

基礎生物学研究所の11年間

飯 田 滋

私は52歳になったばかりの1996年の4月に、基礎生物学研究所のメンバーとして参加することになったので、他の構成員の方々が若くして参加されているに比べて、随分と後からとの思いは否めない。当時の定年は63歳だったから、11年間で何ができるであろうかと思っし、来年の3月末で、当初の11年間で過ぎようとしているこの時に、このような文を書く機会を与えられたのも何かの縁であろう。

私は学部学生及び修士課程で核酸の化学修飾を行い、博士過程では化学突然変異による欠失変異をファージλで解析し、1974年9月から約12年強ほどスイスのバーゼル大学バイオセンターで、大腸菌とそのファージP1やRプラスミドを用いた種々の非相同組換えとDNA再編成の解析に従事した。1987年にスイス理工科大学(ETH-Zurich)の植物科学研究所移り、タバコを用いた遺伝的組換えと遺伝子発現を手掛け、翌年に新設の東京理科大学基礎工学部に移り、絞花を咲かせるアサガオの易変性変異の解析やトウモロコシのトランスポゾン*Ac/Ds*をイネに導入転移を行い、イネ研究の将来性を実感した。

上記の如く、私は当面の研究課題にある程度の目処をつけてから、リセットすべく所属と研究材料や研究課題を変えてきていたが、基礎生物学研究所に着任した際には、従来とはやり方を変え、アサガオの易変性変異の解析は続行することにした。アサガオは我国で園芸化され、江戸時代に花卉園芸植物として発展し、多種多様な花の色や形に係る自然突然変異が分離された我国の文化遺産でもあり、古典遺伝学的研究も戦前我国で盛んに行われている。これらの変異が多数現存しているにもかかわらず、1996年までに分子遺伝学的に解析されたのは、我々のアントシアニン色素生成系の*DRF-B*遺伝子内に*En/Spm*系のDNAトランスポゾン*Tpn1*が挿入したために、白色地に有色のセクターやスポット生じる易変性雀斑変異だけであり、少なくとも花色に係るアサガオの変異の全体像を明らかにするには程遠いと感じたためである。しかも多様な興味深いアサガオの変異の全貌解明を目指す研究者は、後に九州大学の仁田坂英二博士が、ショウジョウバエの研究をなげうってアサガオの研究を始められるまでは出現せず、多彩な花色発現と易変性変異だけでも解析できれば、花色に関するモデル植物となり得ると当時考えた。

事実、我々は、星野敦を中心に森田裕将、田中幸子らの努力により、既にアサガオばかりでなく近縁種で17世紀にヨーロッパで園芸化されたマルバアサガオや20世紀中葉に米国で園芸化されたソライロアサガオの花色に係る変異の同定も行い、30以上の変異を同定できた(図1)。その結果、これら自然突然変異の多くはDNAトランスポゾンが関与し、特にアサガオの場合は大部分が上記の

