

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

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻

放射線植物生理学研究室

小林 奈通子

平成20年度（2008年度）

指導教員 中西 友子

目次

| | |
|---|-----|
| 序章..... | 2 |
| 第 1 章 染色法を用いたアサガオ茎頂内 Mg^{2+} の局在解析..... | 7 |
| 1-1 緒言..... | 7 |
| 1-2 実験方法..... | 9 |
| 1-3 結果および考察..... | 11 |
| 第 2 章 茎頂組織および花成のマーカ-遺伝子の単離..... | 24 |
| 2-1 緒言..... | 24 |
| 2-2 実験方法..... | 26 |
| 2-3 結果および考察..... | 36 |
| 第 3 章 花成誘導初期の茎頂で発現する遺伝子の解析..... | 54 |
| 第 1 節 茎頂の組織分類と花成誘導プロセスの同定..... | 54 |
| 3-1-1 緒言..... | 54 |
| 3-1-2 実験方法..... | 56 |
| 3-1-3 結果および考察..... | 63 |
| 第 2 節 花成誘導が <i>PnWUS1</i> と <i>PnSTM1</i> mRNA の半減期に及ぼす影響 ... | 74 |
| 3-2-1 緒言..... | 74 |
| 3-2-2 実験方法..... | 77 |
| 3-2-3 結果および考察..... | 79 |
| 終章 総合考察..... | 84 |
| 付録..... | 96 |
| 引用文献..... | 103 |
| 論文の内容の要旨..... | 115 |
| 謝辞..... | 120 |

序章

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。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。花成誘導の中でも、光条件の変化によって誘導される花成は光周性花成と称され、季節変動に適応し最適な時期に花をつけるために植物が獲得したメカニズムであると考えられている (Thomas and Vince-Prue 1997, 瀧本 1998)。

光周性花成の進行過程は、大きく 3 つの段階から構成される。第 1 段階は、光条件の変化が葉によって検知され、生物時計を介して花成シグナル物質の産生を促す段階である。これまでの研究により、光条件を検知する物質が赤色光受容体 = **Phytochrome** であることや (Borthwick and Hendricks 1960, Borthwick 1964)、光周性花成における生物時計の出力系に位置する遺伝子は *GI* (*GIGANTEA*) の下流で働く *CO* (*CONSTANS*) であることが示されている (Simon et al. 1996)。

第 2 段階は、花成シグナル物質が葉で産生され、その後、茎頂へと移行し、茎頂において成長相の転換を促す段階である。Chailakhyan M. Kh.によってフロリゲンと名づけられた花成シグナル物質は葉から篩管を通して芽へと移動すると推察されたため、花成誘導後の篩管液成分や、花成を誘導することのできる物質、あるいは花成を阻害する物質について、多くの植物種を対象に研究されてきた (Zeevaart 1976)。その後、長日植物であるシロイヌナズナの花成変異体を用い、花成誘導を

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、花成関連遺伝子が次々と発見されるようになった。その結果、2004～2005 年にかけて、フロリゲンに求められる性質を説明しうる遺伝子 *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) と、そのターゲット遺伝子である *FD* が発見されるに至った。*FT* は葉の篩管伴細胞において *CO* によって直接的に転写が促進され、*FT* タンパク質が篩管を經由して茎頂に達する性質を持つ (Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005)。

第 3 段階は、花成シグナル物質を受容した茎頂において成長相が生殖成長相へと移行し、花の形態形成が行われる段階である。現在では、篩管を經由して茎頂に達した *FT* タンパク質が、栄養成長期からすでに茎頂に蓄積を開始していた *FD* タンパク質と複合体を形成し、*API* (*APETALA 1*) の発現を誘導することが、この段階の中心軸になっていると考えられている。しかし、*FD* の発現組織と *API* の発現組織が一致しないことや、*FT* の茎頂への到達と *API* の発現開始との間には時間的なギャップが見られることなど、未だに解明されていない事象が多く認められている (Searle et al. 2006, Kobayashi and Weigel 2007)。また、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。例えば、ショ糖は最も古くから花成促進効果が指摘されてきた物質の一つであるが (Bernier et al. 1993, Corbesier et al. 1998)、ショ糖の添加がど

の遺伝子の発現に影響するのかを明らかにするため、花成関連遺伝子に変異を持つシロイヌナズナに対するショ糖添加の効果が網羅的に調査されている (Roldan et al. 1999, Ohto et al. 2001)。また、このような研究例は、*CO-FT-FD-API* という遺伝子軸の発見 (Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005) によって花成誘導の実態が遺伝子の連続的な制御によって説明されることが明示された近年においては、遺伝子以外の物質が花成誘導に与える効果を解析する、あるいは花成誘導プロセスの中に具体的に位置付けるために、それらの物質がどの花成関連遺伝子に影響を及ぼすのかを示すことが求められるようになってきていることを示している。

本研究では、光周性花成の第3段階に注目し、アサガオ (*Pharbitis nil*. cv. Violet) を供試植物として花成制御メカニズムの解明を目指した。アサガオは光条件に非常に敏感な短日植物であり、連続明期下で育成した幼植物体を双葉展開時に 16 時間の連続暗期下に置くことで花成を誘導することができる (Fig 0-1)。つまりアサガオには、花成誘導の進行度合が揃ったサンプル植物を比較的容易に準備できるという利点がある。この利点を生かして行なわれた研究により、 Ca^{2+} の花成誘導への関与が認められている他 (Friedman et al. 1989)、花成誘導後の茎頂に見られる生理学的・形態学的変化についても報告されてきた (Bernier 1971)。また、本研究に先立ち、アサガオ幼植物体中の無機元素濃度と光条件の関係を経時的に解析した結果、茎頂における Ca と Mg 濃度が光条件に応じた変動を示すことが見出された (Ikeue et al. 2001)。一方、アサガオにおける花成関連遺伝子の研究はシロイヌナズナなどに比べて大きく遅れているのが現状である。その大きな理由は、アサガオでは最近になるまで遺伝子組換えの技術が確立していなかったことや、花成誘導に

関する変異体についてほとんど報告がないことが挙げられる。しかしながら、シロイヌナズナやイネを始めとするモデル植物で得られた遺伝子情報の保存性・汎用性を他の植物で検証した多くの実験は、遺伝子の塩基配列と発現様態が同一であれば、それは多くの場合、機能的にも同一のオーソログ遺伝子と考えられることを示している。そのため、アサガオにおいても最近では遺伝子に注目した研究も盛んに行なわれており、例えば Liu らによってシロイヌナズナの *CO* オーソログ遺伝子が発見され、*PnCO* と名付けられた。*CO* はシロイヌナズナの花成において必須の遺伝子であるが、*PnCO* をシロイヌナズナの *co-1* 変異株に導入したところ、長日条件下でも短日条件下でも花成促進効果が認められた。(Liu et al. 2001)。また、Parfitt らは他植物の遺伝子情報を基に複数の花成遺伝子を単離し、その経時的な発現様式と培地中のショ糖、あるいはブドウ糖の関係を調べている (Parfitt et al. 2004)。

そこで本研究では、光応答性が見られた *Mg* の花成誘導への関与について、*Mg* の作用する花成関連遺伝子あるいは花成誘導プロセスを特定することによって追究することを目指し、実験を行なった。なお、本論文中、植物の進化に関わる事柄については APG II (Angiosperm Phylogeny Group II 2003) による植物分類体系に基づいて記載・言及した。



Figure 0-1. 実験に用いたアサガオ。

左；双葉が完全に展開し、花成の誘導が可能となった幼植物体の全体像。

中；短日処理による花成誘導後約 2 週間後の地上部。頂芽が花芽に変化していることが確認できる（水色矢印）。

右；花芽（黄色矢印）となった頂芽の拡大図。

第 1 章 染色法を用いたアサガオ茎頂内 Mg^{2+} の局在解析

1-1 緒言

花成誘導期に FT タンパクを主とした花成シグナルを受容した茎頂では、MADS-box を持つ遺伝子群を中心とした花成関連遺伝子の発現を促進/制御することで花を形作る。この、連鎖的な遺伝子の制御メカニズムは FT と FD の同定 (Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005) 後、多くの研究者によって急速に解析が進められており、近年多数の総説が発表されている (Corbesier and Coupland 2005, Sablowski 2007, Kobayashi and Weigel 2007)。一方、花成誘導期の茎頂では遺伝子の発現様式の他にも栄養成長期とは異なる現象が報告されている。長日植物のシロガラシにおいては花成誘導に伴い、プラスモデスマータ数の増加 (Ormenese et al. 2000) および中央帯のシンプラスト領域の拡大 (Ormenese et al. 2002) が見られ、ショ糖の濃度が上昇する (Bodson and Outlaw 1985, Lejeune et al. 1993)。植物ホルモンのジベレリンとサイトカイニンも花成制御メカニズムに関与すると考えられており、シロイヌナズナの茎頂内サイトカイニン量は花成誘導期に上昇する (Corbesier et al. 2003)。また、シロイヌナズナとシロガラシでは、茎頂内の C/N 比が上昇することが認められている (Corbesier et al. 2002)。このように、茎頂における花成制御メカニズムは、遺伝子の連鎖的な発現制御を軸に多様な要素が関与する複合的な生理現象と考えられる。

本研究に先立ち、複数の無機元素濃度の日内変動についてアサガオの組織別に

解析した結果、茎頂における Mg^{2+} 濃度に光応答性が認められた (Ikeue et al. 2001, Kobayashi et al. 2007)。そこで本章では、アサガオの茎頂における光周性花成誘導のメカニズムに Mg^{2+} が関与する可能性について検討するため、まず、 Mg^{2+} の茎頂内における分布を明らかにすることを旨とした。

手法としては蛍光プローブを用いた染色法の適用を検討した。染色法を用いて無機元素の植物組織内分布を解析した報告は多く、花成誘導期を対象とした研究においても、アカザの茎頂内 Ca^{2+} の分布を解析し、花成誘導と Ca^{2+} の分布の関係を論じた報告もある (Albrechtova et al. 2003)。

一方で、現在のところ Mg^{2+} に反応する試薬の多くは同時に Ca^{2+} にも反応し、 Mg^{2+} のみに特異的に反応する染色試薬はない。そこで本研究では、 Ca^{2+} 特異的な染色試薬と、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の両方に反応する染色試薬を併用し、両試薬による染色差を Mg^{2+} の分布として捉えるという手法を独自に考案・試行した。

本研究では、発根から3日目の、双葉が十分に展開したアサガオ幼植物体を16時間暗処理することで花成を誘導した。アサガオ幼植物体の地上部は双葉、茎、新芽（第一本葉、茎頂を含む）のみの単純な構造であり、双葉で生成した花成シグナル物質が茎頂へと移行する時間帯は、双葉の切除時間とその後の花成率の関係から知ることができる。そのため、花成誘導処理直後の花成制御メカニズムについて、解析すべき時間と器官を容易に絞ることができるという利点がある (Bernier 1971)。本章ではまず、花成シグナル物質が茎頂に到達し、茎頂における成長のプログラムが栄養成長へと切り替わる時間帯を特定した。そして、その時間帯における Mg^{2+} 分布を独自の手法で解析し、 Mg^{2+} が花成制御メカニズムに関与する可能性について

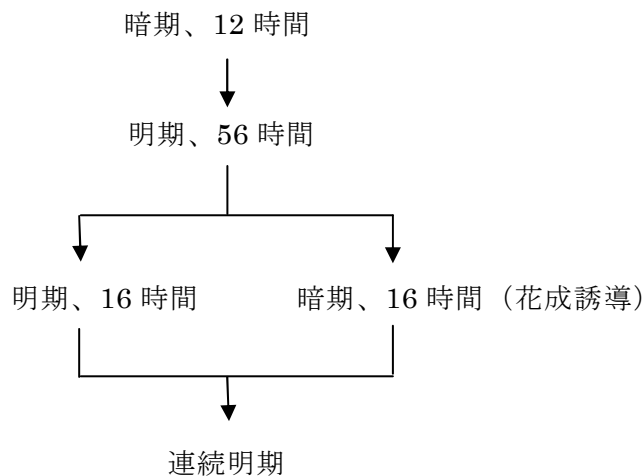
検討した。

1-2 実験方法

植物の育成

アサガオ (*Pharbitis nil*(L) cv. Violet) の種子は丸種株式会社より購入した。種子を蒸留水で湿らせたペーパータオルに挟むように播種して 27℃の暗所に 48 時間静置し、発根させた。発根した幼植物は、茎の下部をスポンジで固定して水耕液 (Table 1-1) に根を浸し、植物育成器内で水耕栽培を行った。

植物育成器の設定は以下の通りである。



明期には蛍光灯 (FL40S、Toshiba) を点灯し、照度は $26.7\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。

育成期間を通して温度は 28.5℃、湿度は 75%であった。

暗期中断 (NB) 処理としては、16 時間の暗期中 10 時間目に 10 分間蛍光灯を点灯した。

本論文では、水耕栽培開始後の 12 時間の暗期以降連続明期下で育成したサンプルを LL、16 時間の暗処理により花成を誘導したサンプルを SD と表記する。

双葉切除実験

16 時間暗期の終了から 1 時間前 (SD-1h) と、暗期終了時 (SD0h)、暗期終了から 30 分後 (SD0.5h)、1 時間後 (SD1h) および 2 時間後 (SD2h) に、葉柄の中央部分から先の双葉部分を切除した。その後も連続明期下で水耕栽培を継続し、花成の有無を確認した。

蛍光染色

試薬

MES 緩衝液

25mM MES

KOH にて pH6.0 に調整。

Mag-fluo-4 染色液

15.3 μ M Mag-Fluo-4 AM (Molecular Probes)

1%(v/v) Pluronic F-127 (Molecular Probes)

25mM MES (pH6.0)

Fluo-3 染色液

44.3 μ M Fluo-3 AM (Molecular Probes)

2%(v/v) Pluronic F-127 (Molecular Probes)

25mM MES (pH6.0)

操作

サンプリング

56 時間の明期終了時 (LL-16h)、16 時間の暗期終了時 (SD0h)、暗期終了から 4 時間後 (SD4h) に MES 緩衝液中で茎頂部を切除した。また、花成を誘導していないコントロールサンプルとして、明期下で育成した植物を SD0h、SD4h と同時に採取し、それぞれ LL0h、LL4h とした。根は根端から 1cm 程度を、茎は中央部を 3mm 程度採取した。

染色と観察

採取した茎頂部はスライサーを用いて MES 緩衝液中で 200 μ m 厚にスライスした。茎は水平方向に、200 μ m 厚に輪切りにした。切片は Mag-fluo-4 染色液あるいは Fluo-3 染色液に浸漬し、室温にて 3.5 時間振盪・染色した。根はスライ

スせず、そのまま染色した。染色後のサンプルは蒸留水にて洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡（LSM-510、ZEISS）を用いて組織観察を行なった。励起波長は488nm、蛍光波長はBP 505-550のフィルターを使用した。

***in vitro* 蛍光スペクトル測定**

Mag-fluo-4 tetrapotassium salt と Fluo-3 pentaanmonium salt を用いて Ca^{2+} および Mg^{2+} 共存下での標準液を作成し、蛍光分光光度計（FL-2500、Hitachi High-Technomogies）にて蛍光スペクトルを測定した。

試薬

MES 緩衝液

25mM MES

KOH にて pH6.0 に調整。

Mag-fluo-4 標準液

15.3 μM Mag-Fluo-4 tetrapotassium salt (Molecular Probes)

0.5~5.0mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0~250nM CaCO_3

25mM MES (pH6.0)

Fluo-3 標準液

44.3 μM Fluo-3 pentaanmonium salt (Molecular Probes)

100nM~10 μM CaCO_3

25mM MES (pH6.0)

1-3 結果および考察

本研究では、発根後のアサガオ幼植物体を連続明期下で 56 時間水耕栽培し、双葉を完全に展開させた後、16 時間の暗処理によって花成を誘導した。この実験条件において、双葉で生成された花成シグナルがいつ茎頂に到達するのかを、シグナルの供給器官である双葉を切除する時間と、その後の花成率から解析した。その結果、

暗期終了 1 時間前 (SD-1h) に双葉を切除すると花成は完全に阻害され、暗期終了後 1 時間目 (SD1h) での切除では花成率は 50%に上昇した (Fig.1-1)。さらに、暗期終了後 2 時間目 (SD2h)での双葉の切除では花成率は 100%であり、双葉切除の花成阻害効果は完全に失われた (Fig. 1-1)。つまり、本実験条件では、暗処理終了後 2 時間以内に花成シグナルは茎頂に到達し、茎頂における成長相の移行を促すことが明らかになった。

アサガオ茎頂において花成誘導初期の Mg^{2+} の分布を解析するにあたり、既存の染色試薬の使用が可能であるかを、まず *in vitro* で検討した。植物細胞内の Mg^{2+} 濃度は、植物種や組織、あるいは細胞の成熟度によって差異はあるものの、数 mM に維持されている。例えば、ホウレンソウのストロマ内の Mg^{2+} 濃度は未熟葉で 3 ~4mM、成熟葉になると 8~10mM (Horlitz and Klaff 2000) である。また、ソラマメの表皮細胞では、細胞質で 0.5mM、ストロマで 5mM の Mg^{2+} が保持されている (Shabala and Hariadi 2005)。一方、細胞内の Ca^{2+} 濃度は通常 200nM 以下であり (Sanders et al. 1999)、アカザの茎頂でも約 200nM (Albrechtova et al. 2003) と非常に低く抑えられていることから、アサガオ茎頂でも Ca^{2+} 濃度は 100nM ~ 200nM 前後と類推した。両イオンのこのような細胞内濃度を鑑み、数 mM の Mg^{2+} に反応する試薬として Mag-fluo-4 に着目した。Mag-fluo-4 は Ca^{2+} 検出用の Fluo系試薬を改変することで、 Mg^{2+} への反応性も付与された蛍光試薬である。 Mg^{2+} に対する K_d 値は $4.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Ca^{2+} に対する K_d 値は $22\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ である。対比染色用の Ca^{2+} 特異的染色試薬には Fluo-3 ($K_d=325\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) の適用を検討した。両試薬による染色差を Mg^{2+} の分布として捉える、「 $(Ca^{2+} + Mg^{2+}) - (Ca^{2+}) = Mg^{2+}$ 」

という原理の概念図を Fig. 1-2 に、両試薬の *in vitro* での蛍光スペクトルを Fig. 1-3 に示す。Mag-fluo-4 は Ca^{2+} が 250nM 以内で存在する溶液での Mg^{2+} の 0.5mM～5mM 間での変化を十分捉えることができること考えられた (Fig. 1-3 A)。 Ca^{2+} の 100nM 前後の変化は Fluo-3 で捉えられるが (Fig. 1-3 B)、蛍光強度が Mag-fluo-4 の 10 分の 1 程度であることも明らかとなった。なお、組織の染色に際しては、両試薬が共に Fluo 系の分子骨格を持つため、細胞に対する浸透性は極めて類似のものであることが期待される半面、顕微鏡観察で使用する励起・蛍光波長が同一のため、二重染色による Mg^{2+} と Ca^{2+} の同時観察は不可能である。

両試薬による組織の染色差を Mg^{2+} の分布として捉えることが実際に可能であるか、暗処理開始時の茎頂と茎の切片および根端を対象として染色し、検証した。染色の結果、茎の切片の染色像には両試薬による差異は見られず、外皮と維管束が最も強い蛍光を発した (Fig. 1-4 B, E)。一方、茎頂の切片を Mag-fluo-4 で染色すると、茎頂先端部と葉原基、次いで中心柱に非常に強い蛍光が見られた (Fig. 1-4 D)。ところが Fluo-3 による染色像は、茎頂先端部と外皮でやや明るいものの、Mag-fluo-4 と比較すると全体に均一な蛍光を発するものであった (Fig. 1-4 A)。この結果は、茎頂先端部と葉原基における Mg^{2+} の局在の可能性を示すものであると考えた。これに対し、茎において Mag-fluo-4 と Fluo-3 の染色像に差異が認められなかったのは、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の分布に大きな差異がない、あるいは、 Ca^{2+} の濃度が高く、Mag-fluo-4 の蛍光に Mg^{2+} の局在が反映されていないためであると考えられた。また、根端の染色では、Mag-fluo-4 を使用した場合 (Fig. 1-3 F) のほうが Fluo-3 を使用した場合 (Fig. 1-4 C) に比べると中心柱における蛍光強度が顕著に高く、

この組織への Mg^{2+} の局在が示唆された。以上の結果から、本研究で注目する茎頂において、Mag-fluo-4 と Fluo-3 の染色像の差異から Mg^{2+} の分布を解析することは可能であると判断された。

茎頂における Mg^{2+} 濃度は光条件に応答し 17% の幅で変動することが示されている (Kobayashi et al. 2007)。そこで、花成を誘導する 16 時間の暗処理終了後、すなわち、茎頂においては生殖成長相へと移行している時間帯での Mg^{2+} の分布を、Mag-fluo-4 と Fluo-3 の染色差から解析した。まず Fluo-3 による染色の結果を Fig. 1-4 に示す。観察した 37 個の茎頂全てにおいて、Fluo-3 の蛍光は茎頂先端部の最外層から 5 層目にかけてやや強く、この染色像には花成誘導の有無による変化は見られなかった。これに対し、Mag-fluo-4 で染色した場合、茎頂先端部の 2 層目から 5 層目に強い蛍光が見られるが、最外層の蛍光はやや弱いものであった (Fig. 1-6)。さらに、茎頂先端部の中央に特に強い Mag-fluo-4 の蛍光を発する数個の細胞が存在することが明らかとなった (Fig. 1-6 B, C, D)。この細胞群は 2 層目と 3 層目の中央帯 (central zone) に付近に位置しており、花成を誘導していない茎頂 (53 個のうち 34 個) と、暗処理終了時の茎頂 (24 個のうち 15 個) で確認できた。ところが、暗処理終了後 4 時間目の茎頂には上記のような細胞群は見られず、中央帯よりも周辺分裂組織 (peripheral zone) の蛍光の方が強かった (Fig. 1-5 E, 17 個のうち 10 個)。なお、花成を誘導する前の茎頂の中でも、茎頂先端部の中央帯に強い Mag-fluo-4 の蛍光が明確に認められるものが数個観察されたが、大多数 (15 個のうち 10 個) の茎頂は Fig. 1-5 A のように、周辺分裂組織と中央帯の蛍光強度は同程度であった。

Mag-fluo-4 の染色様態に見られた花成誘導後の変化が、成長相の移行に伴うものであるのか、あるいは暗処理自体の影響であるのかを判別するため、暗期中断実験 (Night break) を行った。暗期中断実験は、16 時間の暗処理中、10 時間目に 10 分間の明期を挿入するもので、これによりアサガオの花成は完全に阻害される。また、シロイヌナズナやイネを用いた近年の分子生物学的な解析により、暗期中断実験によって影響を受けるのは CO (CONSTANS) タンパク質であり、それによって CO タンパク質のターゲット遺伝子である *FT* の発現が誘導されないことが花成阻害の主要な原因であること明らかとなっている (Valverde et al. 2004, Ishikawa et al. 2005)。Mag-fluo-4 による染色実験の結果、暗期中断を含む 16 時間の暗処理終了時、および、終了後 4 時間の茎頂先端部の中央帯に強い蛍光を発する細胞群が存在していた (Fig. 1-6 F, G)。この Mg^{2+} の局在様式は花成を誘導していない茎頂と同様のものである (Fig. 1-6 B, C)。したがって、茎頂先端部の Mag-fluo-4 染色像が花成誘導後に変化する原因は暗処理そのものではなく、暗処理によって茎頂の成長相が生殖成長相へと移行したことであると考えられた。

アカザの茎頂を対象とし、 Ca^{2+} 濃度と pH を染色法から解析した Albrechtova らの手法は、茎頂へのストレスを軽減する目的で、スライスが茎頂の中央を一度のみとし、茎頂を縦に 2 分割した断面を染色観察するというものであった (Walczysko et al. 2000, Albrechtova et al. 2003)。しかし、本実験の過程で、茎頂部のスライス面の僅かな違いによって、得られる染色像が大きく異なることが判明した (Data not shown)。そのため、顕微鏡観察の際には常に茎頂部の中央を観察していることを確認することが必要であったが、茎頂の中央でスライスされているかについては、

蛍光像や、縦に 2 分割した断面の透過光像からは判断できず、切片の透過光像が必要であった。そのため本実験においては、まず透過光像から茎頂中央がスライスされているサンプルを選別し、それについて蛍光像の観察を行なうという手順で顕微鏡観察するため、200 μ m 厚の切片をサンプルとして用いた。

本実験で観察された Mag-fluo-4 による茎頂染色像の花成誘導後の変化は Fluo-3 による染色にはなかったものであり、Mg²⁺の分布様式が花成の有無により変化することを示唆する結果となった。Mg²⁺の局在が示唆された茎頂先端部は栄養成長期には成長を維持する *CLV* (*CLAVATA*) などの遺伝子や葉の形態形成に関わる遺伝子の、また、花成誘導時には *API* (*APETALA1*) を始めとする花成関連遺伝子の発現が予想される組織である。さらに、栄養成長期における茎頂の中央帯には、特に高濃度の Mg²⁺が局在している数個の細胞群が存在する可能性も示された。これらの結果は即ち Mg²⁺の花成制御メカニズムへの関与を認めるものではないが、その可能性は強く示されたと考えた (Kobayashi et al. 2006)。今後、Mg²⁺の花成における役割をさらに追究するためには、Mg²⁺濃度の絶対値の測定、茎頂において Mg²⁺濃度を制御するメカニズムの解明、Mg²⁺濃度の変動が影響を及ぼす花成誘導プロセスの特定など、さらなる研究が必要であると思われる。

Table 1-1. 水耕液組成

| Macro Nutrients (g/l) | | Micro Nutrients (mg/l) | |
|--|--------|---|-------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.118 | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1.15 |
| Na_2HPO_4 | 0.0183 | H_3BO_3 | 0.925 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.185 | NaFeEDTA | 1.60 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.236 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.145 |
| KNO_3 | 0.152 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.12 |
| | | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.015 |
| | | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.015 |

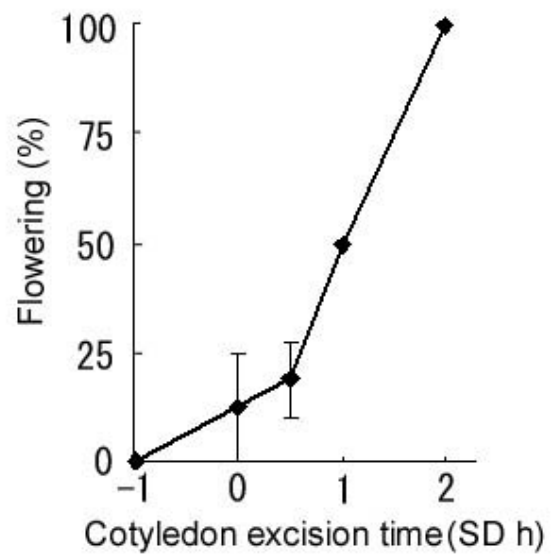


Figure 1-1. 双葉を切除する時間と花成率の関係。暗処理終了時を SD0h とした。SD2h 以降の双葉切除に花成阻害効果はなく、全ての個体の頂芽が花芽となった。

