

光発芽種子における発芽誘導機構
に関する研究

豊増知伸

①

博士論文

光発芽種子における発芽誘導機構
に関する研究

Studies on mechanism of germination of
photoblastic seed

豊増 知伸

Toyomasu Tomonobu

論文目次

序論	-----	1
第1章 レタス種子の光発芽誘導と内生ジベレリン	-----	10
第1節 レタス完熟種子中の内生ジベレリンの定性分析		
1-1 緒言	-----	10
1-2 材料及び方法	-----	10
1-3 結果及び考察	-----	13
第2節 レタス種子の発芽を制御する活性型ジベレリン		
2-1 緒言	-----	17
2-2 材料及び方法	-----	17
2-3 結果及び考察	-----	18
第3節 レタス種子中の主要内生ジベレリンレベルに対する光の効果		
3-1 緒言	-----	20
3-2 材料及び方法	-----	20
3-3 結果及び考察	-----	26
第4節 ジベレリン処理及び赤色光処理のレタス種子中の内生アブシジン酸レベルに対する効果		
4-1 緒言	-----	31
4-2 材料及び方法	-----	31
4-3 結果及び考察	-----	35
第5節 まとめ	-----	41
第2章 レタス種子においてジベレリン処理により誘導される遺伝子のcDNA クローニング	-----	44
第1節 ディファレンシャルスクリーニングによるジベレリン誘導性遺伝子のクローニング		
1-1 緒言	-----	44
1-2 材料及び方法	-----	44
1-3 結果及び考察	-----	58

第2節	ジベレリン誘導性遺伝子 mRNA のジベレリン処理, 赤色光 処理による発現の経時変化	
2-1	緒言	62
2-2	材料及び方法	62
2-3	結果及び考察	64
第3節	ジベレリン誘導性遺伝子 mRNA のジベレリン処理, 赤色光 処理による発現に対するアブシジン酸の効果	
3-1	緒言	68
3-2	材料及び方法	68
3-3	結果及び考察	69
第4節	ジベレリン誘導性遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列	
4-1	緒言	73
4-2	材料及び方法	73
4-3	結果及び考察	83
第5節	まとめ	97
	使用機器, 試薬類, 使用キット	100

総括	106
----	-----

参考文献	107
------	-----

謝辞	113
----	-----

《略語表》

Axx	Absorbance at xx nm
ABA	Abscisic acid
AE ☒	Acidic ethyl acetate soluble fraction
BSA	Bovine serum albumin
DEA	Diethylaminopropyl
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FR	far-red light
fw	fresh weight
GA	Gibberellin
GAX	Gibberellin Ax
GC/MS	Gas chromatography/mass spectrometry
GC/SIM	Gas chromatography/selected ion monitoring
GTC	Guanidine thiocyanate
HOAc	Acetic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
KRI	Kovats retention index
MeOH	Methanol
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
Me-TMSi	Methyl ester-trimethylsilyl ether
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MSTFA	N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide
N(CH ₃) ₂	Dimethylamino
NaOAc	Sodium acetate
NH ₄ OAc	Ammonium acetate
ODS	Octadecylsilane
PEG	Poly(ethylene glycol)
Pfr	Far-red-light-absorbing form of phytochrome
Pr	Red-light-absorbing form of phytochrome
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
R	Red light
RIA	Radioimmunoassay
Rt	Retention time
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N, N, N', N',-tetramethylethylenediamine
CsTFA	Cesium trifluoroacetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolet
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

序論

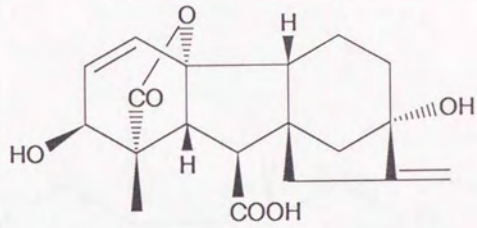
移動性が欠如している高等植物は、生存し続けるためには様々な環境の変化に適応していかなければならない。主な環境因子としては、光、水分、温度等が挙げられるが、その中でも光は独立栄養である植物にとって光合成を行うためのエネルギー源として必要であり、植物は光を得るために、光の有無、強弱、波長、方向、照射時間等を感知し適応していく。さらに植物はその生活環の諸過程において光を情報源として有効に利用している。光の受容・検知に直接関与した物質の一つとしてフィトクロムがある (Butler et al. 1959)。フィトクロムとは、緑色植物に広範に分布する赤色光/近赤外光可逆反応の光受容色素タンパク質であり、赤色光域 (666 nm) に吸収極大を持つ Pr 型と近赤外光域 (730 nm) に吸収極大を持つ Pfr 型の二つの型をとり、赤色光吸収により Pr 型は Pfr 型に、近赤外光吸収により Pfr 型は Pr 型に相互に変換する性質を持つ。これまでもフィトクロムに関する生理学的、生化学的研究が活発になされてきたが、光受容から様々な生理作用発現にいたる諸過程については未だに不明な点が多い。

高等植物の中には、タバコ (Nicotiana tabacum L.)、レタス (Lactuca sativa L.)、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana Heyn.) 等のように光がないと発芽できない種子 (光発芽種子) があり、その発芽制御はフィトクロムにより行われていると考えられている。その中でも特に、レタス (cv. Grand Rapids) 種子の光発芽は、フィトクロム発見の端緒となった現象 (Borthwick et al.

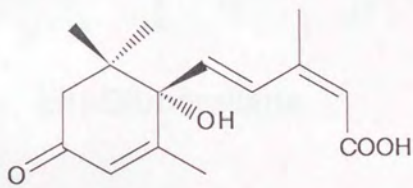
1952)として有名である。即ち、暗黒下では発芽できないレタス種子は短時間の赤色光照射により発芽が誘導され、それに引き続く近赤外光照射は、赤色光の発芽誘導効果を完全に打ち消す。この光発芽誘導について数多く研究がなされているが(Bewley and Black 1982)、その機構は依然として解明されていない。

光発芽種子であるレタス種子は、果皮を除去すると暗黒下でも発芽することから、果皮は、物理的な生長抑制、水分吸収制限等により発芽を抑制していると考えられていた(Ikuma and Thimann 1963)。また、果皮中には発芽阻害物質として知られている ABA(図序-1)が $0.33 \mu\text{g/g}$ の濃度で存在することが示された(Inoue 1990)。一方、 GA_3 (図序-1)がレタス種子において赤色光と同様の効果を示すことは知られているが(De Greef and Fredericq 1983)、 GA の生理的濃度比べて高濃度(10^{-4} M 程度)においてのみ発芽誘導効果があるので、発芽誘導に GA が関与している可能性は低いと考えられていた。しかし、それは無傷種子を用いた発芽試験の場合であり、種子の中央にタングステン針で穴を開けた種子を用いると、 GA の生理的濃度に近い 10^{-7} M 程度で十分発芽が誘導されるようになった(Inoue 1990)。しかも、 GA 生合成阻害剤により種子発芽は抑制され、その効果は本来種子発芽を誘導するのに充分なはずの赤色光照射では解除されないが、 GA_3 投与によって完全に解除されることなどから、 GA による赤色光照射の代替が可能であり、赤色光効果発現のためには GA の de novo 合成が必要であることが示された(Inoue 1990)。

植物ホルモンの一つである GA は現在までに 90 種以上も発見されている。高等植物には GA の 13 位(図序-2)がその生合成の早

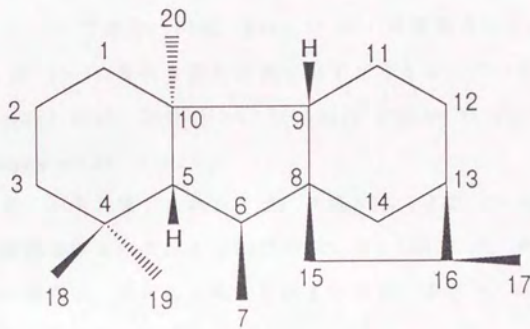


Gibberellin A₃ (GA₃)



Abscisic acid (ABA)

図序-1 GA₃ と ABA の構造



ent-Gibberellane

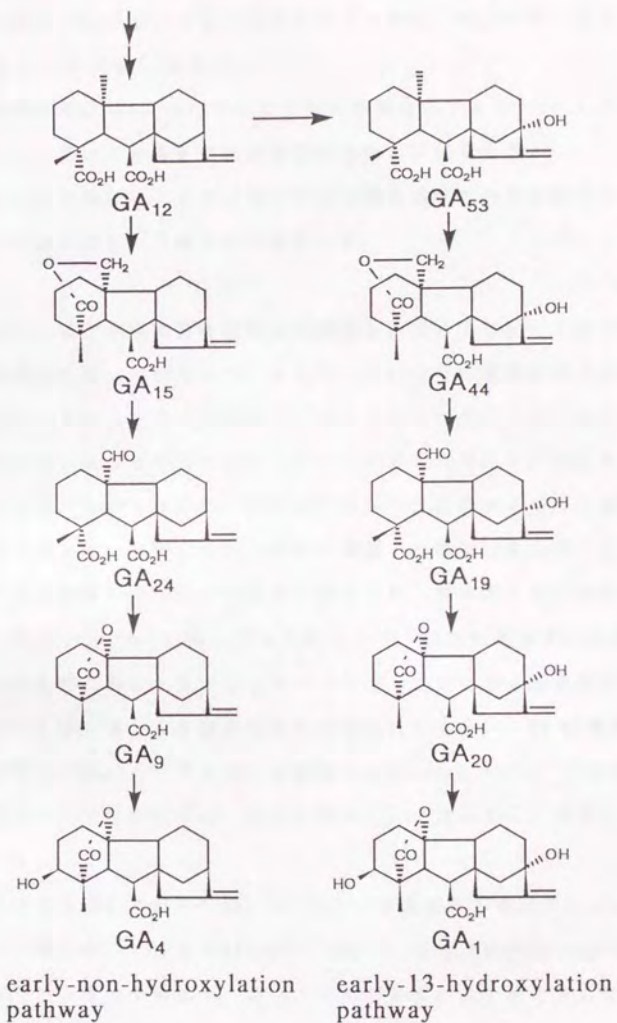
図序-2 GA の基本骨格と炭素番号

期に水酸化される経路と、生合成の早い段階では GA の母核が水酸化されない経路の 2 種類の GA 生合成経路が存在すると考えられており、それぞれ early-13-hydroxylation pathway, early-non-hydroxylation pathway と呼ばれている (図序-3)。各々の経路での活性型 GA は、それぞれ 3 位 (図序-2) に β 配向の水酸基を持つ GA_1 と GA_4 であり、 GA_{20} 、 GA_{19} は GA_1 に変換されて、また、 GA_9 、 GA_{24} は GA_4 に変換されて活性を示すと考えられている (Phinney and Spray 1982; Suzuki et al. 1981; Ingram et al. 1984; Nakayama et al. 1991)。

一方、レタス種子においては、外部から与えた GA の代謝についての研究はなされている (Durley et al. 1976) が、内生 GA についての研究は、ほとんど報告されていない。そこで、本博士論文研究の第 1 章においては、

- ①レタス種子中の内生 GA を同定し、そこで機能している GA 生合成経路を解明すること、
 - ②発芽を制御する内生の活性型 GA を明らかにすること、
 - ③発芽条件及び非発芽条件において培養したレタス種子中の主要内生 GA レベルの経時変化を測定し、光条件が内生 GA レベルに及ぼす影響について検討すること、
- について追究した。

一方、ABA が赤色光処理あるいは GA の投与により誘導される発芽を阻害すること (Khan 1968; Sankhla and Sankhla 1968)、また赤色光処理により種子における ABA 内生レベルが顕著に減少することが知られている (Braun and Khan 1975)。赤色光処理により GA の内生レベルが上昇すると仮定すると、その GA の増加により ABA



図序-3 高等植物における GA の主要合成経路

の内生レベルが低下する可能性が考えられる。そこで第1章では、上記3点の課題に加えて、

④外部からの GA₃ の投与により発芽阻害物質である ABA の内生レベルが受ける影響を赤色光処理の場合と比較すること、
もあわせて検討し、レタス種子の発芽誘導機構を内生植物ホルモンレベルの変動という観点から追究した。

近年、植物が示す生理現象発現機能を解明するために、分子生物学的手法が用いられるようになった。それら生理現象の多くは内生の植物ホルモンを介して引き起こされていると考えられており、植物ホルモンの作用機作の分子レベルでの研究も盛んに行われるようになった。しかしながら、現時点では、それに関する有用な知見は極めて乏しく、植物ホルモン誘導性遺伝子の機能解析を通じてようやくその端緒が開かれつつあるに過ぎない。植物ホルモンの中でもオーキシンと ABA に関しては当該ホルモン誘導性遺伝子の研究が進んでいるのに対し、エチレンやサイトカイニンによる誘導性遺伝子については、ほとんど重要な知見は得られていない。GA 誘導性遺伝子に関しては、 α -アミラーゼ遺伝子 (Akazawa et al. 1990) が最も研究されているものの、それ以外についてはほとんど研究は進んでいない。

種子発芽過程においては、GA により誘導される遺伝子についていくつかが報告されている (Fincher 1989)。その代表的なものは前述の α -アミラーゼ遺伝子であり、その他にもシステインプロテイナーゼ遺伝子 (Whittier et al. 1987)、カルボキシペプチダーゼ遺伝子 (Baulcombe et al. 1987) 等が知られている。 α -アミラーゼ

遺伝子はイネ、大麦の糊粉層を研究材料として詳細に調べられており、そのシス活性化因子 (Skriver et al. 1991)、トランス因子 (Ou-Lee et al. 1988) も追究されている。

