

博士論文番号：9981040

RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーに属する
イネ *OsRAD* 遺伝子の解析

森藤 暁

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17年1月6日提出

要旨

本研究では、イネ(*Oryza sativa L.*)新規 RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーメンバーである *OsGEN-L* (*OsGEN-like*)を単離し、解析を行った。*OsGEN-L*は、N-regionと I-region という RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーに保存されているヌクレアーゼドメインを持っている。データベースサーチや系統樹より、*OsGEN-L*は class 4 の RAD2/XPGヌクレアーゼファミリー属しており、*OsGEN-L*ホモログは動物および高等植物に存在しているが、個体レベルでの機能解析は行われていない。そこで、私は、*OsGEN-L*の機能解析を目的として、RNAiコンストラクトを導入した *OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制形質転換イネの作製や組換え *OsGEN-L* タンパク質の活性測定などの解析を行なった。*OsGEN-L* 遺伝子の発現が抑制されたイネは、小孢子初期の生育異常により、雄性不稔になった。GFP融合 *OsGEN-L* タンパク質は核に局在し、*OsGEN-L* プロモーター活性は、葯特異的であった。組換え *OsGEN-L* タンパク質は、flap エンドヌクレアーゼ活性と 1 本鎖および 2 本鎖 DNA 結合活性を持っていた。以上の結果から、*OsGEN-L* 遺伝子は、イネの小孢子の初期生育に重要な機能を持ち、小孢子生育に必要な何らかの核 DNA 代謝に関与している可能性が示唆された。

目次

序論

材料と方法

結果

1. *OsGEN-L* 遺伝子の単離
2. *OsGEN-L-RNAi* 発現抑制形質転換体の作製と解析
3. *OsGEN-L* 遺伝子の発現解析
4. *OsGEN-L-GFP* 融合タンパク質の細胞内局在の解析
5. 組換え *OsGEN-L* タンパク質の活性測定

考察

1. *OsGEN-L* はイネ新規 RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーメンバーである
2. イネの小孢子初期生育における *OsGEN-L* 遺伝子の役割
3. *OsGEN-L* タンパク質の生化学的機能

謝辞

参考文献

序論

ヌクレアーゼは核酸代謝に必須の酵素であり、遺伝情報の維持や伝達、細胞機能に重要な役割を果たしている(Mishra 2002)。RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーは、真核生物で確立された最初のヌクレアーゼファミリーであり、真核生物に広く保存された構造特異的ヌクレアーゼである(Lieber 1997)。RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーは、N-region と I-region と呼ばれる2つのドメインを持っている(Lieber 1997, Szankasi and Smith 1995)。これまで、主に酵母や哺乳類による解析から、RAD2/XPG (class 1)、FEN1/RAD27 (class 2)、EXO 1(class 3)の3つのサブファミリーの機能解析が報告されている(Harrington and Lieber 1994b, Madura et al. 1986, Murray et al. 1994, Nicolet et al. 1985, Reagan et al. 1995, Scherly et al. 1993, Szankasi and Smith 1995)。これら3つのサブファミリーは主にDNA修復、DNA複製、遺伝的組換えに機能するヌクレアーゼであることが報告されている(Lieber 1997)。また、最近、OsSEND-1 (class 4)、DmGEN (class 5)というRAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーの新規メンバーの単離が報告されている(Furukawa et al. 2003, Ishikawa et al. 2004)。

RAD2/XPG (class 1)は、ヌクレオチド除去修復に機能するヌクレアーゼである(Clarkson 2003)。チミンダイマーなどのDNA傷害がヌクレオチド除去修復経路により修復される過程で、DNA傷害を持つ鎖の3'側にニックを入れる構造特異的ヌクレアーゼである(O'Donovan et al. 1994)。ヌクレオチド除去修復能の欠陥により紫外線に感受性を示し、皮膚ガン等が多発するヒトの遺伝病として知られる色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum)の原因遺伝子(*xpg*)の1つであり、*xpg*の一部の患者はコケイン症候群(Cockayne's syndrome)と呼ばれる早老症、精神遅延などの症状も併発することが知られている。*XPG* ノックアウトマウスは、出生後に生育が悪く、早期に死ぬというヒトのコケイン症候群と類似の表現型を示す(Harada et al. 1999)。マウスにおける解析により *XPG* の構造特異的ヌクレアーゼとしての機能は、ヌクレオチド除去修復においてのみ必要であり(Tian et al. 2004)、コケイン症候群の発症には、ヌクレアーゼに機能とは独立した *XPG* のC末端領域の重要性がヒトやマウスにおける解析から示唆されている(Nouspikel et al. 1997, Shiomi et al. 2004)。色素性乾皮症の原因がヌクレオチド除去修復の欠陥であるのに対し、*XPG* が関与するコケイン症候群の発症の分子機構はまだ解明されていない。最近、出芽酵母の *XPG* のカウンターパートで

ある *RAD2* は、RNA ポリメラーゼ II の効率的な転写を促進する働きを持つことが報告され、転写における欠陥がコケイン症候群の原因ではないかと考えられている(Lee et al. 2002)。出芽酵母においては、*RAD2* 遺伝子のヒトのコケイン症候群と相同な C 末端欠損変異により、一部の遺伝子群の転写が弱められることなどから、*RAD2* のヌクレアーゼの機能とは独立した C 末端の機能が転写に重要であることが示唆されている(Lee et al. 2002)。

FEN1/RAD27 (class 2) は、DNA 複製時のラギング鎖における岡崎フラグメントのプロセッシングや、塩基除去修復やゲノム安定性の維持などに機能していることが報告されている(Henneke et al. 2003, Liu et al. 2004)。*FEN1* は DNA 代謝の様々な局面で重要な構造と考えられている flap 構造を基質とする活性をもつことから同定された(Harrington and Lieber 1994a, Harrington and Lieber 1994b, Lieber 1997)。出芽酵母の相同遺伝子 *RAD27* の破壊株は、ゲノム損傷に対して感受性が高く、高温において致死になり、突然変異発生率の上昇や、トリヌクレオチドリピート配列の長さが増幅するなど、DNA 複製や DNA 修復の欠損により様々な表現型がみられる(Freudenreich et al. 1998, Reagan et al. 1995)。*FEN1* のノックアウトマウスは、胚性致死であり、ヘテロ接合状態でガンの出現が早まることが観察されている(Kucherlapati et al. 2002, Larsen et al. 2003)。これらの DNA 複製や DNA 修復以外の機能として、線虫では、*FEN1* ホモログの *CRN-1* は、通常の生きている細胞における機能以外にも、死にゆく細胞でのアポトーシス時の DNA 分解に機能するヌクレアーゼであることも報告されている(Parrish et al. 2003)。

EXO1 は、分裂酵母の減数分裂時に誘導されるエキソヌクレアーゼとして同定された(Szankasi and Smith 1992, Szankasi and Smith 1995)。*EXO1* はミスマッチ修復や遺伝的組み換えなどに機能している(Fiorentini et al. 1997, Szankasi and Smith 1995, Tishkoff et al. 1997, Tran et al. 2001)。*EXO1* のノックアウトマウスは、減数分裂の異常により、雄、雌ともに不妊になり、ガンにかかりやすくなるなど(Wei et al. 2003)、また、免疫系の体細胞の hypermutation やクラススイッチリコンビネーションの欠陥が報告されている(Bardwell et al. 2004)。

OsSEND-1 (class 4)と *DmGEN* (class 5)は、ヌクレアーゼドメインである N-region、I-region を持つ新規 *RAD2/XPG* ヌクレアーゼファミリーとして単離された(Furukawa et al. 2003, Ishikawa et al. 2004)。組換えタンパク質の解析により、*OsSEND-1* は1本鎖DNAに対するエンドヌクレアーゼ活性をもち(Furukawa et al.

2003)、DmGEN は、エンドエキソヌクレアーゼ活性を 1 本鎖 DNA、2 本鎖 DNA、2 本鎖ギャップ DNA、2 本鎖ニック DNA に対して持っていることが報告されている(Ishikawa et al. 2004)。

植物においても、RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーの各サブファミリーは保存されており、いくつかのメンバーについては既に報告されている。イネにおいては、2つの FEN1 ホモログが報告されている(Kimura et al. 2000, Kimura et al. 2003)。OsFEN-1a は他の真核生物の FEN1 ホモログと同様の酵素活性を持ち(Kimura et al. 2000)、出芽酵母の *rad27* 破壊株を相補できる(Kimura et al. 2003)。また、イネ OsFEN-1a 抗体を用いて、タバコ BY-2 細胞とユリ減数分裂期の細胞における植物の FEN1 タンパク質の細胞内局在の挙動が調べられている(Kimura et al. 2001)。最近単離された RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリー class 4 メンバーである *OsSEND-1* は、メリステムなどの細胞増殖のさかんな組織において発現が認められ、UV や MMS など DNA ダメージを与える試薬により発現が誘導されることが報告されている(Furukawa et al. 2003)。しかしながら、これらのイネの RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーメンバーの個体レベルにおける生物学的機能については報告されていない。シロイヌナズナにおいては、UV 感受性突然変異体である *uvh3* の原因遺伝子が RAD2/XPG ホモログであることが報告されている(Liu et al. 2001)。*uvh3* は、6-4 UV-photoproduct の修復能が低下していることが報告されている *uvr1* のアレルであることから(Britt et al. 1993, Liu et al. 2001)、植物の RAD2/XPG ホモログも酵母からヒトまで真核生物全般に保存されている共通の機能を持っていることが示唆される。

多くの植物の雄性不稔突然変異体は、劣性 1 遺伝子座により支配されていることが報告されている。雄性不稔突然変異体は、孢子体側の細胞、タペート細胞、花粉母細胞、小孢子、花粉などの各発生段階に欠陥を示し、減数分裂前、減数分裂期、減数分裂後などの葯や花粉発生の様々な段階において異常が見られる(Singh 2003, Twell 2002)。かなりの数の雄性不稔遺伝子は、減数分裂後のステージ、特に四分子期の直後に作用していることが知られている(Singh 2003)。核相 n の小孢子の周りを取り囲んでいる核相 $2n$ のタペート組織は、発達過程の小孢子に栄養を供給することにより、小孢子の発育に重要な役割を果たしていることが知られている(Shivanna 2003, Twell 2002)。この複相 $2n$ の孢子体側の細胞(sporophytic cell)と単相 n の配偶体側の細胞(gametophytic cell)の間の細胞間コミュニケーションは、植物の葯や花粉の発生すなわち雄性配偶体の形成にと

って非常に重要である。最近、Wang et al. (2003)により、RAFTIN というタペー
ト細胞で mRNA が発現している構造タンパク質は、タンパク質自身は小孢子へ
と輸送され、花粉の発生に必須であることが、RNAi 法を用いたイネ発現抑制
形質転換体の作製により示されている。RAFTIN の発現抑制により、ほとんど
種子が形成されない雄性不稔になることが報告されている(Wang et al. 2003)。し
かしながら、植物の小孢子発生の分子機構については、現在のところほとんど
分かっていない。

我々の研究室では、以前トウモロコシのトランスポゾン Ac をイネに導入し
たトランスポゾンタギング系統の Ac 隣接配列の解析から、RAD2/XPG のヌク
レアーゼドメインと相同性を示す配列を発見し(川原 1999, Enoki et al. 1999)、
*OsGEN-L (OsGEN-like)*と命名した。配列解析より、OsGEN-L は、RAD2/XPG ヌ
クレアーゼファミリーの新規サブクラスに属することが明らかになった。しか
しながら、他生物種にも存在する *OsGEN-L* サブクラスの個体レベルでの生物
学的機能については報告されていない。そこで、私は、*OsGEN-L* 遺伝子の個体
レベルでの生物学的機能について明らかにすることを目的として、RNAi コン
ストラクトを導入した、*OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制形質転換体イネ(*OsGEN-L*-
RNAi 植物体)を作製した。作製した *OsGEN-L*-RNAi 植物体は、小孢子生育の初
期過程の異常により、雄性不稔になることが分かった。*OsGEN-L* 遺伝子のプロ
モーター活性は葯特異的であることがわかった。組換え *OsGEN-L* タンパク質
の生化学的な解析により、*OsGEN-L* タンパク質は flap エンドヌクレアーゼ活性
と 1 本鎖および 2 本鎖 DNA 結合活性を持つことがわかった。以上の結果から、
OsGEN-L は、イネの小孢子生育に必要な DNA 代謝過程に重要な役割を果たし
ていることが示唆された。

材料と方法

植物材料と生育条件

野生型としてイネ品種とりで 1 号を用いた。形質転換植物体はすべてアグロバクテリウム法により、種子由来のカルスに感染させる定法 Hiei et al. (1994). に従って作製した。ハイグロマイシン耐性のカルスを選抜し、植物体へと再生させた。形質転換体およびそのコントロールとなる野生型植物体は、日中 28 °C 夜間 23 °C に保たれた閉鎖系温室で生育させた。日長条件は、補光を行うことにより、ほぼ 1 年中、明期 14 時間以上の長日条件に保たれている。RT-PCR による発現解析に用いた野生型の植物体は、奈良県生駒市の奈良先端科学技術大学院大学内の敷地で育てたものまたは、30 °C の 恒温恒明室内において MS 寒天培地上で滅菌状態で生育させたものを用いた。

OsGEN-L 遺伝子の単離

イネ cDNA ライブラリーは、東北大学の山谷智行博士より分与していただいたとりで 1 号の根由来のものを用いた。イネゲノム DNA ライブラリーは、 λ BlueSTAR Vector System (Novagen) により作製されたものを用いた。これらのライブラリースクリーニング用のプローブには、*OsGEN-L* 遺伝子の *Ac* 挿入系統のゲノム DNA を鋳型として *Ac5(0)* (5'-CCCATCCTACTTTCATCCCTG-3') と *RAD2-1* (5'-CCAACAAGAAGTGCCATTGCTACC-3') (Enoki et al. 1999) プライマーにより増幅させた DNA を用いた。単離された *OsGEN-L* 遺伝子のゲノム DNA クローンは Kilo-Sequence Deletion Kit (TaKaRa) を用いて塩基配列を決定した。以上の *OsGEN-L* 遺伝子の単離はすべて植物分子遺伝学講座卒業生の川原美保子さんによって行われた(川原 1999)。 *OsGEN-L* 遺伝子の cDNA とゲノム DNA 配列は、EMBL/GenBank/DDBJ にそれぞれ、アクセッションナンバー AB158320 と AB194139 で登録した。

