

トランスポゾンを利用した植物遺伝子の機能解析

誌名	育種学研究 = Breeding research
ISSN	13447629
著者	武田, 真 宮尾, 安藝雄 廣近, 洋彦
巻/号	1巻4号
掲載ページ	p. 243-248
発行年月	1999年12月

トランスポゾンを利用した植物遺伝子の機能解析

武田 真・宮尾安藝雄・廣近洋彦

(農林水産省 農業生物資源研究所, つくば市 〒305-8602)

Functional genomics of plants using transposons

Shin Takeda, Akio Miyao and Hirohiko Hirochika

(Dep. Mol. Genet., Natl. Inst. Agrobiological Res., Tsukuba 305-8602, Japan)

キーワード: トランスポゾン・タギング, 挿入変異, イネ, レトロトランスポゾン, ゲノム機能解析, PCR

1. はじめに - 遺伝子機能解析の重要性 -

モデル植物として研究されているアラビドプシスやイネについての研究基盤が、急速に整備されてきている。ゲノムの構造解析から得られる多大な情報は、植物の多様な性質を遺伝子レベルで理解するのに、大きく貢献すると期待されている。植物の遺伝子機能の解明は、懸念されている将来の食糧問題、地球環境問題の観点からもその重要性がクローズ・アップされている。本稿では、トランスポゾン(動く遺伝子, 転移因子)を利用した遺伝学的手法及び逆遺伝学的手法による遺伝子の機能解析法について概説した後、私達の研究室で行われているイネのレトロトランスポゾン *Tos17* を用いた実験系について紹介する。また、植物遺伝子の機能解析の最近の動向について簡単に述べる。

2. 変異原としてのトランスポゾン

トランスポゾンは、ゲノム中の遺伝子あるいはその近傍に転移挿入して、遺伝子の構造や発現パターンを変化させる(変異を引き起こす)。一般にトランスポゾンは、DNA型およびレトロ型の2つのタイプに大別されるが、その両者が植物ゲノム中に存在することが明らかにされている。両者の間では、その構造のみならず転移様式に大きな違いがある(図1)。DNA型トランスポゾンの転移では、トランスポゾン自身がゲノムから切り出され、ゲノム中の他の部位に挿入される。トウモロコシの *Ac/Ds*, *En/Spm*, *Mu*, キンギョソウの *Tam*, ペチュニアの *dTph1* などがこのタイプに属する。DNA型では、挿入した因子が再び切り出される時にしばしば表現型が元に戻る(復帰変異が起こる)ため、一般に不安定な変異を引き起こすとされている。ただし、例外的に、*Mu* 因子は復帰変異を殆ど起こさないことが知られている。一方、レトロ型(レトロトランスポゾンと呼ばれる)の転移では、トランスポ

