

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成15年度博士課程 進学
氏名 小林 奈通子
指導教員 中西 友子

論文題目

アサガオにおける組織内マグネシウム濃度が関与する花成制御メカニズムについての研究

植物は花成を誘導することにより、栄養成長相から生殖成長相へと移行する。この、花成誘導のメカニズムに関する研究の歴史は古く、花成誘導能を持つ環境刺激や花成に影響する物質などが多様な植物から多数報告されてきた。さらに、シロイヌナズナの花成変異体を用いて、花成誘導を制御する遺伝子が次々と発見されてからは、花成誘導の開始（環境シグナルの受容）から終了（花芽の成熟）までを担う遺伝子ネットワークを解明することに研究の中心が置かれ、その結果、長らく正体不明であった花成ホルモン・フロリゲンに求められる性質を説明する遺伝子、*FT*とそのターゲット遺伝子である *FD* が発見された。一方で、花成に関与が認められる遺伝子は現在でも刻一刻と増え続けており、多数の遺伝子が独特の、しかし部分的には冗長な役割を持ち、互いに影響を及ぼし合うという複雑な遺伝子ネットワークを形成している実態も明らかになってきた。最近では花成誘導の「全体像」の理解を目指し、この遺伝子ネットワークに、古くから研究されてきた物質（ジベレリン、サイトカイニン、ショ糖など）がどのように関係するのかについての研究も活発化している。

アサガオ (*Pharbitis nil*. cv. Violet) は光条件に非常に敏感な短日植物であり、過去の研究から Ca^{2+} の花成誘導への関与が認められている。さらに、申請者の過去の研究から、成長相移行の舞台となる茎頂部における Mg^{2+} 濃度は光条件に応じて増減する現象も確認されている。そこで本研究では茎頂部における花成誘導のメカニズムの一端を明らかにすることを目的し、 Mg^{2+} が花成制御メカニズムに対して果たす役割について追究した。

1. アサガオ茎頂内における Mg^{2+} の分布解析

本研究の実験系において花成がどのようなタイムコースで誘導されるのかを、光受容器官である双葉を切除する時間と花成誘導率の対比から検討した。その結果、本実験系では花成を誘導する 16 時間の暗処理が終了してから 2 時間後には、双葉で産生された花成シグナルが完全に茎頂に到達することが示された。そこで Mg^{2+} の茎頂内における分布解析の対象を、暗処理終了時点（花成誘導率 12%）と終了後 4 時間目（花成誘導率 100%）に定めて実験を行った。

Mg^{2+} の分布解析法としては、蛍光染色法の採用を検討した。しかし、現在使用できる Mg^{2+} 用蛍光試薬は全て Ca^{2+} にも反応し、 Mg^{2+} 特異的な蛍光試薬はない。そこで、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の両方に反応する蛍光試薬と Ca^{2+} 特異的に反応する蛍光試薬を使用し、その染色差を Mg^{2+} 分布として捉える方法を考案・試行した。その結果、葉原基と茎頂先端部に Mg^{2+} が比較的高濃度に局在している可能性が示された。特に、茎頂先端部の中でも中央部の数細胞には強い蛍光が認められ、この細胞群に Mg^{2+} が集積していることが示唆された。さらに、花成誘導が Mg^{2+} 分布に与える影響を調べたところ、16 時間の暗処理終了から 4 時間後の茎頂先端部中央の Mg^{2+} 濃度が、周辺組織よりも低い状態にあることが示唆された。

これらの結果は、茎頂内における花成誘導のプロセスに Mg^{2+} が関与する可能性を示すものであると考えられた。そこで、 Mg^{2+} がどのように花成誘導に関与するのかについて Mg^{2+} の集積する組織の持つ生理学的性質を通して検討するため、アサガオ茎頂内の組織の同定を行うこととした。

