

イネ完熟種子糊粉層におけるアントシアニン生合成に係わる転写制御遺伝子のトランジェントアッセイ系

誌名	育種学研究 = Breeding research
ISSN	13447629
著者名	前川,雅彦 景山,圭祐 力石,和英 宇都木,繁子 野田,和彦 坂本,亘
発行元	日本育種学会
巻/号	2巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 181-187
発行年月	2000年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



原著論文

イネ完熟種子糊粉層におけるアントシアニン生合成に係わる転写制御遺伝子のトランジェントアッセイ系

前川雅彦・景山圭祐・力石和英・宇都木繁子・野田和彦・坂本 亘

(岡山大学資源生物科学研究所, 倉敷市中央2丁目20-1, 〒710-0046)

摘要

イネにおけるアントシアニン生合成の転写制御遺伝子の発現解析に必要なトランジェントアッセイ系を, 常時材料を準備できるイネ完熟種子糊粉層で確立した。まず, 岡大資生研紫米(RIB-P1)の完熟種子を用いて糊粉層を露出するための吸水時間と温度を検討した。露出できた糊粉層にトウモロコシのアントシアニン生合成の転写制御遺伝子, *CI* と *B-Peru* をパーティクルガンで導入したところ, アントシアニンのスポットが観察されたので, 両遺伝子を用いたトランジェントアッセイ系について至適条件を検討した。その結果, 28°Cで4時間吸水させて露出した糊粉層でアントシアニンのスポット数が最大になった。また, 導入するプラスミドの量は, *CI* と *B-Peru* がともに5 µg か *CI* が5 µg で *B-Peru* が10 µg のときに, アントシアニンのスポット数が多くなった。以上の結果から, イネの完熟種子糊粉層を用いたトランジェントアッセイとして, 28°Cで4時間吸水させて糊粉層を露出させ, *CI* と *B-Peru* をともに5 µg ずつ導入することによって, 安定的にアントシアニンを誘導できることが明らかとなった。

キーワード: *Oryza sativa*, 糊粉層, アントシアニン, 転写制御遺伝子, トランジェントアッセイ

緒言

植物が合成するアントシアニンは, 可視的形質として古くから二次代謝経路の研究対象となり, 分子生物学の進展もあってきわめて明瞭な生合成経路がトウモロコシ, ペチュニアやキンギョソウで解明されている(Holton and Cornish 1995)。同時に, アントシアニン着色の組織特異性や発現時期といった転写制御系の解明も盛んになり, トウモロコシではアントシアニン着色に係わるネットワークが構築されている(Coe 1994, Selinger and Chandler 1999)。トウモロコシのアントシアニン生合成の制御遺伝子として *CI* ファミリー(*CI*, *PI*)と *R* ファミリー(*R*, *B*, *Lc*, *Sn*)が知られていて, アントシアニン

着色には *CI* ファミリーと *R* ファミリー遺伝子の相互作用が必要である(Dooner *et al.* 1991)。特に糊粉層におけるアントシアニン着色に関しては *CI* と *R* あるいは *B-Peru* 遺伝子がともに必要であることが明らかにされている(Goff *et al.* 1992)。*CI* および *B*, それぞれのファミリーの遺伝子は MYB ドメインを有する MYB 型転写制御因子と basic helix-loop-helix (bHLH) 構造を有する MYC 型転写制御因子をコードしている(Dooner *et al.* 1991)。

イネでもトウモロコシと同様にアントシアニン着色は古くから遺伝分析の対象となって(竹崎 1921), Takahashi (1957) は広範な交雑実験の結果を基にイネのアントシアニン着色に係わる遺伝子体系を確立した。すなわち, アントシアニン色素遺伝子 *C* と活性化遺伝子 *A* の相互作用でアントシアニンが合成され, 植物体各部にアントシアニン着色が生ずるためには各部にアントシアニンを分布させる遺伝子, 分布遺伝子が必要であるとした。しかしながら, トウモロコシと異なりイネにおけるアントシアニン生合成経路と関与遺伝子との対応が明らかとなっておらず, また分子的転写制御系も不明である。