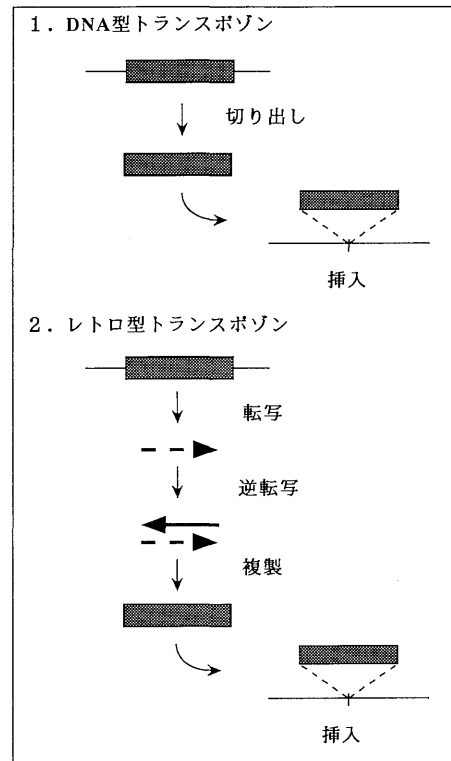


図1. トランスポゾンの種類と転移様式

ンが転写、逆転写を介して複製され、ゲノム中の他の部位に挿入される。したがって、レトロトランスポゾンは転移が起きる度にそのコピー数が増加する。またこのタイプは、一度挿入したトランスポゾンが切り出されることがないため、一般に安定な変異を引き起こす。レトロトランスポゾンは、さらに末端に反復配列をもつLTR型とnon-LTR型(レトロポゾンとも呼ばれる)に分類される。後述するイネの *Tos17* はLTR型に、LINE(long interspersed nuclear element)やSINE(short interspersed nuclear element)は、non-LTR型にそれぞれ属する。また最近、MITE(miniature inverted repeat transposable element)と呼ばれる新しいタイプのトランスポゾンが発見された(Wesslerら1995)。MITEの転移機構はまだ明らかでなく、上述のグループにも分類されていない。トウモロコシやイネでは、多数のMITEがゲノム中に散在

し、また多くの遺伝子領域内に存在することが示されている。

トランスポゾンの転移挿入が起こると、標的遺伝子に変異が起こると同時に「タグ」がつけられる。このような挿入変異体は、次章に述べる遺伝学的手法及び逆遺伝学的手法の両方による遺伝子の「生体内での」機能解析に利用されている。変異遺伝子に「タグ」をつけてクローニングする手法は遺伝子タギングと呼ばれているが、とりわけトランスポゾンで「タグ」をつけた場合にはトランスポゾン・タギングと呼ばれ、この方法による多くの成功例が示されている。植物での最初のトランスポゾン・タギングの成功は、トウモロコシの *Ac* がクローン化された翌年に報告されている (Fedoroff ら 1984)。その後、種々の DNA 型トランスポゾンをを用いたタギング法によって、重要な機能をもつ遺伝子が多様な植物種から次々と単離同定されている。例えば、トウモロコシからは貯蔵タンパク質 *zein* の合成を制御する転写調節因子 *O2* (sCHMIDT ら 1987) や病原菌抵抗性遺伝子である *Hm* (Johal・Briggs 1992) が、キンギョソウでは花の分化を制御する転写調節因子 *DefA* が (Sommer ら 1991) が、ペチュニアからは頂芽分裂組織の形成に必要な *no apical meristem (nam)* 遺伝子 (Souer ら 1996) が、それぞれ単離されている。また、トランスポゾンを異種植物に導入してトランスポゾン・タギングを成功させた例としては、シロイヌナズナからの雄性配偶子の稔性に関わる *MS2* 遺伝子 (Aarts ら 1993)、トマトからの葉かび病抵抗性遺伝子 *Cf-9* (Jones ら 1994)、タバコからタバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子 *N* (Whitham ら 1994) の単離などが挙げられる。以下に述べる遺伝子タギング法や DNA 型トランスポゾンをを用いたタギング法については、和文の解説書やプロトコールが既に記述されており (石黒ら 1994, 井沢・島本 1996)、より深い理解を得たい方にはこれらを参照することをお薦めしたい。

3. 遺伝学的、逆遺伝学的手法による遺伝子の機能解析

遺伝学的手法 (forward genetics) では、ある形質についての変異体を選び、変異の原因遺伝子を同定する。変異誘発性の化学物質やガンマ線などで処理した集団から変異体を選抜する方法が、従来多く用いられてきた。変異体が得られたら、着目した形質に関与する変異遺伝子の座位を決定し、その座位を元に変異遺伝子を含む DNA 配列を明らかにする (map based cloning)。最近では、変異原として T-DNA やトランスポゾンをを用いる、T-DNA タギングあるいはトランスポゾン・タギング法も行われるようになってきている。タギング法では、挿入部位の遺伝子配列を早く知ることができるという利点がある。この方法では、植物体を T-DNA で形質転換した集団、あるいは、トランスポゾンの転移した集団から変異体を選出、その変異が T-DNA やトランスポゾンの挿入に