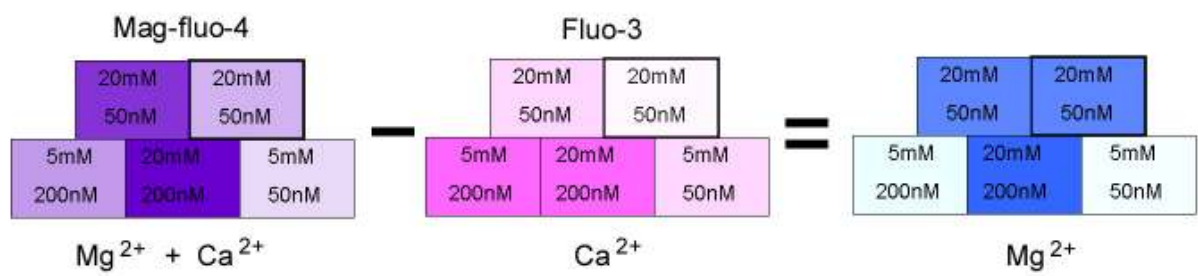


Figure 1-2. Mag- fluo-4 と Fluo-3 による染色差を Mg^{2+} の分布として捉える方法の概念図。四角で細胞を表し、各細胞内 Mg^{2+} 濃度 (20mM あるいは 5mM) を上段に、 Ca^{2+} 濃度 (200nM あるいは 50nM) を下段に記した。右上の四角は、他に比べて染色液が浸透していない細胞を表している。

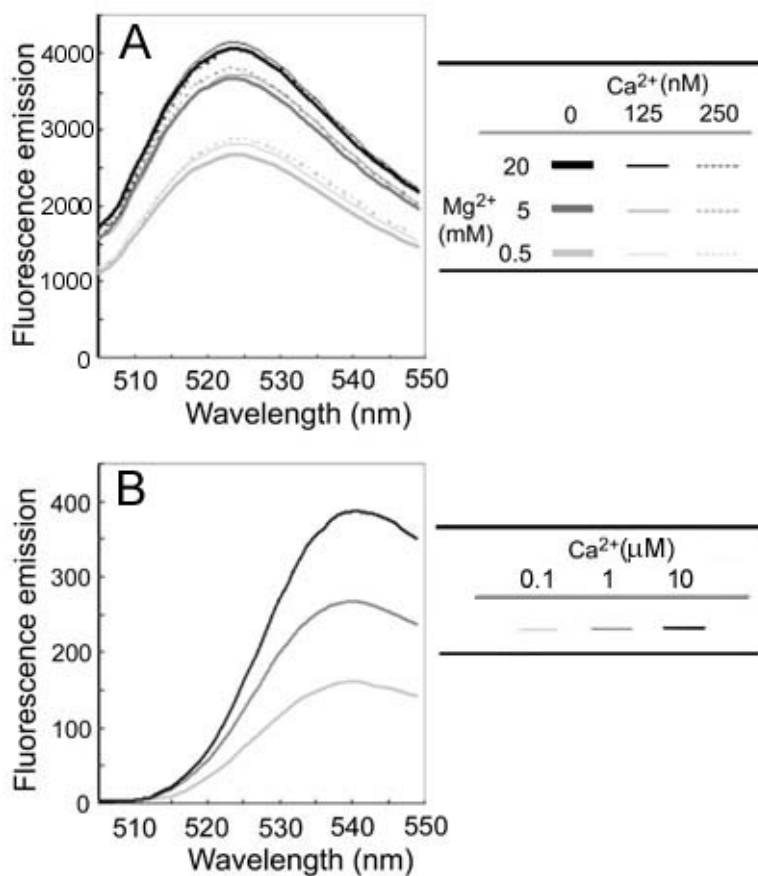


Figure 1-3. Mag-fluo-4 (A) および Fluo-3 (B) の *in vitro* 蛍光スペクトル。

Mag-fluo-4 は 0、125、250nM の Ca²⁺ と、0.5、5、20mM の Mg²⁺ の共存下でのスペクトル。

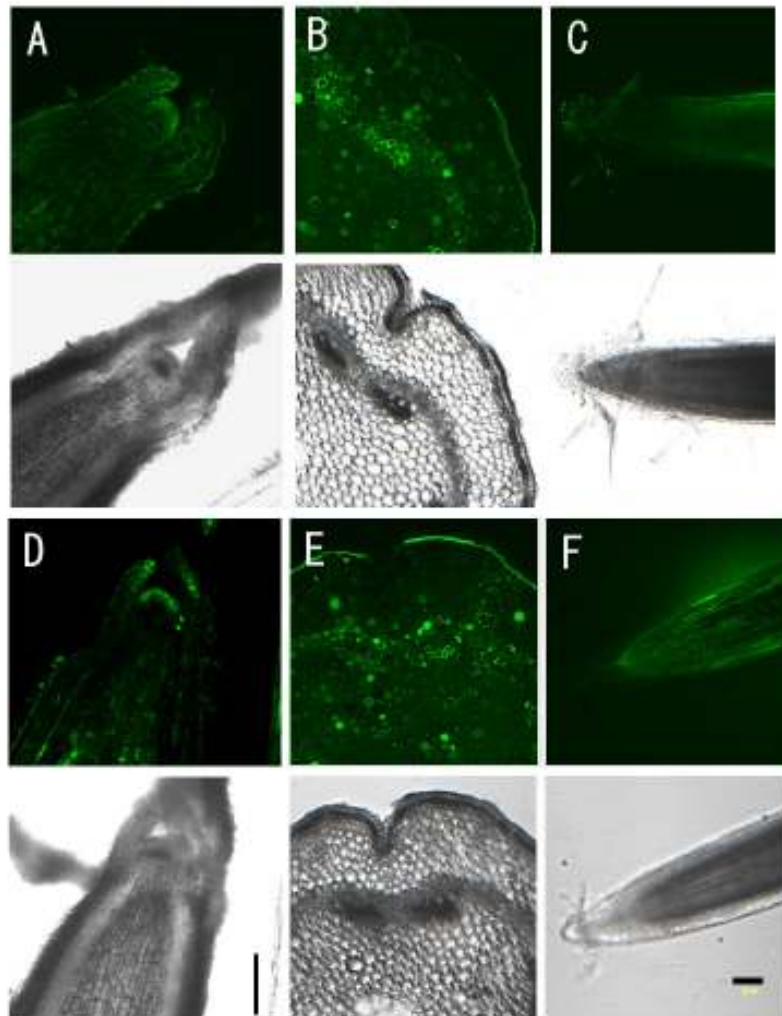


Figure 1-4. 暗処理開始前に採取した茎頂と茎の切片および根の蛍光染色像とその透過光像。

A,B,C ; Fluo-3 による染色像。

D,E,F ; Mag-fluo-4 による染色像。

A, D; 茎頂、B, E; 茎、C, F; 根。

D 内のスケールバー ; 200 μ m は A, B, E に共通。F 内のスケールバー ; 100 μ m は C に共通。

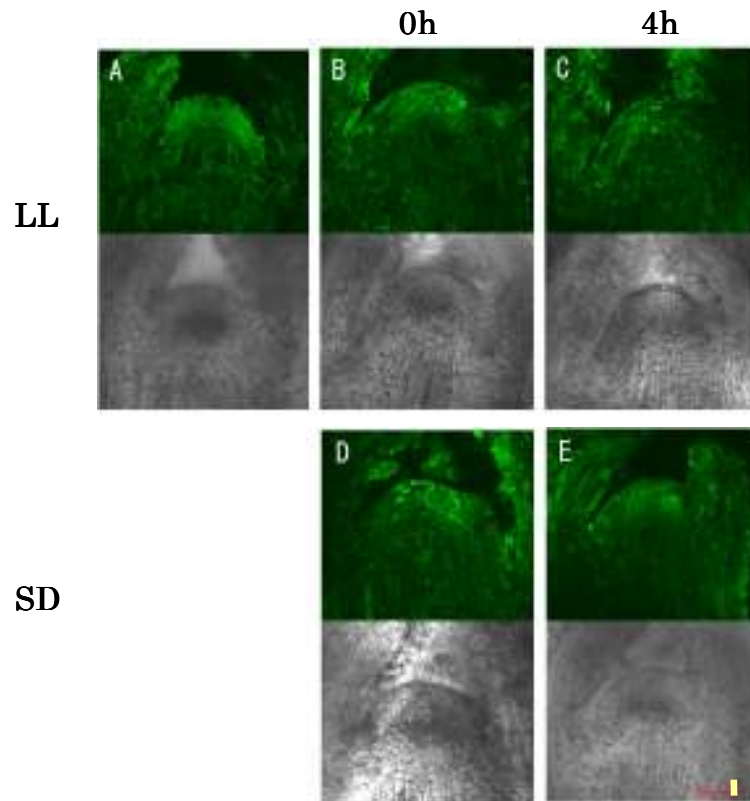


Figure 1-5. Fluo-3 による茎頂の蛍光染色像とその透過光像。A ; 明期で 56 時間育成した、暗処理直前の茎頂、B ; LL0h、C ; LL4h、D ; SD0h、E ; SD4h における茎頂。

E 内のスケールバー; 20 μ m は全てに共通。

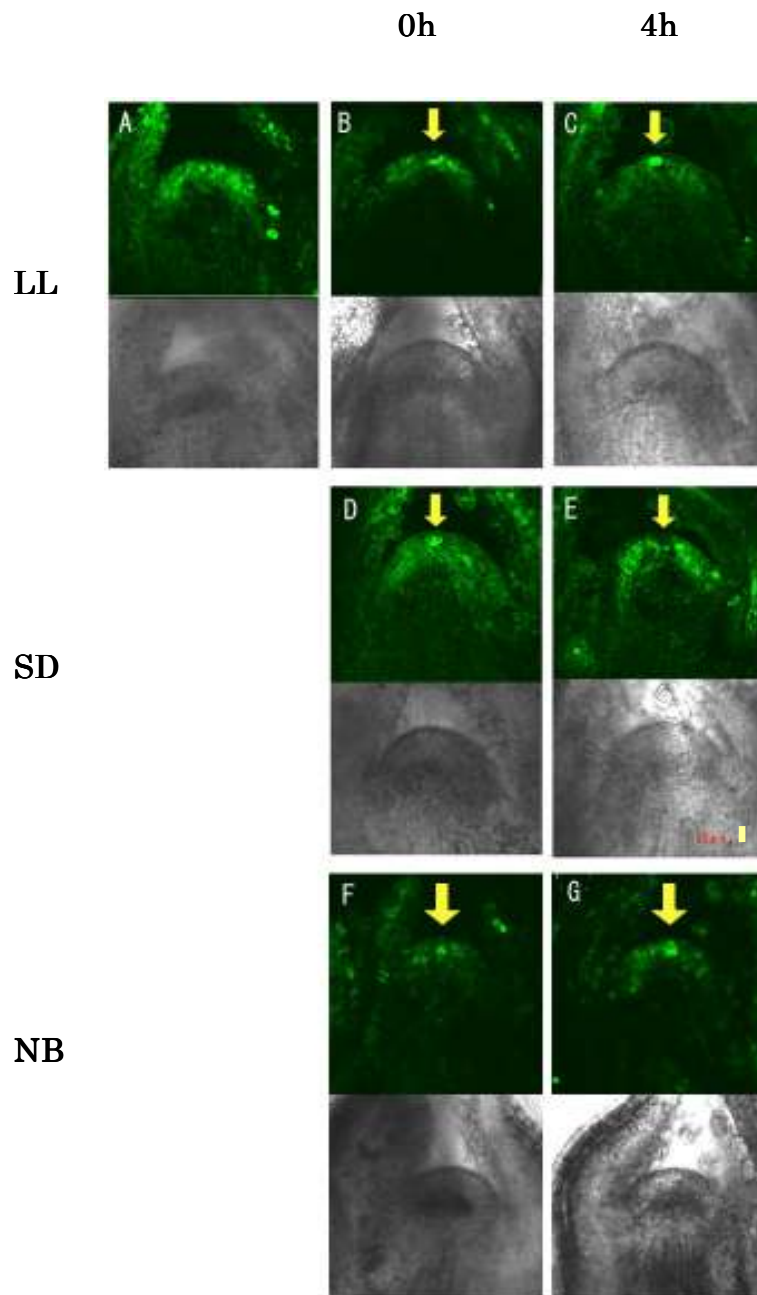


Figure 1-6. Mag-fluo-4 による茎頂の蛍光染色像とその透過光像。茎頂先端部の中央に特に強い蛍光を発する細胞群が見られたが (B、C、D、F、G ; 黄色矢印)、暗処理終了から 4 時間後の茎頂では中央部よりも周辺分裂組織の蛍光のほうが強かった (E ; 黄色矢印)。A; 明期で 56 時間育成した、暗処理直前の茎頂、B; LL0h、C; LL4h、D; SD0h、E; SD4h における茎頂。F、G; 暗期中断実験による NB0h (F)、NB4h (G) の茎頂。E 内のスケールバー; 20 μ m は全てに共通。

第 2 章 茎頂組織および花成のマーカ－遺伝子の単離

2-1 緒言

前章の結果から、アサガオの茎頂先端部には Mg^{2+} が高濃度に集積している可能性が示されると同時に、花成誘導直後では Mg^{2+} の局在が花成を誘導していないものと比べて異なる可能性が示唆された。本章では、 Mg^{2+} の花成における役割を追究するため、 Mg^{2+} が集積している組織の生理学的な同定を試みることにし、まず組織のマーカ－となる遺伝子の単離を行った。

茎頂内の組織は、組織学的な観点からは中央帯 (CZ ; central zone) や周辺分裂組織 (PZ ; peripheral zone)、髄状分裂組織 (RZ ; rib zone) に (Vaughan 1952, Fig. 2-1)、また、機能的には外皮=tunica (L1、L2) と内皮=corpus (L3) に分類されていた (Satina et al. 1940, Fig. 2-1)。ところが、近年の分子遺伝学の発達により、茎頂を構成する細胞群はそれぞれが持つ生理学的に独特な役割・性質によって、より明確に分類されるようになった。例えば、栄養成長期の茎頂の成長を支える遺伝子ネットワークで中心的な役割を果たす *WUS* (*WUSCHEL*) と *CLV* (*CLAVATA*) 遺伝子は、茎頂内の限定された組織内で発現し、当該組織の性格を決定づけている (Mayer et al. 1998, Lenhard and Laux 2003)。つまり、組織の生理学的な同定のためには、形態学的な指標のみならず、*WUS* や *CLV* 遺伝子のような組織のマーカ－となる遺伝子の利用は欠かせないと言える。

本章で単離のターゲットとしたマーカ－遺伝子は *WUS*、*CLV1* 及び *STM*

(*SHOOTMERISTEMLESS*)、*API* (*APETALA1*)、*AG* (*AGAMOUS*) である。

これらの遺伝子はシロイヌナズナなど他植物で解析が進み、発現組織と機能がよく知られており、なおかつ植物種間で保存性の高い遺伝子であることから、組織の生理学的同定のために有効であると考えられた。

WUS はシロイヌナズナでは茎頂先端部の *CZ* 内の最外層 (*L1*) から数えて 3 層目より内側 (*L3*) に位置する組織で発現が確認されており、当該組織を Organizing Center (*OC*) に性格付ける (Schoof et al. 2000, Fig. 2-1)。そして、*OC* の外層側に位置する組織で特異的に発現する *CLV* 遺伝子群との間でフィードバックループを形成している (Schoof et al. 2000)。*WUS/CLV* の相互作用は、茎頂におけるメリステム性の維持に重要な役割を果たしており、*CLV* を発現する組織には各層 1~3 個の幹細胞 (Stem Cell) が含まれている (Mayer et al. 1998)。*CLV* 遺伝子群の一つである *CLV1* は *WUS* を発現する組織の外側に隣接する、極めて限定された組織での発現が予想される (Fig. 2-1)。*STM* は茎頂先端部の *CZ*、*PZ* で広く発現し、当該組織を未分化に保つ (Long et al. 1996, Fig. 2-1) が、*STM* による茎頂の維持機構は *CLV* 遺伝子群による制御機構とは別個のものである (Clark et al. 1996, Lenhard et al. 2002)。一方、*API* と *AG* は花成誘導により茎頂で発現が誘導される代表的な花成マーカー遺伝子であると同時に、花形態形成の分子学的モデルである ABC モデルにおいて *API* は A-class に、*AG* は C-class に分類されている (Theissen and Saedler 2001)。*API* は *FT/FD* タンパク複合体によって直接転写が促進される遺伝子であり (Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005)、*API* の蓄積は茎頂が生殖成長相へと移行したことを示す (Mandel et al. 1992, Bowman

et al. 1989)。 *AP1* は花成初期には葉原基で発現が見られ、その後は花原基で強く発現する (Hampel et al. 1997)。 *AG* は *WUS* によって直接転写が促進され、発現した *AG* によって *WUS* の発現が抑制されることが茎頂のメリステム性の喪失、つまり植物生長の終了につながる (Lenhard et al. 2001, Lohmann et al. 2001)。

これらの遺伝子を用いて花成誘導期のアサガオ茎頂を解析することで、前章で観察された Mg^{2+} 局在組織を同定し、さらに、局在に変化が見られた時間帯 (暗期終了後 4 時間目) の茎頂が、花成誘導プロセスの中でどの段階にあるのかを特定することが可能になると考えた。

2-2 実験方法

WUS と STM オーソログの単離

連続明期下で 56 時間水耕栽培したアサガオの幼植物体の茎頂組織から RNA を抽出した。抽出方法としてはグアニジン-塩化セシウム超遠心法を採用した。

RNA 抽出

グアニジン-塩化セシウム超遠心法

試薬

グアニジンチオシアネート抽出 Buffer

4M グアニジンチオシアネート

0.1M Tris-HCl(pH7.5)

1% β -メルカプトエタノール

HCl で pH を 7.0 に調整。

酢酸

1M 酢酸

Tris/Sarc Buffer

10mM Tris-HCl(pH8.0)

1% N-ラウロイルサルコシナトリウム
NaOH で pH を 8.0 に調整。

Tris/Sarc/CsCl Buffer

10mM Tris-HCl(pH8.0)
1% N-ラウロイルサルコシナトリウム
5.7M 塩化セシウム
NaOH で pH を 8.0 に調整。

酢酸ナトリウム

3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)

操作

1. 植物サンプルを液体窒素で冷やしながら乳鉢でホモジェナイズ。
2. 粉碎したサンプルを遠心チューブに入れ、サンプル 1g 当たり 10ml の冷却したグアニジンチオシアネート抽出 Buffer を添加し、激しく攪拌。
3. 4℃にて 10000rpm で 10 分間遠心。
4. 上清に 1/40 量の酢酸と 3/4 量の EtOH を添加し、-30℃で 2 時間静置。
5. 4℃にて 10000rpm で 20 分間遠心。
6. 上清を捨て、沈殿を 70%EtOH で洗浄。
7. 沈殿に 3.2ml の Tris/Sarc Buffer を添加し、68℃の湯浴で温めながら攪拌、溶解。
8. 4℃にて 8000rpm で 20 分間遠心。
9. 上清 3ml 当たり、塩化セシウムを 3g 添加し攪拌、溶解。
10. 1.25ml の Tris/Sarc/CsCl Buffer をあらかじめ入れておいた超遠心チューブにサンプル溶液をゆっくりと添加。
11. 20℃にて 42000rpm で 12 時間遠心。
12. 沈殿を 400μl の超純水に溶解。
13. 40μl の酢酸ナトリウムと 800μl の EtOH を添加し攪拌後、-30℃で 10 分間静置。
14. 4℃にて 15000rpm で 15 分間遠心。
15. 沈殿を 70%EtOH で洗浄した後、風乾。
16. 沈殿を 70μl の超純水に溶解。

遺伝子断片の単離

SuperScript III (invitrogen) を使用し、cDNA を合成した。他植物の遺伝子配列から保存性の高い領域を選び、regenerate プライマーを作成、*ExTaq*[®] (タカラバイオ) を用いた PCR で遺伝子断片を増幅した。

プライマー

WUS-rgFw1; AAA/GGAIC/TTITAC/TTAC/TAAC/TAA
WUS-rgRv1; GCC/TTTA/GTGA/GTTC/TTGA/GAACCA
WUS-rgRv2; AACCAA/GTAA/GAAIACA/GTTC/TTT
STM-rgFw1; ATA/C/TATGGC/GICAC/TCCICAC/TTA
STM-rgRv1; ACIACA/GAAC/TTGCATA/GTCC/TTC

PCR 反応液組成

WUS-①

| | |
|-------------------------|---------|
| 10× <i>ExTaq</i> Buffer | 2.5μl |
| 2.5mM dNTP Mixture | 2μl |
| 100μM WUS-rgFw1 | 0.5μl |
| 100μM WUS-rgRv1 | 0.5μl |
| 5units/μl <i>ExTaq</i> | 0.25μl |
| テンプレート cDNA | 1μl |
| 超純水 | 17.25μl |
| <hr/> | |
| | 24μl |

WUS-②

| | |
|-------------------------|---------|
| 10× <i>ExTaq</i> Buffer | 2.5μl |
| 2.5mM dNTP Mixture | 2μl |
| 100μM WUS-rgFw1 | 0.5μl |
| 100μM WUS-rgRv2 | 0.5μl |
| 5units/μl <i>ExTaq</i> | 0.25μl |
| PCR①産物 1/10 希釈液 | 1μl |
| 超純水 | 17.25μl |
| <hr/> | |
| | 24μl |

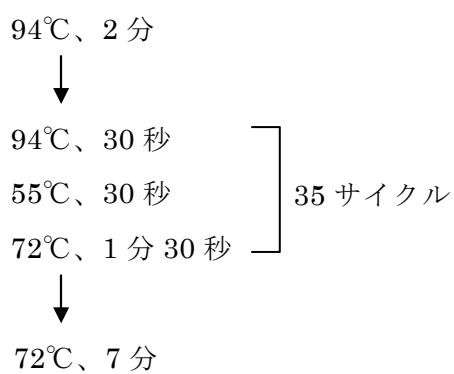
STM-①

| | |
|-------------------------|-------|
| 10× <i>ExTaq</i> Buffer | 2.5μl |
|-------------------------|-------|

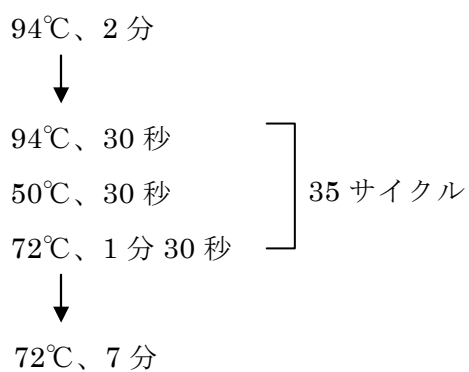
| | |
|------------------------------|---------------|
| 2.5mM dNTP Mixture | 2 μ l |
| 100 μ M STM-rgFw1 | 0.5 μ l |
| 100 μ M STM-rgRv1 | 0.5 μ l |
| 5units/ μ l <i>ExTaq</i> | 0.25 μ l |
| テンプレート cDNA | 1 μ l |
| 超純水 | 17.25 μ l |
| | <hr/> |
| | 24 μ l |

PCR 条件

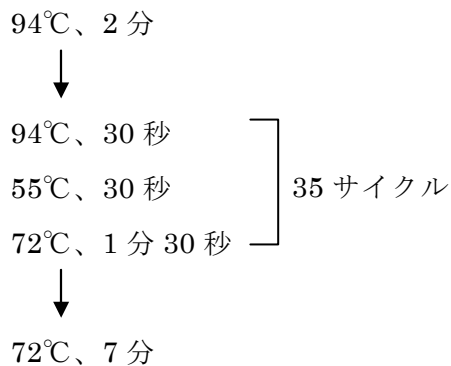
WUS-①



WUS-②



STM-①



クローニング

PCR産物をゲル電気泳動後、切り出し、精製したものを pGEM®-T Easy プラスミドベクター (Promega) にクローニングした。操作の実際は製品付属のプロトコールに従った。最終的に得られた遺伝子断片のシーケンス情報は、RACEにおけるPCRのプライマー設計に利用した。

5'-3'-RACE

GeneRacer Kit ver. L(Invitrogen)を使用。

mRNAの5'末端にはCIP処理、TAP処理を経てGeneRacer RNA Oligoを結合させた。その後、GeneRacer Oligo dT Primerを用いて逆転写し、RACE-ready cDNAサンプルを合成した。試薬および操作の実際はキット付属のプロトコールに従った。

プライマー

WUS-3Fw1; GACGGCGGACCAGATTCAGA

WUS-5Rv1; TATCTTCCCGTACTGCCTCA

STM-3Fw1; AGGATTGAATCCCAGTTCAA

STM-5Rv1; TGCTTGAGGCTTCCCAGGTA

PCR 反応液組成

STM

1stPCR

| | |
|-------------------------|-------|
| 10× <i>ExTaq</i> Buffer | 2.5μl |
| 2.5mM dNTP Mixture | 2μl |

| | |
|------------------------------|---------------|
| 10 μ M 特異的プライマー | 1 μ l |
| GeneRacer Primer | 1.5 μ l |
| 5units/ μ l <i>ExTaq</i> | 0.25 μ l |
| RACE-ready cDNA | 0.5 μ l |
| 超純水 | 17.25 μ l |
| | <hr/> |
| | 24.5 μ l |

nestedPCR

| | |
|---------------------------------|---------------|
| 10 \times <i>ExTaq</i> Buffer | 2.5 μ l |
| 2.5mM dNTP Mixture | 2 μ l |
| 10 μ M 特異的プライマー | 0.5 μ l |
| GeneRacer nested Primer | 1 μ l |
| 5units/ μ l <i>ExTaq</i> | 0.25 μ l |
| 1stPCR 産物 1/100 希釈 | 0.5 μ l |
| 超純水 | 17.25 μ l |
| | <hr/> |
| | 24 μ l |

WUS

1stPCR

| | |
|---------------------------|--------------|
| 10 \times KOD(+) Buffer | 2.5 μ l |
| 2mM dNTP Mixture | 2.5 μ l |
| 25mM MgSO ₄ | 1 μ l |
| 10 μ M 特異的プライマー | 0.75 μ l |
| GeneRacer Primer | 0.75 μ l |
| 1units/ μ l KOD(+) | 0.5 μ l |
| RACE-ready cDNA | 0.5 μ l |
| 超純水 | 16.5 μ l |
| | <hr/> |
| | 25 μ l |

nestedPCR-1

| | |
|---------------------------|--------------|
| 10 \times KOD(+) Buffer | 2.5 μ l |
| 2mM dNTP Mixture | 2.5 μ l |
| 25mM MgSO ₄ | 1 μ l |
| 10 μ M 特異的プライマー | 0.75 μ l |