2. アサガオ茎頂内で発現する、組織および花成マーカー遺伝子の単離

組織の持つ性質を知るための鍵となるのはマーカー遺伝子であるが、アサガオではそのような遺伝子はほとんど単離されていない。そこで、他植物で報告のあるマーカー遺伝子のオーソログの単離を試みた。その結果、茎頂の成長と機能維持に中心的な役割を果たすとされている *Wuschel* (*WUS*) と *Shootmeristemless* (*STM*) のオーソログ候補遺伝子をディジェネレート法により、さらに、*Clavata1* (*CLV1*)、*Fruitful* (*FUL*)、*Agamous* (*AG*) のオーソログ候補遺伝子を EST ライブラリを利用して単離した。アサガオ幼植物体を双葉、葉柄、茎頂、茎、根に、また、花を萼片、花弁、雄ずい、雌ずいに分けて各部位における全 RNA 1ng 当たりの各遺伝子の RNA 蓄積量を定量的 RT-PCR により測定したところ、*WUS* 様遺伝子は雄ずいに約 500 コピーと最も多く、幼植物体中では双葉・葉柄・茎頂に等しく約 10 コピーが蓄積していた。*STM* 様遺伝子が最も多く蓄積していたのは茎であり約 160 コピー、次いで雌ずいに約 100 コピー、茎頂に約 75 コピーが蓄積していた。*CLV1* 様遺伝子は茎と根に約 1.3 コピーずつ、茎頂には約 0.4 コピーが蓄積し、花では蓄積していなかった。また、*FUL* 様遺伝子は萼片に約 2100 コピー、花弁に約 650 コ

ピー蓄積し、雌ずいにも約 230 コピーの蓄積が見られ、幼植物体では茎頂、茎および根にわずかに蓄積していた。*AG* 様遺伝子は雌ずいと雄ずいでのみ蓄積しており、それぞれ約 8800 コピーと約 7500 コピーであった。これらの発現/蓄積様態および ORF から予想されるアミノ酸配列の解析結果から、単離した *WUS* 様遺伝子、*STM* 様遺伝子、*FUL* 様遺伝子はアサガオにおける各遺伝子のオーソログと判断した。また、*AG* 様遺伝子は Nitasaka が発表した遺伝子 *Duplicated (DP)* と同一のものであった。*CLV1* 様遺伝子は、アミノ酸配列はシロイヌナズナ *CLV1* に 75% の相同性を示したが、発現様態が *CLV1* とは異なっていたため、本実験からは同定に至らなかった。

3. 遺伝子の発現と安定性に花成誘導が及ぼす影響の解析

単離した遺伝子のうち、茎頂の有効な組織マーカーとなり、なおかつ花成誘導への関与について近年特に注目を集めている *WUS* (*PnWUS1*, EU672818)、*STM* (*PnSTM1*, EU672819)、*FUL* (*PnFUL1*, EU672820) の茎頂内における発現組織を *in situ* hybridization (ISH) 法により解析した。その結果、*PnWUS1* は茎頂先端部中央の表皮 (L1 層) から数えて 5~6 層目に位置する数個の細胞群で発現していた。*PnSTM1* は茎頂先端部の 2~4 層目に広く帯状の発現が認められた。また、*PnFUL1* は花成誘導後 2 日目の茎頂を用いて ISH を行い、茎頂先端部の 1~4 層目と腋芽の先端部に発現していることが示された。これらの結果から、第 1 章で観察された、 Mg^{2+} が高濃度に局在する組織は未分化 (茎頂メリステム) であり、花成誘導後 2 日目には花器官を形成する組織へと分化する細胞群であることが確認された。

次に、花成誘導時の *PnWUS1*、*PnSTM1*、*PnFUL1*、*AG/DP*、および最近遺伝子データベースに登録された *Apetala1* オーソログ遺伝子 (*PnAPI*) の茎頂における RNA 蓄積量を、定量的 RT-PCR を用いて経時的に分析した。シロイヌナズナをモデルにした花成初期についての研究結果によると、*WUS* は花成誘導後 *AG* の発現を誘導し、さらに *AG* によって転写が抑制される。*FUL* は花成マーカーとしては誘導後最初に転写量が上昇する遺伝子の 1 つであり、*API* は花原基を決定付ける遺伝子である。したがって、これらの性質がアサガオにも共通すると仮定すれば、遺伝子の発現/蓄積状態と Mg^{2+} 局在の変化の時間帯を対応させることで、 Mg^{2+} の果たす役割を推測することができると考えたためである。

