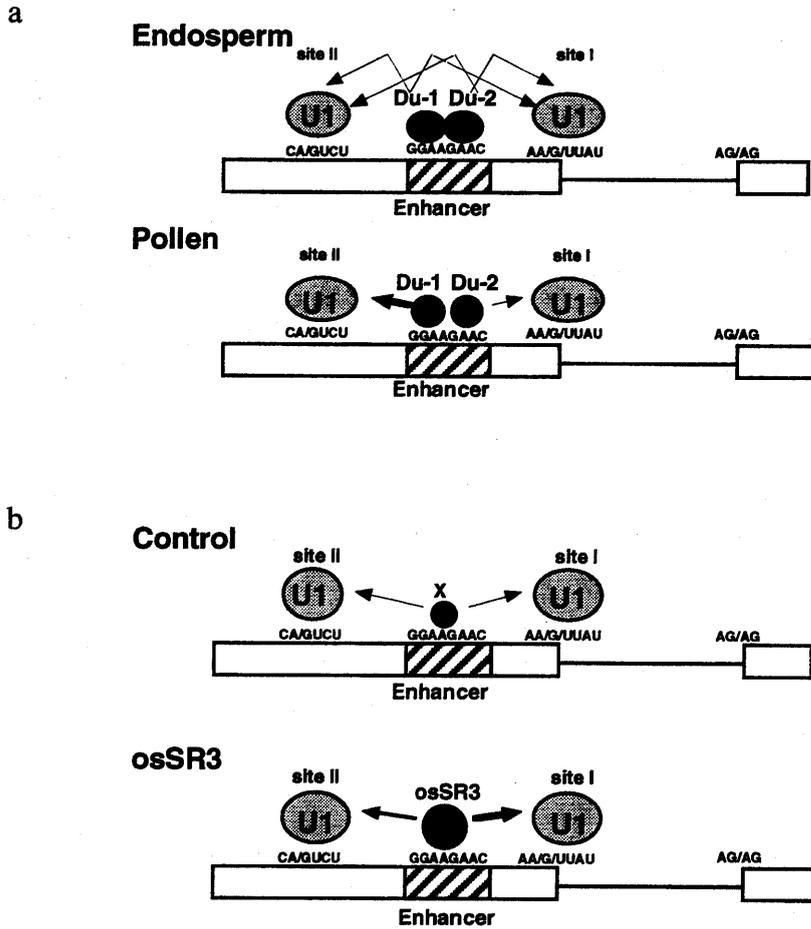


図15. W_x^b のスプライシングに影響を与える因子のモデル。
 (a)Du-1, Du-2の組織特異的なスプライシング制御。(b)osSR3によるスプライシングの促進。矢印の太さの違いは作用する力の強さを示している。

かし、花粉では Du-2 はサイト I を主に活性化させる働きがあると考えられるが、影響力はあまりない。逆に、Du-1 は花粉でサイト II を強く活性化する働きがある。また、イネ SR タンパク質の 1 種である osSR3 はプロトプラスト中でプリンリッチエンハンサーを介してサイト I のスプライシングを強く活性化していた (図 15b)。では、もし花粉で Du-2 を過剰発現させるとどうなるだろうか? プロトプラストで osSR3 を発現させた時と同じく、プリンリッチエンハンサーを介してサイト I のスプライシングを活性化するのではないだろうか。そこで、Du-2 が osSR3 の可能性があるのではないかと考え、*du-2* における osSR3 の RNA の発現および cDNA の塩基配列を調べたが、変化は全くなかった。同時に *du-1* についても調べたが変化はなかった。osSR3 に相同性をもつシロイヌナズナの Rsp31 はファミリーを形成していることから、イネにおいても複数の osSR3 相同タンパク質が存在するのではないかと考えられる。これは今後 osSR3 cDNA を用いて cDNA ライブラリーからのスクリーニングを行うことによって明らかになると思われる。また、Du-2 や osSR3 とは異なった 5' スプライス部位を認識する Du-1 も異なったタイプの SR タンパク質である可能性もあるため、今後イネからの SR タンパク質遺伝子の単離を進め、*Wx^h* を使ったスプライシングの解析によりその正体が明らかになるのではないかと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、適切にご指導を賜りました島本 功教授には厚くお礼申し上げます。このように無事博士論文を完成することができたのも一重に島本教授の叱咤激励のおかげです。また、経塚淳子助教授にはコンストラクトの作製やエレクトロポレーションなどの実験においてご指導いただきありがとうございました。井沢毅博士には実験の基本的な操作方法など懇切丁寧に教えていただき感謝の至りです。川崎 努博士には cDNA ライブラリーを頂いた上、スクリーニングの方法など教えていただきありがとうございました。また、本研究室の森野和子氏の Wx^d のシークエンスの結果がなければその後の実験の進展はありませんでした。心から感謝いたします。さらに、貴重な試料である *dull* 変異体を頂いた九州大学農学部 佐藤 光教授、および抗 WX 抗体を頂いた東京大学農学部 平野博之助教授には深く感謝いたします。また、この研究の端緒をつけた三菱化学の中島みどり氏にお礼を申し上げます。