近年, イネとトウモロコシのシンテニーが明らかになった(Ahn and Tanksley 1993)ことから, トウモロコシの cDNA をプローブにして, イネでもアントシアニン生合成経路に係わる *AI* (Reddy *et al.* 1996, Chen and Bennetzen 1996, Nakai *et al.* 1998) や *chs* (Reddy *et al.* 1996) が単離された。さらに, イネにおけるアントシアニン生合成の転写制御遺伝子に関しても, *CI* (Reddy *et al.* 1998) やトウモロコシの *R* のホモログである *Ra* が単離された(Hu *et al.* 1996)。これらの遺伝子が実際にアントシアニンを誘導するか否かについて検証するトランジェントアッセイ系は, トウモロコシで確立しているだけである(Klein *et al.* 1989)。実際, イネで単離された *Ra* もトウモロコシ未熟種子の糊粉層におけるトランジェントアッセイで, アントシアニンを誘導することが明らかにされた(Hu *et al.* 1996)。ただし, その発現程度はトウモロコシの *Lc* 遺伝子による場合の10%以下と低く, その原因の一つとして異種植物の発現系を使ったことによるものと推定された。

本研究では, イネのアントシアニン発現に係わるとされる遺伝子がアントシアニン誘導に必要であるか否かを検証するために, ホモログな系として常時材料を準備できるイネ完熟種子の糊粉層を用いた効率のよいトラン

ジェントアッセイ系の確立を目的とした。

材料および方法

植物材料

実験に供試したイネは、岡大資生研紫米(RIB-P1)と黒色稲の二(A-58)である。RIB-P1は中国山西省西安から導入した紫米系統で、ふ先と葉鞘下部にアントシアニン着色がある。Takahashi(1957)によるアントシアニン着色に係わる遺伝子系では、*C^BAPI^m*の遺伝子型を有している。また、A-58は北海道大学農学部育種学教室が保有する北海道在来モチ品種で、玄米は白くふ先、葉節および茎節にアントシアニン着色があり、遺伝子型は*C^BA*である。対照として用いたトウモロコシはW22で、穀粒は黄色で葉鞘下部にアントシアニン着色がある。アントシアニン生合成経路の遺伝子はすべて優性で有していて、アントシアニン転写制御因子の*C1*と*B*遺伝子座に関しては*C1⁺*と*B⁺*である。

イネ完熟種子糊粉層の露出法

イネ完熟種子糊粉層の露出法はRIB-P1の玄米を用いて確立した。まず、RIB-P1の玄米の腹面(胚のある方)を下にしてピンセットで固定して、背面にメスで切れ目を入れた。これらの種子を70%エタノールで1分間消毒し、次いで3%次亜塩素酸ナトリウムで20分間、1%次亜塩素酸ナトリウムで10分間滅菌し、その後滅菌蒸留水で3回洗浄した。洗浄後すぐに、滅菌種子を種々の時間と温度の組み合わせで吸水させた。吸水後、滅菌した口紙の上に種子をおき、腹面と背面をピンセットではさみ固定して、別のピンセットで先に背面に入れた切れ目から果皮を引き剥いだ。次に露出した背側の種皮に切れ目を入れ、少し種皮の切れ目を浮き上がらせてからピンセットで種皮を引き剥いだ(Fig. 1a)。果皮および種皮を取り除き、糊粉層を露出できた10粒をR2S培地(Ohira *et al.* 1973)を入れたシャーレの中心に置床し、25°Cで1日培養した。この露出法はA-58の種子にも適用した。

トウモロコシ未熟種子糊粉層の露出法

まずW22の受粉後18日目の未熟種子の下部にメスで切れ目を入れ、イネの場合と同様に滅菌をした。滅菌後、28°Cで4時間吸水させた。そして果皮の切れ目から上部に向かってピンセットで果皮を引き剥ぎ、ついで種皮を引き剥いだ。糊粉層を露出できた10粒を、イネの場合と同様にR2S培地を入れたシャーレの中心に置床し、25°C、12時間日長下で1日培養した。

