

## アサガオの成長点における花成誘導初期遺伝子の単離と解析

(応用生物学) 増田 隆之

### 序論

高等植物は、まず栄養成長期があり、その後、生殖成長期へ移行する生活環を示す。この移行を引き起こす要因には、光周性、窒素欠乏、温度、ストレス、齢、強光などがある。

このうち光周性について、20世紀前半、W. W. Garner、H. A. Allard、K. C. Hamner、M. Kh. Chailakhyanら多くの研究者によって、花芽形成時期の調節において、日長が非常に重要な要因であり、花芽形成反応には限界暗期が関係しているということ、さらに、明暗を感受するのが葉であり、その葉から師管を通して、成長点に花成誘導物質(フロリゲン)が送られていることが明らかにされた。しかし、その後何十年もの歳月が流れた現在でも、その花成誘導物質は単離されておらず、どんな物質であるか不明のままであり、性質さえも明らかになっていない。また、花成誘導物質が成長点に達した後のメカニズムもあまり解明されていない。

そこで、本研究では、花成誘導物質が成長点に達するおよその時間が推定されており、たった1回の短日処理で花成が起こるアサガオ(Pharbitis nil cv. Violet)を研究材料として、成長点における花成誘導初期に特異的発現をする遺伝子を単離し、解析することを目的として研究を行った。この目的の達成は、花成誘導物質の解明につながると確信し、この研究はとても大きな意義がある。

### 方法と結果

#### Poly(A)<sup>+</sup>RNAの抽出

6日間、連続光の下で育てたアサガオの成長点(LD)と5日間、連続光の下で育てた後、16時間暗処理を行ったアサガオの成長点(SD)から、QuickPrep micro mRNA Purification Kitを用いてPoly(A)<sup>+</sup>RNAを抽出した。(Fig. 1)

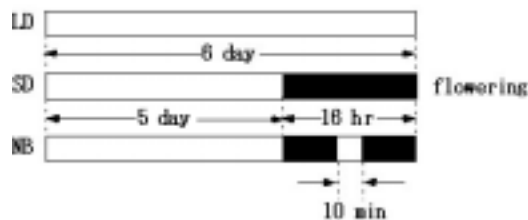


Fig. 1 LD、SD、NBの光条件

LDサンプルは、6日間連続光下で生育させた。SDサンプルは5日間連続光下で生育させ、16時間の暗処理に曝した。NBサンプルは5日間連続光下で生育させ、16時間の暗処理の8時間目に10分間光の下に置いて光中断を行った。SDサンプルのみ花芽が付く。

#### サブトラクション

LD、SDのPoly(A)<sup>+</sup>RNA各2μgをPCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kitを用いてサブトラクションを行い、SD特異的cDNA断片、LD特異的cDNA断片を得た。

各 Poly(A)+RNA を cDNA に変換し、制限酵素 Rsa で切断して平滑末端 cDNA 断片を得た。SD 特異的 cDNA 断片を得る場合、SD の cDNA 断片の平滑末端にアダプターを結合させ、LD の cDNA 断片とハイブリダイズして、アダプターに特異的なプライマーで SD 特異的 cDNA 断片を増幅した。LD 特異的 cDNA 断片を得る場合も同様の手順で行った。( Fig. 2 )

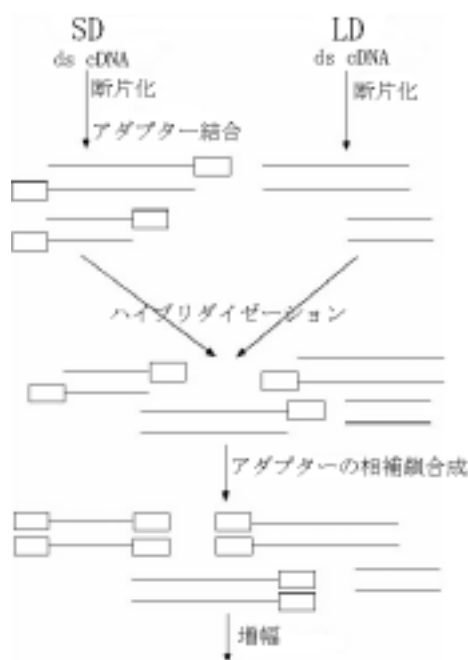


Fig. 2 サブトラクションの流れ図

SD 特異的 cDNA 断片の場合を示している。LD 特異的 cDNA 断片の場合は、SD の cDNA 断片ではなく、LD の cDNA 断片にアダプターを結合させる。

### TA クローニング

SD 特異的 cDNA 断片、LD 特異的 cDNA 断片それぞれをベクターに挿入し、大腸菌に形質転換した。形質転換大腸菌を LB/X-gal/IPTG/ampicillin 培地にまき、1 晩 37 で培養した。複数の青色コロニーと 1 つの白色コロニー (negative control) からプラスミドを回収し、制限酵素 Sph と Pst で切断してインサートの有無を確認した。

### シーケンス

QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて、インサートをもつ形質転換大腸菌から再度プラスミドを回収し、インサート領域のシーケンスを行った。塩基配列を決定できたのが 19 クローンあり、それらを BLAST 検索にかけたところ、他の植物の遺伝子と相同性が高かったものが 14 クローンあった。

### RT-PCR

現在、得られた 19 クローンについて、それぞれのクローン特有のプライマーを用いて RT-PCR を行い、LD、SD、NB それぞれの発現量を調べている。

### 考察

特異的 cDNA 断片を 19 クローン単離することができた。しかし、本研究で行った LD と SD のサブトラクションでは、花成誘導初期遺伝子以外の、光の有無によって成長点で発現量が異なる遺伝子が含まれている可能性がある。そこで、LD、SD、NB それぞれの RT-PCR などの解析を行い、花成誘導初期遺伝子のみを選抜する必要がある。さらに、花成誘導初期遺伝子であるとした遺伝子について、タイムコースや組織特異性を調べるなど更なる解析を行う予定である。