

A377.7

H72K

95/96-I

イネ科植物ならびに *Mu* トランスポゾンの 進化学的研究

(研究課題番号 : 07660002)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

平成9年3月

弘前大学附属図書館



06600378

研究代表者 : 石川 隆 二

(弘前大学農学部助教授)

イネ科植物ならびに*Mu*トランスポゾンの進化学的研究

研究組織

研究代表者：石川隆二（弘前大学農学部助教授）

研究分担者：なし

研究経費

平成 7 年度	1, 900 千円
平成 8 年度	900 千円
<hr/>	
計	2, 800 千円

（１）論文など

Ishikawa, R. 1996. The report of 5th International Symposium on Rice Molecular Biology. Rice Genet. Newslt. 13. (Printing)

Ishikawa, R. and M. Freeling. 1996. Putative transposase like domain found in rice genome. Rice Genet. Newslt. 13. (Printing)

Harata, Y., Y. Tuchimine and R. Ishikawa. 1996. Genetic characterization of Japanese upland rice and gene block on chromosome 11:Chromosomal Polymorphic Region (CPR). Rice Genet. Newslt. 13. (Printing)

石川隆二 1996. Maize meetingにおけるトウモロコシ遺伝学の現状とこれから. 育雑 46 : 309.

Ishikawa, R. and M. Freeling. 1996. *Mutator* like transposase domain found in rice genome. Proceeding of the 5th International Symposium on Rice Molecular Biology (Printing).

Chiba, T., T. Harada, S. Goto, R. Ishikawa and M. Niizeki. 1996. Transcription of *tRNA* genes from a large-scale plastid DNA deletion clearly reveals the action of nuclear-encoded RNA polymerase in the plastid. J. Plant Physiol. 148:652-656.

Wang, T-B., M. Niizeki, T. Harada, R. Ishikawa and K. Saito. 1996. Variations of Nor chromosomes hidden behind RFLP were exposed by fluorescence *in situ* hybridization in maize-*Triticum* somatic hybrid cell lines. Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ. 59: 27-35.

(2) 口頭発表

新関 稔・仲條眞介・千田峰生・石川隆二・原田竹雄・赤田辰治 1995. *Lotus corniculatus* の体細胞雑種カルスにおける核およびオルガネラゲノムの動向. 日本育種学会第88回講演会.

赤田辰治・清水武史・千田峰生・石川隆二・原田竹雄・新関 稔 1995. ダイズにおけるMYB相同性遺伝子の紫外線UV-Bによる発現調節. 日本育種学会第88回講演会.

石川隆二・原田優子・D. Lisch・M. Freeling・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 1995. イネにおける*Mu*トランスポゾンの探索 3. 日本育種学会第88回講演会.

原田優子・近藤康子・石川隆二・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 1995. 日本在来陸稲の染色体多型領域(CPR)に関する研究. 日本育種学会第88回講演会.

澁谷玲・原田竹雄・赤田辰治・石川隆二・千田峰生・新関 稔 1996. 植物の体細胞における相同領域間のDNA組換えに関する研究. 日本育種学会第89回講演会.

千葉貴子・原田竹雄・赤田辰治・黒田久夫・伊藤一敏・石川隆二・千田峰生・新関 稔 1996. オオムギのADPリボシル化因子遺伝子(*arf*)のタバコでの発現. 日本育種学会第89回講演会.

渡部裕之・松倉千昭・千田峰生・石川隆二・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 1996. カルス培養期間の異なるイネカリクローンのソマクローナル変異に関する研究. 日本育種学会第89回講演会.

島津樹一・千田峰生・石川隆二・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 1996. ニコチアナ属における正常葉およびカルス抽出液のソマクローナル変異に与える影響. 日本育種学会第89回講演会.

松倉千昭・千田峰生・石川隆二・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 1996. イネ培養細胞における減数分裂特異的遺伝子の発現解析. 日本育種学会第89回講演会.

石川隆二・M. Freeling 1996. イネにおける*Mu*トランスポゾンの探索4. イネにおいて検出された*Mu*型トランスポゼースと関連因子のゲノム構成. 日本育種学会第90回講演会.

清水武史・千田峰生・石川隆二・原田竹雄・新関 稔・赤田辰治 1996. ダイズMYB相同性遺伝子の単離と紫外線による発現調節. 日本育種学会第90回講演会.

貝森のぞみ・石川隆二・原田竹雄・千田峰生・赤田辰治・新関 稔 1996. マメ科植物のバーズフットトレフォイルとアルファルファの非対称融合雑種に関する研究. 日本育種学会第90回講演会.

原田優子・土嶺康憲・石川隆二・千田峰生・赤田辰治・原田竹雄・新関 稔 1996. 日本在来陸稻の系統分化に関連する遺伝子群の解析. 日本育種学会第90回講演会.

目次

I. 緒言	5
II. <i>Mutator</i> に関する進化学的研究	9
III. イネにおける <i>Mutator</i> の解析	18
IV. 活性を有するトランスポゾンの解析	22
V. 総合論議	35
VI. 要約	37

I. 緒言

近年、トランスポゾン（転写子）は遺伝子タグgingの手段として頻繁に用いられており、色素系遺伝子ならびに形態形成に関わる遺伝子などが数多く得られている（石川 1996）。特に、トウモロコシでは他種・他属に類をみないほど複数の転写因子が検出され、その目的に利用されている。Ac/Ds系では制御機構が植物種を超えて活性を有するため、遺伝子導入を通して広範な植物種へ利用され（Hehl 1994）、アラビドプシスの*Tag1*（Acの同祖性因子）のように遺伝子導入したAcにより活性化されたトランスポゾンの報告もある（Tsay *et al.* 1993）。一方、RNA型転写因子のレトロトランスポゾンでは、水平移行などトランスポゾンそのものの進化的意義が論じられるようになった（Capy *et al.* 1994）。このようにトランスポゾンはその遺伝子タグgingへの利用と共に、植物種間の進化的道筋やトランスポゾンそのものの進化の道筋、同祖遺伝子の制御機構を明らかにする研究対象となっている。

トランスポゾンは大きくClass IのRNAからDNAを経由して転移する転写因子とClass IIのDNAを鋳型として転移する系に分かれている（Kaiser *et al.* 1995）。さらに、Class Iはレトロウイルスと構造上類似している長い末端の反復配列を有するLTR因子とLTRを有さないnon-LTR因子に大別される。LTR因子はレトロトランスポゾンと呼ばれ、内部にレトロウイルスと同様に*gag*（RNAを包み込む蛋白）遺伝子、ならびにRT（RNAを鋳型としてDNAに逆転写を行って転移していく酵素やRNA分解酵素を含む）遺伝子が存在する。酵母（*Saccharomyces cerevisia*）やショウジョウバエ（*Drosophila*）では、それらの遺伝子配列の類似性から2つの主要なレトロトランスポゾンのグループが知られている。1つはTy1/*copia*であり、2つめはTy3/*gypsy*である（Review; Bucheton 1995, Kumar 1996）。特にトランスポゾンの存在していない幼虫の育成培地に*gypsy*因子を混ぜることで、同因子が幼虫に導入された実験から、*gypsy*はレトロウイルスに非常に近い因子として報告されている。植物ではTy1/*copia*に群別される因子としてタバコにおいて活性のある*Tnt1*（Grandbastien *et al.* 1989）やイネの*Tos1*（Hirochika 1993）などが検出されている。Ty3/*gypsy*にはトウモロコシで見出された*Magellan*因子が分類される（Purugganan and Wessler 1994）。一方、non-LTR因子には7kb程度のサイズを示すLINE（Long interspersed elements）とトの*Alu*配列を代表とする300bp程度のサイズのSINE（Short interspersed elements）が知られている。LINEは*gag/pol*類似の配列を有し、SINEは内部に逆転写酵素などの遺伝子を有さず*AluI*（ヒト）では7SL RNAを起源とする類似配列を有する（Brookfield 1995）。一方、植物ではtRNA起源と推定される配列を示すことが報告されており、その起源が興味深い（Umeda *et al.* 1991）。イネでも125bpのpSINE1が検出され4500コピーもの反復配列としてゲノム上に散在していることが報告されている（Mochizuki *et al.* 1992）。さらに核内でのみその存在と転移性が確認されていたこれらの因子がミトコンドリアで存在すること、核とミトコンドリア間を移行する可能性が報告された（Knoop *et al.* 1996, Wright *et al.* 1996）。

Class IIには転写酵素（トランスポゼース）をコードする遺伝子を有して、自らが転移活性を制御する自律性因子と、それから分化し制御される因子となった非自律性因子が存在する。特に、DNA型として知られるこれらの因子はDNAの構造も明らかとなっていない。1940年初期にMcClintock（1945, 1946）により多彩な色彩を呈するトウモロコシ穀粒の表現型から検出された。現在トウモロコシには複数の因子が報告されており、その代表的なものはMcClintockにより最初に見出されたAc/Ds系をはじめとして*Spm/dSpm*系、*Dt/rDt*系、*Mutator*系などが有名である（Review; Freeling 1984）。さらに、いまだ転移機構が明らかとなっていない挿入反復配列として、*Stowaway*ならびに*Tourist*などがゲノム内の遺伝子へ

の挿入から検出されている(Bureau and Wessler 1992, 1994a,b). *Stowaway*は11bpのTIR, 2bp(TA)の標的配列, サイズおよそ300bp, Stem loop構造をとる構造的特徴を示し, イネもち遺伝子への挿入など*Os1*~*Os7*がデータベース上の遺伝子配列から検出された. *Tourist*は9bpのTIR, TAAを基本とする3bpの標的配列を有し, サイズ平均133bpである.

*Mutator*は1991年に制御因子自律因子がクローニングされたトウモロコシ, *Zea mays* L. のClassIIのトランスポゾンである(Chomet *et al.* 1991, Hershberger *et al.* 1991, Qin *et al.* 1991). *Mutator*は*Ac*トランスポゾンの活性系統から出現した葉色変異体の連鎖分析から明らかにされた. 同系統で*Ac*をゲノム内から失った後にも易突然変異性を示し, その系統後代は*Mutator*系統と呼ばれた(Robertson 1978). この系統の当初の突然変異率は他のトランスポゾン系に比較しても少なくとも20倍以上, 自然突然変異の50倍以上であることが報告された. *Mutator*の最初の因子が分子的に明らかにされたのはアリルアルコール耐性の花粉選抜法によりADH遺伝子に1kb程度の*Mu1*の挿入が検出されたADH変異体である(Strommer *et al.* 1984).

*Mu*トランスポゾンの制御因子である*MuDR*は215bpの長い末端反復配列(TIR)を有している(Chomet *et al.* 1991, Review; Chandler and Hardeman 1992, Bennetzen *et al.* 1993). *Mutator*トランスポゾンは*Mu1*サブファミリーを含む6サブファミリーからなる多重遺伝子族を形成しており, それぞれトランスポゾン活性のないNon-*Mutator*系統と活性を有する*Mutator*系統で異なるコピー数が観察される. *Mu1*サブファミリーは欠失型*Mu1*, *Mu1*, *Mu2*(*Mu1.7*)の構成因子からなり非*Mutator*系統では0~4個コピー, *Mutator*系統では10~50コピーもの増幅がなされる. *Mu3*, *Mu4*, *Mu8*はそれぞれのサブファミリーを形成し, *Mu5*, *MuA*, *MuDR*, *Mu9*は*Mu5/A/R/9*サブファミリー, *Mu6*と*Mu7*は*Mu6/7*サブファミリーを形成している. このファミリーはそれぞれがTIRの相同性(70~90%)を示しながらも, それぞれのファミリー間の内部配列は多様性に富んでいる特徴を有している. そのため, TIRや内部領域をプローブとして利用してもHigh stringency条件では他のファミリーを検出することが難しい. *Mu2*が内部に獲得した配列は嫌気条件で発現が誘導される遺伝子と相同性が検出された. このMRS-Aはトウモロコシゲノムでトランスポゾンとは関連しない遺伝子(MRS-A)であり, *Mu2*内部配列との高い相同性は*Mu2*因子がなんらかの機構でMRS-Aを内部に獲得してきたことを示している. コムギ族から見出された*Mu1*に相同なシグナルはこのMRS-Aに対して得られたと考えられる(Sparvoli *et al.* 1989).

*MuR1*が最初に*Mutator*活性と完全連鎖していることが明らかにされた因子であり, Freeling研究室ではこの自律性因子を1コピーのみ有するMinimum lineを利用して遺伝解析と同因子のクローニングを行った(Lisch and Freeling 1994, Lisch *et al.* 1995). さらに, 他の研究室でも同様な因子をクローニングし, それらが*Mu9*, *MuA2*として報告されている. これら自律性因子は*Mutator*を最初に検出したDonald Robertsonに敬意を表して*MuDR*と総称されている. 同因子は内部に2つの逆向きに内部方向に転写される遺伝子を有しており, *mudrA*及び*mudrB*と名付けられた(Hershberger *et al.* 1995). それぞれ2.8kb, 1.0kbの転写産物が同定されているが, *mudrA*は2つのPolyA+サイトを有している. *MuDR*を1コピーしか有さないMinimal lineにおける*mudrA*の内部欠失突然変異体の解析により, 同遺伝子産物が遺伝的にトランスポゼースとして働いていることが明かとされている. 更に, データベースによる相同性の検索から内部に細菌のIS因子(*IS256*, *ISRM3*, *IST2*, *IS1081*, *IS6120*ら)のPutative transposaseと相同な配列が検出されている(Eisen *et al.* 1994). 一方, *mudrB*の内部欠失突然変異体は転移率に影響を与えるものの機能を完全に失わせるものではないこと, さらに抗体の*in situ* hybridizationの結果からGene conversionに関する作用を担っているものと推測されている(Donlin *et al.* 1995).

*MuDR*の相同配列がサザンハイブリダイゼーション解析からかなり広範囲の単子葉植物から検出されており(Chomet *et al.* 1991, Ishikawa *et al.* 1994), これらの相同因子の検出は単子葉植物相互間におけるトランスポゾンの分化との関わりを明らかにして, 単子葉植物の種の相同性を議論する際の重要な因子となると考えられる(Bennetzen and Freeling 1993). さらに, 内部配列はそれぞれのファミリーが内部DNA配列をいかに獲得してきたかを明らかにするのに役立つであろう. 双子葉においてはトマトで~235bpのTIRを有し, なおかつ標的配列も9bpである*Lyt-1*因子が見出されたが, TIRおよび内部の塩基配列相同性を示さないことから*MuDR*との関連は明らかでない(Young *et al.* 1994). 本研究では単子葉に広範囲にわたるTNP領域が検出されたため, 単子葉ならびに双子葉においても*Mutator*の関連因子を特定できる可能性が開けた(Ishikawa *et al.* 1994).