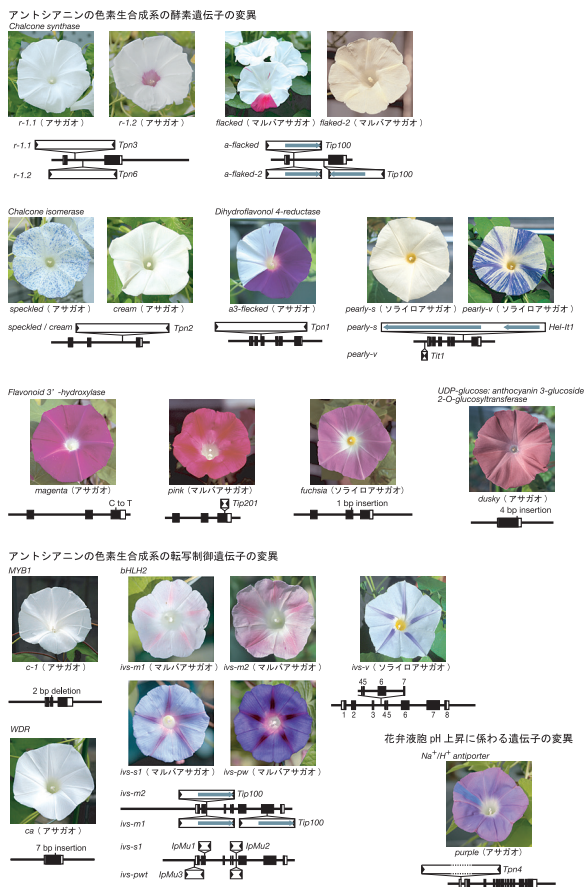


図 1. アサガオとその近縁種の花色に係わる変異の抜粋

アサガオを花卉植物のモデル植物化し得たと考えており、また種々の変異の構造を比較することにより、花卉園芸化に伴う進化過程も明らかにしつつある。

また、折角基礎生物学研究所に移り、新たな環境下である程度の規模で研究を行えるので、当時モデル植物のシロイヌナズナで、ヨーロッパを中心に少数の研究者が試みていた相同組換えによって、ゲノム配列を予めデザインした任意の配列に再現的に変換し得る遺伝子ターゲティングをイネで行うことを決意し、確実に成果が出る保証はないが、成功すれば究極の突然変異法となり得ると信じて、先ず大規模で効率のよいイネの形質転換を行うべく、1997 年から寺田理枝が研究を開始した。遺伝子ターゲティングは ES 細胞を用いたマウスでは汎用されているが、高等生物では導入遺伝子のランダムな挿入に比較して、相同組換えによる遺伝子ターゲティングの頻度が低くて困難なので、組換えや修復系の遺伝子を改変して、ランダムな挿入を抑制したり、相同組換えの頻度を上げたりして、ゲノム改変植物体を効率よく得ようとする研究が主流となっている。しかしながら、組換えや修復系の遺伝子を改変すると、種々の遺伝形質が現れることも多く、たとえ目的とする標的遺伝子をターゲティングにより改変できても、標的遺伝子の機能を解析することが難しくなることが十分に予測される。そこで、我々はゲノム配列が解析された野生型イネの日本晴を用いて、アグロバクテリア菌を介し

Tpn1 関連因子の挿入変異が転移脱離により生じる点変異と考えられ、園芸化過程との関連からも興味深い。また花の色模様には、遺伝的な変異ばかりでなくエピジェネティックな発現制御も大きく関与していることも明らかにできた。我々の花色変異の解析は、質量共に、従来花色に関して先行していたキンギョソウを完全に凌駕し、ペチュニアをも越えつつある。明るい青色の花を咲かせる野生型アサガオの花弁に蓄積するアントシアニンは、通常は赤系の花に見出されるシアニジン系色素であり、その構造はキンギョソウやペチュニアよりも遙かに複雑である。しかも、花弁液胞の pH も開花時には 8 近くまで上がる特徴があり、開花時に花弁液胞の pH が下がるペチュニアとは好対照である。さらに従来困難であった形質転換も再現的にできるようになり、種々の変異形質の検出によく用いられる花と実生で発現する完全長 cDNA を主体に、均一化 cDNA 等も含めて 9 万以上の EST の分離整備できた。これらの状況から、

た大規模な形質転換系と強力なポジティブ・ネガティブ選抜法を組合せて、導入遺伝子がランダムに挿入した形質転換体を効率よく除き、生残った形質転換体の中から PCR スクリーニングでターゲットされたカルスを選び出して再生させ、モチ性に係る *Waxy* 遺伝子を改変した 6 系統の独立なトランスジェニックイネの作出に成功した (図 2)。その後さらに工夫を重ね、寺田理枝や定塚 (久富) 恵世らは、冠水耐性に係る 2 つの *Adh* を個別改変し、さらにイネのエピジェネティックスの逆遺伝学的解明を目指して、10 程の DNA メチル化に係る遺伝子の個別改変にも成功している、イネでの遺伝子ターゲティング法を確立し得たと思っている。

さらに、岡山大学資源生物科学研究所の前川雅彦教授が見付けられた幼苗期に黄緑色地に濃緑色のセクターの葉が生じる易変性

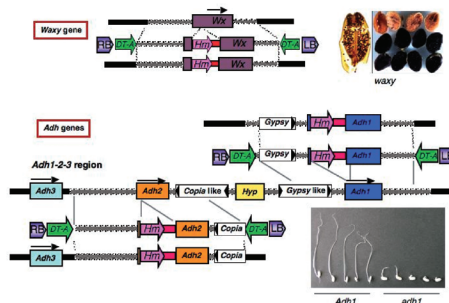
virescent 変異を、前川教授との共同研究により梅根一夫らが同定し、通常栽培条件下で、交配と分離により転移を制御できる *Dart* 系の DNA トランスポゾンと同定できた。現存するイネのタギング法は、T-DNA やトウモロコシのトランスポゾンにせよ、内在性のレトロトランスポゾン *Tos17* にせよ全てカルス培養を介するので、所謂培養変異が付随することを避け得ないが、我々が見出した *Dart* 系は培養変異が起る可能性はなく、しかもタギング効率も大変高く、既に幾つもの新たな遺伝子をこの遺伝子タギングにより同定している (図 2)。このように、我々はイネの遺伝子ターゲティングとタギングに関する新たなイネの機能ゲノム学的解析法を開発しつつ、DNA メチル化に係るジェネティック及びエピジェネティックな遺伝子制御系の解析を目指している。