本論文において研究対象としているレタス種子は、これまで GA 誘導性遺伝子をクローニングするための材料として用いられたことはないが、赤色光照射により誘導された発芽過程で活性化される酵素の研究はいくつか行われている。その例としては、胚の生長のためのエネルギー獲得のための脂肪酸分解系にかかわるイソシトレートリアーゼ (Mayer et al. 1968; Eldan et al. 1974)、炭水化物分解系にかかわる α -ガラクトシダーゼ (Leung and Bewley 1981)、核酸や膜の成分として、あるいは各種リン酸化等に利用するためのリン酸を供給するホスファターゼ (Meyer et al. 1971)、胚軸伸長時の細胞壁の新陳代謝にかかわるマンナーゼ (Halmer et al. 1976)、酸性インペルターゼ (Eldan and Mayer 1974)、胚のタンパク質合成の素材であるアミノ酸を供給するために貯蔵タンパク質を分解するプロテイナーゼ (Shain and Mayer 1965; Leung et al. 1979)、アミノ酸の中でもグルタミンレベルを上昇させ胚の吸水力 (growth potential) を高めていると考えられているグルタミン合成酵素 (竹葉 1984) 等が報告されている。しかしながら、これら酵素の中で遺伝子の塩基配列が決定され、その転写レベルで研究が行われているのはグルタミン合成酵素だけである (Sakamoto et al. 1990)。

そこで、GA によるレタス種子発芽誘導機構を解明するための基礎的知見を得るために、本博士論文研究の第 2 課題として、

- ①レタス種子において、GA 処理により誘導される遺伝子をディフференシャルスクリーニングによりクローニングすること、

- ②クローニングした遺伝子の mRNA の GA 処理による発現の経時変化を調べ、赤色光処理によるそれと比較すること、
 - ③ GA 処理、赤色光処理による mRNA の発現に対する ABA (発芽阻害物質) の効果を調べること、
 - ④クローニングした遺伝子の塩基配列を決定し、そのコード領域に対するホモロジー検索によりその遺伝子の機能を推定すること、
- の 4 点について追究した。

第1章 レタス種子の光発芽誘導 と内生ジベレリン

第1節 レタス完熟種子中の内生ジベレリンの定性分析

1-1 緒言

レタス種子の発芽はフィトクロムにより制御されており、暗黒下では発芽しないが、短時間の赤色光照射により発芽は誘導され、それに続く近赤外光照射により発芽は抑制される。そのレタス種子は、暗黒下においても GA₃ の投与により発芽が誘導されることは知られている。そこでレタス種子中の内生 GA と発芽誘導との関連を調べるために、まずレタス種子中の内生 GA を同定し、そこに機能する GA 生合成経路を説明することを目的とした。

1-2 材料及び方法

① 植物材料

レタス Grand Rapids 完熟種子はサカタ種苗より購入し、分析開始まで 4°C で保存した。採取後 2 年のレタス種子を GA 定性分析に供した。

② 抽出及び溶媒分画

レタス完熟種子 100 g を MeOH により抽出し、300 ml の抽出液

を得た。その MeOH 抽出液を減圧下で濃縮し、得られた水溶液を常法通り溶媒分画し、AE 区を得た。

③ Sep-Pak (ODS) 処理

AE 区を 50% MeOH 水溶液 1 ml に溶解し、Sep-Pak (ODS) カートリッジ (Waters 社製) に通過、吸着させた後、80% MeOH 水溶液 6 ml で溶出した。溶出液を減圧下で濃縮乾固した。

④ ODS-HPLC

Sep-Pak (ODS) 溶出物について、ODS-HPLC を以下の条件で行った。試料注入から 32 分まで 1 分毎に分取し、32 分から 50 分までを 1 分画とした。

カラム: Senshu-Pak ODS-4253-D (10 mm i.d. x 250 mm)

溶媒系: A- MeOH

B- 1% HOAc 水溶液

0- 2 min A 30%, B 70% (isocratic)

2-30 min A 30%, B 70% ~ A 100%, B 0%

(28-min-linear gradient)

30-50 min A 100%, B 0% (isocratic)

流速: 3 ml/min

温度: 40°C

各画分は遠心エバポレーターを用いて溶媒を溜去した。

⑤ 矮性イネ生物検定法

ODS-HPLC によって得られた各画分について矮性イネ単銀坊主 (*Oryza sativa* L. cv. Tan-ginbozu) を用いて, Murakami (1968) の方法で GA の活性検定を行った. 試料はイネ一本当たり 2 g fw 分をのせて, 検定は 6 連で行った.

⑥ R I A

チューブ 1 本当たり 2 g fw 分の試料を用いて 3 連で RIA を行った. RIA は抗 GA₁-Me 抗体, 抗 GA_{2α}-Me 抗体を用いて Yamaguchi et al. (1987, 1990) の方法で行った.

⑦ Sepralyte (DEA) 処理

矮性イネ生物検定法及び RIA によって GA 様活性が認められた画分について Sepralyte 処理を行った. 試料を MeOH 1 ml に溶解させ, DEA ゲル 1 g を充填したカラム (8 ml 用リザーバー, ユニフレックス社製) に通過吸着させた後, MeOH, 0.5% HOAc in MeOH, 1% HOAc in MeOH の順にそれぞれ 10 ml ずつ用いて溶出した. 0.5% HOAc in MeOH 溶出区を GA 分画とし, 濃縮乾固した.

⑧ G C / M S

試料をジアゾメタンでメチル化した後, MSTFA で 60°C, 20 分間加熱処理を行い, Me-TMSi 化したものについて GC/MS 分析を行った. 条件は以下の通りである.

機種: JEOL DX-303 マススペクトロメーター

カラム: Fused silica chemically bonded capillary column

DB-1 (0.258 mm i.d. x 15 m, J&W Scientific 社製)

He pressure: 64 kPa

インジェクション: スプリットレスモード

(sampling time: 2 min)

イオン化法: 電子衝撃イオン化法 (イオン化電圧: 70 eV)

カラム温度: 120°C (2 min) 定温

120°C → 216°C (16°C/min) 昇温

216°C (5 min) 定温

216°C → 280°C (8°C/min) 昇温

1-3 結果及び考察

レタス完熟種子 100 g を MeOH で抽出し, その抽出物について溶媒分画により得られた AE 区を予備精製後, ODS-HPLC により精製分画した. 各画分について矮性イネ生物検定, 及び RIA を行い, GA 様活性のある画分を Rt 12-17 min, 20-22 min, 22-24 min の 3 つにまとめた. これら 3 つの画分について各々 Sepralyte 処理した後, Me-TMSi 誘導体とし, GC/MS 分析を行った. その結果, 表 1-1 に示すように, GA₁, 3-epi-GA₁, GA₁₇, GA₁₉, GA₂₀ と GA₇₇ という一連の 13-OH-GA が KRI とマススペクトルにより同定された. 内生レベルは, 3-epi-GA₁, GA₁₇, GA₁₉, GA₂₀ は比較的高く, GA₁ と GA₇₇ は低かった. GA₄ や GA₉ (13-H-GA) は, 各々に高い交差反応性を示す抗 GA₁-Me 抗体, 抗 GA₂₀-Me 抗体を用いた RIA によっても検出されなかった. アルカリ条件下では, GA₁ は GA₁:3-epi-

表 1-1 レタス (cv. Grand Rapids) 完熟種子から
GC/MS分析により同定されたGAs

Rt on HPLC (min)	Identified GA	*KRI	Principal ions and relative abundance (% base peak)
12-17	GA ₁	2663	506 (M ⁺ , 100), 491 (10), 448 (26), 376 (39), 313 (6)
20-22	3- <u>epi</u> -GA ₁	2775	506 (M ⁺ , 100), 491 (8), 448 (26), 459 (10), 376 (20), 313 (5)
	**GA ₇₇	2631	506 (M ⁺ , 53), 491 (9), 416 (41), 403 (100), 390 (18), 347 (24)
	GA ₂₀	2482	418 (M ⁺ , 100), 403 (15), 390 (7), 375 (52), 301 (15)
22-24	GA ₁₇	2572	492 (M ⁺ , 100), 460 (48), 432 (48), 401 (26), 373 (45)
	GA ₁₉	2590	462 (M ⁺ , 7), 434 (100), 402 (22), 375 (44), 374 (49), 345 (22)

*KRI; Kovats retention index

**GA₇₇-MeTMSiと12-epi-GA₇₇-MeTMSiのKRIは非常に近く、マススペクトルもほとんど同じであるので、GA₇₇-MeTMSiと12-epi-GA₇₇-MeTMSiの合成標品との直接比較によりGA₇₇を同定した。

GA₁=1:3 の比で異性化することが示されており (Cross et al. 1961), 同定された GA の中で 3-epi-GA₁ は精製過程における人工産物である可能性が考えられる. しかしながら, レタス種子抽出物において 3-epi-GA₁ は GA₁ の 5 倍以上存在すること, 第 3 節で GA 定量分析の際に内部標準として加えた [²H₅]GA₁ は精製過程において [²H₅]3-epi-GA₁ へ変換されなかったことから, 同定された 3-epi-GA₁ は人工産物ではなく, レタス種子中の内生 GA の一つであると考えられる. すでに 3-epi-GA₁ が天然から同定された例はいくつか報告されている (Jones and Zeevaart 1980; Pearce et al. 1987; Nakayama et al. 1990). 以上の結果, レタス種子においては図 1-1 に示すように主要 GA 生合成経路として early-13-hydroxylation pathway が機能していることが示された. レタス芽生えにおいても同様の GA 生合成経路が機能していることは示されている (Waycott et al. 1991; Toyomasu et al. 1992). なお, 3-epi-GA₁ の直接の前駆体は GA₂₀ であると考えられる. その理由としては, レタス芽生えにおいては, [³H]GA₂₀ は [³H]GA₁, [³H]3-epi-GA₁ 様物質へ変換されるのに対し, [³H]GA₁ の [³H]3-epi-GA₁ への変換はみられなかった (豊増 1991) ことがあげられる.

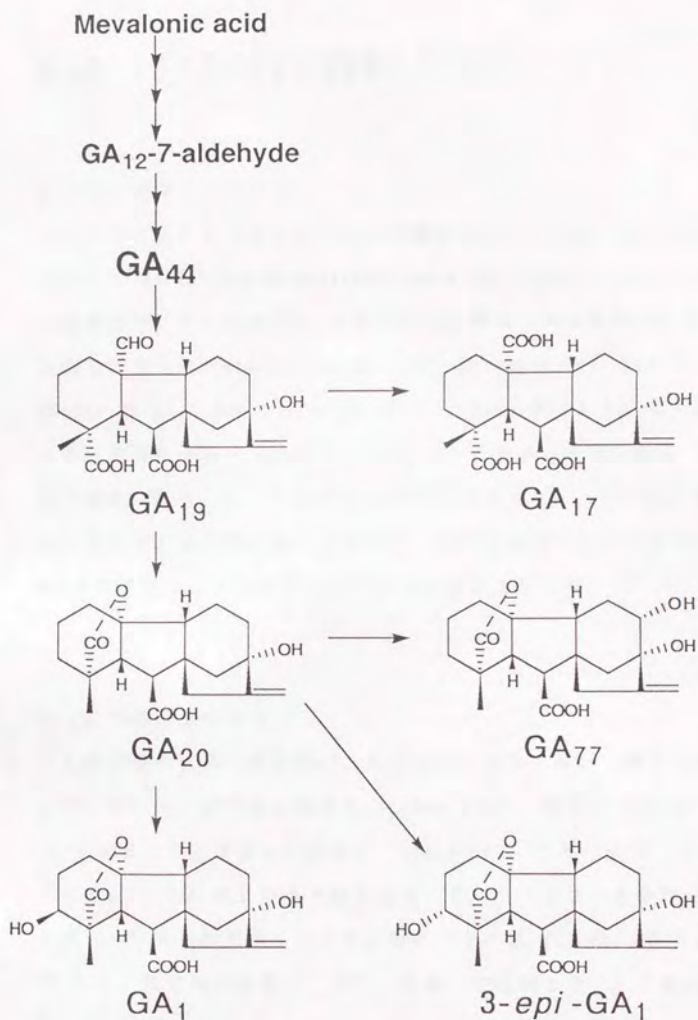


図 1-1 レタス (cv. Grand Rapids) 種子において機能していると想定されるGA合成経路

第2節 レタス種子の発芽を制御する活性型ジベレリン

2-1 緒言

第1節で示されたように、レタス種子において主要 GA 生合成経路として early-13-hydroxylation pathway が機能している。多くの高等植物においては GA_1 が基部伸長を制御する活性型 GA と考えられている (Phinney and Spray 1982; Suzuki et al. 1981; Ingram et al. 1984; Toyomasu et al. 1992) が、レタス種子においても発芽を制御する活性型 GA は GA_1 であると推定される。活性型と推定される GA_1 、その直前の前駆体である GA_{20} のレタス種子暗発芽誘導活性を調べることにより、発芽を制御する内生の活性型 GA を決定することを目的として以下の実験を行った。

2-2 材料及び方法

レタス種子は第1節で用いたものと同じものを用い、種子の中央にタングステン針で穴を開けた (Inoue 1990)。培地は MES を 1 mM となるように蒸留水に溶かし、0.1 N NaOH で pH を 6.1 にあわせたもの (以後 MES 培地と記) を用いた。ジベレリンを含む MES 培地 1 ml を入れたポリスチレン製のペトリ皿 (30 mm i.d.) に 20 粒の穴開き種子を播き、25°C、暗黒下で培養した。2 日後に発芽率を測定した。

2-3 結果及び考察

GA₁ 及び GA₂₀ のレタス種子暗発芽誘導活性を図 1-2 に示す。本検定では穴開き種子を用いているが、それは無傷種子よりも穴開き種子の方が約 1,000 倍 GA に対する感度が上がるためである (Inoue 1990)。GA₂₀ は 10⁻⁴ M で暗発芽誘導活性が認められたが、GA₁ は 10⁻⁷ M 及びそれ以上の濃度で活性を示した。このことは、GA₁ がレタス種子の発芽を制御する活性型 GA であることを示唆するものである。一般に高等植物の基部伸長においては、GA₁ や GA₄ のように 3 β位の炭素 (図序-2) に水酸基をもつ GA が活性型と考えられている。さらに、レタス種子においては GA₁ とほぼ同様の化学構造を有する GA₃ にも GA₁ と同等あるいはそれ以上の発芽誘導活性があること (Inoue 1990) から、GA₁ が活性型 GA であるという推論は妥当であると考えられる。

なお、GA₂₀ の低い暗発芽誘導活性は、暗黒下で培養しているレタス種子において GA₂₀ から活性型 GA である GA₁ への変換率が低いことによると考えられる。

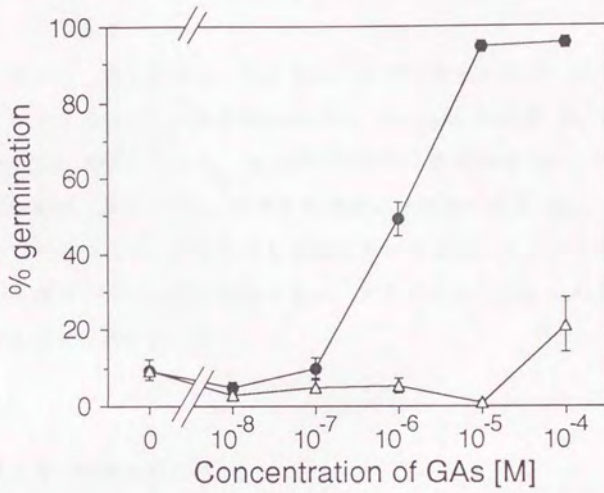


図 1-2 GA₁とGA₂₀のレタス種子暗発芽誘導活性

播種と同時にGAは投与した。発芽率は播種後2日で測定した。

発芽率は、10連の平均値±標準誤差で表した。●-, GA₁; △-, GA₂₀

第3節 レタス種子中の主要内生ジベレリンレベルに対する 光の効果

3-1 緒言

第1節, 第2節で示したように, レタス種子においては GA_1 を活性型とする early-13-hydroxylation pathway が主要 GA 生合成経路として機能している. そこで, 活性型と思われる GA_1 , その直前の前駆体である GA_{20} , そのまた直前の前駆体である GA_{19} の3種の GA について, 発芽条件と非発芽条件で培養したレタス種子における内生レベルの経時変化を調べ, 光条件が内生 GA レベルに与える影響の解析を試みた.