トランスポゾンはそれ自体の作用における突然変異の作出をするため, 奇形的な形態を植物に与えることがあり, 植物の生存能力を低めることでトランスポゾン自身の適応性を低めることも考えられる. しかし, これまでの研究では遺伝子の活性や組織特異的な発現を変更することで遺伝子の新たな機能を作成する場合も報告されている(Gierl 1990). さらに, 切り出し時に生じる挿入部位のスクランブルにより, プロモーターを改変したり, 新たなアミノ酸をコード領域に追加する例も認められていることから, なんらかのゲノムショックを受けた植物体に適応能力を付与する可能性も否定できない(Gierl 1990, Kloeckener-Gruissem and Freeling 1995). また, TNP領域の突然変異によるアンチセンス鎖の転写によるトランスポゾンのコピー数や活性の制御をNegative dominant regulatorとして行うことも推定されており, トランスポゾン自身が生存のための適応性を有していることも考えられる(Brown and Sundaresan 1992, Lisch and Freeling 1994). これはトランスポゾンと植物の適応進化を考える上で非常に興味深い問題である.

トランスポゾンはその進化的な研究のみならず, 広範囲な植物生物学の分野での利用がなされている. その代表的例が遺伝子タグgingである. 既にトウモロコシでは60以上の遺伝子がタグgingされており, その機能が推定されている. 今では*MuDR*の高頻度での転移能と共通配列の高い末端反復配列を利用してSite selected mutagenesisが行われており, 別名をTUSC法もしくはGene machineと呼ばれている(Das and Martienssen 1995). この手法で従来Gain of Function Mutantしか得られていなかった*Kn1*のLoss of Function Mutantが作出され, 同遺伝子産物の機能推定がなされた(Maize meeting 1996). さらに, 塩基配列が既知の遺伝子座における複数の対立遺伝子の突然変異が得られており, 今後も遺伝子機能の推定に計り知れない影響力を示すであろう. このようにトランスポゾンを利用した遺伝子クロ-ニングは今後最も期待される分野の1つとも考えられる.

*MuDR*は1) 高頻度での転移率, 2) Gene conversionを伴う転移機構, 3) トランスポゾンの構造上の相違, などで他のトランスポゾンとは異なっている. さらに, 内部配列の獲得機構など系統分化に関する研究にも利用できる独創的なトランスポゾンである. 本研究ではイネゲノムから*Mu*トランスポゾン相同配列をクロ-ニングし, その活性と易突然変異系統の関連を調査した. 特に, 北海道の系統ではクロ-ニングされたイネにおける*Mutator-like*なTNP領域を有する因子(Tentatively, *Mutator rice* 1; *MuR1(t)*)がゲノム上で不安定な状態で存在していることが明らかにされた(本研究). その事実から同因子の転移している可能性が示唆された(後述). そのため, 内在性トランスポゾンを利用したイネタグging系を確立できると考えられる. Map based cloningは中規模の研究室では, 成果と経済的なリスクが大きく, トランスジェニック系を利用したHeterologousなトランスポゾン因子の遺伝子タグging系では開放系(圃場, 水田)での大規模なスクリーニングが法規制のもとで行えない. 一方, 内在性のトランスポゾンを遺伝子タグgingに利用することで

- 1) 遺伝子導入によらない内在性トランスポゾンの利用による大規模な屋外（水田）での突然変異体のスクリーニングが行える
- 2) 高頻度の転移率により効率的な希望する突然変異体の探索が可能である
- 3) Gene machineを利用して目的の遺伝子座位に挿入をさせることができる
- 4) 内在性トランスポゾンが活性を保っていると推定される北海道の系統では*d-1*, *d-2*, *Ur-1*, *awn-1*, *awn-2*が既に偶発的に誘発された変異体が出現しており、系統保存されているためこれらの遺伝子をクローニングできる可能性があることから、今後、*MuR1(t)*因子は中小規模の研究室におけるイネの遺伝子解析法を大きく変更するであろう。さらに、育種の現場においても、望ましくない遺伝子破壊を行った系統を育種に利用することが可能となるなど従来の育種法を大幅に変更するであろう。

II. *Mutator*に関する進化学的研究

材料及び方法

植物材料

植物材料は学内水田で育成して成葉からDNAを抽出した。野生イネは国立遺伝学研究所から分譲していただき、単子葉植物の一部は弘前市内で入手して、成葉からDNAを抽出した。

ゲノミックライブラリー

ゲノミックライブラリーはZarembinski and Theologis (1993)によるIR36の*Sau3AI*不完全消化DNAを入DASHにライゲートしたものを供試した。*MuDR*のプロープはFreeling研究室から分譲していただいた。

サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションはStratagene社のPrimeItIIを利用した。25ng程度に調整した24ulのプロープDNAに対して、10ulの5xPrimer溶液と混合して5分間100度処理してプライマーを結合させた後に急冷し、10ulの5xReactionBufferと混合した。その後、1 ulの5Unit/ulのExo(-)Klenowならびに5ul(25uCi)の α 32 P-dCTPを入れ、37度30分加温してプロープのラベル化を行った。各酵素で処理したDNAは10xSDSでフィルター (Stratagene社のDuralon-UV™) にブロッティングした後にUV固定した。サザンハイブリダイゼーションの溶液には

30ml	20XSSC
0.4ml	0.5MEDTA
1ml	Tris pH7.5
5ml	100XDenhardts
2ml	10mg/ml Sperm DNA (Denative)
2ml	1m Na phosphate buffer
5ml	20% Sarcosyl-Na

を100mlに調整したものを適量とラベル化したプロープをハイブリダイゼーション用のローターチューブにいれて一晩サザンハイブリダイゼーションを行った。

プロットの洗浄には0.1%SDSと必要に応じて、0.1XSSPE~1xSSPEを加えて65度で2~3回の洗浄を行って、FujiのMacBAS1000により画像解析処理を行った。

PCR反応

PCRはPromega社のTaqポリメラーゼを用いて通常の実験を行った。供試したプライマーは合成DNAを用いて行った。

塩基配列の決定

塩基配列の決定はLiCOR社のシーケンサーを利用して、試料の反応は*SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA sequencing Kits-LC*を、試料DNAの精製はQIAGEN社のQIAprep Spin Miniprep Kitを利用した。全塩基配列については論文投稿中である。

結果及び考察

1. イネ *Mutator* 相同領域のクローニング

インド型イネIR36 *Sau3AI* 不完全消化産物由来のゲノミックDNAライブラリーより、トウモロコシ *Mu* トランスポゾンの制御因子、自律性の *MuDR* の各部分をプローブとして相同性DNAの探索を行った。プローブは逆位末端反復配列部の *XmnI-SaII*, *mudrB* の転写領域の *SaII-EcoRI*, 2つの転写領域の中間部 *Mu** 領域の *EcoRI-XbaI* ならびに *mudrA* の転写領域の *HindIII-HindIII* に対応する部分を用いた (Fig. 1)。プローブ洗浄の条件を弱く設定 (55度, 0.1% SDS, 2xSSPE) してハイブリダイゼーションを行ったところ、逆位末端部位と *Mu** 領域から10以上のクローンが得られた。これらは、その後の解析では非常に相同性の低いクローンであることがわかった。さらに、*mudrA* の転写領域に対応するクローンは4クローン (H1~H4) 得られたがいずれも同一クローンであることがわかった。

H1の制限酵素地図を作成し、詳細な相同性領域の探索を行ったところ、*PstI-XhoI* 断片が非常に強い相同性を示すことがわかった (Fig. 1)。この断片ならびに近傍領域のサブクローニングと塩基配列の決定、PX1塩基配列の決定を行った。その結果、426 bpの対応部分間で *MuDR* のトランスポゼース領域 (TNP領域) とDNAレベルでは69%, アミノ酸レベルでは64%の相同性があった (Fig. 2)。さらに、ORFがギャップなしで保存されていたため、この領域の機能の存在が推定された。この領域内で *MuDR* とイネ TNP 様領域に保存されている箇所にプライマーを設定して、後に述べる单子葉植物からの TNP 領域のPCR増幅を行った。塩基配列決定を遂行中であるが、現在のところ、100bp以上の逆位反復配列の存在が検出されており、今後全塩基配列が決定すればそれ以上のサイズになると推定される。

次に、クローニングした領域をプローブとして用いることでゲノム内でのコピー数の推定を行った。陸稲 (Up1), インド型系統 (Acc001), 日本型系統 (FL280) ならびに Standard *Mutator* 系統をそれぞれ *MuDR* の末端を切断する酵素である *SacI*, *EcoNI* で消化後、PX1プローブでサザンハイブリダイゼーションを行った。*MuDR* は *SacI* ならびに *EcoNI* でそれぞれおよそ4.9Kbのバンドを生じるが、PX1は *MuDR* 内部の TNP 領域との相同性が核酸レベルで69%しかないため、トウモロコシからのバンドを検出できなかった。しかし、イネ系統においては日本型で *SacI* では主要なシグナルである1本のバンド、*EcoNI* では2本のバンドを生じ、インド型では1本のバンドを生じた。このプローブの左右のDNA領域をプローブ化して、それぞれEX1ならびにEX2.6とした。これらをプローブPX1で得られたサザンハイブリダイゼーションの結果を比較することで、クローニングされた断片の特徴を明らかにすることを試みた。

PX1との周辺には *SacI* 認識サイトがないことがインド型系統IR36のクローンから推測されていたが、EX1, EX2.6をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションではインド型及び日本型のいずれも複数のバンドを検出できた (Fig. 3)。PX1で検出されるシグナル以外に、両側のプローブに共通なシグナルが得られたことから、TNP領域の両側にトランスポゾンの末端反復配列に相当する配列の存在していることが推測された。現在の塩基配列の調査から100bp以上の逆位反復配列が検出されているので、この配列であると考えられる。さらに、High stringency 洗浄バッファー (0.1% SDS, 0.1x SSPE) に65度の条件では、背景に複数の不鮮明なバンドを検出した。これらは各プローブに対応して低い相同領域を検出したと考えられる。

その後、Stringency条件を洗浄バッファーは0.1% SDS, 0.1x SSPE, 洗浄温度を65度にして、EX1プローブを用いてX線フィルムへの露光時間を変えてバンドの検出を行った。1日では主要なバンドのみ、3日露光では背景の不鮮明なバンドを多数検出した (Fig. 4)。

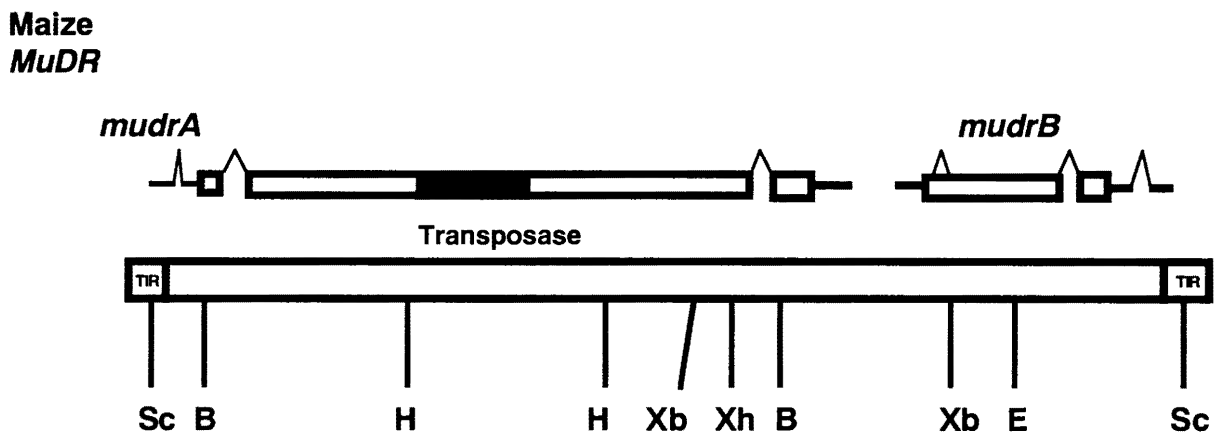
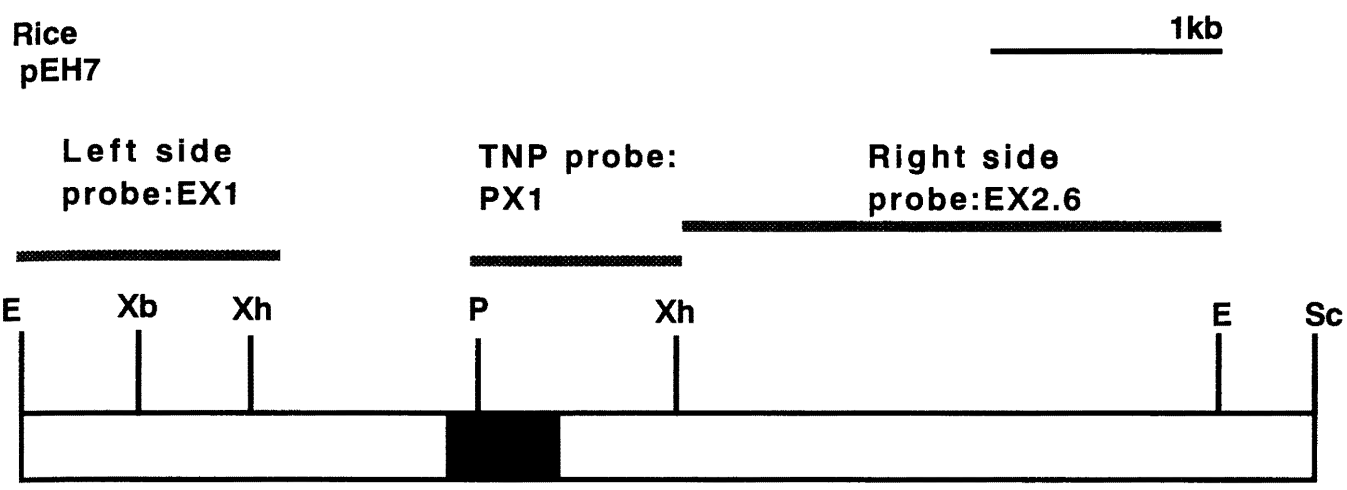


Fig. 1. Restriction map of H1 clone. Black box indicates the highest homology to the putative transposase domain of maize *Mutator* transposable element.

