

アサガオの花成誘導初期に関与する遺伝子群の単離と構造解析

(応用生物学研究室) 石倉淳士

1. 序論

花が咲くという現象は、花成（花芽形成）時期つまりは栄養生長期から生殖生長期へとシフトするタイミングを決めることから始まる。一見単純なようにみえる現象だが実は非常に複雑なメカニズムから成り立っている。シロイヌナズナをはじめアサガオなどの一年生草本植物のような一回繁殖性の植物にとって、花成の時期の決断は一生に一度であり、その植物の繁殖が成功するかどうかは、その一回の花成にかかっている。そのため、植物は周囲の環境要因の変化を敏感にかつ正確に感知し、絶妙なタイミングで花成を誘導しなければならない。花成は植物の一生の中でもっともドラマティックな現象である。

モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の変異体を用いた解析により、シロイヌナズナの花成制御経路には、光周期（一日のうちの昼夜の長さ）依存促進経路・春化依存促進経路・ジベレリン依存促進経路・自律的依存促進経路が存在するとされ、これらの経路がお互いに複雑に絡み合っており花成を誘導すると考えられている。そして、それらの経路の中でも特に重要とされているのが光周期依存促進経路で、この経路の制御下にはフロリゲン（花成ホルモン）があると考えられている。しかし、フロリゲンが提唱され 60 年以上を経た今もその正体は不明のままである。

本研究において、私は光周期依存促進経路において植物に共通に存在するマスター制御遺伝子、またフロリゲンに関わる遺伝子群を同定することをめざし研究を行った。

2.材料及び方法

2-1.実験材料

一般的に花成の研究に用いられるシロイヌナズナは複数の花成誘導経路が絡み合い非常に複雑である。一方で絶対的短日植物アサガオ (*Pharbitis nil*, *P. nil* cv. violet) は、ストレス誘導を除きほぼ光周性に依存した花成誘導が可能であり、昔からフロリゲン研究に使われている非常に有効な実験材料である。本研究では光周性花成に限った研究を行うため、アサガオを用いた。

25°Cで5日間/連続光下で育てたものを Long Day (LD) サンプルとし、同様に 25°Cで5日間/連続光下で育てた後 14 時間の暗処理 (28°C) を行ったものを Short Day (SD) サンプルとし、それぞれから Quick Prep® Micro mRNA Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いて poly(A)⁺RNA の抽出を行った。

2-2.サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション

光周期依存促進経路で特異的に発現する遺伝子群を単離するために、改良サブトラクション法 (Kikuchi et al., 2000) を用いた (図 1)。LD サンプルの poly(A)+RNA と SD サンプルの poly(A)+RNA から合成した一本鎖 cDNA を一定条件下でハイブリダイゼーションさせることで、共通に存在するものを差し引きする手法である。SMART

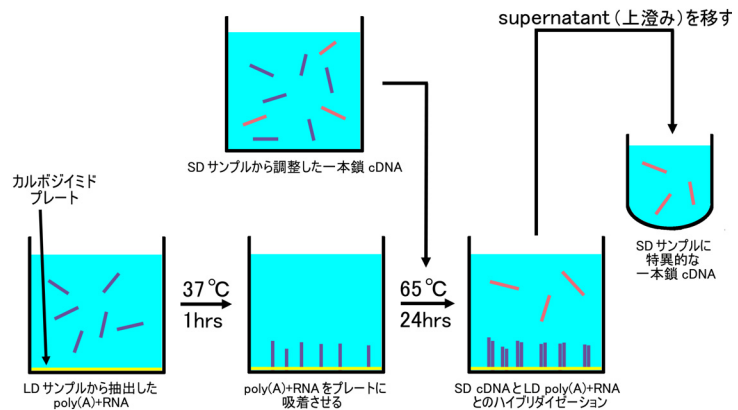


図 1 サブトラクション法のスキーム

LD サンプルの poly(A)+RNA と SD サンプルの cDNA に共通に含まれる遺伝子を差し引きすることで、特異的な遺伝子のみを得た

法を用いて SD サンプルの poly(A)+RNA から完全長一本鎖 cDNA 合成を行い、LD サンプルとのハイブリダイゼーションを 65°C で 24 時間の条件で 2 回行った。その後、SD サンプルに特異的な cDNA のみを回収し、SMART™ cDNA Library Construction Kit (BD bioscience Clontech 社製) を用いて、SD 条件に特異的な遺伝子を含む cDNA フェージライブラリを作成した。

