

キク科植物の花序を決定する遺伝子の単離と機能解析

(応用生物学研究室) 北川 愛紗

【緒言】

植物の花成は、葉や茎などの器官を形成していた茎頂分裂組織が生殖分裂組織へと転換し、葉や茎とは全く異なる花器官を形成するという劇的な変化をもたらすものである。すなわち、栄養成長から生殖成長へと植物の成長の方向性が変化することであり、そこで発現する遺伝子の変化を意味する。

植物の器官は、複数の遺伝子が関与する複雑な経路によって形成されており、花の形成の際にも複数の遺伝子の発現が見られる。このうち、ガク片、花弁、雄ずい、雌ずいなどの花器官を形成する際に発現するホメオティック遺伝子については、シロイヌナズナ等の変異体よりいくつか単離され、その概要が明らかになってきている。だが、花が茎または枝につくときの順序、つまり花序を決定する遺伝子支配については未知な点が多い。特に花序のうち、キク科植物に代表される頭状花序についての遺伝子支配は、まだ明らかにされていない。

本研究では、キク科植物から頭状花序の決定に関与する遺伝子を単離し、その機能を明らかにすることを目指した。具体的には、キク科植物のブラキカムの cDNA ライブラリのスクリーニングを行い、得られた DNA 断片の配列決定を試みた。最終的には、花序についての遺伝子支配の全体像を解明とすることを目的とする。

【実験方法および結果】

．実験材料

実験材料には、キク科植物のブラキカム(和名 ヒメコスモス)を使用した。このブラキカムは4月から6月にかけて花を咲かせる植物で、多数の蕾をつける。本実験ではキク科植物の花芽が大量に必要であったため、実験を行なった時期に花芽をつけるブラキカムを選んだ。

．ブラキカム cDNA ライブラリ

cDNA ライブラリは、同研究室の石倉氏の手により作製されたもので、作製方法は次の通りである。

Poly(A)+RNA の抽出

核ゲノムより転写された mRNA は、A(アデニン)の連続した尾を持つ。この Poly(A)の相補鎖である Oligo(dT)を用いて、ブラキカムの葉および花芽に含まれる mRNA を抽出した。

完全長 cDNA の合成とサブトラクト法による選抜

花芽から抽出した mRNA から、逆転写酵素および SMART Oligonucleotide を用いて完全長の一本鎖 cDNA を合成した(SMART 法)。次に合成した花芽の cDNA と、葉から抽出した mRNA とをサブトラクト法により差し引きし、花芽に特異的な cDNA を選抜した。

完全長 cDNA ライブラリの作製

得られた cDNA を鋳型として PCR (Polymerase Chain Reaction ポリメラーゼ連鎖反応)を行い、二本鎖 DNA を合成、増幅させた。この増幅された DNA 断片を TriplEx2 フェージに挿入し、ライブラリを作製した。TriplEx2 フェージは、E.coli XL1-Blue に感染させたときはフェージとして機能するが、E.coli BM25.8 に感染させると内部の機構によりプラスミドに変換される。

．ブラキカム cDNA ライブラリのスクリーニングと 96 プレートへの集約(〔図 1 実験の流れ〕参照)

ブラキカム cDNA ライブラリには、目的の遺伝子をインサートとして持つフェージとインサートを持たないフェージが混在している状態であった。そこでフェージを E.coli XL1-Blue に感染させ、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- -D-ガラクトシド(X-gal)およびイソプロピル- -D(-)-チオガラクトピラノシド(IPTG)

を加えた NZY 固形培地に撒き、インサートを持つ白色のブランクと、インサートを持たない青色のブランクを得た。白色のブランクは、E.coli XL1-Blue 培養液、NZY 液体培地、10mM MgCl₂ / CaCl₂ を分注した 96 プレートに移してファージを増殖させた後保存した。

・PCR によるインサートの確認とプラスミドへの変換

96 プレートに移したファージの DNA を鋳型として PCR を行い、インサートの増幅を確認した。その結果、96 クローン中の 50 クローンでインサートの確認ができた。残り 46 クローンでインサートが確認されなかった理由としては、ごく短い DNA 断片が挿入されていたことが考えられる。PCR でインサートが確認されたものは、E.coli BM25.8 に感染させ、アンピシリンを加えた LB 固形培地にまいてコロニーを得た。その後コロニーを LB 液体培地に移して培養し、プラスミドを回収した。回収したプラスミドは制限酵素 *Sfi* で切断し、インサートを確認した。

・インサートの配列決定

回収したプラスミドより、挿入されたブラキカムの遺伝子の配列解読を行なった。そのうち 1 クローンの結果を【図 2 塩基配列の解読結果】に示す。この配列は全長約 1kbp で、その一部だけが解読できている。正確な配列の決定と詳しい機能の解析は、現在行なっているところである。

【考察】

本研究により、ブラキカムの花芽に特異的な遺伝子をサブトラクト法により 50 クローン単離することができた。また、そのための方法を確認することができた。だがこれらのクローンの中には、花芽で発現しているあらゆる遺伝子が含まれているので、花序に特異的な遺伝子を単離するには別の方法が必要となる。その方法としては、キク科植物の花托から抽出した mRNA をプローブとしたブランクハイブリダイゼーションを考えている。今後は、クローンの配列決定および機能解析を進めるとともに、花序に特異的な遺伝子の単離方法を確認させることを目指す。

【図 2 塩基配列の解読結果】

1	TNNANTGGG GGANNCGGGA GCGCNTTATT GNGTTGGTCC CCGGAATTC GGCCATTACG GCCGGGGGA GAAAGCAGAC	80
81	CGATTAATTA TCCGGCCAAA AAAGCTTCAC AAAATTAATA ATGGCTGCTG CTTCCTTAG CACCAATTTA CTTTCTACAA	160
161	CCAAACCCAT CAAAGATTTC AAATCTATTA CAATACCCAG TTCCCAAACA CCGAAATTCT TCATTAAACA CAGCTCCGGC	240
241	GCCGGCGCTG GCGCCGTCAA GCGGGTTGCC AATGATGAAA AAATGATGCC CATAAAAAGT AATGATGTTT CAGATCATCA	320
321	AGCTGGAAAC TTGGTGAGTG AAATTGAAAAG GGTGGTGTGTT GATGGTAGTG ATCAAGATTT GCAATTGATT GGTGGGCTAA	400
401	GTTTTGAAGG TGGTTTTAGT AGTGGTGATG GAAATCAAGT TGTGGTGTGTT GAAAATGACG ATTTTGATAA GTTTATGGAT	480
481	AGAGCTATTA ATGCTACTAT TGNTCTTGCT GTNGGTACTT TNGGGATTAC CAAGTNGCTT ACTATTGATT ATGATTCTNG	560
561	GCATGGATGG ACCNNTATGA AATACTTAGA TNCNCCCTCA ACCAACTGGN GGCATNCAAG AAGCTTTNAG GAAAATCCCT	640
641	TTTGGNAAAA TGATGATAAG GGGGNNGGNT TTCATAGGGA TGGATNNCNA GGNTTNAAGA AACCCNNTTG ANTTGACCAA	720
721	CTNNNTTAN GNTGGCTNNT GGTTAANTAC NGNAANTTTN CATTNACCCA NTTTGGNGNC TTTNCCTTNA AATGGGGGG	800
801	CCCCNANGGN CNTTAAAA	881