	10	20	30	40
<i>MuDR</i>	WKEAVIAVMP	DSVIEIDVIL	EDGKYYFSRF	FCAFGPCISG
	W* AY* P	SVIEID I	DGK YF*RF	FCA**PCI*G
Rice	WRAAVMERSP	GSVIEIDTIE	VDGKVYFNRF	FCALSPCITG
	50	60	70	80
<i>MuDR</i>	FRDGCRPYLS	VDSTALNGRW	NGHLASATGV	DGHNWMYPVC
	F GCRPYLS	V STALNGLW	GHLASA *	DG NWMYP*
Rice	FLTGCRPYLS	VNSTALNGLW	KGHLASAIAI	DGNNWMPYPIA
	90	100	110	120
<i>MuDR</i>	FGFFQAETVD	NWIWFMKQLK	KVVGDMTLLA	ICSDAQKGLM
	FGFF AET D	NW WFM QL	K**G ***LA	ICTDA*KGL
Rice	FGFFDAETTD	NWTWFMILL	KAIGKVSPLA	ICTDACKGLE
	130	140	142	
<i>MuDR</i>	HAVNEVFPYA	ERRECFRHLM	GN	
	*AV VFP A	*RECF HL	*N	
Rice	IAVHRVFPWA	GHRECFNHLT	QN	

Fig. 2. Consensus sequence of amino acids between the putative transposase domain of *MuDR* and the rice homolog. * showed considerable substitutional amino acids.

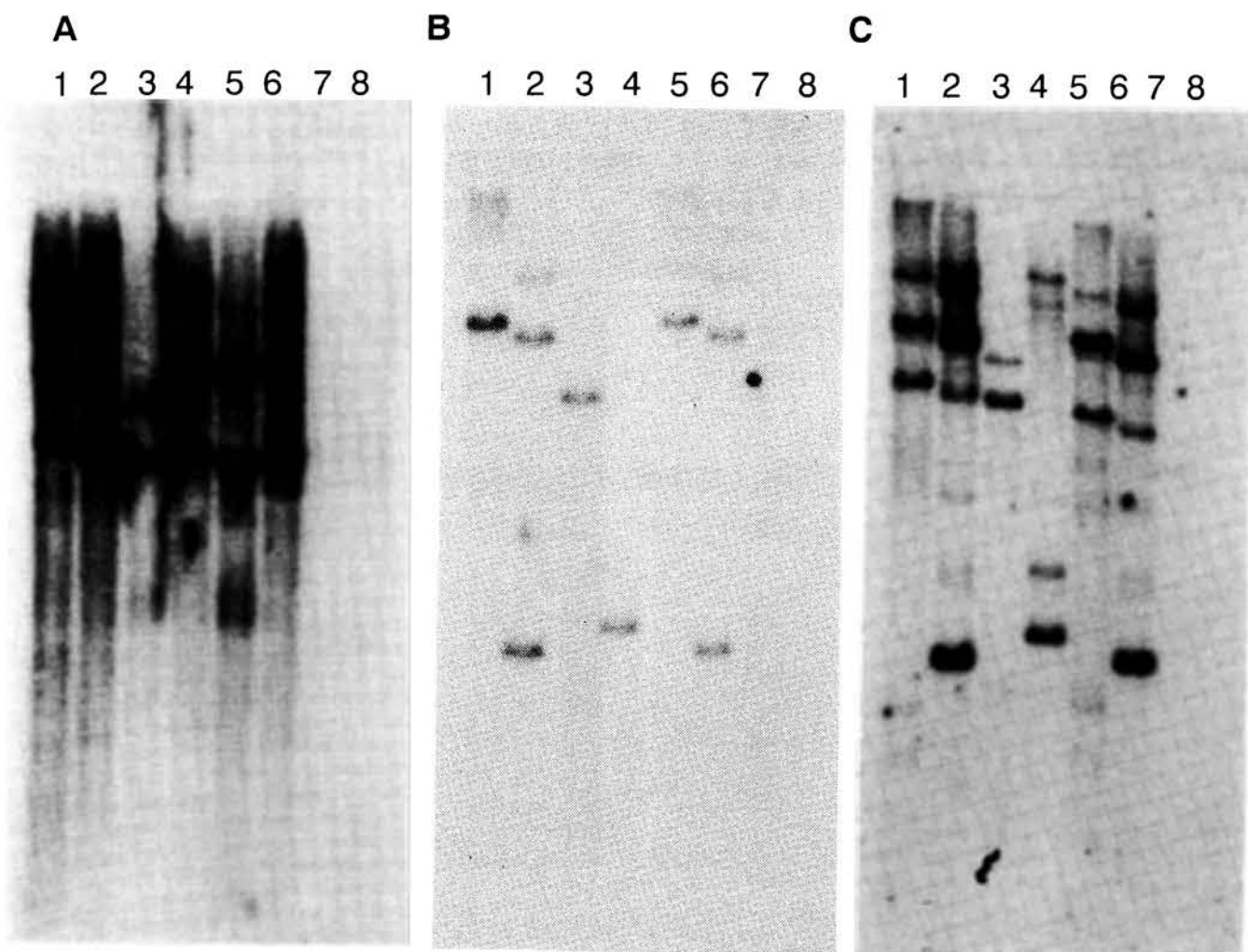


Fig. 3. Hybridization analysis to estimate copy number of rice homologs carrying TNP-like domain, probed with EX1 (panel A), PX1 (panel B) and EX2.6 (panel C). RFLPs were detected among Japonica upland strain (lanes 1 and 2), Indica strain (lanes 3 and 4), Japonica lowland strain (lanes 5 and 6) and miase standard mutator strain (lanes 7 and 8). Genomic DNA was digested with *SacI* (lanes 1, 3, 5 and 7) and *EcoNI* (lane 2, 4, 6 and 8).

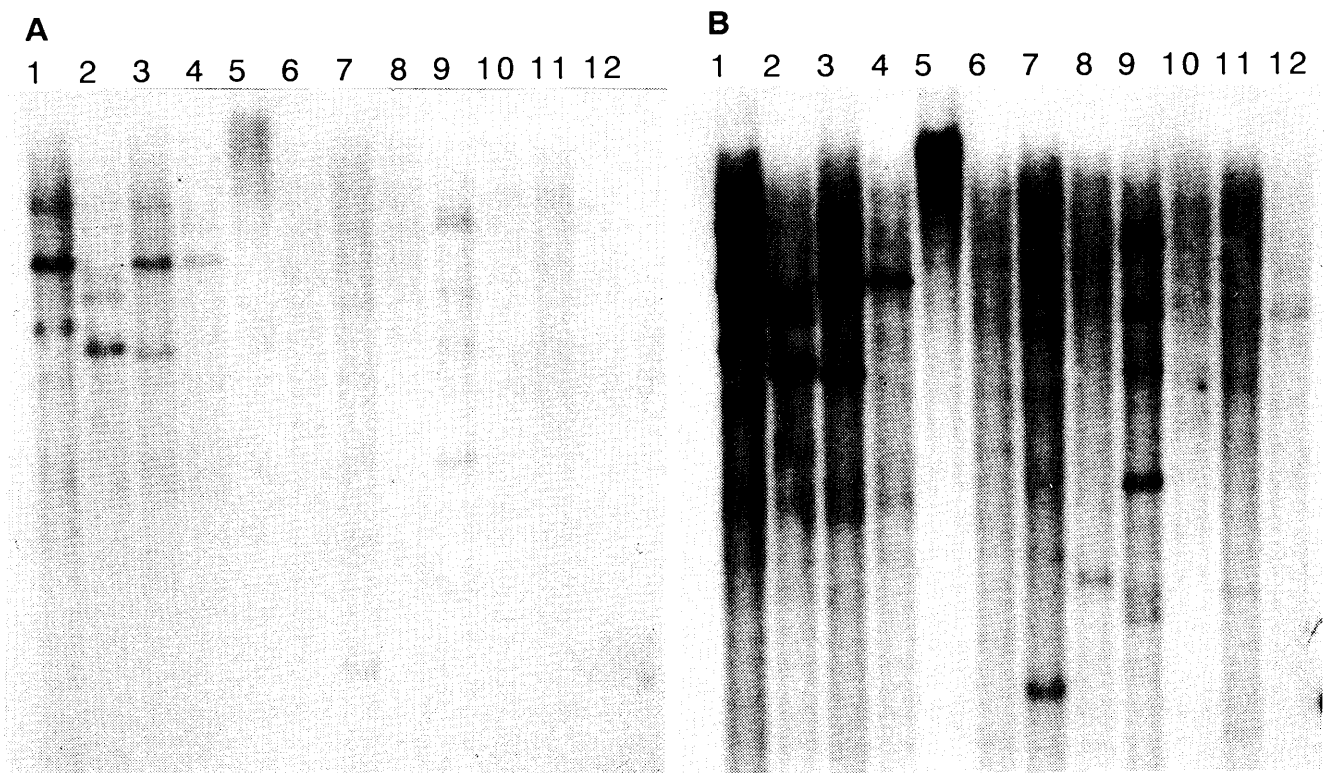


Fig. 4. Hybridization analysis with different exposure when probed with EX1. Panel A and B were exposed to X ray films for one day and three days, respectively. Lanes 1 to 12 indicated Japonica upland, Indica, Japonica lowland, W120, W0025, W0833, W1185, W1627, W1577, W0002, W1318, and maize Standard *Mutator* strain with *SacI* digestion.

このことからこの領域に対応する反復配列がゲノム内に存在することがわかる。また、異なる野生イネゲノムではこれらの低相同配列の領域にRFLPの生じていることが明らかとなった。

2. 単子葉植物における相同配列の探索とクローニング

TNP領域内の保存箇所を設定したプライマーによるPCR増幅を行って、いずれも同じサイズの産物を検出したが、FFゲノムのみ増幅産物が得られなかった。もっとも再現性の高いプライマーF2-r3の組合わせで得られたものをベクターに挿入して増幅産物の塩基配列を決定した（プライマーの塩基配列は投稿中）。クローンの由来はインド型品種のIR36であったが、野生イネゲノムから得られたクローンは日本型よりも高い相同性を示し、いずれのイネ系統間でも90%以上の相同性を示した(Table 1, Fig. 5)。

単子葉植物のクマザサ及びショウガからPCR増幅を行ったところ、プライマーF2-r2の組合わせでのみ増幅産物が認められた。これら増幅された場合について、T突出ベクターを用いて直接クローニングを行った。クローニングされたPCR産物の塩基配列からは53%以上の相同性が検出され、各系統間での遠縁性も明らかにされた(Table 2, Fig. 6)。興味深いことに、トウモロコシの*MuDR*の対応領域はイネに近く、それらに比較してササとショウガは比較的相同性を有していた。これら配列は、低い相同性を有する各単子葉からのトランスポゾン様配列をクローニングする際に重要なプローブとして利用できよう。

Table 1. Homology (%) of TNP-like domain among different rice genomes compared with that of *MuDR* at DNA and amino acids levels, respectively.

DNA aa	J. Upland	J. lowland	Indica	Perennial Wild	<i>MuDR</i>
J. Upland		100	99	96	74
J. lowland	100		99	96	74
Indica	97	97		96	74
Perennial Wild	90	90	91		73
<i>MuDR</i>	73	73	73	72	

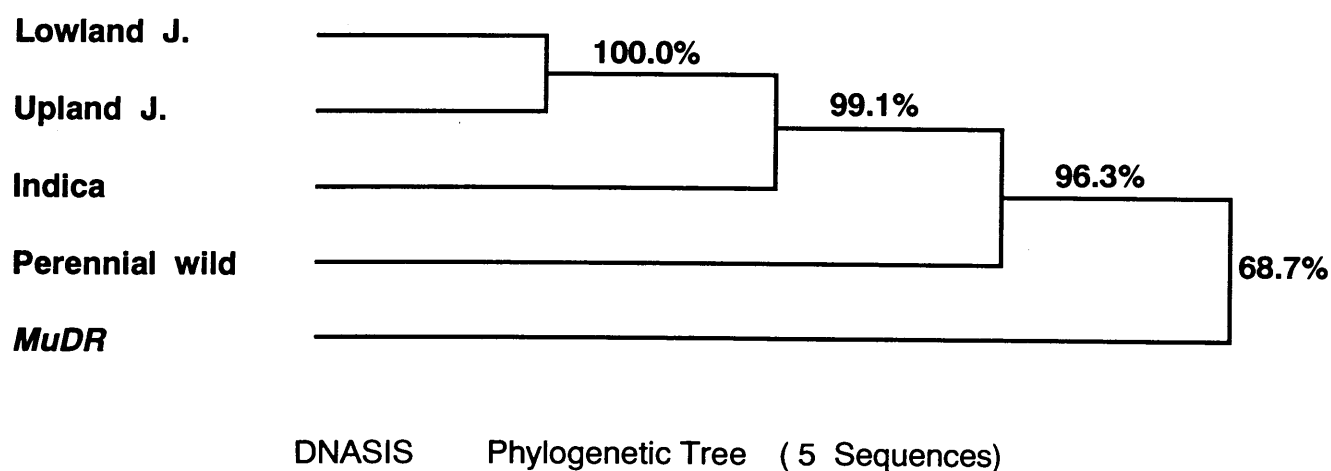
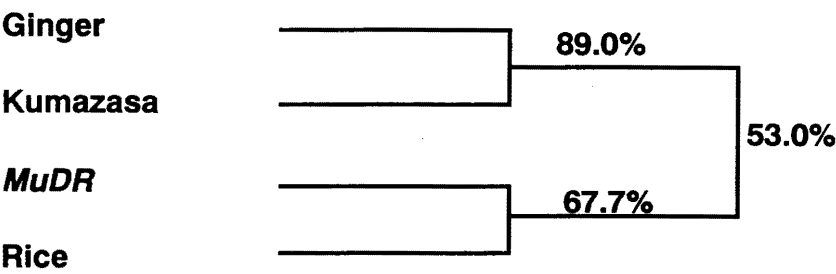


Fig. 5. Phylogenetic tree of TNP-like domain among Japonica upland, Japonica lowland, Indica and perennial wild relative having AA genome and *MuDR*.

