

## ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) をプローブとして

### クローニングしたイネゲノムDNA断片の解析

永田俊文・\*西口正通 (九州農業試験場・\*農業生物資源研究所)

Toshifumi NAGATA and Masamichi NISHIGUCHI: Molecular Analysis of a Rice Genomic Clone Isolated with a Probe of Hygromycin Phosphotransferase Gene (HPT)

エレクトロポレーションによる外来遺伝子の導入手法は、種々の植物を用いて盛んに行われている。特に、アグロバクテリウムによる遺伝子導入が利用できないイネ等の単子葉植物において有用である。しかし、本手法により、外来遺伝子が植物染色体に組み込まれる機構についてはほとんど解明されていない。そこでこの組み込み機構を解明する一環として、遺伝子の導入部位を含む領域の塩基配列を明らかにする目的で、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) を導入したイネカルスより、導入部位を含むクローンを選抜しようとした。そして、この実験過程で、HPT を含まないクローンが得られ、本クローンのゲノムDNA断片の塩基配列を解析した。

#### 1. 材料及び方法

遺伝子導入は、イネ (*Oryza sativa*, L.) 品種「日本晴」を用い、この懸濁培養細胞からプロトプラストを単離し、導入遺伝子として HPT を含むプラスミド DNA を用い、エレクトロポレーションにより遺伝子導入を行った。ゲノムDNAはCTAB法<sup>2)</sup>により抽出し、*EcoRI*により切断後ゲノミックライブラリーに用いた。ベクターとして、λ ZAP II (Stratagene) を、またパッケージングには Gigapack Gold (Stratagene) を供試した。サザン及びブランクハイブリダイゼーションは常法に従った。オートラジオグラフィはX線フィルム (RX, フジフィルム) と、イメージアナライザー (BAS2000, フジフィルム) を用いて行った。シーケンズ解析には、DNA断片を Erase a base system (Promega) により欠失DNAを作製し、pBluescript (Stratagene) にサブクローニングしたものを用いた。ダイデオキシ法に従い、Taq DNA polymerase cycle core kit (ABI) を用いて、各塩基の反応を行い、DNAシーケンサー (373A, ABI) により塩基配列を決定した。また、得られたデータの解析は Genetyx (ソフトサイエンス) により行った。

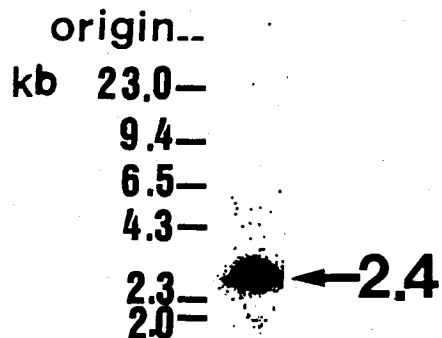
#### 2. 結果及び考察

エレクトロポレーションにより HPT 遺伝子を導入し、ハイグロマイシンを含む培地で生育してきたカルスより、DNAを抽出し、HPT をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果陽性の反応を示した一つのカルス、H-88、についてゲノミックライブラリーを作製した。さらに、HPT をプローブにしてブランクハイブリダイゼーションを試みた結果、プローブに対しやや弱いシグナルを呈す、2.4kbのDNA断片を含むクローンを8クローン得られた (第1図)。そのうちの、R-1、について全塩基配列を決定した。本DNAは2419塩

基からなり、HPT 配列はなく、HPT との相同性は43%であった。さらに、60-70%の相同性を示す20-30塩基の領域が数か所に存在した。また、既知遺伝子とのコンピュータによる解析の結果、本DNAの3'末端約300塩基は、イネ、マメ及びトウモロコシの葉緑体ゲノムで報告されているRNAポリメラーゼのβサブユニット遺伝子の一部と高い相同性 (75-80%) を示すことが判明した。しかし、本領域には上記葉緑体遺伝子と比較して塩基の欠失あるいは翻訳の終止コドンが存在し、同遺伝子の偽似遺伝子の一部であると推定された。

#### 引用文献

- 1) 上原泰樹・西口正通: 日作紀九支報 58, 14-17, 1991.
- 2) 渡辺格・杉浦昌弘: 植物バイオテクノロジー実験マニュアルクローニングとシーケンズ, pp.314. 農村文化社, 東京, 1989.



第1図 イネ (日本晴) のゲノミックサザン分析