シーケンス解析

DNA の塩基配列決定には、ABI Prism 373、310、3100 sequencer (Applied Biosystems) のいずれかにより行った。得られた配列情報の解析は、GeneWorks software version 2.5.1 (Intelligenetics) を使って行った。系統樹の作製のために、予測アミノ酸配列を、NCBI conserved domain search database (CDD v2.01,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)に入力し、XPG-I ドメイン (smart00484)を同定した。系統樹については CLUSTALW を用いて、RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーの XPG-I ドメインを用いた系統樹を作製した。

コンストラクトの作製

OsGEN-L-RNAi

OsGEN-L cDNA より 683 bp の断片を RNAi トリガー領域として、RAD2-31 (5'-ATTATATGAAATTGGTAAAG-3') と RAD2-32 (5'-ATTCTGTCTGCTTGCTAGGT-3')プライマーを用いて増幅し pGEM-T (Promega) にサブクローニングした。このコンストラクト *OsGEN-L* i pGEM-T は、シーケンスにより配列を確認した。*OsGEN-L* i pGEM-T より RNAi トリガー領域を *SacII-SpeI*、*Sall-ApaI* で切り出し、pGUS27 vector の *gus* linker 領域の両端に 683 bp の *OsGEN-L* cDNA の RNAi トリガー領域が、逆向き反復になるように挿入した。最後に、このコンストラクトの *SacI-KpnI* 断片を トウモロコシの *Ubq1* promoter と *nos* terminator を持つ p2K-1+ バイナリーベクターに挿入した。pGUS27 vector と p2K-1+ バイナリーベクターは、現東京大学の経塚淳子博士らにより作製され、Miki and Shimamoto (2004)に述べられている。

OsGEN-L promoter:gus

OsGEN-L 遺伝子の約 1.4 kb の上流配列を Syngenta BAC clone CL034874.88, の配列情報に基づき、日本晴ゲノム DNA をテンプレートとして、*XbaI* と *BamHI* 制限酵素サイトを付加した RAD2-51 (5'-GCTCTAGACCACAGCTCATTACCACACATCTG-3') と RAD2-50 (5'-CGGGATCCCTCTCTTCTTCCCCGGCGAC-3') プライマー (下線部は制限酵素認識配列) により増幅し、*gus* 遺伝子のバイナリーベクター(Yokoi et al. 1997)に挿入した。

OsGEN-L-sGFP

島根大学の中川強博士より供与していただいた pGWB5 バイナリーベクターの 35S promoter と GFP 融合用の Gateway cassette (Invitrogen)を持つ *HindIII-SacI* 断片を pUC12 ヘクローニングした。これを 35S-*attR*-sGFP と表記する。RAD2-56 (5'-CACCATGGGGGTGGGGGGAAGCTT-3') と RAD2-57 (5'-

GCCCAAGCACGCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGATC-3') のオリゴヌクレオチドを用いた。すべてのシグナルは、BAS-2500 Bioimaging analyzer (Fuji)により検出した。これらの実験は植物分子遺伝学講座の三木大介博士に行っていた。

組織学的解析

切片の作製

若い穂や穎花を2%グルタルアルデヒド、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4 中で4°C一晩置くことにより固定した。エタノールシリーズで脱水した後、Technovit 7100 resin (Heraeus Kuzer)に包埋し、ULTRACUT UCT ウルトラミクロトーム (Leica)で1 μm の切片を作製した。切片はトルイジンブルーOで染色し、BX50 (Olympus)で観察した。イネの葯のヨウ素染色は、Terada et al. (2000)に従って行い、暗視野照明のもと Axioskop (Zeiss) で観察した。

減数分裂、小孢子の観察

エタノール：酢酸 (3 : 1) 溶液で穂や穎花ごと固定し、4°Cで保存した。固定した葯の四分子や減数分裂細胞を 10 mg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で染色し、Vectorshield (Vector Laboratories)を使ってスライドガラスにマウントし、顕微鏡で観察した。小孢子は、acetocarmine solution (Wako Pure Chemical)で染色し、顕微鏡で観察した。

GUS 染色

植物体を染色液(100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.1 % Triton X-100)に浸し、ポンプで真空状態にして、合計 15 分間脱気を行ったあと、最終濃度 0.4 mM になるように X-Gluc を加えた。染色反応は37°Cで48時間行い、固定液 50 % ethanol, 5 % acetic acid, and 3.7 % formaldehyde で固定した後、4°Cで保存した。GUS 染色後の穎花の透明化処理は、trichloroacetaldehyde monohydrate : glycerol : water solution (8 g : 1 ml : 2 ml)で行い、実体顕微鏡 SZX7(Olympus)や透明化処理を行わず実体顕微鏡 SZH10 (Olympus)で観察を行った。切片作製のため、固定後のサンプルを Technovit 7100 resin (Heraeus Kuzer) に包埋し、ULTRACUT UCT ウ

ルトラミクロトーム (Leica)で 5 μm の切片を作製し暗視野照明のもと顕微鏡で観察した。すべての写真は DXM1200 microscopic digital camera (Nikon)で撮影した。

RT-PCR とリアルタイム RT-PCR

トータル RNA の単離は、Kawasaki et al. 1996 の方法に従って行った。RNase-free DNase I Amplification Grade (Invitrogen)で処理した RNA 1 μg を Random 9-mer Primer (TaKaRa) と RAV2 reverse transcriptase (TaKaRa)を用いて、逆転写反応を行い cDNA を合成した。合成した cDNA のうち、20 %を PCR 反応に用いた。*OsGEN-L* 遺伝子については、RAD2-21 (5'-CGCGAAATGGCTTCATCTCA-3')と RAD2-11 (5'-CGCAATGTACATCCATTGGCCGA-3')プライマーで、*Actin* 遺伝子については ActF (5'-TGGGTTCGCCGGAGATGAT-3') と ActR (5'-CTTGGGTACGACCACTGGC-3')で 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min のあと、94 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec, / 58 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec, / 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min を *OsGEN-L* 遺伝子については 28 サイクル、*Actin* 遺伝子については 23 サイクルの PCR 反応を行った。

OsGEN-L-RNAi コンストラクトの特異性について調べるための RT-PCR については、トータル RNA を RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使って単離した。RNase-free DNase I Amplification Grade で処理した RNA の 1-2 μg を oligo-dT プライマーと SuperScript II (Invitrogen)を用いて、逆転写反応を行い cDNA を合成した。合成した cDNA のうち、1.25 – 2.5 %を様々な遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 反応を行った。使用したプライマーは次の通りである。

OsGEN-L

RAD2-21 (5'-CGCGAAATGGCTTCATCTCA-3')

RAD2-11 (5'-CGCAATGTACATCCATTGGCCGA-3'),

Ubiquitin

UBQ-F (5'-CCAGGACAAGATGATCTGCC-3')

UBQ-R (5'-AAGAAGCTGAAGCATCCAGC-3')

OsXPG

OsXPG-1 (5'-CCTCCATCAATGCAGTTGG-3')

OsXPG-2 (5'-GATGAAGAGAACTCCGCAGC-3')

OsFEN-1a

OsFEN1a-1 (5'-GAAGCAGAAGCAGAATGTGC-3')

OsFEN1a-2 (5'-AAGAAGGATTCGAGCCTTCC-3')

OsFEN-1b

OsFEN1b-1 (5'-TTCCAGACTTCCTGTGGACC-3')

OsFEN1b-2 (5'-TCACCGTTCAACACTCAAGC-3')

OsEXO1

OsEXO1-5 (5'-CACACAACACAGAGCCATCC-3')

OsEXO1-6 (5'-TCAGCGCAGCAAACCTTATCC-3')

OsSEND-1

OsSEND1-1 (5'-ATTGCTGAGAGAGAACTTCGG-3')

OsSEND1-2 (5'-TACCAGCCACATTGACATCC-3')

gene 1

AK071791-1 (5'-CGATGAGAGCAGCAAGAAGC-3')

AK071791-2 (5'-CAATCCAATGCACGATTGG-3')

gene 2

AK107043-1 (5'-CGATGAGAGCAGCAAGAAGC-3')

AK107043-2 (5'-CAATCCAATGCACGATTGG-3')

gene 3

AK111811-1 (5'-TGTGACATTGCTTCTGGAGC-3')

AK111811-2 (5'-GCACAACACTAGAGTGGAAGGC-3')

gene 4

Pulipase-1 (5'-GACATTCACATATGAATCAC-3')

Pulipase-2 (5'-CATCCAACGAGGAAGACGTG-3')

PCR 条件については、94 °C 2 min のあと、94 °C, 30 sec, / 55 °C, 30 sec, / 72 °C, 1 min を *Ubiquitin* は 24 サイクル、*OsFEN-1a*、*OsFEN-1b* は 27 サイクル、*OsGEN-L*、*OsXPG*、gene 3 は 28 サイクル、*OsSEND-1* と *OsEXO1* は 32 サイクル、gene 4 は 34 サイクル、gene 1 と gene 2 は 37 サイクル行った。

リアルタイム PCR については、SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) と ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて、使用書通りに操作した。トータル RNA は RNeasy Plant Mini Kit を使って単離した。DNase I 処理した RNA を、Random 9-mer Primer と SuperScript II で逆転写して、cDNA を合成した。合成した cDNA のうち、5 % を PCR 反応に用いた。 *OsGEN-L* 遺伝子については、RAD2-real-F (5'-CGGAGGCCAGTGCGG-3') と RAD2-real-R (5'-CTCCACGTATCGCGTGAACCTT-3')

GTCGAAGAGGAGGCGTCGTC-3')プライマーで増幅した *OsGEN-L* ORF 断片を pENTR/D-TOPO (Invitrogen)にクローニングし、配列の正しいクローンを LR Clonase (Invitrogen) の説明書に従って 35S-*attR*-sGFP へ挿入した。これを p35S-*OsGEN-L*-sGFP と表記する。コントロール用の p35S-GFP vector は Miki and Shimamoto (2004)に述べられているものから、イントロン配列を *Bam*HI 制限酵素切断により切り出し、平滑末端ライゲーションにより連結したものをを用いた。

OsGEN-L-pET30b

*Nco*I と *Xho*I の制限酵素サイトを含んだ RAD2-47 (5'-CCATGGGGGTGGGGGAAGC-3') and RAD2-48 (5'-CTCGAGGTCGAAGAGGAGGCGTCG-3') プライマー (下線部は制限酵素認識配列) により *OsGEN-L* cDNA クローンから *OsGEN-L* コーディング断片を増幅した。そして、増幅した *OsGEN-L* 断片を pGEM-T (Promega) にクローニングし、シーケンスの正しいクローンを *Nco*I と *Xho*I で切り出し pET30b vector (Novagen)へ挿入した。

ノーザン解析および siRNA の検出

ノーザン解析および siRNA の検出は、Miki and Shimamoto (2004)および三木 (2004)に述べられている通りに行なった。*OsGEN-L* mRNA のノーザン解析については、20 μg トータル RNA を電気泳動後 Hybond N+ nylon membrane (Amersham Biosciences) へ転写し、RAD2-11 (5'-CGCAATGTACATCCATTGGCCGA-3') と RAD2-40 (5'-GCTAGTGAATGCTGCATTTCC-3')プライマーで増幅した *OsGEN-L* cDNA 末端の ³²P ラベルプローブで定法(Sambrook and Russell 2001)に従ってハイブリダイゼーションを行った。siRNA の検出は、Hamilton and Baulcombe (1999)に従って行った。プローブは RAD2-31 (5'-ATTATATGAAATTGGTAAAG-3') と RAD2-32 (5'-ATTCTGTCTGCTTGCTAGGT-3')で増幅した DNA を ³²P-dCTP でラベルしたものをを用いた。コントロールの 5S rRNA の検出には、³²P-dCTP でラベルした 89-mer の sense (5'-GATCCCATCAGAACTCCGAAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCTGGGAAGTCCTCGTGTTGCATCCC-3') と antisense (5'-GGGATGCAACACGAGGACTTCCCAGGAGGTCACCCATCCTAGTACTACTCTC

をプライマーとして用いた。Ubiquitin 遺伝子については、real-ubq-F (5'-AACCAGCTGAGGCCCAAGA-3') と real-ubq-R (5'-ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA-3')をプライマーとして用いた。これらのリアルタイム用のプライマー及び、検量線用のプラスミドは植物分子遺伝学講座の三木大介博士に作製していただいたものを使用した。

タマネギ表皮細胞への GFP 融合 OsGEN-L タンパク質の一過的発現

タマネギ表皮細胞への一過的発現には、PDS/He biolistic particle delivery system (Bio-Rad)によるボンバードメント法により行った。コントロールの p35S-GFP プラスミドは 6 µg、p35S- OsGEN-L-sGFP プラスミドは 15 µg を金粒子に吸着させ、打ち込んだ。プラスミド DNA の単離は、Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)を使用した。30 °Cの恒明室で一晩培養後、タマネギの表皮を LSM510 confocal laser scanning microscope (Zeiss)で観察した。