プラスミドDNA

実験に供試したプラスミドDNAのうちp35S-Bperuとp35SC1は、それぞれpMF6(Callis *et al.* 1987)の*EcoRI*サ

イトにトウモロコシの*B-PerucDNA*(1.9 kb)と*C1cDNA*(1.1 kb)(Goff *et al.* 1992)がCaMV 35Sプロモーターとトウモロコシ*Adh1*イントロンとともに組み込まれている。また、p35SGUSは、pBI121の*HindIII*サイトにGUS遺伝子(1.8 kb)がCaMV35Sプロモーターとともに組み込まれている。プラスミド抽出は、Qiagen Plasmid Mini Kit(Qiagen)を用いて行われ、遺伝子導入には各プラスミド0.5~20 µgを使用した。

遺伝子導入法

遺伝子導入には金粒子(1.6 µm, Bio-Rad no. 307648)使用のパーティクルガン(Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System, Bio-Rad)を用いた。まず、60 mg/ml金粒子10 µlにプラスミドDNAを加え、さらに2.5 M塩化カルシウムを1 Mと0.1 Mスぺルミジンを0.016 Mになるように順に添加することによって、プラスミドDNAを金粒子に凝着させた。70%および100%エタノールで洗浄した後、上清をピペットでペレットを乱さないように吸い取った。残った金粒子に12 µlの100%エタノールを加え再懸濁し、沈殿しないようにしながらピペットで全量を吸い取り、マクロキャリア(Bio-Rad no. 320680)の中心に滴下した。撃ち込み圧力は1100 psi、撃ち込み距離は15 cmとした。各プラスミドDNAの導入実験はそれぞれ3回反復して行った。遺伝子導入された玄米は、25°C、12時間日長下で培養した。

GUS活性

遺伝子導入してから2日目に玄米をGUS染色液に37°Cで24時間浸漬し(Jefferson *et al.* 1987)、玄米1粒ごとの青いスポット数を実体顕微鏡で調べた。

アントシアニン発現

遺伝子導入を行ってから3日目に実体顕微鏡で玄米にアントシアニンによる紫のスポットがあるか否かを観察し、玄米1粒ごとの紫色のスポット数を記録した。

結果

糊粉層露出に係わる吸水条件

Fig. 1bに示すように紫米のアントシアニン着色は果皮に限られている(Nagao *et al.* 1968)ものの、種皮にもわずかに着色が見られるため確実に果皮・種皮を剥くことができ、糊粉層の露出が容易なために紫米を用いた。まず、種皮と果皮を剥離しやすくなる吸水に係わる温度と時間の条件を調べた。その結果、18°Cから28°Cで、4時間から10時間の範囲で吸水させると種皮・果皮を剥けやすいことがわかった。ただし、実験に供試した30粒の内、25粒以上で果皮および種皮を剥いて糊粉層を露出できた組み合わせは、20°Cで17時間、24°Cで6時間、28°Cで4および24時間と30°Cで7時間の5組み合

わせであった。そこで、これら5組み合わせの条件で吸水させ、糊粉層を露出した玄米に *Cl* と *B-Peru*、それぞれ5 μ gを同時に導入し、アントシアニンのトランジェント発現の効率を調べた。プラスミドの量は、Goff *et al.* (1992) のトウモロコシの未熟種子を用いたトランジェントアッセイを参考とした。その結果 (Table 1)、いずれの条件で露出させた玄米でもアントシアニンによるスポットが認められた (Fig. 1c)。また、その発現は糊粉

Table 1. Number of red and blue spots by direct DNA delivery in aleurone layer of RIB-P1 and W22 with different soaking treatments

Soaking treatment		No. of spots $\pm$ S.E./grain	
Temp. ($^{\circ}$ C)	Hours	Red by <i>Cl</i> and <i>B-Peru</i> genes	Blue by GUS gene
<u>Rice RIB-P1 mature seeds</u>			
20	17	2.9 $\pm$ 0.1ab	2.4 $\pm$ 0.4a
24	6	2.4 $\pm$ 0.4b	2.2 $\pm$ 0.2a
28	4	4.1 $\pm$ 0.3a	2.4 $\pm$ 0.2a
28	24	3.7 $\pm$ 0.3ab	2.4 $\pm$ 0.3a
30	7	3.1 $\pm$ 0.7ab	2.5 $\pm$ 0.2a
<u>Maize W22 premature seeds</u>			
28	2	8.6 $\pm$ 2.2	1.3 $\pm$ 0.1

Note. Means followed by same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

