

# サブトラクション法を使った組織特異的遺伝子の単離と構造解析

(応用生物学研究室) 石倉淳士

## I. 緒言

ヒトゲノム計画をはじめとして、いくつかの生物についてそのゲノムの全塩基配列が解読されているが、その中に含まれる遺伝子の多くは機能が未知である。特に、生物の発生・形態形成に関与する遺伝子及びそれらの発現制御(発生プログラム)については、ごく部分的な情報が得られているに過ぎない。そこで、本研究では栄養生長から生殖生長へと切り替わるプログラム(花成)において特異的に発現する遺伝子の単離を試みた。

現在、組織特異的遺伝子を単離するための方法がいくつか考案されている。その中で特に Subtraction 法(差し引きハイブリッド法)は、目的とする遺伝子の候補を全て単離できる点で有効な手法である。Subtraction 法では、2種類の近縁な細胞から得た mRNA( messenger RNA )を用いる。ほとんどの mRNA は両者に共通して存在するが、ごくわずか片方のみ特異的な mRNA が存在する。目的遺伝子を含む細胞の mRNA から cDNA ( complementary DNA : 相補的 DNA ) を合成し、両者をハイブリッド形成させる。すると、相補的な mRNA と cDNA はハイブリッド形成するので、それらを除けば目的の組織特異的な cDNA が得られる。これが Subtraction の原理である。

従来の Subtraction 法はその効率が低かったが、最近いくつかの改良法が開発されており、今回はその改良 Subtraction 法を用いた。また特に工夫すべき点として、豊富な完全長 cDNA を得ることを可能とする SMART 法を Subtraciotn 法と組み合わせた。2つの方法を組み合わせることで、遺伝子断片から全長遺伝子を単離するよりも、迅速に全長遺伝子を単離することができる。単離された遺伝子群の中から、真に特異的遺伝子を選別する方法について新たな工夫を行い、目的遺伝子を効率よく単離する手法の確立を目指した。

## II. 実験方法及び結果

### i) 実験材料

絶対的短日植物であるアサガオ( *Pharbitis nil* : *P. nil* ) を使用した。 *P. nil* は生長が早く、14時間の暗処理をするだけで急激な花成誘導

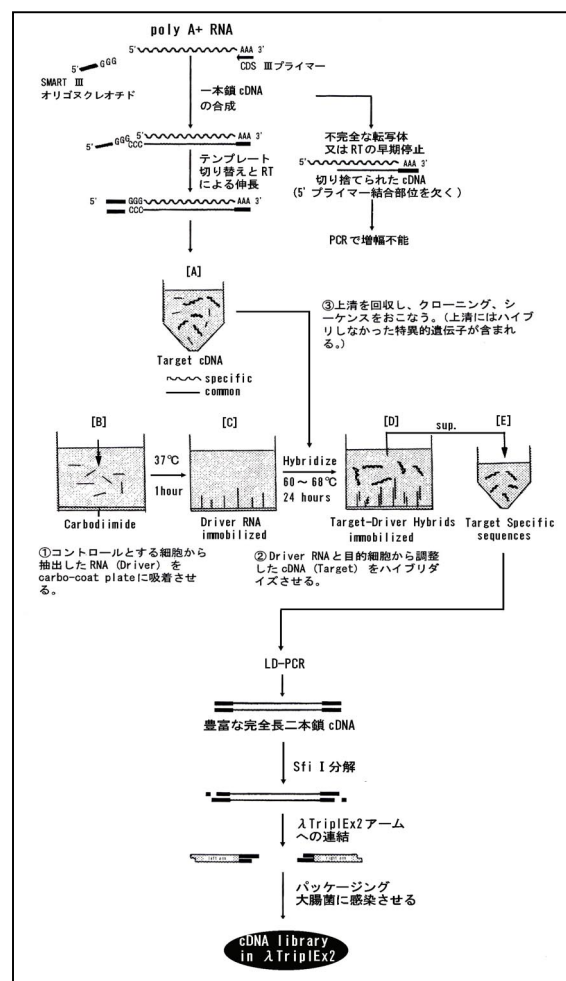


図.1 完全長 cDNA ライブラリ作製の流れ

を受けるので、都合のよい実験材料である。まず、*P.nil* 種子を撒き、5日間明条件で育てたもの (LD) の子葉と、5日間明条件で育てた後 14 時間の暗条件に置いて花成誘導したもの (SD) の子葉から抽出した poly (A)<sup>+</sup> RNA (核コードの mRNA) を用いて、次の操作を行った。

