

イチゴ炭疽病応答性遺伝子の全長配列の取得

1. 試験のねらい

cDNA マイクロアレイによって選抜したイチゴ炭疽病応答性遺伝子は、炭疽病菌を接種した時に特異的に発現が変動する遺伝子であり、その中には耐病性に関与する遺伝子が含まれていると考えられる。一方、遺伝子の働きを解析するためには、目的とする遺伝子の全長配列を植物に導入し、表現形質の変化を確認する必要がある。そこで、炭疽病応答性遺伝子の機能を解析するため、それら遺伝子の全長配列を取得する。

2. 試験方法

(1) マイクロアレイで選抜された cDNA クローンの塩基配列解析

cDNA (相補鎖 DNA : RNA を DNA に変換したもの) クローンの塩基配列は一部分しか解読されていないため、マイクロアレイで選抜された 9 個の cDNA クローン (表) をシーケンスし、クローンの全塩基配列を決定した。得られた配列を解析し、遺伝子の全長配列が得られているかどうか確認した。

(2) RACE (Rapid Amplification of cDNA End : cDNA 末端の迅速増幅) 法による未知配列の取得

遺伝子の全長配列が確認できない cDNA クローンは、炭疽病菌を接種した個体から抽出した RNA を供試し、5' RACE 法または 3' RACE 法により未知配列を増幅してクローニングした。

(3) 取得した未知配列の塩基配列解析

未知配列を含むクローンをシーケンスして全塩基配列を決定し、目的の遺伝子の全長配列が得られたかどうか確認した。

(4) 目的遺伝子の全長配列の取得

目的遺伝子の全塩基配列情報をもとにプライマーを設計し、遺伝子の全長配列を PCR 増幅して植物形質転換用ベクターに導入した。

3. 試験結果および考察

(1) Stg005C01、Stg021F11、Stg006C11 および Stg034D01 の 4 クローンは、cDNA クローンに目的遺伝子の全長配列が含まれていた (表)。

(2) Stg037D09 および Suk018D02 の 2 クローンは、未知領域を取得してシーケンスを行った結果、cDNA クローンに遺伝子の全長配列が含まれていることが確認できた (表)。

(3) Stg023A10、Stg044F06 および Suk004G02 の 3 クローンは、未知領域を取得してシーケンスを行った結果、新たに取得した領域まで遺伝子の全長配列が及んでいることが明らかとなった (表)。

(4) 目的とした 9 遺伝子の全長配列が得られ、植物形質転換用ベクター (目的の遺伝子を植物に導入するための運び屋 DNA) に導入できた (図)。

4. 成果の要約

9 種類のイチゴ炭疽病応答性遺伝子の全長配列を取得した。また、これらを導入した植物形質転換用ベクターを完成した。

(担当者 生物工学部 応用生物研究室 生井 潔、世取山守)

表 マイクロアレイで選抜された cDNA クローンとその遺伝子全長配列の取得

クローン名	推定される遺伝子名	cDNAクローン	5' RACE	3' RACE	全長配列 (bp)
Stg005C01	<i>Chitinase</i>	全長			972
Stg021F11	<i>Thaumatin-like protein</i>	全長			735
Stg037D09	不明	全長	○		330
Suk018D02	<i>MYB</i>	全長	○		615
Stg006C11	不明	全長			597
Stg023A10	<i>Methionine synthase</i>	不完全	○		2298
Stg034D01	<i>Allergenic isoflavone reductase-like protein Bet v 6. 0102</i>	全長			858
Stg044F06	<i>Zinc finger protein</i>	不完全	○		666
Suk004G02	<i>Homeobox protein</i>	不完全	○	○	861

注1. cDNA クローンの「全長」は、目的遺伝子の全長配列が含まれているクローンを、「不完全」は配列の一部が欠けているクローンを示した。

注2. 5' RACE の「○」は、5' RACE 法によって既知配列の上流領域を取得したクローンを、3' RACE の「○」は、3' RACE 法によって既知配列の下流領域を取得したクローンを示した。

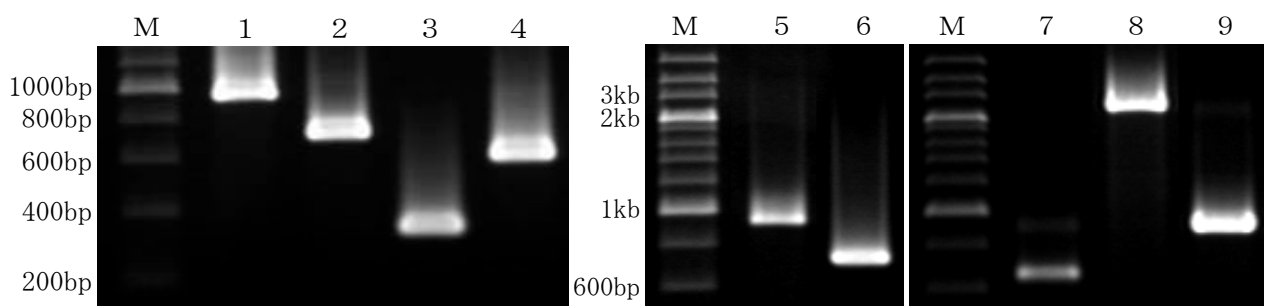


図 植物形質転換用ベクターに導入された遺伝子の全長配列を PCR 増幅した結果

M : 200bp DNA ラダー 3 : Stg037D09 (334bp) 6 : Stg044F06 (724bp) 9 : Suk004G02 (919bp)

1 : Stg005C01 (976bp) 4 : Suk018D02 (619bp) 7 : Stg006C11 (655bp)

2 : Stg021F11 (739bp) 5 : Stg034D01 (916bp) 8 : Stg023A10 (2356bp)

注. () 内は増幅産物の大きさを示した。プライマーによって余分な塩基が付加されるため、レーン 1 ~ 4 は全長配列に 4bp、レーン 5 ~ 9 は 58bp を加えた増幅産物が得られる。