

エレクトロポレーションにより導入したHPT遺伝子のイネゲノム中の挿入領域の解析

永田俊文・森 昌樹・木村貴志・齋藤 彰・大槻義昭¹⁾・津川秀仁¹⁾・西口正通²⁾(九州農業試験場・¹⁾農業研究センター・²⁾農業生物資源研究所)

Toshifumi NAGATA, Masaki MORI, Takashi KIMURA, Akira SAITOU, Yoshiaki OHTSUKI, Hidehito TSUGAWA and Masamichi NISHIGUCHI: Molecular Analysis of a Rice Genomic Region Carrying HPT Gene Introduced by Electroporation.

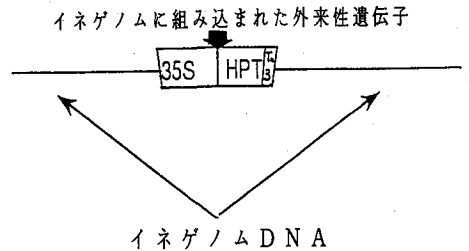
エレクトロポーションによる遺伝子導入は広く行われているが、ゲノムへの外来遺伝子の組み込みの機構についてはほとんど解明されていない。この組み込み機構を明らかにする目的で、エレクトロポレーションによりハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)を導入したイネカルスより、ゲノミックライブラリーを作成し、HPTの組み込み部位を含むクローンを得た。この塩基配列を解析するとともに、対照イネゲノムの塩基配列を解析し、外来遺伝子がイネゲノムに組み込まれる際の塩基配列上の変化を検討した。

1. 材料及び方法

イネ(品種、日本晴)の懸濁培養細胞からプロトプラストを調整し、エレクトロポレーションを用い、HPT遺伝子を含むプラスミドDNA、pUC19-HPTを導入した^{1,2)}。ハイグロマイシンで選抜したカルスより、CTAB法によりゲノムDNAを抽出し、XhoIによる切断後、λZAPIIベクター(Stratagene)に結合し、Gigapack Goldパッケージングキット(Stratagene)を用いてゲノミックライブラリーを作製した。サザンハイブリダイゼーション及びブラクハイブリダイゼーションは常法に従った。クローン化したDNAをErase a base system (Promega)により塩基配列を決定し、データはGenetyxに解析した。

2. 結果及び考察

HPTをプローブにサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性の反応を得たカルスの一つ、H-8-3-7について組み込み領域をもつゲノミッククローンを得た。その塩基配列を決定したところ、導入した遺伝子(プロモーター及びHPTの一部)が確認された(第1図)。HPTの配列の下流には導入に用いたプラスミドの一部(Tn3トランスポーゼス)の配列が組み込まれていることが判明した。本組み込み部位に隣接する領域には、ARS配列は存在せず、GC含量も特に高くはなかった。対照の非形質転換イネについての同領域の塩基配列を解析したところ、遺伝子の組み込みの際、DNAの一部が欠失したことが明らかになった。



```

ccgggtgtagt ccaggcatct tgggcgccga aagctgtcct agttgcaatt cttgcagcta
tcctctgttt gtcttctctt tctaagaaa aagttaggaa aaagttatat cctttctca
gtcgggggaa aaactcttta ttgtgtgtgt tggatgtct ttggtatita tcagtgcat
ctttcggagg ggcacactta caccggacac atgaattggg tgetttgatc agggaaaaaa
aatgatctgt tatacatctt ttttggcgtg ctagtactc tgatataact gaacaattga
gggtgagctg acaggaaggt tatgatttaa gtggttcagg tgttggaact gtgttgatt
gtgaccccaag tttgttcat tccccatgtt tgtaagtac tacatggcaa tcccccttt
gaatacacgt atgtattaaa aaaaatgtact gaaattcctt gtttaatagg ttgcaatctt
ttagtgtttt gaagggtgtt ccgaatgtct gtcaggggtt tcaggctcgc ctggggttat
ttagttgtc ccccttatcg agactctgtt ttatttttag gggggggggt ggccaccatg
tgaatggaag tgggtgagaa tgaatttata tcaccctagc tggttcagaa ttctttaca
tcctccctgt cgaggacgga cgggaaactc tataactccc ctgctctgtt tctgggtta
aaagacctgt ttatcgggg tagtctgctt aaagacctgt cttcagcctc gatgctgtag
tgattcgcta gttcgcgggc tccccatctc taagcaaaaa caccctctt taagcagggg
tcattgaaat tccatcttac ttgacccctc taactcaact tcaactgaa tagtctgat
ttacgtgAAC AAAGGGTAAT ATCCGGAAC CTCCTCGGAT TCCATTGCC AGCATCTGT
CACTTTATTG TGAAGTTAGT GGAAGAGGAA GGTGGCTCTC ACAAATCCA TCATTGCCAT
TAAAGGAAAG GCCATCGTTG AAGTTGCTC TCCGACAGT GGTCCCAAAG ATGGACCCCC
ACCCACGAGG AGCATCGTGG AAAAAAGAAG CGTTCCAACC ACCTCTCAA AGCAAGTGA
TTGATGTGAT ATCTCCACTG ACCTAAGGAA TGACGTACAG TCCCACTATC CTTCGATGA
CCCTTCTCT ATATAAGGAA GTTCATTTC TTTTGAGAGG GGTTCGCCG GGGGCATCTA
AGTTATGAAA AAGCCTGGCC TAACCTGCC GGTCTTGTCT GTCGAGAAGT TTCTAATCGA
AAAGTTCGAC AGCGTCTCCA ACCTGATGCA GCTCTCGGAG GCGGAAGAAT CTCGTCTTT
CAGCTTCGAT GTAGGAGGtg gtaagccctc cagatctgta gttatctaca cagcgggggg
tcaggcaact atggatgaa gaaatagaca gatcagctgag atagggtcct cactgattaa
gcaagttact cagtgagatg ttttctacc tacaanaagt tggttctgtt gatatcctc
aggagcatgt gtcattatct gaccggcaa atcgtaaagg ccccaagctc atcgtctcc
ccccagctcg tccctctgtc agcttcaaat taantatagt ctgtggtctc gctcattat
aaogggctgt gcttttcgga gttatggctt ctccctgtg tccgaaanaa gttctgctta
aaactatcgt gctgcttca cctaagctc caaagtgtg aaattggggg ttgatttttc
ggctataaac catgggctct cgttttcgag ggtttttggg taccataatt ctccggtctt
tatttagggt aaattggcaa gctcga

```

第1図 イネゲノムに導入されたHPT遺伝子

注) 大文字: イネゲノムシークエンス
小文字: 外来性遺伝子のシークエンス
アンダーライン: Tn3トランスポーゼスのホモロジーシークエンス

引用文献

- 1) 大槻義昭(1990) 実験マニュアル「イネ・プロトプラスト培養系」.
- 2) ビデオ 植物の遺伝子組替え技術 第2巻 農文協 1992.