2-3. ディファレンシャル・スクリーニング

得られた cDNA ライブラリから、さらなる選抜を行うため、ディファレンシャル・スクリーニングを行った。まず、cDNA フェージライブラリを青白選抜により、インサートを含むクローンのみを 96 プレートに移し取った。それらのクローンを全てメンブレンに移し取り、SD と LD の各サンプルから調整した一本鎖 cDNA プローブをランダムプライマーから合成した。その後、プローブとのハイブリダイゼーションを行い、LD と SD の両方を見比べることで、SD サンプルから調整したプローブで強いシグナルの出ているクローンを単離した。

2-4. シークエンス (塩基配列の決定)

今回作成した cDNA ライブラリは宿主菌を換えることで、λ フェージからプラスミドへと変換できる。λ フェージをそのままシークエンスにかけることは困難だったため、ディファレンシャル・スクリーニングにより得たクローン全てについてプラスミドへと変換した。その後、得た全てのプラスミドに対して ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いて、シークエンスを行った。

得られたクローンについて、日本 DNA データバンク <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html> 上にある BLASTX (DNA-タンパク質間のホモロジー検索) を用いてホモロジー検索を行い、クローンの機能推定を行った。

2-5.RT-PCRによるタイムコース実験

得られたクローンいくつかについてタイムコース実験を行った。タイムコース実験を行うサンプルとして、25°Cで5日間/連続光下で育てたLD、同様に5日間育てた後、8、12、14、16、20、24時間の暗処理を行ったサンプル、さらに14時間の暗期中の8時間目に10分間の光中断を行った Night Break (NB ; 光中断を行うと花芽の数が激減することが知られている) サンプルの計8処理区についてRT-PCRを行うことで、タイムコースを取った。また、RT-PCRにはReverTra-plus- (TOYOBO社製) を用いて行った。

それぞれのサンプルから total RNA を抽出し、各クローンに特異的なプライマーを設計して50 ng の total RNA を鋳型に RT-PCR を行った。

3.結果及び考察

完成した cDNA フェージライブラリは約180,000 クローンを含み、その組換え効率は14% (約25,200 クローン) であった。96プレート10枚 (960 クローン) についてディファレンシャル・スクリーニングを行った結果、合計で120のSD特異的なクローンを得ることができた。その120クローン全てについてλフェージからプラスミドへの変換を行い、変換の行えなかった3クローンを除く117クローンをシーケンスにかけ、BLASTXで解析した。結果の一部を表1に示す。

その中から、興味深いクローンを19クローン選抜し、タイムコース実験を行った。その中の一つ no.16H04 はユビキチン関連の遺伝子で、暗期が長くなるにつれてその発現量が増加した。また光中断によりその発現は減少し、LDにおける発現量が最も少なかった。今回得られた結果のなかでは最も典型的なパターンで、このほかにも4クローンが同様のパターンを示した。

ユビキチン関連の遺伝子はこの他のクローンと合わせ、全部で3クローン同定できた。ユビキチン様タンパク質 SUMO (SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER) に関与するプロテアーゼが花成制御に関わっていることが報告され (Murtas et al., 2003)、今回得られた3クローンについても同様のことがいえるかもしれない。

また、カタラーゼ関連の遺伝子と相同性のあった no.15C08 は最も発現量の多いクローンであった。カタラーゼには概日リズムを刻む遺伝子が報告されており、(Michael et al., 2002)、実際に no.15C08 も概日リズムを刻んでいるように見える。光周期依存促進経路ではたらく