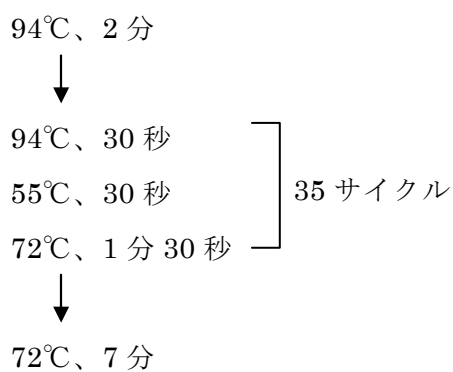
| | |
|-------------------------|--------|
| GeneRacer nested Primer | 0.75μl |
| 1units/μl KOD(+) | 0.5μl |
| 1stPCR 産物 1/200 希釈 | 0.5μl |
| 超純水 | 16.5μl |
| | <hr/> |
| | 25μl |

nestedPCR-2

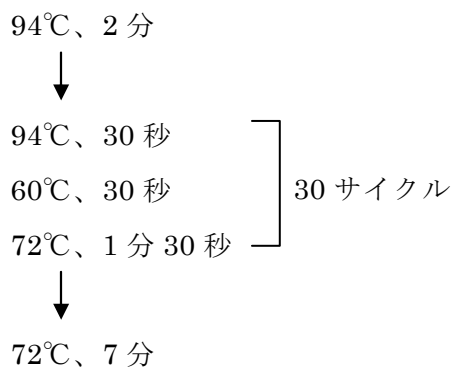
| | |
|-------------------------|--------|
| 10×KOD(+) Buffer | 2.5μl |
| 2mM dNTP Mixture | 2.5μl |
| 25mM MgSO ₄ | 1ul |
| 10μM 特異的プライマー | 0.75μl |
| GeneRacer nested Primer | 0.75μl |
| 1units/μl KOD(+) | 0.5μl |
| nestedPCR-1 産物 1/20 希釈 | 0.5μl |
| 超純水 | 16.5μl |
| | <hr/> |
| | 25μl |

PCR 条件

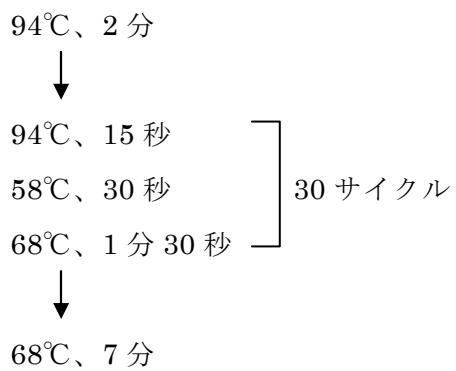
STM-1stPCR



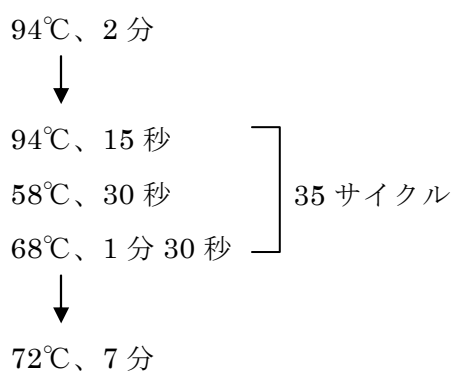
STM-nestedPCR



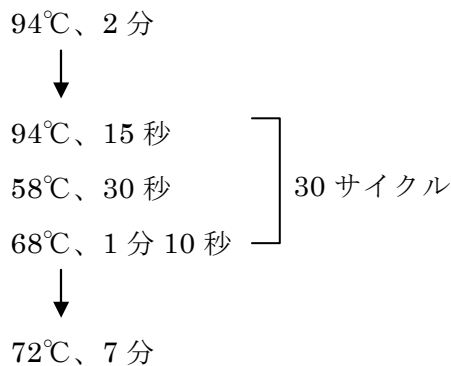
WUS-1stPCR



WUS-nestedPCR-1



WUS-nestedPCR-2



クローニング

最終的に得られた PCR 産物は QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製し、*WUS* は pCR®-Blunt II -TOPO ベクター (Invitrogen) に、*STM* は pCR®4-TOPO ベクター (Invitrogen) にそれぞれクローニングした。試薬および操作の実際はキット付属のプロトコールに従った。

CLV1、*API*、*AG* オーソログの単離

自然科学研究機構 基礎生物学研究所で整備されているアサガオ EST ライブラリから、他植物の遺伝子配列情報をもとにホモログを検索した。その後、再度完全に遺伝子配列を解読して得られた情報をもとに遺伝子特異的プライマーを作成し、ムラサキから ORF 全長を単離した。

API と *AG* の単離には、16 時間の暗処理を施すことで花成を誘導した植物から得た cDNA を使用した。

5 遺伝子の発現解析

リアルタイム PCR を使用し、アサガオ幼植物体および花における遺伝子の発現量を定量した。

RNA 抽出

連続明期下で 72 時間水耕栽培したアサガオの幼植物体を双葉、葉柄、茎頂、茎、根に、また、開花前の花をガク、花弁、おしべ、めしべに切り分け、各組織から RNA を抽出した。抽出には Get pure RNA kit (Dojindo) を使用した。試薬および操作の実際はキット付属のプロトコール（組織用）に従った。

リアルタイム PCR

Fast SYBR® Green Master Mix (ABI) を使用し、StepOne™ Real-Time PCR System (ABI) にて発現解析を行った。

逆転写

逆転写には、Super Script® III First Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) を使用し、1μl あたり 40ng の totalRNA をテンプレートとして cDNA を合成した。試薬および操作の実際はキット付属のプロトコールに従った。

検量線用プラスミド段階希釈

各遺伝子の部分配列を挿入したプラスミドベクターを *EcoRI* 処理によって直鎖化したものを Dillution Buffer (タカラバイオ) を用いて段階希釈した。検量線は 5 遺伝子とも、4 点×2 連で作成した。

プライマーセットおよびそれぞれの反応液中の濃度

WUS (PnWUS1) ; WUS-RTFw と WUS-RTRv、100nM

STM (PnSTM1) ; STM-RTFw と STM-RTRv、200nM

CLV1 (PnCLV1-like) ; CLV1-RTFw と CLV1-RTRv、200nM

AP1 (PnFUL1) ; AP1/FUL1-RTFw と AP1/FUL1-RTRv、50nM

AG (AG/DP) ; AG-RTFw と AG-RTRv、200nM

各プライマーの配列は付録 1~5 を参照。

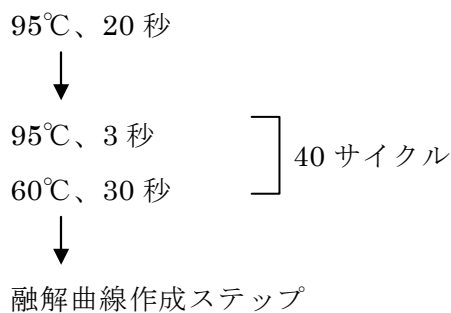
PCR 反応液組成

| | |
|------------------------|-----|
| 2×Fast SYBR® MasterMix | 5μl |
| Fw プライマー | 1μl |
| Rv プライマー | 1μl |

| | |
|-------------------|------|
| テンプレート | 1μl |
| Dillution Buffer* | 1μl |
| 超純水* | 1μl |
| <hr/> | |
| | 10μl |

* プラスミド希釈液をテンプレートとして使用する場合には、Dillution Buffer 1μl は除き、代わりに超純水を 2μl に増やした。

PCR 条件



2-3 結果および考察

「WUSについて」

WUS はホメオドメインを含む転写因子である *WOX* サブファミリーに属する。*WUS* はホメオドメインに加え、酸性アミノ酸残基に富むドメイン、*WUS-box*、*EAR* 様ドメインという 3つの保存性の高い領域を持つ。このうち、酸性アミノ酸残基に富むドメインは、*WUS* タンパク質の転写活性化因子としての機能を付与するものである。反対に *EAR* 様ドメインは転写抑制に関与することが判明している。なお、*WUS-box* の機能は現在のところ不明である。また、*WUS* アミノ酸配列の上記以外の領域については種間の共通性が非常に低いことも特徴である (Ohta et al. 2001,

Hiratsu et al. 2004, Tiwari et al. 2004)。シロイヌナズナにおいては *WUS* 以外に *WOX* サブファミリーに属する遺伝子が 14 種類 (*AtWOX1*~*14*) 見つかったが、胚発生時における各遺伝子の発現部位に応じて胚内各組織が分化する (Haecker et al. 2004)。また、*AtWOX5* は根の先端組織 (root meristem) において Stem Cell の維持に関与しており、茎頂における *WUS* の発現部位と機能をそのまま根に置き換えたような性質を示す (Sarkar et al. 2007)。

今回アサガオから単離した *WUS* 様遺伝子 (*PnWUS1*) と他植物の *WUS* オーソログ、及び *AtWOX1* から予想されるアミノ酸配列を比較したものが Fig. 2-2 である。*PnWUS1* は他 *WUS* オーソログ同様にホメオドメイン、WUS-box、EAR 様ドメインを保持していることが分かった。また、226 番目から 240 番目までの 15 アミノ酸のうち 10 を酸性アミノ酸が占めており、この領域が「酸性アミノ酸残基に富むドメイン」に相当すると考えられた。さらに、ホメオドメインにおいて 20 番目と 21 番目のアミノ酸がともにチロシン (Y) であることは、*WUS* を他の *WOX* 遺伝子と区別する指標である (Haecker et al. 2004) が、*PnWUS1* はこの連続した Y を保持していた。以上のことから、単離した *PnWUS1* はアサガオにおける *WUS* オーソログと考えられた。

PnWUS1 の発現部位を解析したところ、雄ずいに最も多く、全 RNA 1ng 中に 500 コピーが蓄積していた (Fig. 2-6)。*WUS* が雄ずいで発現することはシロイヌナズナやキンギョソウの *WUS* オーソログでも報告されている (Kieffer et al. 2006)。これに対し、幼植物における *PnWUS1* の発現は弱く、双葉、葉柄、茎頂で約 10 コピー/ng RNA が蓄積していた (Fig. 2-6)。キンギョソウでは *WUS* オーソログは葉

では発現していないと報告されているが、これは半定量的 RT-PCR の結果である (Kieffer et al. 2006)。定量的 RT-PCR を用いた今回の解析結果でも双葉における *PnWUS1* の蓄積量は雄ずいに比べると圧倒的に少なく、キンギョソウにおける発現様式に順ずると考えられた。

これら *PnWUS1* のアミノ酸配列及び発現解析の結果は、*PnWUS1* がアサガオにおける *WUS* オーソログであることを支持するものと判断し、NCBI のデータベースに登録した (EU672818)。

「*STM*について」

STM は *KNOTTED* 遺伝子群に属し、ホメオドメインを含むタンパク質をコードしている。*KNOTTED* 遺伝子群に属する遺伝子としては、トウモロコシの *KNOTTED* 変異体から *KN1* (*KNOTTED1*) 遺伝子が単離・同定されたのが最初である (Hake et al. 1989)。*STM* は *KN1* のオーソログとしてシロイヌナズナの *STM* 変異体から同定されたものである (Long et al. 1996)。*KN1* や *STM* の持つホメオドメインは *KNOX* と称され、トウモロコシでは *KN1* 以外にも *KNOX* を含むタンパク質をコードする 11 の遺伝子 (*KNOX1*~*11*) が存在している (Kerstetter et al. 1994)。さらにそれらはアミノ酸配列と遺伝子の発現部位に基づいて 2 つのクラスに分類されるが、*KN1* や *STM* は class1 に属し、茎頂で最も強く発現する (Kerstetter et al. 1994)。*KNOX* ホメオドメインは、他のホメオドメインにも共通するヘリックス-ループ-ヘリックス-ターン-ヘリックスという構造を持つが、ループ内のアミノ酸が 3 つ多いことが特徴的である。ホメオドメイン内にこの 3 アミノ

酸-プロリン・チロシン・プロリン (PYP) を保持する遺伝子群は TALE (three amino acid loop extension) スーパークラスを構成し、植物類、動物類、菌類に広く存在している (Buiglin, 1997)。この事実は、TALE スーパークラスに属する遺伝子が、植物類、動物類、菌類に共通の祖先においてすでに存在しており、形態形成に関与してきた重要な遺伝子であることを示している。

KNOTTED 遺伝子群に属する遺伝子はホメオドメインの他に、保存性の高い領域を 3 つ保持している。そのうち、N 末端側に位置する MEINOX ドメインは動物の TALE スーパークラスの 1 つである MEIS 遺伝子群と相同性が高い。MEINOX ドメインは 2 つの領域がリンカーで繋がった構造でアルファ・ヘリックスを構成し、タンパク間相互作用、例えばホモダイマーの構成などに役割を果たすと予想されている。2 つ目は ELK ドメインと称され、ホメオドメインの上流に隣接して存在する (Kerstetter et al. 1994, Burglin, 1997)。3 つ目は ELK ドメインと MEINOX ドメインの間に存在する GSE-box で、KN1/STM タンパク質の転写因子としての活性を高める役割を果たすことが予想されているが、*KNOTTED* 遺伝子群内での保存性はやや低い (Kerstetter et al. 1994)。

今回単離した *STM* 様遺伝子 (*PnSTM1*) と他植物の *STM* オースログから予想されるアミノ酸配列を比較したものが Fig. 2-3 である。*PnSTM1* は MEINOX ドメイン、ELK ドメインを保持し、G が V に置換しているものの GSE-box も保持していた。また、ホメオドメインは PYP の 3 アミノ酸を含んでいた。MEINOX ドメインから C 末端までのアミノ酸配列は、シロイヌナズナにおいては *STM*(NM104916) に最も高い相同性 (81%) を示した。これらのことから、単離した *PnSTM1* はアサ

ガオにおける *STM* オーソログと考えられた。

PnSTM1 の発現部位を解析したところ、幼植物では茎に最も多く、約 190 コピー/ng RNA が蓄積し、茎頂にも 70 コピー/ng RNA が蓄積する一方で、双葉と根にはわずかに 2.5 コピー/ngRNA が存在していた。*KNOTTED class1* に属する遺伝子は、ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、胚発生後は茎頂で最も強く発現し、葉や根では発現しないと報告されており (Kerstetter et al. 1994)、上記の *PnSTM1* の解析結果は *PnSTM1* が *KNOTTED class1* に属することを支持するものと考えられた。さらに、花器官において、*PnSTM1* は雌ずいにのみ高濃度に蓄積していた (Fig. 2-6)。これはシロイヌナズナの *KNOTTED* 遺伝子でも *STM* に特徴的な発現様態であり、*STM* 以外の *KNOTTED* 遺伝子である *KNAT1* および *KNAT2* には見られないものである (Reiser et al. 2000)。

以上、*PnSTM1* のアミノ酸配列および発現部位に関する解析結果は、*PnSTM1* がアサガオにおける *STM* オーソログ遺伝子であることを強く支持していると考え、NCBI のデータベースに登録した (EU672819)。

「*CLV1* について」

CLV1 遺伝子がコードするタンパク質は、細胞膜貫通型ロイシン・リッチ・リピート (LRR) 受容体様リン酸化酵素ファミリーに属する。このファミリーのタンパク質は一ヶ所の膜貫通部位を持ち、それより N 末端側に LRR、C 末端側にセリン・スレオニン型リン酸化ドメインを保持している。また、LRR を挟むような形で 2 つのシステイン残基を含む短い領域 (paired cystein; PC) が存在する。LRR を構成

するアミノ酸の基本モチーフは「-φ--N-L S/T G-φP--φ--φ--L--L (φは疎水性アミノ酸残基)」であり、このモチーフが 21.5 回繰り返した構造を持つ (Trotochaud et al. 1999)。今回単離した *CLV1* 様遺伝子から予想されるタンパク質は上記の特徴を全て保存しており (Fig. 2-4)、細胞膜貫通型 LRR 受容体様リン酸化酵素ファミリーに属すると考えられた。

単離した *CLV1* 様遺伝子から予想されるアミノ酸配列を BLAST 検索すると、最も相同性の高かったのはシロイヌナズナの *CLV1* (NM106232) であり、相同性は 75% (722/961) であったが、ミヤコグサ *HAR1* (AB092810) とほぼ同じ 75% (738/975) の相同性を示した。*HAR1* 遺伝子は、細胞膜貫通型 LRR 受容体様リン酸化酵素ファミリーに属し、根の窒素栄養状態に応じて根の生長を制御するメカニズムに役割を果たすタンパク質をコードしており、窒素栄養に関して独特の獲得機構を持つマメ科植物において解析が進められている (Downie and Parniske 2002, Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002)。*HAR1* の遺伝子配列はシロイヌナズナの *CLV1* に非常に高い相同性を示す上、イントロンの存在箇所も両遺伝子間で保存されている (Krusell et al. 2002)。しかし、両遺伝子の発現様態には明確な差異がある。すなわち、*CLV1* は茎頂でのみ発現するのに対し、*HAR1* 遺伝子は茎頂以外のほとんどの組織で発現する (Nishimura et al. 2002)。

今回単離した遺伝子は、定量的 RT-PCR の結果、全 RNA 1ng 中に、茎と根で約 1.2 コピーが、また、葉柄にも約 0.5 コピーが蓄積していたが、茎頂には 0.4 コピーしか蓄積していなかった (Fig. 2-6)。この結果は、単離した遺伝子が *CLV1* のオーソログではない可能性を示している。また、本章で茎頂としてサンプリングした部

位には発生直後の新葉も含まれていることを考慮に入れると、本遺伝子の発現様態は *HARI* の発現様態と大きくは異ならないと言える。したがって、単離した遺伝子は、*CLVI* よりも *HARI* のオーソログである可能性が高いと思われる。ただし、細胞膜貫通型 LRR 受容体様リン酸化酵素ファミリーに属する遺伝子数は非常に多く、例えばシロイヌナズナでは 216 の遺伝子が属していることがゲノム情報から予想されているが、それらの遺伝子の多くは解析が進んでいない (Shiu and Bleecker 2001)。そのため、今回単離した *CLVI* 様遺伝子が *CLVI* でも *HARI* でもない、新規の LRR 受容体タンパク質をコードしている可能性も十分考えられ、本実験からは同定することができなかった。

「*API/FUL* について」

API は MADS-box を保持する転写因子で、シロイヌナズナの花器官の形成についての ABC モデルでは A class に分類され、萼片と花弁で主に発現する。また、*API* は花成誘導処理により茎頂で発現が誘導される遺伝子であり、茎頂が花成プロセスのどの段階にあるのかを判断するのに有用な花成マーカーであることから今回単離を試みた。*API* タンパク質は N 末端に位置する MADS-box の他に、I-domain と K-box という 2 つの保存性の高い領域を連続して保持しており、C 末端にも特徴的なアミノ酸配列 CXaa (システイン-X-アラニン-アラニン) が存在する。

アサガオ (東京古型) EST ライブラリを検索すると、*API* と思われるクローンが登録されていたため、その断片配列を元にムラサキアサガオから *API* 様遺伝子を単離した。ところが、遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列 (Fig. 2-5) は、

MADS-box タンパク質の中でも *API* に特徴的な C 末端の CXaa というモチーフ (Rodriguez-Concepcion et al. 1999) を欠いていた。さらに、Protein-BLAST 検索の結果、この遺伝子は各植物において *API* よりも *FRUITFUL* (*FUL*) に高い相同性を示した。例えばタバコにおいては *NAPI-1* (AF009126) と *NAPI-2* (AF009127) がそれぞれ *FUL* と *API* のオーソログであるが、今回単離した *API* 様遺伝子は *NAPI-1* に 73%、*NAPI-2* に 64% の相同性を示した。また、ペチュニアでは *FUL* オーソログとして *PFG* (AF176782) の他に *FUL* 様の遺伝子として *FBP29* (AF335245) という遺伝子が存在するが、今回単離した *API* 様遺伝子は *PFG* に対して 83% の相同性を示す一方で、*FBP29* に対する相同性は 77% であった。また、この遺伝子は MADS-box タンパク質の中でも *FUL* に特徴的な C 末端アミノ酸配列 (Becker and Theissen 2003) を保持していることが分かった。これらの結果は単離した *API* 様遺伝子がアサガオにおける *FUL* オーソログであることを示しており、この遺伝子を以後 *PnFUL1* と呼ぶ。

API と *FUL* は MADS-box タンパク質の中の *SQUA* サブファミリーに属するのみならず、もともと一つの遺伝子であり、eudicots から core eudicots が分離する頃に起こったゲノムの倍化によって分化した、いわゆる兄弟遺伝子であると考えられている (Litt and Irish 2003)。なお、*API* からは、アブラナ目からアブラナ科が分離する際にさらに *CAULIFLOWER* (*CAL*) 遺伝子が分化している (Litt and Irish 2003)。そのため、*API/CAL*、*FUL* 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列は極めて類似している上、機能的にも少なからず似た性質を示す。また、これらの遺伝子の持つ茎頂と花における基本的な役割には植物種間で共通性が見られる一

方、細部については非常に多様性に富む。現在提唱されている花の ABC モデルの中で、*API* の A class としての役割の植物種間での保存性に対して懐疑的な記述が近年多く見られるのも (Theissen et al. 2000, Litt 2007)、こうした *API* 遺伝子の進化の特殊性が背景にある。

FUL は *API* と同様に、花成誘導によって茎頂で発現が誘導される (Hempel et al. 1997)。また、シロイヌナズナの *ap1 cal ful* 三重変異体は *ap1 cal* 二重変異体と比べ、*AG* などの花成関連遺伝子の発現をさらに強く抑制することから、*FUL* は *API/CAL* とともに花器官の形成においても役割を果たしていると考えられる (Frrándiz et al. 2000)。花成制御メカニズムにおいて *FUL* は *API* に類似の役割を持つことが予想される一方、果実の形成・成熟においては細胞分化の制御を通して子房の正常な成長を維持するという独自の役割を果たす (Gu et al. 1998, Ferrándiz et al. 1999)。シロイヌナズナの花器官における発現部位は *API* が萼片と花弁であり、*FUL* は雌ずいであることが、それを裏付けている。ただし、*FUL* の花器官における発現部位はコア真正子葉類の中でもナデシコ科では雄ずい以外の全器官であり、また、単子葉類においてはイネ科で解析され、量にばらつきがあるものの花の全器官で発現することが示されるなど、植物種間で異なることが分かっている (Kim et al. 2005)。

定量的 RT-PCR による発現解析の結果 (Fig. 2-6)、*PnFUL1* は全 RNA 1ng 中に、萼片では約 2100 コピー、花弁では約 650 コピー、雄ずいで約 105 コピー、雌ずいで約 230 コピーが蓄積しており、イネ科のトウモロコシに似た発現様態を示した (Jackson et al. 1996)。また、*PnFUL1* は栄養成長期にある幼植物体ではほと

んど蓄積していなかった。以上の結果から、今回単離した *PnFUL1* はアサガオにおける *FUL* オーソログであると判断し、NCBI のデータベースに登録した (EU672820)。

「*AG/DP*について」

AG は花成誘導後の茎頂内で *WUS* と *LEAFY* によって直接転写が促進される花成関連遺伝子であり (Lohmann et al. 2001)、ABC モデルでは C class に属する。前述の *AP1* や *FUL* とは異なり、*AG* の C class 遺伝子としての性質は植物種間で保存性が極めて高い (Kim et al. 2005)。*AG* は MADS-box 遺伝子群に属し、MADS-box の他に K-box、I-domain および、C 末端に特徴的な *AG*-motif I と II をコードする (Ma et al. 1991, Shore and Sharrocks 1995, Peng et al. 2008)。

今回、EST ライブラリに登録されていた遺伝子配列を利用してムラサキアサガオから *AG* 様遺伝子を単離したが、時を同じくして東京古型アサガオから *AG* オーソログが単離・同定された (Nitasaka 2003)。アサガオは品種間でゲノムにほとんど違いが見られないことが知られており、本研究で単離した *AG* 様遺伝子の DNA 配列も Nitasaka が発表した *AG* オーソログと全く同じであった (data not shown)。アサガオ *AG* オーソログは八重咲きアサガオである *DUPLICATED* 変異体の原因遺伝子として特定されたため、以後この遺伝子は *AG/DP* と表記する。

AG/DP mRNA の蓄積量を定量的 RT-PCR によって解析した結果、花では雌ずいに約 7200 コピー/ng RNA、雄ずいに約 8700 コピー/ng RNA が蓄積し、花弁と萼片にはほとんど蓄積していなかった (Fig. 2-6)。これは Nitasaka による半定量

的 RT-PCR を用いた発現解析の結果と一致する (Nitasaka 2003)。また、栄養成長期にある幼植物体ではほとんど発現しておらず、わずかに葉柄と茎頂に約 0.7 コピー/ng RNA ずつが蓄積するのみであることが判明した (Fig. 2-6)。

本章で単離に成功した *PnWUS1*、*PnSTM1* は茎頂内の特定の組織で発現し、茎頂の維持に中心的な役割を果たすことが予想される。さらに、両遺伝子は、花器官の形成にも関わること、特に *PnWUS1* は花成関連遺伝子である *AG/DP* に直接作用することが予想されるため、本研究のテーマである花成制御機構の解明のために非常に重要な研究対象であると言える。*PnFUL1* と *AG/DP* は花成誘導処理に伴って茎頂で発現が誘導されることが予想されるが、両遺伝子の発現する時間帯を特定することで、茎頂が花成誘導プロセスのどの段階にあるのかを判定できると考えられる。したがって、次章では *PnWUS1*、*PnSTM1*、*PnFUL1*、*AG/DP* を茎頂の解析に用いることにした。

なお、これらの遺伝子はシロイヌナズナなどの変異体の解析から、それぞれの持つ基本的な機能については前述のとおり、すでに判明している。しかし、各遺伝子は発現する組織や、あるいは成長段階の違いによって異なる役割を果たしていることも分かっており、時間・組織特異的な機能について現在多くの研究が行われている。今後、暗処理直後のアサガオ茎頂において各遺伝子の発現や転写、あるいは分解や、各遺伝子をもとに合成されるタンパク質の機能を解析することで、花成誘導初期の成長相移行メカニズムの解明に向けて重要な知見を提供することができると考えられる。

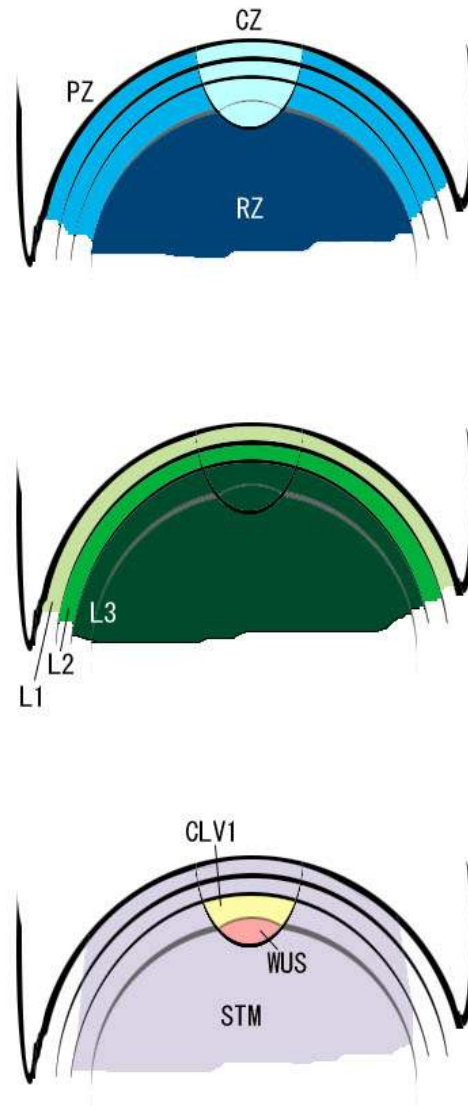


Figure 2-1. 茎頂の模式図。

上；形態学的に分類した茎頂。CZ；中央帯（central zone、□）、PZ；周辺分裂組織（peripheral zone、□）、RZ；髓状組織（rib zone、■）

