

修士論文要旨

アサガオの生長点機能を支配する遺伝子群の同定

人間環境科学研究科 環境情報学専攻 応用生物学研究室

学籍番号 901633010 吉田 愛

1. 要約

植物の葉・茎・花は茎頂分裂組織 (Shoot Apical Meristem : SAM) と呼ばれる同じ組織から分化していく。この SAM の機構を明らかにするために研究が重ねられているが、未だ解明されていない。本研究ではアサガオ (*Pharbitis nil* ; *P.nil*, cv.Violet) の生長点に特異的発現する 45 クローンをディファレンシャルディスプレイ法により単離し、特にこの中の 3 クローンが生長点で特異的に発現していることを明らかにした。

2. 緒言

植物は生涯にわたって生長を持続するという特徴を持っている。発芽後の目を見張るような生長は、植物の上下両極に存在する分裂組織によっておこる。分裂組織は胚発生時に誕生し、幹細胞としてみずからの未分化状態を保ちながら分裂・増殖を繰り返していく。地上では茎の生長点である茎頂分裂組織、地下では根の生長点である根端分裂組織が、各器官を作る源として細胞を提供し続けることで植物は生長していく。この 2 つは同じ分裂組織だが、葉・茎・花などの各器官に分化していく茎頂分裂組織と、途切れることなく根茎を拡大していくだけの根端分裂組織では機構が大きく異なっている。しかしながらこれら 2 つの分裂組織間で何が異なるかについては、全くと言っていいほど解明されていない。茎頂分裂組織は、葉から伝わる花成ホルモンのシグナルを受けて、葉を分化する段階から花を分化する段階にスイッチしていく。本研究では SAM に着目することで生長点に特異発現している遺伝子を単離し、その機能を探索することを目的としている。これにより分化スイッチの機構を明らかにできると考える。

本研究では、絶対的短日植物であるアサガオを材料に候補遺伝子の探索を行った。アサガオをサンプルとした理由は以下の 2 点が挙げられる。アサガオは一度の短日処理を行うだけですみやかに花芽を誘導することから、花芽形成シグナルのレセプターが確実に発現していると考えられるため、その遺伝子をとれる可能性が高いと考えられる。また SAM と根端分裂組織の両サンプルを集めやすい。今回は各部位の遺伝子を比較する方法と、特別な生長条件下でシュートを発生させるという 2 つの方法から、SAM で機能する遺伝子を探索していくことにした。

3. 方法および結果

SAM に特異発現する遺伝子

アサガオ種子の外皮を濃硫酸で処理し、25℃の明条件下で一晩培養した。発根した種子を培養土に植え換え、25℃の長日条件(Long Day ; LD)で育成した。LD条件で育成したのは、アサガオでは短日シグナルをうけるレセプターが光条件により誘導されるのではなく、常時発現していると考えられるためである。発根した種子の根と、LDで育成したアサガオのSAM、第一葉 (first leaf ; 1st leaf) からそれぞれ mRNA を抽出した (図1 参照)。

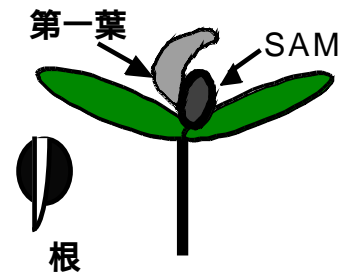


図1 : mRNAを抽出した各器官の名称
 根 : 発根した先5 mmを切断。20株。
 第一葉 : 本葉の若い状態。30株。
 SAM : 葉もしくは茎に分化する前の状態。50株。
 それぞれの株数から約1 μgのmRNAを抽出。



図2 : Differential Displayの結果
 R : Root, S : SAM, L : 1st Leaf
 R,Lと比較してSで薄いバンドが目立つが、矢印で示した部分のみ発現量が上がっている。SAM特異的に発現する遺伝子として切り出し。

図3 : RT-PCR産物電気泳動写真
 M1 : 100 bp Marker, M2 : x174/Hae Marker
 R : Root, S : SAM, L : 1st Leaf
 D.Dの泳動図と同様、SAMでのみ発現している。また期待値の530 bpとも一致している。

にのみ特異的に発現、もしくは発現量の差が顕著だった遺伝子を45クローン単離する事に成功した。シーケンサーにより遺伝子断片の塩基配列を決定し、クローンごとにその断片を増幅するプライマーを設計した。遺伝子発現の差を再確認するために、各部位から新たに mRNA を抽出し、

