

卒業論文要旨
光発芽種子レタスにおける光制御遺伝子群の単離と解析

(応用生物学) 矢田 和正

．序論

植物は、自分にとって不利な時期を乗り越える術のひとつとして、種子という状態になる。それは、植物は種子の状態を維持することで、エネルギーの消費を極限まで下げることができるためである¹⁾。しかし、子孫を残していくためには、発芽し、生育した後、花を咲かせ、新しい種子を作らなければならない。そこで、発芽するタイミングが、その植物種の生存において重要になる。

植物体によって発芽を促進させる要因は様々だが、その中のひとつに光がある。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、これまで多くの研究がされてきた。フィトクロムとは、赤・近赤外光可逆的反応の光受容体である。照射される光の種類によって、フィトクロムが活性化または不活性化して、種子の発芽が制御されることがわかっている。しかし、種子の発芽を制御しているフィトクロムのシグナル伝達機構は、まだ解明されていない²⁾。

本研究は、光照射後に転写が活性化される遺伝子群を単離し、解析することにより、光シグナルがどのように種子発芽を制御しているかを明らかにし、光受容から発芽に至る分子機構を解明することを目的とする。本研究は、平成 14 年度卒業研究で牧田紗央里氏により最初に取り組み、その後を継ぐ研究である。牧田氏の研究により、実験材料であるレタスの品種、生育条件、poly A⁺ RNA の抽出時期を決定できた。

．実験方法および結果

<実験材料>

研究植物として、タカヤマシード社のウエヤーヘッドという品種のレタス種子を用いた。吸水開始後、以下の光条件で 28 8 hrs インキュベートした。

連続白色光照射 (WLc)

暗黒 (Dc)

急速冷凍することで遺伝子発現を停止させた。

<mRNA の抽出法>

DNA より転写された mRNA の 3'末端には poly A 配列を有している。poly A 配列の相補鎖である oligo dT を用いることで、サンプルから mRNA を抽出した。

<cDNA Library の作成>

連続白色光照射条件下で発現する全ての遺伝子の全長 cDNA を含む Library を作成した。

- (1) 冷凍保存していた WLc から mRNA を抽出した。
- (2) 逆転写酵素を用いて、一本鎖 cDNA を合成した。
- (3) 合成した一本鎖 cDNA を PCR することで、二本鎖 cDNA を合成・増幅した。
- (4) 得られた二本鎖 cDNA に TriplEx2 arm を取り付けした。
- (5) phage packaging を行い、Library を作成した。

作成した cDNA Library には約 40 万個のクローンが存在した。X-gal、IPTG を用いた Blue/White Selection の結果、その 8 割以上のクローンでインサート部位が確認できた。

<cDNA Subtraction>

光照射後に転写が活性化される遺伝子群を得るために、WLc と Dc について、サブトラクションを行った。

- (1) WLc と Dc から mRNA を抽出した。
- (2) 逆転写を行い、二本鎖 cDNA を合成した。
- (3) 制限酵素 Rsa を用いて、cDNA を断片化した。
- (4) WLc と Dc から得られた cDNA 断片についてハイブリダイゼーションを行った。
- (5) PCR により光発芽誘導処理で特異的に発現する遺伝子の cDNA のみを増幅した。

サブトラクションした cDNA を PCR により増幅し、電気泳動したところ、Fig.1 のようなバンドが確認できた。

<Sequencing>

電気泳動ゲルをバンドごとに切り分け、cDNA 断片を DNA サイズごとに抽出した。pGEM - T Vector を用いて、PCR によって増幅された cDNA 断片の単離を行なった。その結果、27 種類のクローンを単離した。そのうち、17 種類のクローンについて塩基配列が決定できた。これらのクローンについて、塩基レベルもしくはアミノ酸レベルで既知の遺伝子との相同性を調べた。

1 2 3

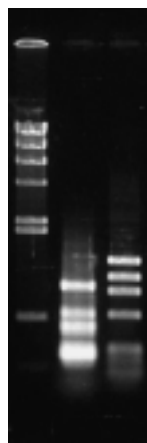


Fig.1 The PCR product of the subtracted sample

lane1: DNA/Hind
lane2: PCR product
lane3: X174/Hae

・考察

今回単離して、塩基配列を決定したクローンの相同性を調べた結果、データベースには登録されているが、機能は未知であるものが多かった。現在、Light と Dark において単離してきたクローンが、実際に mRNA の発現量が異なるかを、いくつかのクローンに対して RT - PCR を行うことで確認している。

今後は、単離した全てのクローンについて RT - PCR および RNA ドットプロット解析を行なうことで、明・暗条件での発現量の違いについて確認する。発現量に違いが見られたクローンについては、どのタイミングで発現量に違いが現れるかを、タイムコースを取って調べる。また、サブトラクションした試料は Rsa により断片化されているので、cDNA Library に含まれている全長 cDNA をもちいて解析も行なう。

[参考文献]

- 1) 古谷雅樹 著 植物は何を見ているか 岩波ジュニア新書
- 2) J. D. Bewley, M. Black Physiology and Biochemistry of Seeds Springer-Verlag