中；機能的に分類した茎頂。L1；L1層（□）、L2；L2層（□）、L3；L3層（■）。

下；予想されるアサガオ *WUS*、*STM*、*CLV1* オーソログの発現部位。赤（□）；*WUS*を発現するOZ（organizing center）、紫（□）；*STM*、黄（□）；*CLV1*。


```

PnWUS1 : -----ME-PQQYQYHQTAQQGGGNEEGGGSGSKNSNVNGGGYLCRQSSSTR : 46
PhWUS : -----METACHQONNQHYLHQHLSIQQGTNIEDGSKNNSSNFMCRQNSSTR : 47
PtWUS : -----MEPHQQPNED-----NNGGAKGNFLCRQTSSTR : 28
OsWUS : -----MDHMQQQRQQ-----VGGGGGEEVAGRGGVPVCRPSGSTR : 35
AtWUS : -----MEPPCHHHHHQAD-----QESGNNNNKSGSGGYTCRQTSSTR : 37
AtWOX1 : MWTMGYNEGGADSFNGGRKLRPLIPLRTSCPTAAVNTNSDHRFNMAVVTMTAEQNKRELMMLNSEPQHPVMVSSR : 76

```

Homeodomain

```

PnWUS1 : WTPTTEQIRILKELYNNVRSPTADQIQRIQAKLRQYQKIEGKNVYWFQNHKARERQKKRLTVSATAPDAAAAA : 122
PhWUS : WTPTTDQIRILNDLYNNGVRSPTAEQIQRIQAKLRQYQKIEGKNVYWFQNHKARERQKKRLIAAATDNTN--- : 120
PtWUS : WNPPTDQIRILKELYIKVRSPNGAFTQQIQLARLRKYQKIEGKNVYWFQNHKARERQKKRLTNEVPMQORT--- : 101
OsWUS : WTPTTEQIKILRELYNSCGIRSPNSEQIQRIQAKLRQYQKIEGKNVYWFQNHKARERQKKRLTTLDVDTTTTAAAA : 111
AtWUS : WTPTTEQIKILKELYNNAIRSPTADQIQRIQAKLRQYQKIEGKNVYWFQNHKARERQKKRFRNGTNTMTPSSSPN : 113
AtWOX1 : WNPPTDQLRVLEELY-ROETRTBSADHQQIQLAQLRKYQKIEGKNVYWFQNHKARERQKKRLRQMETGHEETVLST : 151

```

*

```

PnWUS1 : ATFSMQMRQGVWRSDQCSTFN-----PASSSPGMVAVGQIGNYGGYGNVAMERSFRDCSISAGSNGNGCV : 188
PhWUS : LPMQMQRQGVWRSSADDPFHKKYTNPGVHCPSASSHGVAVGQNGNHG-YG-ALAMEKSFDCSISPGSS---MS : 191
PtWUS : -AWKPEDYYSYKYSNRFSSAS-----SSANTGVTVGQTDSHG-YGSVTMQEKNWDCSAPAGGS----- : 159
OsWUS : DADASHLAVLSLSPTAAGATAPSPFG-----FYVNGGAVQTDQANVVNWDCTAMAAEKTFLQDYMGVSGG---- : 177
AtWUS : SVMMAANDHYHPLLHHHHGVP-----MQRPANSQNVKLNQDHHLYHHNKYPSPFNNGNLNHASSG----- : 173
AtWOX1 : TSLVSNHGFDKDKDPGKYVEQAKN-----WLCVSGCDTQFEKPSRDYHLEEPANI RVEHNARCQGGDEKRS---- : 216

```

```

PnWUS1 : MAASPNYGVVDNHHHPYSSSTPYYPFLEKIKS-----TYDDHETLEEDQODE : 238
PhWUS : HHHHQFAWAGVD-----PYSSST-TYYPFLEKTK-----HFENETLEADEEQOEE : 235
PtWUS : -----NGAGSG-----SMNINYGSGVDINS-----HSSSYAVFGQEQEAA : 195
OsWUS : -----GGAAA-----APWPAMTTTT----- : 194
AtWUS : -----TECGVVNASNG-----YMSHVYGSMEQDCSMNYYNNGGGWANMDHHYSSAPYNFFDRAKPLFGLLEGHQDEE : 240
AtWOX1 : -FLGINTWQMMQLPPSFYSSHHHHQRNLLSPTVSSNMSNSNNAVSAKDTVTVVSPVFLRTRREATNTETCHRNG : 291

```

WUS-box

```

PnWUS1 : DD-----QKEP-----ETLPLFPVHTDHHHHHHNYSGKPPQESFNGGGYYT-----N : 280
PhWUS : DQENY-----YYQRTTSAIETLPLFPMHENISSFCNLK---HQESS---GGFYT----- : 279
PtWUS : AK-----IFTLPLFPMLGEDISSSFNIN---NINP---DFYY-----S : 227
OsWUS : -----REPELPLFPVGGGGDGAHRHAGHGFPSPNFQRWGSAAATNTITVQOHLQOHNFYSS : 252
AtWUS : ECGGDAYLEH-----RRTLPLFPMHGEDHING-----G : 268
AtWOX1 : DDNKDQGHEDCSNGELDHQEQTLPLPLRKEGFCSDGEKDKNISGIHCFYEFPLPLKN----- : 349

```

EAR-like

```

PnWUS1 : TDQWYHYDDNGSASRASTELSTNSYNMATSSSLHFP----- : 315
PhWUS : --EWYRADDNLAAARASTELSTNSF-IGNSS----- : 307
PtWUS : SGGYGDYNDTSSRTSDSTSYSYNGQPQDY----- : 259
OsWUS : SSSQLHSQDGAAGTSELSTSSYCS CSPYPAGSM----- : 289
AtWUS : SGAIWKYQSEVRPCASTELRN----- : 291
AtWOX1 : ----- : -

```

Figure 2-2. *WUS* 様遺伝子から予想されるアミノ酸配列のアライメント結果。ホメオドメイン内の*を付した Y 残基は *WUS* に特徴的なアミノ酸で、*AtWOX1* にはない。*AtWUS* 配列内の白枠で囲んだ部分は、酸性アミノ酸残基に富んだ特徴的な領域。*PnWUS1*; *Pharbitis nil*. (EU672818)、*PhWUS*; *Petunia x hybrida* (AF481951)、*PtWUS*; *Populus trichocarpa* (AM234747)、*OsWUS*; *Oryza sativa* (AM234746)、*AtWUS*; *Arabidosis thaliana* (NM127349)、*AtWOX1*; *Arabidopsis thaliana* *WOX1* (NM112682)。

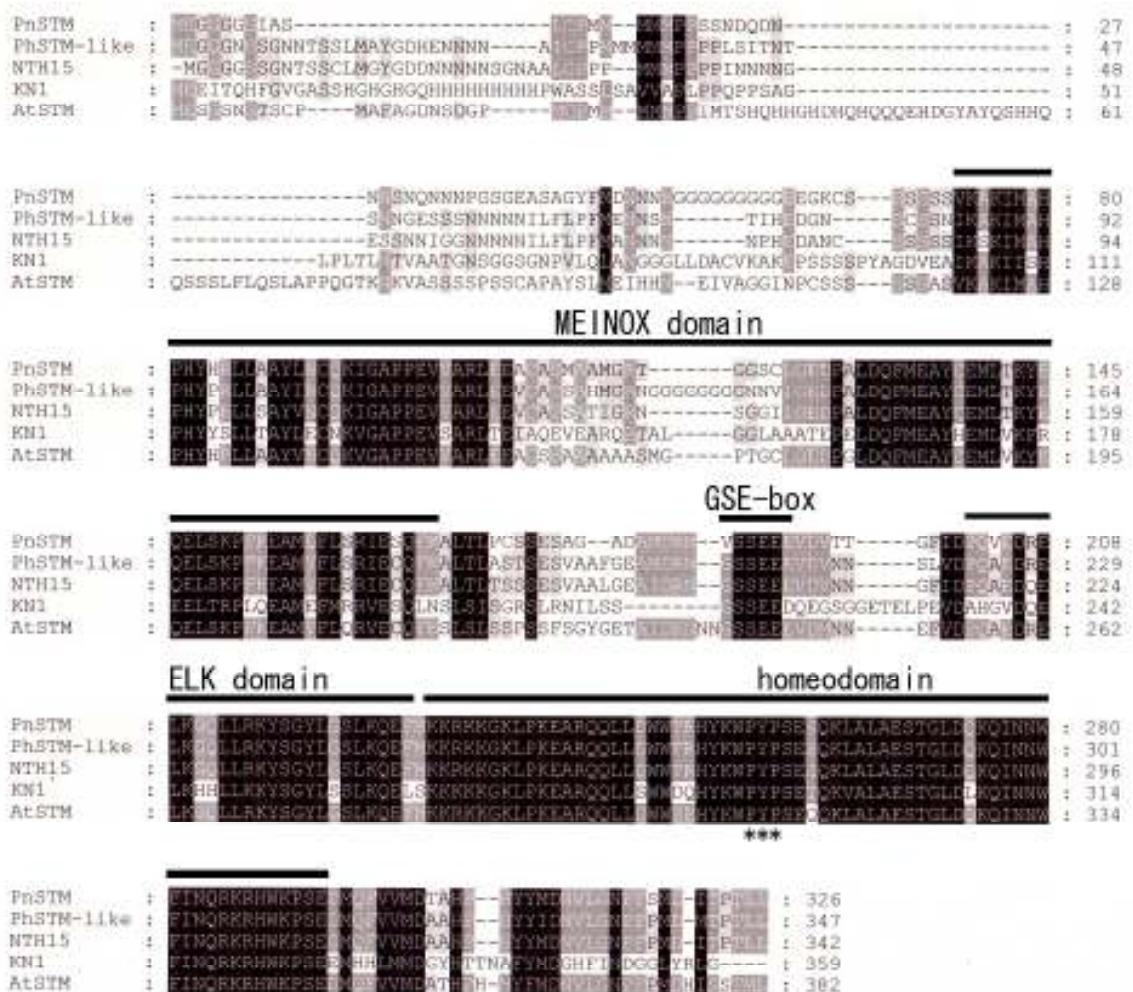


Figure 2-3. *STM*様遺伝子から予想されるアミノ酸配列のアライメント結果。

*を付した PYP 残基は TALE スーパーファミリーに特徴的なアミノ酸。 *NTH15* は、タバコの本メオボックス遺伝子、 *KN1* はトウモロコシの *STM* オーソログ。 *PnSTM1*; *Pharbitis nil* (EU672819)、 *PhSTM-like*; *Petunia x hybrida* (AY112704)、 *NTH15*; *Nicotiana tabacum* *NTH15* (AB004785)、 *KN1*; *Zea mays* (NM001111966)、 *AtSTM*; *Arabidopsis thaliana* (NM104916)。

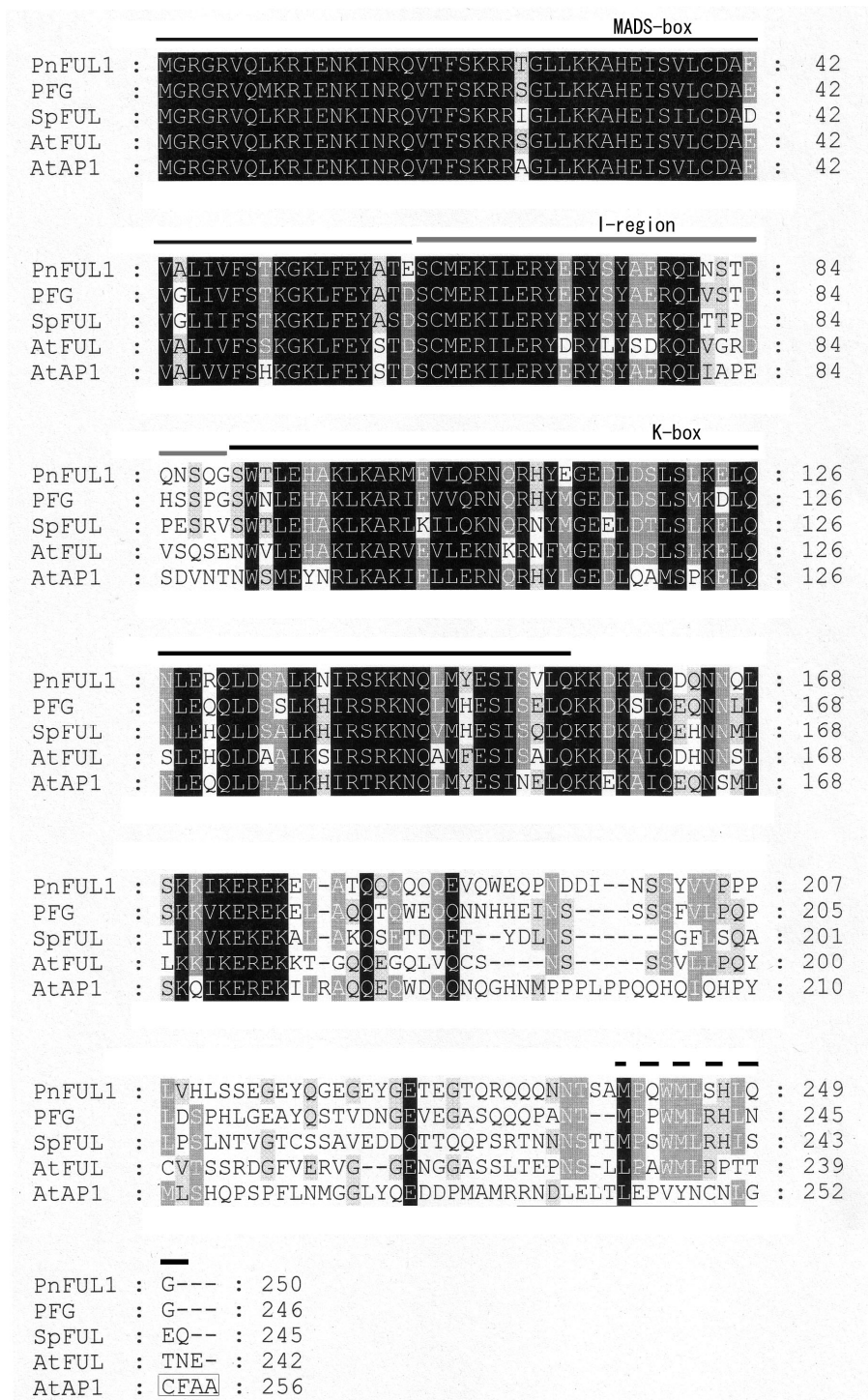


Figure 2-4. *API/FUL* 様遺伝子から予想されるアミノ酸配列のアライメント結果。C 末端の破線を付したアミノ酸は *FUL* に特徴的な配列。AtAP1 の C 末端の下線を付したアミノ酸は *API* に特徴的な配列。PFG はペチュニアの *FUL* オーソログ。PnFUL1; *Pharbitis nil*. (EU672820)、PFG; *Petunia hybrica* x. (AF17682)、SpFUL ; *Spinacia oleracea* (EU726486)、AtFUL ; *Arabidopsis thaliana* (AY072463)、AtAP1 ; *Arabidopsis thaliana API* (Z16421)。

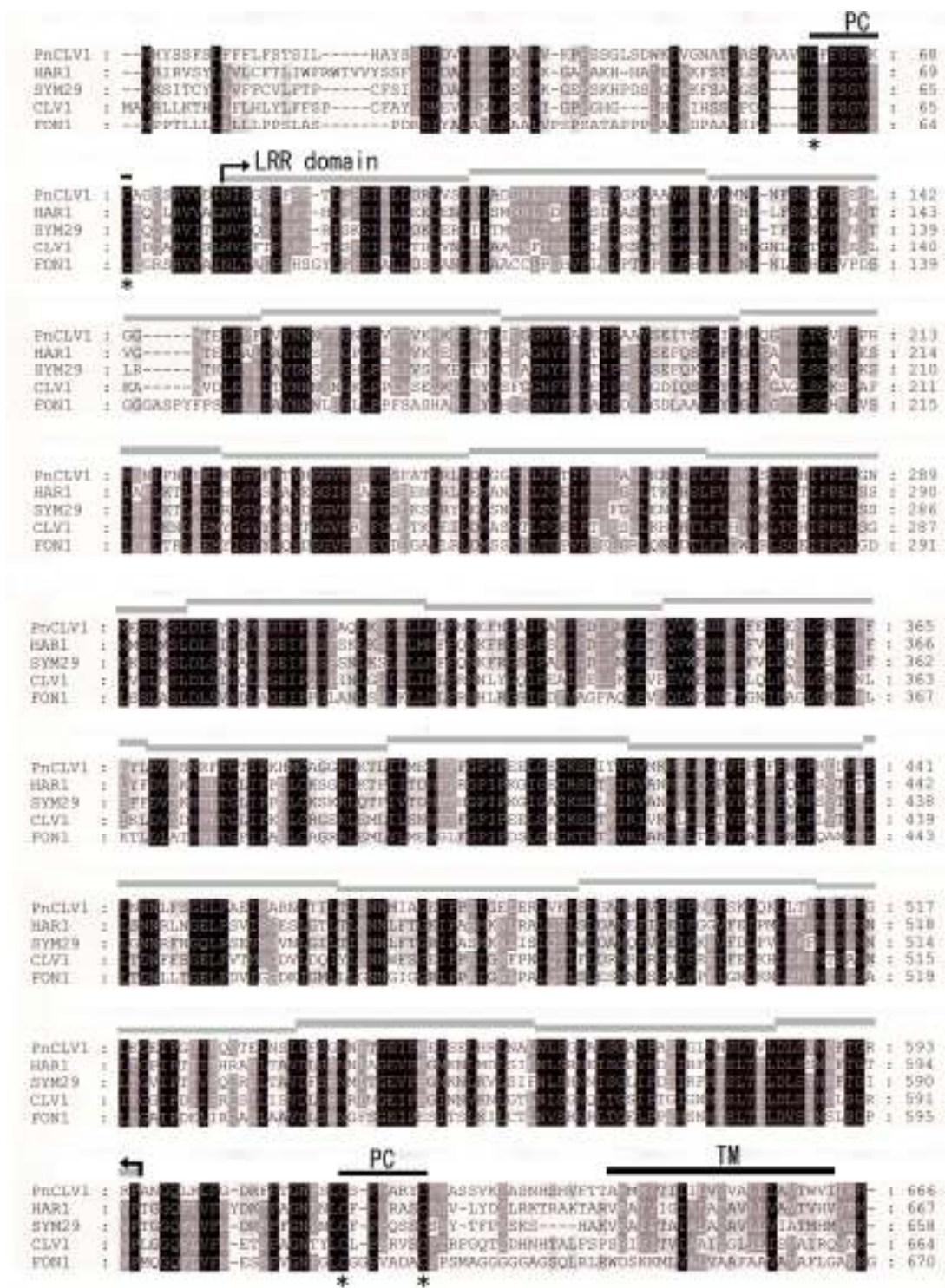


Figure 2-5. (次ページへ続く)

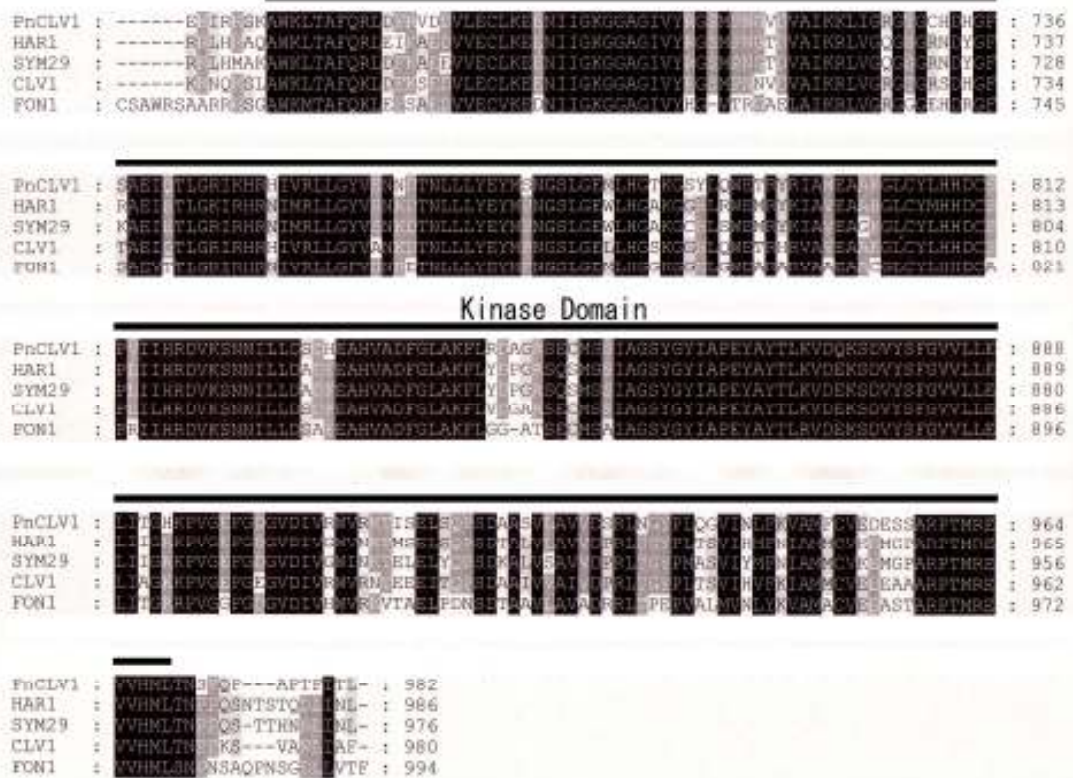


Figure 2-5. (前ページより続く) *CLV1* 様遺伝子から予想されるアミノ酸配列のアライメント結果。灰色の線一本は LRR の基本モチーフ「-φ--N-L S/T G-φ P--φ--φ--L--L (φは疎水性アミノ酸残基)」を示す。LRR domain は基本モチーフが 21.5 回連続した構造になっている。

*を付した C 残基は PC (paired cystein) の中にある保存性の高いアミノ酸。TM; 膜貫通領域。この領域から上流部分が細胞膜の外側に、キナーゼ部分が内側に位置する。*SYM29* はエンドウの *HAR1* オートソログ。*FON1* はイネの *CLV1* オートソログ。*PnCLV1*; *Pharbitis nil CLV1-like*、*HAR1*; *Lotus japonicus HAR1* (AJ495844)、*SYM29*; *Pisum sativum SYM29* (AJ495759)、*CLV1*; *Arabidopsis thaliana CLV1* (NP172335)、*FON1*; *Oryza sativa FON1* (AB182389)。

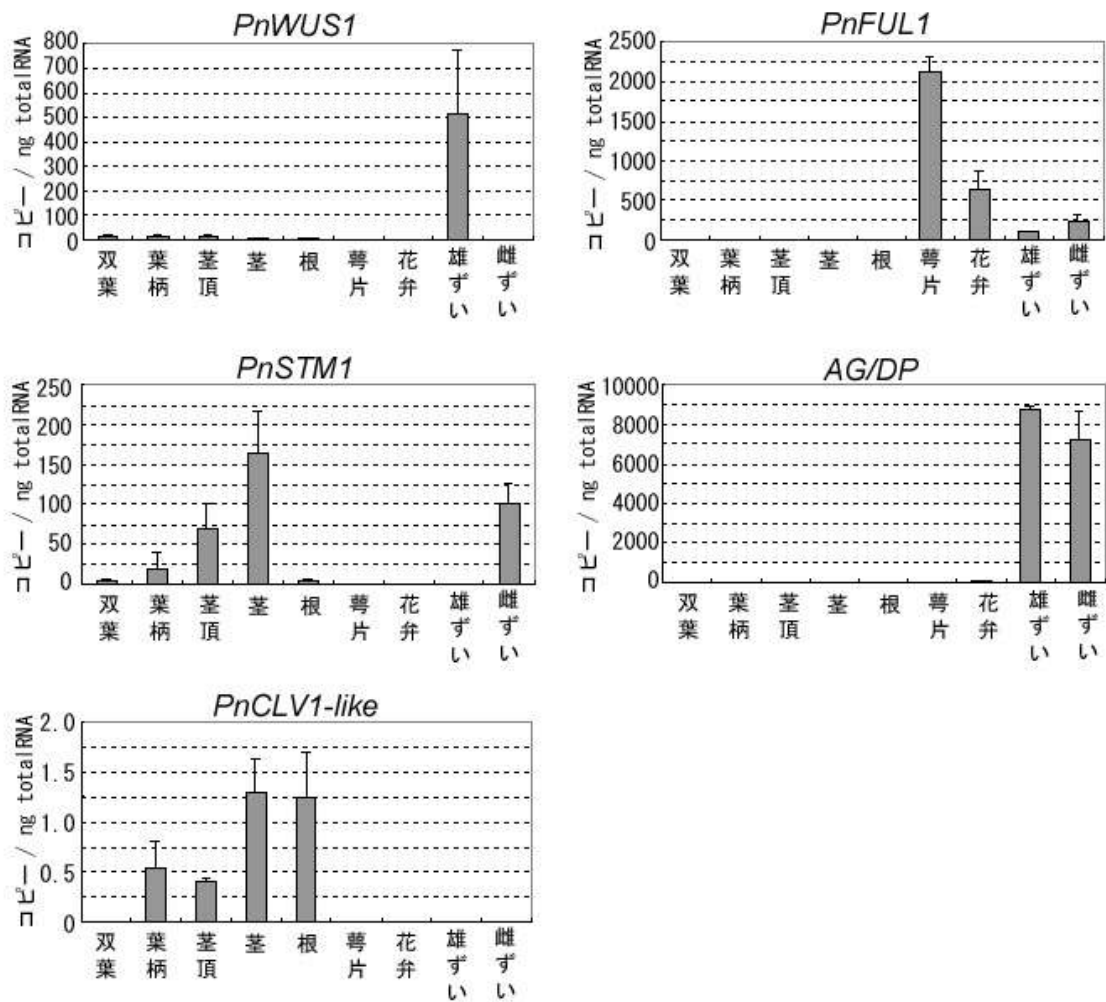


Figure 2-6. 幼植物体の 5 器官（双葉、葉柄、茎頂、茎、根）と花の 4 器官（萼片、花弁、雄ずい、雌ずい）における *PnWUS1*、*PnSTM1*、*PnCLV1-like*、*PnFUL1*、*AG/DP* mRNA の定量結果。花の解析には開花前のつぼみを使用した。N=3。