起因することを連鎖解析によって推定した後、挿入標的部位の遺伝子を特定する。DNA 型のトランスポゾンを用いた場合には、復帰変異体を同定することによって、選抜した変異がトランスポゾンの挿入に起因することを確認できる。挿入遺伝子の内部に、プロモーター・エンハンサー配列を組み込み、挿入部位近傍の遺伝子を強制的に、または異所的に発現させることで新たな形質を作り出す方法 (アクティベーション・タギング) もよく行われている。レポーター遺伝子を挿入遺伝子の内部に組み込んだジーントラップ、エンハンサートラップ法では、特定の細胞あるいは時期に発現する遺伝子への挿入変異体を選抜することができる。この方法では、挿入遺伝子をヘテロにもつ個体でも、標的遺伝子の発現パターンを検出することができるため、標的遺伝子が致死遺伝子である場合の解析にも有効である。アクティベーション・タギング及びジーン/エンハンサートラップ法の詳細については、柿本 (1996) と槻木 (1996) の記述があるので本稿では割愛する。

逆遺伝学的手法 (reverse genetics) では、ある特定遺伝子について、生体内での機能を調べる。この手法は、目的遺伝子の予測された機能を検証するのに有効であるが、予想外の機能が見つかる場合もある。よく用いられているのは、遺伝子を過剰発現させたり、アンチセンス遺伝子、あるいは改変した遺伝子を発現させた形質転換植物をつくり、その表現型を調べる方法である。ジーン・サイレンシングを利用した方法 (形質転換系及びウイルスベクターを用いた一過的発現系) も、遺伝子の機能解析への有効性が示されている (Baulcombe 1996, 1999)。最も直接的なのは、遺伝子破壊をした植物体の表現型を調べる方法である。しかしながら、植物では、形質転換を用いて特定遺伝子だけを破壊すること (ジーン・ターゲッティング) が困難で、成功例も少ない。これに代わるものとして、T-DNA やトランスポゾンの挿入変異体の集団から、特定遺伝子に挿入変異が起きた植物体を選抜する方法が用いられている。すでに、シロイヌナズナ・トウモロコシ・ペチュニアで、挿入変異体の集団が作成され、逆遺伝学的解析に利用されている (Bensen ら, 1995, Das・Martienssen 1995, Koes ら 1995, Mena ら 1996, Souer ら 1996, Azpiroz-Leehan・Feldmann 1997, Martienssen 1998, Wisman ら 1998)。後で述べるが、目的の挿入変異体を選抜する方法としては、調べたい遺伝子と挿入遺伝子の塩基配列からプライマーをデザインして PCR を行う方法 (site-selected mutagenesis) と、挿入遺伝子の隣接配列を網羅的に解析することにより、目的とする遺伝子の破壊株を選抜する方法がある (Martienssen 1998)。これらの方法は、遺伝学的手法で解析された変異の原因遺伝子を最終的に確認したり、さらに詳細に調べる手段としても用いられる。

4. イネの内在性 LTR-レトロトランスポゾン, *Tos17*を利用した実験系

これまでに植物遺伝子の機能解析に利用されてきたトランスポゾンは、いずれも DNA 型のトランスポゾンである。しかしながら近年になって、転移活性のある自律性の LTR-レトロトランスポゾンがクローン化され、その活性制御機構の解析が進むとともに、これらの因子が遺伝子解析の道具として利用し得ることがわかってきた。現在までに最も研究され、さらに遺伝子の機能解析への応用性の示唆されている植物 LTR-レトロトランスポゾンは、Grandbastien ら (1989) によって単離されたタバコの *Tnt1* と、私達の研究室において単離されたタバコの *Tto1* (Hirochika 1993)、イネの *Tos17* (Hirochika ら 1996b) の 3 つが挙げられる。*Tnt1* と *Tto1* については、異種植物に導入した際にも、転移活性がみられることが確認されている (Lucas ら 1995, Hirochika ら 1996a, 廣近ら、投稿中)。