参考文献

- Aebi, M., Hornig, H., and Weissmann, C. (1987). 5' cleavage site in eukaryotic pre-mRNA splicing is determined by the overall 5' splice region, not by the conserved 5' GU. *Cell*, 50, 237-246.
- Anderson, J. M., Hnilo, J., Larson, R., Okita, T. W., Morell, M., and Preiss, J. (1989). The encoded primary sequence of a rice seed ADP-glucose pyrophosphorylase subunit and its homology to the bacterial enzyme. *J. Biol. Chem.*, 264, 12238-12242
- Caceres, J. F., and Krainer, A. R. (1993). Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J.*, 12, 4715-4726.
- Caceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M., and Krainer, A. R. (1994). Regulation of alternative splicing *in vivo* by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*, 265, 1706-1709.
- Carle Urioste, J. C., Ko, C. H., Benito, M. I., and Walbot, V. (1994). *In vivo* analysis of intron processing using splicing-dependent reporter gene assays. *Plant. Mol. Biol.*, 26, 1785-1795.
- Chabot, B. (1996). Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends. Genet.*, 12, 472-478.
- Chandler, S. D., Mayeda, A., Yeakley, J. M., Krainer, A. R., and Fu, X. D. (1997). RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 3596-3601.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Gao, M., Wanat, J., Stinard, P. S., James, M. G., and Myers, A. M. (1998). Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell*, 10, 399-412.
- Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., and Bunn, H. F. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87, 2725-2729.
- Golovkin, M., and Reddy, A. S. (1998). The plant U1 small nuclear ribonucleoprotein particle 70K protein interacts with two novel serine/arginine-rich proteins. *Plant Cell*, 10, 1637-1648.
- Goodall, G. J., and Filipowicz, W. (1989). The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell*, 58, 473-483.
- Graveley, B. R., and Maniatis, T. (1998). Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol. Cell*, 1, 765-771.