3-2 材料及び方法

① 植物材料

1984年アメリカ Ferry Morse 産のレタス Grand Rapids 種子より選抜したウイルスフリーの種子をオーストラリアの South Pacific Seeds で栽培し, 採種した種子(1992年産, 採取後6か月)を用いた. 種子は, デシケーター中(4°C)で保存した.

② 光源とフィルター

赤色光 ($5.0 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) は 20 W 蛍光灯 (FL20S BRN/18, 東芝) の光を Torayglass #130 (東レ) のフィルターを通して得た. 近赤外光 ($4.6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) は, 20 W 蛍光灯 (FL20S FR74, 東芝) の光を

Deglass A900 (旭化成) のフィルターを通して得た、安全光は、蛍光灯 (FLR40 G/A, 東芝) にビリジアン (431C) とサニーオレンジ (222C) の cutting sheet (中川化学) を各々 2 重に巻き付けて得た。以下の“暗黒下”の作業は全てこの安全光下で行った。

③ 内部標準

[1, 2, 2, 3 α , 6-²H₅]GA₁, [1, 2, 2, 3 α , 6-²H₅]GA_{2a} は, Endo et al. (1989) によって調製されたものを, [17, 17-²H₂]GA_{1a} は, L. N. Mander 教授 (オーストラリア国立大学) より供与されたものを用いた。各々の構造は図 1-3 に示す。

④ 分析材料

25°C, 暗黒下でレタス完熟種子 10 g を 100 ml MES (pH 6.1) 培地に浸し (295 x 220 x 43 mm 角型スチロール容器内), 3 時間後に以下のような光処理を行った (図 1-4)。

- i) 近赤外光照射 (FR 処理種子)
 - ii) 近赤外光照射 → 赤色光照射 (FR/R 処理種子)
 - iii) 近赤外光照射 → 赤色光照射 → 近赤外光照射 (FR/R/FR 処理種子)
- 各光照射は 10 分間行った。これら光条件の種子で発芽するのは FR/R 処理種子のみである。この光処理の直後に培地を 40 ml 吸い取り (十分に吸水した種子では過剰の水は発芽に阻害的に働くため), そのまま暗黒下で培養した。FR 処理種子は光処理から 0, 3, 6, 8 時間後に, FR/R 処理種子は光処理から 3, 6, 8 時間後に, FR/R/FR 処理種子は光処理から 6 時間後に採取し, 400 ml の MeOH に浸した。なお, 各定量分析用試料の調製には 40 g の完熟種子を用



図 1-4 GA定量分析のための試料調製法

吸水開始3時間後に各々の光処理を行った。種子の採取は、
○で囲んだ時間に行った。

■, 暗黒下; □, 近赤外光照射(10分間); ■, 赤色光照射(10分間)

いた。FR 処理種子と FR/R 処理種子の発芽の経時変化は、以下のようにして測定した：上述と同様に培養している種子から、所定の時間毎（FR 処理種子については光処理後 17, 21, 25, 29, 44 時間；FR/R 処理種子については処理後 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 44 時間）に約 100 粒の種子を無作為に取り出し、発芽率を測定した。

⑤ 抽出及び溶媒分画

各試料をポリトロンで破碎後、吸引濾過し、残渣を 400 ml MeOH で 2 回再抽出し、濾液を集めて MeOH 抽出液 (1200 ml) とした。各 MeOH 抽出液に、内部標準として、 $[^2\text{H}_5]\text{GA}_1$ 50 ng, $[^2\text{H}_2]\text{GA}_{19}$ 100 ng, $[^2\text{H}_5]\text{GA}_{28}$ 1 μg を加えた後、ロータリーエバポレーターで濃縮して得られた水溶性残渣を蒸留水で 300 ml にし、pH を 2~3 に調整して常法通り溶媒分画を行い AE 区を得た。

⑥ PVPP 処理

AE 区を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.6) 6 ml に溶かし、PVPP (東京化成工業社製) 3 g を充填したカラム (24 mm i.d. x 380 mm) に通過吸着せしめた後、0.1 M リン酸緩衝液 60 ml で溶出した。溶出液を pH 2~3 に調整し、等量の EtOAc で 3 回抽出した。EtOAc 相をあわせ、無水 Na_2SO_4 で脱水後、濃縮乾固した。

⑦ Sep-Pak (ODS) 処理

PVPP 溶出物を 67% MeOH 水溶液 1.5 ml に溶解し、Sep-Pak (ODS) カートリッジに通過させた後、80% MeOH 水溶液 6 ml で溶出した。溶出液を減圧下で濃縮乾固した。

③ Sepralyte (DEA) 処理

Sep-Pak 溶出物を MeOH 0.6 ml に溶解させ、DEA ゲル 0.6 g を充填したカラム (4 ml 用リザーバー, ユニフレックス社製) に通過吸着させた後、順に MeOH (6 ml), 0.5% HOAc in MeOH (12 ml) で溶出した。溶出液を合わせ、濃縮乾固した。

④ ODS-HPLC

Sepralyte 処理により得られた GA 分画について、第 1 節と同様の条件で ODS-HPLC を行った。試料注入から 10 分から 16 分までを GA₁ 画分、17 分から 26 分までを GA_{1.9/2.0} 画分として分取した。

⑩ N(CH₃)₂-HPLC

ODS-HPLC により得られた各々の画分について、以下の条件で N(CH₃)₂-HPLC を行った。GA₁ 画分については試料注入から 9 分から 15 分までを、GA_{1.9/2.0} 画分については 13 分から 23 分を分取した。

カラム: Senshu-Pak N(CH₃)₂-3151-N (8 mm i.d. x 150 mm)

溶 媒: 0.05% HOAc in MeOH

流 速: 3 ml/min

温 度: 50°C

⑪ GC/SIM

GA₁ 画分は、全量を GA₁ 定量用として先細チューブに移し、GA_{1.9/2.0} 画分は、1/2 量を GA_{1.9} 定量用、1/20 量を GA_{2.0} 定量用と

して先細チューブに移した。試料をジアゾメタンでメチル化した後、MSTFA で 60°C、20 分間加熱処理を行い、Me-TMSi 化したものについて GC/SIM 分析を行った。GC/MS の条件は第 1 節と同様である。モニターしたイオンは、次の通りである。

$GA_1/[{}^2H_5]GA_1$; m/z 511, 506, 496, 491, 449, 448

$GA_{19}/[{}^2H_2]GA_{19}$; m/z 464, 462, 436, 434, 404, 402

$GA_{20}/[{}^2H_5]GA_{20}$; m/z 423, 418, 408, 403, 376, 375

GA_1 , GA_{19} , GA_{20} の量は、各々 m/z 506/511, 434/436, 418/423 のピーク面積比で算出した。他のイオンは、化合物の同定のために用いた。

3-3 結果及び考察

試料調製の際に、光処理を吸水開始後 3 時間で行ったのは、以下の理由による。井上（私信）によると、レタス種子は吸水開始後 3 時間以内のどの時間に光処理を行っても、3 時間後に光処理を行った場合と同じ発芽の経時変化を示し、また、3 時間後以降に光処理を行うと、発芽の経時変化は 3 時間後に光処理を行った場合の経時変化よりも光処理が 3 時間より遅れた分だけ遅れた。これらのことから最も効率的な光処理の時間は吸水開始 3 時間後であることがわかる。さらに井上（私信）によると、10 分間の赤色光照射は、発芽を誘導するのに十分であり、10 分間の近赤外光照射は、発芽を抑制するのに十分であった。以上の様な知見から試料調製は図 1-4 のように行った。なお、最初の近赤外光照射は数%起こる暗発芽を完全に抑制するために行ったので、ここでは FR 処理種子を暗対照とし

た。この培養条件での発芽の経時変化を図 1-5 に示した。図のように、FR/R 処理種子は光処理後 9-13 時間で発芽が始まったが、FR 処理種子は光処理後 44 時間まで発芽しなかった。データは示さないが、FR/R/FR 処理種子も 44 時間後まで発芽しなかった。発芽が始まる前での内生 GA レベルの変化に焦点を絞って追究するため、定量分析は光処理後 8 時間までで行った。

各試料の AE 区を 3 段階の予備精製後に、ODS-, $N(CH_3)_2$ -HPLC の 2 段階の HPLC により精製分画し、Me-TMSi 誘導体化した後に GC/SIM 分析を行った。定量結果を図 1-6、表 1-2 に示した。図 1-6 に示すように、FR 処理種子の GA_1 レベルは培養中徐々に減少したが、FR/R 処理種子のそれは上昇し、光処理後 6 時間と 8 時間では FR 処理種子のそれよりそれぞれ約 3 倍、5 倍になった。表 1-2 に示すように、赤色光に続く近赤外光照射は、 GA_1 レベルを上昇させるといふ赤色光の効果を完全に打ち消した。また、 GA_{19} と GA_{20} の内生レベルは光処理により影響されなかった（図 1-6、表 1-2）。以上の結果より、活性型と考えられる GA_1 の内生レベルが発芽条件においてのみ上昇することが示された。このレベルの上昇が発芽誘導に十分なものであるかどうかは現段階では実証することはできないが、増加した GA_1 が発芽誘導において重要な役割を果たしている可能性は高いと思われる。

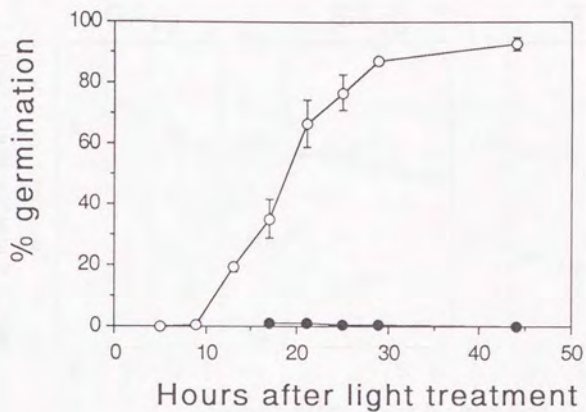


図 1-5 FR 処理種子と FR/R 処理種子の発芽の経時変化

培養中の種子から適当な時間に無作為に約 100 粒取り出し、発芽率を測定した。発芽率は、3 連の平均値 ± 標準誤差で表した。

-●-, FR 処理種子; -○-, FR/R 処理種子

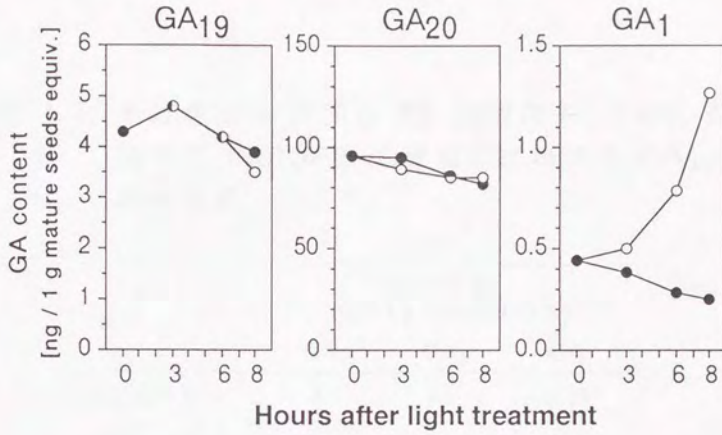


図 1-6 FR 処理種子と FR/R 処理種子における
GA_{19,20,1} の内生レベルの経時変化

各GAは内部標準を用いたGC/SIM法により定量した。
-●-, FR 処理種子; -○-, FR/R 処理種子

表 1-2 光処理後 6 時間の FR 処理種子, FR/R 処理種子と FR/R/FR 処理種子における GA_{19,20,1} の内生量

試料	GA 内生量 (ng / 1 g 完熟種子当量)		
	GA ₁₉	GA ₂₀	GA ₁
FR 処理種子	4.2	86	0.28
FR/R 処理種子	4.2	85	0.78
FR/R/FR 処理種子	4.2	85	0.25