組換え OsGEN-L タンパク質の発現と精製

特に記さない限り、すべての操作は、0-4 °Cで行った。OsRAD-pET30b プラスミド DNA を持った大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene)の細胞を 50 mg/ml カナマイシンと 34 mg/ml クロラムフェニコールの入った LB 培地中で 16 °Cで培養した。吸光度 600 nm が約 0.7 になった段階で、最終濃度 1 mM IPTG を加え、16 °C4 時間培養し、OsGEN-L タンパク質の発現を誘導した。遠心して集菌した 4 g の細胞を 20 ml の buffer A (50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 0.5 M NaCl, 10 mM mercaptoethanol)に懸濁し、超音波破碎を行った。破碎した細胞液に終濃度 0.04 %になるよう Nonidet P-40 を加え、氷上で 20 min 放置した。12,000 x g で 15 min の遠心と 100,000 x g で 10 min の超遠心を行い上清を単離した。イミダゾールを終濃度 80 mM になるように加え、80 mM イミダゾールの入った buffer B (20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 0.5 M NaCl, 0.04 % Nonidet P-40, 1 mM mercaptoethanol)で平衡化した Ni²⁺がチャージされた 1-ml HiTrap chelating column (Amersham Biosciences)にのせた。カラムに結合したタンパク質を 80 mM イミダゾールの入った buffer B で溶出した。溶出画分を集め、buffer C (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.3 M NaCl, 10 % glycerol, 0.04 % Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol (DTT))で透析した。透析したうちの半分 (1.8 mg のタンパク質) を 0.3 M NaCl の入った buffer D (20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 10 % glycerol, 0.04 % Nonidet P-40, 1

mM DTT)で平衡化した 1-ml Hitrap Heparin column (Amersham Biosciences)にのせ、0.3 M NaCl の入った buffer D 10 ml で洗い、0.3-1.0 M NaCl の入った buffer D のリニアグラジエントで溶出した。溶出画分を集め、0.2 M NaCl の入った buffer E (40 mM Tricine-HCl (pH 8.8), 10 % glycerol, 0.04 % Nonidet P-40, 1 mM DTT)で透析した。透析後の全量(1 mg のタンパク質)を 0.2 M NaCl の入った buffer E で平衡化した Mono Q HR5/5 column (Amersham Biosciences)にのせ、5 ml の 0.2 M NaCl の入った buffer E で洗った後、0.2-1.0 M NaCl 入りの buffer E のリニアグラジエントで溶出した。目的のタンパク質の入った画分を集め、0.2 M NaCl の入った buffer F (40 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 % glycerol, 0.04 % Nonidet P-40, 1 mM DTT)で透析し、0.2 mg の精製 OsGEN-L タンパク質を分注し、液体窒素で凍らせた後、 -80°C で保存した。

ヌクレアーゼ活性と DNA 結合活性の測定

flap エンドヌクレアーゼ活性の測定は Kimura et al. (2000)に従って行い、バブル構造の切断活性については、O'Donovan et al. (1994)に従って行った。基質として 5' ラベルしたオリゴヌクレオチドを用いた場合には、40 % formamide で反応を停止させ、15 % のシークエンスゲルで泳動を行い、BAS-2500 Bioimaging analyzer により解析を行った。2 本鎖プラスミド DNA を基質とした場合には、20 mM MOPS (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM DTT の組成で 100 ng の 2 本鎖プラスミド DNA の入った反応液 20 μl 中で 30°C 2 h の反応を行い、半分の 10 μl は、2 μl の反応停止液 (0.05 % bromophenol blue, 0.05 % xylene cyanol, 30 % glycerol, 60 mM EDTA)で反応を止め、残りの半分の 10 μl は、終濃度 6 % の SDS の入った 2 μl の反応停止液で反応を止めた。0.8 % agarose gel を用い室温で $1\times\text{TAE}$ (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) 中で電気泳動を行い、DNA を ethidium bromide で染色後、UV により検出した。

DNA セルロースレジンは、SIGMA より購入した。DNA セルロースレジンは 0.1 M NaCl の入った buffer F で洗浄し使用した。20 μl のレジンと 40 μl OsGEN-L タンパク質 (10 μg)を混合し、氷上で 30 min 放置した。400 x g で遠心し、20 μl の 0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, and 0.8 M NaCl 入り buffer F で連続的にレジンを洗浄した。おのおの上精中の OsGEN-L タンパク質は、8 % SDS-PAGE ゲルで分離し、Coomassie Brilliant Blue 染色で可視化した。

結果

1. *OsGEN-L* 遺伝子の単離

OsGEN-L 遺伝子は、トウモロコシのトランスポゾン *Ac* によるイネの遺伝子破壊系統の解析から同定された(川原 1999, Enoki et al. 1999)。植物分子遺伝学講座卒業生の川原により、全長の cDNA およびそれに対応するゲノム DNA 断片が単離され、塩基配列が決定された(川原 1999)。*OsGEN-L* 遺伝子は 8 エキソン、7 イントロンからなり(図 1A)、629 アミノ酸の RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーに属するタンパク質をコードしていることが予想された(図 1B)。現在までイネにおいて、*OsFEN-1a*, *OsFEN-1b*, *OsSEND-1* の 3 つの RAD2/XPGヌクレアーゼファミリー遺伝子が報告されている(Furukawa et al. 2003, Kimura et al. 2000, Kimura et al. 2003)。*OsGEN-L* 遺伝子は、これらとは異なる新規の配列であった。

サザン解析により、*OsGEN-L* 遺伝子はイネゲノムにおいてシングルコピーであることが示唆された(data not shown)。またデータベース解析により、*OsGEN-L* 遺伝子はシンジェンタ社の BAC クローン CL034874.88 と国際イネゲノムプロジェクトによる fosmid クローンの OSJNOA273B05 (accession number AP006859)内に存在していることがわかった。この fosmid クローンは RGP により、イネ第 9 染色体の 78.5 cM にマップされている(<http://rgp.dna.affrc.go.jp>)。イネ完全長 cDNA プロジェクトによっても我々の単離したものとほぼ同じイネ品種日本晴由来の cDNA (accession number AK063534)が登録されており、*OsGEN-L* 遺伝子の部分的な配列と一致するイネ品種 IR64 由来の EST (CA765363)もデータベースに登録されている。

RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーは、これまで RAD2/XPG (class 1)、FEN1/RAD27 (class 2)、EXO1 (class 3)、*OsSEND-1* (class 4)、*DmGEN* (class 5)の 5 つのサブファミリーが報告されている。図 1B には、既知の代表的な RAD2/XPGヌクレアーゼファミリーメンバーとの比較を模式図で示した。*OsGEN-L* の N-region はヒト XPG (class 1)、ヒト FEN1 (class 2)、ヒト EXO1 (class 3)、イネ *OsSEND-1* (class 4)、ショウジョウバエ *DmGEN* (class 5)とそれぞれ、32%、30%、23%、30%、40%のアミノ酸レベルでの相同性をもつ(図 1B)。また、*OsGEN-L* の I-region はヒト XPG (class 1)、ヒト FEN1 (class 2)、ヒト EXO1 (class 3)、イネ *OsSEND-1* (class 4)、ショウジョウバエ *DmGEN* (class 5)とそれぞれ、32%、32%、22%、37%、27%のアミノ酸レベルでの相同性をもつ(図 1B)。構造特異

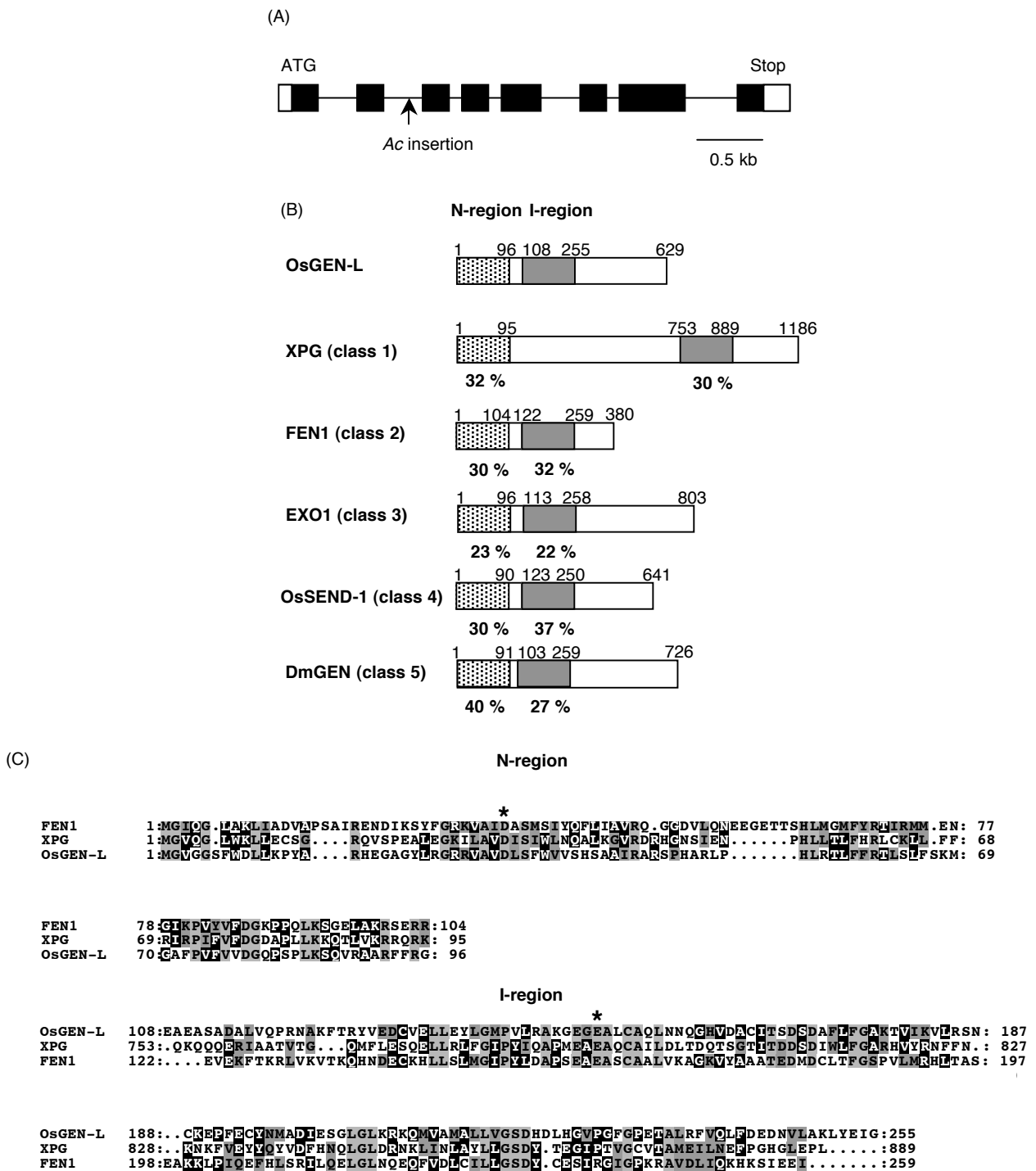


図1 イネ*OsGEN-L*遺伝子のクローニング

(A) イネ*OsGEN-L*遺伝子の構造。矢印はAc挿入系統におけるAc挿入部位を示す。(B) *OsGEN-L*と代表的なRAD2/XPGヌクレアーゼファミリーメンバーとのヌクレアーゼドメイン比較。*OsGEN-L*と各クラスのRAD2/XPGヌクレアーゼファミリーメンバーのヌクレアーゼドメインN-regionとI-regionにおけるアミノ酸配列の一致を%で示す。XPG、FEN1、EXO1はヒト、*OsSEND-1*はイネ、*DmGEN*はショウジョウバエのものである。(C) *OsGEN-L*のN-regionとI-regionのアミノ酸とヒトXPG、FEN1のN-regionとI-regionのアミノ酸のアライメント。星印は、ヒトXPG、FEN1の構造特異的ヌクレアーゼ活性に必須のアミノ酸が*OsGEN-L*にも保存されていることを示す。

的ヌクレアーゼとしての生化学的性質がよく調べられているヒト XPG とヒト FEN1 と OsGEN-L の N-region と I-region のアミノ酸配列の比較を図 1C に示した。ヒト XPG とヒト FEN1 の構造特異的ヌクレアーゼ活性に必須のアミノ酸 (Constantinou et al. 1999, Shen et al. 1997) が OsGEN-L にも保存されていることから(図 1C の星印)、OsGEN-L も RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーメンバーとして構造特異的ヌクレアーゼ活性をもつ可能性が示唆される。

データベースサーチにより、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、シロイヌナズナなどゲノム解読の終わった様々な生物種においても、*OsGEN-L* ホモログが存在していることがわかった。完全長 cDNA が、ヒト(accession number NM_182625)、マウス(NM_177331)、ショウジョウバエ(NM_139686)、ニワトリ(XM_419963)、ホヤ(AK116543)などに存在している。ショウジョウバエの完全長 cDNA は、ごく最近報告された *DmGEN* (class 5) (Ishikawa et al. 2004) と同じアミノ酸配列をコードしているものである。また、シロイヌナズナ(*Atlg01880*, NM_100069)、ラット(XM_233966)の *OsGEN-L* ホモログも、ゲノム配列からの予測により存在が示唆される。しかしながら、これまでこれらの他生物種の *OsGEN-L* ホモログについては、*DmGEN* の組換えタンパク質の生化学的解析のみであり(Ishikawa et al. 2004)、個体レベルでの機能解析の報告は現在のところない。NCBI conserved domain database (CDD v2.01)を用いた検索により、*OsGEN-L* の I-region は、さらに2つに分割され、XPG-I (smart00484)と HhH class2 (cd00080)ドメインに分けられることがわかった(図 2A)。*OsGEN-L* とヒトとシロイヌナズナホモログの比較をおこなったところ、XPG-I ドメインは、それぞれ、51%、64%のアミノ酸の相同性がある(図 2A)。この XPG-I ドメインは、RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリー全般に保存されている。N-region、I-region 以外にも *OsGEN-L* とヒトホモログの間には、弱く相同性を示す領域(weakly conserved region)が存在している(図 2B)。イネの中では *OsGEN-L* の XPG-I ドメインは、*OsSEND-1* の XPG-I ドメインと 46%の相同性で最も高い。

配列解析および系統樹の作製により、*OsGEN-L* は *OsSEND-1* とともに class 4 のサブファミリーを形成することがわかった(図 2C)。class 5 と報告されている *DmGEN* は、XPG-I ドメインが不完全なため、この系統樹解析に含めることはできなかったが、XPG-N ドメインを用いた系統樹解析では、*OsGEN-L* や *OsSEND-1* と同様に class 4 に含まれることがわかった(dats not shown)。興味深いことに、*OsGEN-L* のホモログは、出芽酵母、分裂酵母、線虫には存在してい

