

## アサガオの花成誘導機構における microRNA 標的遺伝子の機能解析

鷲塚 滯 (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、自身の生育段階や外部環境を把握し、適切な時期に花成を誘導する。その制御には様々な外的・内的要因が関係しており、光周性を示す植物は、日長の変動(光周期)を感知して生殖段階に移行する。本研究では絶対的短日植物であるアサガオ (*Pharbitis nil* 又は *Ipomoea nil*) を用いて、microRNA (miRNA) 標的遺伝子が花成に与える影響について注目した。

miRNA は 20 塩基ほどの 1 本鎖 RNA であり、標的遺伝子の mRNA の不安定化や分解を誘導する因子である。miRNA157 の標的配列を保持する *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* は、*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN (SBP)*-BOX を DNA 結合ドメインとして持つ、植物特有の転写因子をコードする遺伝子である。長日植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、花成ホルモン *FLOWERING LOCUS T (FT)* と *FLOWERING LOCUS D (FD)* の複合体が *APETALA1 (AP1)*, *FRUITFULL (FUD)* などの花器官形成を制御する MADS-box 遺伝子の発現を誘導し、花成を促進する。そして *SPL* も MADS-box 遺伝子の発現制御に関わることが知られている。

本研究では、アサガオの *SPL* 遺伝子の発現パターンの解析と、miRNA 耐性にした *PnSPL* cDNA (*rPnSPL1a*, *rPnSPL2a*) を用いた過剰発現体の解析により、アサガオの花成誘導機構における miRNA と *SPL* 遺伝子の役割の解明を目的とする。

## 【材料】

アサガオ品種 Violet の非形質転換体と *rPnSPL1* と *rPnSPL2* の cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで過剰発現した形質転換系統 (*rPnSPL1a*-OX, *rPnSPL2a*-OX) を用いた。

```

PnSPL1a 5' - ATGCTCTCTATCTTCTGTCAA -3'
miR157 3' - CACGAGAGATAGAAGACAGTT -5'
rPnSPL1a 5' - GCGCCTTAAGCTTGTTAAGCA -3'
miR157 3' - CACGAGAGATAGAAGACAGTT -5'

PnSPL2a 5' - CGTGTCTCTCTCTTCTGTCAAAC -3'
miR157 3' --CACGAGAGATAGAAGACAGTT---5'
rPnSPL2a 5' - CGAGCCTTAAGCTTGTTAAGCAAC -3'
miR157 3' --CACGAGAGATAGAAGACAGTT---5'

```

図1 *PnSPL1*, *PnSPL2* 遺伝子の miR157 標的配列と同義置換後の配列 (先頭の r は miRNA 耐性 (resistant) の意味。\* は塩基の対合部分を示す。)

## 【方法】

1. *PnSPL* 遺伝子の発現パターンの調査

非形質転換体の Violet を用いて、16 時間連続暗期 (強い短日条件) を与えた芽生えと連続明期 (長日条件) を与えた芽生えの頂芽における *PnSPL* 遺伝子の発現パターンを、SYBR® *Premix Ex Taq*™ II を用いた qRT-PCR

により解析した。頂芽は、暗期開始直後から 4 時間おきに 2 日間サンプリングされたものを使用した。

## 2. 過剰発現体の花成調査

発芽後 7 日目の芽生えに 12 時間連続暗期 (弱い短日条件) を与え、約 1 か月間恒明条件で栽培後、花成を調査した。各個体の花芽の個数と、系統ごとのターミナルフラワー (茎の先端に形成される花芽) 形成率を比較することで評価した。

## 3. 過剰発現体を用いた花成関連遺伝子の発現解析

1. と同様に、発芽後 7 日目の芽生えに 12 時間連続暗期を与えた。その後、12 時間の暗期終了時に子葉を、暗期開始後 24 時間後に頂芽をサンプリングした。子葉は mRNA のみを、頂芽は miRNA を含む total RNA を抽出し cDNA を合成した。miRNA に対しては TaqMan® MicroRNA Assays を、mRNA に対しては SYBR® *Premix Ex Taq*™ II を使用して qRT-PCR を行った。miRNA は miR157 を解析し、mRNA は *PnSPL* 遺伝子及び、花成関連の遺伝子を解析した。

## 【結果】

1. *PnSPL* 遺伝子の発現パターンの調査

*PnSPL1* の発現量は、暗期開始 12~16 時間後に一過性のピークを示す傾向にあった。*PnSPL2* は、暗期を与えたことによる発現量の変化は観察されなかった。

## 2. 過剰発現体の花成調査

*rPnSPL1a*-OX は、花芽形成数、ターミナルフラワー形成率が増加した。一方、*rPnSPL2a*-OX は花芽数が増加しターミナルフラワーを形成する系統 (#3, #8) とやや花芽数が減少する系統 (#11), 花芽の形成されない系統 (#12) が観察された。

3. 過剰発現体を用いた花成関連遺伝子の発現解析  
現在解析中

## 【考察・展望】

花成調査の結果より、*PnSPL1a* は花成を促進する因子であることが示唆された。qRT-PCR 解析では *PnFT1* の発現量に変化が見られないため、*PnFT1* の発現を直接促進する因子である可能性は低いと考えられる。一方、*PnSPL2a* は系統により花成に差が見られた。この原因を探るため、引き続き qRT-PCR による *rPnSPL2a*-OX の発現解析を行う。

## 【謝辞】

形質転換アサガオの種子を提供してくださった、農研機構・野菜・花き研究部門の渋谷健市博士に、御礼を申し上げます。