層に限られていた (Fig. 1d)。アントシアニンによる紫色のスポット数は28 $^{\circ}$ Cで4時間吸水させた場合に最も多くなった。次にスポット数が多かったのは、28 $^{\circ}$ Cで24時間、30 $^{\circ}$ Cで7時間と20 $^{\circ}$ Cで17時間の組み合わせで、24 $^{\circ}$ Cで6時間の吸水条件で最もスポット数が少なかった。対照として行ったGUS遺伝子の活性を示す青いスポット数はいずれの吸水条件でも同じで、しかもその数は *Cl* と *B-Peru* によるアントシアニンのスポット数が最も少ない場合と同じであった。一方、トウモロコシの未熟種子における糊粉層でのトランジェントアッセイでは、アントシアニンのスポット数はイネの完熟種子の糊粉層で最も多い場合の2倍以上あった。なお、GUSによるスポット数はイネの場合より少なかった。この結果から、トウモロコシの *Cl* と *B-Peru* をイネに導入した場合、高温で吸水させてから露出させた糊粉層でアントシアニンが比較的良好に発現するものと推定された。なかでも、吸水時間が短くてすむ28 $^{\circ}$ Cで4時間の吸水条件が適当であると判断された。次に、果皮にアントシアニンを分布させないA-58の糊粉層についても検討したところ、RIB-P1と同様に28 $^{\circ}$ Cで4時間吸水させると、よく糊粉層を露出できた。A-58は植物体にはアントシアニン着色があるものの、玄米にはいっさいアントシアニン着色がないため、導入後に認められる着色は導入された遺伝子によって発現されていると結論できる。そのため、これ以降の遺伝子導入実験には28 $^{\circ}$ Cで4時間吸水させて

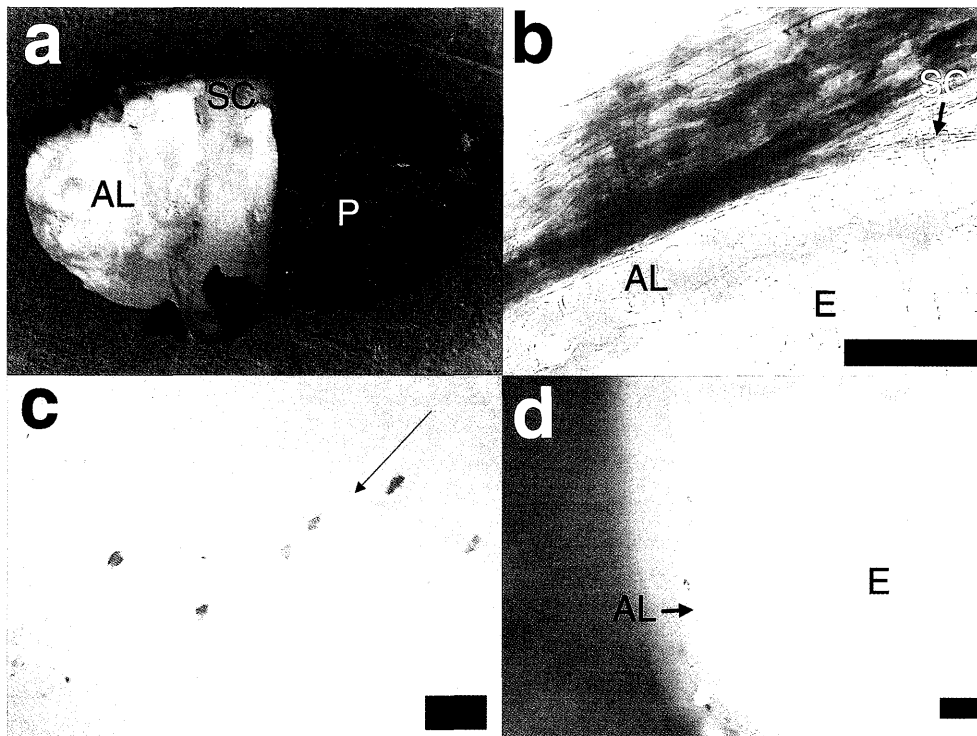


Fig. 1. Exposed aleurone layer (a) and transverse section (b) of RIB-P1 seed, anthocyanin production induced transiently at aleurone layer by microprojectile delivery of *Cl* and *B-Peru* genes (c), and transverse section of RIB-P1 seed indicated by arrow in c (d). AL; Aleurone layer. E; Endosperm. P; Pericarp. SC; Seed coat. Bar=100 μ m.