第3章 花成誘導初期の茎頂で発現する遺伝子の解析

第1節 茎頂の組織分類と花成誘導プロセスの同定

3-1-1 緒言

前章により、茎頂の組織を同定するために有効な *WUS* および *STM* のオーソログ遺伝子である *PnWUS1* と *PnSTM1* を単離することに成功した。本節ではこれらの遺伝子を用いてアサガオ茎頂の組織を分類し、第1章で Mg^{2+} の高濃度局在が見られた組織を同定することで、 Mg^{2+} の花成誘導に果たす役割について考察した。また、花成マーカー遺伝子である *PnFUL1* と *AG/DP*、さらに、筑波大学の研究グループによって単離されたアサガオ *API* オーソログである *PnAPI*(AB302848) の経時的な発現解析を行い、 Mg^{2+} の局在に変化が生じた SD4h におけるアサガオ茎頂が、花成誘導プロセスのどの段階にあるのかを確認した。

花成誘導のプロセスについては、シロイヌナズナにおいて大まかな分類がなされている。電子顕微鏡による形態観察の結果から、花成誘導から花形態の完成までが 1~12 の stage に分けられており (Bowman et al. 1989)、茎頂の脇に花の原基が盛り上がるように現れる段階が stage 1 である。遺伝子の発現様態解析から、stage 1 では *API* が花原基特異的に発現することが分かっている (Hempel et al. 1997, Abe et al. 2005)。また、この段階に達した花原基はその後、不可逆的に花を形成する (Hempel et al. 1997)。その後、stage 3 に至ると、花芽は中央の丸い膨らみの

縁が徐々に凹み、浮き輪状の組織が花芽を囲むような形態になる (Bowman et al. 1989)。この浮き輪状の組織は将来萼片になる。この stage3 では、*AG/DP* の発現が始まることが報告されている (Smyth et al. 1990)。花成誘導直後に *API* よりも早く発現するのが *FUL* である。*FUL* の発現が開始する段階の茎頂は、電子顕微鏡では花原基の形成などの形態変化はまだ確認できない。また、茎頂で *FUL* の発現が始まっても、まだ栄養成長相から完全に脱してはいない (Hempel et al. 1997)。なお、生育条件や品種によって多少の差異は見られるが、*in situ* hybridization (ISH) 法を用いた解析結果によると、花成を誘導する長日処理の終了から茎頂および葉原基で *FUL* の発現が見られるまでに概ね 16~24 時間、*API* が花原基特異的に発現するまでに概ね 72~96 時間を要する (Hempel et al. 1997, Wigge et al. 2005)。

本節では短日処理終了時 (SD0h) から 48 時間後までの各時間において、花成マーカー遺伝子のアサガオ茎頂における蓄積量を定量的 RT-PCR によって解析することで、アサガオ茎頂における花成誘導プロセスのタイムコースを提示した。さらに、花成マーカー遺伝子と同時に *PnWUS1* と *PnSTM1* の茎頂での蓄積量も定量し、他植物でも研究報告の少ない、花成誘導初期における両遺伝子の発現様態を明らかにした。

3-1-2 実験方法

***in situ* hybridization 法**

in situ hybridization (ISH) 法により、*PnWUS1*、*PnSTM1*、*PnFUL1* の茎頂内局在を解析した。*PnWUS1* と *PnSTM1* の解析には *SD0h* の茎頂を、*PnFUL1* の解析には *SD48h* の茎頂を用いた。ISH 法は主に Kim らがアサガオ *CO* オーソログの解析に適用した実験条件 (Kim et al. 2003) を参考にした。

組織サンプルの作成

試薬

FAA 液

5% 酢酸

50% EtOH

3.7% ホルムアルデヒド

EosineY 液

Eosine Yellowish (Chroma 社製) を 20%(w/v)になるよう 100%EtOH に溶解したものを stock 溶液として冷蔵保存。

Histo-Clear

National Diagnostics 社製。

パラプラスチック

Paraplast Plus、Sigma 社製。

操作

1. 茎頂部 (直径 1mm×長さ 5mm 前後) を切り出し、FAA 液に浸漬。
2. 室温にて 4 時間振盪。
3. 100%EtOH に移し、氷上にて 2 時間振盪。
4. 0.2%EosineY 液を含む 100%EtOH に移し、4℃にて一晩振盪。
5. 0.2%EosineY 液を含む 100%EtOH を交換し、室温にて 1 時間振盪。
6. EtOH : Histo-Clear = 3 : 1 の液に移し、室温にて 1.5 時間振盪。
7. EtOH : Histo-Clear = 1 : 1 の液に移し、室温にて 1.5 時間振盪。
8. EtOH : Histo-Clear = 1 : 3 の液に移し、室温にて 1.5 時間振盪。
9. Histo-Clear に移し、室温にて 2 時間振盪。

10. Histo-Clear を交換し、42℃にて静置。
11. 1/4 量のチップ状パラプラストを加え、42℃にて静置。
12. 1/4 量のチップ状パラプラストを追加し、42℃にて静置。
13. パラプラストが完全に溶解したら、60℃にて静置。
14. あらかじめ 60℃にて溶解させておいたパラプラストに移し、60℃にて一晩静置。
15. 朝と夕にパラプラストを交換し、一晩静置。
16. 朝と夕にパラプラストを交換し、一晩静置。
17. ディスポーザブル秤量皿に入れたパラプラストに茎頂を包埋し、室温にて静置。
18. パラプラストが白く固まったら、冷蔵庫にて保存。

DIG 標識 RNA プローブの作成

RNA 抽出

LL4h (*PnWUS1*、*PnSTM1*) あるいは SD48h (*PnFUL1*) の茎頂より RNA を抽出した。抽出には Get *pure* RNA kit (Dojindo) を使用した。試薬および操作の実際はキット付属のプロトコール（組織用）に従った。

逆転写

逆転写には、Super Script® III First Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) を使用し、Oligo(dT)₂₀ プライマーを用いて cDNA を合成した。試薬および操作の実際はキット付属のプロトコールに従った。

PCR

ExTaq® (タカラバイオ) を用いて PCR を行った。

プライマー

PnWUS1 ; ISFw 5'-GGCGTCTCCAAACTATGGTT-3'

ISRv 5'-GCAGACCCATTGTCGTCGTA-3'

PnSTM1 ; ISFw 5'-GCCTTCTAGCAACGACCAAG-3'

ISRv 5'-GCTCCAATCTTCTGGCAGTT-3'

PnFUL1 ; ISFw 5'-GTTTCAGTGGGAGCAGCCTAA-3'

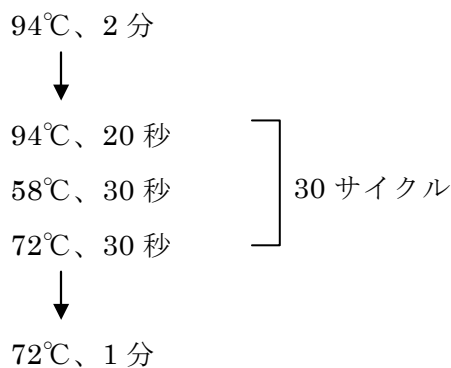
ISRv 5'-AGGTGGCTAAGCATCCACTG-3'

それぞれの遺伝子内の位置は付録 1~3 を参照。

PCR 反応液組成

| | |
|-------------------------|--------|
| 10× <i>ExTaq</i> Buffer | 2.5μl |
| 2.5mM dNTP Mixture | 2μl |
| 10μM Fw プライマー | 1μl |
| 10μM Rv プライマー | 1μl |
| 5units/μl <i>ExTaq</i> | 0.3μl |
| テンプレート cDNA | 1μl |
| 超純水 | 17.2μl |
| <hr/> | |
| | 25μl |

PCR 条件



クローニング

PCR 産物をゲル電気泳動後、切り出し、精製したものを pGEM®-T Easy プラスミドベクター (Promega) にクローニングした。操作の実際は製品付属のプロトコールに従った。

プラスミドの直鎖化

プラスミドを *Apa I* (Promega) あるいは *Spe I* (Promega) にて処理し、直鎖化した。*Apa I* で処理したプラスミドはエタノール沈殿後、T4 DNA Polymerase (Promega) にて処理し、平滑末端化した。反応液組成、反応条件など操作の実際は製品付属のプロトコールに従った。処理後のプラスミドは脱塩精製し、10mM Tris-HCl(pH8.5)液に溶解した。

RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写

約 500ng の直鎖状プラスミドをテンプレートとし、DIG RNA Labeling Kit [SP6/T7] (Roche) を使用して *in vitro* 転写を行った。反応液組成、反応条件など操作の実際は製品付属のプロトコールに従った。合成後のプローブは脱塩精製し、30 μ l の超純水に溶解した。

ハイブリダイゼーション

試薬

Histo-Clear

0.2N HCl

1N HCl を超純水で 5 倍希釈。

1 \times TE(pH8.0)

10mM Tris-HCl(pH8.0)

1mM EDTA(pH8.0)

Proteinase K 液

Proteinase K を 10 μ g/ml になるよう 1 \times TE(pH8.0)に溶解。

10 \times PBS

1.37M NaCl

27mM KCl

100mM Na₂HPO₄ (H₂O)₁₂

18mM KH₂PO₄

HCl で pH を 7.4 に調整し、オートクレーブ。使用時は超純水で適宜希釈。

4% PFA/PBS

1.2g パラホルムアルデヒド粉を 27ml の超純水に加え、60 $^{\circ}$ C に加熱した上、5N NaOH 1 μ l を添加し、攪拌して溶解。溶解後は室温に冷却し、10 \times PBS を 3ml 添加。

0.25% 無水酢酸/0.1M トリエタノールアミン

トリエタノールアミン 0.45g を超純水に溶解し、HCl で pH を 8.0 に調整後、30ml にメスアップ。使用直前に無水酢酸 75 μ l を添加し激しく攪拌。

ハイブリ液

50% ホルムアミド

0.3M NaCl

10mM Tris-HCl(pH7.5)

10mM EDTA(pH7.5)

1 \times Denhardt's 液

30mM DTT

1mg/ml Yeast tRNA

5% 硫酸デキストラン

20 \times SSC

3M NaCl

0.3M クエン酸ナトリウム

NaOH で pH を 7.0 に調整し、オートクレーブ。使用時は超純水で適宜希釈。

RNase A 液

20 μ g/ml RNase A

0.5M NaCl

10mM Tris-HCl(pH8.0)

1mM EDTA(pH8.0)

TBS

100mM トリス塩基

150mM NaCl

HCl で pH を 7.5 に調整し、オートクレーブ。

0.5% ブロッキング試薬

Blocking Reagent (ロシュ) を 0.5%(w/v)になるよう TBS に溶解。

BXT

BSA を 1%(w/v) 、 TritonX-100 を 0.3%(v/v)になるよう TBS に溶解。

X-TBS

TritonX-100 を 0.3%(v/v)になるよう TBS に溶解。

Buffer C

100mM Tris-HCl(pH9.5)

50mM MgCl₂

100mM NaCl

操作

温度については、特に記載した操作以外は室温で行った。

1. パラフィン包埋したサンプルをマイクロトームで 15 μ m 厚 (*PnWUS1*) ある
いは 10 μ m 厚 (*PnSTM1*、*PnFUL1*) の切片にする。
2. パラフィン切片は超純水に浮かべておき、スライドガラス
(SUPERFROST®PLUS SLIDES、MJ RESEARCH) に直接掬い取るよう
にして乗せる。
3. 切片を乗せたスライドガラスは 37°Cにて一晩静置。
4. Histo-Clear にスライドガラスを 15 分間浸漬。
5. Histo-Clear を交換してスライドガラスを 15 分間浸漬。
6. 100%~30%の EtOH 系列に 20 秒間ずつ浸漬。
7. 超純水で 2 回リンス。
8. 0.2N HCl に 10 分浸漬した後、1×TE(pH8.0)でリンス。
9. Proteinase K 液に浸漬し、37°Cにて 30 分間静置。
10. 4% PFA/PBS に浸漬し、10 分間穏やかに振盪。
11. 0.25% 無水酢酸/0.1M トリエタノールアミンに浸漬し、10 分間穏やかに
振盪。
12. 70%、90%、100%EtOH に 10 秒間ずつ浸漬した後、風乾。

13. ダコペン (Dako) で切片を囲い、さらに風乾。
14. プローブを含まないハイブリ液をダコペンで囲った部分に垂らし、密閉容器に入れ、40~45°Cのハイブリオープン内に 2 時間静置。密閉容器には乾燥を防ぐため、50%ホルムアミドに浸したペーパータオルを敷いておく。
15. 0.5~1 μ g/ml のプローブを含むハイブリ液に交換し、密閉容器に入れ、40~45°C (14.と同じ温度) のハイブリオープン内に一晩静置。
16. 2 \times SSC に浸漬し、37°Cにて 15 分間穏やかに振盪。
17. 1 \times SSC に浸漬し、15 分間穏やかに振盪。
18. RNase A 液に浸漬し、37°Cにて 20 分間静置。
19. 0.5 \times SSC に浸漬し、15 分間穏やかに振盪。
20. 0.5% ブロッキング試薬に浸漬し、1 時間静置。
21. BXT に浸漬し、30 分間静置。
22. AP 標識 DIG 抗体 (Roche) を BXT で 1000 倍に希釈した液に浸漬し、1 時間静置。
23. X-TBS に浸漬し、15 分間穏やかに振盪。
24. X-TBS を交換して浸漬し、15 分間穏やかに振盪。
25. Buffer C に浸漬し、5 分間穏やかに振盪。
26. NBT/BCIP stock solution (Roche) を Buffer C で 100~400 倍に希釈した液に浸漬し、遮光して静置。時々発色の様子を確認する。
27. ちょうど良い発色が見られたら、TE、さらに 100%EtOH でリンスし、風乾。
28. 顕微鏡で観察。

定量的 RT-PCR

RNA 抽出

植物の育成条件は第 1 章に準ずる。16 時間短日処理によって花成を誘導した植物から新芽部分を、短日処理終了時 (SD0h) から 4 時間後 (SD4h)、8 時間後 (SD8h)、24 時間後 (SD24h)、48 時間後 (SD48h) に採取し、そこから第一本葉、あるいは第二本葉以下の基部組織を切除したものを茎頂サンプルとした。また、対照区として、連続明期下で同時間育成した植物からも茎頂を採取し、LL0h~LL48h サンプルとした。なお、5 つの茎頂を 1 サンプルとし、各サンプル 2 連で準備した。RNA の抽出には Get *pure* RNA kit (Dojindo) を使用した。試薬および操作

の実際はキット付属のプロトコール（組織用）に従った。

リアルタイム PCR

第 2 章に準ずる。ただし、逆転写では 1 μ l あたり 50ng の totalRNA をテンプレートとした。*PnAPI* の解析では、SD48h のサンプルを段階希釈したものを検量線として用い、SD48h における *PnAPI* の蓄積量を 1 とした相対値を算出した。プライマーは Fw; ATGGGAGCAGCAAATCATC と Rv; GGCTGTTGAAA GAGGAAGGA を 200nM で使用した。

3-1-3 結果および考察

PnWUS1 と *PnSTM1mRNA* の ISH 法による発現解析の結果を Fig. 3-1 に示した。供試サンプルであるこの茎頂は、先端部一帯に Mg^{2+} が局在し、中央付近には特に Mg^{2+} が高濃度に集積する細胞群が確認された、短日処理終了時 (SD0h) のものである。*PnWUS1* の発現は、茎頂先端部中央の最外層から数えて 5 層目に存在する数個の細胞（緑矢印）に限られていた (Fig. 3-1)。したがって、アサガオではこの数個の細胞からなる組織が OC (organizing center) であり、真上に位置する組織が中央帯 (Fig. 2-1) に分類することができる。Fig. 3-1 と Fig. 1-5 D を比較すると、 Mg^{2+} が特に高濃度に集積している組織（黄矢印）は OC の上部、つまり中央帯内に位置していることが分かる。一般的な植物茎頂の中央帯には、各層に 1~3 個の幹細胞が存在することを考慮に入れると、 Mg^{2+} が高濃度に集積している細胞は幹細胞である可能性が高い。また、*PnWUS1* を発現する組織=OC は、 Mg^{2+} が局在する組織の外縁に位置していると思われた。

PnSTM1 は、茎頂先端部の最外層とその内側一層での発現量は少なく、3 層目

～5 層目に多く発現していた。また、原基となる組織（青矢印）では発現していなかった（Fig. 3-1）。*KNOTTED* class 1 の中でも *KN1* や *STM* の mRNA は、茎頂組織内においては先端部の CZ を中心とした未分化組織に最も多く蓄積し、茎にもわずかに蓄積する一方で、葉や花の原基では蓄積が見られないことが知られている（Jackson et al. 1994, Long et al. 1996）。この点、Fig. 3-1 に示した *PnSTM1* の発現様態も *KN1* や *STM* の発現様態と類似である。特に、*PnSTM1* の発現量が茎頂先端部の最外層とその内側一層で少ないという結果は *KN1* の発現様態に酷似している（Jackson et al. 1996）。なお、トウモロコシ KN1 タンパク質は mRNA とは異なり、最外層、その内側一層を含む茎頂全体に存在する（Jackson et al. 1996）。一方、*KN1* のオーソログであるシロイヌナズナ *STM* mRNA はトウモロコシ KN1 タンパク質と同様に茎頂全体で発現する（Long et al. 1996）。

茎頂における *KN1/STM* の重要な役割は当該組織を未分化状態に保つことである。このことは、アサガオ *KN1/STM* オーソログである *PnSTM1* を発現する組織は未分化組織であることを示している。Fig. 3-1 と Fig. 1-5 D を比較すると、 Mg^{2+} が局在する組織のほとんどが未分化組織であると考えられた。特に、*PnSTM1* と Mg^{2+} の蓄積量がともに最外層とその内側一層に少なく、それよりも内側（L3 層）に多いという事実は、「 Mg^{2+} が局在する組織≒未分化組織」という考えを強く支持する。以上、*PnWUS1* と *PnSTM1* の ISH 法による解析結果から、第 1 章で観察された茎頂先端部の Mg^{2+} 局在組織は未分化細胞の集合体、すなわち、茎頂メリステムである可能性が示された。

次に、SD0h～SD4h の茎頂が花成誘導プロセスのどの段階にあるのかを特定す

るため、花成マーカー遺伝子の茎頂における発現解析を行った。最近になって NCBI データベースにアサガオ *API* オーソログである *PnAPI* も登録されたため、*PnAPI* についても相対定量を行った。なお、本章でいう茎頂とは、前章で茎頂として扱った組織から第一本葉以下の茎頂基部組織を除くことで、より茎頂先端部に特化した組織である。また、花成誘導後 24 時間、48 時間目の茎頂については第二本葉以下を切除した。

PnFUL1 は早くも短日処理終了時には対照区の約 18 倍にあたる 38 コピー/ng RNA が蓄積しており、SD4h にはさらに 8 倍に増加して約 320 コピー/ng RNA が蓄積していた (Fig. 3-1-2)。*PnFUL1* の蓄積量は SD8h と SD24h においては SD4h と同等の約 400/ng RNA 前後にとどまっていたが、SD24h 以降は SD48h にかけて再度増加して約 1200/ng RNA となった (Fig. 3-1-2)。一方、*PnAPI* の蓄積量は SD8h において増加を開始し、対照区に比べ SD8h で約 7 倍、SD24h で約 14 倍、SD48h には約 22 倍と、順調に増加していった (Fig. 3-1-2)。この結果は、アサガオ茎頂は短日処理終了から 8 時間後には、遺伝子発現レベルでは、シロイヌナズナにおける stage 1 の状態に到達していることを示していると考えられる。

シロイヌナズナの *API* の転写を促進するのは FT/FD タンパク質複合体で、この作用は直接的なものであることが知られおり、*FD* を葉で発現させる変異体を用いた実験からは、*FT* が発現すると、その後 2 時間以内に *API* が発現を開始することが示されている (Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005)。ところが、実際に茎頂内において *API* の発現が見られるのは、茎頂の形態に変化が確認できる段階である stage 1 になってからであり、時間になると花成誘導処理から約 3 日後である

(Hempel et al. 1997, Abe et al. 2005, Wigge et al. 2005)。このように、*API*が発現を開始する時間には、花成ホルモンの到達推定時刻（シロイヌナズナでは測定できないが）とは時間的なギャップが存在することが指摘されているが、ギャップが生じる理由はまだ分かっていない (Searle et al. 2006, Kobayashi and Weigel 2007)。アサガオ茎頂における *PnAPI* の発現も、少なくとも短日処理終了から 4 時間までは開始しないことが明らかとなったが (Fig. 3-2)、第 1 章の双葉切除実験によると花成ホルモンは短日処理終了から 2 時間後には完全に茎頂に到達することが確認されており (Fig. 1-1)、シロイヌナズナで見られた「FT 到達から *API* 発現までの時間的ギャップ」がアサガオにおいても存在することが示された。

これに対し、*PnFUL1* は短日処理終了前に発現が開始していると考えられた。シロイヌナズナでも *FUL* の発現が花成誘導処理後速やかに開始することが ISH 法や *FUL::GUS* を導入した植物の解析からすでに判明しており (Hempel et al. 1997)、アサガオ *PnFUL1* の発現様態も *FUL* と同様であることが示された。ただし、*API* とは異なり、*FUL* 発現のメカニズムについては未解明な点が多く、本実験で観察された花成誘導直後の *PnFUL1* の発現も、その分子機構は不明である。この点、花成ホルモンが茎頂に到達する時間帯 (Fig. 1-1; SD0h=12.5%、SD2h=100%) と *PnFUL1* の茎頂における発現様態 (Fig. 3-2; SD0h=38 コピー/ng RNA、対照区の 18 倍、SD4h=320 コピー/ng RNA、対照区の 65 倍) に相関が見られたことは非常に興味深い。*PnFUL1* の発現が双葉から移行してきたシグナルによって誘導されたものだとすると、そのシグナル — Fig. 1-1 に表された時間帯かそれ以前に茎頂に移行し、花成誘導にとって十分条件となる物質 — の正体が問題となる。そのような物

質の第一の候補となるのは FT タンパク質である。実際、FT/FD 複合体が *FUL* に作用する可能性は総説にも示されている (Kobayashi and Weigel, 2007)。この予想が正しいとすると、FT/FD 複合体が *API* よりも低い閾値で *FUL* の発現を直接誘導するはずで、そうでなければ、*API* よりも早期に *FUL* が発現する事実を説明できない。シグナルとして次に考えられるのは FT タンパク質以外の物質であるが、そのような物質の存在が最近の複数の研究によって示されている。Searle らは、*FD* が花成誘導前から茎頂で発現しているが、花成誘導後にはさらに発現が促進されるという事実に着目して実験を行い、この *FD* の発現の促進が *FT* によらないことを示した上で、*FD* の発現を促進する葉由来物質として、通常は *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) によって発現が抑制されている遺伝子 X を提起した (Searle et al. 2006)。

シロイヌナズナの葉において、*CO* の下流で長日花成に作用するのは *FT* のみであることがマイクロアレイ Affymetrix ATH1 を利用した実験からは判明しているが (Wigge et al. 2005)、*FLC* は *CO* とは別の経路に位置する遺伝子で、*CO-FT* 経路と並立が可能である。*FUL* の発現も、FT タンパク質以外の物質によって誘導されると仮定すると、*FUL* は花成を促進するが、花成誘導には不十分であるという事実の説明も可能となる。この場合、*FUL* や *FD* の発現を誘導する物質は花成誘導の必要条件で花成誘導処理直後に茎頂に到達し、そのような物質と同時か、あるいは遅れて茎頂に到達する FT タンパク質は花成誘導の十分条件と位置づけられる。また、X 以外にも、*CO-FT* 経路とは独立に *API* と *LFY* の発現を促進する遺伝子として *AGL17* が最近報告された (Han et al. 2008)。このように、花成誘導初期には FT タンパク質以外の花成促進物質が茎頂へ移行する可能性が高まっている。

PnFUL1 mRNA の茎頂における蓄積量は SD4h にかけて増加した後、SD24h ~SD48h にかけて一段と増加されており (Fig. 3-2)、*PnFUL1* の発現が二段階の促進制御を受けていることが示唆された。これに類似した事例としては、例えば *API* は FT/FD 複合体によって直接発現が誘導されるのに加え、FT/FD 複合体によって発現が促進された *SOC1* 遺伝子によってさらに *API* の発現が促進されるという、Feed Forward 制御を受ける (Kobayashi and Weigel 2007)。第 2 章で触れた通り、遺伝学的に *FUL* は *API* に非常に似た性質を示すことから、*FUL* や *PnFUL1* も、*API* のような二段階の発現機構を持つ可能性は十分考えられる。

SD48h における *PnFUL1* の発現組織を ISH 法によって解析した結果、*PnFUL1* は茎頂先端部および第三本葉と第四本葉の腋芽に広く発現していることが示された (Fig. 3-3)。シロイヌナズナの *FUL* は *API* の発現後は花原基特異的に発現することから (Hempel et al. 1997)、*PnAPI* の発現後である SD48h において *PnFUL1* の発現が見られた組織は、完全に花芽として機能していると考えられる。なお、*FUL* タンパク質が作用する対象として、class C である *AG* と、class E として花器官の形成に関わる *SEPALLATA* 遺伝子群が yeast two-hybrid を用いたスクリーニングから提示されている (Kater et al. 2006)。したがって、SD48h においては *AG/DP* の発現はまだ開始していなかったものの (Fig. 3-2)、SD48h 以降の比較的早い時期に *AG/DP* の発現が開始し、花器官が形成され始めることが予想された。以上のことから、SD48h のアサガオ茎頂は、シロイヌナズナにおける stage 2 にあると考えた。

PnWUS1 と *PnSTM1* の ISH 法による発現解析には SD0h の茎頂を用いた。Mg²⁺

の局在に変化が生じる SD4h の茎頂での局在については確認していないが、*STM* と *WUS* の発現組織は花成誘導後少なくとも stage 6 までには変化がないとされている (Long et al. 1996, Mayer et al. 1998)。したがって、アサガオ茎頂においても SD4h での両オーソログ遺伝子の発現組織は SD0h と同様であると考えられたが、花成誘導初期における発現量については解析した例がないため、本節において定量を試みた。その結果、*PnWUS1* と *PnSTM1* の発現量に花成誘導の有無による大きな差異は認められず、*PnWUS1* はおおよそ 1.2 コピー/ng RNA、*PnSTM1* はおおよそ 80 コピー/ng RNA が蓄積していた。ただし、花成誘導処理をした場合、特に *PnWUS1* が SD0h から SD24h にかけて蓄積量が一時的に増加する現象が見られた。この原因は定かではないが、暗期の中に低下していたショ糖濃度が、明期になって急激に上昇し (小林 修士論文 2003)、細胞活性を上昇させることが関係するのではないかと思われた。また、一時的に蓄積量が増えた *PnWUS1* も SD48h には対照区と同程度の蓄積量になったのは、Feed Back 制御のような機構が働いたためではないかと推察されたが、正確な理由は不明である。*PnWUS1* と *PnSTM1* の蓄積量が花成誘導の有無によって影響を受けなかったことは、両遺伝子が花成誘導後も対照区と同様に発現し、茎頂のメリステム性の維持に関わっていることを示唆するものであると考えられた。

本節から、短日終了から 4 時間目までのアサガオ茎頂は、花成シグナルを受容してから stage 1 に至るまでの過渡期にあることが判明した。この時間帯は、FT/FD—*API* 間で見られるギャップに相当する時間帯であることにも現れているように、花成誘導の遺伝子制御メカニズムの中でも未解明な点が多い時間帯である。そこで

