

# イネの培養細胞における相同組換えに関わる遺伝子の同定と機能の解明

赤間義明<sup>\*3</sup>・千田峰生<sup>\*2</sup>・石川隆二<sup>\*1</sup>・赤田辰治<sup>\*2</sup>・原田竹雄<sup>\*1</sup>・新関 稔<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 弘前大学 農学生命科学部 遺伝情報科学講座

<sup>\*2</sup> 弘前大学 遺伝子実験施設

<sup>\*3</sup> 名古屋市郵便局

(2004年9月30日受付)

## 緒 言

我々はソマクローナル変異の分子レベルでの解明を目的とし、その変異の一つと推定されている体細胞分裂期相同組換えに着目し、相同組換え遺伝子である酵母の *recA* 様遺伝子に焦点を当てて実験を進めている。島津(4)の報告によると、イネ日本型系統 A58 において、減数分裂期相同組換え遺伝子 *RiLIM15* がカルスの体細胞分裂期でも発現していることが確認されている。この *RiLIM15* 遺伝子は真核生物においては *LIM15 / DMC1* タイプに属し、このタイプ以外に *recA* 様遺伝子として *RAD51* タイプがあり、生物全般に存在し、DNA 傷害の修復、抗体産生などの機構にも関与していることが示唆されている(3)。ひとつの仮説としてソマクローナル変異発生は培養過程に生じる何らかのストレスが原因であると考へ、相同組換え遺伝子群は DNA 修復機能を有することから、これら *RiLIM15* 遺伝子のカルス内での発現はストレスによって生じた DNA の傷害が原因で誘導されると考えられる。そこで同遺伝子の発現がストレスによるものかどうか調べるために二重鎖切断を生じさせる X 線を用いて同遺伝子の発現が見られるかどうかを調べたが発現されなかった。TERASAWA *et al.*(7)の報告によると、コリにおいて、減数分裂期の相同組換えには、*LIM15 / DMC1* と *RAD51* タイプの両方の遺伝子が関与していることが示唆されている。この研究では *RAD51* タイプの遺伝子に焦点を当て、この遺伝子の X 線照射による発現様式や構造解析、コピー数など、*RAD51* に関する基礎的知見を得ることを目的として実験を行った。

## 実験材料および方法

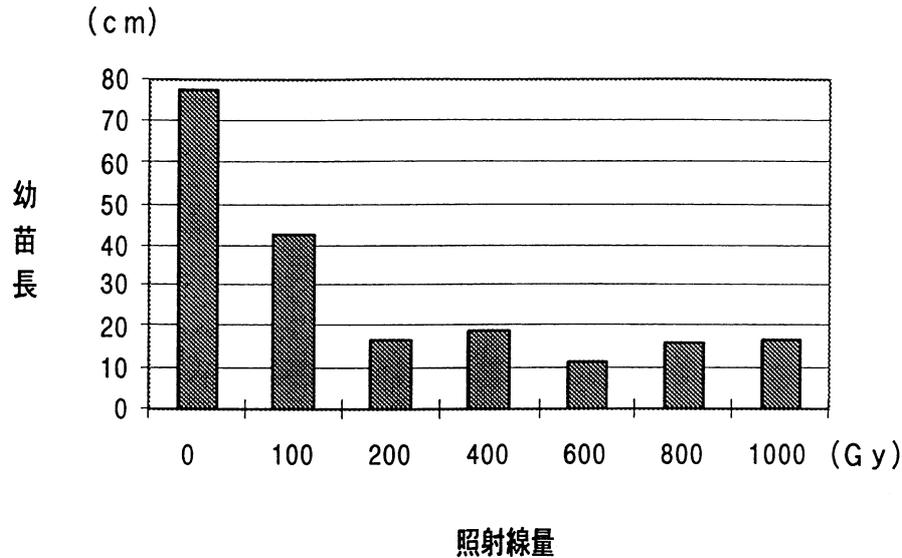
イネの *RAD51* 遺伝子の発現様式を調べるため、イネ (*Oryza sativa* L.) 系統 A58 のカルス、幼穂、成葉、播種3日後に X 線処理した幼苗を実験に供試した。X 線照射はイネ種子各 50 粒をシャーレに播き、30 時間の暗条件下で3日間発芽および生育を行い、その幼苗各 50 個体に軟

X 線を、100Gy 200Gy 400Gy 600Gy 800Gy 1000Gy の各線量で処理を行い、無照射をコントロールとした。その後直ぐに 25℃ 明条件下で静置し、2時間後、4時間後、6時間後にサンプリングを行った。

