

アサガオ花成ホルモン遺伝子 *PnFT1* の発現制御機構の解析

高橋 果歩 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は自身が成長する栄養成長から子孫を残す生殖成長へと移行する。この成長相の移行を花成と呼ぶ。花成は様々な内生、外生の環境刺激からの複雑なシグナル伝達経路を経て制御されている。花成を誘導する外的環境要因の一つとして光周期(日長)があり、光周期により制御される花成を光周性花成と呼ぶ。今日、光周性花成が最も明らかとなっているのはシロイヌナズナであるが、条件的長日植物として知られている。本研究で用いたアサガオ (*Pharbitis nil*) は、1回の12時間以上の暗期を与えることで花成を誘導し、適さない光周期では花成を誘導しない絶対的短日植物として知られている。この特性から光周性花成研究において有用な植物である。

シロイヌナズナにおける光周性花成では葉で光周期を感受し、花成促進因子である *GIGANTIA (Gd)*、*CONSTANS (CO)* が順に発現し、花成ホルモン遺伝子である *FLOWERING LOCUS T (FT)* の発現が促進される。*FT* は葉において篩部維管束鞘に特異的に発現し、生じた *FT* タンパク質が篩管を通り茎頂へ移動し、花芽形成遺伝子の転写因子 *FLOWERING LOCUS D (FD)* を活性化することで花成を引き起こす。*FT* は光周期以外にも様々な要因により発現するため、花成のシグナル伝達経路における統合遺伝子としても機能する。*FT* プロモーターは花成の決定機構の最重要ポイントとなっている。

シロイヌナズナ *FT* プロモーターと直接相互作用する転写抑制因子 *TARGET OF EAT1 (TOE1)*、*CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1)* のアサガオ相同遺伝子 *PnTOE1*、*PnCDF1* は、花成を促進する日長条件で発現が上昇することから花成促進因子として機能すると考えられている。またシロイヌナズナ *TOE1* mRNA は成長相の移行において発現する microRNA172 (*miR172*) の標的部位を持ち、*miR172* により分解が誘発された結果、花成が促進される。*miR172* は植物において保存性が高く、アサガオにおいても *miR172* は *PnTOE1* mRNA の分解を誘発すると考えられる。

本研究ではアサガオ花成ホルモン遺伝子 *PnFT1* の発現制御機構の解析を目的とし、発現領域および発現制御因子を調べるための一連の実験を行った。

【材料】

(1) アサガオ *PnFT1* プロモーター塩基配列の解析

日本の在来品種の中から光周性の実験系統として選ばれたムラサキ (Violet) とメキシコ原産の野生系統である Y031。さらに、アメリカ原産で早咲きを示す近縁種、アメリカアサガオの帰化系統 Q65 (*Ipomoea hederacea*) を用いた。

(2) *PnFT1 pro:: GUS-GFP* 形質転換体の GFP 蛍光と GUS 染色の観察

Violet の *PnFT1* プロモーターにレポーター遺伝子である *GUS* (β -glucuronidase) に *GFP* (Green Fluorescent Protein) を付加した形質転換体 (*PnFT1 pro:: GUS-GFP*) を用いた。この形質転換体は *PnFT1* の発現領域を GUS 染色および GFP 蛍光観察で確認することが出来る。

(3) *PnCDF1-RNAi* 形質転換体における花芽形成数調査

Violet の *CDF1* 発現抑制の形質転換体 (*PnCDF1-RNAi*) を用いた。

(4) *PnTOE1* 形質転換体の作製

Violet の不定胚を用いて形質転換体の作製を行った。

【方法・結果】

(1) アサガオ *PnFT1* プロモーター塩基配列の解析

Violet の *PnFT1* プライマーより、Violet、Y031、Q65 のゲノム DNA を用いて PCR 増幅し、増幅した DNA 断片のシーケンスを行い、比較した。

シーケンスの結果、3 系統の *PnFT1* プロモーター塩基配列は全域で相同性が高かった。しかし、Violet において CA 繰り返し配列の数が多く、Y031 において TA 繰り返し配列の数が多くなるなどの違いが見られた。

また、3 系統に 16 時間の暗期処理を 1 回を行い、*PnFT1* の発現リズムを調べる RT-PCR を行うと共に花芽形成数の調査を行った。

(2) *PnFT1 pro:: GUS-GFP* 形質転換体の GFP 蛍光と GUS 染色の観察

PnFT1 pro:: GUS-GFP 形質転換体に 16 時間の暗期処理を 3 回を行い、*PnFT1* の発現を誘導した。GFP 蛍光観察では、子葉の葉脈、葉柄の維管束において蛍光が観察された。GUS 染色では子葉全体が青く染まると共に葉脈、葉柄の維管束で強く染色が観察された。

(3) *PnCDF1-RNAi* 形質転換体における花芽形成数調査

PnCDF1-RNAi 形質転換体と非形質転換体 (Violet) に 12 時間の暗期処理を 1 回を行い、花芽形成数の調査を行った。

(4) *PnTOE1* 形質転換体の作製

miR172 の *PnTOE1* 結合領域の塩基配列に変異を導入したプライマーを用いて PCR を行い、*miR172* 分解耐性を持つ *PnTOE1* の cDNA をクローニングした。また *PnTOE1* の相互作用遺伝子領域を調べるために、免疫沈降に用いるタグ 3×FLAG を *PnTOE1* に付加した cDNA もクローニングした。これらをアグロバクテリウムに導入し、Violet の不定胚に感染させた。

【今後の展望】

(1) アサガオ *PnFT1* プロモーター塩基配列の解析

PnFT1 プロモーター塩基配列の解析から 3 系統における花芽形成数、開花時期などの関係を調べる。

(2) *PnFT1 pro:: GUS-GFP* の GFP 蛍光と GUS 染色の観察

引き続き GFP 蛍光と GUS 染色の観察を行う。

(3) *PnCDF1-RNAi* 形質転換体における花芽形成数調査

引き続き実験を行うと共に、RT-PCR を行い *PnCDF1* の発現を調べる。

(4) *PnTOE1* 形質転換体の作製

引き続き形質転換体の獲得のため、感染および培養を進める。

【謝辞】

本研究を行うにあたりまして終始ご指導頂きました、本大学院生命環境科学研究科の鎌田博教授、小野道之准教授、小野公代博士、研究室の皆様へ深く感謝の意を表します。