Table 2. Homology (%)of TNP-like domains among rice, Kumazasa, Ginger and *MuDR* at DNA and amino acids levels, respectively.

DNA aa	Rice	Kumazasa	Ginger	<i>MuDR</i>
Rice		69	68	73
Kumazasa	59		93	61
Ginger	34	30		
<i>MuDR</i>	67	50	30	



DNASIS Phylogenetic Tree (4 Sequences)

Fig. 6. Phylogenic tree of TNP-llike domains among rice, Kumazasa, Ginger and *MuDR*.

III.. イネにおける *Mutator* の解析

材料及び方法

植物材料

植物材料は学内水田で育成して成葉からDNAを抽出した。野生イネは国立遺伝学研究所から分譲していただき、成葉からDNAを抽出した。さらに、イネで検出されたTNP領域のORFの転写機能を明らかにするためにRT-PCRを用いて転写産物の確認を行うために成葉からRNAを抽出した。全RNAはIR36ならびにAcc504から幼植物ならびに成葉を用いて液体窒素で破碎後、抽出した。混在しているDNAはRNaseFreeのDNaseで消化して試料中に混在するDNAを鋳型から除いた。さらに、日本型及びインド型品種群での転写をみるために、インド型としてAcc435、日本型として北海道のイネ系統A23、A26、A58からの全RNA抽出を行った。

RT-PCR

RNA抽出はグアニジン法で行った。新鮮な成葉を液体窒素で粉碎した後に、5mlの抽出バッファー (Guanidinium thiocyanate homogenization buffer; 100g Guanidinium thiocyanate as final 4.0M, 20ml 1M Tris-HCl pH7.5 as final 0.1M in 200ml)ならびに1% β -Mercaptoethanol, 125ul Sodium lauroyl sarcosinateを加えて500ulを1.5ml用のチューブに移した。10,000rpm, 10分遠心後、上澄み400ulを超遠心用のチューブに移し200ulの5.7MのCsCl溶液(48g CsCl, 900ul, 0.5M EDTA pH7.5 as final 0.01M in 50ml)を加えた。さらに、500ulのCsCl溶液を緩衝用に加えて、80,000rpm, 5時間(20度)遠心して沈殿したRNAをSDS/TE溶液(10% SDS in TE pH7.5)で溶出させてフェノール/クロロフォルム処理を行ってエタノール沈殿させた後にRT-PCR反応に供試した。100ugの全RNAに対してGIBCOBRL社のSuperScript™ RTキットの5X 1st strand buffer, 1ul RQ1Dnase (Promega社), 0.02ul RNasin (Promega社)を加えて2時間37度処理した。フェノール/クロロフォルム処理を行ってエタノール沈殿させた後に、25ug/9ulのRNAを逆転写反応に用いた。2ul oligo dT primer (37.5pm/ul)を加えて10分70度処理をした後に17ul反応液(6ul 5x 1st strand buffer, 0.5ul RNasin, 3ul 0.1MDTT, 2ul 10mM dNTP, 5.5ul deph₂O)を加えて2分37度処理、その後2ulのRNaseを加えて1時間37度処理、5分95度処理を行った。以上の処理後、2ulのcDNAを用いて通常のPCR反応を行って転写産物の有無をPCR反応増幅産物の有無で検定した。

結果及び考察

1. イネ栽培種におけるRFLPの検出

IR36のクローンにおける制限酵素サイトからトランスポゾン様配列の領域内では切断しないSacIサイトの存在することが明らかであり、このサイトを利用して、TNP領域PX1をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行って相同領域のコピー数を推測した。

栽培イネでは日本型、インド型品種間で多型が検出され、クローン中央で切断しないSacI消化では少なくとも4コピー存在することが検出された (Fig. 7)。すべての制限酵素消化においても共通なサイズのバンドはオルガネラDNA内における同因子の存在、もしくはMuトランスポゾンで検出されたような細胞質内で検出されるMuサークルの存在を推測させる。

*SacI*でゲノミックDNAを切断した後に行った野生イネを含むサザンハイブリダイゼーションでは、一年生野生イネならびに多年生野生イネで4ないし5コピーの存在が推定された (Fig. 8) . 共通して同じサイズのバンドが検出されたが、それ以外はRFLPを示した。他のゲノムでもそれぞれ数コピーの存在がみられたが、相同性が低くシグナルが薄かった。イネゲノム内で相同性因子の遺伝的分化が起こっていると推測される。

2. TNP領域の転写

日本型品種Acc504, A23, A26, A58からはどの生育段階でも主要なPCR産物を確認できたため、対応するTNP領域の転写されていることがわかった。しかし、IR36及びAcc435系統では明かな増幅産物が得られなかったため、少なくとも幼苗ならびに成葉での対応領域の転写がないものと推定された (Fig. 9,10)。

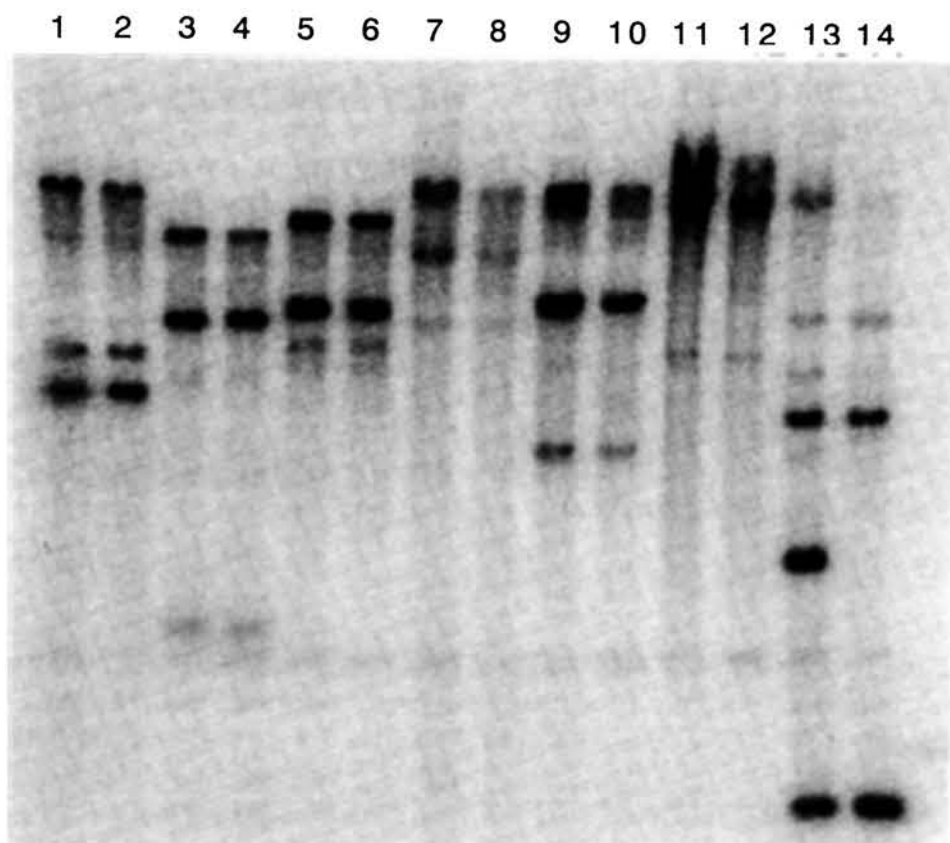


Fig. 7. RFLPs detected between Japonica strain (KL403, odd number lanes) and Indica strain (Acc435, even number lanes) probed with PX1. Genomic DNA was digested with *Bam*HI (lanes 1 and 2), *Eco*RI (lanes 3 and 4), *Hind*III (lanes 5 and 6), *Pst*I (lanes 7 and 8), *Sac*I (lanes 9 and 10), *Sal*I (lanes 11 and 12), and *Xho*I (lanes 13 and 14).

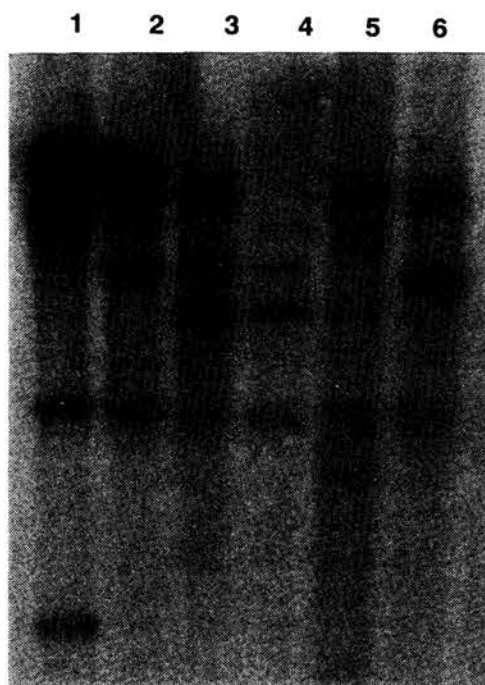


Fig. 8. RFLPs probed with PX1 among Japonica strains (lanes 1 and 2), Indica strains (lanes 3 and 4), wild relatives carrying AA genome (lanes 5 and 6). Genomic DNA was digested with *Sac*I.

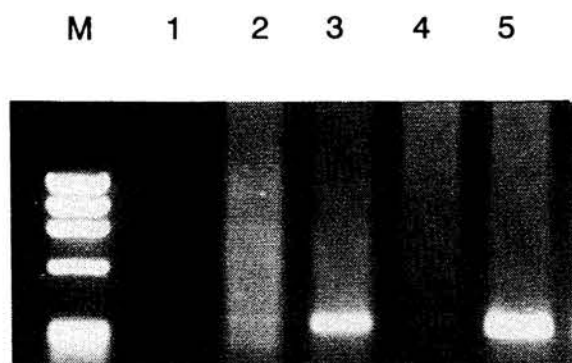


Fig. 9. Detection of transcripts by RT-PCR with the primer pair designated inside of TNP-like domain. M indicates marker, ϕ X174 digested with *Hae*III. Lane 1 is negative control. Template cDNA in lanes 2 and 4 and those of 3 and 5 was synthesized with RNA extracted with young seedlings and mature leaves of Indica IR36 and Japonica Acc504, respectively.

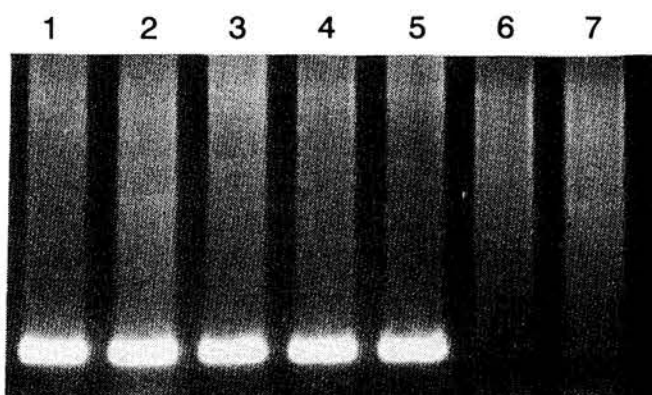


Fig. 10. RT-PCR analysis among Japonica strains (lanes 1 to 5) and Indica strains (lanes 6 and 7). RNA was extracted with mature leaves.

IV. 活性を有するトランスポゾンの解析

材料及び方法

植物材料

植物材料は学内水田ならびに金木農場で育成し、突然変異体を観察した。アイソザイムの解析は石川(1994)に基づいて行った。さらに成葉からDNAを抽出して、サザンハイブリダイゼーションに供試した。もち遺伝子ならびにADHは既に様々な植物でトランスポゾンの挿入変異が報告されている(Fedroff *et al.* 1983, Freeling and Bennett 1985, Dolferus *et al.* 1990, Wisman *et al.* 1991)。これら遺伝子内における挿入変異のスクリーニングのため水稻と陸稲からうるち系統ならびにもち系統を収集してもち遺伝子を、さらに異なるADHの対立遺伝子を有する系統を供試してADHの内部配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を行った。

結果及び考察

1. 挿入変異の探索

もちプローブは塩基配列に基づいて鋳型としてAcc504を供試したPCR増幅を行って作出した。増幅配列はゲノミックDNAの2262-3611 bpを標的としてクローニングした産物を末端塩基配列を決定して利用した。イネゲノミックDNAは数種類のPstIで制限酵素で切断した後にサザンハイブリダイゼーションを行った。うるち系統としてインド型品種のIR36ならびに日本型の在来水稻を供試した(Fig. 11)。反復配列がバックグランドに出現したが、これはプローブ内に挿入していたpSINE1-r2と相同のものと考えられた。L32はアイソザイムでは日本型だが、このパターンではIR36と同じであったことから品種の由来が興味深い。もち系統ではいずれの栽培系統にもRFLPが検出されなかったことから、プローブで検出される領域外で変異をおこしているか、うるち系統と差異が検出できない程度の極微細な挿入もしくは欠失、点突然変異によって生じたものと推測される。陸稲においても同様に顕著なバンドサイズの変更を伴う変異は検出されなかった。陸稲はもち系統が数多く認められるが、これらには水稻と異なる特別な変異が生じたよりも、一般的なもち遺伝資源が陸稲のもち系統として選抜されたものと考えられる。

アルコール脱水素酵素(ADH)はMutatorのクローニングされた遺伝子トラップとしても有名であるが、イネにおいてもnull型の系統が検出されている。その系統の遺伝子構造の解析のために、ランドマーカーとして分譲されているcDNAプローブを供試した。植物供試材料としてはADH 1 座の1 (日本型Acc504), 2 (熱帯日本型Acc224), 3 (熱帯日本型Acc347), ならびにnull (熱帯日本型Acc624) 変異型を用いた。2種類の制限酵素で切断したがRFLPは観察されなかったため、いずれの対立遺伝子も点突然変異による電荷ならびに正常な転写領域の変異による発現の欠失と考えられる。特に、null型では他の対立遺伝子とのヘテロ型でハイブリッドバンドが検出されるため、転写レベルでの変異よりも翻訳レベルでの異常な翻訳やアミノ酸配列変異などによる活性の消失が表現型nullの原因であると考えられる。