表 1. *Tos17* の特徴と遺伝子機能解析の道具としての利点

- (1) *Tos17* は、組織培養をすることでその転移が活性化され、コピー数が増加する。培養した組織から植物個体を再分化させることにより、*Tos17* が新たに転移した個体を容易に得られる。
- (2) *Tos17* の転移コピー数を培養期間によって制御できる。
- (3) 多くのレトロトランスポゾンが植物ゲノム中に多コピー存在するのに対し、*Tos17* はイネゲノム解析の標準栽培品種である日本晴のゲノム中に、2 コピーしか存在しない。このため、新たに転移したコピーを特定することが容易である。
- (4) 培養以外の条件下での *Tos17* の活性化はみられない。植物体の細胞中での転移や次世代に変異が遺伝しない転移が殆ど起こらない。
- (5) 遺伝子領域内への *Tos17* の挿入が比較的高い頻度で起こる。
- (6) 転移部位の選択性が低い。^(注1)
- (7) 転移したコピーが安定である。また、転移挿入時に末端の欠失が殆ど起こらない。
- (8) 内在性のトランスポゾンであるため、挿入変異集団を生育し、解析する時に、遺伝子組み換え実験の制約を受けない。

^(注1) DNA 型トランスポゾンである *Ac/Ds* や *En/Spm* を用いた場合には、転移因子の挿入が、切り出された部位の近傍で起こりやすい。そのため、目的の遺伝子が近傍にあることが推定されている場合には、その遺伝子の挿入変異体が得られる確率が高い。また、予め染色体の様々な部位に転移因子が挿入されたシステムを用意しておくことによって、多様な挿入変異体を得ることができる。一方、レトロトランスポゾン *Tos17* では、転移挿入が転写されるコピーの近傍以外でも起こるため、より選択性の少ない挿入変異の個体集団を用意することができる。レトロトランスポゾンの中には、酵母の *Ty* 因子のようにゲノム中での挿入部位に選択性を持つものが見つかるが、*Tos17* の挿入部位の顕著な選択性は、これまでのところみられていない (Hirochika ら 1996b, 山崎ら、投稿準備中)。

LTR-レトロトランスポゾンは、動物のレトロウイルスに類似した構造をもち、逆転写を介した転移の機構もレトロウイルスのそれと類似している。ただし、LTR-レトロトランスポゾンには細胞間を移動するための env ドメインがないため、レトロウイルスのような感染性を持たない。LTR-レトロトランスポゾンは植物ゲノムに普遍的にかつ多数存在するが、その大部分は転移活性をもたない不活性型の因子と推定されている。また、転写あるいは転移活性のみられる LTR-レトロトランスポゾンについても、通常の生育条件下では不活性化状態にあり、ストレス条件下で活性化されるといった共通点がみられている (Grandbastien 1998)。

現在、私達の研究室では、イネより単離された *Tos17* をイネ遺伝子の機能解析に利用するためのシステムの構築が進められている。*Tos17* の主な特徴と遺伝子機能解析の道具としての有用性を表 1 にまとめた。現在行われている 3 つのアプローチ (図 2) について、利点と改善すべき点をあげながら以下に紹介する。いずれの方法を用いた場合においても、変異形質が *Tos17* の挿入によって起因することを複数の事例をあげて証明しなければならない。実際には、同じ遺伝子の別の位置に変異をもつ個体 (allelic mutant) について表現型が同じであることを示すか、野生型遺伝子を導入し、相補性試験を行う必要がある。