糊粉層を露出させたA-58の玄米を用いた。

トランジェントアッセイ効率に係わるプラスミドの至適濃度

A-58の糊粉層を用いてアントシアニン発現に係わる *CI* と *B-Peru* を有するプラスミドの至適量を調べた。その結果、*CI* と *B-Peru* を有するプラスミドがともに5 μ g以下ではアントシアニンは発現しないことが判明した (Table 2)。一方、5 μ g以上ではアントシアニンが発現したが、量によって発現に差があった。すなわち、*CI* と *B-Peru* を有するプラスミドの量比が1:1であると、スポット数が増える傾向が見られた。その数は、プラスミドの濃度とは無関係でほぼ一定であった。また、*CI* プラスミドが5 μ gの時、*B-Peru* プラスミドの量が5 μ g以上であってもスポット数に顕著な差はなかった。一方、*B-Peru* プラスミドの量が5 μ g/10 μ gの時は、*CI* プラスミドも5 μ g/10 μ gの時に有意にスポット数が増えたが、5 μ g/10 μ g以上では逆に、スポット数が有意に減少した。さらに、*B-Peru* が20 μ gの時は、*CI* が20 μ g未満でスポット数が有意に減少したが、その減少程度は *CI* が20 μ gの時に *B-Peru* が20 μ g未満での組み合わせの方が大きかった。結局、アントシアニンのスポット数を最大にする *CI* と *B-Peru* の量はともに5 μ gずつか、あるいは5 μ gと10 μ gの組み合わせの時であった。ただし、なるべく少ない量で実験する必要もあることから、イネのトランジェントアッセイ系でも、Bodeau and Walbot (1992)が報告しているように *CI* と *B-Peru* の量はともに5 μ gずつが適濃度と結論された。ちなみに、GUS 遺伝子の活性とプラスミドの量との関係を Table 3 に示した。GUS 遺伝子の活性の場合には4 μ gまでは差がなかったが、量が多くなるにつれて活性が上昇し、10 μ gで最大に達しそれ以上の量ではむしろ減る傾向にあった。

以上の結果をまとめて、Fig. 2 にイネ A-58 の完熟種子

Table 3. Mean number of blue spots per grain expressed transiently by GUS gene with different concentration in A-58 aleurone

Conc. of p35SGUS (μ g)	Mean number of blue spots/grain
0	0
1	12.7 $\pm$ 0.6c
2	14.3 $\pm$ 0.5c
3	13.3 $\pm$ 0.6c
4	13.9 $\pm$ 0.4c
5	17.1 $\pm$ 2.0bc
10	22.0 $\pm$ 2.7a
15	20.8 $\pm$ 1.2ab
20	19.8 $\pm$ 1.1ab

Note. Means followed by same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