全 RNA の抽出は GLISIN *et al.*(9) および ULLRICH *et al.*(1977) の方法に従った。材料 1 g を液体窒素中で完全に磨砕し、グアニジン抽出緩衝液 (4.0 M guanidinium thiocyanate, 0.1 M Tris - HCl pH7.5, 1% 2-mercaptoethanol, 0.5% NaL. Lauryl - sarcosinate) へ懸濁後、室温で 14000 rpm (アングルロ - タ - , 75 mm) で 10 分間遠心分離した。上清液を回収し CsCl 平行密度勾配遠心により DNA を除き、RNA を分画した。さらに、得られた全 RNA 1 μg に対して 100 μl の反応液 (40 mM Tris - HCl pH7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 unit RQ1 RNase - Free DNase : Promega) 中で 37℃, 3 時間処理し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 抽出を 2 回を行い、精製全 RNA を得た。

RT - PCR はトマト (*Lycopersicon esculentum*) 由来の *RAD51* cDNA (6) とアラビドプシス (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *RAD51* cDNA (SMITH and SINGER, GenBank Accession number U43528) から推定されるアミノ酸配列をもとにデザインしたフォワードプライマーとリバースプライマーを用い全 RNA を鋳型に行った。その増幅産物をクローニングし、さらにシークエンスを行った。この得られたシークエンスデータをもとに、さらにフォワードプライマー *RiRAD51F1*, リバースプライマー *RiRAD51R1* を作製し、再度 RT - PCR を行った。

全 DNA の抽出は、ろ紙で余分な水分を取り除いた試料 5 g を液体窒素存在下でよく磨砕し、ウレア抽出 buffer 20 ml (7.0 M Urea, 350 mM NaCl, 50 mM Tris - HCl pH8.0, 20 mM EDTA pH8.0) を加えよく転倒混和し、37℃ で 15 分間振とうした。これに 20 ml のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加えよく混和した後、スイングローター (RS - 4 : KUBOTA) で室温、3000rpm, 30 分間の条件で遠心分



第1図 X線照射により見られたイネ日本型系統 A58 の成長阻害。  
棒グラフは照射線量と幼苗長の関係を示す。  
幼苗長は X線照射後 10 日目に測定した。

離を行った。さらに 1.8 ml の 3 M 酢酸ナトリウムと 20 ml のイソプロパノールを加え転倒混和した。- 80 で 30 分間冷却した後、シングローター (RS - 4 : KUBOTA) で、4 , 3000rpm, 30 分間遠心し、DNA / RNA 混合物を回収した後、適量の TE 緩衝液 (10 mM Tris - HCl pH8.0, 1.0 mM EDTA pH8.0) に溶解した。得られた DNA / RNA 混合物は、CsCl - EtBr 平行密度勾配遠心により精製 DNA を分画した。

サザンブロット解析に用いるプローブ断片の単離のため、アラビドプシス、トマト *RAD51* シークエンスデータをもとに、フォワードプライマー、リバースプライマーを設定し、イネ系統 A58 の成葉から調製した全 DNA を鋳型に PCR を行った。得られた増幅産物は、TA クロニング法によってクローン化した。

プローブに用いた DNA 内に、認識サイトのない制限酵素を使い、各全 DNA を完全消化した。電気泳動は 0.8 % アガロースゲルを用いて 20 V, 20 時間行った。固定は STRATAGENE 社製の Duralon - UV<sup>TM</sup> membrane に 10 x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M クエン酸) をバッファーとして、約 24 時間ブロッティングを行い、UV リンカーで行った。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションバッファー (6 x SSC, 2 mM EDTA pH8.0, 10 mM Tris - HCl pH7.5, 5 x Denhardt's, 0.2 mg Salmon Sperm DNA, 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % Na N - Lauroyl Sarcosinate) へ標識したプローブを加え、65 で 12 時間以上行った。その後、オートラジオグラフィによるシグナル検出を行った。