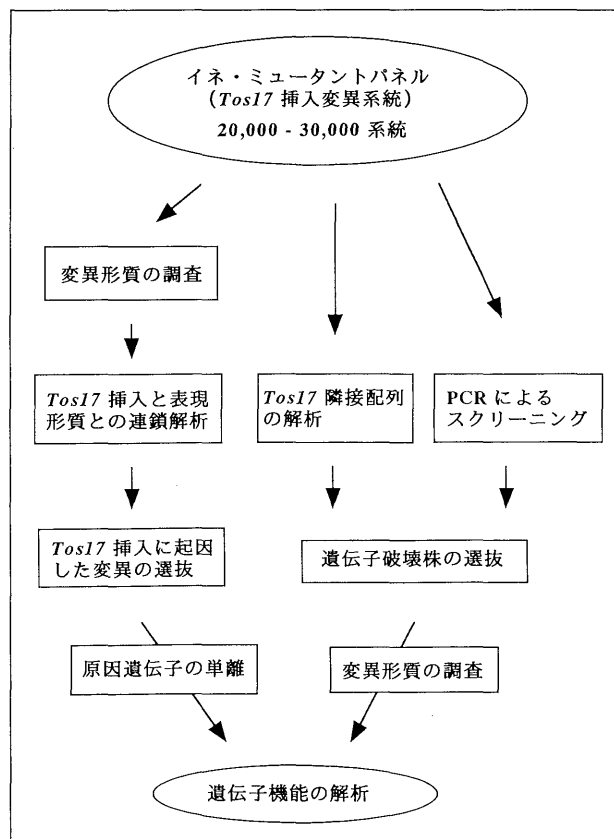


図 2. *Tos17* を利用したイネ遺伝子の機能解析

(1) トランスポゾン・タギング (forward genetics)

培養により活性化された *Tos17* が遺伝子領域に比較的高い頻度で転移挿入することから、*Tos17* が培養変異の一因となっていることが示され、また同時にトランスポゾン・タギングに利用できることが示唆された (Hirochika ら 1996b). 現在までに、培養によって *Tos17* の転移を誘発した、2万系統のイネ (日本晴) が作出され、種子として保存されている。このようにして得られた変異集団をミュータントパネルと呼んでいる。このミュータントパネルでは、新たに転移した *Tos17* のコピー数が平均5コピー程度になっているが、イネの全遺伝子を網羅する挿入変異体を得るためには、2~3万系統の集団が必要と試算されている。

ミュータント・パネルとして保存されている種子 (M2) を、発芽、生育させて表現型を調べると、枯死、分げつ異常、矮性、アルビノ、黄緑葉、縦縞葉、垂れ葉、褐斑葉、病斑葉、不稔、鎌いらず、粒型変異、穂発芽など様々な変異が約40%の系統で観察される。変異形質と *Tos17* の挿入との連鎖は、*Tos17* の DNA プローブを用いた DNA ゲル・プロット法によって解析し、タグされた遺伝子は、TAIL-PCR や Inverse-PCR 法によって単離することができる。T-DNA の挿入変異の場合には、T-DNA がしばしば同じ挿入箇所にも多コピー挿入されて不安定となるほか、T-DNA の末端が欠失しやすい欠点がある。これに対して、*Tos17* の挿入変異の場合には、同じ挿入箇所にも多コピー転移する頻度は低く、末端の欠失も殆ど起こらないため、PCR による隣接遺伝子の単離に有利となっている (*Tos17* が他の *Tos17* に挿入する場合があるが、これまでに不安定性はみられていない)。

観察された変異のうちのどれくらいが挿入遺伝子でタグされているかは、変異の原因遺伝子のクローニングの効率性を決定づける。シロイヌナズナにおける T-DNA による挿入変異系統では、変異の 35~40% が T-DNA にタグされていると推定されている (Azpiroz-Leehan・Feldmann 1997)。ミュータントパネルでは、*Tos17* との連鎖解析から変異の 5~10% が *Tos17* の挿入に起因すると推定している。培養処理を経た再分化植物体では、*Tos17* 以外に起因する培養変異が同時に起きているために、*Tos17* によるタギング効率が低くなっていると考えられる。培養変異の原因については、これまでに幾つかの報告がなされている。トウモロコシでは、培養によって DNA 型のトランスポゾンが活性化されることが知られている (Peschke ら 1987, Peschke・Phillips 1991)。タバコでは、プロトプラト培養によって誘発される硝酸還元酵素の欠損変異のうち 1/3 が挿入変異を有することが示されている (Grandbastien ら 1989)、培養中に活性化するレトロトランスポゾンとして *Tnt1*, *Tnp2*, *Tto1*, *Tto2* が単離されている (Grandbastien ら 1989, Hirochika 1993, Grandbastien 1998)。イネでは、*Tos17* 以外にも *Tos10*, *Tos19* の転移が培養により誘発されるが (Hirochika ら