糊粉層を用いたトランジェントアッセイの概略図を示した。

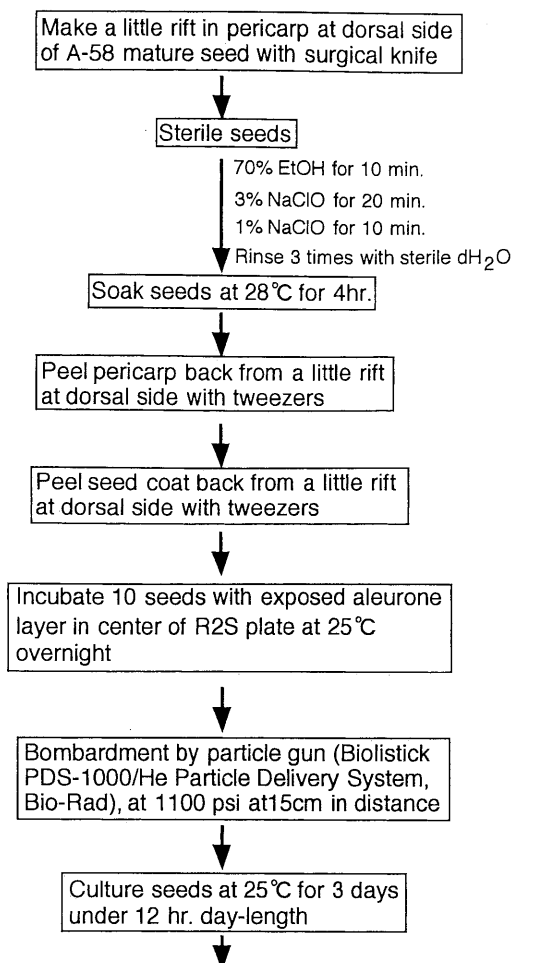
考 察

遺伝子導入する場合には受容体となる細胞の状態が重要で、前処理の条件がトランジェントアッセイの効率を律速している可能性がある (Vain *et al.* 1993)。したがって、トランジェントアッセイにおける発現効率を高めるには、糊粉層がもっとも活性の高くなる時に遺伝子発現が生ずるように遺伝子導入する必要があると考えられる。アントシアニン発現には導入してから3日必要であることから、なるべく糊粉層露出にかかる時間は短くした方がよいと考えられる。本実験の結果、28°Cで4時間の吸水条件が糊粉層露出に適し、この後の24時間の培養 (Fig. 2) がトランジェント発現に重要であると推定される。トウモロコシの完熟種子糊粉層を利用したトランジェントアッセイ系においても、糊粉層の調整は室温

Table 2. Mean number of red spots per grain expressed transiently in A-58 aleurone followed delivery of *CI* and *B-Peru* cDNAs with different concentration by particle bombardment.

Conc. of p35SB-Peru (μ g)	Mean number of red spots/grain									
	Concentration of p35SC1 (μ g)									
	0	1	2	3	4	5	10	15	20	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0								
2	0		0							
3	0			0						
4	0				0					
5	0					19.8 $\pm$ 1.1abc	12.9 $\pm$ 0.4f	13.5 $\pm$ 0.2ef	12.8 $\pm$ 0.4f	
10	0					21.1 $\pm$ 0.8a	17.9 $\pm$ 0.2bcd	15.9 $\pm$ 1.1de	13.3 $\pm$ 0.6ef	
15	0					18.3 $\pm$ 1.2bcd	14.3 $\pm$ 0.5ef	17.1 $\pm$ 2.0cd	14.3 $\pm$ 0.5ef	
20	0					17.8 $\pm$ 1.0cd	17.6 $\pm$ 1.3cd	13.9 $\pm$ 0.4ef	20.7 $\pm$ 0.3ab	

Note. Means followed by same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.



Observe anthocyanin spots under a dissecting microscope

Fig. 2. Scheme of transient assay for anthocyanin expression at aleurone layer of A-58 mature seed of rice by microprojectile delivery of *C1* and *B-Peru*, transcriptional activators of maize.

で24時間吸水させて行い、遺伝子導入している (Ludwig *et al.* 1990).

本実験では、アントシアニン発現の誘導遺伝子としてトウモロコシの *C1* と *B-Peru* を用いたが、果皮にはアントシアニンを発現する紫米の糊粉層でも両遺伝子が必要であることが確かめられた。元来、紫米は糊粉層に着色しないこと (Nagao *et al.* 1968)、また *C1* あるいは *B-Peru* を単独で導入してもアントシアニン発現が認められないことから、イネの糊粉層では *C1* と *B-Peru* に相当する遺伝子は両方とも発現していないことが示唆された。また、本実験では、*C1* と *B-Peru* の量比が1:1の時にアントシアニン発現が高くなり、このことは、Bodeau and Walbot (1992) が報告した、アントシアニン発現に関する *C1* と *R* の量比が等しい時にレポーター遺伝子の発現を最大にするということと一致した。Bodeau and Walbot (1992) は、また *R* が過剰にあると発現を抑制することも指摘したが、本実験では *B-Peru* の量より *C1* が過剰にあると阻害的な効果を示した。ただし、*B-Peru* が過剰量ある時には一定の関係は見いだせなかった。こ

