

キク科植物の頭状花序で特異的に発現する遺伝子の探索

(応用生物学研究室) 北川 愛紗

1. 序論

自由に移動できない植物にとって、様々な環境において生育および繁殖に適した形態をとることは生存に必須である。故に、植物は実に多彩な形態を獲得することで、多様な環境に適応している。頭花植物における生殖器官、花の形態もまた、実に多様であり、花器官の形や数、花序 (inflorescence: 花芽の茎に対してのつき方) などが種ごとに異なる。この多様な花の形態は、多数の花をつけることで種子の数を増やしたり、大きな花弁や芳香で虫を呼び寄せて花粉を運ばせたりと、植物が繁殖を成功させるのに有利なものとなっている。

本研究が着目する花序は、こうした花の多様性を作り出す因子のひとつである。花を取り巻く器官は (図 1 A-C) のような名称で呼ばれている。花は、花軸と呼ばれる茎から枝分かれした花柄と呼ばれる茎の先につく。こうした器官のうち、花序の形態に貢献しているのは、花柄、小花梗、節、節間の特徴である。節間の長さや、節および小花梗の分岐の違いにより、花序は大きく変化する。また、分子生物学的な観点からも、これらの分化のタイミングと伸長度合いの決定が、花序を決定する重要なファクターのひとつであると考えられる。つまり花序とは、茎の形成パターンを指すと言える。

近年モデル植物 *Arabidopsis thaliana* の変異体の研究により、花序の形成に関与すると思われるいくつかの遺伝子が見つかってきている。これまでに花序に関与する遺伝子として発見された遺伝子は、転写因子、レセプターキナーゼなど、様々な機能を有するタンパク質をコードしている。しかし、これらの遺伝子の相互の関連は、まだ明らかになっていない。このことから、今後これらの遺伝子の相互関連の解明とともに、さらなる花序に関する遺伝子の発見が期待される。

頭花植物の花の中で最も特徴的な花序は、キク科植物の頭状花序に見られる (図 1 D)。頭状花序では花柄が存在せず、花軸から直接花托が形成される。また、多くの花が密生して形成されることも大きな特徴である。多くの花をつけることで、種によっては数十万もの種子を残すことが可能である。この種子の数の多さは、植物の繁殖において大変有利な特徴であると言える。また、頭状花序の花は花柄がないため花が密集しており、虫や風を媒介とした受粉を行う場合、少ないチャンスでより多くの花の受粉を完了させることができると考えられる。このように、頭状花序は植物の花の形態を決定するファクターのひとつとして、植物の繁殖に大きな意義を持つと考えられる。

キク科植物は、数ある被子植物の中でもごく最近に進化したものであることが、遺伝子の DNA 配列の系統解析から示されている。ところが、キク科植物は現在全世界に広く分布しており、全被子植物種の 10% を占める程に繁栄している。このようにキク科植物が繁栄した理由の一つとして、頭状花序を獲得したことによる生殖戦略の成功があると考えられている。

しかし、キク科植物における頭状花序の形成に関わる遺伝子についての分子生物学的研究は殆どなされていない。頭状花序では花柄が存在しない他、頭花の外側と内側で花の形態が異なることなどから、遺伝子に多数の変異が起こっていると予想される。故に、キク科植物の花序を制御する遺伝子を特定することは、茎や花などの器官分化に関わる因子の特定に貢献すると思われる。そこで、本研究では、キク科植物において、花序の決定に関与する遺伝子(群)を同定し、機能を解析することで、花序の決定メカニズムの全体像を明らかにすることを目的とした。具体的には、cDNA サブトラクト法を用い、花器官特異的に発現している遺伝子の cDNA ライブラリを作製し、キク科植物の頭状花序の決定に関与する遺伝子の単離および機能解析を試みた。この研究自体の意義としては、(1) 植物の発生プログラムのうち、花序の決定メカニズムを明らかにする。(2)(1)の成果を通じて生物進化のより詳細な道筋を理解する。 が挙げられる。そして実用的な意義としては、(3)多様な花を新たに作り出す技術を開発する。 が挙げられる。

2. 材料と方法

本研究では、ブラキカム(*Brachycome angustifolia*)を材料として用いた。まず、ブラキカムの葉と花芽から Poly(A)+RNA を抽出し、花芽の Poly(A)+RNA を SMART 法で 1 本鎖 cDNA に変換した。次にサブトラクト法によりそれぞれの遺伝子を差し引きし、花芽にのみ存在する 1 本鎖 cDNA を抽出した。次に抽出した 1 本鎖 cDNA から 2 本鎖 cDNA を合成し、 λ TriplEx2 ベクターのアームを結合させて cDNA ライブラリを作製した。

次に、Blue/White セレクションおよび PCR によりインサート DNA の挿入が確認されたクローンについて、プラークハイブリダイゼーションによって各遺伝子の発現を確認した。そして、発現を確認したものの中から無作為に 60 クローンを選び、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を用いて、全生物の配列情報データベースに対して BLAST を用いた相同性検索を行った。また、一部クローンについては、ノザンハイブリダイゼーションによって組織別および花器官形成初期過程における発現挙動を解析した。これらの結果を受けて、花序に関与すると推定された 2 クローンについては、RACE 法による全長 cDNA の取得を試みた。

