

2007年度 卒業論文

*Chlamydomonas reinhardtii*におけるRNA干渉反応関連遺伝子のTagging法による検索

高知工科大学

物質・環境システム工学科

1080026 兼田 昇

指導教官 大濱 武 教授

[要旨]

Tag DNA 断片の導入により RNAi 反応が不完全となった株に関して、Tag が破壊した遺伝子周辺のゲノム DNA を用いて RESDA- PCR 法により決定して、ゲノム配列データと比較することで検索した。RESDA- PCR 法では、TagDNA 内の既に知られている配列に特異的な Specific primer 3つとゲノム DNA に非特異的にアニーリングする Degenerated primer を使い PCR を行うことで、Tag 上流や下流のゲノム配列を含む PCR 断片を得る。First PCR では DP と一番外側の SP1 とで PCR を行い、このとき、副産物として DP 同士、SP1 同士の産物が出来ることも予想されるため second PCR を行う。最後に電気泳動法によって明瞭な PCR 産物があればそのバンドをゲルから切り出し、その塩基配列を決定してクラミドモナスのゲノム配列と比較することにより、ゲノム内の Tag 挿入部位を決定した。

このような方法により、明らかにした Tag 被破壊遺伝子の多くは、その機能がまったく不明であるものが多かった。また、機能が予測されているものでも、RNAi 反応と直接関連づけられる可能性のある被破壊遺伝子はなかった。Dicer や Argonote タンパクなどの RNAi に関連が深い遺伝子は、これまで Tag 位置が決定された被破壊遺伝子の中には見い出されていない。それは、シーケンスが決まっていない領域が 5%あることや、全部で 1, 5143 個あるうちの 44%の遺伝子の機能が不明であることに起因すると考えられる。