各GAは内部標準を用いたGC/SIM法により定量した。FR 処理種子, FR/R 処理種子については図 1-5 から抜粋した。

第4節 ジベレリン処理及び赤色光処理のレタス種子中の内生 アブシジン酸レベルに対する効果

4-1 緒言

アブシジン酸が、赤色光や GA_3 により誘導されるレタス種子の発芽を阻害することはよく知られているが (Kahn 1968; Sankhla and Sankhla 1968), その内生レベルは、暗黒下で培養した場合に比べて赤色光処理した場合はその減少が顕著である (Braun and Khan 1975). 以上の事実と第3節での赤色光による GA_1 の増加を考え合わせると、赤色光照射により GA_1 が増加し、その増加した GA_1 が内生 ABA を減少させるという可能性が考えられる。そこで、赤色光照射と GA_3 の投与が内生 ABA レベルに及ぼす影響について比較し、上述の仮説を検討した。また、ABA の減少が種子内の代謝によるものなのか、種子外への分泌なのかを検討するために、培地中の ABA 量も定量し、その結果もあわせて考察を加えた。

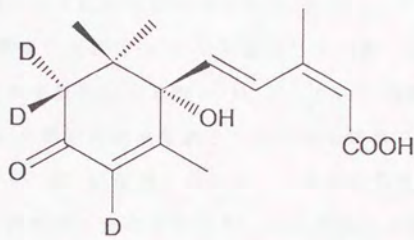
4-2 材料及び方法

① 植物材料、光源とフィルター

レタス種子、光源とフィルターは第3節と全く同じものを用いた。

② 内部標準

[3', 5', 5'- 2H_3]ABA は、理化学研究所吉田茂男博士により供与されたものを用いた。構造は図 1-7 に示す。



[3',5',5'-²H₃]ABA

図 1-7 重水素標識された ABA の構造

③ 分析材料

25°C, 暗黒下でレタス完熟種子 0.5 g を MES 培地 (pH 6.1) 2 ml を入れた直径 6 cm の細胞培養用ペトリ皿 (Nunc #1-50280) に浸し, 3 時間後に新鮮な培地 1.5 ml で置き換えた後, 以下のような光処理を行い, それから暗黒下でそのまま培養した.

i) 15 分間赤色光照射 (R 処理種子)

ii) 15 分間赤色光照射 → 15 分間近赤外光照射 (R/FR 処理種子)

また, 培地を置き換える際に 2×10^{-3} M GA₃ 溶液 1.5 ml で置き換えて, 15 分間近赤外光照射し, それから暗黒下でそのまま培養を続けた種子を, GA 処理種子とした. この近赤外光照射は, Pfr の効果を完全に打ち消すために行った. これら条件の種子で発芽するのは R 処理種子と GA 処理種子である. 処理直前の種子を処理後 0 時間として採取し, R 処理種子, R/FR 処理種子, GA 処理種子は各処理から 3, 10, 14 時間後に採取し, 10 ml の MeOH に浸した. 各試料は, 2 連で調製した. 各種子の発芽の経時変化は, 以下のようにして測定した. すなわち, 上述条件で培養している種子から, 採取した時と同じ時間に約 30 粒の種子を無作為に取り出し, 発芽率を測定した.

④ 植物材料の抽出及び培地の濃縮

各試料に内部標準として [²H₃]ABA 100 ng を加えた後, ポリトロンで破碎, 吸引濾過し, 残渣を MeOH 5 ml で 3 回再抽出し, 濾液を集めて MeOH 抽出液 (25 ml) とした. なお, 処理後 14 時間の種子について採取時に除いた培地にも [²H₃]ABA 50 ng を加えた. 各 MeOH 抽出液, 培地を濃縮した.

⑤ Sep-Pak (ODS) 処理

すべての試料について第1節1-2③と同様の方法で行った。

⑥ Sepralyte (DEA) 処理

Sep-Pak 溶出物を MeOH 0.3 ml に溶解させ、DEA ゲル 0.3 g を充填したカラム (4 ml リザーバー) に通過吸着させた後、順に MeOH (0.7 ml), 0.5% HOAc in MeOH (6 ml) で溶出した。溶出液を合わせ、濃縮乾固した。

⑦ ODS-HPLC

Sepralyte 処理により得られた ABA 分画について、ODS-HPLC を以下の条件で行った。試料注入後 12 分から 15 分までを ABA 画分とした。

カラム: Senshu-Pak ODS-4253-D (10 mm i.d. x 250 mm)

溶媒系: 50% MeOH 水溶液 (0.1% HOAc)

流速: 3 ml/min

温度: 40°C

⑧ $N(CH_3)_2$ -HPLC

ODS-HPLC により得られた ABA 画分について、第3節3-2⑩と同じ条件で $N(CH_3)_2$ -HPLC を行った。試料注入後 7 分から 9 分までを ABA 画分とした。

⑨ GC/SIM

各試料をジアゾメタンでメチル化した後、GC/SIM 分析を行った。

GC/MS の条件はカラム温度以外は第 1 節 1 - 2 ③と同様である。

カラム温度: 120°C (2 min) 定温
 120°C → 280°C (16°C/min) 昇温
 280°C (5 min) 定温

モニターしたイオンは, m/z 162, 165, 190, 193, 278, 281 である。ABA の量は, m/z 190/193 のピーク面積比で標品を用いた検量線により算出した。他のイオンは, 化合物の同定のために用いた。

4 - 3 結果及び考察

アブシジン酸の定量のためには多量の種子を必要とするが, GA に対して高感度な穴開き種子を用いることは困難であったので, 無傷種子を用いた。そのため 2×10^{-3} M という高濃度で GA₃ 処理を行った (Inoue 1990)。GA₃ は GA_i と構造が類似し (GA₃ は GA_i の 1, 2 位に二重結合があるもの; 図序-1 参照), ほぼ同様の活性を示し, 大量に入手可能であるので, GA_i のかわりに用いた。第 3 節の試料で予備的に ABA を定量したところ, 近赤外光照射は完全に赤色光の効果を打ち消すことが示されたので, ここでは対照として R/FR 処理種子を用いた。

図 1-8 に ABA 定量分析に用いた試料の発芽の経時変化を示す。R/FR 処理種子は, 処理後 23 時間まで発芽しなかったが, R 処理種子, GA 処理種子はそれぞれ処理後 10 時間, 14 時間で発芽が始まった。図 1-9 に各試料の ABA の定量結果を示す。R 処理種子にお

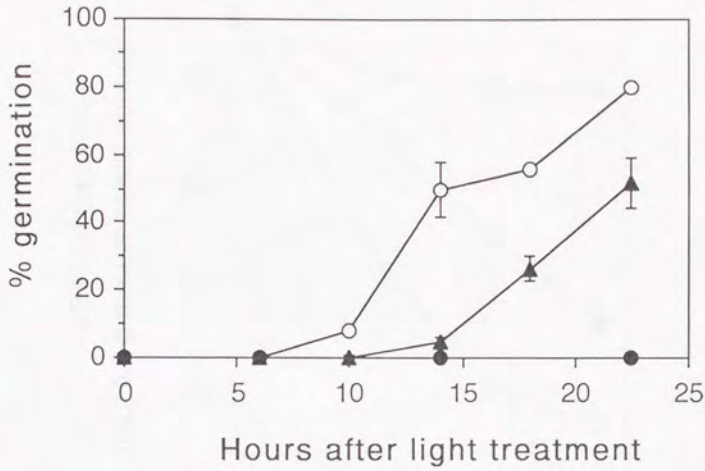


図 1-8 R 処理種子, R/FR 処理種子と GA 処理種子の発芽の経時変化

培養中の種子から適当な時間に無作為に約 30 粒取り出し、発芽率を測定した。発芽率は、2連の平均値±標準誤差で表した。

-○-, R 処理種子; -●-, R/FR 処理種子; -▲-, GA 処理種子

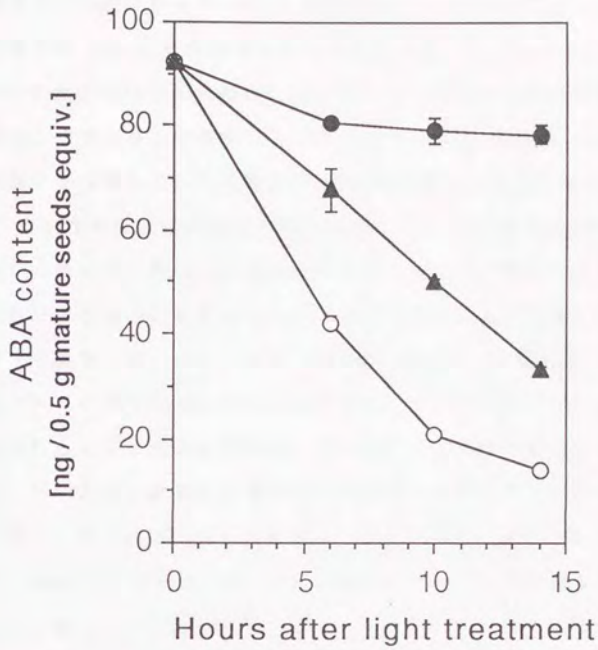


図 1-9 R 処理種子, R/FR 処理種子と GA 処理種子
におけるABAの内生レベルの経時変化

ABAは内部標準を用いたGC/SIM法により定量した。定量値は、
2連の平均値±標準誤差で表した。

-○-, R 処理種子 ; -●-, R/FR 処理種子 ; -▲-, GA 処理種子

いて ABA の減少が最も速く、GA 処理種子でも速く減少したが R 処理種子程ではなかった（約 5 時間遅れ）。それに対して、R/FR 処理種子の ABA の減少はきわめて少なかった。以上のように ABA レベルの減少の仕方の各処理による違いは、発芽率の経時変化の各処理による違いをよく反映している。表 1-3 は、処理後 14 時間まで各種子を培養していた培地中の ABA を定量した結果である。各培地の ABA 含有量はほぼ同じであるので、赤色光処理、GA₃ 処理による ABA の減少は培地への分泌によるものではなく、種子内での ABA の代謝によるものだと考えられる。レタス種子においては、ABA の主要な代謝物は図 1-10 に示す ABA グルコシルエステルであることが示されている (Orlandini et al. 1984)。赤色光や GA₃ により誘導されるレタス種子の発芽は、ABA により阻害されることを考えると、ABA の減少は発芽誘導において重要な役割を担っている可能性が高いと思われる。以上の結果は、赤色光照射により GA₁ が増加し、その増加した GA₁ が内生 ABA を減少させるという仮説を支持するものである。

表 1-3 処理後14時間まで培養した
ときの培地中のABA量

試料	ABA 量 [ng / petri dish]
R 処理種子を培養した培地	6.7 ± 0.2
R/FR 処理種子を培養した培地	7.3 ± 0.4
GA 処理種子を培養した培地	7.3 ± 0.7

ABAは内部標準を用いたGC/SIM法により定量した。
定量値は、2連の平均値±標準誤差で表した。

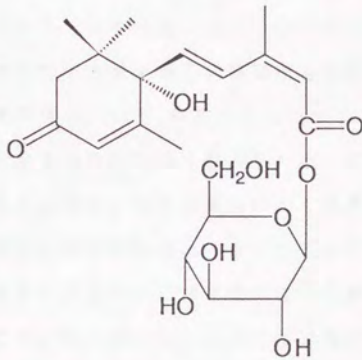


図 1-10 ABA-β-D-グルコピラノシドの構造

第5節 まとめ

一般に、高等植物の種子は、吸水によって休眠が打破されて発芽するが、タバコ、レタス、シロイヌナズナ等のような光発芽種子は吸水だけでは発芽できず、発芽するためには光照射が必要である。光発芽種子の中でも、レタス種子はフィトクロム発見の端緒となったものとして有名で、その光発芽誘導機構を物質的観点から明らかにしようとする研究は、1970年代に盛んになり、各種植物ホルモンの投与実験、定量実験等が数多く試みられた。特に、GAは種子の暗発芽を誘導することから、赤色光照射により内生GAレベルが増加し、その結果発芽が誘導されるという可能性が考えられていたが、内生GAは超微量であるために信頼性の高い定量分析は行われていなかった。そこで、第1章においては内生植物ホルモンレベルとの関連性からレタス種子の光発芽誘導機構を追究した。

まず第1節においては、レタス種子中の内生GAを同定し、そこに機能するGA生合成経路を推定することを試みた。GC/MS分析の結果、レタス種子抽出物からGA₁、GA₁₇、GA₁₉、GA₂₀、3-epi-GA₁という一連の13-OH-GAが同定され(表1-1)、主要GA生合成経路としてearly-13-hydroxylation pathwayが機能していることが明らかになった(図1-1)。第2節においては、外部からのGAの投与実験により発芽を制御する内生の活性型GAはGA₁である可能性を示した(図1-2)。多くの高等植物の茎葉部には、GA₁を活性型とする同様のGA生合成経路が機能していることはよく知られている。

次に、第3節においては、種々の光条件（発芽条件、非発芽条件）で培養したレタス種子における内生 GA レベルの経時変化を調べ、光条件が内生 GA レベルに与える影響の解析を試みた。定量分析は内部標準を用いた GC/SIM 法で行った。その結果、赤色光照射により活性型 GA である GA_1 の内生レベルは上昇し、その赤色光の効果はそれに続く近赤外光照射により完全に打ち消されること、また、 GA_1 の前駆体である GA_{19} と GA_{20} の内生レベルは光処理による影響を受けないことが示された（図 1-6, 表 1-2）。この赤色光照射による活性型 GA の内生レベルの上昇は、芽が果皮を破って出てくる以前におこる現象であり、レタス種子の光発芽誘導機構において重要な役割を果たしていると思われる。

一方、ABA は発芽阻害物質として知られており、レタス種子においても光発芽との関連性は追求されてきた。レタス種子中の ABA の内生レベルは、赤色光照射により顕著に減少すること（Braun and Kahn 1975）が知られており、さらに、第3節で示したように、赤色光照射により暗発芽誘導活性を有する GA_1 の内生レベルが上昇することを考え合わせると、赤色光照射により内生 GA_1 レベルが上昇し、その増加した GA_1 が ABA の内生レベルを低下させるという可能性が考えられる。この可能性を検討するために、第4節においては、GA 処理したレタス種子中の内生 ABA レベルと赤色光処理した場合の内生レベルを比較することを試みた。内部標準を用いた GC/SIM 法により ABA 量を定量した結果、赤色光処理同様、GA 処理によっても ABA の内生レベルは減少することが示された（図 1-9）。アブジジン酸が赤色光処理あるいは GA の投与により誘導される発芽を阻害すること（Khan 1968; Sankhla and Sankhla 1968）を考慮する