ホスホグルコースイソメラーゼ (PGI) には、Pgi-1, Pgi-2及びPgi-3と3遺伝子座が報告されており、それぞれnull型が検出されている(石川 1994)。さらに、Pgi-1及びPgi-2ではハイブリッドバンドを形成するがそれ自体のバンドが検出されない表現型を示

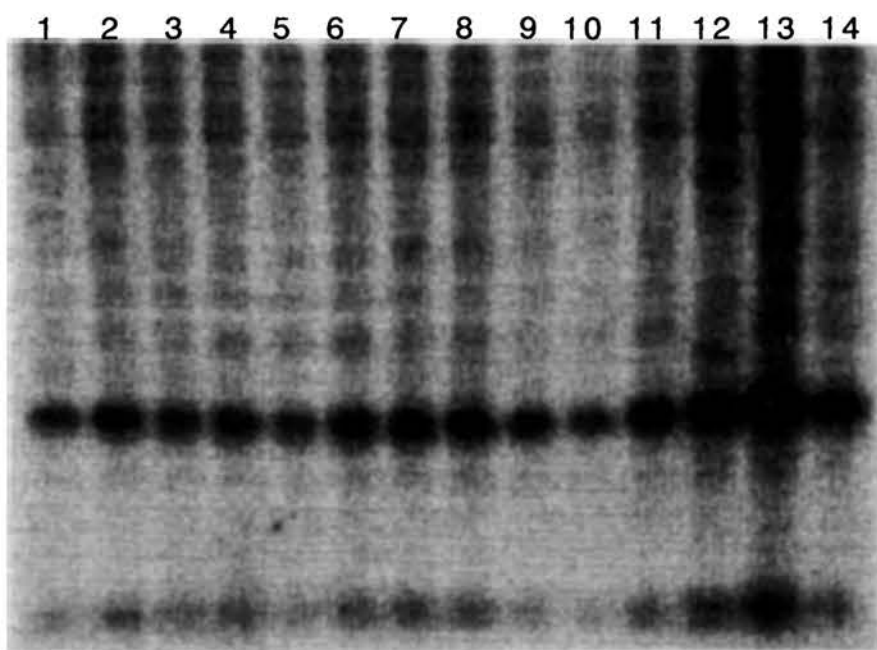


Fig. 11. Southern hybridization probed with wx. IR36 (lane 1) and lowland strains (lanes 2 to 14) were digested with *Pst*I. Lane 13 was L32 (Nagaokaho) showing Indica like repeatitive pattern hybridized to *pSINE1-r2* locating inside of wx probe.

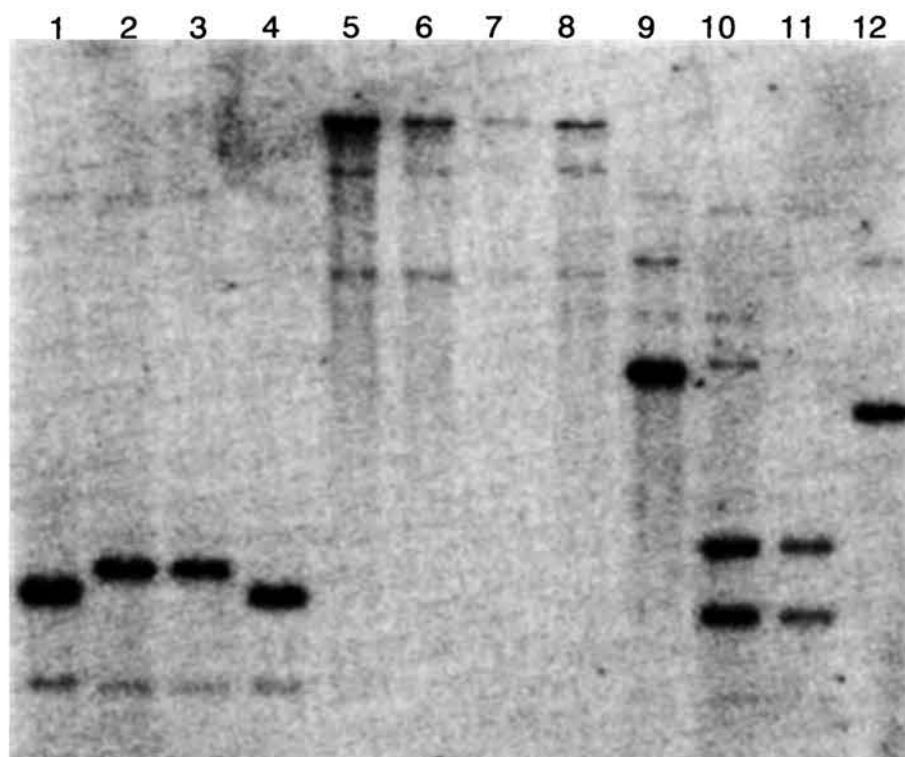


Fig. 12. Southern hybridization probed with PGI among Acc504 (lanes 1, 5 and 9), IR36 (lanes 2, 6 and 10), J328 (lanes 3, 7 and 11) and L192 (lanes 4, 8 and 12). Genomic DNA was digested with *Eco*RI (lanes 1 to 4), *Sal*I (lanes 5 to 8) and *Sac*I (lanes 9 to 12).

す。cDNA解析からPGIの塩基配列が報告されており、5'および3'領域にプライマーサイトを設定してAcc504を対照として*Pgi-1*のnull型系統との鋳型からPCR増幅産物のクローニングを行った。

上流領域に対応するプライマー組合わせではnull型のJ328、野生型遺伝子を有するAcc504系統から1 kbのサイズの産物が得られた。エキソンから推定されるサイズより大きいのでイントロンを含んでいると推定される。下流ではJ328から1.3ならびに1.4kb、Acc504では1.2ならびに1.15kbのサイズの増幅産物が得られた。現在、クローニングして塩基配列を決定しているが、遺伝子ファミリーを構成する*Pgi-1*及び*Pgi-2*に対応する断片を増幅したものと考えられる。さらに、Acc504からの産物をベクターに導入して塩基配列を決定後、プローブとして用いて、Acc504及びJ328を*EcoRV*、*SaII*ならびに*SacI*制限酵素で切断してサザンハイブリダイゼーションを行った(Fig.12)。*SaII*では多型が認められず、*EcoRI*では日本型とインド型間での多型が見られたがnull型と正常型での差が見出せなかった。*SacI*で消化した場合はIR36とJ328では多型が見られなかったが、Acc504に対してL192ではサイズの異なるバンドが検出された。今後、この領域のクローニングと挿入配列の有無を解析する予定である。

2. 培養細胞と再分化個体でのサザンハイブリダイゼーション

TNP領域近傍の変異が細胞培養時に生じるソマクローナル変異を検出するためにアキヒカリの培養細胞ならびに再分化個体のDNAを用いてサザンハイブリダイゼーション解析を行った。EX1領域をプローブとして用いたところ複数のバンドが検出されたが、明瞭なRFLPは検出されなかった。今後、相同性を有する各ファミリーに特異的な領域をクローニングして、サザンハイブリダイゼーション解析を行う必要がある。

3. 易突然変異体の解析

1) 北海道系統の自殖後代における易突然変異体

北海道のイネ北限領域が拡大していった育種的背景として、赤毛以降の突然変異の蓄積があげられる。特に、赤毛以降、坊主、坊主5号と北海道のイネの北限が進展していった。さらに、赤毛の後代では劣性遺伝子*d1*を自然突然変異で誘発した大黒(A23)、*d2*を誘発した夷(A26)、優性遺伝子*Ur-1*を誘発した風連坊主(A32)が出現している。

弘前大学内の水田において1994年にA23から縞葉様の葉を有する分げつが生じ、この自殖後代を1996年に栽培したところ、キメラ様の葉を有する個体が複数出現した(Fig. 13)。

次に1996年の自殖個体から各20種子をランダムに抽出して、催芽後3葉期に白色光下で緑化させて葉色の変異を観察した。縞葉葉とアルビノ葉の個体が分離したが明らかな遺伝子分離を観察できなかった。さらに、完全に緑色と白色の葉色のキメラ状個体、双子胚植物などを検出した(Table 3, Fig. 13)。また、キメラ状個体の中には植物体の半分が白色、残りが緑色の個体が存在したため、胚形成後の極初期にキメラ現象が生じることがわかる(Fig. 13)。この自殖後代からDNAを抽出して、TNP領域近傍のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション解析を行った。*PstI*で消化した個体をTNP領域PX1でサザンハイブリダイゼーションを行ったところRFLPは検出できなかったが、*XhoI*によって多型が認められた(Fig. 14)。自殖後代はすべて大黒型わい性を示し花粉などの混入はないため、バンドの変異はプローブ部分と相同な領域を含むDNA断片の転移を検出したものと考えられる。

Table 3. Mutation rate determined from reciprocal crosses between Indica Acc435 and other Japonica strains

Strain	No. of plants	Total mutants	No. of mutants		
			Albino	Chimera	Twin embryo
1	20	4	3	1	0
2	20	0	0	0	0
3	20	0	0	0	0
4	20	0	0	0	0
5	20	4	3	1	0
6	20	0	0	0	0
7	20	1	1	0	0
8	20	1	1	0	0
9	20	8	3	5	0
10	20	0	0	0	0
11	20	3	2	1	0
12	20	3	3	0	0
13	20	2	1	1	0
14	20	3	0	3	0
15	20	5	4	1	0
16	20	1	1	0	0
17	20	0	0	0	0
18	20	0	0	0	0
19	20	1	0	0	1
20	20	1	1	0	0

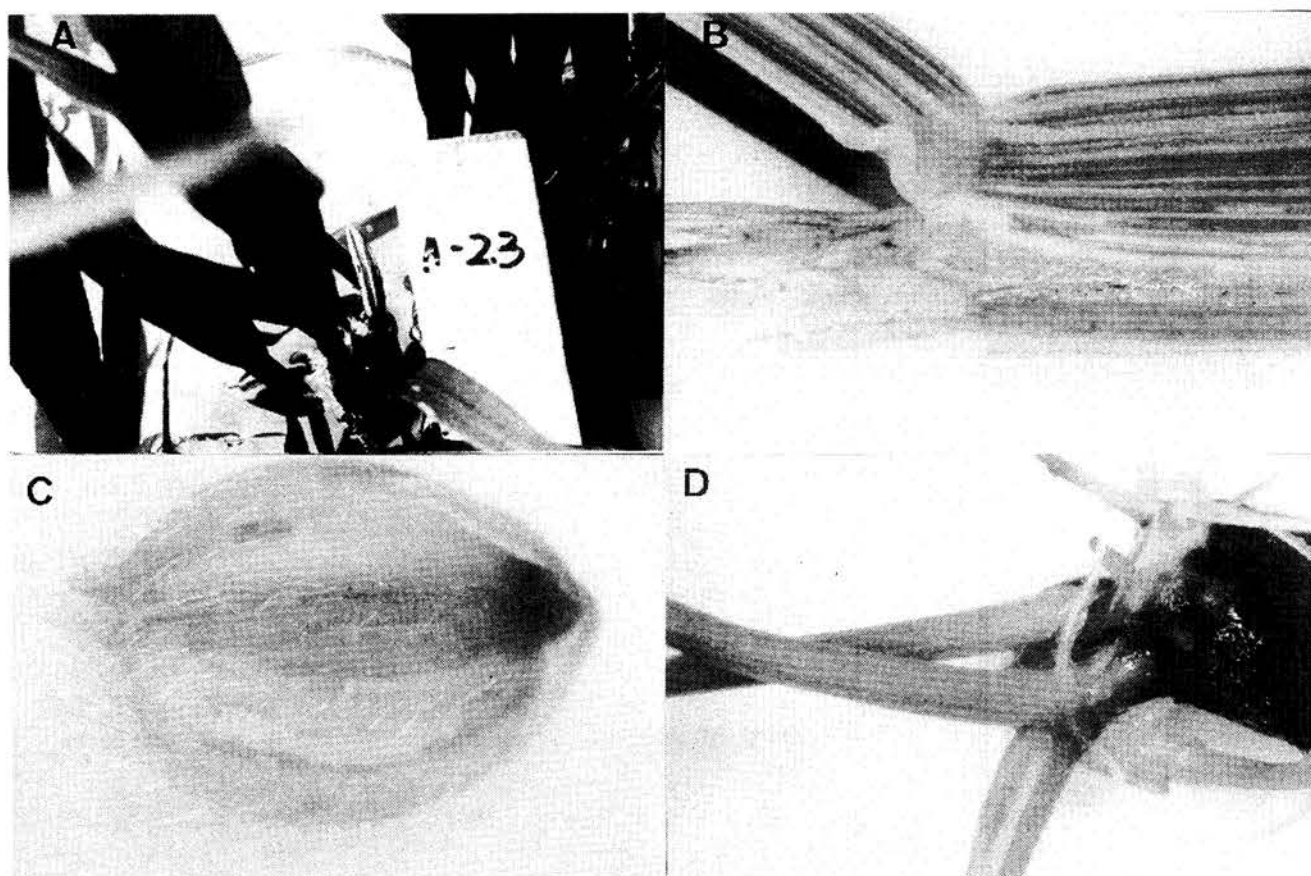


Fig. 13. Mutations generated in the self-pollinated progeny of A23. Panel A is a tiller with fine strip found in 1994, panels B and C are mature leaf and hull with fine stripe , which obtained at 1996, and panel D is twin seedlings found in the progeny of the plants grown at 1996.

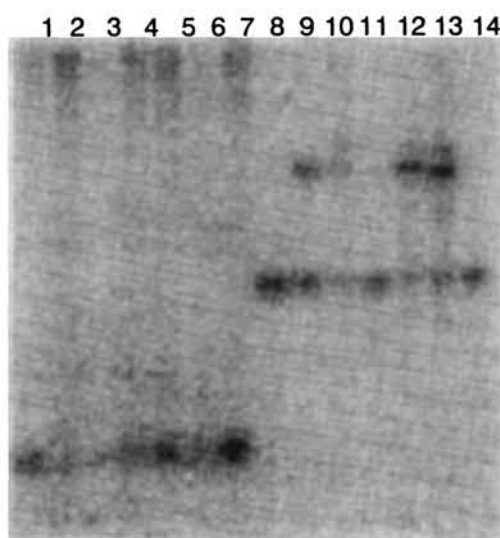


Fig. 14. RFLPs in the self-pollinated progeny of A23 carrying recessive gene *d1* for homozygous condition, probed with PX1. Genomic DNA was digested with *Pst*I in lanes 1 to 7 and *Xho*I in lanes 8 to 14.