のことは、イネの糊粉層においてアントシアニンを効率よく発現させるには *C1* の量が制限要因であることが推定された。一方で、*C1* と *B-Peru* がそれぞれが5 µg以下の時にはアントシアニンが発現しなかった。トウモロコシの場合にはそれぞれが0.05 µgの時から、*Bz2*のプロモーターを活性化する (Bodeau and Walbot 1992)、あるいは *Lc* の場合にも0.01 µgからアントシアニンが発現することが明らかになっている (Ludwig *et al.* 1990)。これらのことから、イネの糊粉層におけるトウモロコシの *C1* と *B-Peru* のプラスミドの量が5 µg以上でイネのアントシアニン生成遺伝子を活性化していることについて、異种植物の遺伝子を用いていることが一つの原因ではないかと考えられる (Hu *et al.* 1996)。

アントシアニン合成の転写制御遺伝子導入によるアントシアニンのトランジェント発現は細胞自律的 (cell-autonomous) であることが報告され (Ludwig *et al.* 1990)、一方 GUS 遺伝子による青いスポットは細胞非自律的 (cell-nonautonomous) であることから、トランジェントアッセイの効率検定にはアントシアニン発現に係わる転写制御遺伝子が好適であると報告された。さらに、GUS 遺伝子の場合のように生化学的な染色処理をしなくてもアントシアニン発現を確認できることもあって、たとえばプロモーターの制御領域検定のエフェクターとして、あるいは形質転換における可視的な選抜マーカーとしての利用が提案されている。実際に、トウモロコシの *R* や *Lc* 遺伝子がソルガム (Casas *et al.* 1993) やコムギおよびオオムギ (McCormac *et al.* 1998) で用いられている。

イネ完熟種子の糊粉層を利用したアントシアニン合成の転写制御遺伝子のトランジェントアッセイ系を確立したことで、今後も単離されるであろうアントシアニン関連遺伝子と Takahashi (1957) が確立した遺伝子系との整合性が確かめられるとともに、*Pl* 遺伝子のみならず他のアントシアニン発現関連遺伝子の解析がイネにおいて進展することが期待される。

謝 辞

イネの完熟種子糊粉層を用いたトランジェントアッセイ法に関して、服部東穂博士、三重大学遺伝子実験施設、にご指導いただき、ここに感謝申し上げます。また、V. L. Chandler 博士、米国アリゾナ大学、からトウモロコシの *C1* および *B-Peru* cDNA クローンを、経塚淳子博士、奈良先端科学技術大学院大学、から GUS 遺伝子を、佐藤尚氏、北海道農業試験場からはトウモロコシ、W22 の種子を分譲していただいた。ここに深甚なる謝意を表します。この研究の一部は、文部省科学研究費、No. 08876002 と No. 10460007 (前川) と No. 10182220 (坂本) および財団法人大原奨農会研究助成費によって実施された。