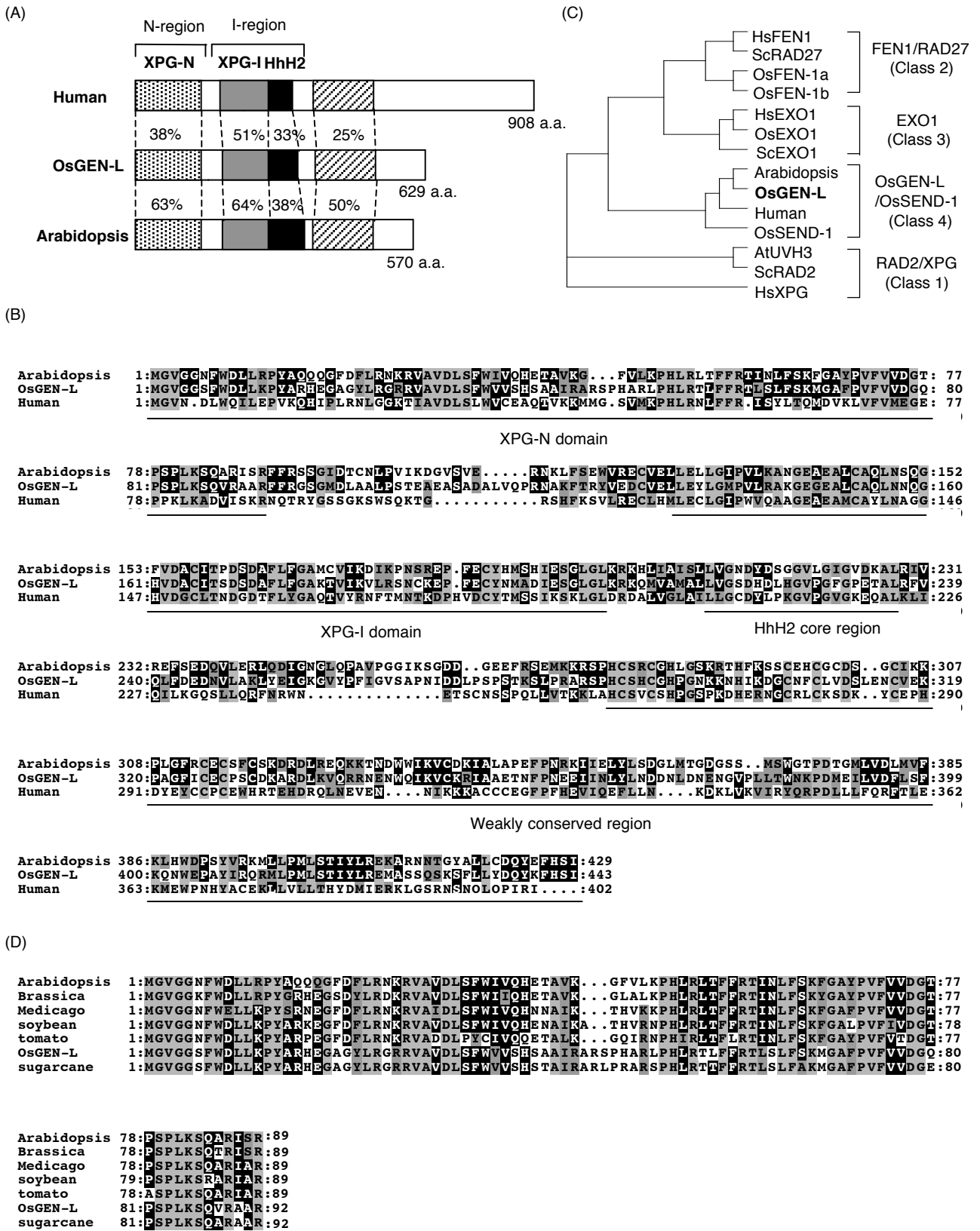


図2 OsGEN-Lとそのホモログ

(A) OsGEN-Lとヒトおよびシロイヌナズナホモログを比較した模式図。(B) OsGEN-Lとヒトおよびシロイヌナズナホモログのアミノ酸配列のアライメント。(C) OsGEN-LとRAD2/XPGヌクレアーゼファミリーメンバーの系統樹。各メンバーのXPG-Iドメインの配列を用い、CLUSTALWにより系統樹を作製した。OsEXO1は、イネゲノム配列より予測されている配列(NM_191476)を用いた。(D) OsGEN-Lと植物ホモログのXPG-Nドメインのアミノ酸配列のアライメント。

ない。

高等植物にはシロイヌナズナ以外にも sugarcane (*Saccharum officinarum*) (accession number CF569989)、大豆 (*Glycine max*) (BU926894)、*Brassica napus* (CD837439)、*Medicago truncatula* (AW584311)、トマト(*Lycopersicon esculentum*) (AW222911)などにも高い相同性を示す EST クローンが登録されている。これらの EST から予測される XPG-N ドメインと OsGEN-L を比較すると sugarcane、大豆、*B. napus*、*M. truncatula*、シロイヌナズナ、トマトの XPG-N ドメインと 91 %、67 %、65 %、64 %、63 %、55 %の相同性を示す(図 2D)。このことから、植物においても OsGEN-L ホモログは保存されていることが示唆される。

2. *OsGEN-L* 遺伝子発現抑制形質転換イネの作製と解析

川原らにより、*OsGEN-L* 遺伝子の第 2 イントロンにトウモロコシのトランスポゾン *Ac* が挿入した *OsGEN-L* 遺伝子破壊候補系統が単離された(図 1A)。しかし、この系統では、*Ac* の挿入にも関わらず、挿入部位の第 2 イントロンのスプライシングが正常に起こるため、*OsGEN-L* 遺伝子の発現量は野生型とほぼ同じであった(data not shown)。このため、この *Ac* 挿入系統による解析は断念した。新たな、トランスポゾンによる *OsGEN-L* 遺伝子破壊系統を同定するため、当研究室の *Ac* プールおよび農業生物資源研究所の廣近博士らのグループで作製されたイネレトロトランスポゾン *Tos17* 挿入変異体プールの 3 年分の PCR スクリーニングや *Tos17* 隣接配列データベースの検索を行った。しかし、*OsGEN-L* 遺伝子の新たなトランスポゾン挿入系統を見つけることはできなかった。

そこで、RNAi コンストラクトを導入した形質転換体を作製し、*OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制系統の解析を進めることにした。*OsGEN-L* 遺伝子特異的な発現抑制を起こすため、ヌクレアーゼドメイン直後の 683 bp の *OsGEN-L* 遺伝子に特異的な配列を RNAi トリガーとして用いたコンストラクトをアグロバクテリウム法によりイネ種子由来のカルスに感染させ、形質転換体を作製した(図 3A)。*OsGEN-L*-RNAi 植物体の葉から RNA を単離して、ノーザン解析や RT-PCR 解析を行った結果、多くの *OsGEN-L*-RNAi 系統において、*OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制が起こっていることが植物分子遺伝学講座の三木大介博士により確認された(図 3B, 三木 2004)。また、*OsGEN-L*-RNAi 培養細胞のノーザン解析においても、*OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制を確認している(data not shown)。さらに、RNAi が起きていることの分子的指標である *OsGEN-L* 遺伝子の RNAi トリガー領域に

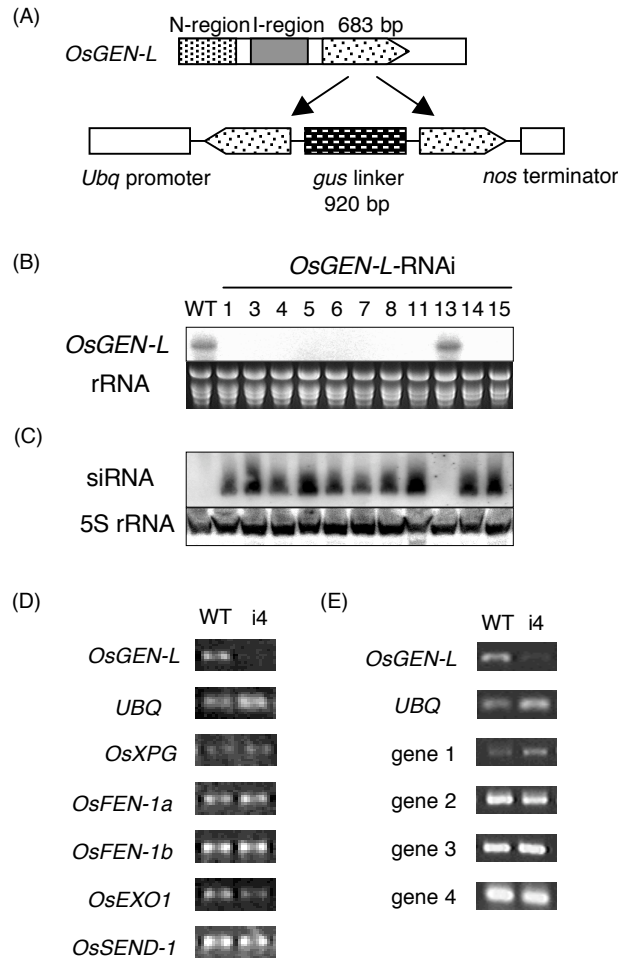


図3 *OsGEN-L*-RNAi植物体における*OsGEN-L*遺伝子のサイレンシング

(A) *OsGEN-L*-RNAiコンストラクトの模式図。638 bpの*OsGEN-L*遺伝子に特異的な領域をRNAiトリガーとして用いた。トウモロコシのエビキチンプロモーターの制御下で、構成的に発現され、RNAiトリガー領域が2本鎖RNAを形成することで、*OsGEN-L*遺伝子のRNAiが引き起こされることが期待される。(B) ノーザン解析による*OsGEN-L*-RNAi植物体における*OsGEN-L*遺伝子の発現抑制。葉由来のRNAを用い、*OsGEN-L*遺伝子のC末端領域のプロープにより発現を検出した。*OsGEN-L*-RNAi植物体のほとんどの系統で野生型に比べ発現抑制が観察された。(C) *OsGEN-L*-RNAi植物体の発現抑制個体でのsiRNAの検出。2本鎖RNAによる遺伝子サイレンシングの分子マーカーである*OsGEN-L*遺伝子のRNAiトリガー領域のsiRNAが発現抑制個体で検出された。コントロールとして、5S rRNAを用いている。(D) *OsGEN-L*-RNAi植物体におけるイネRAD2/XPGヌクレアーゼファミリーメンバー内の*OsGEN-L*遺伝子特異的な発現抑制。野生型と*OsGEN-L*-RNAi植物体系統i4の葉からRNAを単離し、RT-PCRを行った。(E) 638 bpのRNAiトリガー領域と短い塩基配列の相同性を持つイネ遺伝子の発現解析。葯よりRNAを単離し、RT-PCRにより、RNAiトリガー領域と短い相同性 (18 bp/18 bp)を持つ4遺伝子の発現が*OsGEN-L*-RNAi植物体系統i4で発現抑制されていないことを確認した。

特異的な siRNA が三木大介博士により検出された(図 3C, 三木 2004)。RNAi コンストラクトが *OsGEN-L* 遺伝子だけを特異的に発現抑制しているかどうかを調べるため、まず最初に、イネの *RAD2/XPG* ヌクレアーゼファミリーメンバーの発現を *OsGEN-L-RNAi* 植物体において調べた。RT-PCR の結果、*OsGEN-L-RNAi* 植物体においては、*OsGEN-L* 遺伝子の発現は抑制されているが、それ以外の *OsXPG*、*OsFEN-1a*、*OsFEN-1b*、*OsEXO1*、*OsSEND-1* の発現抑制は起きていなかった(図 3D)。次に RNAi コンストラクトに使用した 683 bp の領域をつかって、イネゲノムのデータベース RiceBLAST (<http://RiceBLAST.dna.affrc.go.jp/>)のサーチを行い、相同性を持つ領域があるかどうか検討した。その結果イネゲノム中に 19 カ所において、23 bp/24 bp から 18 bp/18 bp の短い塩基配列の一致がみられた。この 19 カ所について、イネのアノテーションデータベース RiceGAAS (Rice Genome Automated Annotation System; <http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp/rgadb/>)を使って調べた結果、4 カ所は遺伝子のエキソンに、6 カ所は遺伝子のイントロンに、9 カ所は遺伝子ではない領域にヒットしていることがわかった。エキソンにヒットしていたこれら 4 つの遺伝子について、RT-PCR により発現を調べた結果、4 つの遺伝子はすべて *OsGEN-L-RNAi* 植物体においても発現抑制は見られなかった(図 3E)。また、イントロンにヒットした 6 つの遺伝子のうち、3 つについては完全長 cDNA データベースに cDNA 情報が登録されていたので、RT-PCR をおこなったところ、3 つとも発現抑制は見られなかった(data not shown)。以上から、今回使用した RNAi コンストラクトは、*OsGEN-L* 遺伝子を特異的に発現抑制していることが推測された。

OsGEN-L-RNAi 植物体の栄養生長期における成長は正常であった。しかし、*OsGEN-L-RNAi* 植物体の開花時の葯に図 4A のような異常が観察された。ヨウ素染色により、これらの異常な形態の葯を染色したところ、*OsGEN-L-RNAi* 植物体には成熟した花粉粒が観察されなかった(図 4B)。多くの *OsGEN-L-RNAi* 植物体は、低稔性を示した(表 1)。表現型の強い *OsGEN-L-RNAi* 植物体の 2 系統においては、ほぼ完全不稔であったが、野生型の花粉を人工授粉させることにより種子をつけることから、*OsGEN-L-RNAi* 植物体は雄性不稔であることが示唆された(表 1)。ノーザン解析の結果から、*OsGEN-L-RNAi* 植物体の多くの系統は葉において、*OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制が観察され(図 3B)、また、*OsGEN-L-RNAi* 植物体系統 i13 以外のすべてにおいて siRNA が検出されている(図 3C)。しかし、葉において RNAi が起こっていると考えられる 2 系統(i6, i7)において、