3. 結果と考察

3.1. ブラキカムの花器官特異的 cDNA ライブラリの作製

今回作製したブラキカムの花器官特異的 cDNA ライブラリから、Blue/White セレクションによって 1156 のクローンを得た。さらに、インサートを確認するため各クローンの DNA をテンプレートとした PCR を行い、798 クローンに候補を絞った。インサートサイズは、250 - 4000bp であり、500bp 以上の長鎖 cDNA が 50%以上を占めていた。続いて、花より抽出した Poly(A)+RNA から作製した cDNA プロブをハイブリダイズさせ、各クローンの発現をプラークハイブリダイゼーションによって確認した。PCR によってインサートが確認されないクローンではシグナルが検出されないことから、ベクター配列への非特異的ハイブリダイゼーションは存在しないと判断された。最終的に 234 個のクローンについて花器官での発現が確認された。

これらのクローンでは、異なる強度のシグナルが得られており、それぞれのクローンの花器官における発現量を反映していると考えられる。続いて、発現量によらず無作為に選抜した 60 クローンについて、インサートの塩基配列を決定した。47 クローンについて、300bp から 800bp の塩基配列が決定された。クローンの重複はほとんど確認されず、46 の独立したクローンが得られた。23 クローンについては、データベースに相同遺伝子が存在しなかった。これらの遺伝子は、ブラキカムに特有の遺伝子をコードしているか、長い 3'-UTR 領域を持つと考えられる。残りの 23 クローンについては相同遺伝子が存在した。その内訳は、遺伝子発現関連遺伝子 5 クローン、シグナル伝達関連遺伝子 2 クローン、代謝関係遺伝子 12 クローン、細胞骨格、クロマチン構造、輸送関係遺伝子および光合成関連遺伝子各 1 クローンであった。この中から、遺伝子発現制御に関わる可能性の高い RNA 会合ドメインなど特定のモチーフを持つものと機能未知の遺伝子から 15 クローンを選抜し、発現解析を行った。

3.2. 発現解析

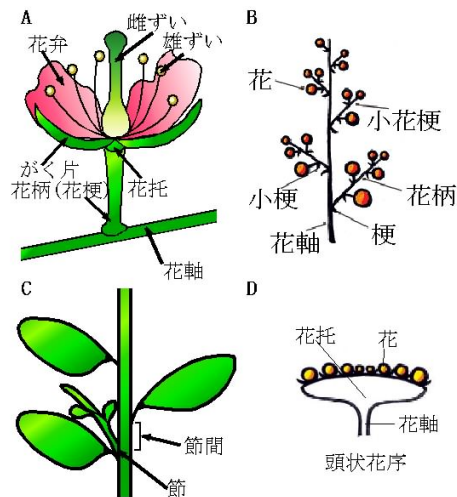
ブラキカムの根、茎、葉、および 3 種の発達ステージ（ステージ 1、5、10）の花からトータル RNA を抽出し、ノザン解析を行った。ステージ 1 は約 0.5mm、5 は 2mm、10 は 3mm の花である。調べた 15 遺伝子全てについて、花器官において転写産物が検出された。11 遺伝子については、花器官以外の組織でも強い発現が見られ、花器官特異的な発現は確認されなかった。一方、W4C9 および W8H2 については、花器官特異的な発現が確認された。W4C9 は、特に成長段階初期のステージ 1 の花において最も高い発現が観察され、花の発達に伴い発現量の低下が見られた。また、葉、茎、根においても低い発現が確認された。W8H2 クローンは、根および葉での発現は殆ど見られず、全てのステージの花において発現が観察された。また、茎での発現も見られ、その発現強度は花より高かった。

cDNA サブトラクト法の目的は、特定組織で特異的に発現している遺伝子群を濃縮した cDNA ライブラリを構築することである。今回作製したサブトラクトライブラリ中には、花特異的に発現する遺伝子が 13% 存在した。

3.3. 花器官特異的な発現を示す遺伝子の全長 cDNA の単離

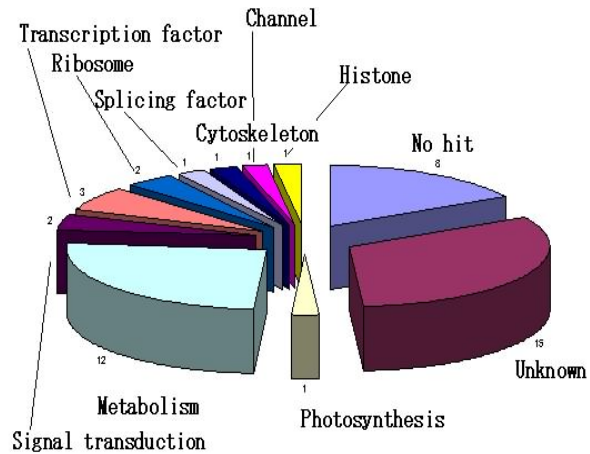
今回の研究では、花特異的な発現を示す遺伝子を 2 クローン（W4C9、W8H2）得ることができた。花序の形態形成に関与する遺伝子は、花成時期に呼応して茎の分化および伸長を制御する因子であると考えられ、花器官で特異的に発現している可能性が高い。これらの遺伝子についての解析をさらに進めるために、RACE 法による全長 cDNA の単離を行った。両遺伝子について、5'-RACE 法による特異的バンドの増幅に成功し、シーケンス解析を行った。W8H2 クローンについては全長 cDNA の単離に成功し、その塩基配列を決定した。W8H2 クローンは、267 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、その配列はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の SWAP domain / G_patch domain タンパク質 (At3g52120.1) と高い相同性を示した。G_patch domain は、転写因子、スプライシングファクター等、多くの RNA 結合能を持つタン