と、ABA の内生レベルが減少することは発芽誘導において重要な現象であると考えられる。

以上、第1章から得られた結果から、レタス種子光発芽誘導機構は以下のように推論される。

「レタス種子において、暗黒下では発芽に促進的に働く GA₁ の内生レベルは、徐々に減少していくのに対し、赤色光照射によりその内生レベルは上昇する。その増加した GA₁ の作用により ABA の内生レベルが低下し、ABA による阻害が解除されて発芽が誘導される。赤色光に続く近赤外光照射は赤色光の効果を完全に打ち消し、GA₁ の増加、ABA の減少は起こらず、種子は発芽しない。」

しかしながら、現段階では、赤色光照射による GA₁ の増加が ABA の減少を引き起こすのに十分な量であるかどうか、また、ABA の減少が実際に発芽を誘導しているかどうかについては結論出来ないが、本研究により、光発芽誘導機構を解明するための確かな糸口が見いだされたといえよう。

第2章 レタス種子においてジベレリン処理により誘導される遺伝子の cDNA クローニング

第1節 ディファレンシャルスクリーニングによるジベレリン誘導性遺伝子のクローニング

1-1 緒言

レタス種子の発芽はフィトクロムにより制御されており、暗黒下では発芽しないが、短時間の赤色光照射により発芽する。その発芽は、発芽に促進的に働く GA_1 の内生レベルの上昇、それによる発芽に阻害的に働く ABA の内生レベルの低下により誘導される可能性を示した(第1章)。レタス種子は暗黒下でも GA_3 の投与により発芽が誘導されることは知られているので、暗黒下において GA_3 の投与によりその発現が誘導される遺伝子をクローニングし、その機能を解析することにより、レタス種子の発芽誘導機構を追究することを第2章の課題とした。そこでまずはじめに、レタス種子において GA_3 処理により誘導される遺伝子をディファレンシャルスクリーニングによりクローニングすることを試みた。

1-2 材料及び方法

実験の概要は図 2-1 に示すが、以下にその詳細を記述する。

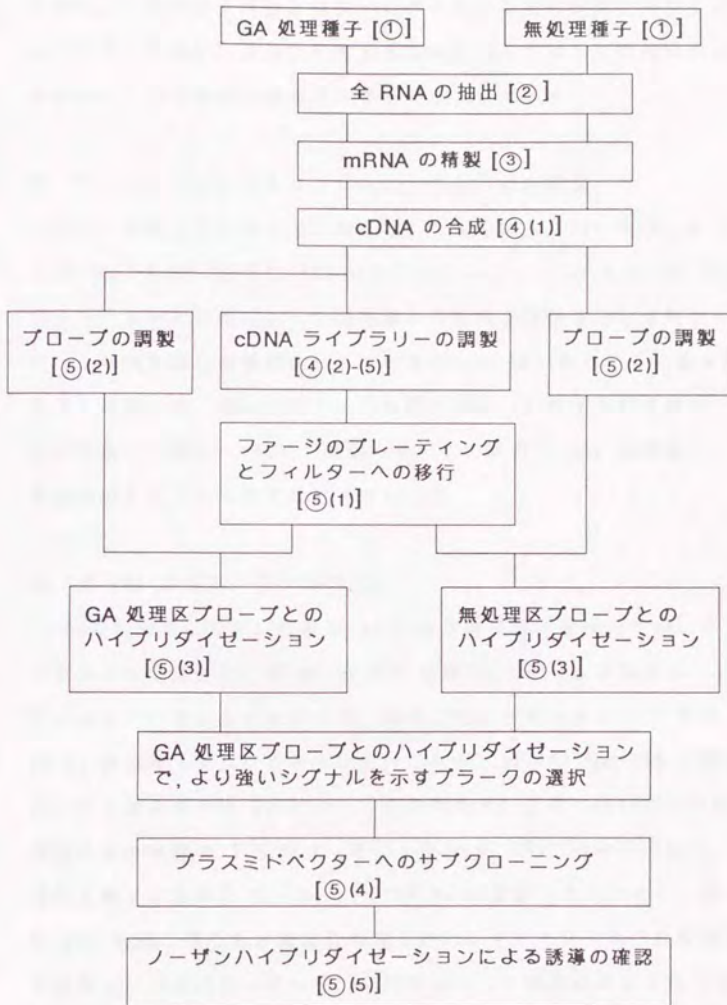


図 2-1 ディファレンシャルスクリーニングの概要

図中の [] 内の番号は、本文中の項目を示す。

種子, 培養培地, 光源及びフィルターは第1章第3節と同じものを用いた. 本文中, 最初に記述する際に#印をつけた試薬の組成は, 本章末の「使用機器, 試薬類, 使用キット」で示す.

① ディファレンシャルスクリーニング用の材料調製

25°C, 暗黒下でレタス完熟種子 10 g を 100 ml MES 培地, あるいは 10^{-3} M GA₃ を含む MES 培地に浸し (295 x 220 x 43 mm 角型ポリスチロール容器内), 3 時間後に近赤外光照射を 10 分間行った. この光処理の直後に各々の培地を 40 ml 吸い取り, そのまま暗黒下で培養した. 各々の種子は吸水開始から 12 時間後に採取し, 液体窒素で凍結し, -80°C で保存した. この時点で GA₃ 処理種子, 無処理種子双方とも発芽していなかった.

② 全 RNA の抽出; GTC/CsCl 法

-80°C で保存しておいた種子 10 g を液体窒素で冷やしておいたコーヒーマルで破碎し, 80 ml の GTC 溶液[®] に入れ, よく攪拌し, ポリトロンでさらによく破碎した. 滅菌したガーゼで濾過し 3 本の 30 ml 遠心管 (ナルゲン社) に分けて入れ, 15,000 rpm, 15 分間遠心した (ローターは RP50T-2; 日立製作所). 上清についてさらに同様の遠心分離を 2 回行い, その上清を 40 ml チューブ (40PA, 日立工機) に入れた 5.7 M CsCl[®] 10 ml に重層した (2 本). さらに GTC 溶液で遠心管を満たした後, E-Ti2 キャップクミ (日製産業) で密栓し, 前述のローターで 35,000 rpm, 24 時間超遠心を行った. ローターから遠心管を取り出し, 上清の上層を 10 ml 駒込ピペットで吸い取り, 上清の下層はデカンテーションで除いた. 遠心管を逆

さにしてペーパータオル上で乾かした後、熱したカッターで遠心管の上半分を切り取った。沈澱を EtOH (-20°C) で洗浄し、2本の遠心管から計 4 ml の滅菌水で別の 30 ml 遠心管 1 本に移し取った。その水溶液に 10 M LiCl[®] を 1 ml 加え、氷上 2 時間放置後、15,000 rpm, 20 分間遠心し、上清を除いた。沈澱を 4 ml の滅菌水に溶かし、5 M NaCl 0.4 ml, EtOH (-20°C) 10 ml を加え、-80°C で 30 分間放置した後、15,000 rpm, 15 分間遠心し、上清を除き、さらに、沈澱を 75% EtOH[®] 5 ml でリンスした。沈澱を真空ポンプで 1 分間乾かし、TE 溶液[®] 2 ml に溶解し、200 分の 1 を用いて吸光度 (UV 260 nm) を測定し、全 RNA の濃度を求めた。全 RNA はエタノール沈澱状態で -80°C で保存した。以上の操作を、GA₃ 処理及び無処理種子についてそれぞれ行った。

③ ポリ (A)⁺ RNA (mRNA) の精製

Dynabeads mRNA 精製キット (ベリタス社) を用いて行った。GA₃ 処理種子については下記のように行った。

Dynabeads 液を懸濁して、0.4 ml (2 mg) を 1.5 ml チューブに取り出した。チューブをマグネット (Dynal MPC-E-1) に置き、30 秒後上清を抜き取った。2x 結合バッファー[®] 200 μl で同様の操作により洗浄し、2x 結合バッファー 200 μl を加え懸濁した。全 RNA 1 mg を 200 μl 溶出バッファー[®] に溶解させ、65°C で 2 分間放置し、前述の Dynabeads 懸濁液に加え、穏やかに攪拌し、室温で 3 分間放置した。マグネットに 30 秒間置き、上清を抜いた。Dynabeads を洗浄バッファー[®] 400 μl で 2 回洗浄し、溶出バッファー 40 μl を加え、65°C で 2 分間放置し、マグネットに 30 秒間

置き、上清を別のチューブへ移した。以上の操作で得たポリ (A)⁺ RNA (mRNA) の量は、EtBr を少量含む寒天にスポットし、標品と比較して定量した。無処理の種子については、すべて半分のスケールで行った。

④ cDNA ライブラリーの調製

(0) mRNA の逆転写反応のチェック

mRNA の逆転写とマーカーの [³²P]dCTP による標識

1.5 ml チューブに、各々の mRNA 1 μ g / 14 μ l 滅菌水を入れ、5x ファーストストランド合成用バッファー[®] 6 μ l, 0.1 M DTT[®] 3 μ l, リボヌクレアーゼインヒビター (東洋紡績) 0.5 μ l (20 U), オリゴ dT プライマー (ファルマシア) 1 μ l (1 μ g), デオキシヌクレオチド三リン酸混合液 (各 20 mM, 宝酒造) 1 μ l, [α -³²P]dCTP (Amersham 社, 111 tBq/mmol を希釈したもの) 4 μ l (40 万 cpm), 逆転写酵素 Superscript (BRF ライフテックオリエンタル) 1 μ l を順次加え、42°C で 1 時間反応させた。また、マーカーは、 λ Hind III 0.5 μ l (0.25 μ g), 滅菌水 21.5 μ l, 5x 標識用バッファー 6 μ l, [α -³²P]dCTP 1 μ l (10 万 cpm), 酵素溶液 (Klenow, 宝酒造) 1 μ l の組成で 37°C で 30 分間反応させ、 λ Hind III を標識したものをを用いた。

アルカリアガロースゲル電気泳動

アガロース 0.7 g に 50 ml のゲル調製用バッファー (50 mM NaCl, 1 mM EDTA) を加え、加熱して溶解した後、ゲルを固め、泳動槽に泳動用バッファー (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) を流し込んだ。前

に逆転写させた試料 15.7 μ l に泳動用色素液[®] 3.3 μ l と 1 N NaOH 1 μ l を加え、また、マーカー 10.4 μ l に泳動用色素液 2.2 μ l と 1 N NaOH 0.6 μ l を加えてそれぞれスロットに入れて電気泳動した。ゲルは 7% TCA 水溶液 50 ml に 30 分間入れ、さらに、新しい 7% TCA 水溶液 50 ml に入れ 30 分間置いた後、濾紙の間に挟みおもりを載せ 12 時間以上放置した。水分を取ったゲルをサランラップ（旭化成）で包み、濾紙に固定し、イメージングプレート（40 x 20 cm, FUJIX）とともにカセットに入れて室温で 6 時間放置した後、イメージングアナライザー（FUJIX BAS 2000）で解析し、反応の進行を確認した。

(1) 2 本鎖 cDNA の調製

1.5 ml チューブに、mRNA（GA₃ 処理種子）1 μ g / 18 μ l 滅菌水を入れ、5x ファーストストランド合成用バッファー 6 μ l, 0.1 M DTT 3 μ l, リボヌクレアーゼインヒビター（東洋紡績）0.5 μ l（20 U）、オリゴ dT プライマー（ファルマシア）1 μ l（1 μ g）、デオキシヌクレオチド三リン酸混合液（各 20 mM, 宝酒造）1 μ l、逆転写酵素 Superscript（BRF ライフテックオリエンタル）1 μ l を順次加え、42°C で 1 時間反応させ、さらに滅菌水 56 μ l、セカンドストランド合成用バッファー[®] 5 μ l, 1 M (NH₄)₂SO₄ 1 μ l, デオキシヌクレオチド三リン酸混合液 1 μ l, リボヌクレアーゼ H（宝酒造）0.3 μ l（20 U）、DNA ポリメラーゼ（宝酒造）6 μ l（21 U）を順次加え、12°C で 1 時間、22°C で 1 時間反応させて、65°C で 10 分間加熱後 2 分間急冷した。これに T4 DNA ポリメラーゼ（宝酒造）0.5 μ l を加え、37°C で 10 分間反応させた。反応液

に滅菌水 50 μ l, フェノール/クロロホルム[®] 100 μ l を加えて攪拌, 3,000 rpm, 2 秒間遠心した後, 水層を別のチューブに移し, フェノール/クロロホルム層をさらに滅菌水 100 μ l で 2 回抽出し, 抽出液を水層とあわせた (計 300 μ l) .

(2) EcoR I/Not I アダプター (脱リン酸化済み) の付加

あわせた水層に, 7.5 M NH₄OAc 150 μ l, EtOH 900 μ l を加え, -80°C で 30 分間おいた後, 15,000 rpm で 10 分間遠心し, 沈澱をリンスして真空ポンプで乾燥させた. 沈澱を 86 μ l の滅菌水に溶かし, 10x ライゲーションバッファー[®] 10 μ l, ATP 溶液 (ファルマシア) 1 μ l, EcoR I/Not I アダプター[®] 溶液 (ファルマシア) 2 μ l, T4 DNA リガーゼ 1 μ l を加え, 12°C で 12 時間以上反応させた. 反応液を 65°C で 10 分間加熱後 2 分間急冷した後, ATP 溶液 3 μ l, T4 ヌクレオチドキナーゼ 1 μ l (宝酒造) を加え, 37°C で 30 分間反応させた. 反応終了後, 等量のフェノール/クロロホルムを加え, 攪拌, 3,000 rpm, 2 秒間遠心して得た水層 100 μ l を Sephacryl S-400, ファルマシア) で精製した. DNA 量は EtBr を含む寒天で定量した.

