

イネ及びシロイヌナズナの花形成関連遺伝子のクローン化

の試みと様々な植物でのサザン分析

永田俊文・*田中正美・森 昌樹 (九州農業試験場・熊本県農業研究センター)

Toshifumi NAGATA, Masami TANAKA and Masaki MORI :

Southern blot analysis of flower morphogenesis relating genes for various plants and trial for cloning those genes from Rice and Arabidopsis

花芽及び花器官形成関与遺伝子が、2、3の植物よりクローニングされシーケンス解析された結果、これらの遺伝子中には共通する構造が存在することが解明されている。本実験ではこれらの構造が多くの他の植物にも共通しているか否かをサザン分析によって解析し、遺伝子の類似性を利用したクローニングの可能性を検討した。さらに、PCR法を用いた共通配列の特異的増幅によるクローニング法の確立も行なった。

1. 材料及び方法

各植物のゲノミックDNAの抽出はCTAB法¹⁾に従った。サザン及びドットプロットは従来法²⁾を用いて行った。DNAプライマーはApplied Biosystem社の391 DNA synthesizerで作製し、PCR反応はGene Amp PCR system 9600 (93°C=30秒, 36°C=30秒, 72°C=1分, cycle=40)で行った。PCR産物のクローニングはSureclone ligation kit (Pharmacia)を用いた。シーケンスはダイデオキシ法を用いて蛍光DNAシーケンサー (373A, Applied Biosystems) で決定した。

2. 結果及び考察

キンギョソウなどよりクローン化されている花芽形成関与遺伝子 (FLO)³⁾、花器官形成関与遺伝子 (DEFA)⁴⁾と相同な遺伝子を、PCR法を用いてクローン化することを試みた。FLO及びDEFAに特徴的な200bp以下のDNA領域を増幅するプライマーを作製し、シロイヌナズナ (コロンビア株) のゲノムDNAを鋳型にしてPCR反応を行い、増幅したDNA断片をクローニングして塩基配列を決定した。その結果約160bpのDEFA相同配列、約180bpのFLO相同配列がクローン化されたことが明らかとなった。これらは、シロイヌナズナ (ランズバーグ株) 由来の既知の同配列とアミノ酸レベルで95%以上の相同性を示した。クローン化したDNA断片とキンギョソウのFLO (C末端側) 約200bp (生物研、高辻博志博士より分与) をプローブとして26種類の植物についてサザン分析を行い、多くの植物でハイブリダイズするバンドを見だし、これらのプローブを用いた花芽及び花器形態形成遺伝子のクローニングの可能性を示唆した (第1表)。また、DEFAを増幅するプライマーを用いたPCR反応を行った結果、キャベツ、トルコキキョウ等、数種類の作物ではドットプロット分析で陽性のシグナルが検出され、この方法による花器官形成遺伝子のクローニングの可能性が示された。

第1表 FLO及びDEFAプローブを用いたゲノミックサザン分析

	アラビドプシス FLO (N末)	キンギョソウ FLO (C末)	アラビドプシス DEFA
イネ	-	++	-
アスパラガス	++	++	+
ミカン (ユズ)	-	++	-
スイカ	+	++	+
ツツジ	-	-	-
ナス	+	++	+
メロン	+	++	++
ユリ	-	-	-
トルコキキョウ	++	++	++
カスミソウ	+	++	+
シンビジウム	+	++	-
カトレア	++	++	++
デンドロビウム	+	+	+
トマト	++	++	++
サトイモ	-	+	n.t.
ジャクヤク	++	+	+
イチゴ	n.t.	-	+
キク	n.t.	-	-
キャベツ	++	++	++
ウコン	++	++	+
リンドウ	n.t.	-	n.t.
アサガオ	++	++	n.t.
サツマイモ	++	+	n.t.
カラー	++	++	++
カンアオイ	+	-	+
キウイ	++	++	++

注) : ++強, +弱, -無し, n.t.未分析

引用文献

- 1) 渡辺 格・杉浦昌弘: 「クローニングとシーケンス」(植物バイオテクノロジー実験マニュアル), 344 p. 1988.
- 2) Sambrook, Jetal, Molecular cloning: Alaboratory manual, Cold Spring harbor laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 1988.
- 3) Coen, E. S. et al. Cell. 63, 1311-1322, 1990.
- 4) Sommer, H. et al. EMBO J. 9, 605-613, 1990.