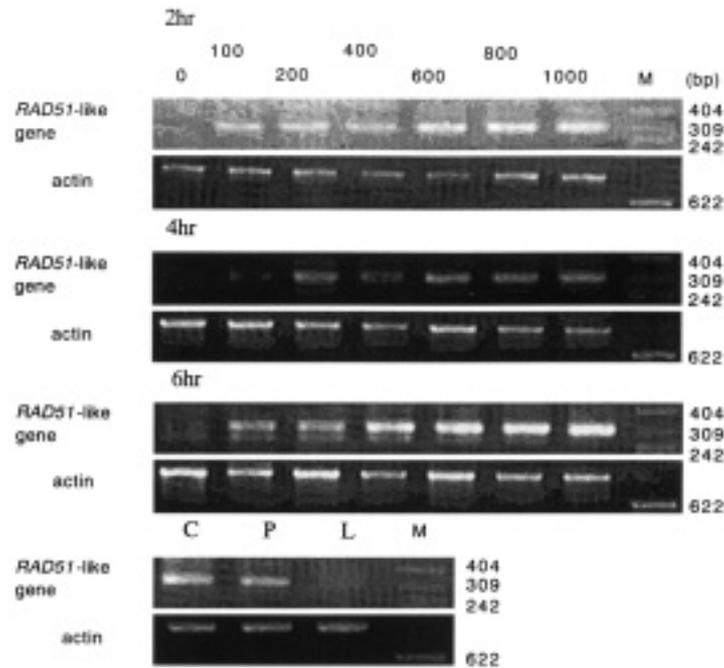
系統 A58 のカルスからも同様に、全 RNA の抽出、RT - PCR、PCR 産物のクローニングを行いシークエンスを行った。得られたクローンを SequiTherm<sup>TM</sup> Long - Read<sup>TM</sup> Cycle Sequencing Kit - LC (Epicentre

Technologies) を用いてサイクルシークエンス反応を行い、蛍光式 DNA シークエンサー model 4000 (LI - COR) で塩基配列を解読した。得られたデータは、アラビドプシス、トマト、トウモロコシの *RAD51* 遺伝子の配列と比較検討した。

## 結果および考察

本実験は、DNA 損傷に対する *RAD51* 遺伝子の発現様式を解析することを目的とした。そのため、供試する材料には、DNA 切断を誘導する必要がある。そこで、間接的な指標として、X 線照射による幼苗期の生長阻害の程度によって、X 線照射による *RAD51* 遺伝子の発現様式の解析を行うための適切な材料の条件設定を行った。異なる線量の X 線を発芽後 3 日目の幼苗に照射し、10 日後の草丈を測定したところ、幼苗の成長は 100Gy の線量で成長阻害を受ける事が分かった (第 1 図) また、200Gy 以上の線量では 10 日後の草丈にそれほど差はなかったが、1000Gy では枯死する個体も見られた。この結果から、X 線照射による DNA 傷害の修復に *RAD51* 遺伝子が関与しているとすれば、100Gy の線量で *RAD51* 遺伝子の発現が確認されると考えられた。

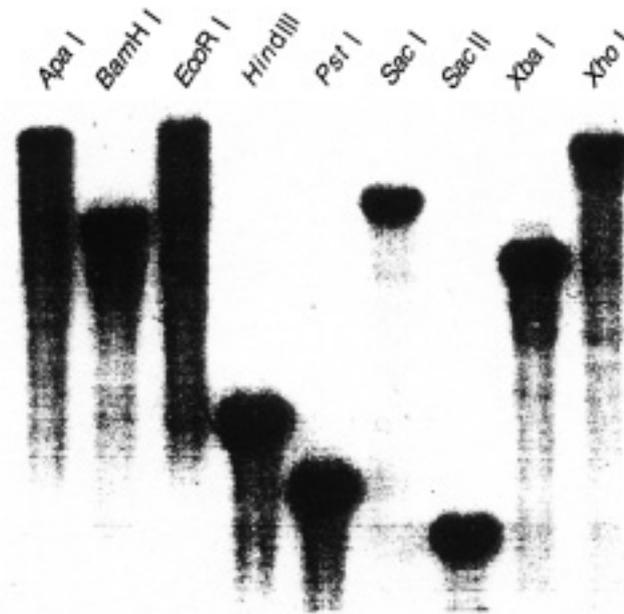
また、この実験の目的は *RAD51* 遺伝子の DNA 二重鎖切断の修復機能に関して調べ、培養細胞においての組換えに関して検討するのが目的である。トマトならびにアラビドプシスの *RAD51* 遺伝子の塩基配列より *RiRAD51* フォワードプライマーとリバースプライマーをデザインし、イネ日本型系統 A58 のカルス、成葉、幼穂、X 線処理した幼苗から抽出した RNA を用い RT - PCR を行った。その結果、カルス、幼穂および X 線処理した幼苗において増幅産物がえられ、一方、成葉では得られなかつ



第2図 アラビドプシス, トマト *RAD51* シークエンスデータをもとにデザインしたプライマーを用い, X線照射した幼苗の全RNAでRT-PCRを行った結果。各レーン上の数値(0 1000)はGyを示す。2hr, 4hr, 6hrはX線照射後の幼苗のサンプリング時間を示す。C: カルス, P: 幼穂, L: 成葉, M: マーカー。