- Heinrichs, V., and Baker, B. S. (1995). The *Drosophila* SR protein RBP1 contributes to the regulation of *doublesex* alternative splicing by recognizing RBP1 RNA target sequences. *EMBO J.*, 14, 3987-4000.
- Heinrichs, V., Ryner, L. C., and Baker, B. S. (1998). Regulation of sex-specific selection of *fruitless* 5' splice sites by *transformer* and *transformer-2*. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 450-458.
- Hentze, M. W. and Kulozik, A. E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*, 96, 307-310.
- Hirano, H.-Y., and Sano, Y. (1998). Enhancement of *Wx* gene expression and the accumulation of amylose in response to cool temperatures during seed development in rice. *Plant Cell Physiol.*, 39, 807-812.
- Hirano, H.-Y., and Sano, Y. (1991). Molecular characterization of the *waxy* locus of rice (*Oriza sativa*). *Plant Cell Physiol.*, 32, 989-997.
- Humphrey, M. B., Bryan, J., Cooper, T. A., and Berget, S. M. (1995). A 32-nucleotide exon-splicing enhancer regulates usage of competing 5' splice sites in a differential internal exon. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 3979-3988.
- Isshiki, M., Morino, K., Nakajima, M., Okagaki, R.J., Wessler, S.R., Izawa, T. and Shimamoto, K. (1998). A naturally occurring functional allele of the rice *waxy* locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J.*, 15, 133-138.
- Kawasaki, T., Mizuno, K., Baba, T., and Shimada, H. (1993). Molecular analysis of the gene encoding a rice starch branching enzyme. *Mol. Gen. Genet.*, 237, 10-16.
- Kawasaki, T., Mizuno, K., Shimada, H., Satoh, H., Kishimoto, N., Okumura, S., Ichikawa, N., and Baba, T. (1996). Coordinated regulation of the genes participating in starch biosynthesis by the rice *Floury-2* locus. *Plant Physiol.*, 110, 89-96.
- Krainer, A. R., Mayeda, A., Kozak, D., and Binns, G. (1991). Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators. *Cell*, 66, 383-394.
- Lazar, G., Schaal, T., Maniatis, T., and Goodman, H. M. (1995). Identification of a plant serine-arginine-rich protein similar to the mammalian splicing factor SF2/ASF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 7672-7676.
- Lopato, S., Waigmann, E., and Barta, A. (1996). Characterization of a novel arginine/serine-rich splicing factor in arabidopsis. *Plant Cell*, 8, 2255-2264.
- Luehrsen, K. R., Taha, S., and Walbot, V. (1994). Nuclear pre-mRNA processing in higher plants. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 47, 149-93.
- Luehrsen, K. R., and Walbot, V. (1994). Addition of A- and U-rich sequence increases the

- splicing efficiency of a deleted form of a maize intron. *Plant Mol. Biol.*, 24, 449-463.
- Lynch, K. W., and Maniatis, T. (1995). Synergistic interactions between two distinct elements of a regulated splicing enhancer. *Genes Dev.*, 9, 284-293.
- Madhani, H. D., and Guthrie, C. (1994). Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome. *Annu. Rev. Genet.*, 28, 1-26.
- Manley, J. L., and Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes Dev.*, 10, 1569-1579.
- Marillonnet, S., and Wessler, S. R. (1997). Retrotransposon insertion into the maize *waxy* gene results in tissue- specific RNA processing. *Plant Cell*, 9, 967-978.
- McCullough, A. J., Baynton, C. E., and Schuler, M. A. (1996). Interactions across exons can influence splice site recognition in plant nuclei. *Plant Cell*, 8, 2295-2307.
- McCullough, A. J., and Schuler, M. A. (1993). AU-rich intronic elements affect pre-mRNA 5' splice site selection in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 7689-7697.
- Misteli, T., Caceres, J. F., Clement, J. Q., Krainer, A. R., Wilkinson, M. F., and Spector, D. L. (1998). Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription *in vivo*. *J. Cell Biol.*, 143, 297-307.
- Nagy, F., Kay, S. A., and Chua, N.-H. (1988). Analysis of gene expression in transgenic plants. In *Plant Molecular Biology Manual*, S. Gelvin and R. Schilperoort, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 1-29.
- Nakajima, M., and Shimamoto, K. (1994). Regulation of the rice *waxy* gene expression. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 68, 1589-1591.
- Nelson, O., and Pan, D. (1995). Starch synthesis in maize endosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 475-496.
- Okuno, K., Fuwa, H., and Yano, M. (1983). A new mutant gene lowering amylose content in endosperm starch of rice, *Oryza sativa* L. *Jpn. J. Breed.*, 33, 387-394.
- Preiss, J. (1991). Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 7, 59-114.
- Ramchatesingh, J., Zahler, A. M., Neugebauer, K. M., Roth, M. B., and Cooper, T. A. (1995). A Subset of SR Proteins Activates Splicing of the Cardiac Troponin T Alternative Exon by Direct Interactions with an Exonic Enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4898-4907.
- Ring, H. Z., and Lis, J. T. (1994). The SR Protein B52/SRp55 Is Essential for *Drosophila* Development. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7499-7506.