(3) ベクター (λ ZAP II) への組み込み

カラム溶出液 10 μ l (50 ng) と λ ZAP II (STRATAGENE) 10 μ l (1 μ g) に滅菌水を加えて 32 μ l にし, 3 M NaOAc 3 μ l, EtOH 70 μ l, グリコーゲン (20 mg/ml, ベーリンガーマンハイム) 0.5 μ l を加え, -80°C で 20 分間置いた後, 15,000 rpm で 10 分間遠心し, 沈澱をリンスした後真空ポンプで乾燥させた. 沈澱をバッフ

アー (100 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 300 mM NaCl) 2.5 μ l に溶かし、Ligation kit (宝酒造) の 溶液 B (酵素液) 2.5 μ l を加え、26°C で 30 分間反応させた。

(4) *in vitro* パッケージング

パッケージングは、GIGAPACK II GOLD (STRATAGENE) を用いて行った。ライゲーション反応液をエタノール沈澱により精製した後、滅菌水 4 μ l に溶かし、Freeze/Thaw extract (赤色チューブ) 10 μ l を加え、さらに Sonic extract (黄色チューブ) 20 μ l を直ちに加え、22°C で 2 時間置いた。SM バッファー[®] 500 μ l、クロロホルム 20 μ l を加え攪拌し、3,000 rpm、2 秒間遠心し、この上清をファージ溶液とした。

(5) タイトレーションと青/白ブランク選抜

宿主菌 (XL1-Blue) の 1 コロニーを LB 培地[®] 5 ml (0.1 M $MgSO_4$, 0.2% マルトース) に植菌し、37°C で 12 時間以上振盪培養した。培養液を集菌した後、10 mM $MgSO_4$ で $A_{600} = 1.0$ となるように調整した。ファージ溶液 2 μ l と XL1-Blue 溶液 100 μ l を混ぜ、0.5 M IPTG[®] 15 μ l と 250 mg/ml X-gal[®] 50 μ l とともにトップアガー[®] (49°C) に加え、よく攪拌し、NZY プレート[®] (9 cm 丸型シャーレ; あらかじめ表面を乾かし、37°C にしたもの) 上に広げた。37°C で 12 時間以上培養した後、白ブランク (インサートが入ったもの) と青ブランク (インサートが入っていないもの) の数を数えた。

⑤ ディファレンシャルスクリーニング

(1) フィルターの調製

XL1-Blue溶液 ($A_{600} = 1.0$) 200 μ l の中にファージ液を 2 μ l 加えて混合し, 37°C 15 分間培養した (1 プレート当り 1,000 プラークとなるように計算し, 4 枚のプレートを作製した). トップアガー 6 ml に培養した溶液を加え, NZY プレート (10 x 14 cm 角形シャーレ) にひろげ, 37°C で培養した. プラークが直径約 0.5 mm から 1 mm の大きさになるまで培養した後 (約 5 時間), 4°C で保存した. ナイロンフィルター Hybond-N (Amersham 社) を 9 x 12 cm の大きさで 2 枚切り取り, 1 枚目はプレート上に 2 分間 (無処理プローブ用), 2 枚目は 4 分間 (GA_3 処理プローブ用) 置き (3 箇所針で穴を開け目印とした), アルカリ変性液^②, 中和液^③, 2xSSC^④ を染み込ませた各濾紙に 5 分間ずつのせたのち, 乾燥させた. このフィルターに 5 分間 UV (302 nm) を照射し, RNA を固定した.

(2) プローブの調製

2 本鎖 cDNA の合成

cDNA ライブラリー調製時に調製しておいた GA_3 処理, 無処理の全 RNA から得られた mRNA を④ (1) と同様な方法で [α - ^{32}P] dCTP 10 万 cpm を加えて逆転写, 2 本鎖 cDNA を合成したところ (22°C 反応終了後) で, フェノール/クロロホルム抽出して水層 600 μ l を得た. この水層を Sephadex G-50 カラムにのせ, 滅菌水で溶出を行い, 4 滴ずつ分取し, 液体シンチレーションカウンター (LSC-3500, Aloka) で放射能を測定し, 取り込みのあった画分を集め (最初のピーク) エタノール沈澱を行った. 沈澱を 50 μ l の滅

菌水に溶かし濃度を測定した。

[³²P]dCTP によりラベルされたプローブの調製

メガプライム DNA 標識システム (Amersham 社) を用いて以下の操作を行った。また、プローブのラベルには [α -³²P]dCTP (111 tBq/mmol) を用いた。

GA₃ 処理, 無処理の cDNA 溶液それぞれに滅菌水を加えて全量を 28 μ l とし, プライマー溶液 5 μ l を加え, これを沸騰した熱湯中に 5 分間置き, 水中急冷し (2 分間), 標識用バッファー 10 μ l, [α -³²P]dCTP 5 μ l (1 億 cpm) を加え, 酵素 (Klenow) 2 μ l をさらに加えよく混合し, 37°C で 10 分間反応させた。この溶液を Sephadex G-50 カラムにのせ, 滅菌水で溶出を行った。溶出液は 6 滴ずつ分取し, 液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し取り込みのあった画分 (最初のピーク) をハイブリダイゼーションに用いた。

(3) スクリーニング

ブレハイブリダイゼーション

(1) で得られたフィルターを 3x SSC/0.1% SDS 溶液²に浸し, その間にブレハイブリダイゼーション溶液を準備した。サケ DNA² 160 μ l, 滅菌水 100 μ l をディスポチューブに入れ, 沸騰した熱湯中に 5 分間静置し, 水中急冷後, さらにラビッドハイブリダイゼーションバッファー (Amersham 社) 10 ml を加えた。フィルター的水分をペーパータオルで軽く取った後, ハイブリダイゼーション用バッグで挟み, 3 方をシールした。開いている所からブレハイブリ

ダイゼーション溶液を入れて、徐々に空気を抜きながらシールした。更にハイブリダイゼーション用バッグで包み、シールし、65°Cで3時間置いた。

ハイブリダイゼーション

フィルターをバッグから出してペーパータオルで水分を切り、前に作製したプローブを用いて、プレハイブリダイゼーションと同様に以下の組成でハイブリダイゼーション溶液を用意し、ハイブリダイズした。GA₃処理、無処理のラベルしたプローブ液(約2,800 cpm)をそれぞれ別々にディスポチューブに入れて、サケDNAを8 μ lずつ加え、プレハイブリダイゼーションと同様に加熱、急冷し、ラピッドハイブリダイゼーションバッファーを6 ml加えた。プレハイブリダイゼーションと同様にフィルターとハイブリダイゼーション溶液をハイブリダイゼーション用バッグに入れ、65°Cで12時間以上置いた。フィルターを4x SSC/0.1% SDSで軽く洗浄した後、4x SSC/0.1% SDS (65°C)、3x SSC/0.1% SDS (65°C)で各々30分間洗い、フィルターの放射能が約3,000 cpmになった事を確認した後、ペーパータオルで水分を取りサランラップで覆い濾紙に固定し、更に全体をサランラップで包んだ。カセットに入れてインテンシファイイングスクリーン(Lightning plus; Dupont)と共にフィルムを挟み、-80°Cで24時間露光した後、フィルムを現像した。

(4) プラスミド(pBluescript SK⁺)へのサブクロニング

GA₃処理、無処理のシグナルを比較し、GA₃処理のプローブにより強くシグナルを示すブランクを21個選抜した。選んだブランク

を先端を太くしたブルーチップで打ち抜き、SMバッファー 200 μ l を加えて懸濁し、クロロホルム 20 μ l を加えた (4°Cで保存)、3,000 rpm, 2 秒間遠心した後、上清 20 μ l を取り、R408 helper phage を 0.1 μ l 加え混合し、XL1-Blue溶液 ($A_{600}=1$) 20 μ l を加え、37°Cで 15 分間培養した。さらに 2x YT 培地[®] 0.5 ml を加え 37°Cで 3 時間培養し、70°Cで 20 分加熱した。7,000 rpm で 15 分間遠心した後、上清 1 μ l を取り XL1-Blue溶液 ($A_{600}=1.0$) 20 μ l の中へ加えた。37°Cで 15 分間培養した後、全量を LB/amp プレート[®]の上に広げて、37°Cで 12 時間以上培養した。LB/amp プレートより 1 コロニーを取り、LB/amp 培地[®]に植菌し 37°Cで 12 時間以上振盪培養し、以下のようにアルカリ-SDS 法によりプラスミドを回収した。培養液を 1.5 ml チューブに移し、8,000 rpm, 1 分間の遠心により上清を除き、TEG 溶液[®] 50 μ l に懸濁した。これにリゾチーム溶液 (10 mg/TEG 1 ml) 50 μ l を加え、室温で 5 分間置いた後、アルカリ-SDS 溶液[®] 200 μ l を加え、混合し、氷上に 5 分間置いた。さらに 3 M NaOAc 150 μ l を加え、混合し、氷上に 10 分間置いた後、15,000 rpm 5 分間の遠心分離を行い、上清 350 μ l を別のチューブに移した。これに等量のイソプロピルアルコールを加え、混合し、室温で 10 分間置いた。15,000 rpm 5 分間の遠心後、上清を捨て、沈澱を 75% EtOH でリンスして真空ポンプで乾燥させた。沈澱を、滅菌水 50 μ l に溶かし 0.1 mg/ml リボヌクレアーゼ A (ペーリンガーマンハイム) 1 μ l を加えて混合し 37°Cで 30 分間反応させた。反応後、フェノール/クロロホルム抽出を行い水層を分取した。この溶液を 1 μ l 分取して酵素 (EcoR I) で処理し、1% アガロース TAE[®] ゲルを用いて電気泳動を行い、ベクターと

インサートのバンドを EtBr で染め UV 照射により確認した。

(5) ノーザンブロッティング

電気泳動・ブロッティング

アガロース 1 g に滅菌水 77 ml を加え加熱して溶かした後、60 °C まで冷し、20x MOPS バッファー[®] 5 ml、ホルムアルデヒド 18 ml を加え良く攪拌した後、ゲル作製台でゲルを固めた。このゲルを電気泳動槽 (AH-16 型、和科盛) にセットし、1x MOPS バッファー 700 ml を注いだ。GA₃ 処理、無処理の各全 RNA 溶液について、分光光度計での濃度決定に従い RNA の濃度が 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように希釈し、これに変性ゲル泳動用のバッファー[®]を加えて終濃度 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ にした。この溶液を 65°C で 10 分間加熱後、氷冷し、10 μl ずつ交互にゲルのスロットに入れて、50 V で泳動した。泳動終了後ゲルの中で RNA が流れていないと考えられる部分を切捨て、マーカーをのせたレーンを切り分けて、EtBr 溶液に浸して 25S rRNA、17S rRNA を染色し、泳動距離を測定した。

ゲルをあらかじめ用意しておいた 20x SSC[®] で湿らせた濾紙 (3 MM Whatman) の上に置き、ゲルの側面をラップで覆い、その上に 2x SSC で湿らせたゲルより少し大きめのナイロンフィルターを気泡が入らないようにのせた。更にフィルターの上に 2x SSC で湿らせた濾紙を 2 枚かぶせ、ペーパータオルを 5 cm 程度の厚さに乗せてガラス板を乗せ、おもりをのせて静置した。この状態で 12 時間以上静置した後、おもり、ガラス板、ペーパータオル、濾紙を除いた。フィルターにスロットの位置を鉛筆でマークした後、フィルターをはがし、ペーパータオルにはさんで 30 分間乾燥させ、UV を 5 分

間照射し RNA をフィルターに固定した。

インサートの切り出し

アルカリ-SDS 法により回収したプラスミドを酵素 (EcoR I あるいは Not I) で処理し, 1% アガロース TAE ゲルを用いて電気泳動し, 必要なインサートを切り出した。切り出したゲルからのインサート DNA の回収は, DNA 精製用キット GENE CLEAN II (フナコシ) を用いて行った。切り出したゲルを 1.5 ml 容のマイクロチューブに入れ, 600 μ l の NaI を加え 50°C 5 分間加熱し, ゲルを溶かした。この溶液に 5 μ l の GLASSMILK を加えて懸濁し, 5 分間氷冷した後, 15,000 rpm 5 秒間遠心した。上清を除き, 沈澱を 250 μ l の NEW WASH[®] に懸濁し, 上と同様に遠心した。この操作を 2 回繰り返す。上清を除いた後, 沈澱を 20 μ l の滅菌水に懸濁し, 50°C で 20 分間置いた後, 15,000 rpm 3 分間遠心した。上清を回収し, 一部を電気泳動に供し, インサート DNA の回収を確認した。

ハイブリダイゼーション

先に作製したフィルターを用いて, 得られたクローン中のインサートが GA₃ により誘導されたものかどうかを確認した。インサート DNA 溶液 5 μ l に滅菌水を加え全量を 15.5 μ l とし, プライマー溶液 2.5 μ l を加え, これを沸騰した熱湯中に置き, 氷中急冷し, 標識用バッファー 5 μ l, [³²P]dCTP 1 μ l を加え, 酵素 (Klenow) 1 μ l を更に加えてよく混合し, 37°C 10 分間インキュベートした。この溶液から 15 μ l 取り出し, 滅菌水 100 μ l, サケ DNA 2 μ l を加え, 加熱急冷した後, ラピッドハイブリダイゼーションバッフ

ァー 1 ml を加え、プレハイブリダイゼーション後のフィルターと共にハイブリダイゼーション用バッグに入れ、65°Cで 12 時間以上置いた。フィルターを 2x SSC/0.1% SDS (65°C), 1x SSC/0.1% SDS (65°C), 0.1x SSC/0.1% SDS (65°C) でそれぞれ 30 分間ずつ洗浄し、放射能が約 400 cpm になった事を確認した後、サランラップで覆い、濾紙に固定してイメージングプレートと共にカセットに入れ、室温で 12 時間露光した。イメージングアナライザーで解析し、得られたクローンの誘導の有無を確認した。