た(第2図)。同様に系統 A58 のカルス, 成葉, 幼穂, X線処理した幼苗から抽出したRNAを用い, *RiLIM15* 遺伝子の発現をしらべたが, カルス, 幼穂において発現が認められたが, 成葉やX線処理した幼苗では発現が認められなかった。このことから, コリやマウスと同様にイネにおいても *RAD51* 遺伝子は, 減数分裂期に *RiLIM15* 遺伝子と共に発現し, さらにマウスやアラビドプシスと同様に培養細胞でも発現していることが明らかになった。一方, *RiLIM15* 遺伝子とは異なり, *RiRAD51* 遺伝子は, X線処理した幼苗においても発現が認められた。*RiLIM15* と *RiRAD51* 遺伝子は, 相同組換え遺伝子であるということと考え合わせると, 両遺伝子はイネにおいて減数分裂の細胞と培養細胞内での相同組換えにおいて協調的に働くが, それぞれ別の機能で異なる役割を持つ可能性が考えられる。また, SHINOHARA *et al.* (5) によると, *RAD51* タンパクは大腸菌で古くから相同組換えタンパクとして知られている *recA* タンパクと同様に単独で組換え反応を引き起こすが, *RAD51* タンパク単独では, *recA* タンパクに比べ組換え率が  $1/10$  以下になると報告している。さらに, *RAD52*, *RAD54*, *RAD57*, *RAD59*, *RPA* などが複合体を形成し, *recA* タンパクと同等の組換え率を獲得していると報告している。また, 小川ら(3)によると, 真核生物の組換え機

構を明らかにする目的で, 酵母の減数分裂期組換え欠損株を分離解析した結果, 組換えに関わるタンパクは, (1) 染色体対合に關与するもの, (2) 組換えの開始である二重鎖切断に關与するもの, (3) 二重鎖切断後の組換え体分子形成に關与するもの, の三種に大別することが出来ると報告している。今後, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD59*, *RPA* など組換え体分子形成に關与する遺伝子や, それ以外の組換え反応に關わるイネの変異体を作出し, 組換えに關わるタンパクの各々の機能をはじめ, 相同組換えに關する細かな事柄などを明白にする必要がある。また, 農林水産省農業生物資源研究所の清水特別研究員によると(Personal communication), イネにおいてもトウモロコシと同様に *RAD51* 遺伝子が2コピー存在するとしている。したがって, それぞれのRNAの非翻訳領域などを使い, ノーザンプロット解析などで再度それぞれの遺伝子についての発現解析を行う必要がある。そこで, イネ系統 A58 を材料として用い, ゲノミックDNAを9つの制限酵素を用い消化し, サザンプロット解析をおこなったが, どの制限酵素においても1つのバンドしか確認されなかった(第3図)。この結果から, ハイブリダイゼーションの条件を甘くして再度サザンプロット解析を行ったが, はっきりしたコピー数に關する結論は出なかった。アラビドプシスやトマトの *RAD51*



第3図 イネ日本型系統 A58 の全 DNA を各制限酵素で消化し *RAD51* 遺伝子の部分配列をプローブとして用いたサザンブロット解析。ゲノミック DNA は左のレーンから *Apa*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sac*I, *Sac*II, *Xba*I, *Xho*I の各制限酵素で消化したものを示す。

遺伝子においても、ジーンバンクにはそれぞれ1つしか配列が登録されていない。しかし、AMIE *et al* (1)によると、トウモロコシでは*RAD51* 遺伝子はゲノム内に2コピー存在することが cDNA ライブラリーによる実験から示唆されている。トウモロコシから得られたこの2つの *RAD51* 遺伝子は、それぞれ *RAD51a*, *RAD51b* と名づけられ、塩基配列で 90 % の相同性があり、ヒトの *RAD51* 遺伝子と比較するとそれぞれ 69 %, 70 % の相同性があると報告されている。さらに、彼等はトウモロコシにおける 2 つの *RAD51* の機能を調べるため、*RAD51a*, *RAD51b* のいずれかの遺伝子の機能喪失変異体と野生株の比較を行っている。その結果、*RAD51a* のみの機能喪失変異体と *RAD51b* のみの機能喪失変異体と野生株との間に表現型に差は見られなかったことから、この 2 つの遺伝子は機能的に同じ働きをしているのではないかと述べている。イネでも今後 cDNA ライブラリーを作り、クローンの塩基配列をきめるなどの方法でコピー数を確認する必要がある。