### ii) 完全長 cDNA の合成と Subtractive Hybridization

SD サンプルから reverse transcriptase (逆転写酵素) を使って一本鎖 cDNA を合成した。この際、完全長 cDNA を合成するために SMART Oligonucleotide も用いた。その後、LD サンプルの poly (A)<sup>+</sup> RNA と SD サンプルの一本鎖 cDNA との Subtractive Hybridization を行った。24 時間以上 Hybridize させた後、組織特異的 cDNA を含む上澄み液を取り出した。

### iii) 完全長 cDNA ライブラリの作製

得られた組織特異的な一本鎖 cDNA を鋳型にして PCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) を行い、二本鎖 cDNA を合成、増幅させた。その後 TriplEx2 フェージに挿入し、ライブラリとした。この cDNA ライブラリは、約 18 万の独立したクローンで構成されており、子葉で発現する花成誘導に関わる組織特異的遺伝子を網羅していると考えられる。

### iv) TA クローニングと組織特異的遺伝子の配列決定

上述の方法で得られた cDNA ライブラリから、その一部を取り出したものを鋳型として PCR を行い、ファージインサート部位の増幅を試みた。1%アガロースゲルで電気泳動して確認作業を行ったところ、いくつかの増幅がみられた(図.2)。その後、TA クローニングを行うため、PCR 産物を pT-Adv プラスミドベクターにライゲーションし、大腸菌 TOP10F' に形質転換した。LB/X-gal/IPTG/amp 培地にまき、一晩 37 で培養した後、青色コロニーを 10 個選別し、プラスミドを回収した。制限酵素 EcoRI でプラスミドからインサートを切り出し電気泳動で確認すると、10 個のうち 2 種類のプラスミドが長さの異なる遺伝子を含んでいることがわかった(図.3)。

その後、その 2 つのクローンについて、塩基配列を解読した。塩基配列を決定後、現在はその構造解析を行っている。

## III. 考察

本研究により、完全長の組織特異的遺伝子を単離する新しい Subtraction 法を確立することができた。完全長の遺伝子を得られるこの新しい Subtraction 法は、遺伝子の断片から全長を得る従来の方法と比べると、多大な時間と労力を削減することができる。また、花成誘導に特異的な遺伝子の単離だけでなく、他の研究へ応用できる可能性をもっている。

今後は、この新しく確立した Subtraction 法を用いて、さらなる花成誘導に特異的に発現する遺伝子を探索していく。

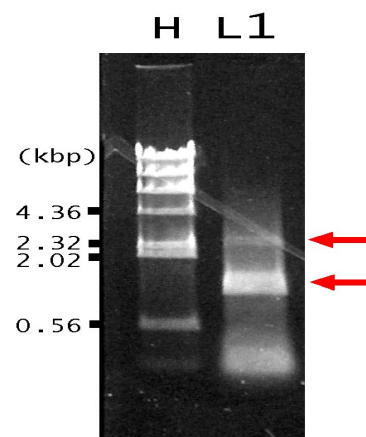


図2 フェージのインサート部位の増幅  
矢印のところに特異的バンドが見られる。

H… HindIII L1… sample

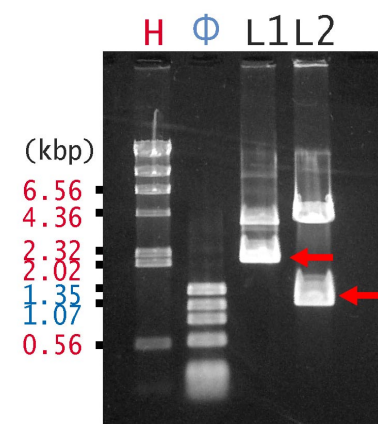


図3 プラスミドのインサート部位の増幅  
異なる長さのバンドが見られる2種類の遺伝子の単離に成功した。

H… λ HindIII Φ… Φx174HaeIII  
L1.L2… sample