1-3 結果及び考察

10^{-3} M GA₃ で 12 時間処理したレタス種子 10 g より GTC/CsCl 法で抽出した全 RNA (8.4 mg) の一部を Dynabeads により精製してポリ (A)⁺ RNA (mRNA) を得た。その mRNA からの逆転写反応を ³²P の取り込みにより確認したところ、調製された RNA-DNA ハイブリッドのサイズは約 0.3 kbp から約 4 kbp 程度であった (図 2-2)。その後、2 本鎖 cDNA を調製し、アダプターを付加した後ベクター (λ ZAP II) に組み込み、それをファージにパッケージングした。そのファージを宿主菌 XL1-Blue に感染させ、プレート上にブランクを形成させ力価を測定し、同時に X-gal による青/白ブランク選抜を行ったところ、その cDNA ライブラリーの plaque-forming unit は 2×10^5 で、インサート挿入率は約 95% であった。

この調製された cDNA ライブラリーのファージを宿主菌である XL1-Blue に感染させ、プレート上にブランクを形成させ、それをナイロンフィルター 2 枚に移し取り、ブランクハイブリダイゼーション

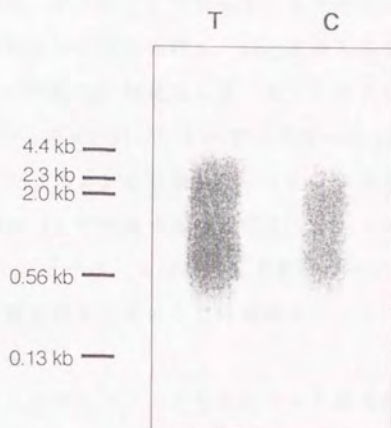


図 2-2 レタス種子 mRNA の逆転写反応の確認

GA 処理した種子及び無処理種子から各々抽出、精製した mRNA の逆転写反応の際に、 $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を加えておき、反応液をアルカリアガロースゲル電気泳動を行い、そのゲルを 7% TCA で処理した後、脱水し、イメージングアナライザーで解析した。マーカーは標識した $\lambda\text{Hind III}$ を用いた。

T: GA 処理種子; C: 無処理種子

ン用のフィルターを作製した。また、GA₃ 処理、無処理の種子から抽出した全 RNA から mRNA を精製し、それらから 2 本鎖 cDNA を調製し、これを鋳型としたランダムプライミングにより、 [³²P] dCTP で標識されたプローブを調製した。このフィルターとプローブを用いて、ディファレンシャルスクリーニングを行い、GA₃ 処理、無処理のシグナルを比較し、GA₃ 処理の方でより強くシグナルを示すブランクを 21 個選抜した。そこに含まれるインサートをプラスミド (pBluescript SK⁻) ヘサブクロニングし、アルカリ-SDS 法によりプラスミドを単離した。このプラスミドを酵素 (EcoR I あるいは Not I) で処理することによりインサートをベクター (2.958 kbp) から切り出した結果、全てのクローンについてインサートの存在が確認された。その中には複数のインサートが存在するものもあった。

これらのクローンのうちインサートを単離しやすいもの 10 個について、ノーザン分析により誘導の有無を調べたところ、1.2 倍程度ではあったが、2 個のインサートの GA₃ による再現性のある発現誘導が確認され、それぞれ pLRG5, pLRG11 と名付けた (図 2-3)。インサートのサイズは pLRG5 が約 1.3 kbp, pLRG11 が約 0.3 kbp であり、発現した mRNA のサイズは、それぞれ約 1.4 kb, 0.7 kb であり、pLRG5 がほぼ全長でクローン化されている可能性が高かった。pLRG11 に関しては、全長の cDNA が得られていないので、バックスクリーニングを行い、全長の cDNA をクローニングする必要がある。

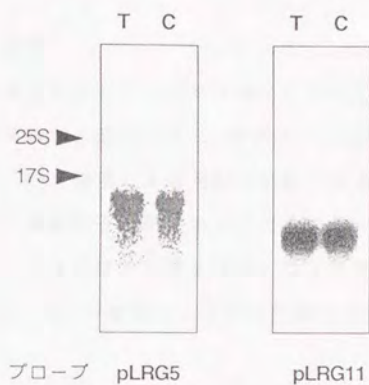


図 2-3 pLRG5 と pLRG11 の GA による誘導
の確認

GA処理種子と無処理種子から抽出した全RNAの10 μ gについて変性アガロースゲル電気泳動を行った後、pLRG5、pLRG11インサートをそれぞれプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。

解析はイメージングアナライザーで行った。マーカーはレタス種子から抽出したrRNA(25S, 17S)を用いた。

T: GA処理種子; C: 無処理種子

第2節 ジベレリン誘導性遺伝子 mRNA のジベレリン処理, 赤色光処理による発現の経時変化

2-1 緒言

前節で述べたとおり, レタス種子において GA_3 の投与によりその発現が誘導される遺伝子を2種クローニングした (pLRG5, pLRG11)。そこで, GA_3 処理による発現の経時変化を詳細に追究し, 上記遺伝子が GA 誘導性遺伝子であることを確認することを試みた。さらに, 赤色光処理 (種子は発芽する) による発現の経時変化も同時に調べ, 内生 GA_1 の増加による発現誘導を検討した。

2-2 材料及び方法

種子, 培養培地, 光源及びフィルターは第1章第3節と同じものを用いた。#印のついた試薬については第2章第1節同様である。

① 分析材料の調製

25°C, 暗黒下で, レタス完熟種子 0.5 g を用いて第1章第4節と全く同様に R 処理種子, R/FR 処理種子 (暗対照), GA 処理種子を調製した。これらの条件で発芽する種子は, R 処理種子と GA 処理種子である。処理直前の種子を処理後 0 時間として採取し, R 処理種子, R/FR 処理種子, GA 処理種子は各処理から 6, 10, 14, 18 時間後に採取し, 液体窒素で凍結し, -80°C で保存した。なお, 吸水前の完熟種子も凍結保存した。

② 全 RNA の抽出; GTC/CsTFA 法

-80°Cで保存しておいた種子 0.5 g を液体窒素で冷却したコーヒーミルで破碎し, 5 ml GTC 溶液の入った 30 ml 遠心管に入れ, よく攪拌し, 15,000 rpm, 20 分間遠心した (ローターは RP50T-2). 上清についてさらに同様の遠心分離を 2 回行い, その上清を 10 ml チューブ (Konical, ベックマン) 内の CsTFA 溶液⁸ 5 ml 上に重層した. さらに, GTC 溶液で遠心管を満たした後, スイングローター (SW41, ベックマン) で 37,000 rpm, 16 時間超遠心を行った. ローターから遠心管を取り出し, 上清の上層を 10 ml 駒込ビベットで吸い取り, 上清の下層はデカンテーションで除いた. 遠心管を逆さにしてペーパータオル上で乾かした後, 熱したカッターで遠心管の上半分を切り取った. 沈澱を EtOH で洗浄し, 遠心管から 0.8 ml の滅菌水で 1.5 ml チューブに移し取った. その水溶液に 10 M LiCl を 0.2 ml 加え, 氷上で 2 時間放置後, 15,000 rpm, 20 分間遠心し, 上清を除いた. 沈澱を 0.4 ml の滅菌水に溶かし, 5 M NaCl 40 μ l, EtOH 1 ml を加え, -80°Cで 30 分間放置した後, 15,000 rpm, 15 分間遠心し, 上清を除き, さらに沈澱を 75% EtOH 0.5 ml でリンスした. 沈澱を真空ポンプで 1 分間乾かし, 滅菌水 0.2 ml に溶解し, 250 分の 1 を用いて吸光度 (UV 260 nm) を測定し, 全 RNA の濃度を求めた. 全 RNA は -80°Cで保存した.

③ ノーザンブロッティング

②で抽出した全 RNA 溶液を用いて 1 レーン当たり 5 μ g を泳動し, 第 2 章第 1 節 1-2 ⑤ (5) と同様に, フィルターを作製し, 誘導の確認されたクローン pLRG5, pLRG11 のインサートを切り出し, ³²P

標識したものをそれぞれプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。

2-3 結果及び考察

調製した試料の発芽の経時変化は、第1章第4節の図1-8に示した通りである。R/FR処理種子(暗対照)は、処理後23時間まで発芽しなかったが、R処理種子、GA処理種子はそれぞれ処理後10時間、14時間で発芽が始まった。各試料のpLRG5とpLRG11のmRNAの発現をそれぞれ図2-4、2-5に示す。両mRNAに関して、吸水前の完熟種子ではほとんど発現していなかったが、3時間の吸水によって発現が増加した。このことは吸水による内生GAレベルの増加(辻, 1988)によると考えられる。対照であるR/FR処理種子は処理開始から時間とともにその発現は減少したのに対し、GA処理種子とR処理種子は10時間後には発現が増加した。第1章第3節において、対照では内生GA₁レベルは徐々に減少するのに対し、赤色光処理により発芽直前まで内生GA₁レベルは上昇することが示されているので、R/FR処理種子における発現の減少、R処理種子における発現の増加は、その結果とよく対応している。処理開始時(吸水開始後3時間)において、両クローンは相当量発現していたが、光処理後14時間以降では、対照の発現量が少なくなっている。したがって、GA処理、赤色光処理の効果を明瞭に観察するためには、FR処理後14時間以降でGA処理及び赤色光処理を行って経時変化を詳細に調べることも有効であると思われる。なお、前節において、無処理種子とGA処理種子の発現量の差が少なかった理由として、



図 2-4 pLRG5 mRNA の R/FR 処理種子、GA 処理種子、R 処理種子における発現の経時変化

各処理種子を処理後 6, 10, 14, 18 時間に採取し、抽出した全 RNA の 5 μ g について変性アガロースゲル電気泳動を行った後、pLRG5 インサートをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。処理後 0 時間の試料は処理直前（吸水開始後 3 時間）の種子である。解析はイメージングアナライザーで行なった。

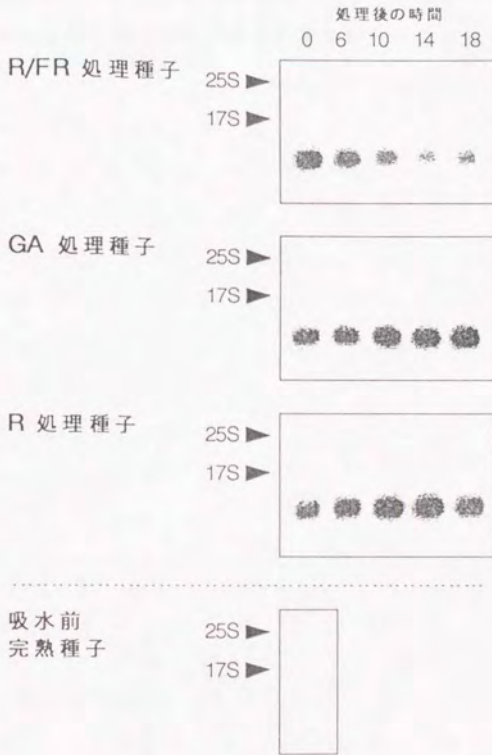


図 2-5 pLRG11 mRNA の R/FR 処理種子、GA 処理種子、R 処理種子における発現の経時変化

方法は図 2-4 参照. プロローブは pLRG11 インサートを用いた.

その培養条件では発芽が始まる前で試料の採取を行ったので、無処理種子における発現の減少が十分でなかったことによると考えられる。

第3節 ジベレリン誘導性遺伝子 mRNA のジベレリン処理, 赤色光処理による発現に対するアブシジン酸の効果

3-1 緒言

レタス種子においては, GA や赤色光処理により誘導される発芽は ABA の投与によって完全に抑制される (Khan 1968; Sankhla and Sankhla 1968). そこで, 第1節でクローン化した GA 誘導性遺伝子 pLRG5 と pLRG11 について, GA あるいは赤色光処理により増加する mRNA の発現が, 発芽を完全に抑制する濃度の ABA によりどのような影響を受けるかを追究することにした.

3-2 材料及び方法

種子, 培養培地, 光源及びフィルターは第1章第3節と同じものを用いた.

① 分析材料の調製

レタス完熟種子 0.5 g を 2 ml の MES 培地を入れた直径 6 cm のペトリ皿に浸し, 25°C, 暗黒下で培養した. 3 時間後, 1.5 ml の新鮮な MES 培地, あるいは 10^{-4} M ABA を含む MES 培地に置き換え, 赤色光を 15 分間照射した後, そのまま暗黒下で培養し, 処理後 14 時間で採取した (各々 R 処理種子, R&ABA 処理種子と名付けた). また, 2×10^{-3} M GA₃ を含む培地, あるいはそれに加えて 10^{-5} M ABA を含む培地に置き換えて, そのまま暗黒下で培養し, 処理後 14 時間で採取した種子をそれぞれ GA 処理種子, GA&ABA 処理

種子とした。17 時間暗黒下で培養した種子を対照として採取した（暗黒下培養種子）。各試料は、液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

② 全 RNA の抽出

第2章第2節と全く同様にして、GTC/CsTFA 法で行った。

③ ノーザンブロッティング

第2章第2節と全く同様の方法で行った。

3-3 結果及び考察

上述の条件で培養した場合の種子の各処理後 24 時間の発芽率を表 2-1 に示す。これにより、GA 処理あるいは赤色光処理により誘導される発芽は、それぞれ 10^{-5} M、 10^{-4} M の濃度の ABA で完全に抑制されることがわかる。なお、試料採取を各処理後 14 時間で行ったのは、その時間では、GA 及び R 処理種子における mRNA の発現量と対照の発現量の差が顕著であることが示されていたからである（第2章第2節）。

各処理種子の pLRG5 と pLRG11 mRNA の発現パターンを図 2-6 に示す。両 mRNA について、GA あるいは赤色光により誘導される発現量は ABA 処理により変化しないか、あるいは若干減少しても対照レベルまでは達していないことがわかる。以上の結果、ABA 処理は発芽誘導を完全に抑制するが、投与した GA_3 と赤色光処理による pLRG5 と pLRG11 mRNA 発現誘導にはほとんど影響しないことが明らかになった。このことは、GA あるいは赤色光が誘導する発芽誘導過