1996b)、日本晴ではこれらの活性は低いため、他の培養変異の要因の存在が示唆される。イネの *Tos17* によるタギング効率を高めるためには、*Tos17* 以外に起因する培養変異を減らす必要があるが、現在、*Tos17* の転移をより活性化できる条件が模索されている。また、培養により転移が活性化される、*Tos17* 以外の内在性トランスポゾンの探索も続けられている。

(2) *Tos17* による 遺伝子破壊株の PCR スクリーニング (reverse genetics)

特定の遺伝子の破壊株を得たい場合には、PCR スクリーニングによってミュータントパネルから破壊株を選抜することができる。*Tos17* 挿入変異系統のゲノム DNA を 2次元または、3次元にプールしたものを鋳型とし、*Tos17* に特異的なプライマーと任意の遺伝子に特異的なプライマーを用いて、PCR を行う。*Tos17* が遺伝子のどの位置に、どの向きで挿入するかは予測できないので、目的の遺伝子について複数のプライマーの組み合わせをテストする必要がある。非特異的な PCR 産物が多く増幅する場合には、PCR 産物を電気泳動した後、膜に転写し、目的の遺伝子の断片をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションを行って挿入変異を確認することができる。転移した *Tos17* が安定で、また、転移挿入時に末端の欠失が殆ど起こらないことは、PCR スクリーニングをする際の利点となっている。この方法によって、イネのホメオティック遺伝子の 1 つである *OSH15* の破壊株が得られ、この遺伝子が節間伸長を制御することが示されている (Sato ら 1999)。

(3) *Tos17* 挿入変異 遺伝子の ランダム・シーケンス (reverse genetics)

Tos17 の挿入隣接配列は TAIL-PCR 法や Suppression PCR 法によって容易に決定することができる (Miyao ら 1998)。変異系統毎に隣接配列のデータを集積すれば、その集積データ中から解析したい遺伝子の破壊株を見つけ出すことが可能になる。現在、隣接配列のデータベース化が行われているが、将来さらに大規模化が進めば、推定総数 30,000 のイネ全遺伝子の破壊株がデータベース上で検索できるようになると期待されている。

(2) 及び (3) の方法では特定の遺伝子の破壊株の形質を調査するのであるが、*Tos17* を用いた系に限らず、遺伝子破壊による解析で問題となるのは、目的の遺伝子が破壊されていても、それによって引き起こされる表現形質を見出すのが容易でない点である (Bouchez and Höfte 1998)。目的の遺伝子の発現パターンを知ることは、表現形質を観察する大きな手がかりとなるが、マイクロアレイを用いた大規模な遺伝子発現パターンのデータ集積は、将来この問題を軽減するであろう。しかしながら、遺伝子が重複している、あるいは遺伝子の機能が redundant である場合には、これら遺伝子の機能を特定することが困難である。ただし、遺伝子が重複していても、それらの機能が分化している場合には、それぞれの機能を特定す

ることが可能である。逆に、同じ遺伝子が多面的な機能を持つ場合には、変異形質として観察できる一部の機能しか特定できないと考えられる。このような問題を解決するためには、遺伝子破壊以外の相補的な解析手段が必要である。また、植物は多くの環境応答性の遺伝子や病害虫に対する防御遺伝子をもつため、種々の生育条件下での遺伝子機能を解析することが必要と予想される。

5. 今後の展望 - 植物遺伝子の機能解析の動向 -

大腸菌や酵母、線虫を始めとしたモデル生物の全ゲノム遺伝子配列の解析は、今やヒトを含む高等動物に加え、シロイヌナズナやイネといった植物にも及んでおり、そこから得られる多大な遺伝子構造の情報は、新たな生物学研究の基盤を与えている。こうした状況の中で、遺伝子機能の解析はより重要な課題となっており、実際、今日までに多くの解析手法が考案され、急速な進展がみられている。近年のゲノム及び遺伝子の機能解析は、functional genomics という用語で呼ばれているが、植物の分野でも、重要な機能をもつ未知なる遺伝子の解明が、大きな課題となっている。

