

光発芽種子レタスにおける光制御遺伝子群の単離と機能解析

応用生物学研究室 牧田紗央里

1. 緒論

レタス種子は、フィトクロムを介する典型的な光発芽種子であり、古典的には多くの研究があるが、光信号がどのように種子の発芽を制御しているかについては、まだ十分には解明されていない。

本研究は、光照射後に活性化される遺伝子群を取り出すことにより、種子発芽に光シグナルがどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。

本研究の意義としては、

- (1) 光発芽は、種子が発芽できる環境にあるかどうかを判断する重要な現象であり、その仕組みを解明することは植物が生き抜くための戦略を理解するのに役立つ。
- (2) 種子の発芽過程とその制御機構を解明する研究は、種子の貯蔵や発芽制御などのさまざまな課題の解決に役立つ。

などがある。

同研究室の石倉氏が確立したサブトラクション法を用いることによって、目的の遺伝子群を迅速に単離し、その機能の解析を目指した。

2. 実験方法と結果

実験材料の選定と実験材料からの poly(A)+RNA の抽出

光発芽種子であるレタス(レタスウエアヘッド)の種子を用いた。種子をインキュベートする適切な温度を知るために、数種類の温度で種子を発芽させた。28℃では、暗黒下においたもの(D サンプル)は全く発芽せず、光照射したもの(L サンプル)はほぼ 100 %発芽した。25℃では D サンプルも 20 %近い発芽率であった。L サンプルに特異的な遺伝子を取り出したいため、L サンプルと D サンプルの差がはっきりと出る 28℃で実験を行った。

レタスは Red(R)光を照射することにより発芽し、その効果は Far-Red(FR)光により取り消される。まず、種子をシャーレにまいて、L サンプルと D サンプルを用意した。共に、28℃のインキュベータにおいた。次に、L サンプルと D サンプルから poly(A)+RNA(mRNA)を抽出した。mRNA を 8 時間後の種子から取った理由は以下の通りである。R 光照射から約 6 時間後になると、FR 光を照射しても、種子はほぼ発芽するということが分かる(図 1)。R 光を照射して 6 時間後には、発芽する、という情報が流れ出ている、FR 光を照射しても、発芽する、という情報を取り消すことができないということになる。よって、R 光を照射して 6 時間後に種子を回収すると、発芽初期に関する遺伝子が見られる、と考えられる。

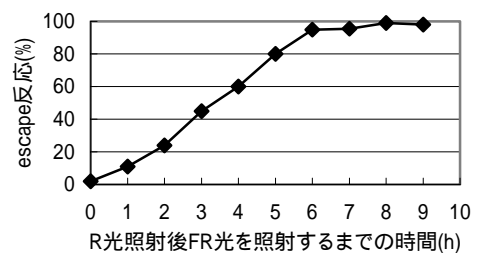


図 1. レタス種子発芽における escape 反応
縦軸は発芽率、横軸は R 光照射後 FR 光を照射するまでの時間を示す。発芽率は吸水開始後 24 時間目に測定した。

種子は水分を吸収していないと光を感知しないため、水分吸収のために2時間が必要と考え、シャーレにまいてから8時間後の種子を利用した。

1 本鎖 cDNA の合成とサブトラクション

L サンプルの mRNA から逆転写酵素、SMART Oligonucleotide を用いて、一本鎖 cDNA を合成した。次に L サンプルから合成した cDNA と D サンプルから抽出した mRNA をハイブリダイズし、L サンプルに特異的な一本鎖 cDNA を得た(サブトラクション法)。

cDNA ライブラリの作製

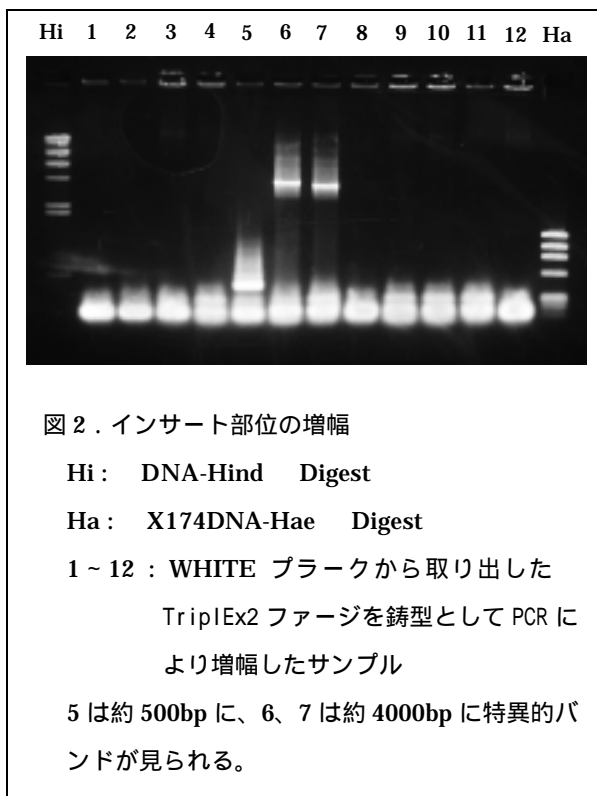
L サンプルから得られた特異的な cDNA を鋳型にして PCR を行い、完全長二本鎖 cDNA を作製した。その cDNA を TripIEx2 フェージに挿入した。これを cDNA ライブラリとした。

96 プレートの作製とインサート確認

TripIEx2 フェージを NZY 培地にまき、BLUE プラーク(インサートが入っていない)と WHITE プラーク(インサートが入っている)にわけ、WHITE プラークを 96 プレート(大腸菌 XL1-BLUE と 10 mM CaCl₂/MgCl₂ を 100 ml ずつ混合した溶液が入っている)に移した。WHITE プラークから取り出した TripIEx2 フェージを鋳型として PCR を行い、TripIEx2 フェージのインサート部位の増幅を行った(図2)。この結果、96 個のうち 11 個に増幅が見られた。残りの TripIEx2 フェージは大変短いインサートを含んでいると考えられる。これら 11 個を大腸菌 BM 25.8 に感染させ、LB/Amp 培地にまいて培養し、ここからプラスミドを回収した。

光特異的遺伝子の配列決定

回収したプラスミドを制限酵素 *Sfi* で切断し、インサートを切り出し、何らかの遺伝子を含んでいることを確認した。このプラスミドに関して、現在配列決定を行っている。



3. 考察

本研究では、レタス種子の発芽に光信号がどのように関与しているかを調べるために、サブトラクション法を用い、光を照射した時に発現する遺伝子を計96個単離した。しかし、サブトラクション法では、その他の遺伝子が紛れ込んでいる場合もある。光条件で発芽している遺伝子のみを単離するため、TripIEx2 フェージのインサート部位増幅のPCRを行った。その結果、11個に増幅が見られた。増幅が見られたインサート部位をプラスミドに変換し、現在、配列決定のための準備を行っている。塩基配列が決定されれば、その情報を基にRT-PCR法などにより、発現を詳しく調べる予定である。このような作業の積み重ねによって、光制御遺伝子群の全貌が明らかになると考えられる。