以上のように、道中ばとは言え、この 11 年間に当初構想したそれなりに独創的な研究を展開できたのではないかと考えている。申すまでもなく、これらの研究は、ここに名前を挙げた方々ばかりでなく、多くの共同研究者の日夜にわたる研鑽努力の結果であり、ここの深く感謝する次第である。

参考文献

1. Park, K.-I., Ishikawa, N., Morita, Y., Choi, J.-D., Hoshino A., and Iida, S. (2007). A *bHLH* regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *Plant J.* 49, 641-654.
2. Chopra, S., Hoshino, A., Boddu, J., and Iida, S. (2006). Flavonoid pigments as tools in molecular genetics. E. Glotewold ed., *The Science of Flavonoids*, pp.147-173, Springer.

相同組換えによる *Waxy* と *Adh* 遺伝子のターゲティング



DNA トランスポゾン *nDart* の挿入による易変性変異の抜粋

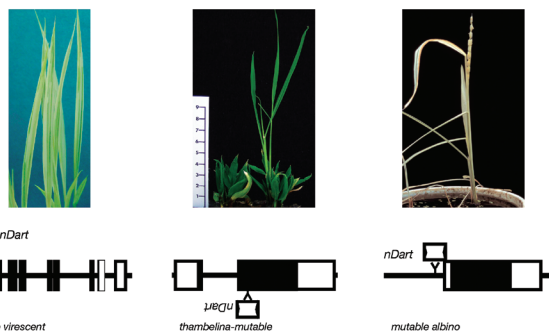


図 2. イネの遺伝子ターゲティングとタギング

3. Tsugane, K., Maekawa, M., Takagi, K., Takahara, H., Qian, Q, Eun, C.-H., and Iida, S. (2006). An active DNA transposon *nDart* causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice. *Plant J.* 45, 46-57.
4. Morita, Y., Hoshino, A., Kikuchi, Y., Okuhara, H., Ono, E., Tanaka, Y., Fukui, Y., Saito, N., Nitasaka, E., Noguchi, H., and Iida, S. (2005). Japanese morning glory *dusky* mutants displaying reddish-brown or purplish-grey flowers are deficient in a novel glycosylation enzyme for anthocyanin biosynthesis, UDP-glucose:anthocyanidin 3-O-glucoside-2''-O-glucosyltransferase, due to 4-bp insertions in the gene. *Plant J.* 42, 353-363.
5. Park, K.-I., Choi, J.-D., Hoshino, A., Morita, Y., and Iida, S. (2004). An intragenic tandem duplication in a transcriptional regulatory gene for anthocyanin biosynthesis confers pale-colored flowers and seeds with fine spots in *Ipomoea tricolor*. *Plant J.* 38, 840-849.
6. Iida, S., and Terada, R. (2004). A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 132-138.
7. Hoshino, A., Morita, Y., Choi, J.-D., Saito, N., Toki, K., Tanaka, Y., and Iida, S. (2003). Spontaneous mutations of the flavonoid 3'-hydroxylase gene conferring reddish flowers in the three morning glory species. *Plant Cell Physiol.* 44, 990-1001.
8. Terada, R., Urawa, H., Inagaki, Y., Tsugane K., and Iida, S. (2002). Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnol.* 20, 1030-1034.
9. Yamaguchi, T., Fukada-tanaka, S., Inagaki, Y., Saito, N., Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y., Kusumi T., and Iida, S. (2001). Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol.* 42, 451-461.
10. Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Yamaguchi, T., Saito N., and Iida, S. (2000). Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407, 581.
11. Iida, S., Hoshino, A., Johzuka-Hisatomi, Y., Habu Y., and Inagaki, Y. (1999). Floricultural traits and transposable elements in the Japanese and common morning glories. *Annal. New York Acad. Sci.* 870, 265-274.
12. Habu, Y., Hisatomi Y., and Iida, S. (1998). Molecular characterization of the mutable *flaked* allele for flower variegation in the common morning glory. *Plant J.* 16, 371-376.