A15は葉舌をもたない*liguleless*変異体であるが、自殖後代を育成したところ1個体の*liguleless*+個体が出現した(Fig. 15). さらに、*lazy*変異体を後代で分離した。*lazy*については正常個体との分離比が1:3であったため、親個体がヘテロ型であったと推測される。*Ig*⁺と*Ig*個体をそれぞれ*Pst*I, *Hind*IIIならびに*Eco*RIで消化してPX1プローブでサザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、*Pst*Iで明瞭なRFLPを検出した(Fig. 16). この多型はEX2.6プローブによっても検出された。*Ig*の分離とこのRFLPの連鎖関係は自殖個体における*Ig*とRFLPの分離の連鎖解析によって明らかにできよう。

87ACC601は優性の赤斑遺伝子*Rc*と劣性のゼブラ斑*zt*を標識遺伝子として有する(Fig. 17). しかし、1995年度に一部の分けつから白色の粒色を示す玄米を有する穂を検出した(Fig. 17). この個体から赤色の玄米と白色の玄米を取り出して1996年度に育成した。赤色の玄米後代では赤色と白色の玄米が18:6と3:1に分離したため、親は*Rc*についてヘテロ型であったことがわかった。さらに、白色の玄米後代では白色の個体のみが得られるはずであったが、玄米色の分離(8:14)を生じた。しかし、全個体が劣性のゼブラ斑を表現型として示したため、この系統についても花粉らの混入は可能性として考えられない。1995年以前に相同染色体上の1つの*Rc*遺伝子が*rc*に突然変異を生じ、その個体上の一部に残った*Rc*遺伝子の突然変異を生じたものと考えられる。ただし、細胞系列の一部に*Rc*を有する細胞が存在していたため、受精個体の果皮色は白色の母親細胞の表現型を示したものの、*Rc*遺伝子を有する細胞(花粉)との受精により、白色の玄米後代でも赤色の玄米を生じた後代が得られたものと推測される。トランスポゾン*Ac*がトウモロコシの*myb*遺伝子*P*に挿入Hotspotの存在が報告されており、変異の原因が興味深い(Grotewold *et al.* 1991)

PX1プローブによりゲノミックDNAを*Sac*Iの制限酵素で消化しサザンハイブリダイゼーションを行ったが、RFLPが認められなかった(Fig. 18). 今後、トランスポゾン様配列の各領域をプローブとして、*Rc*の遺伝子型と対応する多型を検出することが必要である。

A1系統は耐冷性の北海道品種を生み出していった親系統である。この品種の自殖後代を展開してサザンハイブリダイゼーション解析を行った。*Sac*I消化による多型は見られなかったが、*Xho*I消化によるサザンハイブリダイゼーションではPX1, EX2.6の両プローブによる多型が検出された(Fig. 19). PX1では個体4, 5, 16, 17, 20, 21, 24ならびに25に新たなバンドが出現した。この自殖後代では出穂期やのげの存在から他種の花粉の混入などは前世代で生じていないと考えられることから、TNP領域を有するDNA断片の転移が起こったものと推定される。さらに、これまでサザンハイブリダイゼーション及び解析中の塩基配列から末端反復配列が存在するEX2.6プローブでは個体5, 16, 17, 20, 21, 24及び25のみに対応する新たなバンドが検出された。個体4の3.4kbのバンドはIR36のクローンの有していた末端配列と相同性が低いTNP領域については高い相同性を有するDNA断片と推定される。さらに個体4ではPX1のみでRFLPが観察された事象はTNP領域に相同性を有しながらも末端反復配列部分の相同性が異なるものと推定される。*Mutator*ファミリーにおいても末端の相同性は70~90%とファミリー間で異なるためイネにおいても同様なファミリー分化が生じていることを推察させる。今後、IR36の各領域に対応するクローンを日本型イネからクローニングする事によって*Mutator*-likeファミリーの構成を知ることができよう。

2) Acc435系統との交雑における雑種崩壊性と易突然変異体

Acc435系統は日本型系統との交雑後代で通常では異常分離を生じる第12染色体の標識遺伝子について正常な分離を示す。さらに、これまで異常な頻度でアルビノやキメラ植



Fig. 15. A wild type plant for *liguleless* phenotype (left plant) compared with *liguleless* and *lazy* phenotype segregant found in the same progeny (right plant) in the self-pollinated progeny of A15.

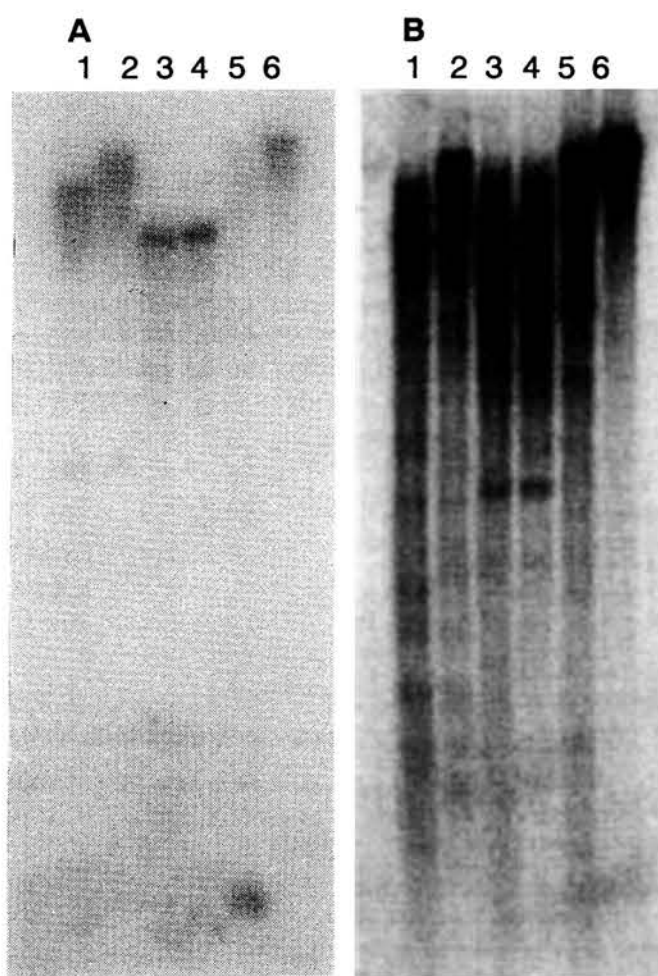


Fig. 16. RFLPs between *ligules*⁺ and *liguleless* plants in the progeny of A15, probed with PX1 (panel A) and EX2.6 (panel B). Genomic DNA was digested with *Pst*I (lanes 1 and 2), *Hind* III (lanes 3 and 4) and *Eco*RI (lanes 5 and 6).

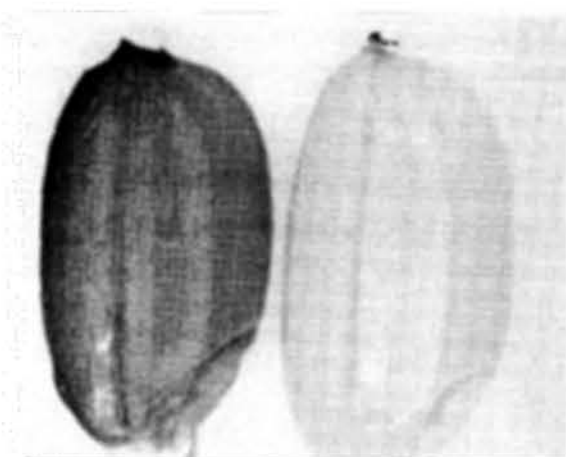
A**B**

Fig. 17. Segregation of pericarp color among the tiller of 87ACC601 which initially carried with *Rc* and zebra leaf, grown in 1995 (panel A) and self-progeny plants representing phenotype of recessive gene, *zebra* in the self progeny.

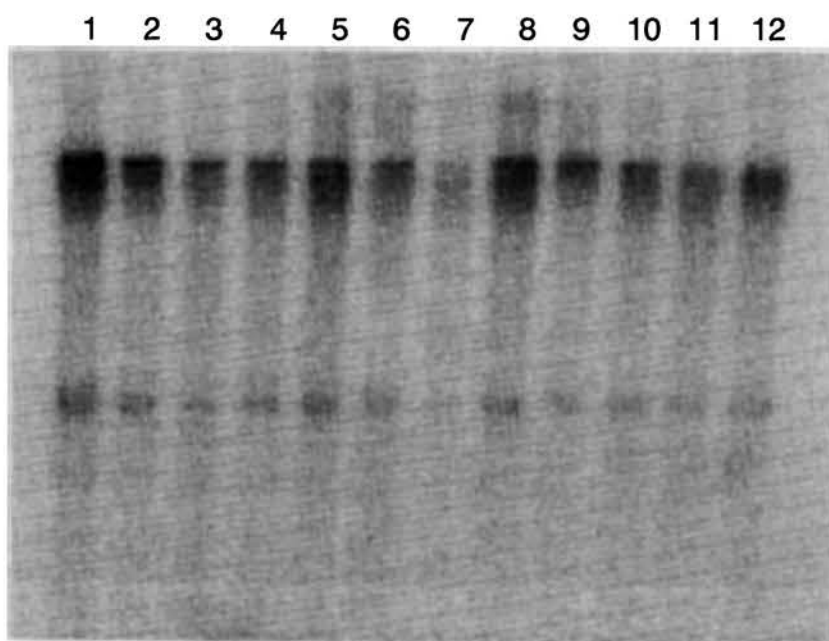


Fig. 18. RFLPs in the progeny of plants showing *Rc* phenotype (lanes 1 to 6) and *rc* phenotype (lanes 7 and 12) probed with PX1. Genomic DNA was digested with *Sac*I.

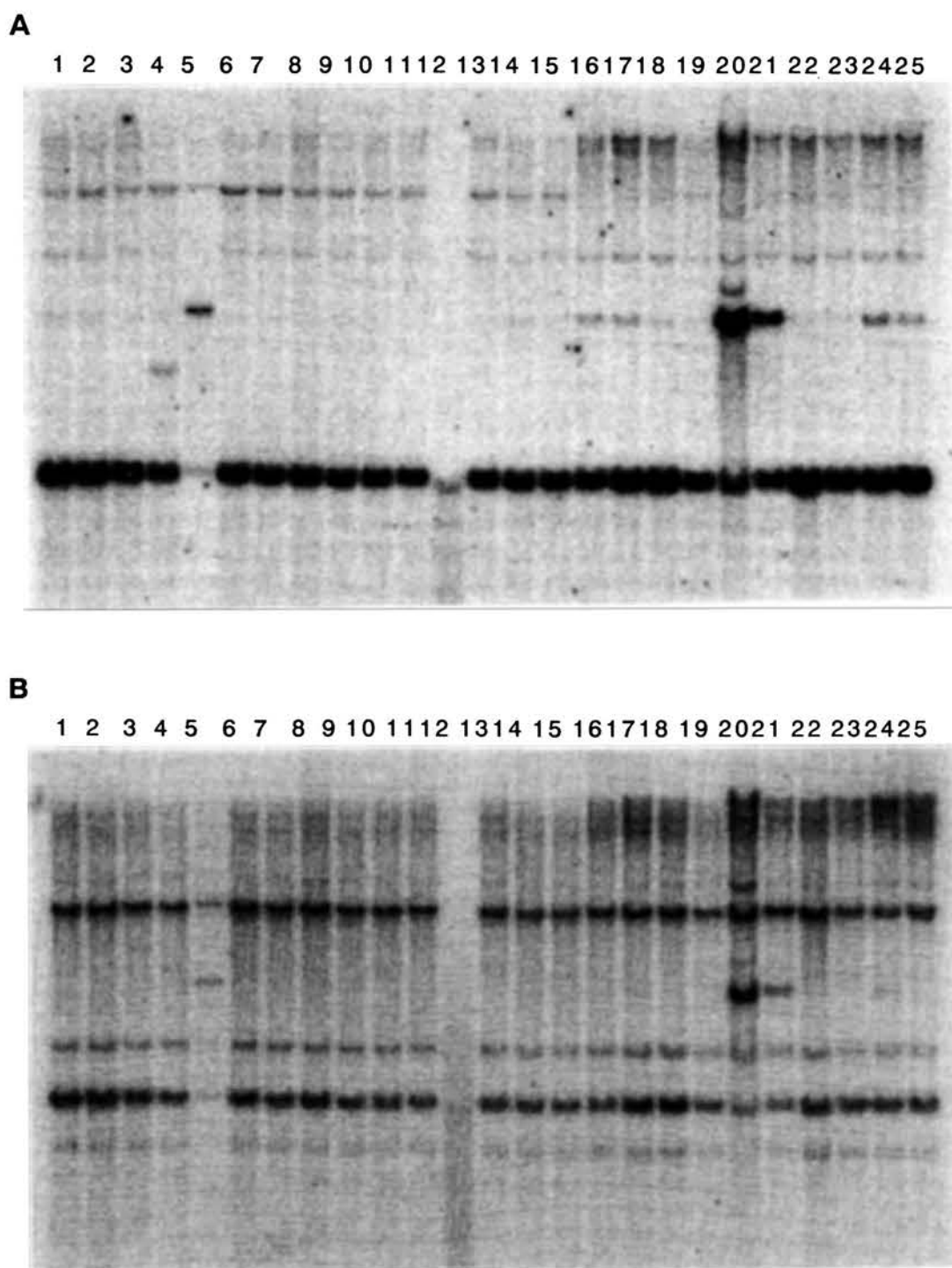


Fig. 19. RFLPs appeared in self-pollinated progeny of Akage strain (A1). Genomic DNA was digested with *Xho*I and hybridized with PX1 (panel A) and EX2.6 (panel B).