イネ系統 A58 における *RAD51* 遺伝子の構造解析のため、*recA* 様遺伝子内で保存性の高い homologous core 領域に的を絞って、RT-PCR によって得られた増幅産物のシーケンスを行った。アラビドプシス、トマトの cDNA 配列を基に得られたシーケンスデータと比較した結果アラビドプシスで 81 %, トマトで 82 % の相同性が認められた。また、得られたシーケンスデータをアミノ酸配列に置き換えアミノ酸配列での比較を行った結果、アラビドプシスで 95 %, トマトでは 97 % の相同性が認められた。また、*RAD51* 以外の *recA* 様遺伝子の可

能性もあるため、*RiLIM15* 遺伝子と *AtDMC1* 遺伝子に関してもアミノ酸配列に置き換え比較を行った。その結果 *RiLIM15* で 57 %, *AtDMC1* で同じく 57 % の相同性が認められた。これらのことから前にシーケンスを行った遺伝子はイネにおける *RAD51* 遺伝子である可能性が極めて高いと考えられる。次に、まだ決定していない *RiRAD51* 遺伝子の 5 側, 3 側の配列を RACE 法を用い、その cDNA 塩基配列の決定を試みた。5 側は今だ 60bp 程しか読めていないが、配列が決定している領域中の翻訳領域に関して相同性検索を行ってみると、アラビドプシスにおいて 78 %, トマトにおいて 79 %, トウモロコシ *ZmRAD51a* において 84 %, *ZmRAD51b* において 93 % の相同性を示した。さらに、得られたシーケンスデータをアミノ酸配列で比較してみると、アラビドプシスで 90 %, トマトで 95 %, トウモロコシ *ZmRAD51a* で 92 %, *ZmRAD51b* で 96 % の相同性が得られた (第4図)。さらに、*RiLIM15* 遺伝子、*AtDMC1* 遺伝子の cDNA 塩基配列をアミノ酸に置き換え相同性を比較した結果それぞれ 56 % の相同性が得られた。それに対して、非転写領域に関しては、種によって非常に相同性が低いことが分かった。このことから、イネにおいても *RAD51* 遺伝子が 2 コピーあるとすれば、非転写領域をプローブとして用い、それぞれの遺伝子に関して発現解析が出来るものと考えられる。さらに、今後ゲノミック DNA において、*RAD51* 遺伝子の塩基配列を明らかにし、イントロン、エクソンならびに、プロモーターなどの位置などを調べる必要がある。