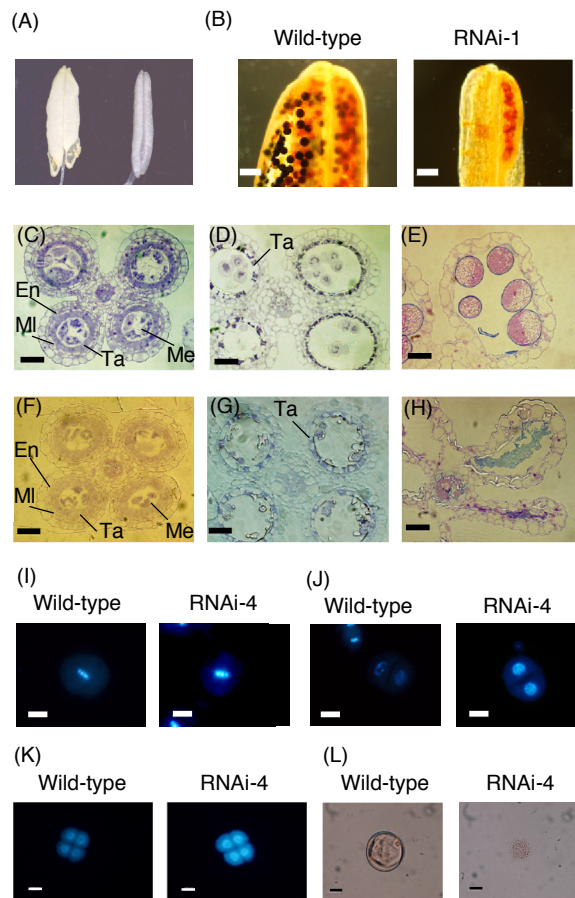


図4 *OsGEN-L-RNAi*植物体の表現型

(A) 開花時の葯の表現型。野生型（左）。*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4（右）。
 (B) 葯のヨウ素染色。野生型（左）。*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4（右）。サイズバーは100 μm 。(C-H) コントロール植物体 (empty vector, p2K-1+) (C,D,E)と*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4 (F,G,H)の葯の切片。サイズバーは33 μm 。(C) 減数分裂期初期のコントロール植物体の葯。減数分裂期の細胞(Me)、タペート細胞(Ta)、中間層(MI)、内皮(En)が観察される。(F) 減数分裂期初期の*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4の葯。減数分裂期の細胞(Me)、タペート細胞(Ta)、中間層(MI)、内皮(En)がコントロール同様(C)に観察される。(D) 四分子から小孢子初期のコントロール植物体の葯。(G) 小孢子初期の*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4の葯。正常なタペート細胞(Ta)が観察される。(E) 成熟中の花粉がコントロール植物体の葯で観察される。(H) (E)のステージ対応する*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4の葯。葯室内には花粉は観察されない。タペート細胞は(E)のコントロール植物体のように崩壊している。(I-K) 正常な減数分裂と四分子が*OsGEN-L-RNAi*植物体でも観察される。サイズバーは10 μm 。(I) 野生型（左）と*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4（右）の雄の減数分裂中期IのDAPI染色像。(J) 野生型（左）と*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4（右）の雄の二分子期のDAPI染色像。(K) 野生型（左）と*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4（右）の四分子期のDAPI染色像。(L) 野生型（左）と*OsGEN-L-RNAi*植物体系統i4（右）の小孢子初期。

表 1 *OsGEN-L*-RNAi 植物体系統の稔性

Line	Fertility (%)	Seeds / Flowers	Cross-pollination (seeds / flowers)	<i>OsGEN-L</i> mRNA level (%)
Wild-type a	82.1	358/435		100
Wild-type b	63	63/100		
i1	0.88	5/570	(22/44)	50
i2	0	0/133		
i4	2.2	20/893	(15/46)	7
i5	0	0/190		
i6	67.2	314/467		155
i7	69.4	302/435		102
i8	29.4	68/231		73
i11	0	0/63		
i13	83.5	81/97		114
i14	0	0/101		31
i15	0	0/91		

稔性は 2002 年の夏から秋に決定した。稔性を決定するため、全穎花数で全種子を割ることにより稔性を算出した。*OsGEN-L*-RNAi 植物体の雌しべに野生型の花粉を交配させる実験は、2001 年と 2002 年の夏に行った。*OsGEN-L* の mRNA レベルの決定は、リアルタイム RT-PCR により、2003 年の葯の RNA サンプルを使って行った。野生型と T0 世代の *OsGEN-L*-RNAi 植物体系統は、2001 年から 2003 年まで維持し、3 年間稔性の傾向は同じだった。

正常な稔性が観察された(表 1)。そこで私は、リアルタイム RT-PCR により、実際に表現型が観察された葯での RNA サンプルを用いて、*OsGEN-L-RNAi* 植物体の *OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制レベルと低稔性の間に相関が見られるか検討を行った。葯の RNA は、葉耳間長が+10 cm から+11 cm の穂から単離した。リアルタイム RT-PCR の結果、稔性の低い系統では、葯における *OsGEN-L* 遺伝子の発現も下がっており、通常の稔性が観察された系統では、葯での *OsGEN-L* 遺伝子の発現は野生型と同様のレベルであることがわかった(表 1、図 5)。葯における *OsGEN-L* 遺伝子の発現の低下は、*OsGEN-L-RNAi* 植物体の稔性の低下と相関がみられることがわかった(図 5、 $R^2 = 0.7451$)。以上の結果から、葯における *OsGEN-L* 遺伝子の発現抑制により、雄性不稔が引き起こされることが示された。

OsGEN-L-RNAi 植物体において、どの発生段階の異常により雄性不稔が引き起こされたかを調べるため、コントロールの植物体と *OsGEN-L-RNAi* 植物体の葯や花粉の発生を観察した。減数分裂初期においては、*OsGEN-L-RNAi* 植物体でも、コントロールの植物体同様、減数分裂細胞や葯壁のタペート層、中間層内皮層は正常に形成されていることが観察された(図 4C,F)。タペート層は小孢子初期過程においても、正常に観察され、後のステージで、コントロール植物体と同様に崩壊していた(図 4D,G)。開花前には、*OsGEN-L-RNAi* 植物体の葯の中に花粉は観察されなかった(図 4E,H)。次に雄の減数分裂を調べた。*OsGEN-L-RNAi* 植物体においても、野生型と同様に、正常な減数分裂中期 I や二分子が観察され、最終的に正常な形態の四分子が観察された(図 4I,J,K)。以上の結果から、*OsGEN-L-RNAi* 植物体の減数分裂は正常であることが考えられた。一番最初に観察された *OsGEN-L-RNAi* 植物体の異常は、1 核期の小孢子であった。初期の小孢子は生育できず、分解してしまうのが観察された(図 4L)。これらの *OsGEN-L-RNAi* 植物体の表現型から、*OsGEN-L* 遺伝子はイネの小孢子初期生育に重要な役割を果たしていることが推測された。

3. *OsGEN-L* 遺伝子の発現解析

RT-PCR により、*OsGEN-L* 遺伝子の発現は、葉、根、開花前の穎花など様々な組織で発現が検出された(図 6A)。植物体における *OsGEN-L* 遺伝子の空間的な発現パターンを調べるため、*OsGEN-L* 遺伝子の 5' 上流約 1.4 kb の推定プロモーター領域をクローニングし、*gus* マーカー遺伝子との融合コンストラクトを

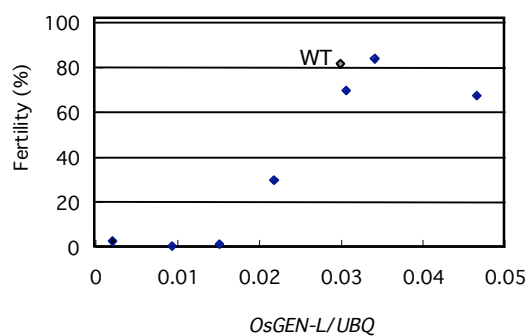


図5 *OsGEN-L*-RNAi植物体系統の葯における*OsGEN-L* mRNAの発現レベルと稔性の相関
 野生型と*OsGEN-L*-RNAi系統の葯は、葉耳間長+10 cmの時の穂から集めた。リアルタイムRT-PCRを行い、各系統の*OsGEN-L* mRNAレベルは、コントロールの*Ubiquitin (UBQ)*の値で割ることによって、補正した。縦軸の稔性は、表1の値を用いた。コントロールとしての野生型(WT)の点の位置を示す。ほかの点はすべて*OsGEN-L*-RNAi系統(i1, i4, i6, i7, i8, i13, i14)の値である。 $R^2 = 0.745$ であった。

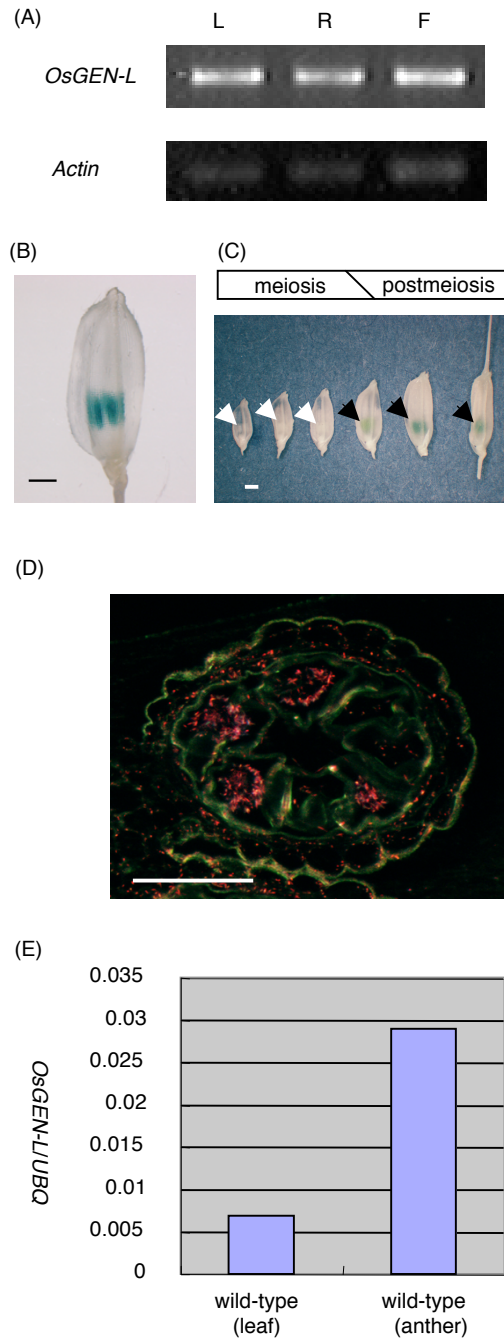


図6 イネにおける*OsGEN-L*遺伝子の発現解析

(A) RT-PCRによる*OsGEN-L*遺伝子の発現解析。野生型とりで1号の葉(L)、根(R)、開花前の穎花(F)からRNAを単離し、RT-PCRに使用した。イネ*Actin*遺伝子をコントロールとして使用した。(B) *OsGEN-L*遺伝子プロモーター*gus*形質転換植物体の葯特異的プロモーター活性の検出。GUS染色後、透明化処理を行った。サイズバーは1 mm。(C) *OsGEN-L*遺伝子プロモーター活性は、減数分裂後のステージで上昇する。黒い矢印はGUS染色で染まっている葯の位置を示す。白い矢印は染色されていない葯の位置を示す。サイズバーは1 mm。葯の発生段階は穎花長をもとに決定した。(D) *OsGEN-L*遺伝子プロモーター*gus*形質転換植物体の葯の切片。サイズバーは50 μm 。GUS活性は暗視野顕微鏡による観察で、葯室内や葯壁の両方にピンク色のスポットとして観察される。(E) *OsGEN-L*遺伝子の野生型の葉と葯におけるリアルタイムRT-PCRによる発現量の解析。*OsGEN-L*遺伝子の発現量は、コントロールUbiquitin (UBQ)の値により補正した。葉では、0.007、葯では0.029であった。

作製し、野生型とりで1号に導入した形質転換体を作製した。この *OsGEN-L* プロモーター*gus* 植物体において、GUS は蒴で特異的に発現が検出された(図 6B)。発生段階ごとに発現を調べたところ、減数分裂前の蒴でも発現が検出されるが (data not shown)、減数分裂期頃の蒴では発現が検出できなくなり、その後の減数分裂後の小胞子のステージで発現が誘導されるのが観察された(図 6C)。GUS の活性は、葉、根、雌の器官、外穎、内穎、蒴のフィラメントなど蒴以外では全く検出できなかった(data not shown)。4 系統の独立した形質転換体の T0 において、蒴でのみ発現が検出され、それらの T1 世代の芽生えにおいても、葉や根での GUS 活性は検出されなかった(data not shown)。蒴での切片を作製したところ、蒴壁や蒴室内など蒴の中では特に発現の特異性はなく、蒴のどの場所でも発現が検出された(図 6D、data not shown)。これらの結果から、*OsGEN-L* 遺伝子のプロモーターは、イネの蒴で特異的に活性をもち、減数分裂後に発現が誘導されることがわかった。RT-PCR では、様々な組織で発現が検出されたのに対し、*OsGEN-L* プロモーター*gus* 植物体では蒴でのみプロモーター活性が検出されることから、蒴ではほかの組織に比べ発現量が高い可能性が考えられた。そこで、リアルタイム RT-PCR による定量的な発現解析の結果、葉耳間長+10 cm の穂から単離した蒴では、コントロールのユビキチンにより補正した値で、成熟葉における発現のおよそ 4 倍の値であった(図 6E、葉 0.007、蒴 0.029)。しかし、*OsGEN-L* プロモーター*gus* 植物体で蒴特異的な発現が見られたのは、蒴以外の組織での発現に必要な領域が今回用いた推定プロモーター領域に含まれていないという可能性も考えられる。

4. GFP 融合 *OsGEN-L* タンパク質の細胞内局在の解析

OsGEN-L タンパク質の細胞内局在を調べるため、35S プロモーターのコントロール下で *OsGEN-L*-GFP 融合タンパク質を発現させることのできるコンストラクトを作製し、タマネギ表皮細胞にパーティクルボンバードメント法で一過的に発現させ、共焦点顕微鏡により観察を行った。その結果、コントロールの GFP では、核や細胞質に蛍光が観察されるのに対し(図 7A,C)、*OsGEN-L*-GFP 融合タンパク質では、GFP の蛍光が核において観察された(図 7B,D)。以上から、*OsGEN-L* タンパク質は核に局在することが示唆された。