物個体を生じることが著者により観察されていた。この現象は他のインド型と日本型品種やそれぞれの品種群内交雑では認められない。

この現象を遺伝的に解析するために相反交雑集団と世代以降の後代系統で調査した。インド型品種のAcc435に対して、日本型のAcc504, T65(Hg), L119及び奥羽195号を供試して相反交雑F₁を作出して、温室で育成した後に自殖F₂種子を採取して、催芽後幼植物に生じる変異を観察した。

アルビノは日本型を母親にして交雑した場合に0.5%の頻度で生じ、緑葉中に生じる白色組織のキメラ個体がAcc435を母親系統にしてAcc504系統を交雑した場合に同じく0.5%の頻度で生じた(Table 4)。A38xAcc435の組合わせのF₂集団ではアルビノ個体はなく、キメラ個体が88個体中に2個体生じており、この頻度は明らかにアルビノに関与する遺伝子の分離ではなく、不規則なキメラを支配する遺伝子の分離とも考えられない。

日本型の奥羽195号に対して、同じインド地方に由来するインド型品種、Acc435, サージャンキを用いて相反交雑して得られたF₂の個体別に採取したF₃種子を催芽させて幼植物の変異を観察した。F₂での分離比を検定するためにデータはF₃種子をF₂親系統毎にまとめた。さらに、F₃世代での変異の出現頻度を明らかにするために全F₃個体中の変異出現頻度ならびに観察された変異の種類についてデータをまとめた(Table 5)。

変異の種類として幼植物で容易に観察されるアルビノ個体および縞葉様のキメラ個体が検出された(Fig. 20)。さらに、F₂系統ごとにみても各変異種類の出現頻度が各系統毎に1個体しか認められず遺伝子分離として検出されなかったことから、F₂集団で生じたのと同様にF₃集団で生じた独立の変異であると考えられる。このF₃個体に生じる変異についても相反交雑における変異出現率に有意な差を検出できなかった。さらに、幼鞘の一部に不規則なアントシアニン様の赤色ストライプが個体に検出されることがあり、この現象もトランスポゾンの活性化との関係で非常に興味深い。

A38はそれ自身自殖で矮性個体が出現する易突然変異系統である(Fig. 21)。同系統とAcc435系統を交配したF₂において、TNP領域のプロープを用いたサザンハイブリダイゼーション解析によるF₂分離を調査した。親系統とA38xAcc435について分離を調査したが、Acc435の自殖系統毎にRFLPが観察されるため、この系統における転移についても詳細な調査の必要ことがわかった。F₂集団において固定されたRFLPについてはSacIによる消化を行ったところ、PX1プロープで4つの主要なバンドとなって検出された(Fig. 22)。4つのうち、もっともサイズの大きいバンドと1kb程度のサイズの小さなバンドが分離し、それぞれ65:19ならびに62:22と1遺伝子の分離比である3:1の期待分離比に適合し、これらのバンドが核支配によることが明らかとなった。さらに、この2バンドは独立に分離しているので異なる染色体もしくはかなり離れた位置に座乗していると考えられる。残りの2バンドについては分離していないので親系統同士、日本型およびインド型品種群が分化する以前に固定したものと考えられ、他の制限酵素で多型を検出する必要がある。

このほかにアイソザイム9つの遺伝子が分離しているので連鎖分析を行った結果、それぞれが独立な分離を示したため、他のRFLPマーカーを利用して多型検出ならびに連鎖分析を行っている。現在、primaryトリソミックを利用したdosage効果による座乗染色体の推定を行ってから、詳細な連鎖解析を進める予定である。さらに、この系統ではキメラ個体が2個体検出されたが、PX1プロープでは新たなRFLPの検出がなされていない。ただし、PX1, EX2.6プロープでは13kb程度の高分子の領域に多数のバンドを検出しているので複数の制限酵素の組合わせによるサザンハイブリダイゼーション解析を必要とする。

Table 4. Mutation rate determined from reciprocal crosses between Indica Acc435 and other Japonica strains

Cross combination	No. of plants	Total mutants	No. of mutants	
			Chimera	Albino
Acc435xAcc504	200	1	1	0
Acc504xAcc435	200	1	0	1
Acc435xOou195	200	0	0	0
Oou195xAcc435	200	1	0	1
Acc435xL119	200	0	0	0
L119xAcc435	200	1	0	1
Acc435xT65(<i>Hg</i>)	200	0	0	0
T65(<i>Hg</i>)xAcc435	200	1	0	1

Table 5. Mutation rate appeared in F₂ generation in reciprocal crosses. Data are summarized within F₂ stains and with F₃ individuals in each population.

Cross combination	No. of plants	Total mutants (%)	No. of mutants	
			Chimera	Albino
(F ₂ strain)				
Acc435xOou195	46	3(6.5)	1	2
Oou195xAcc435	74	0(0.0)	0	0
SurjamkhixOou195	83	1(1.2)	0	1
Oou195xSurjamkhi	70	1(1.4)	0	1
(F ₃ individuals)				
Acc435xOou195	549	3(0.6)	1	2
Oou195xAcc435	848	0(0.0)	0	0
SurjamkhixOou195	995	1(0.1)	0	1
Oou195xSurjamkhi	816	1(0.1)	0	1

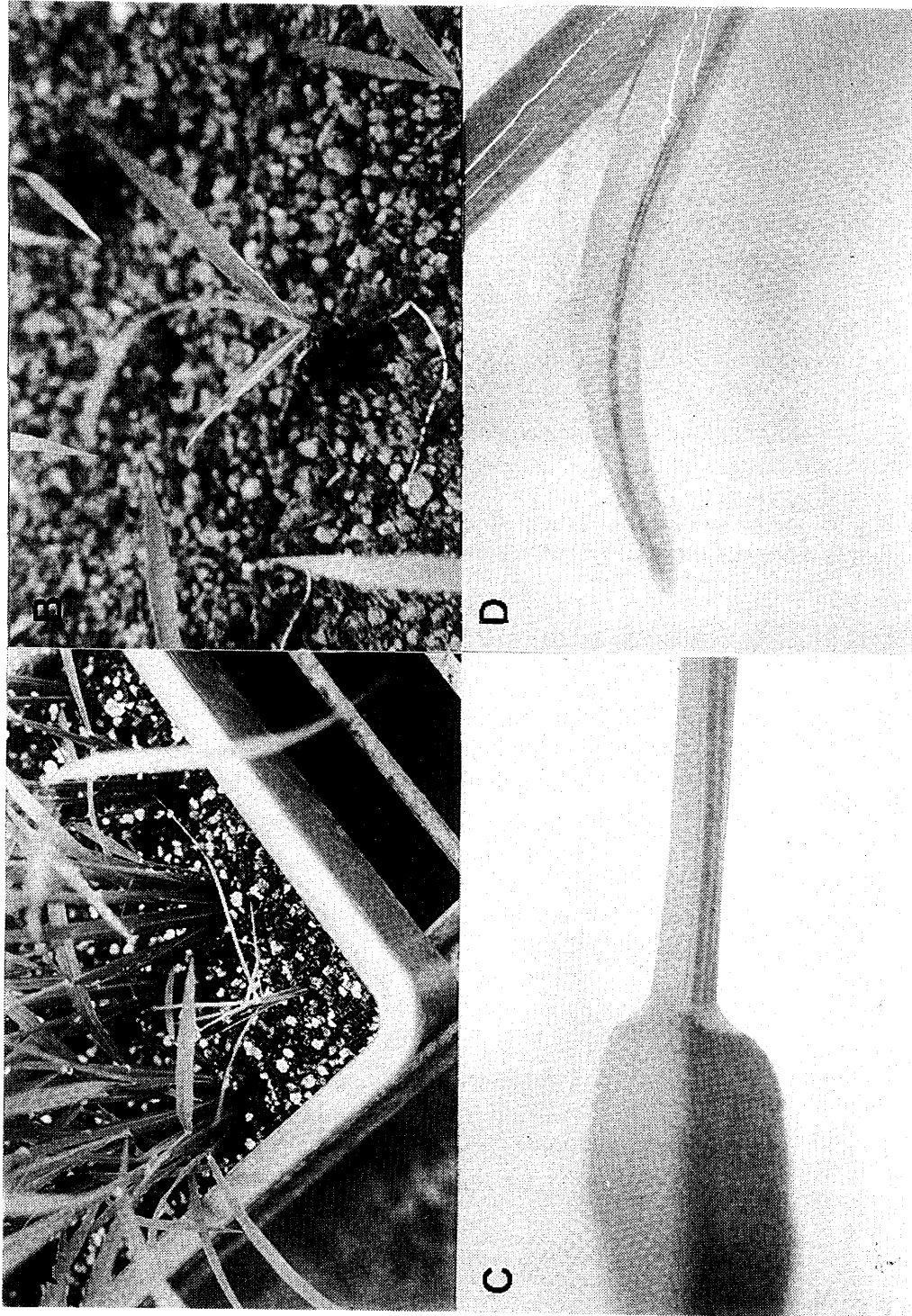


Fig. 20. Mutants appeared in the F₂ generation of the cross between Acc435 and several kinds of Japonica strains. Panel A to D show dwarf, chimeric plant with small sector and chimeric plant with half white tissue and seedling with red sector in a part of plumule.



Fig. 21. Dwarf and sterile mutant generated from self-pollinated progeny of A38. Left is a normal plant and right is a dwarf plant.

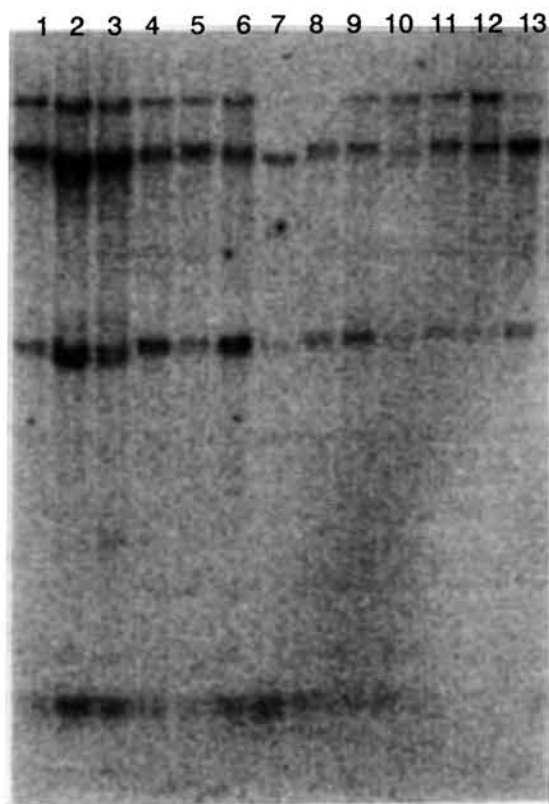


Fig. 22. Segregation of TNP-like domain in the F₂ generation of the cross between A38 and Acc435 with double digestion of *Pst*I and *Eco*R I.

V. 総合論議

イネにおけるトランスポゾンの報告については、これまでレトロトランスポゾンのLINE, SINEならびにDNA型Spm様トランスポゾンが報告されている。しかし、DNA型トランスポゾンでトウモロコシの*Mutator*様因子についての報告はなく、活性型のトランスポゾンについてはレトロトランスポゾンのLINE様因子についてのみ培養条件下で活性の認められた報告がある(Grandbastien 1989, Hirochika 1993)。

*Mutator*は他のトランスポゾンに比較して独自の特徴を有している。特に、ゲノム内で高いコピー数の維持と高頻度に認められる転移率は遺伝子タグgingにおける効率を飛躍的に増大させた。これまで穀物植物における同因子のスクリーニングもなされたが、自律性因子の発見が1991年であったため、*Mu1*などの非自律性因子がサザンハイブリダイゼーション解析のプロブとして利用された。コムギ族には*Mu1*と相同性の因子の存在が確認された(Sparvoli *et al.* 1989)が、これはトウモロコシで明らかにされたように*Mu*トランスポゾンがリクルートした嫌気性条件下で発現する単子葉植物に共通の遺伝子の存在を検出したものと考えられる。本実験では、*Mutator*トランスポゾンの自律性因子*MuDR*の各断片をプロブ化して供試したため、TNP様の配列をクローニングすることができた。

本実験で得られたトランスポゾン様配列は、興味深いことに*MuDR*の有していた細菌と相同なトランスポゼース領域に対して、相同なアミノ酸で64%、置換可能なアミノ酸レベルで80%に及ぶ相同性を検出することができた。トランスポゾンは植物との共存のため活性を自ら調節して負の選択から免れようとする(Gierl 1990)。さらに、遺伝子の破壊だけでなく、発現部位への挿入により組織特異性を調整して遺伝子発現を変化させる。さらに、イントロン-エキソン境界領域への挿入で発現量の変化をも引き起こす。イネとトウモロコシの分岐は今から7000万年以上も昔であり、これだけの相同性が現在でもイネで保たれていることは、イネの進化に際して何らかの働きを有していたか、現在でも有していることを想起させる。また、この事実はRT-PCRによるTNP領域の転写産物の確認が行われたことから明らかである。ただし、DNAレベルで69%の相同性を有するインド型で転写が確認されなかったことは、イネにおいても組織特異的な転写がなされていることも推定される。一方、日本型品種での転写産物の存在はイネの北進と突然変異が果たした役割を考えるうえで非常に興味深い。

*Mutator*トランスポゾンは、末端反復配列(TIR)の相同性のみを有するファミリーを構成しており、各ファミリー間での内在配列の相同性はないことが報告されている。また、同一ファミリーの左右のTIR間の相同性は90%以上で、ファミリー間のTIR相同性が70~90%であることはかなり遺伝的分化が進んでいることを示し、TIR内部の蛋白結合部位の存在も一部のコア配列が存在していることで*Mutator*としての機能が維持されることを示している。他のトランスポゾンに比較してTIRが非常に大きいサイズであることもこの分化を支えているのであろうか。さらに、*Mutator*の活性がない、もしくは過去に*Mutator*系統との交雑が知られていない系統、つまり非*Mutator*系統のトウモロコシで検出される嫌気条件下で発現する遺伝子が*Mu2*に取り込まれていることが報告されており、*Mutator*の進化に内在配列の獲得機構が関与していることを裏付けている。イネのTNP領域の周辺領域には反復配列が検出され、1) この配列がゲノム内で高頻度反復配列として存在しており、2) 1~3コピーのTNP領域とは異なるファミリーを形成していることから、イネにおいても内部配列の獲得機構が維持されていることを示している。今後、イネで検出された末端の反復配列をプロブとして利用することで多様なファミリーを検出することが可能であろう。また、ファミリー間での内部配列の比較により、*Mutator*それ自身の進化機構を解明することが可能であろう。