次節では、花成誘導後 4 時間目において観察された Mg^{2+} 局在の変化が花成制御メカニズムに果たす役割について検討を試みた。

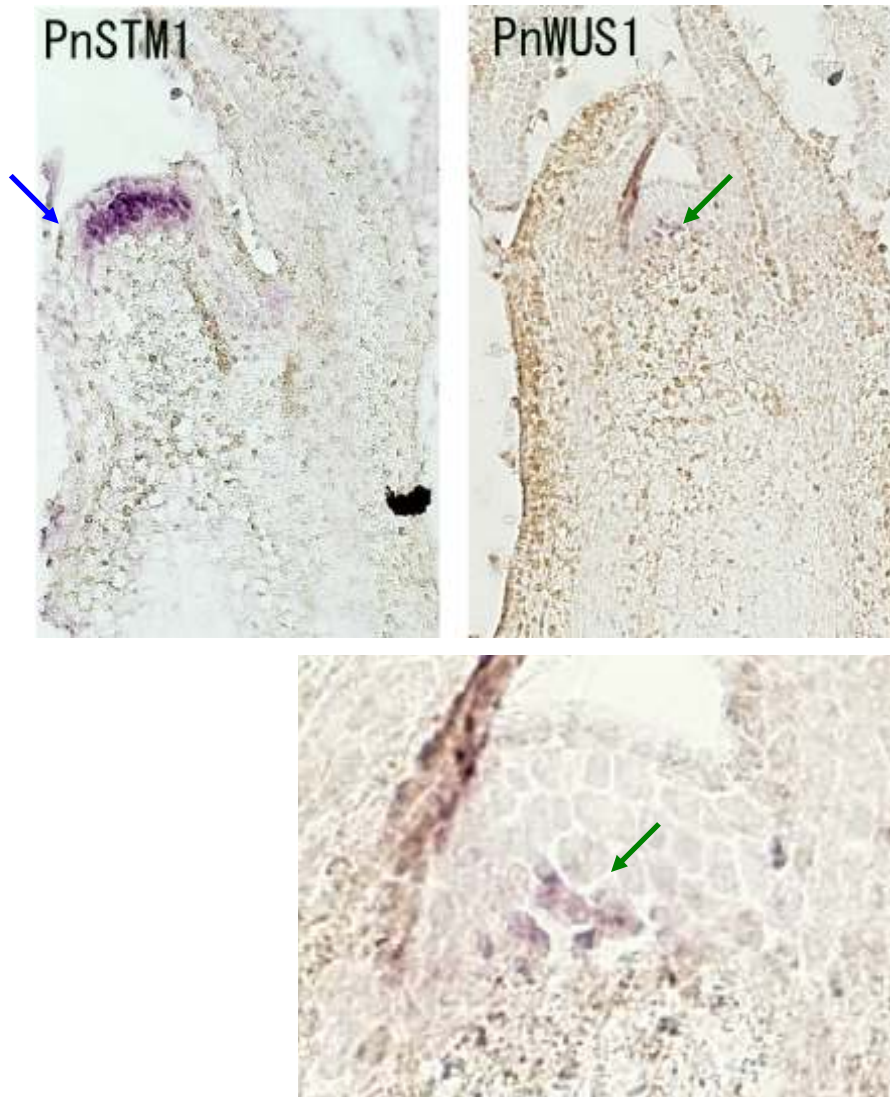


Figure 3-1-1. *PnSTM1* (左) と *PnWUS1* (右) の *in situ* hybridization 法による SD0h の茎頂での発現解析。*PnSTM1* は茎頂先端部の外縁で分化が始まった組織では発現していない (青矢印)。

PnWUS1 の発現解析結果の茎頂先端部を拡大し、下段に付した。中央帯の一部に *PnWUS1* を発現する細胞が確認できる (緑矢印)。

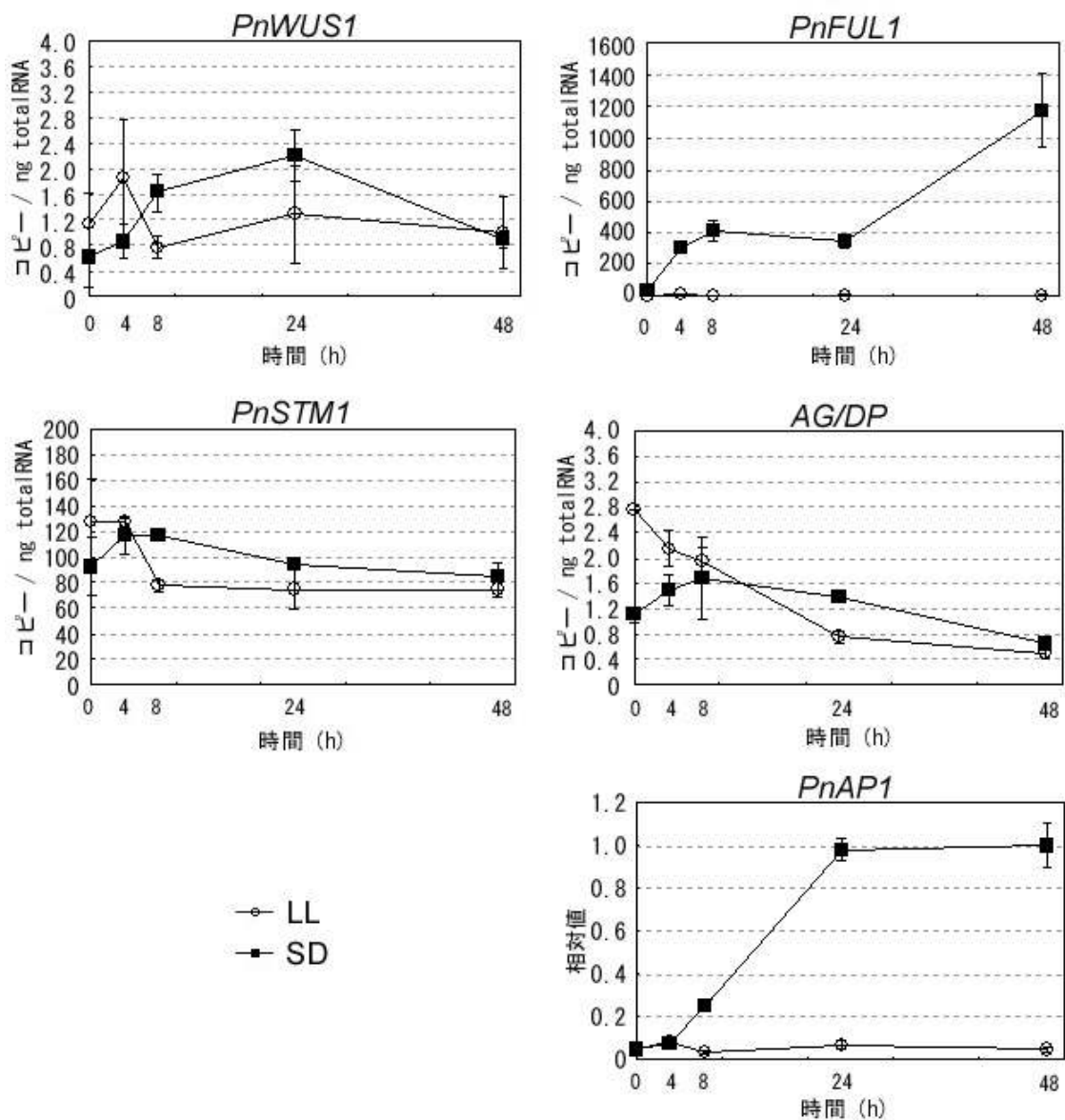


Figure 3-1-2. 定量的 RT-PCR による *PnWUS1*, *PnSTM1*, *PnFUL1*, *AG/DP*, *PnAP1* の茎頂における発現解析。16 時間の暗処理終了時(SD0h)から 4 時間後 (SD4h)、8 時間後 (SD8h) および 1 日後 (SD24h)、2 日後 (SD48) と、各時間における対照区 (LL0h~48h) の茎頂に蓄積している各遺伝子を定量した。SD 区、LL 区ともに N=2 で解析。*PnAP1* については SD48h の蓄積量=1 とした相対値で示した。



Figure 3-1-3. *PnFUL1*の *in situ* hybridization 法による SD48h の茎頂での発現解析。頂芽（赤矢印）と腋芽（緑矢印）での発現が確認された。

第 2 節 花成誘導が *PnWUS1* と *PnSTM1* mRNA の半減期に及ぼす影響

3-2-1 緒言

前節の *PnWUS1* と *PnSTM1* を用いた ISH 法による解析結果により、第 1 章で示された Mg^{2+} が高濃度に局在する組織は、茎頂における未分化組織＝メリステムであることが明らかとなった。茎頂メリステムには、CZ に位置する幹細胞群や、PZ に位置する分裂組織が含まれる。幹細胞はあらゆる細胞に分化する能力をもつ細胞で、分裂活性は低いものの自己複製し、増殖した一部を隣接する分裂組織へと提供する (Weigel and Jurgens 2002)。分裂組織は活発に分裂し、成長相に応じた器官の原基となる細胞を PZ の縁に産生し続ける。

茎頂メリステムの持つ分裂・分化と構造保持のメカニズムについては未解明な点が多く、現在も変異体の解析を中心に研究が盛んに行われている。これまでの研究により、前述の *WUS* や *CLV* 遺伝子群、*STM* の他にも、*Arabidopsis Response Regulator* 遺伝子群や *TOPELESS*、*LONELY GUY* などの遺伝子や植物ホルモンのサイトカイニンが関わって茎頂を維持する構図がシロイヌナズナをモデルとして描かれつつある (Tucker and Laux 2007)。

Mg^{2+} は植物の多量必須元素であるが、その必須性はまず Mg^{2+} が葉緑素の生合成に不可欠であることに認められる。また、 Mg^{2+} は多くの酵素活性を保持する役割があり、特に酵素と ATP 間を架橋することで酵素のリン酸化活性を高める。この効果は植物に特有の機能である光合成に主要な役割を果たすリブローズ 1,5-ビスリン酸

カルボキシラーゼに対しても発揮される。 Mg^{2+} はリボソームの立体構造の維持にも役割を果たし、細胞内 Mg^{2+} 濃度はタンパク質の生合成に影響を及ぼす。本研究で注目している茎頂メリステムには分裂組織が含まれており、ATP を消費しながら活発にタンパク質を合成していることが予想される。そのため、当該組織に Mg^{2+} が高濃度に局在することの有利性をタンパク質の活性に見出すこともできると思われた。しかし、第 1 章によると Mg^{2+} は茎頂メリステムの中でも分裂活性の低い CZ に特に高濃度に集積している (Fig. 1-5)。また、花成誘導に伴って Mg^{2+} の局在が変化するが、例えば Mg^{2+} 濃度の低下が予想される CZ において花成誘導初期にタンパク質活性が低下することの効果など、タンパク質活性の変化と花成制御メカニズムの関連性を合理的に説明するのは難しいと思われた。そこで本節では、花成制御メカニズムが茎頂メリステムにおいて多数の遺伝子発現の誘導/抑制を伴うリプログラミング過程であるという事実に着目し、遺伝子制御メカニズムの中でも Mg^{2+} が関与することが報告されている mRNA の安定性の制御メカニズムについて検討することとした。

mRNA の安定性が遺伝子制御メカニズムの一端を担う事象の一例は、生物時計に支配される遺伝子の発現様態に見ることができる。すでに 1997 年には、生物時計の分子機構解明の先駆けとなったハエの *Period* 遺伝子の転写率と mRNA の蓄積量の比較から、mRNA の半減期は日周期によって制御されることが示唆されていたが (So and Rosbash 1997)、Lidder らはシロイヌナズナを用いて *CCL* (*COLD CIRCADIAN RHYTHM AND RNA BINDING-LIKE*) mRNA の半減期が明期 1 時間目 (ZT1) では 175 ± 65 分であるのに対し、明期 8 時間目 (ZT8) では 35 ± 5

分であること、同様に、*SEN1* (*SENESCENCE ASSOCIATED GENE 1*) mRNA の半減期は ZT1 では 99 ± 13 分、ZT8 では 37 ± 3 分であることを示し、実際に植物体内において mRNA の安定性が生物時計の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Lidder et al. 2005)。この他にも、mRNA の安定性に影響を与える環境要因として光やショ糖の有無、あるいはウイルス感染などが確認されていることから、mRNA の安定性制御は植物の正常な成長のために重要な因子であると考えられ、mRNA の安定性を制御するメカニズムの解明を目指した研究が進められている (Gutierrez et al. 1999, Parker and Song 2004)。

Mg²⁺濃度によって Mg²⁺の輸送に関わる遺伝子の mRNA の分解速度が変化するという現象が主に酵母や細菌を用いた実験によって確認されており、細胞内 Mg²⁺濃度制御メカニズムに Mg²⁺濃度そのものが関与するモデルが提示されている (Graschopf et al. 2001, Spinelli et al. 2008)。植物においては、Horlitz と Klaff がホウレンソウの葉緑体内で発現する数種類の遺伝子を用いて *in vitro* で mRNA の半減期を測定した結果、Mg²⁺濃度 (0~25mM) 依存的に mRNA の安定性が増すことが示され、葉緑素の成熟に伴って Mg²⁺の濃度が上昇する事実との関連が示唆されている (Horlitz and Klaff 2000)。さらに、タバコを用いた実験により、Mg²⁺濃度に依存して mRNA を分解する経路の一つに関わることが予想される RNA 結合タンパク質も報告された (Bollenbach et al. 2003)。

本節では、花成誘導初期の茎頂で Mg²⁺が関与する事象の候補として mRNA の安定性の制御メカニズムを検討するにあたり、花成誘導初期に mRNA の半減期に変化が見られるのかを *in vivo* で検証した。半減期の測定対象遺伝子としては、茎

頂メリステムで発現が確認された *PnWUS1* と *PnSTM1* をモデルとして用いた。

mRNA の半減期の測定には、mRNA の合成を阻害した茎頂における mRNA の蓄積量を経時的に定量し、その減少率から算出するという手法を用いた (Seeley et al. 1992, Lidder et al. 2005)。実験では、まずアサガオ茎頂における mRNA の合成を阻害できる条件の設定を行った。具体的には、光に応答して発現する性質を持つ *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)* の、光照射による発現誘導を阻害できる mRNA 合成阻害剤処理濃度を決定した。mRNA 合成阻害剤には、ヌクレオチド誘導体の抗生物質で RNA ポリメラーゼの阻害剤である Cordycepin (3'-deoxyadenosine) を用いた。適当な Cordycepin 濃度を決定した後、その濃度で SD4h および LL4h の茎頂を処理しながら、経時的にサンプリングした茎頂から RNA を抽出、定量的 RT-PCR を用いて *PnWUS1* と *PnSTM1* の mRNA の残存量を求め、両遺伝子の半減期を算出した。

3-2-2 実験方法

mRNA の半減期測定

Seeley らの方法に倣った (Seeley et al. 1992)。まず、光に反応して発現する性質を持つ *CAB (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN)* 遺伝子 (AY547298) を用い、mRNA の合成を阻害できる Cordycepin 濃度を決定した。次に、その濃度の Cordycepin を含む溶液中で茎頂をインキュベートしながら経時的にサンプリングし、茎頂内の mRNA 量を定量、mRNA 量/インキュベート時間から mRNA の半減期を算出した。mRNA 量は定量的 RT-PCR を用いて定量した。

試薬

Sucrose Buffer

1mM PIPES pH6.26

1mM クエン酸ナトリウム

1mM KCl

15mM Sucrose

Cordycepin

Cordycepin (シグマ) を 8mM になるよう Sucrose Buffer に溶解したものをストック液とし、使用時まで -20°C にて保存した。

mRNA 合成阻害剤処理濃度の設定

操作

第 1 章に準じて明期下で 52 時間育成した植物に 20 時間の暗処理を施した。暗処理終了後直ちに暗所にて茎頂を採取し、Cordycepin を 0~3.2mM の濃度で含む Sucrose Buffer に浸漬し、暗所、室温にて 30 分間プレインキュベーションした。30 分間のプレインキュベーション終了時に一部の茎頂をサンプリングした後、残りの茎頂サンプルを植物育成器内に 1 分間静置することで $26.7\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光を照射、その後直ちに暗所に戻し、さらに 1 時間インキュベーションした。

リアルタイム PCR

前節に準ずる。光照射前と照射後の茎頂から RNA を抽出、*CAB* mRNA 量を定量した。5 つの茎頂を 1 サンプルとし、各サンプル 2 連で準備した。検量線には明期下で育成した葉のサンプルを段階希釈したものを用い、相対定量を行った。プライマーは Fw; TGAAGGATTTGAAGCTGAAAGAAGT と Rv; AAGTATCCCAGAATGGCCAACA を 200nM で使用した。

PnWUS1 と *PnSTM1* mRNA の半減期測定

操作

植物の育成は第 1 章に準ずる。LL4h と SD4h の茎頂を採取し、3.2mM Cordycepin を含む Sucrose Buffer に浸漬した。明所、室温にて 30 分間プレインキュベーションした後、3.5 時間後までインキュベーションし、経時的に

サンプリングした。

リアルタイム PCR

前節に準ずる。プレインキュベーション終了時を 0h とし、0.5h、2h、3.5h の茎頂から RNA を抽出、*PnWUS1* および *PnSTM1* mRNA 量を定量した。5 つの茎頂を 1 サンプルとし、各サンプル 2 連で準備した。

3-2-3 結果および考察

1 分間の光照射によって *CAB* の発現を誘導し (= 0h)、1 時間後の茎頂における *CAB* の蓄積量を Fig. 3-2-1 に示した。Cordycepin を含まない Buffer 内でインキュベートした茎頂内の *CAB* 量は、光照射前に対して 1 時間後には 1.5 倍に増加していた。また、Cordycepin 濃度を 0.4mM、0.8mM で処理しても、それぞれの 0h における *CAB* 量よりも蓄積量がやや増加する場合が見られた。しかし、Cordycepin 濃度を 1.6mM あるいは 3.2mM で処理すると、0h よりも *CAB* 量が増加することは無かった。つまり、Cordycepin 濃度が 1.6mM 以上になると、*CAB* の光に応答した発現を完全に阻害できることが示された。なお、光を照射せずに 3.2mM Cordycepin 溶液で 1 時間処理した茎頂における *CAB* 量も、光照射した茎頂における *CAB* 量と同等であることを確認した (data not shown)。したがって、アサガオ茎頂における mRNA 合成阻害に必要な Cordycepin 濃度は 1.6mM 以上であり、以後の実験においては 3.2mM で茎頂を処理した。エンバクやシロイヌナズナで mRNA 合成を阻害できる Cordycepin 濃度は比較的 low、0.5mM 前後と報告されて

いるのは (Seeley et al. 1992, Lidder et al. 2005)、これらの植物の組織がアサガオに比べて薄く、Cordycepin が容易に浸透しやすかったためではないかと考えられた。

3.2mM Cordycepin で処理した SD4h および LL4h の茎頂を、経時的に 3.5 時間までサンプリングし、各時間に茎頂に含まれていた *PnWUS1* と *PnSTM1*mRNA の定量した結果を Fig. 3-2-2 に示した。これに対して指数近似式を求め、蓄積量が 0h 時の半分になる時間を半減期として算出した。その結果、*PnWUS1* の半減期は LL4h において約 13.6 時間、SD4h においては約 2.7 時間となった。つまり、*PnWUS1* mRNA の安定性は花成誘導によって 1/5 に低下していることが示された。また、*PnSTM1* の半減期は LL4h では約 11.8 時間、SD4h では約 4.4 時間であり、花成誘導によって *PnSTM1* mRNA の安定性はおよそ 1/3 に低下することが示された。

mRNA の半減期は、不安定な一過的シグナル因子では 1 時間以下、非常に安定したものでは数日に及ぶが、平均的には数時間であると言われている (Gutierrez et al. 1999)。*PnWUS1* と *PnSTM1* の mRNA の、花成誘導を行わない茎頂における半減期は極めて平均的であり、両遺伝子を一定量蓄積するために、一定のプロモーター活性をもって常に mRNA を合成していると考えられた。また、花成を誘導することにより、*PnWUS1* mRNA は 1/5 に、*PnSTM1* mRNA は 1/3 にそれぞれ安定性が低下したが、この 1/5、1/3 という数値は、例えば前述の生物時計に関わる遺伝子の ZT8 における半減期が ZT1 の 1/3~1/5 であることや (Lidder et al. 2005)、光合成に関与する *Ferredoxin 1* 遺伝子の暗期における半減期が明期の 1/2 であること (Petracek et al. 1998)、また、 α -アミラーゼをコードする遺伝子のショ糖存在時の半減期がショ糖欠乏時の 1/4 であること (Sheu et al. 1996) などを鑑みると、

mRNA 半減期の変動幅として妥当であると思われる。

今回観察された *PnWUS1* と *PnSTM1* の安定性の低下が花成制御メカニズムの一環であるのか、 Mg^{2+} の濃度変動によるものであるか、等については、他の茎頂発現遺伝子の半減期測定、茎頂内 Mg^{2+} 濃度の定量、あるいは他植物での検証など、さらなる実験が必要である。しかし、本実験結果は花成誘導初期の茎頂における遺伝子制御メカニズムに、新たに mRNA の安定性の制御が含まれている可能性を提示するものと考えられる。

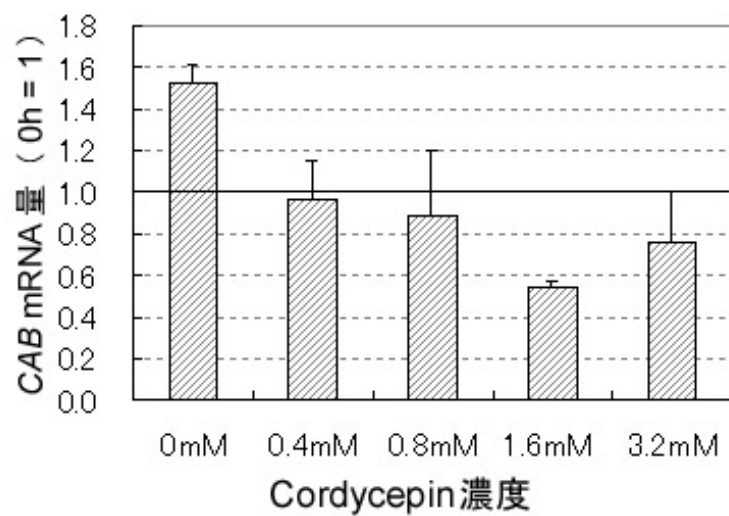


Figure 3-2-1. 光照射から 1 時間後の *CAB* 遺伝子の発現量と Cordycepin 処理濃度の関係。各処理濃度とも、光照射直前の *CAB* 遺伝子量=1 とした相対値で示した。N=2 での解析。

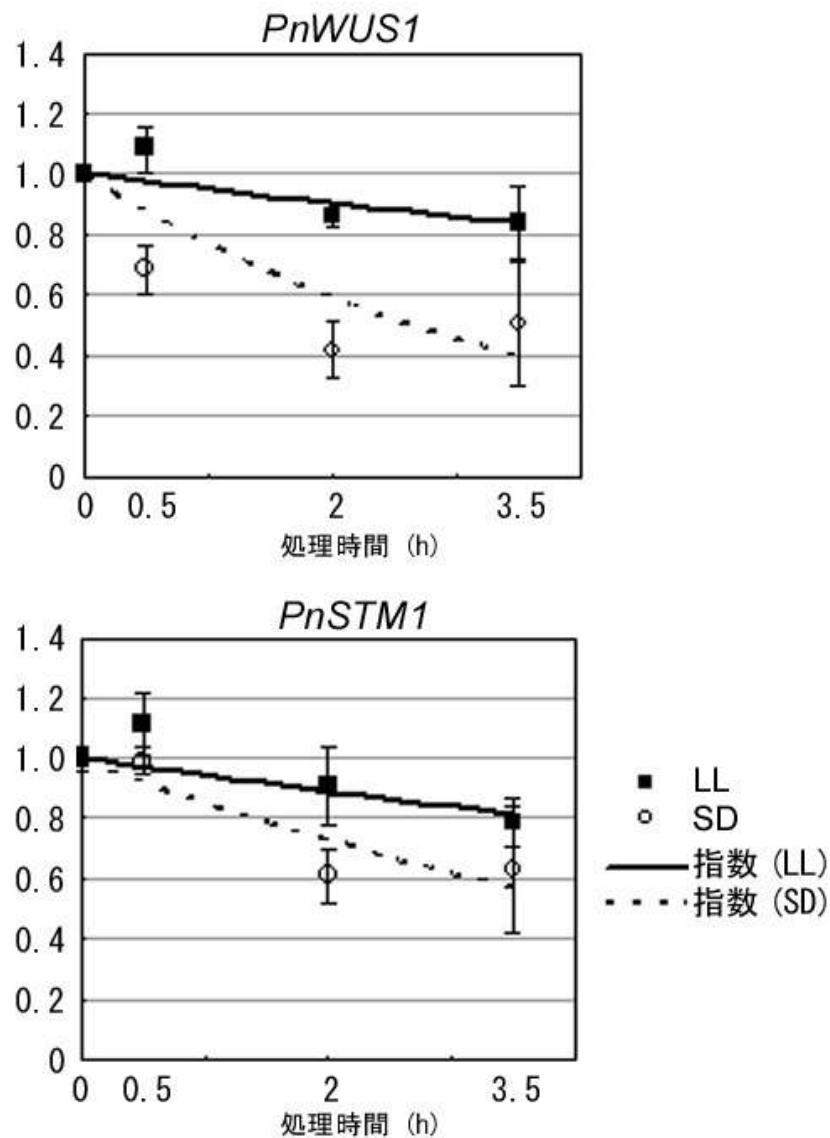


Figure 3-2-2. LL4h あるいは SD4h の茎頂における *PnWUS1*、*PnSTM1* mRNA の安定性の解析結果。LL4h あるいは SD4h に採取した茎頂を 3.2mM Cordycepin で処理し、経時的にサンプリング、蓄積している各遺伝子の mRNA を定量した。それぞれ 0h における蓄積量=1 とした相対値で示した。N=2 での解析。近似曲線から、蓄積量が 0.5 になる処理時間を算出し、各遺伝子の半減期とした。*PnWUS1* の半減期は LL4h では約 13.6 時間、SD4h では約 2.7 時間。*PnSTM1* の半減期は LL4h では約 11.8 時間、SD4h では約 4.4 時間であった。

終章 総合考察

本研究は、先に行なったアサガオ幼植物体の元素分析結果 (Ikeue et al. 2001) に基づき、茎頂における Mg^{2+} 濃度の変動と花成制御メカニズムの関連について追究したものである。

第 1 章では、茎頂において Mg^{2+} が高濃度に局在する組織を、独自に考案した蛍光染色法によって明らかにした。解析対象として注目する時間は、花成シグナルが茎頂に到達してから成長相の移行が開始する「花成誘導初期」に定めた。花成シグナルが完全に茎頂に到達する時間帯は、双葉を切除する時間と花成率の関係により、16 時間の暗処理終了後 2 時間目であることが確認された (Fig. 1-1)。このように、比較的単純な方法で茎頂へのシグナルの到達時間帯を極めて狭い範囲に限定できることは、アサガオを供試植物として用いる実験の非常に有利な点である。