この研究は、ソマクローナル変異発生機構の解明の一

	10	20	30	40	50
<i>AtRAD51</i>	MTTMEQRRNQ	NAVQQODDEE	TOHGPFPEQ	LOAAGIASVD	VKKLRDAGLC
<i>LeRAD51</i>	MEQQHRNOKS	MQDQNDDEED	VQHGPFPEQ	LOASGIAALD	VKKLKDAGLC
<i>ZmRAD51a</i>	MSSSSAHQKA	SPPIEEEAATE	--HGPFPEQ	LOASGIAALD	VKKLKDAGLC
<i>ZmRAD51b</i>	MSSSSAHQKA	SPPIEEEAATE	--HGPFPEQ	LOASGIAALD	VKKLKDAGLC
<i>RiRAD51a</i>	MSTSAASAA	AEQQQEEG-E	--HGPFPEQ	LOASGIAALD	VKKLKDAGLY
<i>RiRAD51b</i>	-----	-----	--HGPFPEQ	LOASGIAALD	VKKLKDAGLC
	60	70	80	90	100
<i>AtRAD51</i>	TVEGVAYTTPR	KDLLQIKGIS	DAKVDKIVEA	ASKLVPLGFT	SASQLHAQRQ
<i>LeRAD51</i>	TVESVYVAPR	KELLQIKGIS	EAKVDKIEA	ASKLVPLGFT	SASQLHAQRL
<i>ZmRAD51a</i>	TVESVAYSPPR	KDLLQIKGIS	EAKVDKIEA	ASKLVPLGFT	SASQLHAQRL
<i>ZmRAD51b</i>	TVESVAYSPPR	KDLLQIKGIS	EAKVDKIEA	ASKLVPLGFT	SASQLHAQRL
<i>RiRAD51a</i>	TVESVAYTTPR	KDLLQIKGIS	EAKVDKIVEA	ASKLVPLGFT	SASQLHAQRL
<i>RiRAD51b</i>	TVESVYVSPR	KDLLQIKGIS	EAKVDKIEG	ASKLVPLGFT	SASQLHAQRL
	110	120	130	140	150
<i>AtRAD51</i>	EIIQITSGSR	ELDKVLEGGI	ETGSITELVG	EFRSGKTQLC	HTLCVTCQLP
<i>LeRAD51</i>	EIIQITSGSK	ELDKILEGGI	ETGSITEIVG	EFRSGKTQLC	HTLCVTCQLP
<i>ZmRAD51a</i>	EIIQITTTGSR	ELDKILDGGI	ETGSITEMYG	EFRSGKTQLC	HTLCVTCQLP
<i>ZmRAD51b</i>	EIIQITTTGSR	ELDKILDGGI	ETGSITEMYG	EFRSGKTQLC	HTLCVTCQLP
<i>RiRAD51a</i>	EIIQVTTGSR	ELDKILDGGI	ETGSITEIVG	EFRSGKTQLC	HTLCVTCQLP
<i>RiRAD51b</i>	EIIQVTTGSR	ELDKILDGGI	ETGSITEIVG	EFRSGKTQLC	HTLCVTCQLP
	160	170	180	190	200
<i>AtRAD51</i>	LDQGGGEGKA	MYIDAEGTFR	PORLLQIADR	FGLNGADVLE	NVAYARAYNT
<i>LeRAD51</i>	LDQGGGEGKA	MYIDAEGTFR	PORLLQIADR	YGLNGADVLE	NVAYARAYNT
<i>ZmRAD51a</i>	LDQGGGEGKA	LYIDAEGTFR	PORLLQIADR	FGLNGADVLE	NVAYARAYNT
<i>ZmRAD51b</i>	LDQGGGEGKA	LYIDAEGTFR	PORLLQIADR	FGLNGADVLE	NVAYARAYNT
<i>RiRAD51a</i>	LDQGGGEGKA	LYIDAEGTFR	PORLLQIADR	FGLNGADVLE	NVAYARAYNT
<i>RiRAD51b</i>	LDQGGGEGKA	LYIDAEGTFR	PORLLQIADR	FGLNGADVLE	NVAYARAYNT
	210	220	230	240	250
<i>AtRAD51</i>	DHQSRLLLEA	ASMMVETRFA	LLIVDSATAL	YRTDFSGRGE	LSARQMHLAK
<i>LeRAD51</i>	DHQSRLLLEA	ASMMVETRFA	LMIVDSATAL	YRTDFSGRGE	LSARQMHLAK
<i>ZmRAD51a</i>	DHQSRLLLEA	ASMMVETRFA	LMVVDSATL	YRTDFSGRGE	LSARQMHLAK
<i>ZmRAD51b</i>	DHQSRLLLEA	ASMMVETRFA	LMVVDSATL	YRTDFSGRGE	LSARQMHLAK
<i>RiRAD51a</i>	DHQSRLLLEA	ASMMVETRFA	LMIVDSATAL	YRTDFSGRGE	LSARQMHLAK
<i>RiRAD51b</i>	DHQSRLLLEA	ASMMVETRFA	TMIVDSATAL	YRTDFSGRGE	LSARQMHLAK
	260	270	280	290	300
<i>AtRAD51</i>	FLRSLQKLAD	EFGVAVVITN	QVVAQVDGSA	LFAGPQFKPI	GGNIMAHAST
<i>LeRAD51</i>	FLRSLQKLAD	EFGVAVVITN	QVVAQVDGSA	VFAGPQIKPI	GGNIMAHAST
<i>ZmRAD51a</i>	FLRSLQKLAD	EFGVAVVITN	QVVAQVDGAA	MFAGPQIKPI	GGNIMAHAST
<i>ZmRAD51b</i>	FLRSLQKLAD	EFGVAVVITN	QVVAQVDGAA	MFAGPQIKPI	GGNIMAHAST
<i>RiRAD51a</i>	FLRSLQKLAD	EFGVAVVITN	QVVAQVDGSA	MFAGPQIKPI	GGNIMAHAST
<i>RiRAD51b</i>	FLRSLQKLAD	EFGVAVVITN	QVVAQVDGAA	MFAGPQIKPI	GGNIMAHAST
	310	320	330	340	
<i>AtRAD51</i>	TRLALRKGRA	EERICKVISS	PCLAEAEARF	QISIEGVTDC	KD
<i>LeRAD51</i>	TRLALRKGRA	EERICKVIVSS	PCLAEAEARF	QISIEGVTDV	KD
<i>ZmRAD51a</i>	TRLALRKGRG	EERICKVISS	PCLAEAEARF	QISIEGVTDV	KD
<i>ZmRAD51b</i>	TRLALRKGRG	EERICKVISS	PCLAEAEARF	QISIEGVTDV	KD
<i>RiRAD51a</i>	TRLALRKGRG	EERICKVISS	PCLAEAEARF	QIASIEGVDV	KD
<i>RiRAD51b</i>	TRLALRKGRA	EERICKVIVSS	PCLAEAEARF	QISIEGVTDV	KD

