

アサガオ生長点で特異的に発現する花成初期遺伝子群の単離と解析

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 901633005 佐内 勇亮

1. 要約

植物の花芽形成過程は、長年研究されてきたにも関わらずまだ明らかにされていない。本研究の目的は、その花成初期遺伝子を同定し、花成検定系を確立することである。アサガオを用いて行った実験の結果、花芽形成初期に関係する遺伝子7クローンを同定することに成功した。また、うち3クローンが花成初期に特異的に発現することを発見した。

2. 序論

高等植物の花芽形成には、多数の転写因子に関わるカスケード制御が存在している。現在、がく片や雄ずい、雌ずいを形成する遺伝子は同定されているが、直接花芽形成を促す遺伝子は、まだ見付かっていない。L. Chailachjan (露) が初めて花成ホルモン“フロリゲン”の存在を仮定してから半世紀以上になるのに、未だにフロリゲンは単離されておらず、遺伝情報も化学的性質も分かっていない。花成が起こったかどうかを検定するには、植物体に花芽が形成されているかを観察するほか術がなく、それには花成刺激から一週間もかかってしまう。

私の研究テーマは、生長点でフロリゲンに応答して起こる、最初のイベントに関わる遺伝子群を同定し、花成の生物検定系を確立することである。そのためには、花芽形成に伴って発現してくる多数の遺伝子のバックグラウンドから、目的の初期遺伝子を探し出す工夫が必要になる。私はあえてゲノム解読が完了しているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いず、ただ一回の短日処理で花芽が完全に誘導されるアサガオ (*Pharbitis nil* cv. Violet) を材料に選び、

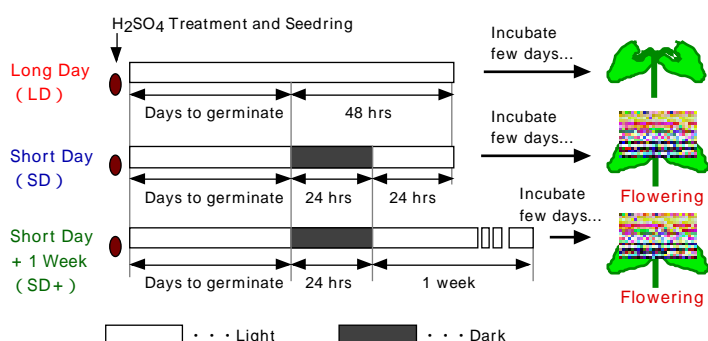


図. 1 LD・SD・SD+各サンプルの調整。種子に硫酸処理を施して種皮を溶解し、オーバーナイトで吸水させた後にパーミキュライト上へ播種した。発根後に培養土へ植え継ぎ、発芽して双葉が開くまで明条件下で生育させた。その後、SDサンプルとSD+サンプルには24 hrsの暗処理を与えた。暗処理後、SDサンプルは24 hrs、SD+サンプルは1 week明条件下で生育させ、サンプリングした。LDサンプルは、SDサンプルの暗処理開始から48 hrs後にサンプリングした。

ディファレンシャル・ディスプレイ (Differential Display, D.D.) 法で初期遺伝子の同定を行った。その結果、予想通り花芽形成のごく初期に一過的に働く新奇の遺伝子をクローニングすることに成功した。そしてそれらの遺伝子の発現量の差をタイムコースの RT-PCR 法で調べた結果、

花成刺激の直後に発現している遺伝子を発見した。

3. 材料と方法

材料ならびにサンプルの調製

アサガオは、10 時間以上の連続した短日処理により速やかに花芽形成のための遺伝子を発現させ、花をつけるための機構を立ち上げる。本実験では、発芽後アサガオを連続的に長日条件で生育させたものを LD (Long Day)、双葉が開くまで長日条件で生育させたのち 24 時間短日条件に置き、その後 24 時間明所で生育させたものを SD (Short Day)、SD と同様に短日処理を与えたのち、一週間明所で生育させたものを SD+ (Short Day ± 1 week) とした (図. 1)。LD サンプルでは花成誘導は起こっておらず、SD と SD+ サンプルで花成誘導が起こっている。それぞれの茎頂生長点サンプルからオリゴ (dT) セルロースを用いて mRNA を精製し、分光光度計で吸光度を測定して濃度を計算した後に、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。

cDNA ライブラリの構築

LD、SD、SD+ の各サンプルから mRNA を精製し、合成した cDNA を Triplex2 ファージに挿入してパッケージングし、宿主菌 (*E.coli* XL1-blue) に感染させ、遺伝子のコピーを増幅させた後に ファージを回収し、これを cDNA ライブラリとした。

ディファレンシャル・ディスプレイ法による特異的遺伝子の単離

調製した 3 サンプルの cDNA を PCR で増幅すると同時に [³²P]-dATP により放射能標識し、ディファレンシャル・ディスプレイ法のために作製したポリアクリルアミドゲルで電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーを撮った (図. 2、図. 3A)。各泳動レーンで特異的に発現しているバンドを切り出して溶出し、DNA 断片を単離したのちに PCR で増幅し、計 185 個のクローンを得た