5. 組換え *OsGEN-L* タンパク質の活性測定

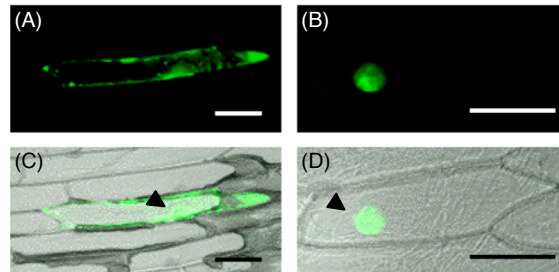


図7 タマネギ表皮細胞への一過的発現によるOsGEN-L-GFPの核への局在
矢じりは核の位置を示す。サイズバーは100 μm 。(A,C) *35S::GFP*コンストラクトを
導入した細胞。(B,D) *35S::OsGEN-L-GFP*コンストラクトを導入した細胞。(A,B)
GFPの蛍光。(C,D) GFPの蛍光と明視野像と重ね合わせたもの。

OsGEN-L タンパク質の活性測定のため、OsGEN-L の N 末端にヒスチジンタグと S タグ、C 末端にヒスチジンタグを付加した大腸菌発現系のコンストラクトを作製し(図 8A)、発現誘導を行った。大腸菌株は、OsGEN-L のアミノ酸構成比を考慮して、BL21-CodonPlus (DE3)-RIL を選定し、発現誘導は 16 °C 4 時間で行った。発現誘導後大腸菌の可溶性画分を抽出し、ヒスチジンタグへの親和性を利用したニッケルカラムクロマトグラフィー、DNA 結合タンパク質やエンドヌクレアーゼに親和性があるとされるヘパリンカラムクロマトグラフィー、Mono Q イオン交換カラムクロマトグラフィーの 3 段階により、CBB 染色で、ほぼ単一バンドまで精製を行った(図 8B)。His タグに対する抗体と S タグに対して親和性を持つ S protein を用いたウエスタンブロットにより、このバンドは全長の組換え OsGEN-L タンパク質であると考えられた(data not shown)。この最終精製品のバンドを Q-tof 型質量分析装置(Cap-LC, Q-tof ultima)により解析を行ったところ、OsGEN-L タンパク質であることが同定された(data not shown)。この同定は、植物分子遺伝学講座の川口裕介さんと藤原正幸博士に行っていた。精製した OsGEN-L タンパク質を用い、ヌクレアーゼ活性をもつか検討した。基質として一本鎖円環状 DNA、二本鎖円環状プラスミド DNA、二本鎖直鎖状 DNA を用いて、エンドヌクレアーゼ活性を検討し、一本鎖オリゴヌクレオチドや、アニールさせた 2 本鎖オリゴヌクレオチドにより、エキソヌクレアーゼ活性を検討し、RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリー基質の特徴である構造特異的ヌクレアーゼ活性の検討には、XPG の基質であるバブル構造と、FEN1 の基質である 5'-flap DNA 構造を用いた。今回のプレップで、これらの基質に対して、限られた反応条件でヌクレアーゼ活性を調べた結果、唯一 5'-flap に対するエンドヌクレアーゼ活性がコントロールの OsFEN-1 と比べ弱いながら検出された(図 8C)。この 5'-flap エンドヌクレアーゼ活性は、Kimura et al. (2000)により報告されている OsFEN-1 の活性測定条件と同じ条件で反応を行った。ほぼ等モルの OsGEN-L 250 ng (3 pmol)では、OsFEN-1 100 ng (2 pmol)に比べて非常に弱い flap エンドヌクレアーゼ活性が検出され、過剰に OsGEN-L を加えたところ (500 ng, 1000 ng)、弱いながらはっきりとした flap エンドヌクレアーゼ活性を示すバンドが検出された(図 8C)。

2 本鎖円環状プラスミド DNA に対する活性を調べた際、以下のような興味深い実験結果が得られた。マグネシウムイオン存在下の緩衝液中で反応を行い、アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により、DNA 分解活性を

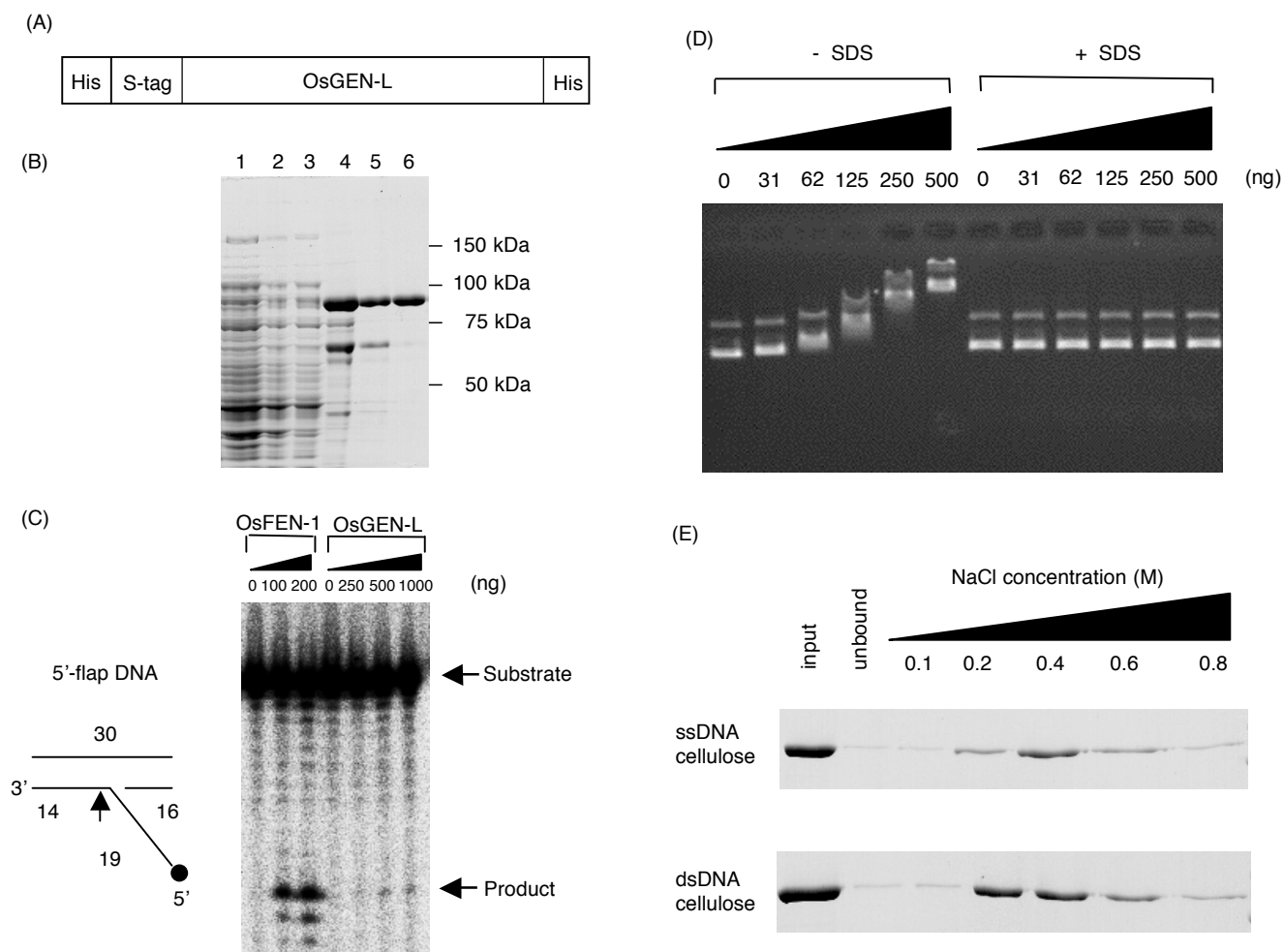


図8 組換えOsGEN-Lタンパク質の精製とflapエンドヌクレアーゼ活性とDNA結合活性の測定
 (A) 組換えOsGEN-Lタンパク質の発現コンストラクトの模式図。(B) 組換えOsGEN-Lタンパク質の精製。精製過程における様々な段階の画分を分取し、8% SDS-PAGEゲルに流し、Coomassie Brilliant Blue染色を行った。レーン1、発現誘導前。レーン2、IPTGで発現誘導をかけた後。レーン3、発現誘導後の可溶性画分。レーン4、ニッケルアフィニティーカラム後。レーン5、ヘパリンアフィニティーカラム後。レーン6、Mono Qカラムのピーク画分。右に示した分子量は、Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad)に基づく。(C) 組換えOsGEN-Lタンパク質のflapエンドヌクレアーゼ活性の測定。様々な量のコントロールOsFEN-1タンパク質およびOsGEN-Lタンパク質を5'ラベルした5'-flap DNA (100 f mol)と37°C2時間反応させ、シーケンシングゲルにより解析した。(D) 組換えOsGEN-Lタンパク質の2本鎖DNA結合活性。様々な濃度の組換えOsGEN-Lタンパク質と2本鎖プラスミドDNAを反応させ、SDSを含まない反応停止液(- SDS)とSDSを含む反応停止液(+ SDS)を混ぜアガロースゲル泳動を行った。SDSを含まない反応停止液(- SDS)では、加えたOsGEN-L量に依存して、ゲルシフトバンドパターンが観察された。SDSを含む反応停止液(+ SDS)では、おそらく、OsGEN-Lタンパク質とDNA複合体が形成されないため、ゲルシフトバンドパターンが見られなくなる。OsGEN-Lタンパク質の2本鎖プラスミドDNAに対するエンドヌクレアーゼ活性も検出できなかった。(E) OsGEN-Lタンパク質の1本鎖および2本鎖DNAセルロースレジンへの結合活性。OsGEN-Lタンパク質とDNAセルロースレジンとを混ぜ、反応させた。その後DNAセルロースレジンと様々な塩濃度の緩衝液と混ぜ、DNAセルロースレジンに結合したOsGEN-Lタンパク質を溶出させた。そして、8% SDS-PAGEゲルに流し、Coomassie Brilliant Blue染色を行った。

検討した。37°C 2 時間反応させ、停止液として、SDS を含むもの SDS を含まないもので比較した(図 8D)。SDS を含まない停止液を混ぜた場合、OsGEN-L タンパク質濃度に依存して、泳動の遅れが見られるゲルシフトパターンが観察された(図 8D)。一方、SDS を含まない停止液を混ぜた場合、OsGEN-L タンパク質濃度を増加させても DNA 分解活性は観察されず、精製した OsGEN-L タンパク質は、2 本鎖円環状プラスミド DNA の基質に対して、エンドヌクレアーゼ活性をもたないと考えられた(図 8D)。ヌクレアーゼ活性は見られなかったが、SDS を含まない停止液では、おそらく OsGEN-L タンパク質の DNA 結合活性により、ゲルシフトパターンが観察されたのではないかと予想された。そこで、OsGEN-L タンパク質の DNA 結合活性について、さらに検討を加えるため、OsGEN-L タンパク質の 1 本鎖 DNA および 2 本鎖 DNA セルロースレジンに対する親和性を調べた。1 本鎖 DNA および 2 本鎖 DNA セルロースレジンと OsGEN-L タンパク質を混ぜ、氷上で 30 分反応させた後、遠心して、レジンと上精を分離し、レジンに OsGEN-L タンパク質が結合しているかどうか SDS-PAGE 法で調べた。0.1 M 以下の低塩濃度の反応液では、OsGEN-L タンパク質は、1 本鎖 DNA および 2 本鎖 DNA セルロースレジンに結合しており、上精には、OsGEN-L タンパク質はほとんど検出されない(図 8E)。しかし、塩濃度を上昇させると、0.2 M 以上で 1 本鎖 DNA および 2 本鎖 DNA セルロースレジンから溶出されてくること分かった(図 8E)。以上から OsGEN-L タンパク質は、1 本鎖 DNA および 2 本鎖 DNA 結合活性をもつことが示唆された。OsGEN-L タンパク質の核局在の結果とあわせ、以上の生化学的結果から、OsGEN-L はイネの小孢子生育に必要な何らかの核 DNA 代謝に関与している可能性が示唆された。

考察

1. OsGEN-L はイネ新規 RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーメンバーである

本研究では、RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーに属するイネ遺伝子 *OsGEN-L* を単離し解析を行った。これまで報告された RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーの class 4 メンバーは *OsSEND-1* のみであったが(Furukawa et al. 2003)、私たちの単離した *OsGEN-L* もこの class 4 に当てはまることがわかった。*OsSEND-1* は植物特異的なメンバーではないかと考えられるのに対し、*OsGEN-L* は、動物、植物においても保存されている。植物の *OsGEN-L* サブクラスの報告は、これまでなく、植物においては *OsGEN-L* がはじめての報告である。

ショウジョウバエホモログは、ごく最近、*DmGEN* として報告されたが(Ishikawa et al. 2004)、ゲノムプロジェクト終了直後の配列解析の論文では、ショウジョウバエの *FEN1* ホモログのうちの一つとして記述されていた(Sekelsky et al. 2000)。*OsGEN-L* もこれまで活発に解析されている XPG (class 1)、*FEN1* (class 2)、*EXO1* (class 3)の中では、ドメインの相同性や構造的に、脊椎動物の *FEN1* (class 2)に最も似ている。そこで、*OsGEN-L* も *FEN1* と機能的なホモログであるかもしれないと考えて、*OsGEN-L* が出芽酵母の *rad27* 破壊株を相補できるか検討を行った。しかし、*OsGEN-L* は、出芽酵母の *rad27* 破壊株の高温致死性および MMS 感受性のどちらも相補しなかった(data not shown)。このことから、*OsGEN-L* は、*FEN1/RAD27* (class 2)とは異なる機能を持つ可能性が示唆されるが、組換え *OsGEN-L* は、弱いながらも flap エンドヌクレアーゼ活性を持っていた。*XPG* (class 1)、*EXO1* (class 3)も、flap エンドヌクレアーゼ活性を持っていることから、現段階では、*OsGEN-L* と他の RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーのサブファミリーとの間のヌクレアーゼとしての機能的な違いについてはわからない。

RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーは、DNA 修復において重要な機能を持っていることから、*OsGEN-L* の DNA 修復経路への関与を調べるため、*OsGEN-L-RNAi* 培養細胞の MMS 感受性について検討した。私の実験条件では、野生型培養細胞と比べ、*OsGEN-L-RNAi* 培養細胞の MMS 感受性に顕著な違いは観察されなかった(data not shown)。MMS は DNA にダメージを与えるアルキル化剤であり、少なくとも、MMS が及ぼす DNA ダメージを修復する経路に *OsGEN-L* は関与していないことが示唆される。イネのもう一つの class 4 のメ

ンバーである *OsSEND-1* は、MMS 処理によって発現誘導されることが報告されており(Furukawa et al. 2003)、アルキル化剤による DNA ダメージの修復に *OsGEN-L* と *OsSEND-1* は機能的重複があるため、*OsGEN-L* 単独のノックダウンでは MMS 感受性が見られなかったという可能性も考えられる。

2. イネの小孢子初期生育における *OsGEN-L* 遺伝子の役割

多くの雄性不稔突然変異体がイネにおいても報告されている(Kinoshita 1997)。Tamaru and Kinoshita(1985)は組織学的な観察に基づき、29 のイネ雄性不稔突然変異体を 7 種類の異常に分類している。そのうち、*ms24*、*ms25*、*ms34*、*ms36* は、*OsGEN-L-RNAi* 植物体の表現型と同様に、四分子期や小孢子初期に異常を示すことが報告されている(田丸 1994, Kinoshita 1997, Tamaru and Kinoshita 1985)。しかし、これらの原因遺伝子は現在のところ同定されていない。また、Lee et al. (2004)はイネのシステインプロテアーゼ遺伝子 *OsCPI* の T-DNA 挿入変異体が、*OsGEN-L-RNAi* 植物体と類似した低稔性の表現型を示し、*OsCPI* のプロモーター活性は葯で見られることを報告している。*OsGEN-L* と *OsCPI* はもしかしたらイネの葯や花粉の形成過程において、関連した経路もしくは同じ経路に機能しているかもしれない。また、ヌクレアーゼやプロテアーゼなどの分解酵素の働きが適切に制御されることが、小孢子や花粉の発生に必要なという可能性も考えられる。

表現型の強い *OsGEN-L-RNAi* 植物体系統は、小孢子初期の異常により、ほぼ完全不稔だった(表 1、図 4)。このことは、*OsGEN-L* 遺伝子は雄の稔性に作用する孢子体型の遺伝子であることを意味している(McCormick 2004)。*OsGEN-L* プロモーター活性は、核相 n の小孢子的生育に重要である核相 $2n$ の体細胞でも活性が見られることから、このことが支持される。興味深いことに、*OsGEN-L-RNAi* 植物体においては減数分裂や、タペート層の細胞の異常は観察されなかった。雌においては稔性に影響がなかったことから、*OsGEN-L* はおそらく、一般的に減数分裂に作用する因子ではないであろう。私の観察では、雄の減数分裂やタペート層の異常は検出できなかったが、もしかしたらさらに詳細なレベルで調べれば、これらの過程に異常がみられるという可能性を完全には除外できないが、*OsGEN-L* の発現抑制では、減数分裂および葯壁の細胞層の全体的な構造に影響は出ないのだろうと考えている。

OsGEN-L プロモーター *gus* 形質転換植物体の GUS 活性は、減数分裂後のステ

ージの葯で発現が上昇することが観察された。この発現上昇のタイミングと *OsGEN-L-RNAi* 植物体の小孢子初期の生育異常が見られ始める時期は対応している。興味深いことに GUS 活性は、減数分裂期前の葯でも観察されたが、減数分裂期には発現が消失した(図 6、data not shown)。 *OsGEN-L* プロモーター *gus* 形質転換植物体の GUS 活性は、花粉母細胞、小孢子、葯壁の細胞層のほとんどすべての細胞で活性が観察され、葯の中ではとくに明確な組織特異性は観察されなかった(図 6、data not shown)。今後解明されなければならない問題点として、孢子体型の遺伝子としての作用がどのようにして小孢子のような配偶体に影響を与えるのかという点である。 *OsGEN-L* の mRNA やタンパク質がもしかしたら $2n$ の細胞から n の細胞へと移動することにより、 *OsGEN-L* タンパク質が直接的に小孢子の核で機能しているのかもしれない。また別の可能性としては、 $2n$ の細胞の核で *OsGEN-L* タンパク質が機能することが重要であり、そのことが間接的に n の小孢子に影響を与えているのかもしれない。第三の可能性としては、花粉母細胞で発現した *OsGEN-L* が、そのまま減数分裂後ももちこされて小孢子の核で機能しているのかもしれない。また、 *OsGEN-L* は、小孢子や花粉など n の細胞でもプロモーター活性が検出されたため、配偶体型の遺伝子機能ももっているかもしれない。シロイヌナズナの *Bcp1* 遺伝子は、雄性不稔を制御する孢子体型および配偶体型の両方の機能を持つことが報告されている(Xu et al. 1995)。 *OsGEN-L* の mRNA や *OsGEN-L* タンパク質のさらに詳細な発現パターンを解析していくことが、葯や小孢子発生における *OsGEN-L* の分子機能を明らかにする上で必要である。

RT-PCR では、栄養成長期の葉や根などでも *OsGEN-L* の発現が検出された(図 6A)。しかし、 *OsGEN-L-RNAi* 植物体の栄養成長期には異常は観察されなかったことから、 *OsGEN-L* は栄養成長期の細胞にとっては必要ないかもしくは、他のイネの *RAD2/XPG* ヌクレアーゼファミリーのメンバーが重複して機能している可能性が考えられる。これまで報告されている植物の減数分裂に必須の遺伝子である、 *SYN1*、 *DIF1*、 *Asy1*、 *AHP2*、 *PAIR2* などは、栄養成長期にも発現が見られるのに、減数分裂以外の表現型は見られていない(Bai et al. 1999, Bhatt et al. 1999, Caryl et al. 2000, Nonomura et al. 2004, Schommer et al. 2003)。

3. *OsGEN-L* タンパク質の生化学的機能

RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーのメンバーのうち、大腸菌発現系により

全長を活性のある形で発現精製できた例は少なく、これまでの報告では class 2 の FEN1 と class 5 の DmGEN だけである。例えば、全長の OsSEND-1 (class 4) は、大腸菌内で不溶性になってしまうことが報告されている(Furukawa et al. 2003)。今回組換え OsGEN-L タンパク質を大腸菌の pET システムを用いて、低温で発現誘導をかけることにより、可溶性画分より全長を精製することができた。精製したタンパク質は flap エンドヌクレアーゼ活性と 1 本鎖および 2 本鎖 DNA 結合活性をもっていることが本研究により示された。OsGEN-L タンパク質にも保存されている HhH class 2 モチーフは、DNA の塩基配列に依存しない DNA 結合モチーフとして知られている(Doherty et al. 1996)。今回同定された OsGEN-L タンパク質の DNA 結合能は、このモチーフに依存している可能性が考えられる。また、同定された flap エンドヌクレアーゼ活性は、RAD2/XPG ヌクレアーゼファミリーのうち、FEN1 (class 2)以外にも、XPG (class 1)、EXO1(class 3)も持っていることから、このファミリーに属するメンバーの構造特異的ヌクレアーゼとしての特徴を示していると考えられることもできる。OsGEN-L のショウジョウバエホモログである DmGEN は、エンドエキソヌクレアーゼ活性を持つことが示されている。しかしながら今回私たちが精製した OsGEN-L のプレップを用いて、限られた基質と条件で調べた限りでは、DmGEN と同様の活性については検出されなかった。また、DmGEN では、バブル構造や 5'-flap DNA などの構造特異的ヌクレアーゼ活性については持たないということが報告されている(Ishikawa et al. 2004)。OsGEN-L のヌクレアーゼ活性についてさらに研究を進めていくことが、OsGEN-L の生化学的機能をより明らかにしていくためにも必要である。

DNA との相互作用を介して、OsGEN-L は、イネの小胞子の初期生育に必要な何らかの機能を発揮していることが示唆される。その機能の一つとして考えられるのが、葯の細胞における何らかの基質に対するヌクレアーゼ活性であろう。OsGEN-L の基質の一つとして考えられるのは、5'-flap DNA かもしれない。次のステップの重要な課題は、実際の *in vivo* における OsGEN-L の基質を同定することであろう。OsGEN-L は、class 1 の XPG で報告されているように、ヌクレアーゼとは別の機能を持っている可能性も考えられる。XPG はヌクレチド除去修復に機能する構造特異的ヌクレアーゼである(O'Donovan et al. 1994)と同時に、ヌクレアーゼとは独立した他の機能を持っていることが提唱されている(Clarkson 2003)。例えばヒトの XPG は、ヌクレオチド除去修復経路における反

応において、タンパク質-DNA 複合体の構造的役割も果たしていることや (Wakasugi et al. 1997)、ヌクレアーゼ活性をもたない変異型 XPG でも、塩基除去修復経路の NTH1 DNA グリコシラーゼの活性を野生型同様に上昇させることができる補助因子としても機能することなどが報告されている (Bessho 1999, Klungland et al. 1999)。それゆえ、OsGEN-L と相互作用するタンパク質を同定することも大変興味深い課題であろう。

葯や花粉の発生段階において、ユニークな DNA 代謝の関わるイベントが知られている。花粉母細胞は前減数分裂期の S 期に DNA 複製を行い、その後減数分裂が行われる。減数分裂後、四分子の個々の細胞は、自由小孢子として放出され、小孢子は有糸分裂を行って、最終的に雄性配偶体である成熟花粉が形成される (McCormick 2004)。タペート細胞は endoreduplication により DNA 含量を増やして多核化することが知られている (Scott et al. 2004, Shivanna 2003)。タペート細胞は、いずれ崩壊してしまうが、これはプログラム細胞死として知られている。OsGEN-L-RNAi 植物体において、雄の減数分裂やタペート細胞には私が行った観察では異常は認められなかったことから、OsGEN-L は、減数分裂後の小孢子初期における有糸分裂の過程に関与している可能性が考えられる。オオムギで、1 核期の小孢子において合成されるエンドヌクレアーゼが部分的に精製されているが (Marchetti et al. 2001)、これが OsGEN-L と関係があるのかについては今のところ不明である。また最近シロイヌナズナの DNA グリコシラーゼ DEMETER が雌の発生に重要な MEDEA (MEA) 遺伝子のプロモーター領域におそらくニックを入れることによって、雌性配偶子の中央細胞での母方由来の MEA アリルの発現を活性化させていることが明らかになっている (Choi et al. 2002, Choi et al. 2004)。このような DNA 代謝酵素が転写レベルで他の遺伝子の発現を制御しているという例から、OsGEN-L もひょっとしたら DNA との相互作用を介して、小孢子生育に重要な雄の遺伝子群の発現制御に関わっているかもしれないという仮説も考えられる。出芽酵母の XPG ホモログである RAD2 もヌクレアーゼの活性とは独立に RNA ポリメラーゼ II に依存したいくつかの遺伝子の効率的な発現を支える働きを持つことが示されている (Lee et al. 2002)。

本研究で示されたように、多くの高等植物は保存された OsGEN-L ホモログを持っている。この新規なタンパク質の分子レベルの機能をさらに解析することによって、現在ほとんどわかっていない小孢子初期の生育に必要な DNA 代謝への理解につながる事が期待される。また、イネの小孢子初期は、冷害に

よる不稔の被害を最も受けやすい時期として知られているため、本研究によって得られた知見が、将来的にイネの耐冷性を向上させる応用のための基礎となることや、雄性不稔性を操作するためのターゲットとしてうまく利用することにより、従来とは異なる核遺伝子型の雄性不稔を利用したハイブリッドライスを作り出すための基礎となることも期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の場を与えていただき、数々の御指導、御鞭撻を賜りました指導教官の植物分子遺伝学講座の島本功教授に謹んで感謝申し上げます。また、数々の御助言、御指導を賜りました植物分子遺伝学講座の川崎努助教授、一色正之博士、横井修司博士、現東京大学の経塚淳子博士、現農業生物資源研究所の井澤毅博士、6年間様々な面でお世話になりました植物分子遺伝学講座の皆様方に深く感謝申し上げます。*OsGEN-L*遺伝子の単離をしていたいただいた植物分子遺伝学講座卒業生の川原美保子さんの研究がなければ、本研究はあり得ず、深く感謝申し上げます。ノーザン解析およびsiRNAの検出の実験結果を出していただき、リアルタイムRT-PCR用のプライマーや検量線用のプラスミドを作製していただいた植物分子遺伝学講座の三木大介博士、また、組換え*OsGEN-L*タンパク質の発現、精製、活性測定や投稿論文の作成など数々の御指導を賜りました原核生物分子遺伝学講座の秋山昌広助教授、真木寿治教授には、心より感謝申し上げます。共焦点顕微鏡や投稿論文を作成する上でも数々の御指導をいただきました植物分子遺伝学講座のHann Ling Wong博士、すべての形質転換体を作製していただきました植物分子遺伝学講座の小橋小和子さんに心よりお礼申し上げます。cDNAライブラリーを御分与していただきました東北大学の山谷智行先生、pGWB5ベクターを御分与していただきました島根大学の中川強先生、*OsFEN-1*タンパク質を御分与していただきました東京理科大学の木村成介先生、内山幸伸さん、坂口謙吾先生、ヌクレアーゼ活性測定のための材料を御分与していただきました金沢大学の松永司先生、*Tos17*ミュータントパネルのPCRスクリーニング用のDNAプールを御分与していただきました農業生物資源研究所の廣近洋彦先生、宮尾安藝雄先生、出芽酵母発現ベクターを御分与していただきました植物代謝調節学講座の与那嶺育子博士、GUSリコンビネーション基質導入イネの種子を御分与していただきました農業生物資源研究所の土岐精一先生、イネ*OsPCNA*プラスミドを御分与していただきました農業生物資源研究所の橋本純治先生、GUSリコンビネーション基質導入シロイヌナズナの種子を御分与していただきました現産業創造研究所の浦和博子博士、基礎生物学研究所の堀内嵩先生に深くお礼申し上げます。樹脂切片作製を御指導していただきました形質発現植物学講座の齋藤知恵子博士、減数分裂および染色法など御助言をいただきました遺伝学研究所の野々村賢一先生、倉田のり