イネは熱帯起源の作物であり赤道地帯から高緯度地帯まで栽培されており、北進は栽培

化されてからの方向性でもあったと考えられる。特に、ブラキストン線を越える栽培圏の拡大はイネが有する遺伝変異の大きさと、変異拡大に関する遺伝的能力を示唆している。日本に2000年以前に上陸したイネが青森の砂沢遺跡、垂柳遺跡に代表される地域まで即座に栽培圏を獲得してから、北海道で栽培可能となるまでには1600年あまりの期間が必要であった。さらに、北海道南部で栽培され、1868年に耐冷性を有する赤毛が見出された。この赤毛後代からのげを失った坊主が出現し、さらなる耐冷性を獲得して北上を続けた。この他に赤毛後代からは100年以内に*d-1*, *d-2*, *Ur-1*などと様々な突然変異体が見出された。これらの系統を栽培したところ、A23（大黒矮稲）からキメラの分げつが発生し、その後代ではアルビノ、縞葉状の組織を有する変異体が高頻度で得られた。さらに、TNPプローブでのRFLPsはこの系統内でTNP領域と相同なDNA断片が転移することを証明している。今後、末端反復配列に関するプローブを利用することでアルビノらを引き起こす突然変異性の解析が可能となろう。また、これら相同因子をクローニングし、その周辺領域をマッピングすることで*d-1*ら赤毛後代で得られた突然変異遺伝子と密に連鎖するDNAマーカーを作出することが可能であろう。

現在、遺伝子機能を推定できる解析法としては、T-DNAタグging、Map based cloning ならびにトランスポゾンによる遺伝子タグging法が利用可能である。しかし、イネにおいてはタグging系の確立はいまだなされていない。タバコなどで可能であった*Ac/Ds*因子の遺伝子導入もイネにおいてなされたが未だ遺伝子タグgingが報告されていない。これはイネにおける転写系と形質転換用トランスポゾンの改変が影響を及ぼしている可能性もある。イネ内在性因子が明らかとされれば、閉鎖系温室でなく大規模な圃場（水田）で突然変異体のスクリーニングや復帰突然変異体の選別が可能となり、望ましい突然変異体のReference alleleを有する個体と自由に交配し、その後代を得ることが可能である。さらに、交配に望ましい開花期にあわせるために様々な地域に変異系統を導入することも可能となろう。このように本研究で明らかにされた*Mutator*様の転移因子(*MuR1t*)は、イネにおける有用な遺伝子タグging系の確立に役立つであろう。特に、赤毛後代での易突然変異性においてはRFLPsなどの検出からトウモロコシとは異なる自殖系でのトランスポゾンの活性化による容易な遺伝子タグging系が開発されよう。*Mutator*では自殖を重ねることでsickな状態になることが*Mutator syndrome*と呼ばれているが、自殖で増殖し変異を拡大できる赤毛後代では*Mutator*以上の効率が期待される。さらに、過去の育種における記録から、赤毛後代で生じた遺伝子をクローニングすることも考えられる。

*Mutator*相同配列はイネゲノム上で高度反復配列として存在しており、一次トリソミック系統による量的効果を利用した座乗染色体の特定を行うことで染色体上の分布様式が推定されよう。現在、インド型のIR24と日本型の台中65号の各遺伝背景でのトリソミックを利用できるため、日本型とインド型が分化する以降の座乗染色体の転移を検出できるものと考えている。イネにおける*Mutator*相同配列がゲノム構成に果たした役割と栽培域の北進における適応と突然変異についても重要な知見を与えるであろう。

VI. 要約

イネからの *Mutator* トランスポゼース (TNP) 相同配列をクロ-ニングした。この配列の近傍領域はイネにおいて散在反復配列として存在している。この配列は単子葉に広く存在しており、単子葉植物の系統分化と関連している。さらに、幼苗及び成葉においては日本型イネには転写が認められ、その活性を保持していることが推測された。イネにおける易突然変異生との関連を明らかにするために、北海道の易突然変異系統である赤毛後代では赤毛からのげを消失した坊主をはじめとして、大黒 (*d-1*)、夷 (*d-2*) などを自然突然変異として偶発的に生み出した。赤毛の自殖後代では花粉などの混入がない条件で TNP 領域のプローブで RFLPs を検出した。さらに、大黒 (A23) 系統からは縞葉様の分げつ変異が得られ、その後代ではわい性でありながらアルビノ、縞葉状のキメラ組織を生じ、さらに双子胚などを生じた。この系統においても TNP 領域のプローブで RFLPs が検出された。北海道の保存系統である A15 系統でも無葉舌から葉舌を有する個体が出現し、さらに自殖集団で *lazy* 変異体が正常個体 : *lazy* 個体で 3:1 に分離した。この系統内でも TNP プローブで多型が得られており、今後、日本型の北海道系統における相同配列をクロ-ニングすることで突然変異遺伝子と密に連鎖する RFLPs が得られることが期待される。日本型だけでなく、特定のインド型品種と日本型品種を交配した交雑後代においても易突然変異系統が得られた。この系統での RFLP は F₂ 分離としてのみ観察されており、多型を検出した 2 バンドは独立に分離し核支配であることがわかり、調査した 9 座のアイソザイム遺伝子とも独立であった。

以上の結果から、単子葉で広く維持されているトランスポゼース対応領域はイネクローンにおいてその近傍に末端反復配列様の配列を有しており、易突然変異系統での多型性も観察されていることからイネで活性を有するトランスポゾンとしてゲノム中に存在している可能性が示唆された。

謝辞

本研究において、データの解析において弘前大学農学部の新関 稔教授、原田竹雄助教授、同大学の遺伝子実験施設の赤田辰治助教授、千田峰生博士に貴重な助言をいただいたことを深謝します。また、アイソザイムのnull変異体の解析、もち系統における遺伝的多様性の解析、ならびにTNP領域の多型性に関しては修士課程の原田優子さん、イネにおける*Mutator*様因子の塩基配列の解析、北海道系統の易突然変異性、ならびに遠縁交雑における雑種崩壊性の解析にあたっては4年生の志賀麗子さんに協力していただいたことを深謝します。また、修士課程の小林健一氏、土嶺康憲氏、4年生の佐伯英治氏、三浦富教氏には学内圃場ならびに金木農場での材料育成と収穫調査に協力いただいたことを感謝します。

引用文献

- Bennetzen, J.L. and Freeling 1993. Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. *TIG*, 9:259-260.
- Bennetzen, J.L., P.S. Springer, A.D. Cresse, and M. Hendrickx 1993. Specificity and regulation of the transposable element system in maize. *Crit. Rev. In Plant Sci.* 12:57-95.
- Brookfield, J.F.Y. 1995 Transposable elements as selfish DNA. *In* Mobile genetic elements ed(D.J. Sherratt), IRL Press, NY, pp130-153.
- Brown, J. and V. Sundaresan 1992. Genetic study of the loss and restoration of *Mutator* transposon activity in maize: evidence against dominant-negative regulator associated with loss of activity. *Genetics* 130:889-898.
- Bucheton A. 1995. The relationship between the *flamenco* gene and *gypsy* in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. *TIG* 11:349-353.
- Bureau, T.E. and S.R. Wessler 1992. *Tourist*: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *The Plant Cell* 4:11283-1294.
- Bureau, T.E. and S.R. Wessler 1994a. *Stowaway*: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *The Plant Cell* 6:907-916.
- Bureau, T.E. and S.R. Wessler 1994b. Mobile inverted-repeat element of the *Tourist* family are associated with the genes of many cereal grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1411-1415.
- Capy, P., D. Anxyolabehere and T. Langin. 1994. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *TIG* 10:7-12.
- Chandler, V. L. and K. J. Hardeman 1992. The *Mu* elements of *Zea mays*. *Advance Genet, Advance Genet*: 77-122.

- Chomet, P., D. Lisch, K.J. Hardeman, V.L. Chandler, and M. Freeling 1991. Identification of a regulatory transposon that controls the *Mutator* transposable element system in maize. *Genetics* 129:261-70.
- Das, L., and R. Martienssen 1995. Site-selected transposon mutagenesis at the *hcf106* locus in maize. *The Plant Cell*, 7, 287-294.
- Dolferus, R., D.V.D. Bossche and M. Jacobs. 1990. Sequence analysis of two null-mutant alleles of the single *Arabidopsis* *Adh* locus. *Mol. Gen. Genet.* 224:297-302.
- Donlin, M., D. Lisch and M. Freeling 1995. Tissue-specific accumulation of MURB, a protein encoded by *MuDR*, the autonomous regulator of the *Mutator* transposable element family. *The Plant Cell*, 7:1989-2000.
- Eisen, J. A., M.I. Benito and V. Walbot 1994. Sequence similarity of putative transposases links the maize *Mutator* autonomous element and a group of bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, 22: 2634-2636.
- Fedroff, N., S. Wessler, and M. Shure 1983. Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*. *Cell* 35:235-242.
- Freeling, M. 1984. Plant transposable elements and insertion sequences. *Ann Rev Plant Physiol* 35:277-298.
- Freeling, M. And D.C. Bennett. 1985. Maize *Adh-1*. *Ann. Rev. Genet.* 19:297-323.
- Gierl, A. 1990. How maize transposable elements escape negative selection. *TIG* 6:155-158.
- Grandbastien, M.-A., A. Spielman and M. Caboche 1989. *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable elements of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* 337:376-380.
- Grotewold, E., Athma, P. and Peterson, T. 1991. A possible hot spot for *Ac* insertion in the maize *P* gene. *Mol Gen Genet*, 230: 329-331.
- Hehl, R. 1994. Transposon tagging in heterologous host plants. *TIG* 10:385-386.
- Hershberger, R. J., C. A. Warren, and V. Walbot, 1991. *Mutator* activity in maize correlates with the presence and expression of the *Mu*-transposable element *mu9*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10198-10202.
- Hershberger, R. J., M-I. Benito, K. J. Hardeman, C. Warren, V. L. Chandler and V. Walbot 1995. Characterization of the major transcripts encoded by the regulatory *MuDR* transposable element of maize. *Genetics* 140:1087-1098.

Hirochika, M. 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J. 12:2521-2528.

石川隆二 1994. イネのアイソザイムに関する遺伝育種学的研究. 弘大農学報 57:105-180.

石川隆二 1996. Maize meetingにおけるトウモロコシ遺伝学の現状とこれから. 育雑 46 : 309.

Ishikawa, R., D. Lisch and M. Freeling 1994. Screening of *Mutator*-related sequence in rice. Rice Genet. Newslt .11:155-156.

Kaiser, K., J.W. SENTRY and D.J. Finnegan 1995. Eukaryotic transposable elements as tools to study gene structure and function. In Mobile genetic elements ed(D.J. Sherratt), IRL Press, NY, pp169-100.

Kloeckener-Gruissem, B. And M. Freeling 1995. Transposon-induced promoter scrambling:a mechanism for the evolution of new alleles. Pro. Natl. Acad. Sci. USA 92:1836-1840.

Knoop, V., M. Unseld, J. Marienfeld. P. Brandt, S. Sunkel, H. Ullrich and A. Breenicke 1996. Copia-, gypsy- and LINE-like retrotransposon fragments in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 142:579-585.

Kumar, A. 1996. The adventures of the Ty1-copia group of retrotransposons in plants. TIG 12:41-43.

Lisch, D., and M. Freeling 1994 Loss of *Mutator* activity in a minimal line. Maydica 39:289-300.

Lisch D., P. Chomet and M. Freeling 1995. Genetic characterization of the *Mutator* system in maize: Behavior and regulation of *Mu* transposons in a minimal line. Genetics139:1777-1796.

McClintock, B. 1945. Cytogenetic studies of maize and *Neurospora*. Carnegie Inst. Wash. Year Book 44:108-112.

McClintock, B. 1946. Maize genetics. Carnegie Inst. Wash. Year Book 45:176-186.

Mochizuki, K., M. Umeda, H. Ohtsubo and E. Ohtsubo. 1992. Characterization of a plant SINE, pSINE1, in rice genomes. Jpn. J. Genet. 57:155-166.

Purugganan, M.D. and S. R. Wessler 1994. Molecular evolution of *magellan*, a maize Ty3/gypsy-like retrotransposon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11674-11678.

Qin, M.M., D.C. Robertson and A.H. Ellingboe 1991. Cloning of the *Mutator* transposable element *MuA2*, a putative regulator of somatic mutability of the *a1-Mum2* allele in maize. Genetics 129:845-855.

- Robertson, D. S. 1978. Characterization of a *Mutator* system in maize. *Mutation Research* 51:21-28.
- Sparvoli, F., M.C. Patrosso, A. Viotti and N.E. Pogna. 1989. Occurrence of DNA sequences homologous to the maize *Mu* transposable element in wheat and other cereal species. *J. Gen. And Breed.* 43:237-244.
- Strommer, J.N., S. Hake, J.L. Bennetzen, W.C. Taylor and M. Freeling 1982. Regulatory mutants of the maize *Adh1* gene caused by DNA insertions. *Nature* 300:542-544.
- Tsay, Y.-F., M.J. Frank, T. Page, C. Dean and N.M. Crawford 1993. Identification of a mobile endogenous transposon in *Arabidopsis thaliana*. *Sci.* 260:342-344.
- Umeda, M., H. Otsubo and E. Otsubo 1991. Diversification of the rice *Waxy* gene by insertion of mobile DNA elements into introns. *Jpn. J. Genet.* 66:569-586.
- Wisman, E., M. Koornneef, T. Chase, E. Lifshytz, M.S. Ramanna and P. Zabel 1991. Genetic and molecular characterization of an *Adh-1* null mutant in tomato. *Mol. Gen. Genet.* 226:120-128.
- Wright, D.A., N. Ke, J. Smalle, B.M. Hauge, H. M. Goodman and D.F. Voyatas. 1996. Multiple non-LTR retrotransposons in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142:569-578.
- Young, R.J., D.M. Francis, D.A.St.Clair and B.H. Taylor. 1994. A dispersed family of repetitive DNA sequences exhibits characteristics of a transposable element in the genus *Lycopersicon*. *Genetics* 137:581-588.
- Zarembinski, T.I. And A. Theologis 1993. Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Biology of the Cell.* 4:363-373.