分析の結果、*PnFUL1* は早くも 16 時間の暗処理終了時点で対照区の約 18 倍の蓄積が見られ、その後 4 時間で約 65 倍へと上昇していったが、*PnAPI* の発現は暗処理終了から 8 時間後に見られた。これは、アサガオ茎頂先端部は花成誘導後 4 時間目には未分化の状態から花器官の形成へと組織の性質を変化させつつあるが、成長相は完全には移行していない、過渡期にあることを示すものと考えられた。一方、*PnWUS1*、*PnSTM1*、*AG/DP* の、暗処理終了後 48 時間以内の蓄積量には大きな変化はなかった。

PnWUS1 と *PnSTM1* が発現する茎頂メリステムにおいて Mg^{2+} 濃度が変化することか

ら、花成誘導に伴う Mg^{2+} の濃度変化は、メリステムにおいて生成されるタンパク質の量やその活性、あるいは mRNA の安定性などに影響を及ぼす可能性を想起した。特に、植物細胞内 mRNA の安定性の調節は遺伝子制御機構の大きな柱である上、近年の研究により、 Mg^{2+} が直接的に影響することが示されている。さらに、*WUS* タンパク質については以前から、環境シグナルに迅速に対応するために、生成・分解のサイクル、つまり半減期が短いと言われている。そこで、 Mg^{2+} 濃度が関わる具体的な生理活動として mRNA の安定性の調節という可能性について *PnWUS1* と *PnSTM1* をモデルに検討を行うこととし、両遺伝子の mRNA の半減期を *in vivo* で測定した。

花成誘導処理後 4 時間目および対照区の茎頂を mRNA 合成阻害剤処理し、各遺伝子の RNA 蓄積量の減少量を定量的 RT-PCR で測定したところ、*PnWUS1* mRNA の半減期は対照区において約 13 時間と算出された。それに対し、花成が誘導された茎頂における *PnWUS1* mRNA の半減期は約 2.5 時間と算出され、*PnWUS1* mRNA は花成誘導によって安定性が 1/5 に低下していることが判明した。*PnSTM1* mRNA の対照区における半減期は約 11 時間であったが、花成を誘導すると 1/3 の約 4 時間へと短縮した。このような mRNA の安定性の低下に Mg^{2+} が直接関与しているかについては *in vitro* の測定系による検証が必要であるが、*in vivo* で mRNA の半減期が遺伝子特異的に変化することを確認した本実験結果は、花成誘導期の複雑な遺伝子ネットワークの制御機構に、新しく mRNA の安定性の関与を提起するものである。

本研究は、花成誘導への関与が示唆されていた Mg^{2+} が具体的に果たす役割を、茎頂内局在の解析と、マーカー遺伝子の発現/蓄積量との相関から追究したものである。研究の中で、茎頂の機能解析に重要な *WUS* と *STM* オーソログの単離に成功し、さらに、両遺伝子が花成誘導初期に mRNA の安定性を変化させていることを示した。今後、両遺伝子の機能がさらに解明されれば、mRNA 安定性の変化という現象が持つ意味についても判明すると考えられる。また、 Mg^{2+} の果たす役割についても、細胞内 Mg^{2+} 濃度の変動量を定量し、各 mRNA の半減期に対する Mg^{2+} 濃度の影響を *in vitro* 測定系にて詳細に解析することで、より具体的に把握することができると期待される。

発表論文

Natsuko I. Kobayashi, Keitaro Tanoi, Tomoko M. Nakanishi (2007) *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry*, 271(2), pp329-332

Natsuko I. Kobayashi, Keitaro Tanoi, Tomoko M. Nakanishi (2006) *Canadian Journal of Botany*, 84(12), pp1908-1916