引用文献

- Ahn, S. and S. D. Tanksley (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7980–7984.
- Bodeau, J. P. and V. Walbot (1992) Regulated transcription of the maize *Bronze-2* promoter in electroporated protoplasts requires the *Cl* and *R* gene products. *Mol. Gen. Genet.* 233: 379–387.
- Callis, J., M. Fromm and V. Walbot (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* 1: 1183–1200.
- Casas, A. M., A. K. Kononowicz, U. B. Zehr, D. T. Tomes, J. D. Axtell, L. G. Butler, R. A. Bressan and P. M. Hasegawa (1993) Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11212–11216.
- Chen, M. and J. L. Bennetzen (1996) Sequence composition and organization in the *Sh2/Al*–homologous region of rice. *Plant Mol. Biol.* 32: 999–1001.
- Coe, E. H. (1994) Anthocyanin genetics. In “The maize handbook” Freeling, M. and V. Walbot (eds), Springer-Verlag, New York, pp 279–281.
- Dooner, H. K., T. P. Robbins and R. A. Jorgensen (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Ann. Rev. Genet.* 25: 173–199.
- Goff, S. A., K. C. Cone and V. L. Chandler (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: evidence for direct functional interaction between two classes of regulatory protein. *Gene Dev.* 6: 864–875.
- Holton, T. A. and E. C. Cornish (1995) Genetics and Biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071–1083.
- Hu, J., B. Anderson and S. R. Wessler (1996) Isolation and characterization of rice *R* genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. *Genet.* 142: 1021–1031.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan (1987) GUS-fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901–3907.
- Klein, T. M., B. A. Roth and M. E. Fromm (1989) Regulation of anthocyanin biosynthetic genes introduced into intact maize tissues by microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6681–6685.
- Ludwig, S. V., B. Bowen, L. Beach and S. R. Wessler (1990) A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science*. 247: 449–450.
- McCormac, A. C., H. Wu, M. Bao, Y. Wang, R. Xu, M. C. Elliott and D.-F. Chen (1998) The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* 99: 17–25.
- Nagao, S., M. Takahashi and T. Kinoshita (1968) Heterotic effect of alleles at *Pl*-locus in rice plant. –Genetical studies on rice plant, XXX–. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 56: 45–56.
- Nakai, K., Y. Inagaki, H. Nagata, C. Miyazaki and S. Iida (1998) Molecular characterization of the gene for dihydroflavonol 4-reductase of *japonica* rice varieties. *Plant Biotech.* 15: 221–225.
- Ohira, K., K. Ojima and A. Fujiwara (1973) Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14: 1113–1121.
- Reddy, V. S., B. E. Scheffler, G. Madhuri, M. N. Srivastava, A. Kumar, P. V. Satyanarayan, S. Nair and M. Mohan (1996) Chalcon synthase in rice (*Oryza sativa* L.): Detection of the CHS protein in seedlings and molecular mapping of the *chs* locus. *Plant Mol. Biol.* 32: 230–235.
- Reddy, V. S., B. E. Scheffler, U. Wienand and A. R. Reddy (1996) *DFR* from rice cv. Purpleputtu. *Plant Mol. Biol.* 32: 1235–1237.
- Reddy, V. S., B. E. Scheffler, U. Wienand, S. R. Wessler and A. R. Reddy (1998) Cloning and characterization of the rice homologue of the maize *Cl* anthocyanin regulatory gene. *Plant Mol. Biol.* 36: 497–498.
- Selinger, D. A. and V. L. Chandler (1999) A mutation in the *pale aleurone color1* gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. *Plant Cell* 11: 5–14.
- Takahashi, M.-E. (1957) Analysis on apiculus color genes essential to anthocyanin coloration in rice. *J. Fac. agr. Hokkaido Univ.* 50: 266–362.
- 竹崎嘉徳(1921)紫稻の葉色遺伝に就いて. 遺雜 1: 37–43.
- Vain, P., M. D. McMullen and J. J. Finer (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12: 84–88.

A System for Transient Assay of Transcriptional Factors Controlling Anthocyanin Biosynthesis at the Aleurone Layer of Mature Rice Seed

Masahiko Maekawa, Keisuke Kageyama, Kazuhide Rikiishi, Shigeko Utsugi, Kazuhiko Noda and Wataru Sakamoto

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710-0046, Japan

Various combinations of temperature and time for soaking seed were tested to establish a system for transient assay of transcriptional factors controlling anthocyanin biosynthesis to prove that the isolated gene is an inducible gene for anthocyanin expression at the aleurone layer of mature rice seed. The aleurone of mature seed of RIB-P1 with purple pericarp was sufficiently exposed under five combinations. Both *Cl* and *B-Peru*, transcriptional factors controlling anthocyanin biosynthesis of maize, were introduced by particle bombardment into the aleurone exposed under these five conditions. The highest expression of anthocyanin was obtained at the aleurone of the seeds soaked at 28°C for 4 hours. The effect of concentration of plasmids with *Cl* and *B-Peru* for introduction into the aleurone of A-58 mature seed with

white pericarp soaked at 28°C for 4 hours was examined. Both *Cl* and *B-Peru* were found to give high expression of anthocyanin at the same concentration. Especially, 5 µg of *Cl* with 5 µg of *B-Peru* and 5 µg of *Cl* with 10 µg of *B-Peru* showed the highest expression. In conclusion, soaking of mature rice seed at 28°C for 4 hours and introduction of 5 µg of *Cl* with 5 µg of *B-Peru* into the exposed aleurone was found to be a highly efficient system for transient assay of transcriptional factors controlling anthocyanin biosynthesis.

Key Words: *Oryza sativa*, aleurone, anthocyanin, transcriptional factor, transient assay.