本稿で述べてきたように、トランスポゾンの挿入変異体を用いた遺伝子機能解析は、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、キンギョソウ、ペチュニア、トマトなどの植物で行われているが、今後さらなる成果が期待される。とりわけシロイヌナズナでは、*Ac/Ds* や *En/Spm* や T-DNA の挿入変異体のみならず、アクティベーション・タギング、ジーン/エンハンサー・トラップの系統が續々と作出され、利用されている。これら複数の相補的なシステムによって多くの遺伝子の機能が明らかにされており、今後さらに進展するであろう。イネについても、*Tos17* 以外にも *Ac/Ds*, *Spm* による挿入変異体を利用した解析やアクティベーション・タギング、ジーン/エンハンサー・トラップの系統の作成が進められている。トウモロコシでは、抗生物質耐性遺伝子を内部にもつ *Mu* 因子を組み込んだ形質転換体がつくられた。これを転移させることで、推定 50,000 に及ぶ遺伝子全てについての挿入変異を作りだし、挿入部位の遺伝子配列と機能を同時に解析するプロジェクトが始まった。また、MITE を用いたトランスポゾン・ディスプレイ (多コピーの因子の活用; AFLP) も新たな試みとして行われようとしている。近年に開発された DNA チップ、マイクロアレイのような新しい技術は、包括的な遺伝子発現パターンの解析や、より簡便な遺伝子マップの作成に寄与し、遺伝子機能解析のスピードをさらに加速させると期待されている。また、種々の遺伝子の機能解析の手法は他の有用な植物にも適用されていくと予想される。植物の functional genomics の動向について詳しく知りたい方には、Bouchez・Höfte (1998), Martienssen (1998), Birchler ら (1999), Somerville と Somerville (1999) の記述や、Science 誌 [282 巻 (1998) pp 652-654.] に掲載された記事 'A Bonanza for Plant

Genomics' を参照することをお薦めする。

6. おわりに

遺伝学的手法、逆遺伝学的手法による植物遺伝子の機能解析の進展は、新たな研究の起点を作りだし、また同時に、生化学、分子遺伝学、分子生物学、生理学、組織化学、育種学といった多くの学問領域の研究と相互作用をして、植物の包括的な理解に向けた研究を推進していくと思われる。新しい研究接点の増加はさらに新たな視点やアプローチを生み出すと期待され、そうした意味では、私達はこれから大きく展開する研究分野のまだ入り口に立っているだけなのかも知れない。また、今後得られるであろう植物遺伝子の機能についての知見は、生物学的な理解を深めることにとどまらず、農業あるいは工業的に有用な植物の作出といった可能性をさらに大きく広げると予想されている。多くの研究者が、より効率的な実験システムの構築や得られる知見の有効的な利用に知恵を出し合い、貢献することによって、将来その可能性から大きな果実を収穫できるものと確信している。

謝辞

ゲノム動態研究室の杉本和彦、山崎宗郎 両氏には、イネ遺伝子の機能解析についての有用なディスカッションに心から感謝いたします。*Tos17* を用いた機能解析は、COE プロジェクト及び生研機構基礎研究推進事業によりサポートされ、STAFF 研究所との共同研究によって進められている。