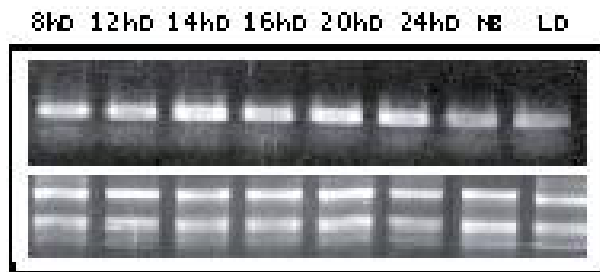


図2 no. 16H04のタイムコース実験

上段は RT-PCR の結果、下段は RT-PCR に持ち込んだ total RNA を示す。今回の実験系では 50ng を持ち込んだ

CONSTANS 遺伝子は、概日時計によって制御されており、暗処理 14 時間目で最も発現していることから、花成誘導初期に関わることが推測される。現在までにカタラーゼは花成の後、花や花粉に関わっている事は示唆されているが、花成に関する報告はなく、非常に興味深い。

no.17B07 はカルシウム結合タンパク質をコードする遺伝子と相同性があった。no.17E08

は非常に特徴的な発現を示し、8hD から 16hD まで高い発現を示した後、急激にその発現レベルは減少した。また、NB において特に発現量は少なかった。最近、光周期による花成誘導に関与するとされるカルシウム依存タンパク質キナーゼも同定された (Jaworski et al., 2003)。光周期に関わる新しい経路がまだあるのかもしれない。

以上の結果より、19 クローンについて RT-PCR によるタイムコース実験を行ったなかで、大きく違いがあったのは 8 クローンであった。この中には、機能未知でリズムを刻むように見えるクローンも含まれており、大変興味深い。光中断の効果があまりみられなかったものが多く感じたが、光中断の効果が花芽の数をゼロにするのではないことを踏まえると、発現レベルがゼロにならないことが花芽の数がゼロにならないことの原因なのかもしれない。

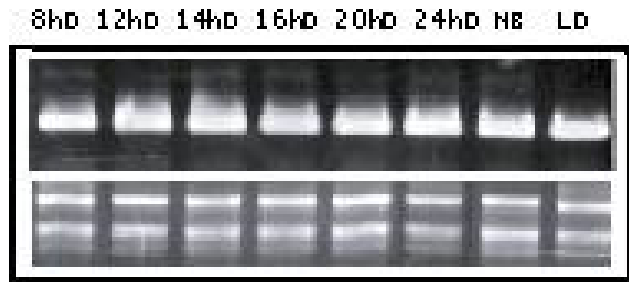


図 3 no. 15C08 のタイムコース実験

上段は RT-PCR の結果、下段は RT-PCR に持ち込んだ total RNA を示す。今回の実験系では 50ng を持ち込んだ

表 1 ディファレンシャル・スクリーニングにより単離したクローン

クローン名	Differential Screening シグナル強度		DDBJ BLASTX (DNA-タンパク ホモロジー検索結果)
	SD	LD	
no.10H07	++	+	Arabidopsis thaliana F22D16.13 protein.
D2-1-2	+	-	Nicotiana tabacum putative translationally controlled tumor protein.
no.11B05	++	-	Solanum tuberosum epoxide hydrolase protein.
no.11E10	++	+	Nicotiana tabacum ras-related GTP-binding protein protein.
no.15C08	+	-	Ipomoea batatas protein (Seet potato mRNA for catalase (EC 1.11.1.6)).
no.16H04	+	-	Nicotiana sylvestris ubiquitin fusion protein
no.17E08	++	+	Arabidopsis thaliana ubiquitin-like protein protein
no.18C05	+	-	Oryza sativa (japonica cultivar cultivar-group) unknown protein protein.
no.18D07	+	-	Oryza sativa (japonica cultivar cultivar-group) unknown protein protein.
no.18E06	+	-	Arabidopsis thaliana At1g22630/F12k8_2 protein

クローン名ディファレンシャル・スクリーニング時のシグナルの強度、BLASTX によるホモロジー検索の結果を示した。シグナルの強度は検出できなかった場合は-、できた場合はその強度を+から++++として表した。また、BLASTX のホモロジー検索の結果は、最も相同性の高かった結果を示した。なお、表中のクローンについてはすべて RT-PCR によるタイムコース実験を行った