

# 外来遺伝子の高発現を実現する植物形質転換用ベクターが登場！ 植物形質改変の高効率化や物質生産などにお試しください

## pRI 101-AN DNA

製品コード 3262 10 μg ¥50,000

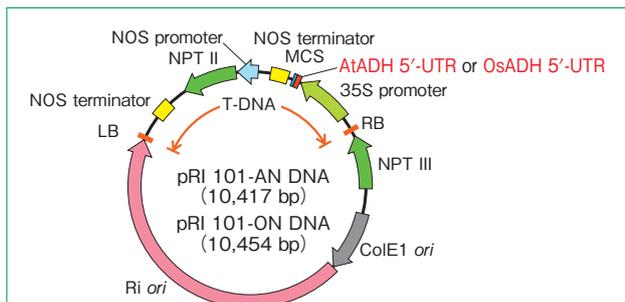
## pRI 101-ON DNA

製品コード 3263 10 μg ¥50,000

- 35SプロモーターとADH(Alcohol dehydrogenase) 遺伝子由来の5'非翻訳領域(5'-UTR)を搭載
- 上記5'-UTR領域の持つ翻訳エンハンサー機能により、植物体での目的遺伝子の高発現が可能
- 双子葉用(-AN：シロイヌナズナ、タバコなど)と単子葉用(-ON：イネなど)の2種類を用意

遺伝子組換えによる植物の形質改変や遺伝子組換え植物による物質生産などには、導入した遺伝子が植物体中で安定に高発現することが求められます。pRI 101 DNA シリーズは、形質転換植物における外来遺伝子の高発現を目的とするバイナリーベクターです。ADH遺伝子由来の5'-UTRを搭載しており、当該領域の持つ翻訳エンハンサー機能により、植物体中での目的遺伝子産物の高発現が期待できます<sup>1)</sup>。

シロイヌナズナADH 5'-UTR(AtADH 5'-UTR)を搭載したpRI 101-AN DNAとイネADH遺伝子由来5'-UTR(OsADH 5'-UTR)を搭載したpRI 101-ON DNAの2種類のタイプがあり、使用する植物種に応じて選択できます(図1)。



- Ri ori : *Rhizobium (Agrobacterium)* での複製起点
- RB, LB : 植物体に組み込まれるT-DNAのボーダー配列
- NOS promoter : 植物での選択マーカー遺伝子発現のためのプロモーター
- NOS terminator : 植物での遺伝子発現のためのターミネーター
- NPT II : 植物での選択マーカー遺伝子(カナマイシン耐性)
- 35S promoter : 植物での目的遺伝子発現のためのプロモーター (CaMV由来)
- AtADH 5'-UTR : 翻訳エンハンサー領域 (pRI 101-AN)
- OsADH 5'-UTR : 翻訳エンハンサー領域 (pRI 101-ON)
- ColE1 ori : 大腸菌での複製起点
- NPT III : 大腸菌および *Rhizobium (Agrobacterium)* での選択マーカー遺伝子(カナマイシン耐性)

図1 ベクターマップ

注) エンハンサーと開始コドンの位置は翻訳活性に影響する場合があります<sup>1,3)</sup>。

また、本製品は大腸菌での取り扱いが容易な植物形質転換用バイナリーベクターpRI 910 DNAをバックボーンとしています。*Rhizobium rhizogenes*のRiプラスミドに由来する変異型複製起点(Ri ori)<sup>2)</sup>とpUC系のプラスミドと同じ複製起点(ColE1 ori)を保持しており、大腸菌で高コピー数のプラスミドとして維持されること、また、植物染色体への目的遺伝子の安定的な組込みが可能になることなど、pRI 910 DNAの特長をすべて保持しています。

※本ベクターは国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学より技術および試料の提供を受けてタカラバイオ(株)が製品化したしました。

### ■ 実験例 1 : 5'-UTRの翻訳エンハンサー機能の確認 (pUC系プラスミドを使用した一過性発現)

#### 【方法】

タバコ培養細胞BY-2、シロイヌナズナ培養細胞T87およびイネ (*Oryza sativa*) のプロトプラストを調製し、エレクトロポレーション法により図2に示すGUS ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) 遺伝子配列を持つプラスミドを導入した。プラスミド導入後16~18時間培養してプロトプラストを破碎し、得られた抽出液中のGUS活性を測定した。GUS活性は、基質であるMUG (4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-グルクロニド) が分解されて生ずる4MU (4-メチルウンベリフェロン) 量を、蛍光強度を指標にして測定し数値化した。

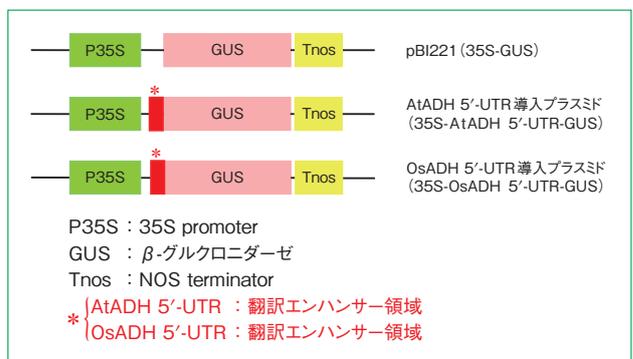


図2 pUCプラスミドに含まれる導入遺伝子

### 【結果】

5'-UTRを搭載したpUC系プラスミドを用いた場合、CaMV 35S プロモーター単独の場合に比べて数十倍以上のGUS活性を示しました(図3)。シロイヌナズナ ADH 5'-UTR (AtADH 5'-UTR) はBY-2細胞、T87細胞では高い活性を示しましたが、イネではほとんど効果は見られませんでした。一方、イネ ADH 5'-UTR (OsADH 5'-UTR) はBY-2細胞、T87細胞に加え、イネのプロトプラストでも効果を示しました。