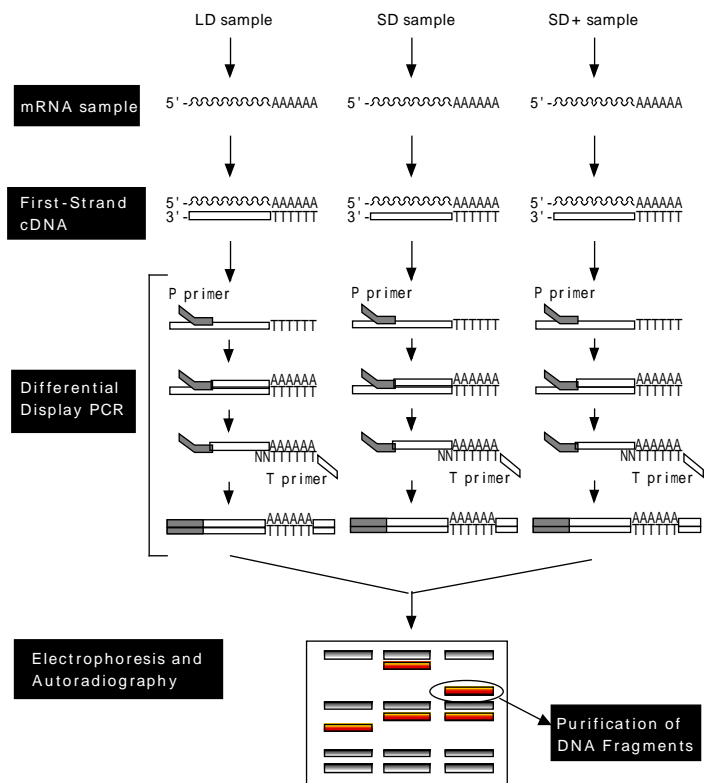


図. 2 ディファレンシャル・ディスプレイ法のスキーム図。LD・SD・SD+各サンプルから調整された mRNA サンプルは 1 本鎖 cDNA が合成された後、P・T 両プライマーを用いてディファレンシャル・ディスプレイ PCR により放射能ラベルされながら増幅された。PCR 産物は、ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動され、ゲル乾燥後にオートラジオグラフィーにかけた。現像後、特異的に発現しているバンドをゲルから切り出し、単離した。

単離した遺伝子断片の解析

D.D.法で得た 185 個のクローンを制限酵素 *EcoR* で処理し、アガロースゲル電気泳動により、遺伝子断片がライゲーションされているかを確認した。確認されたものは 167 クローンであり、それらのサンプルについて、断片の塩基配列を解読した。本研究で正確に塩基配列を決定することができたのは、135 個であった。これらをインターネットで BLAST ホモロジー検索にかけた結果、rRNA をコードしていると考えられるものを除き、新奇の遺伝子断片のクローンを 113 個得ることができた。決定された 113 クローンのうち、ホモロジー検索や D.D.の結果から優先的に解析する遺伝子断片を選択し、PCR プライマーを設計した。そしてそれらを用い、RT-PCR 法により各遺伝子の LD、SD、SD+それぞれの発現量を調べた。

RACE-PCR 実験とプラークハイブリ実験

RT-PCR 解析により発現の差異が観察されたクローンについて、RACE 法により全長遺伝子を得るための実験を行った。D.D.法では一般に遺伝子の poly(A)⁺尾部、3'末端が得られるので、5'末端へ向かって伸長する 5'-RACE 法が有効であると考えられる。また、RACE 法により増幅が困難であると判断されたクローンについては、作成した cDNA ライブラリをもとに、プラークハイブリ実験を行った。

4. 結果

cDNA ライブラリの構築

各サンプルについて、それぞれ約 100 万の独立したクローンを持つ cDNA ライブラリを構築することに成功した。その中の任意の数クローンについてその遺伝子の大きさを検定した結果、いずれも 1~2 kb であることが分かった。これらは、十分に上質のライブラリであると評価できる数値であった。

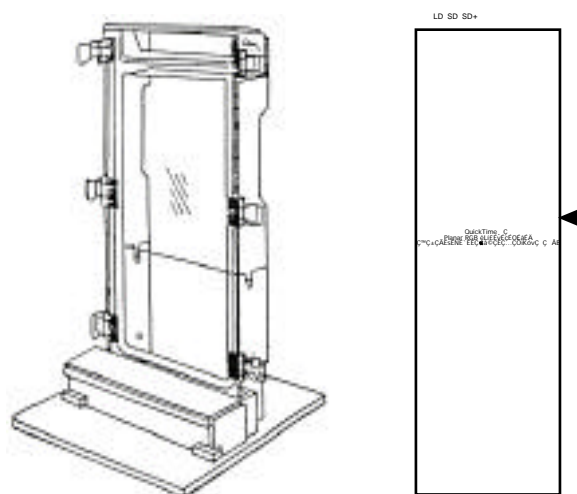


図 3 ディファレンシャル・ディスプレイ法。(A)ディファレンシャル・ディスプレイ法に用いた実験装置図。(B)ディファレンシャル・ディスプレイ後のゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィにかけて撮影した結果。左のレーンからLD、SD、SD+である。図中の矢印の部分に、発現の差が見られる。LDではバンドが無いのに対し、SDでは強く、SD+ではやや弱いバンドが観察できる。

