

## 2Dp-4

マツ Rubisco 小サブユニット遺伝子と LHCP 遺伝子の cDNA  
クローンの単離・同定及び明暗両条件下における発現  
○山本直樹<sup>1</sup>、松岡信<sup>2</sup>、村上ゆり子<sup>3</sup>、大橋祐子<sup>2</sup>、小関  
良宏<sup>4</sup>、田中善之<sup>5</sup>（<sup>1</sup>林試、<sup>2</sup>生物研、<sup>3</sup>果樹試、<sup>4</sup>東大・  
教養・生物、<sup>5</sup>農環研）

Rubisco 小サブユニット (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Small Subunit) や LHCP (Light Harvesting Chlorophyll a/b Protein) の遺伝子の発現は、光の調節をうけると考えられてきた。しかし、暗所でも黄化することなく淡緑色を呈するマツ類の芽生えにおいて、従来 Photogene と考えられてきた遺伝子が暗所、明所の条件を問わず発現していることを示唆する知見を得てきた。今回この現象を明らかにすることを目的として cDNA クローンの単離を行い、両遺伝子の暗所発現について解析を行ったので報告する。

クロマツの暗所芽生え、明所芽生え各々から poly(A) RNA を単離し、無細胞蛋白合成系で翻訳させたところ、免疫学的に Rubisco SSU mRNA 及び LHCP mRNA の存在を確認した。そこで両 RNA 標品からショ糖密度勾配遠心法により各々の mRNA を濃縮したのち、Gubler & Hoffman 法により cDNA を合成した。次いで cDNA を dG·dC tailing により pUC8 にアニールし、*E. coli* JM83 に形質転換して cDNA ライブラリーを作製した。明暗各々の cDNA ライブラリーからの cDNA クローンの単離・同定は、以下の方法に従った。

LHCP cDNA クローンの単離に際して、*Lemna gibba* のゲノム・クローン pLgAB19 (Stiekam et al. 1983) をプローブに用いてコロニー・ハイブリダイゼーションを行ったところ、強いシグナルを示すコロニーを得ることができた。明暗各々の cDNA クローンのうち、インサート長から全鎖長を含むと予想されるクローンについて制限酵素の切断パターンを比較したところ、少なくとも 3 種類のクローンを確認することができた。しかし、どの種類のクローンも明暗両ライブラリーからも単離されており、その発現様式に明暗の条件に特異性を示す知見を得ることはできなかった。暗所芽生えからの cDNA クローン (pPD LHCP 2176) について全塩基配列を決定し、他植物に関する知見と比較したところ、Transit Peptide を除くコード領域のホモロジーが高く、LHCP 遺伝子の変異は小さいことが示された。

Rubisco SSU cDNA のクローンの単離に際して、クロマツ Rubisco SSU 抗血清を用いてイムノ・スクリーニングを実施し、次いで HRT により同定した。LHCP 遺伝子に比べると、Rubisco SSU 遺伝子の変異は大きいことが示唆された。

今回得られた cDNA クローンを用いたサザン・ブロッティングの結果から、マツ類でも両遺伝子とも Multigene Family を形成していることが示された。Multigene Family の中で、個々の遺伝子が明・暗の光条件に特異性を示して発現するのか、あるいは同一の遺伝子が両条件で発現するのかについてはまだ結論を得るにはいたらないが、ノーザン・ブロッティングの結果は、両遺伝子が明・暗いずれの条件下においても発現するというマツ類の特徴を明らかにしている。