先生、小胞子の発生やイネ雄性不稔突然変異体の御助言をいただきました北海道教育大学の田丸典彦先生、出芽酵母相補実験で御助言をいただきました原核生物分子遺伝学講座の梅津桂子先生、ヌクレアーゼ活性測定ための材料作製や測定方法を御指導していただきました原核生物分子遺伝学講座の八木義彦さん、OsGEN-Lの機能に関して重要な御助言をいただきましたU.C Davis校のAnne Britt先生、イネ*Ac*遺伝子破壊株のDNAプールのスクリーニングでお世話になりました植物分子遺伝学講座の神田雅子さん、Q-tof型質量分析装置による最終精製品のタンパク質の同定をしていただきました植物分子遺伝学講座の川口裕介さん、藤原正幸博士、投稿論文の英語校正をしていただきました奈良先端科学技術大学院大学のIan Smith先生、様々な事務手続きを行っていただきました植物分子遺伝学講座の今井さゆりさんに心より感謝申し上げます。

参考文献

- Bai, X., Peirson, B.N., Dong, F., Xue, C., and Makaroff, C.A. (1999) Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 417-430.
- Bardwell, P.D., Woo, C.J., Wei, K., Li, Z., Martin, A., Sack, S.Z., Parris, T., Edelmann, W., and Scharff, M.D. (2004) Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. *Nat. Immunol.* 5: 224-229.
- Bessho, T. (1999) Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 27: 979-983.
- Bhatt, A., Lister, C., Page, T., Fransz, P., Findlay, K., Jones, G.H., Dickinson, H.G., and Dean, C. (1999) The *DIF1* gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the *REC8/RAD21* cohesin gene family. *Plant J.* 19: 436-472.
- Britt, A.B., Chen, J.-J., Wykoff, D., and Mitchell, D. (1993) A UV-sensitive mutant of *Arabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidine (6-4) dimers. *Science* 261: 1571-1574.
- Caryl, A.P., Armstrong, S.J., Jones, G.H., and Franklin, F.C. (2000) A homologue of the yeast *HOP1* gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma* 109: 62-71.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., and Fischer, R.L. (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 33-42.

Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L. (2004) An invariant aspartic acid in the DNA glycosylase domain of DEMETER is necessary for transcriptional activation of the imprinted *MEDEA* gene. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 101: 7481-7486.

Clarkson, S.G. (2003) The XPG story. *Biochimie*, 85: 1113-1121.

Constantinou, A., Gunz, D., Evans, E., Lalle, P., Bates, P.A., Wood, R.D., and Clarkson, S.G. (1999) Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair. *J Biol Chem.* 274: 5637-5648.

Doherty, A.J., Serpell, L.C., and Ponting, C.P. (1996) The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res.* 24: 2488-2497.

Enoki, H., Izawa, T., Kawahara, M., Komatsu, M., Koh, S., Kyojuka, J., and Shimamoto, K. (1999) *Ac* as a tool for the functional genomics of rice. *Plant J.* 19: 605-613.

Fiorentini, P., Huang, K.N., Tishkoff, D.X., Kolodner, R.D., and Symington, L.S. (1997) Exonuclease I of *Saccharomyces cerevisiae* functions in mitotic recombination in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.* 17: 2764-2773.

Freudenreich, C.H., Kantrow, S.M., and Zakian, V.A. (1998) Expansion and length-dependent fragility of CTG repeats in yeast. *Science*, 279: 853-856.

Furukawa, T., Kimura, S., Ishibashi, T., Mori, Y., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. (2003) OsSEND-1: a new RAD2 nuclease family member in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 51: 59-70.

Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.

Harada, Y.N., Shiomi, N., Koike, M., Ikawa, M., Okabe, M., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitagawa, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., and Shiomi, T. (1999) Postnatal growth failure, short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *Mol Cell Biol.* 19: 2366-2372.

Harrington, J.J., and Lieber, M.R. (1994a) The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *EMBO J.* 13: 1235-1246.

Harrington, J.J., and Lieber, M.R. (1994b) Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 8: 1344-1355.

Henneke, G., Friedrich-Heineken, E., and Hubscher, U. (2003) Flap endonuclease 1: a novel tumour suppresser protein. *Trends Biochem Sci.* 28: 384-390.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282.

Ishikawa, G., Kanai, Y., Takata, K-I., Takeuchi, R., Shimanouchi, K., Ruike, T., Furukawa, T., Kimura, S., and Sakaguchi, K. (2004) DmGEN, a novel RAD2 family endo-exonuclease from *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 32: 6251-6259.

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.

Kimura, S., Ueda, T., Hatanaka, M., Takenouchi, M., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. (2000) Plant homologue of flap endonuclease-1: molecular cloning, characterization, and evidence of expression in meristematic tissues. *Plant Mol Biol.* 42: 415-427.

Kimura, S., Suzuki, T., Yanagawa, Y., Yamamoto, T., Nakagawa, H., Tanaka, I., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. (2001) Characterization of plant proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and flap endonuclease-1 (FEN-1), and their distribution in mitotic and meiotic cell cycles. *Plant J.* 28: 643-653.

Kimura, S., Furukawa, T., Kasai, N., Mori, Y., Kitamoto, H.K., Sugawara, F., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. (2003) Functional characterization of two flap endonuclease-1 homologues in rice. *Gene* 314: 63-71.

Kinoshita, T. (1997) Gene symbols and information on male sterility. *Rice Genet. Newslett.* 14: 13-22.

Klungland, A., Hoss, M., Gunz, D., Constantinou, A., Clarkson, S.G., Doetsch, P.W., Bolton, P.H., Wood, R.D., and Lindahl, T. (1999) Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol Cell.* 3: 33-42.

Kucherlapati, M., Yang, K., Kuraguchi, M., Zhao, J., Lia, M., Heyer, J., Kane, M.F., Fan, K., Russell, R., Brown, A.M., Kneitz, B., Edelman, W., Kolodner, R.D., Lipkin, M., and Kucherlapati, R. (2002) Haploinsufficiency of Flap endonuclease (*Fen1*) leads to rapid tumor progression. *Proc. Natl Acad. Sci U S A* 99: 9924-9929.

Larsen, E., Gran, C., Saether, B.E., Seeberg, E., and Klungland, A. (2003) Proliferation failure and gamma radiation sensitivity of *Fen1* null mutant mice at the blastocyst stage. *Mol Cell Biol.* 23: 5346-5353.

Lee, S., Jung, K.H., An, G., and Chung, Y.Y. (2004) Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, *OsCPI*, using T-DNA gene-trap system. *Plant Mol. Biol.* 54: 755-765.

Lee, S.K., Yu, S.L., Prakash, L., and Prakash, S. (2002) Requirement of yeast *RAD2*, a homolog of human *XPG* gene, for efficient RNA polymerase II transcription: implications for Cockayne syndrome. *Cell* 109: 823-834.

- Lieber, M. R. (1997) The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *BioEssays* 19: 333-240.
- Liu, Y., Kao, H.I., and Bambara, R.A. (2004) Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 589-615.
- Liu, Z., Hall, J.D., and Mount, D.W. (2001) *Arabidopsis UVH3* gene is a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae RAD2* and human *XPG* DNA repair genes. *Plant J.* 26: 329-338.
- Madura, K., and Prakash, S. (1986) Nucleotide sequence, transcript mapping, and regulation of the *RAD2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 166: 914-923.
- Marchetti, S., Zaina, G., Chiaba, C., Pappalardo, C., and Pitotti, A. (2001) Isolation and characterization of an endonuclease synthesized by barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. *Planta* 213: 199-206.
- McCormick, S. (2004) Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16: S142-S153.
- Miki, D., and Shimamoto, K. (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 490-495.
- Mishra, N.C. (2002) *Nucleases : molecular biology and applications*. John Wiley and Sons Inc, Hoboken.
- Murray, J.M., Tavassoli, M., Al-Harithy, R., Sheldrick, K.S., Lehmann, A.R., Carr, A.M., and Watts, F.Z. (1994) Structural and functional conservation of the human homolog of the *Schizosaccharomyces pombe rad2* gene, which is required for chromosome segregation and recovery from DNA damage. *Mol Cell Biol.* 14: 4878-4888.

Nicolet, C.M., Chenevert, J.M., and Friedberg, E.C. (1985) The *RAD2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence and transcript mapping. *Gene* 36: 225-234.

Nonomura, K.-I., Nakano, M., Murata, K., Miyoshi, K., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., and Kurata, N. (2004) An insertional mutation in the rice *PAIR2* gene, the ortholog of *Arabidopsis ASY1*, results in a defect in homologous chromosome pairing during meiosis. *Mol. Gen. Genet.* 271: 121-129.

Nospikel, T., Lalle, P., Leadon, S.A., Cooper, P.K., and Clarkson, S.G. (1997) A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 94: 3116-3121.

O'Donovan, A., Davies, A.A., Moggs, J.G., West, S.C., and Wood, R.D. (1994) XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 371: 432-435.

Parrish, J.Z., Yang, C., Shen, B., and Xue, D. (2003) CRN-1, a *Caenorhabditis elegans* FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. *EMBO J.* 22: 3451-3460.

Reagan, M.S., Pittenger, C., Siede, W., and Friedberg, E.C. (1995) Characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with a deletion of the *RAD27* gene, a structural homolog of the *RAD2* nucleotide excision repair gene. *J Bacteriol.* 177: 364-371.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Scherly, D., Nospikel, T., Corlet, J., Ucla, C., Bairoch, A., and Clarkson, S.G. (1993) Complementation of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group G cells by a human cDNA related to yeast *RAD2*. *Nature* 363: 182-185.

Schommer, C., Beven, A., Lawrenson, T., Shaw, P., and Sablowski, R. (2003) *AHP2* is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. *Plant J.* 36: 1-11.

Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G. (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell* 16: S46-60.

Sekelsky, J.J., Brodsky, M.H., and Burtis, K.C. (2000) DNA repair in *Drosophila*: Insights from *Drosophila* genome sequence. *J Cell Biol.* 150: F31-F36.

Shen, B., Nolan, J.P., Sklar, L.A., and Park, M.S. (1997) Functional analysis of point mutations in human flap endonuclease-1 active site. *Nucleic Acids Res.* 25: 3332-3338.

Shiomi, N., Kito, S., Oyama, M., Matsunaga, T., Harada, Y.N., Ikawa, M., Okabe, M., and Shiomi, T. (2004) Identification of the XPG region that causes the onset of Cockayne syndrome by using *Xpg* mutant mice generated by the cDNA-mediated knock-in method. *Mol Cell Biol.* 24: 3712-3719.

Shivanna, K.R. (2003) Pollen development. In *Pollen biology and biotechnology*. pp. 7-25. Science Publishers Inc, Enfield.

Singh, R.J. (2003) Genetic control of meiosis. In *Plant cytogenetics* 2nd edn. pp. 73-92. CRC press, Boca Raton.

Szankasi, P., and Smith, G.R. (1992) A DNA exonuclease induced during meiosis of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 267: 3014-3023.

Szankasi, P., and Smith, G.R. (1995) A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction. *Science* 267: 1166-1169.

Tamaru, N., and Kinoshita, T. (1985) Classification of induced genetic male sterile mutants based on histological observation of microsporogenesis. *Rice Genet. Newslett.* 2: 76-77.

Terada, R., Nakajima, M., Isshiki, M., Okagaki, R.J., Wessler, S.R., and Shimamoto, K. (2000) Antisense *waxy* genes with highly active promoters effectively suppress *waxy* gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 41: 881-888.

Tian, M., Jones, D.A., Smith, M., Shinkura, R., and Alt, F.W. (2004) Deficiency in the nuclease activity of xeroderma pigmentosum G in mice leads to hypersensitivity to UV irradiation. *Mol Cell Biol.* 24: 2237-2242.

Tishkoff, D.X., Boerger, A.L., Bertrand, P., Filosi, N., Gaida, G.M., Kane, M.F., and Kolodner, R.D. (1997) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *EXO1*, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 94: 7487-7492.

Tran, P.T., Simon, J.A., and Liskay, R.M. (2001) Interactions of Exo1p with components of MutLalpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 98: 9760-9765.

Twell, D. (2002) The developmental biology of pollen. In *PLANT REPRODUCTION*. Edited by O'Neill, S.D. and Roberts, J.A. pp. 86-153. Sheffield Academic Press, Sheffield.

Wakasugi, M., Reardon, J.T., and Sancar, A. (1997) The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. *J Biol Chem.* 272: 16030-16034.

Wang, A., Xia, Q., Xie, W., Datla, R., and Selvaraj, G. (2003) The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 100: 14487-14492.

Wei, K., Clark, A.B., Wong, E., Kane, M.F., Mazur, D.J., Parris, T., Kolas, N.K., Russell, R., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Yang, G., Kunkel, T.A., Kolodner, R.D., Cohen, P.E., and Edlmann, W. (2003) Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev.* 17: 603-614.

Xu, H., Knox, R.B., Taylor, P.E., and Singh, M.B. (1995) *Bcp1*, a gene required for male fertility in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 92: 2106-2110.

Yokoi, S., Tsuchiya, T., Toriyama, K., Hinata, K. (1997) Tapetum-specific expression of the *Osg6B* promoter- β -glucuronidase gene in transgenic rice. *Plant Cell Rep.* 16: 363-367.

川原 美保子 (1999) *Ac/Ds* によるイネ遺伝子破壊系統の作出 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.

田丸 典彦 (1994) イネの遺伝的雄性不稔性と雑種不稔性に関する育種学的研究 北海道大学農学部邦文紀要 第十九巻 第二号.

三木 大介 (2004) イネにおける dsRNA を用いた遺伝子特異的なサイレンシングとそのエピジェネティックな影響 奈良先端科学技術大学院大学博士論文.