

草本と木本の違いを決定する遺伝子の探索

(応用生物) 秋山 昌子

[1] 序論

現在畑で栽培される作物は大部分が草本であり、また1年生である。草本は木部の肥大成長に同化産物を消費する必要がないため、木本に比べて成長が早い。したがって、短期間で多くの生産量を得るが、それらはそのときの環境に左右されやすい。逆に木本の植物は、成長は遅いがいったん成熟すると草本ほど環境のストレスに影響されない。そこで、草本、木本両者の長所を活かすことができれば、成長が早くて環境ストレスに強い、生産しやすい作物ができるであろうと考えた。その作物を実現させた形が「木になるキャベツ」である。本研究では、この「木になるキャベツ」をつくる技術の確立を目指す。そのためには、植物体の任意の部分を木化させる新しい技術の開発が必要である。

木本とは、二次肥大成長をおこなう植物の総称であり、シダ類や裸子植物、双子葉類の一部に見られる。単子葉類や草本の双子葉類では、茎は一次組織からなり、二次組織は未発達である。一方、双子葉類でも木本の場合は、形成層が盛んに分裂して内側に二次木部、外側に二次師部が形成される。また、形成層は水平方向にも拡がり、隣接する維管束の形成層とつながることで、維管束間形成層を形成する。その結果、肥大成長を行えるようになる。さらに、木本植物では、細胞壁へのリグニンやスベリンの沈着(コルク化)など、細胞壁成分の生化学的変化も伴う。したがって、木本植物では細胞分化や増殖制御、細胞壁成分合成系などに関わる様々な遺伝子が働いていると考えられている。

一方、近縁種内に草本植物と木本植物が存在する例も多数知られている。例えば、イラクサ科カラムシ属には草本のアカソと木本のコアカソが存在する。この事実は、双子葉植物における木本植物と草本植物の違いがごく少数の遺伝子の変異で生じうる可能性を示唆している。一群の遺伝子の発現活性を制御している遺伝子(転写因子など)に変異が生じた場合には、多数の遺伝子の発現や機能がいっせいに変異することが知られており、この場合も同様の変異が生じている可能性がある。つまり、木本化のマスタースイッチにあたる制御因子が存在する可能性が考えられるのである。そこで、その遺伝子を取得できれば、植物体の任意の部分を木化させる技術開発が可能になると考えた。

茎が肥大成長する木本植物においても、葉の基部に存在する葉柄では肥大成長が見られない。このことから、木化している茎と葉柄とのあいだでの遺伝子発現を比較することにより、木本化(肥大成長)を制御する遺伝子群が同定できるのではないかと考えた。本研究では、アラカシを材料に茎で特異的に働く遺伝子をcDNAサブトラクト法で取得することを目指した。

[2] 方法と結果

材料として、アラカシ(ナラ科)の2ヶ月目の若い組織を使用した。枝の先端3cm程度を切りとり、腋芽も含めた芽の部分と葉を切り落として枝材料とし、切り落とした葉から葉柄のみを切り取って葉柄材料とした。茎および葉柄の横断切片を作製し観察した結果、茎では完全な維管束間形成層が存在するのに対して、葉柄では維管束間形成層が未形成で、維管束が分断されて存在していることが確認された。新鮮な試料を液体窒素で急速凍結、粉碎後、poly A tailのRNAを抽出した。葉柄試料からは1.8 μ g、枝試料からは2.4 μ gのpoly A tailのRNAを得た。

遺伝子発現の比較には、cDNAサブトラクト法を用いた。この方法は、2種類の材料A、Bで発現している遺伝子群をとりだし、片方(A)の遺伝子群からもう片方(B)を引き算するものである。これにより、材料Aでのみ高い発現が見られる遺伝子を得ることができる。cDNAサブト

ラクシオンには、BD Biosciences 社の Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit を用いた。

本実験では、葉柄、枝試料それぞれ 1.8 μg ずつの poly A tail の RNA を cDNA サブトラクションにかけ、枝で特異的に発現している遺伝子群を濃縮した cDNA ライブラリーを作製した。そのうちの 25 クローンの配列をキャピラリーシーケンサで決定した。25 クローンのうち 20 クローンについては、多いもので 7 クローンにおいて配列の重複が見られた。続いて、得られた配列情報について NCBI BLAST を用いた相同性検索を行った。その結果を表 1 に示す。遺伝子 2 を除いて、相同性の高い遺伝子は見つからなかった。

次に、多数のクローンが得られたクローン 1 から 3 について、決定した配列情報をもとに PCR プライマーを設計し RT-PCR による発現解析を行った。図 1 にその結果を示す。RT-PCR により、これらの遺伝子については茎と葉柄でほぼ同量の発現が見られることが分かった。

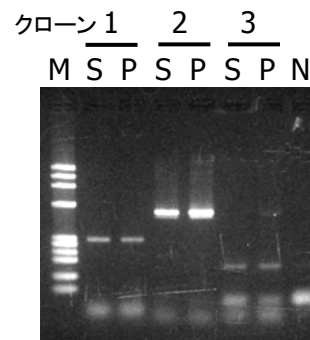


図 1. RT-PCR の結果

M: ϕ X Hae III (80ng)

S: 枝試料 P: 葉柄試料

N: -テンプレート

表 1. cDNA サブトラクト法によって得られた遺伝子配列

	相同遺伝子 (由来植物)	相同性	クローン数	同定した配列 の長さ (base)
クローン 1	なし	-	7	792
クローン 2	AIM1 タンパク質 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1.00E-17 (79%)	3	892
クローン 3	なし	-	6	375
クローン 4	なし	-	2	731
クローン 5	なし	-	2	770
クローン 6-10	なし	-	各 1	100-600

[3] 考察

RT-PCR の結果、cDNA サブトラクト法によって得た枝特異的遺伝子の cDNA ライブラリーには、枝 (木本) で特異的に発現していない遺伝子が多数含まれていることがわかった。期待したライブラリーが作製できなかった理由として、(1) cDNA サブトラクションにおける両者の cDNA 量の比が適切でなかったこと、(2) 2 本鎖 cDNA の融解が不十分なためにハイブリダイゼーションが理論どおりにいかなかったこと、などが考えられる。今後は条件設定を見直し、再度 cDNA サブトラクトライブラリーの構築を目指したい。また、枝および葉柄からの EST ライブラリーを構築し、特異的に発現する遺伝子を取得する研究に取り組むことも考えている。

一方、未分化組織である前形成層から維管束間形成層が分化する機構を見つけることが本研究の方針のひとつである。未分化な組織が別の組織に分化する引き金となる因子は、分化の前および直後に発現が高まっていると考えられる。そのような遺伝子を取得するには、マイクロダ イセクションによって未分化な組織を切り出し、そこから今回と同様の手法あるいは別の手法を用いて特異的 cDNA を取得する方法、人為的な分化誘導系を確立して遺伝子発現を解析する方法、などが考えられる。