



# Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation

融合遺伝子構築が容易な植物形質転換 Gateway バイナリベクター (pGWB) の開発

(JBB, Vol.104, No.1, 34-41, 2007)

中川 強<sup>1\*</sup>・黒瀬 高章<sup>1</sup>・日野 武志<sup>1</sup>・田中 克典<sup>2a</sup>・川向 誠<sup>2</sup>  
丹羽 康夫<sup>3</sup>・豊岡 公德<sup>4</sup>・松岡 健<sup>5</sup>・神保 哲朗<sup>6</sup>・木村 哲哉<sup>6</sup>

植物バイオ分野において形質転換はなくてはならない基幹技術の1つである。手法としては主にバイナリベクターを利用するアグロバクテリア感染法が用いられているが、従来のバイナリベクターはサイズが大きい、使用できる制限酵素が少ない、などの理由で必ずしも使いやすいものではなかった。我々自身も興味深い遺伝子を見いだしたにも関わらず、制限酵素サイトの問題によりバイナリベクターへのクローニングを断念したという経験を持つ。そこでGateway技術を応用し、制限酵素サイトを気にせず容易にクローニングが可能なバイナリベクターの開発を行った。

Gateway技術はλファージと大腸菌との可逆的DNA組換え反応を基にしたものであり、2種の特異的組換え配列を備えたベクターに正確かつ効率的に遺伝子クローニングを行うことができる。我々はこの手法をバイナリベクターの1種であるpBIに適用し、Gatewayバイナリベクター(pGWB)の作製に着手した。第1段階として、クローニング用ベクター、35Sプロモーターによる発現用ベクター、GUSやGFPとの融合用ベクターを作製した。これらpGWBを用いてパフォーマンステストを行ったところ、従来のpBIに比べ格段に効率よくクローニングできることが示された。この結果を受け、第2段階として種々のエピトープタグやレポーターを融合できるベクターシリーズを作製することにした。第1段階では既存のベクターを出発材料に用いたため、タグ・レポーターの種類により別々の構築手順となり大変煩雑であった。そのため第2段階ではまずプラットフォームベクターを開発し、どのようなタグ・レポーターについても同一の操作で融合用pGWB構築ができるようにした。これにより並行処理が可能となったため、新たに6xHis、FLAG、3xHA、4xMyc、10xMyc、GST、T7、TAP、LUC、YFP、CFPの融合用ベクターを作製し、合計36種から構成されるpGWBシリーズを完成させた(図1)。

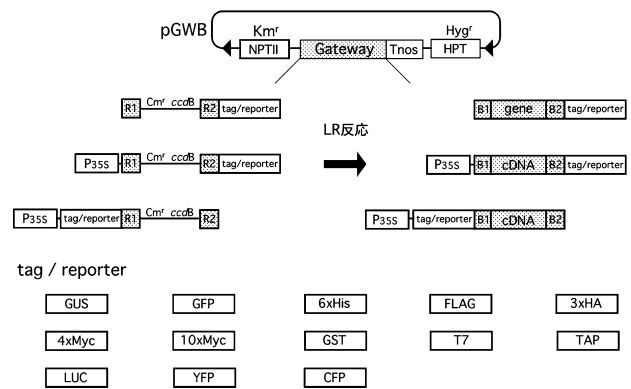


図1. Gateway Binary Vector (pGWB) の構造

上記pGWBによる融合コンストラクトをタバコ培養細胞に導入してウエスタンブロット解析を行った結果、タグやレポーター融合タンパク質が期待通りに発現していることが示された。次いで小胞出芽に必要なSec13シロイヌナズナホモログのGFP融合体を作製して細胞内局在の解析を行ったところ、ER局在することが示された。また、シロイヌナズナリン酸トランスポーター遺伝子PHT1<sup>2)</sup>についてプロモーター-GUS融合遺伝子を構築し、シロイヌナズナ植物体に導入して発現解析を行ったところ、GUSが根の表皮で特異的に発現し、またリン酸欠乏により誘導されることが観察された。この結果は他の方法による実験結果と一致していた。

今回開発したpGWにより遺伝子構築、とりわけ従来煩雑であったタグ・レポーター融合体の構築がきわめて容易になった。今後植物形質転換の重要なツールとして広く利用されるものと期待している。

- 1) Walhout, A. J. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **328**, 575 (2000).
- 2) Koyama, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 38 (2005).

\* 著者紹介 <sup>1</sup> 島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析分野 (教授) E-mail: tnakagaw@life.shimane-u.ac.jp  
<sup>2</sup> 島根大学生物資源科学部, <sup>a</sup> 現, 関西学院大学理工学部, <sup>3</sup> 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科  
<sup>4</sup> 理化学研究所植物科学センター, <sup>5</sup> 九州大学大学院農学研究院, <sup>6</sup> 三重大学大学院生物資源学研究科