第一葉を3つ目の対象区として加えたのは、2つの分裂組織を比較するにあたり、アサガオのシュートが非常に小さくて葉の原基が混入しやすいと考えられたので、分化済みの葉で発現する遺伝子を候補から外すために用いた。またこれら3点を比較することで、光合成に関与していると考えられる遺伝子なども排除できる。各 mRNA を cDNA に変換し、ディファレンシャルディスプレイ (Differential Display ; D.D) にかけて (図2 参照) 。D.D法は特定の組織で発現している遺伝子の種類と量を比較するのに便利な方法である。この方法で SAM

No.	D.D size	D.D			RT			RT size
		R	S	L	R	S	L	
1	300	+	++	+				
2	600	+	++	+				
3	400	·	++	·				
4	600	·	++	·				
5	600	·	++	·				
6	300	+	++	+	·	+	+	144
7	500	·	++	·	·	·	++	240
8	550	+	++	+	·	+	++	296
9	500	+	++	+				
10	280	·	++	·	+	+	+	136
11	300	+	++	+				
12	600	+	++	+				
13	560	·	++	·				
14	700	·	++	·				
15	900	+	++	+				
16	800	+	++	+	+	++	+	530
17	600	+	++	+	·	++	·	560
18	600	+	++	+				
19	400	·	++	·	·	·	+	170
20	450	·	++	·				
21	600	+	++	+				
22	500	+	++	+				
23	500	·	++	·				
24	500	·	++	·	·	+	++	283
25	800	·	++	·				
26	600	·	++	+	·	++	+	464
27	500	·	++	·				
28	700	·	++	·				
29	600	·	++	·	·	+	+	221
30	700	·	++	·				
31	700	·	++	·				
32	550	·	++	·				
33	500	·	++	·				
34	450	·	++	·				
35	700	·	++	·				
36	650	·	++	+				
37	600	·	++	·				
38	400	·	++	·				
39	300	+	++	·				
40	1078	·	++	·				
41	872	·	++	·				
42	500	·	++	·				
43	600	·	++	·	++	+	+	381
44	500	·	++	·				
45	500	·	++	+				

表1 : 各遺伝子断片の発現パターン

R = Root, S = SAM, L = 1st Leaf

· = 発現なし + = やや発現 ++ = 高発現
 No.16, No.17, No.26でD.DとRT-PCRの結果が一致している。

各クローン特有のプライマーを用いて RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) を行い (図 3 参照)、これらの結果を表 1 まとめた。発現量の差が再確認できた遺伝子断片の全長を得るために、フアージとして LD 条件で育成した SAM の cDNA ライブラリー (2001 年 佐内 勇亮氏作) を、プローブとして D.D 法で単離した遺伝子断片をそれぞれ使用し、ハイブリダイズしたと思われる遺伝子について塩基配列を決定した。

シュート再生

植物体において、花を付け子孫となる種子を残すことは最も重要な過程である。この時期膨大なエネルギーを必要とするため、植物は栄養生長中に茎や葉を伸ばし光合成を行うことでエネルギーを蓄積する。このようにシュートは植物においてとても重要な器官と言える。このためシュートの元となる SAM で機能している遺伝子を調べることで、シュート形成に関する遺伝子を同定できると考えた。しかしその遺伝子が SAM のどの時期で発現しているのか、どのような構造を持っているのかなど、手がかりとなるものはまるでない。そこで今回アサガオの SAM (LD 条件) から抽出した mRNA を元にして以下の手順で実験を行うことにした。mRNA には SAM で機能している数千から 1 万種もの遺伝子が含まれている。これを扱いやすい状態 (cDNA ライブラリー) に変換し、アグロバクテリウム法により植物体内に遺伝子の集合体を取り込ませる。この植物片をシュートの再生を誘導しない培地で培養する。この条件下でシュートが形成できれば、そこで発現している遺伝子を調べることで、シュートを形成する能力を持った遺伝子を特定できると考えている。現段階は宿主細胞であるアグロバクテリウム菌に cDNA ライブラリーを移入するため、図 4 に示した手順で cDNA をベクター (pCAMBIA1300) に接合し、選択培地でアグロバクテリウム菌に取り込まれた遺伝子を選抜している状態である。