パク質で確認されており、高度に保存された7つのグリシンを持っている。このことから、W8H2クローンはRNAに結合して何らかの制御を行うことで、ブラキカムの花の形態形成に関わっている可能性が考えられる。また、W4C9についても、現在シーケンス解析を進めている。



【図1 花を取り巻く部位の名称】

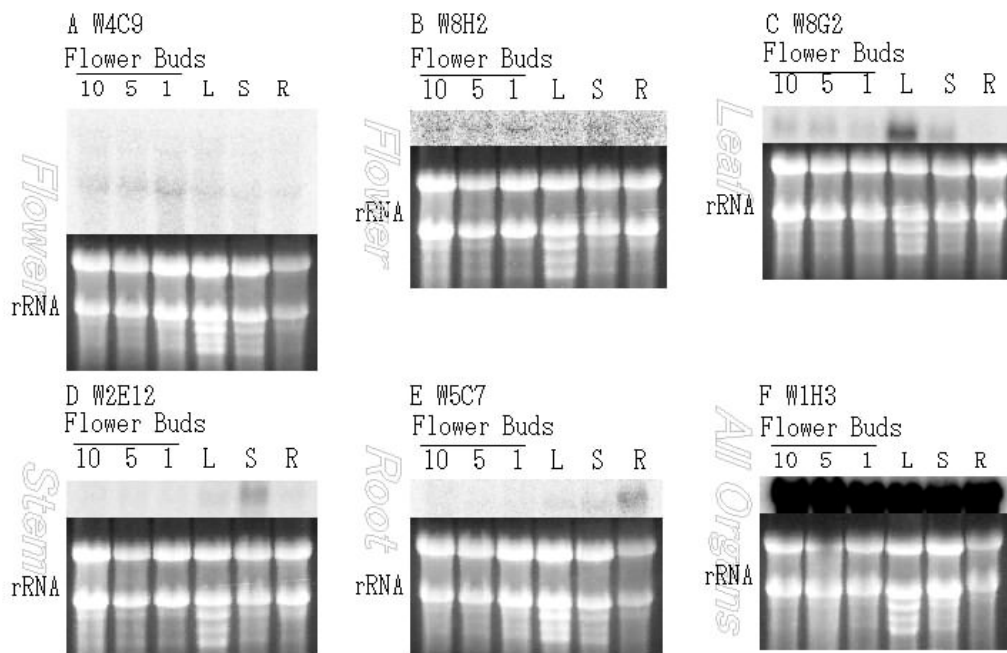
A - C : 植物体の各部位の名称。
 A : 花は花軸から分岐した花柄(花梗)の先につく。
 B : 繖状花序などのように、花が密集して咲く場合、ひとつひとつの小花の花柄は小花柄と呼び、小花を束ねる茎を花柄と呼ぶ。
 D : 頭状花序の模式図。小花が密集して1つの花のように見えており、この花の集団を頭花と呼ぶ。頭状花序には花柄がなく、花軸に直接花がつく。



【図2 BLASTによる相同遺伝子の検索結果】

塩基配列を決定した47クローンについて、BLASTによる相同遺伝子の検索を行った

No hit : 相同遺伝子検出不可
 Unknown : 機能未知
 Photosynthesis : 光合成関連遺伝子
 Metabolism : 代謝
 Signal transduction : シグナル伝達に関与する因子
 Transcription factor : 転写因子
 Ribosome : 40Sリボソーム
 Splicing factor : スプライシングファクター
 Cytoskeleton : 細胞骨格
 Channel : チャンネルタンパク質
 Histone : ヒストン



【図3 ノザン解析結果】

各成長段階の蕾と器官より抽出したTotal RNA 10μgを膜にのせている。プローブは、各クローンのcDNA配列をランダムプライマーで増幅して作製している。

1 : 直径0.5mmの蕾 5 : 直径2mmの蕾 10 : 直径8mmの蕾 L : 葉 S : 茎 R : 根 rRNA : コントロールリボソームRNA
 A-B : 花での高い発現が確認されるもの C : 葉での高い発現が確認されるもの D : 茎での高い発現が確認されるもの
 E : 根での高い発現が確認されるもの F : 各部位全てで発現が確認されるもの