ディファレンシャル・ディスプレイ法の結果

本実験では、実験系を確立するために予備実験を含め十数回のディファレンシャル・ディスプレイ電気泳動を行い、37 個の花芽形成特異的遺伝子の候補を同定することに成功した(図 3B)。そしてそれらを pT-Adv ベクターにライゲーションし、大腸菌 TOP10F'にクローニングした。各サンプルから 5 個ずつのクローンを選択し、合計 185 個のクローンを得ることができた。

遺伝子断片の解析

RT-PCR 法により、各遺伝子の LD、SD、SD+それぞれでの発現量を調べた結果、7 個の遺伝子が花芽形成に特異的であることを確認した。ディファレンシャル・ディスプレイ法で得た遺伝子断片が 185 個で、うち 7 クローンのみが特異的に発現していた。このように、花芽形成のごく初期で特異的に発現する遺伝子を同定することに成功したのは、初めてのことである。

また、どれくらいの段階で遺伝子が発現しているのかを確認するために、RT-PCR のタイムコース実験、組織特異的発現実験を行った。24 hrs の暗処理を施してから、LD 条件下に移して 6 hrs、12 hrs、24 hrs 経ったアサガオからサンプリングし、mRNA 濃度を合わせた後に RT-PCR を行った。同様に根と第 1 葉についても RT-PCR を行った結果、時系列に沿った遺伝子発現等が観察された (図. 4)。

5. 考察

本研究で、短日植物の代表格であるアサガオにおいて、花芽形成のごく初期に特異的に発現する 7 個の遺伝子の同定に初めて成功し、解析の結果それらが新奇の遺伝子であり、特異的に発現することを確認した。そのうちの 3 個のクローンについては、タイムコースの RT-PCR 実験により、花成刺激の直後に、遺伝子レベルの変化が起こっていることが分かった。これは、花成刺激初期段階での「花成検定」を確立することのできる遺伝子である事を示唆している。事実、クローン 19-1 の発現をみると (図. 4)、花成刺激の直後 (6 hrs) に急激に遺伝子が発現しており、これだけでも花成検定が成立しているといえる。SD 処理済みサンプルから抽出した物質を切り出した生長点に与え、今回発見した遺伝子のプライマーを用いて RT-PCR をする事で花成検定を行い、花成要因物質を検討することもできるはずである。

今後、現在までに花芽形成に関連すると報告されている遺伝子 *LEAFY (LFY)* や *FLOWERING LOCUS T (FT)* などと、本研究で発見した新奇遺伝子群がどのような関係にあるのか、他種の植物にも相同な遺伝子は存在するかどうかを解明する余地がある。また、この花成初期に関与する新奇遺伝子の全長 cDNA を得て、コードするタンパク質に対する抗体を作製することができれば、フロリゲンの解明につながるはずである。

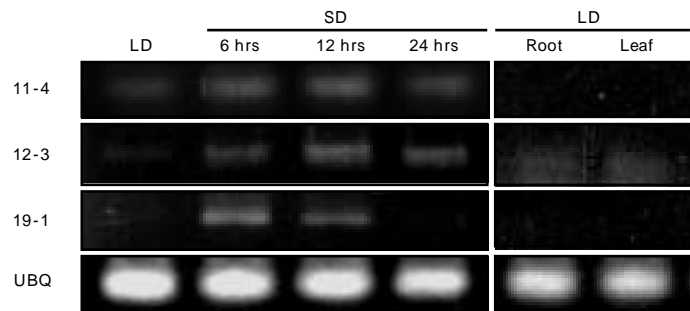


図. 4 RT-PCRのタイムコース実験。レーン左側から、LD、SD処理後6 hrs、12 hrs、24 hrsの生長点から精製したmRNAを、RT-PCRにかけた結果。また右側2レーンは、LD条件下で育てたアサガオの根、第1葉から精製したmRNAで、同様にRT-PCRにかけた結果である。各サンプルについて、花成刺激後に遺伝子の発現量が増加しているのが観察できる。12-3では徐々に増加し、19-1では6 hrsで急激に発現し、その後減少してゆく。また、根や第1葉では発現が観察できないので、生長点にのみ部位特異的に発現していることが分かる。UBQは、コントロールとして、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のユビキチン遺伝子上から作成したプライマーを用いて行ったRT-PCRした結果である。