蛍光染色法では、 Ca^{2+} のみに反応する試薬と、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の両方に反応する試薬を用い、その染色差を Mg^{2+} の分布として捉える、「 $(Ca^{2+} + Mg^{2+}) - (Ca^{2+}) = Mg^{2+}$ 」という原理で Mg^{2+} 局在の解析を試みた (Fig. 1-2)。蛍光試薬は、①同一の基本構造を持ち、②植物組織内の両イオン濃度に十分反応し得るという条件を設定し、Fluo-3 と Mag-fluo-4 を選択した。①により、細胞間に存在する試薬浸透性の違いによって生じる「イオン濃度の見かけ上の違い」を補正した。②については、アサガオ茎頂におけるイオン濃度は他植物で報告されている組織内イオン濃度と大きくは変わらないと仮定し、 Ca^{2+} 濃度 0~250nM、 Mg^{2+} 濃度 0~20mM の範囲で両試薬

の反応性を確認した (Fig. 1-3)。そして、実際に Fluo-3 と Mag-fluo-4 それぞれによって茎頂、茎、根を染色し、適用の可否を検討したところ、茎頂と根の染色像に、試薬間での差異が観察された (Fig. 1-4)。茎頂を Mag-fluo-4 を用いて染色すると、Fluo-3 で染色した場合と比べ、茎頂先端部における発色が他組織よりも強く、特に先端部の 2 層目より内側において強い発色が見られた。

本研究で考案した蛍光染色法には定量性がなく、また、イオン濃度の判明している組織を用いた検証も行なっていない点、未だ不完全なものである。しかしながら、観察された両試薬による組織の染色差は Mg^{2+} の濃度差を反映している可能性が高いと考え、茎頂内でも特に染色差が明らかであった茎頂先端部に注目し、さらに解析を進めた。

解析の結果、Mag-fluo-4 で染色した場合にのみ、強い蛍光を発する細胞群が茎頂先端部に観察された (Fig. 1-5, Fig. 1-6)。これにより、 Mg^{2+} が茎頂先端部に局在することに加え、特に Mg^{2+} が高濃度に集積している細胞群が茎頂先端部の中央に存在している可能性が示された。さらに、花成誘導された茎頂を解析したところ、暗処理終了時 (SD0h) の茎頂での Mg^{2+} 局在様式は花成誘導されていない茎頂と同様であるが、4 時間後 (SD4h) の茎頂では Mg^{2+} 濃度は茎頂先端部の中央よりも周辺部でより高くなることが示唆された (Fig. 1-6 D, E)。また、SD4h における Mg^{2+} の局在変化が暗期そのものの影響ではなく、花成誘導の影響であることは暗期中断実験によって確認された (Fig. 1-6 F, G)。

第 1 章で示された Mg^{2+} の茎頂先端部への高濃度局在と、花成誘導による局在様式の変化は、 Mg^{2+} が花成制御メカニズムに何らかの役割を果たす可能性を示唆する

ものであると考えられた。この可能性をさらに追究するため、 Mg^{2+} が局在する組織の性質を明らかにすることとし、そのために必要な組織マーカーである *WUS*、*STM*、*CLV1*と、花成マーカーである *API*と *AG*のオーソログの単離を第2章で行なった。

単離した5つの遺伝子のうち、*WUS*様遺伝子と *STM*様遺伝子は、予想されるアミノ酸配列 (Fig. 2-1, Fig. 2-2) と発現様式 (Fig. 2-5) からそれぞれのオーソログと同定され、*PnWUS1*、*PnSTM1*と名付けた。*API*様遺伝子は予想されるアミノ酸配列から、*API*ではなく、*API*と起源を同じくする *FUL*であることが示され (Fig. 2-3)、*PnFUL1*と名付けた。*AG*様遺伝子は Nitasaka が単離・同定したアサガオ *DP* 遺伝子と同一のものであったため、本研究では *AG/DP*と称した。また、*CLV1*様遺伝子は幼植物体における発現様式がシロイヌナズナ *CLV1*とは異なっており (Fig. 2-4)、*CLV1*のオーソログとは同定できなかった。

第3章 第1節では *PnWUS1*、*PnSTM1*、*PnFUL1*、*AG/DP*に加え、他の研究グループによって単離された *API* オーソログの *PnAPI* を用い、茎頂の解析を行なった。まず、茎頂組織を同定するため、*PnWUS1*と *PnSTM1*を用いて *in situ* hybridization (ISH) を行った。その結果、茎頂先端部で Mg^{2+} の局在が見られた組織 (Fig. 1-5) は *PnSTM1* を発現する未分化細胞から成っていることが明らかとなった (Fig. 3-1)。また、*PnWUS1* を発現する細胞は茎頂先端部の中央の外側から4,5層目に存在しており (Fig. 3-1)、 Mg^{2+} が局在する組織の外縁、 Mg^{2+} を高濃度に集積する数個の細胞群にほぼ隣接して位置することが示された (Fig. 1-5)。アサガオの茎頂組織について、 Mg^{2+} と遺伝子の局在解析から得られた結果を Fig. 4-1 にまとめた。花成誘導に伴い Mg^{2+} の局在様式が変化することが *PnWUS1* と

PnSTM1 に及ぼす影響については第二節で検討した。

花成シグナルが完全に茎頂に到達してから 2 時間後、すなわち、 Mg^{2+} の局在様式に変化が見られた SD4h の茎頂が、花成誘導プロセスのどの段階にあるのかについては、3 つの花成マーカー遺伝子を用いて同定した。花成誘導プロセスについてはシロイヌナズナをモデルとして花成シグナル到達から花の成熟までが 12 の stage に分類されており、*FUL* は stage 1 以前、*API* は stage 1、*AG* は stage 2 ~3 において発現が開始する。本研究の結果、*PnFUL1* の発現が開始するのは暗処理終了時以前、*PnAPI* の発現開始は SD4h から SD8h の間、*AG/DP* の発現開始は SD48h 以降であることが明らかとなり (Fig. 3-2)、注目している SD4h の茎頂は stage 1 直前の状態にあることが示された。また、*PnWUS1* と *PnSTM1* mRNA の蓄積量には解析期間中、大きな変動は見られなかった。アサガオ茎頂における花成誘導のタイムコースについて得られた上記の結果は、Fig. 4-2 にまとめた。

第 2 節では、花成誘導の持つ「成長のリプログラミング」という特性に着目し、細胞内遺伝子制御メカニズムの 1 つで Mg^{2+} が役割を果たすことが知られている mRNA の安定性制御機構が花成誘導後のアサガオ茎頂で機能する可能性について検討した。mRNA の安定性は、半減期の長短によって計られる。本節では、茎頂先端部での発現が確認された *PnWUS1* と *PnSTM1* をモデルとして用い、両遺伝子の SD4h と LL4h における半減期を算出した。その結果、SD4h での半減期は LL4h に比べ、*PnWUS1* は 1/5 に、*PnSTM1* は 1/2.7 に短縮しており、花成誘導によって両遺伝子とも安定性が低下することが示された (Fig. 3-2-2, Fig. 4-2)。

本研究の結果、アサガオ茎頂における花成制御メカニズムに、mRNA の安定性

制御機構が関与している可能性が新たに示された。今後、花成制御メカニズムの解明を目指し、SD4hにおいて *PnWUS1* と *PnSTM1* の安定性が低下することの意義を考察するためには、花成シグナルがほとんど到達していない SD0h や、成長相が完全に生殖成長に移行した stage 1 に当たる SD8h の茎頂でも半減期を算出することが重要であり、その点、本実験は極めて予備的なものである。しかし、仮に *PnWUS1* と *PnSTM1* で確認されたような mRNA の安定性の低下が、茎頂で発現する遺伝子全般に当てはまるものとするれば、花成制御メカニズムに mRNA の安定性の低下が果たす役割としては、組織内に存在する mRNA の種類の迅速な切り替えに対する効果が予想できる。前述の通り、アサガオでは暗処理終了後、茎頂に花成シグナルが到達するまでに約 2 時間、その後茎頂が stage 1 に達するまでに 2~6 時間しか要しない (Fig. 4-2)。この間に、茎頂で発現する遺伝子群は栄養成長に必要なものから生殖成長に必要なものへと、種類が切り替わることが予想される。この時、もし栄養成長に必要な mRNA の半減期が 10 時間以上であると、花成シグナルの到達を受けて転写活性が低下してからも数時間は mRNA が一定濃度蓄積した状態が継続することになる。しかし、転写活性が低下すると同時に、mRNA の半減期が 1/2 の 5 時間に短縮されれば、茎頂が stage 1 に到達するまでに蓄積量を 1/2 以下に下げることができる。また、*PnWUS1* や *PnSTM1* のように花成誘導後も必要な遺伝子は、転写活性を保つことで、mRNA の半減期短縮によって一時的に蓄積量が低下することはあっても、一定濃度の蓄積量を保つことが可能であると思われる。

この仮説について検証するためには、栄養成長期に茎頂で発現し、花成誘導後

には発現が抑制される遺伝子の安定性と蓄積量の経時変化を解析することが効果的であると思われる。また、他の遺伝子の安定性の解析に加え、シロイヌナズナなど、他の植物におけるオーソログ遺伝子の安定性を調査することも非常に重要と考えられる。ただしシロイヌナズナにおける花成誘導は、花成シグナルの茎頂への到達から *API* の発現までに 72 時間を要するなど、アサガオに比べて進行が穏やかであると考え、花成誘導後に半減期の調節が行われなかったとしても、転写活性の低下のみで不要な遺伝子の分解は時間的には十分に間に合うとも言える。つまり、本研究で示唆された花成誘導に伴う mRNA の半減期の短縮という機構は、暗処理後速やかに成長相が移行するアサガオに独特な制御メカニズムである可能性も考えられる。

さらに、*PnWUS1* と *PnSTM1* の安定性の低下が Mg^{2+} の濃度変化に影響されたものであるのかについても検討することが必要である。Fig. 4-1 に示した通り、両遺伝子が発現する組織では、SD4h には SD0h よりも Mg^{2+} 濃度が低下するのではないかとと思われるが、前述の通り、本実験では Mg^{2+} 濃度の絶対量は測定しておらず、また、mRNA の安定性に影響を与える因子は Mg^{2+} 以外にも存在することを踏まえると、*PnWUS1* と *PnSTM1* の安定性の低下が Mg^{2+} の濃度変化以外の原因で生じた可能性も十分に考えられる。今後はまず SD0h と SD4h の茎頂内の特定の組織内における Mg^{2+} 濃度を定量し、その濃度における遺伝子の半減期を *in vitro* で測定することが必要となると思われる。しかし、現在までに報告されている植物における *in vitro* での遺伝子の半減期測定系は、ほとんどが葉緑体で発現する遺伝子を対象とするものであり、上記のような検証実験を行うためにはまず細胞質環境を反映させた

in vitro 測定系の構築が必要となる。なお、花成誘導時に mRNA の安定性が制御されるメカニズムについて検討する際には、下記のような理由から、注意が必要である。すなわち、Mg²⁺の関与する mRNA の分解経路についての研究の多くは葉緑体を対象としたものであるが、本研究で注目した *PnWUS1* と *PnSTM1* の安定性の制御は核と細胞質で機能するメカニズムであると考えられる。葉緑体内に発現している mRNA のほとんどは、3'末端の非翻訳領域に stem-loop 構造を保持し、それによって葉緑体特異的なタンパク質に結合するが (Horlitz and Klaff 2000)、そのようなタンパク質が葉緑体における mRNA の安定性制御にも関わっていると考えられることから、葉緑体で解明されている mRNA の安定性制御メカニズムは、細胞質におけるそれとは異なる可能性があるためである。

本研究では、双葉切除実験と花成マーカー遺伝子の解析により、アサガオ茎頂における花成誘導のタイムコースも明らかにした (Fig. 4-2)。その中で、シロイヌナズナで示されている「茎頂への FT タンパク質の到達から *API* 遺伝子の発現までに存在する時間的ギャップ」がアサガオの花成誘導においても存在することが確認された。前にも言及した通り、FT タンパク質が茎頂に到達する正確な時間はシロイヌナズナでは特定することが難しいが、アサガオでは双葉切除実験によって容易に特定できる (Fig. 1-2, Fig. 4-2)。したがって、今後、FT-AP1 間のギャップとなっている時間帯 - アサガオでは SD2h から SD8h にかけて - に茎頂で生じている成長相の変化の実態について、アサガオを用いて解析することで、植物の花成誘導研究にとって新規な知見を得られると期待される。さらに、茎頂で生じる成長相の変化について経時的に解析するにあたり、アサガオ茎頂は形態の面でも非常に有利

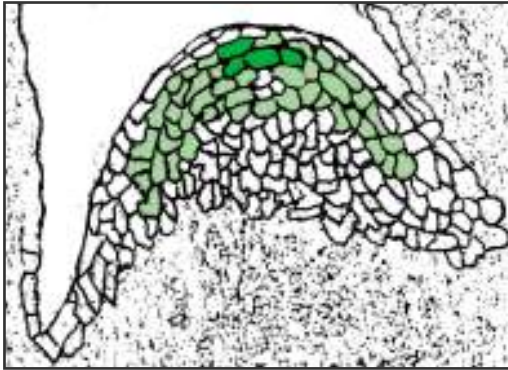
である。すなわち、シロイヌナズナをはじめ多くの植物は、花成誘導後も茎頂メリステムの外縁に花芽を次々と発生させながら成長を続けるが、アサガオは花成誘導により茎頂そのものが花芽に「変化」する。そのため、シロイヌナズナなどの茎頂をサンプリングすると、そこには常に **stage** の異なる組織が混在するが、アサガオでは花成誘導段階の揃った茎頂がサンプリングできることになる。茎頂で生じる遺伝子的変化を解析するための実験手法としては、ISH 法などによる画像解析か、組織のサンプリングに定量的 RT-PCR を組み合わせる定量解析が用いられるが、両者を比較すると、定量的 RT-PCR の感度は抜群であり、遺伝子が発現を開始する時間を特定するためにはより有効であると思われる。したがって、花成誘導タイムコースが明確であり、**stage** 別に茎頂をサンプリングすることが容易なアサガオ茎頂を用いることで、特に花成誘導初期の遺伝子ネットワークを時間面から解明することを目指せると考えられる。

最後に、近年盛んに行われている、「シロイヌナズナ等モデル植物で得られる知見を他植物で検証する」試みに関して以下に考察する。本研究においても、遺伝子解析についてはシロイヌナズナで先行している研究を大いに参考にした。茎頂および花成マーカー遺伝子にも、オーソログを利用した。しかし、例えば、シロイヌナズナに次ぐモデル植物であるイネでは *FUL* オーソログ遺伝子として *FUL1* と *FUL2* の二種類が存在し、なおかつ *FUL2* は機能的にはシロイヌナズナ *AP1* に似ているという事実に表されているように、植物の持つ機能・性質を遺伝子面から研究する場合は、やはり植物種それぞれで解析することが重要であると思われる。この点、近年の報告によると、植物の系統（科目）と遺伝子の塩基配列や機能に一定

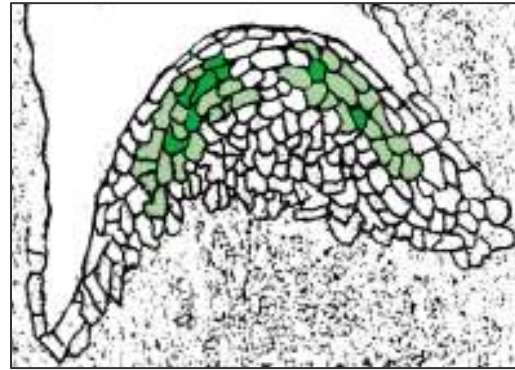
の関連性が認められることから、シロイヌナズナの遺伝子情報を研究利用する際には、供試植物の系統を参考にすることが重要と思われる。本研究でも、アサガオは真正双子葉類-コア真正双子葉類-キク群-第一真正キク群の中の、ナス目に属することから、同シソ目に属するキンギョソウで得られていた *WUS* オートログ遺伝子の発現と機能に関する知見は *PnWUS1* 同定の重要な根拠となり、また、*CLV1* 様遺伝子の検討に際しても、真正双子葉類-コア真正双子葉類-バラ亜綱-バラ群に属するミヤコグサ（第一真正バラ群-マメ目）*HARI* と、シロイヌナズナ（第二真正バラ群-アブラナ目）*CLV1* は、配列が酷似し、発現部位もともに地上部であるにも関わらず、機能は全く異なるという事実は、細胞膜貫通型 LRR 受容体様リン酸化酵素ファミリーに属する遺伝子の多様性を示していると考え、アサガオから単離した *CLV1* 様遺伝子の配列と発現解析に基づく同定は不可能と判断する主要因となった。*PnSTM1* についても、ISH 法によって示された発現様態（Fig. 3-1, Fig. 4-1）は、アサガオと同じ真正子葉類であるシロイヌナズナ *STM* よりもトウモロコシ（単子葉類-ツユクサ群-イネ目）*KN1* に類似していたが、アサガオ、シロイヌナズナ、トウモロコシの系統図中の位置付けを考慮すると非合理的とは言えない。また、花成誘導において非常に重要な経路である *CO* と *FT* の作用機構についても、アサガオやトマトなどのナス目に属する植物では、シロイヌナズナで報告されている機構とは異なる可能性が示唆されている（Hayama et al. 2007, Lifschitz et al. 2006）。このような状況は、シロイヌナズナ等モデル植物から得られる情報を慎重に利用しながら、主要な栽培野菜が多く含まれるナス目に属するアサガオを研究対象とすることの意義を示していると考えられ、前述のような茎頂の特殊性と合わせて、アサガ

オを用いた花成誘導研究の今後の発展が期待される。

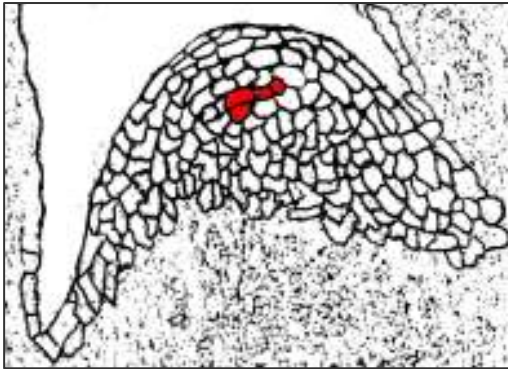
Mg²⁺ - SD0h



Mg²⁺ - SD4h



***PnWUS1* - SD0h**



***PnSTM1* - SD0h**

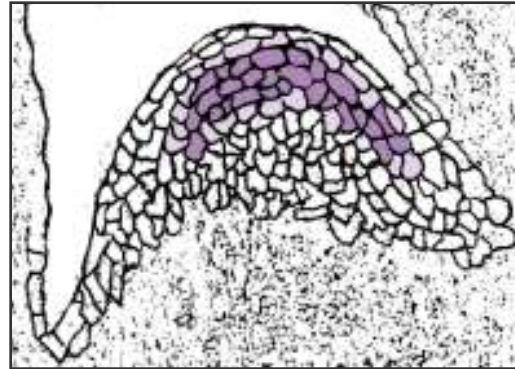


Figure 4-1. 茎頂組織の同定。

上段、左 ; Mg²⁺の SD0h における局在、右 ; Mg²⁺の SD4h における局在。Mg²⁺濃度の高低を緑色の濃淡で表した。

下段、左 ; *PnWUS1* の分布、右 ; *PnSTM1* の分布。

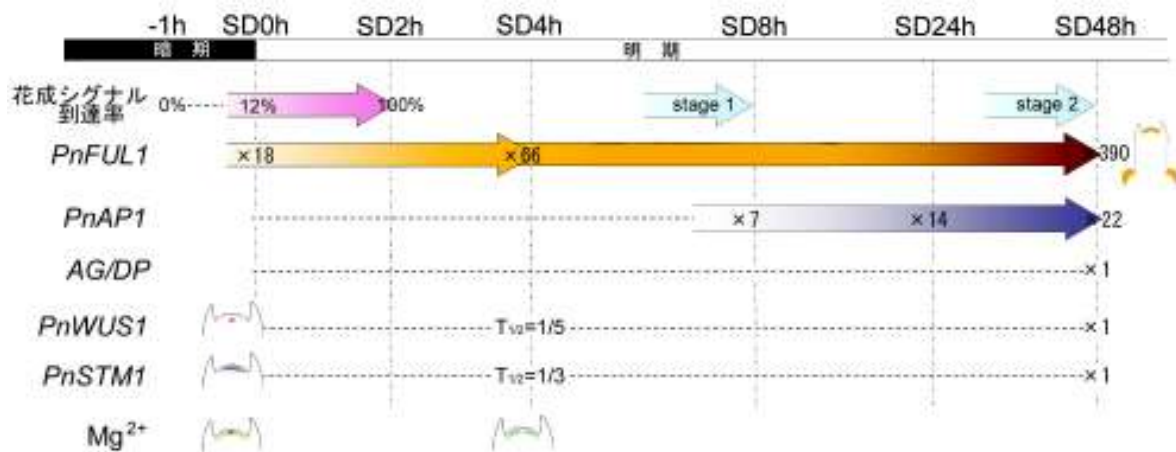


Figure 4-2. アサガオ茎頂における花成の進行。16時間の暗処理終了1時間前には花成シグナルは茎頂に全く到達していなかったが、暗処理終了時（SD0h）には12%の個体で、その2時間後（SD2h）には全ての個体で花成シグナルが茎頂に到達した。*PnFUL1* mRNAの蓄積量を黄～茶のカラースケールで示した。SD0hでは対照区の18倍の蓄積が見られ、SD4hにかけて蓄積量が66倍にまで増加した。さらにSD24h以降に再度増加し、SD48hでは対照区の390倍が蓄積した。*PnFUL1*がSD48hにおいて、茎頂先端部と腋芽に蓄積している様子を模式図で示した。*PnAPI1* mRNAの蓄積量を白～紫のカラースケールで示した。*PnAPI1*はSD4hからSD8hにかけて発現を開始し、SD8hには対照区の7倍、SD24hには14倍、SD48hには22倍が蓄積した。*PnWUS1*、*PnSTM1*、*AG/DP* mRNAの蓄積量にはSD48までに変化が見られず、対照区と同程度が蓄積していた。以上から、SD8hまでがstage 1、SD48hまでがstage 2に相当する状態であると考えられた。SD0hにおいて*PnWUS1*は茎頂先端部中央の4～5層目に位置する数細胞で発現し、*PnSTM1*は茎頂先端部の3～5層目に広く発現が見られた。SD4hには*PnWUS1* mRNAの安定性は対照区の1/5に、*PnSTM1* mRNAの安定性は対照区の1/3に低下した。 Mg^{2+} はSD0hでは茎頂先端部に高濃度に局在し、特に中央付近の最外層から内側2～3層目に位置する数細胞に高濃度に蓄積していたが、SD4hでは先端部中央付近よりも周辺分裂組織に高濃度に局在した。

付録

付録 1-*PnWUS1* 遺伝子配列とプライマー、プローブ（網掛け部分）の位置

ATGGAACCTCAACAACAACAATACTATCATCAAACCAAGCCCAGCAGGGCGGTGGGAACGAAGA
GGGAGGAGGGAGTGGGAGCAAGAACAGCAACGTTAACGGCGGGGATACCTGTGCAGGCAAAGCA
GTACGAGGTGGACGCCGACAACGGAGCAGATAAGAATCTTGAAGGAGCTTTACTACAATAATGGA
GTGAGGTCCCCGACGGCGGACCAGATTGAGAGGATCTCCGCCAAGCTGAGGCAGTACGGGAAGAT
AGAGGGGAAGAACGTCTTTTACTGGTTCAGAACCACAAGGCCCGGGAGGCCAGAAGAAGCGCC
TCACCGTCTCGCCACCGCCCTGACGCCGCCGCCGCCGCCACCTTCTCCATGCAAATGCAG
AGAGGCGTTTGGAGATCTGATCAGTGCTCCACCTTCAATCCAGCGTCTTCTCACCTGGAATGGT
GGCTGTTGGTCAGATAGGAACTATGGCGGCTATGGAAACTGTGGCTATGGAGAGGAGCTTCA
GGGACTGCTCAATATCAGCAGGAAGCAATGGGAATGGGTGTGTAATGGCGGGTCTCCAACTAT
WUS-ISF_w
GGTTGGTTGGGGTAGATAATCATCATCATCCCTACTCTTCATCAACCCATACTACCCTTT
TCTGGAAAAGATCAAGTCCACTTATGATGATCATGAAACCCTAGAAGAGGATCAGCAAGACGAAG
ATGATCAGAAGGAGCCAGAAACCTTCTCTCTTCCCAGTACACACAGATCACCACCACCACCAC
WUS-ISR_v
CACAACACTACAGCGGCAAGCCGCCGAGGAGTCGTTCAACGGCGGGGATACTACACCAACACTGA
WUS-RTF_w
CCAGTGGTACCACTAGCAGCACAATGGGTCTGCATCTAGGGCTTCCCTTGAGCTCTCCCTCAACT
WUS-RTR_v
CCTACAACATGGCCACTTCTTCTCTCCATTTCCCCTAGCTACCTAGCTCATGAAACATCTTAGTA
CTAAATATGGGTAAAGTTCTATGTTTTCTTGAATTATTGTAATTATTAAGTATTCAGTTCAGTTCA
CTGTCCGGCCTGTTACAAAAGACAAAATTCCTGGCCCCGAGGGTTAGACTACTCACTCAATATG
AATTATCAGCTCTGTAATGCTATTTACTACTCCAGCTAATANTGAGTGATCTAAAATCATCATT
CAANTTGGTAAAAAAAAA

