

1Ba-8

発現ベクターを用いたエンドウフィットクロム cDNA の
単離富澤健一¹, 米田好文², 佐藤直樹¹, 長谷あきら^{1,3}, 飯野徹雄^{1,2}, 古谷雅樹^{1,3} (¹東大・理・植, ²東大・遺伝子, ³基生研・情報制御)

フィットクロムの生合成過程とその蛋白質部分の一次構造などの知見を得るために、最近免疫化学的手法および分子生物学的手法が利用されている。Hershey ら (1984) は単子葉植物カラスミギからフィットクロムに対する cDNA を得た。しかし、単クローン性抗フィットクロム抗体に対する結合性は、単子葉植物と双子葉植物のフィットクロムで著しく異なっていた (Saji *et al.* 1984)。そこで本研究は、双子葉植物エンドウのフィットクロムに対する cDNA をクローン化することを試みた。

7日間暗所で育てたエンドウ芽生えの上胚軸より得たポリソーム画分と抗フィットクロム抗体の免疫沈降により合成途中のフィットクロムポリペプチドを結合したポリソームを選択し、さらにオリゴ(dT)セルロースカラムによりフィットクロム mRNA に富む poly(A)⁺RNA を調製した。大腸菌へ DNA を導入するためのベクターとして pUC9 (Vieira & Messing, 1982) を用いた。これは、大腸菌 lac オペロンのプロモーター、オペレーター、および lac 遺伝子の一部をもつ発現ベクターで、アンピシリン耐性遺伝子をマーカーとしてもつものである。この pUC9 を制限酵素 Pst I で切り、オリゴ(dT)を付加したものをを用い、Falkenthal (1984) の方法に従って cDNA を合成した。この cDNA 断片を含むプラスミドにより、大腸菌 DH1 株を形質転換した。この転換体を lac オペロンの誘導剤である IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) を含む培地上で生育させた後、菌体をニトロセルロース上に移した。菌体は SDS と熱処理により溶菌させ、抗フィットクロム抗体と反応するニトロセルロース上のコロニーを酵素を介した発色により検出した。

形質転換体、406 クローンを調べたところ、抗フィットクロム抗体と反応するクローンを 1 個得た。このクローンに含まれるプラスミド (pPP1) には、1.2 kbp の cDNA 断片が挿入されていた。pPP1 により、別の大腸菌株 D1210 を形質転換した場合にもコロニーは抗フィットクロム抗体と反応した。形質転換細胞から蛋白質を抽出し、SDS-電気泳動とトランスファー・ブロッティング (Western blotting) を行なったところ、抗フィットクロム抗体と反応する分子量約 30,000 のポリペプチドが検出された。以上の結果は、pPP1 がエンドウフィットクロム mRNA の一部分 (コード領域の約 1/4) に対応する cDNA を含んでいることを示している。