第4図 イネ *RAD51* 遺伝子 cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列と、アラビドプシス、トマト、トウモロコシ *RAD51* タンパクのアミノ酸配列の比較。At: アラビドプシス, Le: トマト, Zm: トウモロコシ, Ri: イネ。

環として行って来た。本育種・遺伝学研究室では、ランドマーカーを使ったソマクローナル変異の起きやすい座についての研究など様々な角度からソマクローナル変異を解明しようとして来た。体細胞分裂期相同組換えの解析もその一つである。寺沢ら(8)の報告を総合すると、カルスや減数分裂期幼穂など相同組換えが起こっている細胞で、*LIM15* や *RAD51* 遺伝子はお互いに協調的に働くが、同じ *recA* 様遺伝子という枠の中でも機能が違うと考えられるとしている。さらに、小川ら(3)によると、*RAD51* 遺伝子は、大腸菌における *recA* と同様に単独でも組換えを起こすが、*recA* に比べ、単独では組換え効率

が低く、*RAD52*, *RAD54*, *RAD57*, *RAD59*, *RPA* などが複合体を形成し、*recA* と同等の組換え効率を獲得していることを示唆している。今後、酵母やマウス以外でも、変異体やノックアウトの個体を作成し、それぞれ組換えに関与する遺伝子の機能を調べる必要があると思われる。

## 摘 要

1. イネ日本型系統 A58 の胚盤由来のカルス、減数分裂期の幼穂、成葉より全 RNA を抽出し、アラビドプシス、

トマト *RAD51* cDNA の塩基配列を基に, homologous core 領域にダイジェネレートプライマーを作製し, RT-PCR をおこなった。その結果, カルスと幼穂で増幅産物が得られたが, 成葉では増幅産物は得られなかった。その後, カルス, 幼穂で得られた増幅産物を, TA クローニング法でライゲーションさせ, シークエンスを行い, プライマ - 作製の際用いたアラビドプシスとトマト *RAD51* cDNA の配列と比較した結果, アラビドプシスにおいて 81 %, トマトにおいて 82 % の相同性が確認された。また, 得られたシークエンスデータをアミノ酸配列に置き換え, 比較した結果, アラビドプシスで 95 %, トマトで 97 % と高い相同性が確認され, 今回得られた増幅産物はイネにおける *RAD51* と推定された。

2. *recA* 様遺伝子の中には, 組換えの際に生じるニックを修復する機能がある場合もあるという報告をもとに, *RAD51* 遺伝子には修復機能があるか調べるため, 二重鎖切断を生じさせる X 線を照射し発現を調べた。その結果, 照射線量の増加に伴い, *RAD51* 遺伝子の発現が強くなることが分かった。このことから, イネにおいて *RAD51* は DNA 修復機能を持つのではないかと推定された。今後, イネにおいて変異体作出などの方法で *RAD51* の機能を明らかにする必要がある。

3. イネ日本型系統 A58 におけるゲノム内での *RAD51* 遺伝子のコピー数を調べるため, プローブ内に制限酵素サイトを持たない 9 つの制限酵素を用いゲノミックサザンプロット解析を行った。その結果, いずれの制限酵素処理においてもシングルバンドしか得られなかったためイネ A58 ゲノム内において *RAD51* 遺伝子はシングルコピーで存在すると考えられたが, 他の研究者がイネ栽培種日本晴において, ダイジェネレートプライマーを作製し, RT-PCR を行った結果 *RAD51* 遺伝子はゲノム内に 2 コピー存在するとの結果を得ている。最近の報告で, トウモロコシではゲノム内に 2 コピー存在することが, cDNA ライブラリーにより確認されている。イネに関しても, 今後 cDNA ライブラリーを作製するなどの方法

で, コピー数を厳密に確認する必要がある。

4. *RAD51* 遺伝子の構造解析に関しては, トウモロコシにおける *ZmRAD51b* に相同性の高い *RiRAD51* の cDNA において, ポリ A までの 3 末端まで配列が決定している。今後, 5 末端の配列を決定する必要がある。