付録 2-*PnSTM1* 遺伝子配列とプライマー、プローブ（網掛け部分）の位置

ATGGAGGGTGGTGGTGGTTCTATTGCTTCTTTGTGCCCCATGATGATGATGATGCCGCTTCTAG

CAACGACCAAGACAACAACAATAGCAATCAGAATAACAACCCCGGTTCAGGCGAGGCTTCCGCAG
STM-ISF_w

GTTATTTTCATGGATAACAACAACAATGGCGGCGGCGGCGGCGGTGGCGGTGGGGAGGAGGGGAAG

TGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGTGAAGGCCAAGATCATGGCGCATCCTCACTACCACCGCCTCCT
STM-RTR_v STM-RTF_w

GGCCGCCTATCTCAACTGCCAGAAGATTGGAGCTCCTCCGGAGGTGGTGGCCAGGTTGGAGGAAG
STM-ISR_v

CTTGCGCCTCCATGGCCGCCATGGGCCGTACCGGCGGCAGCTGTCTCGGTGAAGATCCGGCGCTT

GACCAGTTCATGGAGGCTTACTGTGAAATGCTCACAAAATATGAACAAGAACTCTCCAAACCTT

CAAGGAAGCCATGCTTTTCTCTCAAGGATTGAATCCCAGTTCAAGGCTCTACCCTTCTTGTT

CCTCTGAATCTGCAGGTGCTGATGCAATGGACAGAAATGTTTCGTCTGAAGAGGAGGTTGATGTG

ACGACGGGTTTTATAGACCCTCAGGTAGAAGACCGGAACTGAAAGGTCAACTTCTGCGCAAATA

CAGTGGATACCTGGGAAGCCTCAAGCAAGAGTTCATGAAGAAGAGAAAGAAGGGgAAGCTCCCCA

AGGAAGCCAGACAACAATTGCTCGATTGGTGGACCCGACATTACAAATGGCCATATCCTTCGGAA

TCCCAGAAGCTGGCACTTGCTGAATCTACGGGACTAGACCAGAAGCAAATCAATAACTGGTTTAT

CAACCAGAGGAAGCGCCACTGGAAGCCCTCGGAAGACATGCAGTTTGTGGTTATGGACACCGCTC

ATCCCCATTACTACATGGACAACGTGCTTGGCAATCCTTTCTCGATGGATATCACACCAACTCTC

CTTTGAGCCCGAAGAGGAATGCTCGAGGAGCTGAGGTTGCTGCGCGTGCTGTTTGGGTTTGTGAT

ATTAAATTACTCCGTTATATATATTATATTATATGTAAGTAGGGTTGCATGCTTCTATATCTAT

CTGTATCTGTCAGCCATTGCATACTACCTGGTATGCTTGTATTGTGCATTGCTATCAACCTAAAC

ATTTGACTCGGTTCTATATTCAACTAGATGGTATAATAATTATAGTTGCTGGGGTATATTTTTTA

CCAGTTTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAA

付録 3-*PnFUL1* 遺伝子配列とプライマー、プローブ（網掛け部分）の位置

ATGGGGAGAGGGAGGGTGCAACTGAAGAGAATAGAGAACAAGATAAACCGGCAAGTCACCTTCTC
AP1/FUL1-RTF_w
CAAACGCCGTACTGGCTTGCTCAAGAAAGCCACGAGATTTCCGTCCTCTGCGATGCCGAGGTTG
AP1/FUL1-RTR_v
CACTCATCGTCTTCTCCACCAAAGGAAAGCTCTTCGAGTACGCCACTGAATCTTGATGGAAAAG
ATTCTTGAACGATATGAAAGATACTCGTATGCAGAGAGGCAACTGAATTCTACAGATCAAACTC
ACAAGGAAGTTGGACTCTGGAGCATGCAAAGCTCAAGGCTAGGATGGAGGTTCTACAAAGAAACC
AAAGGCATTATGAGGGAGAAGACCTAGATTCTTTAAGCCTCAAAGAGCTTCAGAATCTGGAGCGC
CAACTTGATTGAGCACTCAAAAATATTCCGGTCAAAAAGAATCAACTCATGTATGAATCCATTTCT
TGTGCTCCAGAAAAAGGACAAAGCATTGCAGGACCAAAATAATCAGCTTTCTAAGAAGATCAAGG
FUL1-ISF_w
AGAGGGAGAAAGAGATGGCTACTCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGTTCAGTGGGAGCAGCCTAAC
GACGACATAAATTCCTCCTATGTTGTGCCGCCGCACTCGTGCACCTCAGCAGTGAAGGAGAATA
TCAGGGTGAAGGAGAGTATGGAGAAACAGAAGGAACTCAGCGTCAGCAGCAGAACAAACACCAGTG
FUL1-ISR_v
CCATGCCCCAGTGGATGCTTAGCCACCTACAAGGCTAACTATATATGTAATTATATATATATATA
CATATATATACACATATAGTTTGAAGGGTTATATGTATAACACTGTCACTGCTGGTGCATATATA
GGGAGCAAGTAGTGTAGTTGCCTTTTGTTCTATATATAATCTTTTAAAATATATATGTATATNCT
AAGTATGTTTTCTACCTTTGAACAAAAAAAAAAAAA

付録 4-AG/DP 遺伝子配列とプライマーの位置

ATGGAATTCCAAAGTGATCAATCCAGAGAGATGTCCCCTCAGCGGAAAATGGGTCGGGGCAAGAT
CGAAATCAAGCGGATCGAGAACACCACGAACCGGCAGGTGACCTTCTGCAAGCGCAGAAATGGGT
AG-RTF_w
TGCTGAAGAAGGCCTACGAGTTGTCTGTTCTGTGTGACGCTGAGGTGGCTCTCATCGTCTTCTCC
AG-RTR_v
AGCCGCGGCCGCTCTACGAGTATGCTAACAACAGTGTGAAGGCAACAATTGATAGGTACAAGAA
GGCATGCTCAGATTCCACTAATACTGGATCCATTTCTGAAGCCAATACTCAGTTTTATCAGCAGG
AAGCGAACAAATTGCGTCAACAATTAGTAATCTGCAGAACCAGAATAGGAACTACATGGGTGAA
GGTTTAGGTGGTTTTAACCTTAGGGATCTCAAGAACCTGGAATCCAAAATAGAGAAAGGAATCAG
CAAAATCCGTGCCAAGAAGAACGAGCTCCTGTTTGCAGAAATCGACTACATGCAAAGAGCAGGG
AAATCGATTTACATAATAACAACCAATACCTTCGGGCAAAGATAATTGAGACGGAGAGAGCTCAG
CAGCAGCAGCAGCAGATGAAGTTGATGCCTGGGAGTTCTAGCTATCATGAGCTGGCGCCGCCCA
GCAATTTGATGCAAGAACTACCTCCAACCTCGATGGATTTCAATCCACCTCTAGTTACTCCAAGC
AAGATCATCTCCCCTTCAGTTAGTGTAATAATCTGGGAGGGATCCATGGTGCTGTTTGTGCGCAA
AACTATATATATAAATATATATATGGATAATATGAAGTGTGACGACAACCTGGTACTTATGGCGTCT
TCAAGAAATGTAAGGAGTGAAGATGGAAGCTGATGGTTTTATGGATATGATGATGATAAACGTTA
CCTCAGACTTGTTATGTATTAAGTGGAGACATATGTTTTCTACTGTTTTATGTTGATGCTGTTTG
AACTGAATTGAGATATCATATTCAAATGTTTGTGGAGTTATATATATCTATTTCTCTAAAATAAA
AAAAAAAAAAAAA

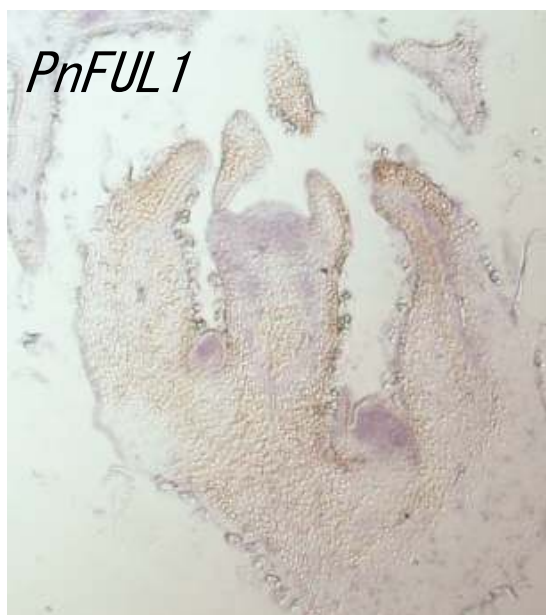
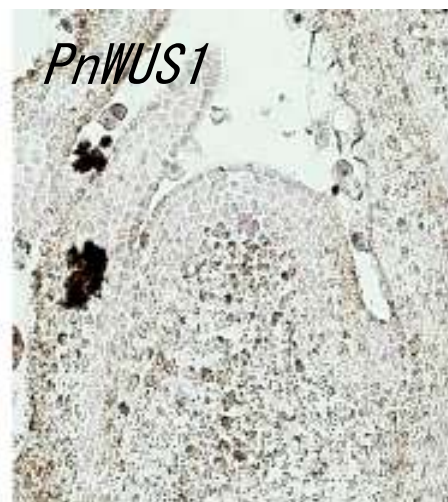
付録 5- *PnCLV1-like* 遺伝子配列とプライマーの位置 (次ページへ続く)

ATGGGGAAGCTCGCGGCGGTGAAAGTTATTGTTCTGATGAATAATAATTTTTCCGGTGACTTCCC
CGGGGAGATCTTGGGTGGGATGACGGAGCTTGAGGTGTTAACGTTTACAACAATAACTTCACCG
GTAACCTCCCGGTGGAGGTCGTGAAGATGAAGAACTGAGGACTCTTATTCTCGGCGGGAATTAC
TTCGCCGAGAAATCCCGGCGGCTACTCTGAGATCACTAGTTTGCAGATTTGCACTTACAGGG
AAACTCACTCACCGGTGTTATACCTCCAAGAATGTCTAACCTCCCAACCTTGAGGAACTAAAGC
TAGGCTATTTCAACACATATCACGGCGGCGTTCCGCCGAGTTCGGCTCGTTCGCCACTCTCCGC
CTTCTCGATCTCGGCGGCTGTAACCTCACCGGCACCATTCCGCCGAGCCTCGCGAATTTGAAACG
GCTGCATACTCTATTCTGCAAATGAACAGTCTCACCGGTCATATTCCGCCGAGCTGGGGAATA
TGGAGAGTTTAATGTCTCTGGATATTTCGTATAACAATATGACCGGAGAAATTCCTGAAAGTTTC
GCTCAGTTGAAAAATATGACGCTCTTAAACCTGTTCAATAACGAATTCCACGGTGAATCCCGGC
GTTTCATCGGCGACCTTCCAAACCTAGAAACGTTACAGGTTTGGGGTAACAACCTTCACGTTCGAAT
TGCCCGAGAATCTCGGGCGTAACGGCCGGTTTCTGTATCTGGACGTATCGTCCAACCGTTTCACC
GGTACGATTCCGAAACACATGTGCGCCGGCGGGAGGTTGAAGACGTTGATTCTCATGGAGAATTT
CTTCTTCCGTCCGATTCTGAAGAGCTCGGCGAGTGCAAATCGTTGATTACTGTTCCGCTTATGA
AGAATTTTCTGAACGGAACGGTTCTCCCGGTTCTTCAATCTGCCGCGGCTCGATATGCTTGAG
CTGAATAACAACCTTATTCTCCGGCGAGCTTCCGGCGGAGATTTCTGCCAGGAATTTAACGATTCT
CACTCTTTCAAACAATATGATCGCCGGCGAGATCCCTCCGGCCATTGGGGAATTAGAGAGACTCG
TGAAGCTGTGCTTGGCGCCAACAACCTTCGTGCGGAGAAATCCCTAATGAAATTTCGAAGTTACAG
AAGCTCTTGACCATTGATTTGAGCGGCAACGGTTTAAAAGGTGAGATTCCGGGTTCAATATCGCA
GTGCACCGAGCTGAACTCCATTGATTTACGCGGAAACAATCTCACCGGTGAAATTTCAAAGGAAA
TCTCAGAGCTTCACAGATTGAACGCACTCACTTATCCGGCAACGGCTATCCGGCGCAATTTCC
GCTGAACTAGGGCTAATGAATAGCTTAACCGTCTTGGACCTTTCTACAATGATTTCACCGGCCG
GAGACCCGCCAACGGGCAGCTAAGGCTCTTCGGCGACCGGTTTTTACCAGGAAATCCAAGCCTCT
GTTACCTCACGCCGATATTGCCCTCAGCTTCATCGGTGAAAACAGCATCTAATCATTCCCAT
GTTTTACCACGGCGAAGATGATGATCACGATAATAATCCTGGTCACGGTGGCGCTGCTGCTGGC
AGTCACGTGGGTGATAATCCGGCGGGAGAAGATCCGGAAATCAAAGCGTGGAAGCTCACGGCGT
TCCAGAGACTCGACTTCAGAGTAGACGACGTTCTGGAGTGCTTAAAGGAGGAGAACATCATCGGC
AAAGGCGGCGCCGGGATTGTCTACCGGGGATCCATGCCAACGGGTCGACGTGGCGATTAAAAA
GCTAATCGGGCGCGGACCGGCTGCCACGACCACGGTTTCTCGGCGGAGATTCAGACGCTGGGCA
GAATCAAGCACCGCCACATCGTCCGATTGCTGGGATACGTTTCCAACAACGACACGAACTTGCTG

付録 5-*PnCLV1-like* 遺伝子配列とプライマーの位置 (前ページから続く)

TTATACGAGTACATGTCTGAACGGGAGCTTAGGGGAGATGCTTCACGGGACCAAAGGATCGTATTT
GCAGTGGGAAACGCGGTACAGAATCGCCATGGAAGCCGCCAAGGGGCTCTGCTACTTGCACCACG
ATTGCTCGCCGGTTATTATCCATAGAGACGTCAAGTCCAATAACATCCTGCTCGACTCCGATCAC
GAGGCTCACGTGCGGATTTGCGGCTGGCTAAGTTCTTGCAGACGCGGGCGGTCCGAGTGCAT
GTCCTCCATCGCCGGATCTTATGGCTACATTGCACCAGAGTATGCATACACATTGAAAGTTGATC
AGAAGAGCGATGTGTATAGTTTCGGAGTAGTGTACTAGAGCTGATCACGGGACACAAACCGGTG
GGCGAGTTCGGGGACGGGGTGGACATAGTGAGGTGGGTGAGGAAGACCATCTCGGAGCTATCTCA
GCCATCCGATGCGGCCTCCGTGCTAGCCGTGGTGGATTCCAGGCTCAATGGCTACCCACTCCAGG
GCGTGATCAACCTGTTTAAGGTTGCCATGTTTTGCGTTGAAGATGAGAGTTCTGCCAGGCCAACC
CLV1-RTR_v CLV1-RTF_w
ATGAGAGAAGTTGTTACATGCTCACTAATTCTCCCAGCCTGCCCTACCTTCATCACTCTT**TG**
AGACTAATCACCTATATATTTTTCTTATTTTTATTTTAAAAAATGGGATAAGGCATGTATTGTATA
AATAAATTGTAATATTTGTGTTGTTTTCGGGTGCAATCTATCACCCAAAATTTGAGAACAACCT
GAGCTACTCGTGAGGGTCATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

付録 6-*PnWUS1*、*PnSTM1*、*PnFUL1* の *in situ* hybridization を別サンプルで行った結果。



引用文献

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T.** (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052-1056.
- Albrechtova, J. T. P., Heilscher, S., Leske, L., Walczysko, P., Wagner, E.** (2003) Calcium and pH patterning at the apical meristem are specifically altered by photoperiodic flower induction in *Chenopodium* spp. *Plant Cell and Environment* **26**, 1985-1994.
- Becker, A. and Theissen, G.** (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**, 464-489.
- Bernier, G.** (1971) Structural and metabolic changes in the shoot apex in transition to flowering. *Canadian Journal of Botany* **49**, 803-819.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A., Lejeune, P.** (1993) Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* **5**, 1147-1155.
- Bodson, M., Outlaw, W. H., Jr.** (1985) Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiology* **79**, 420-424.
- Bollenbach, T. J. Tatman, D. A. Stern, D.B.** (2003) CSP41a, a multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts. *The Plant Journal* **36**, p842-852.
- Borthwick, H. A.** (1964) Phytochrome action and its time displays. *American*

Naturalist **98**, 347-355.

Borthwick, H. A. and Hendricks, S. B. (1960) Photoperiodism in plants, *Science* **132**, 1223-1228.

Bowman, J. L., Smyth, D. R., Meyerowitz, E. M. (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37-52.

Burglin, T. R. (1997) Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research* **25**, 4173-4180.

Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z., Meyerowitz, E. M. (1996) The *CLAVATA* and *SHOOTMERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-1575.

Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. and Smyth, D. R. (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* **119**, 721-743.

Corbesier, L., Bernier, G., Perilleux, C. (2002) C:N ratio increases in the phloem sap during floral transition of the long-day plants *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **43**, 684-688.

Corbesier, L. and Coupland, G. (2005) Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant Cell and Environment* **28**, 54-66.

Corbesier, L., Lejeune, P., Bernier, G. (1998) The role of carbohydrate in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* **206**, 131-137.

- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacqumard, A., Lejeune, P., Van Onckelen, H., Perilleux, C., Bernier, G.** (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudates and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2511-2517.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z., Laux, T.** (1996) The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant Journal* **10**, 967-979.
- Ferrándiz, C., Pelaz, S., Yanofsky, M. F.** (1999) Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 321-354.
- Friedman, H., Goldschmidt, E. E., Halevy, A. H.** (1989) Involvement of calcium in the photoperiodic flower induction process of *Pharbitis nil*. *Plant Physiology* **89**, 530-534.
- Graschopf, A., Stadler, J. A., Hoellerer, M. K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S. D., Schweyen, R. J.** (2001) The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg²⁺ homeostasis and is subject to Mg²⁺-dependent control of its synthesis and degradation. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 16216-16222.
- Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, M. F., Martienssen, R.** (1998) The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**, 1509-1517.
- Gutierrez, R. A., MacIntosh, G. C., Green, P. J.** (1999). Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends in Plant Science* **4**, 429-438.

- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., Laux, T.** (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**, 657-668.
- Hake, S., Vollbrecht, E., Freeling, M.** (1989) Cloning *Knotted*, the dominant morphological mutant in maize using Ds2 as transposon tag. *EMBO Journal* **8**, 15-22.
- Han, P., Garcia-Ponce, B., Fonseca-Salazar, G., Alvarez-Buylla, E. R., Yu, H.** (2008) *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway. *Plant Journal* **55**, 253-265.
- Hayama, R., Agashe, B., Luley, E., King, R., Coupland, G.** (2007) A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* Homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. *Plant Cell*, **19**, 2988-3000.
- Hempel, F. D., Weigel, D., Mandel, M. A., Ditta, G., Zambryski, P. C., Feldman, L. J., Yanofsky, M. F.** (1997) Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* **124**, 3845-3853.
- Hiratsu, K., Mitsuda, N., Matsui, K., Ohme-Takagi, M.** (2004) Identification of the minimal repression domain of *SUPERMAN* shows that the DLELRL hexapeptide is both necessary and sufficient for repression of transcription in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321**, 172-178.
- Horlitz, M. and Klaff, P.** (2000) Gene-specific *trans*-regulatory functions of magnesium for chloroplast mRNA stability in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 35638-35645.

- Ikeue, N., Tanoi, K., Furukawa, J., Yokota, H., Ookuni, Y., Nakanishi, T. M.** (2001) Circadian rhythm in concentrations of Mg, K, Ca and Mn in Japanese morning-glory during flowering process. *Radioisotopes* **50**, 275-281.
- Ishikawa, R., Tamaki, S., Yokoi, S., Inagaki, N., Shinomura, T., Takano, M., Shimamoto, K.** (2005) Suppression of the floral activator *Hd3a* is the principal cause of the night break effect in rice. *Plant Cell* **17**, 3326-3336.
- Jackson, D., Veit, B., Hake, S.** (1994) Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**, 405-413.
- Kater, M. M., Dreni, L., Colombo, L.** (2006) Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3433-3444.
- Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B., Yamaguchi, J., Hake, S.** (1994) Sequence-analysis and expression patterns drive the maize *KNOTTED1*-like homeobox genes into 2 classes. *Plant Cell* **6**, 1877-1887.
- Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T., Davies, B.** (2006) Analysis of the transcription factor *WUSCHEL* and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell* **18**, 560-573.
- Kim, S., Koh, J., Yoo, M. J., Kong, H. Z., Hu, Y., Ma, H., Soltis, P. S., Soltis, D. E.** (2005) Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: implications for the evolution of floral regulators. *Plant Journal* **43**, 724-744.
- Kobayashi, N. I., Tanoi, K., Nakanishi, T. M.** (2007) Circadian rhythm of elemental concentration in Japanese morning-glory revealed by neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* **271**,

329-332.

Kobayashi, N. I., Tanoi, K., Nakanishi, T. M. (2006) Magnesium localization in shoot apices during flower induction in *Pharbitis nil*. *Canadian Journal of Botany* **84**, 1908-1916.

Kobayashi, Y. and Weigel, D. (2007) Move on up, it's time for change—mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes and Development* **21**, 2371-2384

Lejeune, P., Bernier, G., Requier, M. C., Kinet, J. M. (1993) Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis-alba* L. *Planta* **190**, 71-74.

Lenhard, M. and Laux, T. (2003) Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development* **130**, 3163-3173.

Lenhard, M., Jurgens, G., Laux, T. (2002) The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfill complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* **129**, 3195–3206.

Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G., Laux, T. (2001) Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**, 805–814.

Lidder, P., Gutierrez, R. A., Salome, P. A., McClung, C. R., Green, P. J. (2005) Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. *Plant Physiology* **138**, 2374-2385.

Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z.,

- Alvarez, J.P., Eshed, Y.** (2006). The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6398-6403.
- Litt, A** (2007) An evaluation of A-function: evidence from the *Apetala1* and *Apetala2* gene lineages. *International Journal of Plant Science* **168**, 73-91.
- Litt, A. and Irish, V. F.** (2003) Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: Implications for the evolution of floral development. *Genetics* **165**, 821-833.
- Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Parcy, F., Simon, R., Weigel, D.** (2001) A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I., Barton, M. K.** (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Ma, H., Yanofsky, M. F., Meyerowitz, E. M.** (1991) AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Development* **5**, 484-495.
- Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and Yanofsky, M. F.** (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* **360**, 273-277.
- Mayer, K. F. X., Schoof, H., Haecker, H., Lenhard, M., Jürgens, G., Laux, T.** (1998) Role of *WUSCEL* is regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.

- Nitasaka, E.** (2003) Insertion of an En/Spm-related transposable element into a floral homeotic gene *DUPLICATED* causes a double flower phenotype in the Japanese morning glory. *Plant Journal* **36**, 522-531.
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., Nakamura, K.** (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 252–261.
- Ormenese, S., Havelange, A., Deltour, R., Bernier, G.** (2000) The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* **211**, 370-375.
- Ormenese, S., Havelange, A., Bernier, G., Van der Schoot, C.** (2002) The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta* **215**, 67-78.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M.** (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959–1968.
- Parfitt, D., Herbert, R. J., Rogers, H. J., Francis, D.** (2004) Differential expression of putative floral genes in *Pharbitis nil* shoot apices cultured on glucose compared with sucrose. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2169–2177.
- Parker, R. and Song, H.** (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural and Molecular Biology* **11**, 121-127.
- Peng, S. M., Luo, T., Zhou, J. Y., Niu, B., Lei, N. F., Tang, L., Chen, F.** (2008) Cloning and quantification of expression levels of two MADS-box genes from *Momordia charantia*. *Biologia Plantrum* **52**, 222-230.

- Petracek, M. E., Dickey, L. F., Nguyen, T. T., Gatz, C., Sowinski, D. A., Allen, G. C., Thompson, W. F.** (1998) *Ferredoxin-1* mRNA is destabilized by changes in photosynthetic electron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9009-9013.
- Reiser, L., S'anchez-Baracaldo, P., Hake, S.** (2000) Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes. *Plant Molecular Biology* **42**, 151–166.
- Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., Gruissem, W.** (1999) Protein prenylation in plants: old friends and new target. *Plant Molecular Biology* **39**, 865–870.
- Roldan, M., Gomez-Mena, C., Ruiz-Garcia, L., Salinas, J., Martinez-Zapater, J. M.** (1999) Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes dark-morphogenesis and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **20**, 581–590.
- Sablowski, R.** (2007) Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **58**, 899-907.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J. F.** (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**, 691-706.
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., Laux, T.** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811-814.
- Satina, S., Blakelsee, A.F., Avery, A.G.** (1940) Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *American Journal of Botany* **27**, 895–905.

- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jurgens, G., Laux, T.** (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Searle, I., He, Y. H., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S., Amasino, R.A., Coupland, G.** (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**, 898-912.
- Seeley, K. A., Byrne, D. H., Colbert, J. T.** (1992) Red light-independent instability of oat phytochrome mRNA *in vivo*. *Plant Cell* **4**, p29-38.
- Shabala, S. and Hariadi, Y.** (2005) Effects of magnesium availability on the activity of plasma membrane in transporters and light-induced responses from brpad bean leaf mesophyll. *Planta* **221**, 56-65.
- Sheu, J. J., Yu, T. S., Tong, W. F., Yu, S. M.** (1996) Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice alpha-amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 26998-27004.
- Shiu, S. H. and Bleecker, A. B.** (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10763-10768.
- Shore, P. and Sharrocks, A. D.** (1995) The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry* **229**, 1-13.
- Simon, R., Igeno, M. I., Coupland, G.** (1996) Activation of floral meristem

identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* **384**, 59-62.

Smyth, D. R., Bowman, J. L., Meyerowitz, E. M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.

Spinelli, S. V., Pontel, L. B., Vescovi, G., Soncini, F. C. (2008) Regulation of magnesium homeostasis in *Salmonella*: Mg²⁺ targets the *mgtA* transcript for degradation by RNase E. *FEMS Microbiology Letters* **280**, 226-234.

Theissen, G. and Saedler, H. (2001) Floral quartets. *Nature* **409**, 469-471.

Thomas, B and Vince-Prue, .D. (1997) *in* Photoperiodism in plants, 2nd ed., Academic Press, San Diego.

Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *PLANT CELL* **16**, 533-543.

Tucker, M. R. and Laux, T. (2007) Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in Cell Biology* **17**, 403-410.

Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G. (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**, 1003-1006.

Vaughan, J.G. (1952) Structure of the angiosperm apex. *Nature* **169**, 458-459.

Walczysko, P., Wagner, E., Albrechtova, J. T. P. (2000) Use of co-loaded Fluo-3 and Fura Red fluorescent indicators for studying the cytosolic Ca²⁺ concentrations distribution in living plant tissue. *Cell Calcium* **28**, 23-32.

Weigel, D. and Jurgens, G. 2002 Stem cells that make stems. *Nature* **415**, p751-754.

Wigge, A. P., Kim, M. C., Laeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**, 1056-1059.

Zeevaart, J. A. D. (1976) Physiology of flower formation. *Annual Reviews in Plant Physiology* **27**, 321-348.

瀧本 敦 (1998) 花を咲かせるものは何か. 中公新書.

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しうる遺伝子、*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指し、 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

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

謝辞

本研究を行なうにあたり、放射線植物生理学研究室の中西友子教授には御指導、御鞭撻をいただき、植物の持つ性質の面白さ、研究の楽しさも教えていただきました。また、生活に関する出来事についても御理解いただいたのみならず、折に触れて貴重な御助言をいただいたことについて、深く感謝致します。放射線植物生理学研究室の田野井慶太郎助教には、個々の実験に際し惜しみないご協力をいただき、研究の方向性について常日頃から御助言いただきました。

Freiburg 大学 Department of Plant Physiology の Edgar Wagner 教授には花成誘導研究の課題や植物の持つ機能の可能性について貴重なお話をいただき、染色実験の結果についてもディスカッションしていただきました。

自然科学研究機構 基礎生物学研究所の飯田滋教授、星野敦助教には、分子生物学的研究手法を基礎から御教授いただきました。両先生ならびに分子遺伝学研究部門の皆様の並々ならぬご好意に、心よりお礼申し上げます。

放射線植物生理学研究室の皆様とは、しばしば研究について語り合い、また、日々の研究生活において筆舌に尽くし難い暖かいサポートをいただきました。深く感謝いたします。

最後に、足掛け 6 年間に及ぶ博士課程での研究活動を可能にし、励ましてくれた家族に心から感謝いたします。ありがとうございました。

平成 21 年 3 月

小林 奈通子