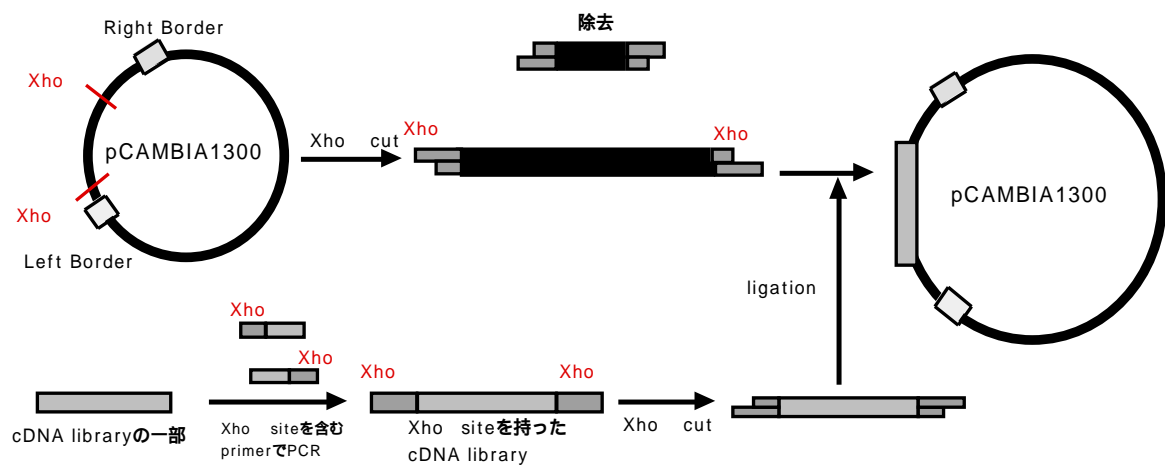


図 4 : ベクター構築から cDNA library 挿入までの手順

- : ベクターとなる pCAMBIA を制限酵素 XhoI で切断。
- : SAM より抽出した mRNA から cDNA library を構築。
- : 制限酵素 XhoI により両端を切断。
- : 電気泳動にかけ、長い方の断片をゲル回収により切り出し。
- : PCR 法により各 cDNA に XhoI site をつける。
- : ligase を使い、pCAMBIA と各 cDNA を接合。

4. 考察

今回 D.D 法により SAM で特異的に発現する遺伝子を 45 クローン単離する事に成功した。しかし RT-PCR で発現量の差を再確認したことにより候補遺伝子は 3 クローンに絞られた。理由として、D.D 法では直接ゲルのバンドが可視的にはならないので、いくつもの密集したバンドの中から X-線フィルムの位置と照らし合わせて人の手で切り出さなければならない。そのため、誤って目的遺伝子の上下で発現していた遺伝子断片を切り出したことが考えられる。これは D.D 法でも放射能標識した何種類かのマーカーをサンプルの両サイドに流すことで、ある程度改善できるだろう。また候補遺伝子が 45 クローンから 3 クローンにまで減少しているが、3 クローン以外の全てが RT-PCR の結果と一致しなかったわけではない。RT-PCR は各クローンに対して設計した専用のプライマーを使用するので、温度や伸長時間などの条件設定が非常に難しい。このため多くのものが RT-PCR では増幅されなかったか、期待値と一致しなかった。様々な反応条件を網羅的に調べるか、もしくはプライマーを設計し直すことで改善できる可能性もあるが、今回は限られた短い断片内で設計しているので、後者は難しいと思われる。

単離した 3 つの遺伝子断片を塩基レベルでホモロジー検索を行った。その内の一つ No.17 は、マルバアサガオのカルコン合成酵素遺伝子と 83 %の高い相同性を示した。カルコンとはフラボノイド系の色素で濃い黄色や橙赤色を発色する色素なのだが、なぜ SAM でのみ発現しているかはさらなる研究が必要である。残り 2 つのクローンについても同様に塩基レベルでホモロジー検索を行ったが、これら 2 つのクローンは既知の遺伝子とは明確な相同性を示さなかった。今回単離したクローン（表 1 参照）の中からは、残念ながら花芽形成シグナルレセプターに関わる遺伝子は得られなかった。しかし、これらのクローンが生長点機能にどのように関与するのは興味深い課題である。

シュート再生での実験では、ベクターに cDNA を接合する際に *Xho* サイトを利用して挿入しているが、目的となる未知の遺伝子が既にこのサイトを含んでいる可能性がある。今回 *Xho* は CTCGAG の 6 塩基を認識して切断するということから、目的遺伝子に入っている可能性は比較的少ない。しかし、より効率を上げるためには、cDNA が制限酵素で切断されないように 5'-Methyl dCTP を用いて PCR をかけたり、ベクターに *EcoR* などの平滑末端を生じる制限酵素サイトをもつアームを取り付け、ベクター側を処理することで cDNA を制限酵素で切らずにベクターへ組み込んだりする工夫が必要になってくる。このように走り始めたばかりの実験だけに様々な試行錯誤が必要となる。しかし生長点機能を支配している遺伝子が分かれば、組織培養で効率よく生育できない植物を、この遺伝子を過剰発現させることで直接シュートを誘導できるので、将来的には自然環境下では繁殖が困難で絶滅に瀕している植物体を救うことにもつながる。これらの点から、この試みは非常に重要な役割を担っていると言えるだろう。