

# ジェミニウイルスベクターを用いた DNA トランスポゾン切り出しの検出系の構築

先端生命科学専攻 資源生物創成学分野 2006 年 3 月修了

学籍番号 : 46525

川島佑介

指導教官 : 宇垣正志 教授

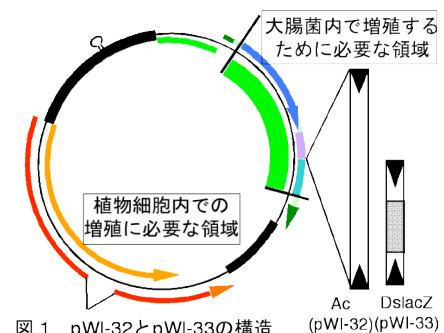
## 序論

DNA トランスポゾン *Activator* (*Ac*)は、トウモロコシの種皮に生じる班入りの原因因子の遺伝学的解析から、転移因子として初めてその存在が証明された。*Ac* は内部に 807 アミノ酸残基の *transposase* をコードし、*hAT* スーパーファミリーに属する。*Ac transposase* は、植物ゲノム DNA 複製時に *Ac* の両末端の逆位反復配列(IRs)で *Ac* を切り出し、転移先のゲノム DNA を切断して *Ac* を挿入する Cut & Paste 機能を持つ。IRs を持ち *transposase* 遺伝子を持たない非自律性の *Dissociation* (*Ds*)も *Ac transposase* のトランスな供給により転移する。*Ac/Ds* はトウモロコシのみでなくシロイヌナズナ、イネなどの細胞内でも転移し、植物ゲノムからのみでなく DNA ウイルスであるジェミニウイルスのゲノム上からも転移するという報告がある。*Ac transposase* の構造と機能について、DNA 結合部位や二量体化部位などの知見はあるが、転移機能の中心となる転位因子切り出し能の活性中心は未だに明らかにされていない。そこで、本研究では大腸菌にレスキューできるジェミニウイルスベクターを用いて *in vivo* での *Ac transposase* の転位因子切り出し能を解析する系を構築し、*Ac transposase* に関する更なる知見を得ることを目的とした。

## 結果と考察

### 1. ジェミニウイルスベクターからの *Ac* の切り出し

ジェミニウイルス科 *Mastrevirus* 属に属する *Wheat dwarf virus* (WDV)ゲノム DNA をもとに作成された、単子葉植物細胞と大腸菌とのシャトルベクターである pWI ベクターに *Ac* を組み込み pWI-32 を作製した(図 1)。これをイネプロトプラストに導入し、2 日後に DNA を抽出して、*Ac* の両外側の pWI ベクター上のプライマーを用いて PCR を行ったところ、pWI-32 から *Ac* が転移した空のベクターに由来する PCR 産物を得た。



### 2. *Ac* トランスポゼースのトランスな供給によるジェミニウイルスベクターからの *Ds*

### の切り出し

*Ac* の内部配列を欠失させ *lacZ* 遺伝子を導入した *DslacZ* を pWI ベクターに組み込み、pWI-33 を作製した(図 1)。また *Ac* transposase 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター支配下に組み込み、植物細胞内で *Ac* transposase を一過的に発現する pFF-*Ac* を作成した。両者を electroporation によってイネプロトプラストに同時に導入し、*DslacZ* の転移を PCR およびプラスミドレスキューにより検出した。PCR の結果、pWI-33 と pFF-*Ac* の共導入により、pWI-33 から *DslacZ* が切り出された空の pWI ベクターに由来するバンドが検出された(図 2)。プラスミドレスキューにおいても、*Ac* transposase の共発現によって、pWI-33 から *DslacZ* が切り出された白色コロニーが得られた。しかし、ネガティブコントロールである pWI-33 のみを導入したイネ細胞からも、*DslacZ* が切り出された白色コロニーが小数得られたので、白色コロニーのシーケンス解析を行ったところ、*DslacZ* が切り出された後の配列(フットプリント)は *Ac* transposase の発現の有無に関わらず解析したすべての白色コロニー間で良く似ており、すでに報告されている典型的な *Ac/Ds* のフットプリントとは異なっていた。以上から、得られた白色コロニーは、イネプロトプラスト内での pWI-33 のリアレンジメント、あるいはイネ内在性の未知の transposase による *DslacZ* の切り出し等の可能性が考えられた。

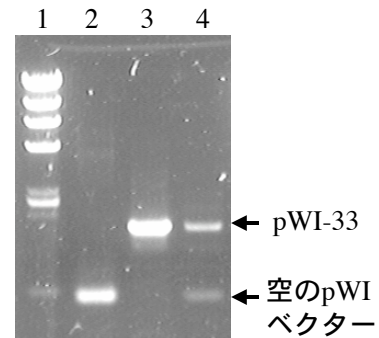


図 2 Rice PP内でのDs転移のPCRによる検出  
1: λ/HindIII マーカー  
2: pWI-31  
3: pWI-33のみをRice PPに導入、抽出  
4: pWI-33とpFF-*Ac*をRice PPに導入、抽出

### 3. ジェミニウイルスのシロイヌナズナへの感染系の

#### 確立

シロイヌナズナを宿主とするジェミニウイルス感染系の構築を行った。シロイヌナズナに感染することが報告されているジェミニウイルス科 *Curtovirus* 属の *Beat curly top virus* (BCTV)の感染葉を入手し、ゲノム DNA を単離し、1.5 copy をアグロバクテリウムのバイナリーベクターにクローン化した。このベクターを導入したアグロバクテリウムをシロイヌナズナのロゼット葉にインフィルトレーションすることにより、効率的に BCTV 特有の病徴が現れ、PCR とシーケンシングの結果、BCTV の感染が確認された。今後、この BCTV 感染性クローンをもとにシャトルベクターを構築することにより、*Ac* transposase の転位因子切り出し能を解析する新たな系を構築できる可能性がある。



図3 1. 非感染シロイヌナズナ  
2. BCTV感染シロイヌナズナ

キーワード:

真確生物 DNA トランスポゾン, Activator/ Dissociation, ジェミニウイルスシャトルベクター