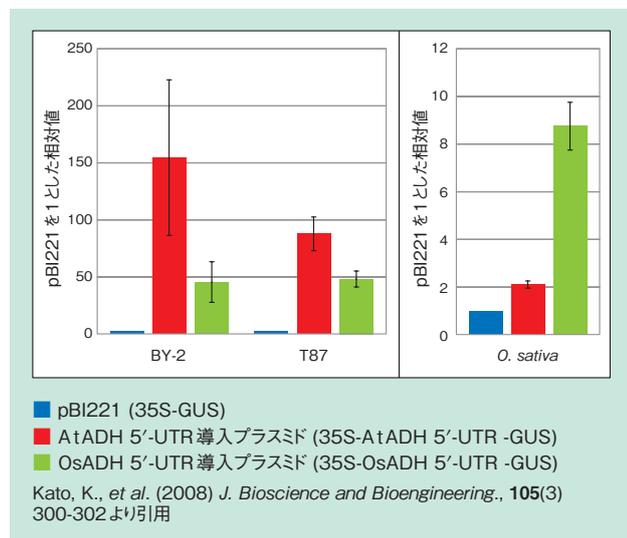


図3 タバコBY-2細胞、シロイヌナズナT87細胞およびイネ(*O. sativa*)細胞でのGUS活性測定結果

### ■ 実験例 2：植物における目的タンパク質の発現 (バイナリーベクター使用)

#### 【方法】

実験例1と同様に、pRI 101-AN DNAおよびpRI 101-ON DNAにGUS遺伝子を挿入し(図4)、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cellsにエレクトロポレーション法で導入した。得られた形質転換アグロバクテリウムを用いてタバコ培養細胞BY-2を形質転換し、抗生物質耐性で選抜した形質転換体におけるGUS活性を実験例1と同様の方法で測定した。

#### 【結果】

CaMV 35S プロモーター単独のベクター[pBI 121(35S-GUS)およびpRI 910(35S-GUS)]で形質転換した場合と比較して、ADH 5'-UTRを導入したベクターによる形質転換体では高いGUS活性を発現するクローンが多数取得できました(図5)。

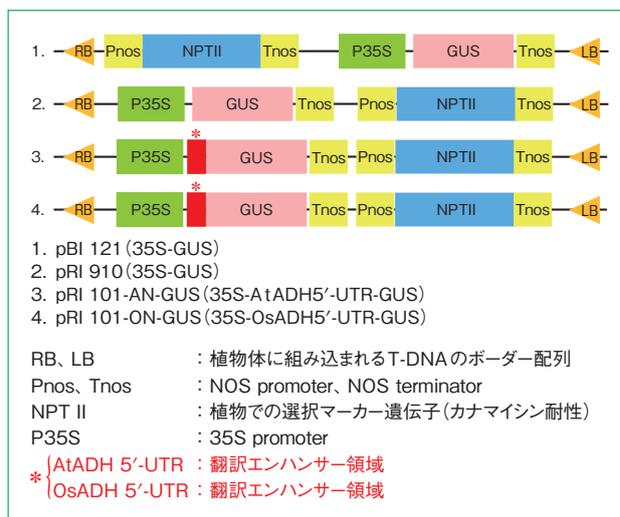


図4 形質転換用バイナリーベクターに含まれる導入遺伝子

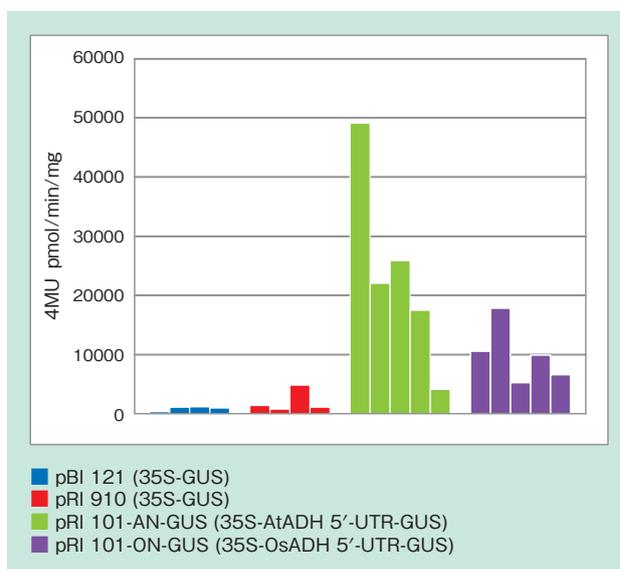


図5 形質転換したタバコBY-2細胞でのGUS活性測定結果

#### 【参考文献】

- 1) Sugio, T., Satoh, J., Matsuura, H., Shinmyo, A. and Kato, K.: The 5'-untranslated region of the *Oryza sativa* alcohol dehydrogenase gene functions as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells. (2008) *J. Bioscience and Bioengineering*, **105** (3), 300-302.
- 2) Nishiguchi, R., Takanami, M. and Oka, A.: Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy-root-inducing plasmid pRiA4b. (1987) *Molecular and General Genetics*, **206** (1), 1-8.
- 3) Satoh, J., Kato, K. and Shinmyo, A.: The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. (2004) *J. Bioscience and Bioengineering*, **98** (1), 1-8

#### ■ 関連製品

- ・ pRI 909 DNA/pRI 910 DNA  
製品コード 3260/3261 各 10 µg 各 ¥50,000
- ・ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cells  
製品コード 9115 40 µl × 5 ¥29,000