引用文献

- Aarts M.G.M., W.G. Dirkse, W.J. Stiekema and A. Pereira (1993) *Nature* 363: 715-717.
- Azpiroz-Leehan, R. and K.A. Feldmann (1997) *Trends Genet.* 13: 152-156.
- Baulcombe, D.C. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32: 79-88.
- Baulcombe, D.C. (1999) *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 109-113.
- Bensen, R.J., G.S. Johal, V.C. Crane, J.T. Tossberg, P.S. Schnable, R.B. Meeley and S.P. Briggs (1995) *Plant Cell* 7: 75-84.
- Birchler, J., J. Langdale and V. Chandler (1999) *Trends Plant Sci.* 4: 205-206.
- Bouchez, D. and H. Höfte (1998) *Plant Physiol.* 118: 725-732.
- Das, L. and R. Martienssen (1995) *Plant Cell* 7: 287-294.
- Fedoroff, N. V., D.B. Furteck and O. E. Nelson, Jr. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3825-3829.
- Grandbastien, M.A., A. Spielmann and M. Caboche (1989) *Nature* 337: 376-380.
- Grandbastien, M.-A. (1998) *Trends Plant Sci.* 3: 181-187.
- Hirochika, H. (1993) *EMBO J.* 12: 2521-2528.

- Hirochika, H., H. Otsuki, M. Yoshikawa, Y. Otsuki, K. Sugimoto and S. Takeda (1996a) *Plant Cell* 8: 725-734.
- Hirochika, H., K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa and M. Kanda (1996b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7783-7788.
- 石黒澄衛・和田拓治・望月伸悦・岡田清孝・志村令郎 (1994) *植物細胞工学* 6: 142-147.
- 井沢 毅・島本 功 (1996) “モデル植物の実験プロトコール”, 島本 功・岡田清孝監修, 秀潤社, 東京. 49-54.
- Johal, G.S. and S.P. Briggs (1992) *Science* 258: 985-987.
- Jones D.A., C.M. Thomas, K.E. Hammond-Kosack, P.J. Balint-Kurti. and J. D.G. Jones (1994) *Science* 266: 789-793.
- 柿本辰男 (1996) “モデル植物の実験プロトコール”, 島本 功・岡田清孝監修, 秀潤社, 東京. 135-142.
- Koes, R., E. Souer, A. van Houwelingen, L. Mur, C. Spelt, F. Quattrocchio, J. Wing, B. Oppedijk, S. Ahmed, T. Maes, T. Gerats, P. Hoogeveen, M. Meesters, D. Kloos and J.N.M. Mol (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8149-8153.
- Lucas, H., F. Feuerbach, K. Kunert, M.-A. Grandbastien and M. Caboche (1995) *EMBO J.* 14: 2364-2373.
- Martienssen, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 2021-2026.
- Mena, M., B.A. Ambrose, R.B. Meeley, S.P. Briggs, M. F. Yanofsky and R.J. Schmidt. (1996) *Science* 274: 1537-1540.
- Miyao, A., M. Yamazaki and H. Hirochika (1998) *Plant Biotechnol.* 15: 253-256.
- Peschke, V.M., R.L. Phillips and B.G. Gengenbach (1987) *Science* 238: 804-807.
- Peschke, V.M. and R.L. Phillips (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 90-97.
- Sato, Y., N. Sentoku, Y. Miura, H. Hirochika, H. Kitano and M. Matsuoka (1999) *EMBO J.* 18: 992-1002.
- Schmidt, R.J., F.A. Burr and B. Burr (1987) *Science* 238: 960-963.
- Somerville, C. and S. Somerville (1999) *Science* 285: 380-383.
- Sommer, H., J.-P. Beltr, P. Huijser, H. Page, W.-E. Lönnig, H. Saedler and Z. Schwarz-Sommer (1991) *EMBO J.* 9: 605-613.
- Souer, E., A. van Houwelingen, D. Kloos, J. Mol and R. Koes. (1996) *Cell* 85: 159-170.
- 槻木竜二 (1996) “モデル植物の実験プロトコール”, 島本 功・岡田清孝監修, 秀潤社, 東京. 129-134.
- Wessler, S.R., T.E. Bureau and S.E. White (1995) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 814-821.
- Whitham, S., S.P. Dinech-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr and B. Baker (1994) *Cell* 78: 1101-1115.
- Wisman, E., U. Hartmann, M. Sagasser, E. Baumann, K. Palme, K. Hahlbrock, H. Saedler and B. Weisshaar. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12432-12437.