## 引用文献

1. AMIE, E. F., M. JOHN, S. IVANA, R. RODNEY, B. BEN and C. ZACHEUS : Three-dimensional microscopy of the Rad51 recombination protein during meiotic prophase. *The Plant Cell* 11 : 809-824, 1999.
2. GLISIN, V., R. CRKVENJAKOV and C. BYUS : Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13 : 2633, 1974.
3. 小川英行・小川智子 : 減数分裂期組換え - 関与する遺伝子の機能とその普遍性 . 蛋白質 核酸 酵素 39 : 568-578, 1994.
4. 島津樹一 : 植物のソマクローナル変異発生機構の解明に関する研究 . 平成 8 年度 弘前大学大学院農学研究科生物資源科学専攻修士学位論文 . 1997.
5. SHINOHARA, A. and T. OGAWA : Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* 391 : 404-407, 1998.
6. STASSEN N. Y., JM. JR. LOGSDON, G. J. VORA, H. H. OFFENBERG, J. D. PALMER and M. E. ZOLAN : Isolation and characterization of rad51 orthologs from *Coprinus cinereus* and *Lycopersicon esculentum*, and phylogenetic analysis of eukaryotic recA homologs. *Curr. Genet.* 31 : 144-157, 1997.
7. TERASAWA, M., A. SHINOHARA, Y. HOTTA, H. OGAWA and T. OGAWA : Localization of RecA-like recombination protein on chromosome of the lily at various meiotic stages. *Genes & Dev.* 9 : 925-934, 1995.
8. 寺沢匡博・池谷智淳・小川智子 : 減数分裂期における組換え . 蛋白質 核酸 酵素 41 : 1535-1542, 1996.
9. ULLRICH, A., J. SHINE, J. CHIRGWIN, R. PEKET, E. TISCHER, W. J. RUTTER and H. M. GOODMAN : Rat insulin genes : Construction of plasmid containing the coding sequences. *Science* 196 : 1313, 1977.

# Investigation of Structure and Function of a Gene Concerning to Homologous Recombination in Meiosis and Callus of Rice (*Oryza sativa* L.)

Yoshiaki AKAMA <sup>\*3</sup>, Mineo SENDA <sup>\*2</sup>, Ryuji ISHIKAWA <sup>\*1</sup>, Shinji AKADA <sup>\*2</sup>,  
Takeo HARADA <sup>\*1</sup> and Minoru NIIZEKI <sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> Gene and Genetic Systems, Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

<sup>\*2</sup> Gene Research Center, Hirosaki University

<sup>\*3</sup> Post Office of Nagoya City

## SUMMARY

Genetic variations which have often arisen through cell cultures in many species of plants have become known as somaclonal variation. However, the mechanism of somaclonal variation is as yet unclear from many perspectives. In order to clarify the mechanism, we focused on mitotic homologous recombination.

The *recA*-like genes which are essential to homologous recombination of DNA strands are classified into *LIM15/DMC1*-type and *RAD51*-type genes in eukaryotes. The *LIM15/DMC1*-type gene is specifically expressed for homologous recombination during meiosis. The *RAD51*-type is expressed for meiotic homologous recombination and the repair of double-strand breaks of DNA. In rice, the *LIM15/DMC1*-type gene, *RiLIM15*, was isolated and was expressed not only in meiotic young panicles, but also in mitotic cultured cells. However, the *RAD51* gene has not been isolated yet from rice. In this study, we tried to isolate the *RAD51*-type gene from rice, and also investigated the function of the gene. The results are as follows.

1. *RecA*-like genes consist of three domains, and domain II is highly homologous among *recA*-like genes. Therefore, we focused on domain II and performed RT-PCR. By using primers designed by the sequences of the *RAD51* gene of tomato and *Arabidopsis*, RT-PCR was performed using tissue cultured cell of strain A58. The sequence of the RT-PCR product was determined and compared with those of tomato and *Arabidopsis*. Homology to the *RAD51* sequences of tomato and *Arabidopsis* were 81% and 82%, respectively. Homologies of the amino acid sequences predicted with the DNA sequences to those of tomato and *Arabidopsis* were 95% and 97%, respectively.

2. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using total RNA extracted from the cultured cells, young meiotic panicles, mature leaves and X-ray treated seedlings. Expression of the *RAD51*-like gene was found to occur in cultured cells, young meiotic panicles and X-ray treated seedlings, but not mature leaves. This result shows that the *RAD51*-like gene possibly participates in DNA repairing. Thus, it is likely that the *RiLIM15* and *RAD51* genes may have different functions of the homologous recombination of DNA strands. The expression of *RAD51*-like gene on rice during meiosis and after X-ray irradiation are similar to those *RAD51*-type genes expressed in other species. The expression of *RAD51*-like gene in cultured cells may be related to the mitotic homologous recombination.

3. Copy number of *RAD51* gene was investigated of a rice strain A58. Southern blot analysis was carried out using nine kind of restriction enzymes and a genomic clone of partial *RAD51* gene as a probe. This blot showed that the rice strain A58 has only a single copy. A cultivar Nipponbare, however, has been reported to have two copies of *RAD51* genes. This difference between a strain A58 and a cultivar Nipponbare has not been clarified in this investigation.