- Romac, J. M. J., and Keene, J. D. (1995). Overexpression of the arginine-rich carboxy-terminal region of U1 snRNP 70K inhibits both splicing and nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Genes Dev.*, 9, 1400-1410.
- Ruby, S. W., and Abelson, J. (1991). Pre-mRNA splicing in yeast. *Trends. Genet.*, 7, 79-85.
- Sablowski, R. W., and Meyerowitz, E. M. (1998). Temperature-sensitive splicing in the floral homeotic mutant *apetala3-1*. *Plant Cell*, 10, 1453-1463.
- Sako, A., Nagano, H., Inukai, T., and Sano, Y. (1998). Molecular characterization of mutations induced by γ rays and EMS treatments at the rice *wx* locus. *Breed. Sci.*, 48 (Suppl.2), 330.
- Sano, Y. (1984). Differential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.*, 68, 467-473.
- Sano, Y., Katsumata, M., and Okuno, K. (1986). Genetic studies of speciation in cultivated rice. 5. inter- and intraspecific differentiation in the *waxy* gene expression of rice. *Euphytica*, 35, 1-9.
- Sano, Y., Maekawa, M., and Kikuchi, H. (1985). Temperature effect on the *Wx* protein level and amylose content in the endosperm of rice. *J. Heredity*, 76, 221-222.
- Satoh, H., and Omura, T. (1981). New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice, *Oryza sativa* L. *Jpn. J. Breed.*, 31, 316-326.
- Senapathy, P., Shapiro, M. B., and Harris, N. L. (1990). Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol.*, 183, 252-278.
- Sharp, P. A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell*, 77, 805-815.
- Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T., and Fujimoto, H. (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature*, 338, 274-276.
- Shirzadegan, M., Christie, P., and Seemann, J. R. (1991). An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nucleic Acid. Res.*, 19, 6055.
- Simpson, G. G., and Filipowicz, W. (1996). Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Mol. Biol.*, 32, 1-41.
- Tacke, R., Chen, Y., and Manley, J. L. (1997). Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: Creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 1148-1153.

Tanaka, A., Mita, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K. and Nakamura, k. (1990). Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. *Nucleic Acid. Res.*, 18, 6767-6770.

Tian, M., and Maniatis, T. (1993). A splicing enhancer complex controls alternative splicing of *doublesex* pre-mRNA. *Cell*, 74, 105-114.

Umeda, M., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. (1991). Diversification of the rice *Waxy* gene by insertion of mobile DNA elements into introns. *Jpn. J. Genet.*, 66, 569-586.

van Hoof, A. and Green, P. J. (1996). Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. *Plant J.*, 10, 415-424

Wang, J., and Manley, J. L. (1995). Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways. *RNA*, 1, 335-346.

Wang, Z. Y., Zheng, F. Q., Shen, G. Z., Gao, J. P., Snustad, D. P., Li, M. G., Zhang, J. L., and Hong, M. M. (1995). The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *waxy* gene. *Plant J.*, 7, 613-622.

Watakabe, A., Tanaka, K., and Shimura, Y. (1993). The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.*, 7, 407-418.

Wu, J. Y., and Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*, 75, 1061-1070.

Xiao, S. H., and Manley, J. L. (1998). Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.*, 17, 6359-6367.

Yano, M., Okuno, K., Satoh, H., and Omura, T. (1988). Chromosomal location of gene conditioning low amylose content of endosperm starches in rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, 76, 183-189.

Zahler, A. M., Neugebauer, K. M., Lane, W. S., and Roth, M. B. (1993). Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science*, 260, 219-222.

Zahler, A. M., and Roth, M. B. (1995). Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 2642-2646.

Zuo, P., and Manley, J. L. (1993). Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.*, 12, 4727-4737.