

アサガオにおける光周性花成誘導の分子基盤に関する研究

山本 高広 (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】

植物は適切な時期や条件を満たすと栄養成長から生殖成長へ移行し、子孫繁栄のために花を形成する。この成長相の移行を花成と呼び、日長の変化の感知による花成の誘導を特に、光周性花成誘導と呼ぶ。

本研究では、絶対的短日植物であるアサガオ(*Pharbitis nil*)を研究材料として主に用いた。植物学の研究で広く用いられるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は条件的長日植物であり、光以外の要因も花成に影響しやすい。これに対してアサガオは、長日条件ではほぼ花成を行わず、1回の短日処理によって花成が誘導できることから、光周性花成誘導の解析により適している。本研究では、アサガオの分子基盤を司ると予想される遺伝子について解析し、光周性花成誘導の基本的な理解と新たな知見を得ることを目的とし、(1)概日時計の主要因子である *PnLHY* 及び *PnTOC1* の逆遺伝学的な機能検証、(2)花成の中心的制御因子である *PnCO* の野生種及び近縁種における差異の解析、(3) *PnCO* の分解を行うと予想される *PnCOPI* の機能検証のためのシロイヌナズナ変異体の相補性試験、についての解析を試みた。

(1)光周性花成を行う植物は、概日時計を制御する因子による内生の時間情報と外界からの光の有無の情報を組み合わせ、適切な時期での花成誘導を行う。シロイヌナズナでは朝方遺伝子 *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* と、夕方遺伝子 *TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1)* が、遺伝子発現のネガティブフィードバックループを形成し、一日の周期を刻む概日時計の中心とされている。本研究では、これらの相同遺伝子である *PnLHY* 及び *PnTOC1* について過剰発現体(over-expression: OX)と抑制体(RNAi)の形質転換体を作製し、時計の振動を止めた場合に、花芽形成数や花成制御遺伝子の周期的転写発現の変化を調べることで、1回の短日処理による花成誘導がどのような影響を受けるかについて解析することを目的とする。

(2)*CONSTANS (CO)* は、概日時計から花成制御経路へ情報を出力する主要な因子であり、花成ホルモン遺伝子 *FLOWERING LOCUS T (FT)* の発現を制御する。本研究では、*PnCO* 遺伝子の塩基配列や転写発現のパターンの違いと、1回の短日処理による花芽形成数の違いなどを野生種と近縁種を用いて比較解析することを目的とする。

(3)*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1 (COPI)* は、E3 ユビキチンリガーゼとして CO タンパク質を分解することで *FT* の発現を調節する。COPI は、光シグナル伝達においても中心的な抑制の調節因子であり、胚軸伸長などの適切な光形態形成に重要な因子となっている。本研究では、*PnCOPI* cDNA を用いたシロイヌナズナの *cop1-4* 変異体の相補性試験を行い、*PnCOPI* の機能を明らかにすることを目的とする。

【材料・方法】

材料:

アサガオ品種ムラサキ(cv. Violet) 及びメキシコ野生種 Y031、近縁種 Q65(*Ipomoea hederacea*)。シロイヌナズナ野生型(WT: ecotype Columbia)及び *cop1-4* 変異体、*cop1-4* に *PnCOPI*-OX を導入した形質転換体 (近藤 2012)。

方法:

(1)*PnLHY*-OX、*PnLHY*-RNAi、*PnTOC1*-OX、*PnTOC1*-RNAi のコンストラクトを作製した。塩基配列を確認の後、これらのコンストラクトをアグロバクテリウムを用いてアサガオ未熟胚へ遺伝子導入を行った。その後、選抜培地上で不定胚の誘導、選抜、培養を行った。

(2)Violet、Y031、Q65 のゲノム DNA を鋳型として用いて *CO* 遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を比較した。また、3系統の芽生えに1回の16時間暗期を1回与え、*PnCO* の発現リズムを調べる RT-PCR を行うとともに花芽形成数の調査を行った。

(3)先行研究で得られた種子を用いて、選抜培地上で相補体の選抜を行い、*PnCOPI* が相補したと思われるホモラインを得た。この相補体のホモライン、WT、*cop1-4* 変異体を用いて、7日間暗所に置き、胚軸伸長を測定した。その後、3日間明所に置き、緑化を観察した。相補体での *PnCOPI* の発現量を確認するために RT-PCR による発現解析を行った。さらに、相補体ホモライン、WT、*cop1-4* 変異体を用いて、花成時期を調査した。

【結果・考察・今後の展望】

(1)コンストラクトを作製し、塩基配列を確認した。コンストラクトをアグロバクテリウムを用いてアサガオ未熟胚へ遺伝子導入を行った。選抜培地上で不定胚を誘導し、選抜培養中である。得られた形質転換植物体を用いて1回の短日処理による花芽形成数の調査や RT-PCR による各種遺伝子の発現解析を行う計画である。そして、これらの遺伝子の機能解明とアサガオにおける短日性花成の概日時計の様式について解析する計画である。

(2)Violet、Y031、Q65 について *PnCO* の塩基配列を確認した結果、その相同性は3系統間で高かった。1回の16時間暗期処理後の *PnCO* の RT-PCR による発現解析及び花芽形成数の調査を行う計画である。

(3)暗所発芽実験を行った結果、相補体が WT と同様の胚軸伸長や緑化反応を示すことがわかった。このことから光形態形成において *PnCOPI* は *COPI* と同等の機能を持つことが確認された。RT-PCR による *PnCOPI* の発現量解析の結果と、花成時期との関連を解析する計画である。

【謝辞】

シロイヌナズナ *cop1-4* 変異体を分譲いただきました京都大学の拓殖知彦准教授に御礼申し上げます。本研究を行うにあたり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、研究室の方々に深く感謝の意を表します。