表 2-1 GA 処理と赤色光処理による
レタス種子の発芽誘導に
対する ABA の抑制効果

試料	発芽率
暗黒下培養種子	3%
GA処理種子	87%
GA&ABA処理種子	0%
R処理種子	95%
R&ABA処理種子	0%

表中の発芽率は、各処理種子の処理後 24 時間での発芽率を示す。
各処理は吸水開始後 3 時間で行い、条件を下に記す。

GA: GA_3 $2 \times 10^{-3} M$; GA&ABA: GA_3 $2 \times 10^{-3} M$ / ABA $10^{-5} M$;

R: 赤色光15分間照射; R&ABA: 赤色光15分間照射 / ABA $10^{-4} M$

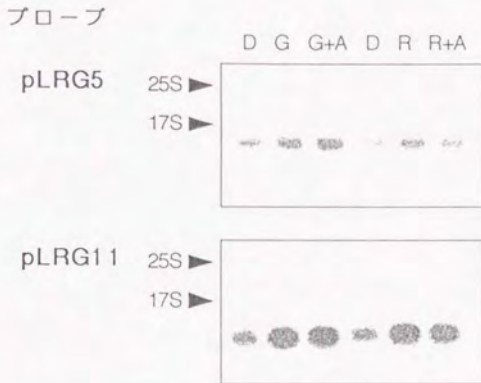


図 2-6 pLRG5 及び pLRG11 mRNA の GA 処理、
赤色光処理による発現に対する ABA の効果

各処理種子を処理後 14 時間に採取し、抽出した全 RNA の 5 μ g について変性アガロースゲル電気泳動を行なった後、pLRG5、pLRG11 インサートをそれぞれプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。解析はイメージングアナライザーで行なった。

D : 暗黒下培養種子 ; G : GA 処理種子 ; G+A : GA&ABA 処理種子 ;
R : R 処理種子 ; R+A : R&ABA 処理種子

程において、これら遺伝子は ABA の作用段階より上流で、あるいは ABA とは異なるシグナル伝達経路で機能している可能性が示されたといえる。

第4節 ジベレリン誘導性遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

4-1 緒言

第2, 第3節において述べたとおり, GA 誘導性遺伝子 pLRG5 と pLRG11 mRNA の発現パターンをノーザン解析により追究した. 次に, それらクローンの塩基配列を決定し, それに基づいてそれらのアミノ酸配列, コード領域を推定し, ホモロジー検索を通して, pLRG5 と pLRG11 mRNA の転写産物の機能を追究することにした.

4-2 材料及び方法

(a) pLRG5 の塩基配列の決定

① 制限酵素地図の作製

pLRG5 をインサートとして持つプラスミドの溶液を pBLUESCRIPT SK⁻ の中に 1 箇所しか認識配列のない制限酵素 (Acc I, Apa I, Bam HI, Cla I, Eco RV, Hind III, Kpn I, Pst I, Sac I, Sal I, Xba I, Xho I) で処理し, 1% アガロース TAE ゲル電気泳動を行った. このゲルを EtBr で染色した後 UV 照射し, 現れたバンドをマーカー (λ -HindIII, Φ X174-HincII) と比較することにより, 切断断片の長さを決定した. この結果を pBLUESCRIPT SK⁻ の認識配列部位と合わせることにより, インサート DNA の制限酵素地図を作製した.

② デリションクローンの作製

(1) プラスミドの単離

pLRG5 をクローン化してある XLI-Blue の 1 コロニーを LB/amp 培地 6 ml で 37°C, 12 時間以上振盪培養した後, 第 1 節 1-2 ⑤ (4) と同様にしてアルカリ-SDS 法によりプラスミドを回収した. リボヌクレアーゼ処理後, フェノール/クロロホルム抽出により得た水層をエタノール沈澱により精製し, 100 μ l の滅菌水に溶かした. そのプラスミド溶液に 20% PEG/2.5 M NaCl^o 60 ml を加えよく混ぜた後, 氷上 1 時間置いた. 15,000 rpm, 15 分間の遠心で上清を捨て, 沈澱を 75% EtOH で洗浄し, 真空ポンプで乾燥させ, 50 μ l の滅菌水に溶かした. 分光光度計でプラスミドを定量し, 電気泳動でプラスミドの純度を確認した.

(2) デリレーションクロンの作製

デリレーションクロンの作製は, キロシークエンス用デリレーションキット (宝酒造) を用いて行った. 以下に, その詳細を示す.

プラスミド溶液 176 μ l (10 μ g), 10x L 制限酵素用バッファー^o 20 μ l, Apa I 4 μ l (40 unit) を 1.5 ml マイクロチューブに入れ, 37°C で 12 時間以上反応させた. 反応液の 5 μ l を用いて電気泳動を行い, 反応の進行を確認した後, エタノール沈澱により精製した後, 沈澱を 176 μ l の滅菌水に溶かし, 10x H 制限酵素用バッファー^o を 20 μ l, Hind III 4 μ l (40 unit) を加え, 37°C で 2 時間反応させた. 反応液の 5 μ l を用いて電気泳動を行い, 反応の進行を確認し, エタノール沈澱により精製した後, 沈澱を 90 μ l の滅菌水に溶かして, 10 μ l の 10x Exo III バッファー^o を加えた. 3 分間氷冷した後, Exonuclease III を 1 μ l (180 unit) 加え,

混合，スピンドウンして，37°Cの水上に置いた（この瞬間を0秒とした）。15秒，30秒，1分，2分，3分，4分，5分，6分，7分，8分後にそれぞれ10 μ lずつ分取し，10x MB Nuclease バッファー[®] 3 μ lに滅菌水 17 μ lを加え，あらかじめ水冷しておいたものに入れた。（以下の操作は全てのチューブについて各々行った。）65°Cで10分間，次いで室温に5分間置いた後，Mung Bean Nuclease 0.5 μ l (3 unit)を加え，混合，スピンドウンし，37°Cで1時間置いた。滅菌水 70 μ l，フェノール/クロロホルム 100 μ lを加え，攪拌し，15,000 rpm，5分間遠心した後，水層を得，その水層を70°Cに5分間置いた。水層をエタノール沈澱により精製し，沈澱を5 μ lのKlenow バッファー[®]に溶かし，Klenow 酵素 1 μ l (0.8 unit)を加え，混合，スピンドウンし，37°Cで15分間置いた。反応液に泳動用バッファー（グリセリン色素）2 μ lを加え，0.7% アガロースゲル電気泳動を行い，第1節1-2⑤(5)と同様にして GENE CLEAN II キットを用いてバンドを切り出し，DNA 溶液（20 μ l）を得た。その水溶液の7 μ lに10x ライゲーションバッファー 1 μ l，ATP 溶液 1 μ l，T4 DNA リガーゼ 1 μ l (350 unit)を加え，混合，スピンドウンし，16°Cで12時間以上反応させた。反応液全量を大肠菌（XLI-Blue）に形質転換させ（次の(3)参照），LB/amp プレートにまき，得られたコロニーから第1節1-2⑤(4)と同様にしてアルカリ-SDS法によりプラスミドを回収した。得られたプラスミドをデリーションのかかったインサート部分を切り出すような制限酵素（Kpn I と Eco RI）で切断し，電気泳動を行い，目的の長さを持つクローン（100 bp~150 bp ずつデリーションのかかったクローン）のシリーズを得た。以上は，DyeDeoxy ter-

minator 法のサーマルサイクラー反応時に M13-21 プライマーを用いる場合のデリーションクロンの作製法であるが、reverse プライマーを用いる場合も以下の点以外は全く同様にして行った。

用いたプラスミド： 上で得られたデリーションクロンのうち、
M13-21 プライマー側のアダプターの Eco RI
サイトが消失し、インサートが最長のもの。

3' 末端突出の制限酵素： Pst I

5' 末端突出の制限酵素： Eco RI

インサート切り出し用の制限酵素： Kpn I と Xba I

(3) 形質転換

コンピテントセルの調製

LB 培地 5 ml (0.2% maltose, 0.1 M MgSO₄) で XLI-Blue の 1 コロニーを 37°C で 12 時間以上振盪培養し (前培養), その培養液 600 μl を LB 培地 20 ml に移殖し, 37°C で 3 時間振盪培養した (本培養). 培養液を 5 分間氷冷し, 2,000 rpm, 4°C, 5 分間の遠心により集菌し, 50 mM CaCl₂ 2 ml で洗浄した後, 菌を 50 mM CaCl₂ 4 ml に懸濁し, 氷上で 12 時間以上置いた. 2,000 rpm, 4°C, 5 分間の遠心により集菌された菌を 2 ml のグリセロール-CaCl₂ (1:1, v/v) に懸濁し, 200 μl ずつ分注し, 直ちに使用しないものは -80°C で保存した. 以上の操作はすべて 4°C 以下で行った.

形質転換

コンピテントセル 200 μl (保存してあったものは氷上融解) に, プラスミド溶液 (10 μl 以下) を加え, 4°C で 30 分間置いた後,

37°C, 5 分間のヒートショックを与え, 再び氷上に 2 分間置き,
SOC[®] 1 ml を加え, 37°C で 1 時間置いた. 4,000 rpm, 3 分間の遠
心後, 上清を 900 μ l 抜き, 残り約 300 μ l に菌を懸濁させ,
LB/amp プレートにまき, 37°C で 12 時間以上置いた. 得られたコロ
ニーが形質転換された大腸菌である.

③ 塩基配列の決定

得られた各デリートクローンの塩基配列は Taq DyeDeoxy
Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて
決定した. 各クローンは, ベクターのプライマーアニーリング部位
の側からインサート DNA に順次デリートンを作っているため, 各
クローンの塩基配列を順次つないでゆき, 全長のインサート DNA の
塩基配列を決定した. 以下にその詳細を記述する.

(1) 各デリートクローンのプラスミドの大量単離

目的のインサートが形質転換された菌を, 6 ml の LB/amp 培地で
37°C, 12 時間以上振盪培養した後, 集菌し, 4-2②(1)と同様に
してプラスミドを得, 吸光光度計で濃度を測定した.

(2) サーマルサイクラー反応

Reaction Premix の調製

試料 1 本分当り以下の組成で調製した.

5x TACS バッファー[®] 4 μ l

デオキシヌクレオシド

三リン酸混合液 1 μ l

DyeDeoxy A terminator	1 μ l
DyeDeoxy T terminator	1 μ l
DyeDeoxy G terminator	1 μ l
DyeDeoxy C terminator	1 μ l
Ampli Taq DNA ポリメラーゼ	0.5 μ l

反応液の調製

(1) で得られたプラスミド溶液を 1 μ g/6.5 μ l となるように滅菌水で調整し、それに Reaction Premix 9.5 μ l, プライマー溶液 (M13-21 プライマーあるいは reverse プライマー) 4 μ l (3.2 pmol) を加え、混合、スピンドウンし、反応に用いた。

サーマルサイクラー反応

反応は、ZYMOREACTOR II AB-1820 (アトー) を用いて行った。先ほど調製した反応液にミネラルオイル (PLOUGH 社) を 1 滴落し、反応液の蒸散を抑制した。反応の温度プログラムは、96°C で 30 秒間、50°C で 15 秒間、60°C で 4 分間を 25 回繰り返した後、4 °C で保持した。

反応生成物の精製

反応液に、滅菌水 80 μ l, クロロホルム 100 μ l, フェノール-水-クロロホルム (68:18:14, v/v/v) 100 μ l を加え、攪拌し、15,000 rpm, 5 分間遠心した後、水層を別のチューブに移した。さらに、その水層にフェノール-水-クロロホルム (68:18:14, v/v/v) 100 μ l を加え、攪拌し、15,000 rpm, 5 分間遠心した後、水層を

別のチューブに移した。この水層 100 μ l に 3M NaOAc 15 μ l, EtOH 300 μ l を加え, 15,000 rpm, 15 分間遠心した後, 上清を除き, 沈澱を 75% EtOH 250 μ l で洗浄し, 真空ポンプで乾燥させた。使用まで -20°C で遮光保存した。

(3) アクリルアミドゲルの作製

6% ゲルの調製

35 g の尿素に 40% アクリルアミド・ストック液[®] (アクリルアミド: ビス = 19:1) 10.5 ml を加え, 60 ml ぐらいまで脱イオン水を加え, 50°C で攪拌しながら完全に溶解させた。0.22 μ のフィルター (CORNING 社) で吸引濾過し, 濾液に 7 ml の 10x TBE[®] を加え, さらに脱イオン水で 70 ml にメスアップした。超音波洗浄器と吸引にて脱気した。

ゲル板の組み立て

蛍光を発しないような洗剤 (BIO NOX) を用いて温水でガラス板両面を洗浄した後, 脱イオン水, 次いで, 2-プロパノールを用いてガラスを洗浄した。両側に 0.4 mm のスペーサーを置き, ガラス板を重ね, クリップで固定し, ガラス板底部をテープでとめた。

ゲルの流し込み

先ほど調製したアクリルアミド溶液に 10% 過硫酸アンモニウムを 350 μ l 加え, 穏やかに混合し, 50 ml のチューブに 10 ml 程度移した。これに TEMED を 10 μ l 加え, 混合後, すみやかにガラス板底部から 5 cm 位まで流し込んだ。軽くガラス板を叩き, 気泡を取

り、固まるまで 5 分間立てて置いた。残り約 60 ml に、TEMED 35 μ l を加え、混合後すみやかに流し込んだ。気泡を完全に取った後、ガラス板を静かに横にし、コームを差し込み、固まるまで約 3 時間放置した。

(4) 電気泳動及びデータ解析

電気泳動、データ解析は、ABI 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems) を使用して行った。

ゲル板の装着

ゲル板からコームを抜き、周りのテープ、クリップを取り、ゲル板両面を脱イオン水、2-プロパノールで洗浄した。特にゲル板底部から約 3 分の 1 の位置は検出部にあたるので、念入りに洗浄した。本体にバッファー・チャンバーをセットし、ゲル板を取り付け、プレートチェックを行い、検出部が汚れていないことを確認した。

電気泳動

上下のバッファー・チャンバーに 1x TBE 1,500 ml を注ぎ、ウェルをリンスし、30 W の定電力泳動でプレ・ランを 20 分間行った。この間に (2) で調製しておいた試料をバッファー (50 mM EDTA と脱イオン化したホルムアミドを 1:5 の割合で混合し、ブルーデキストランをわずか加えたもの) に溶かした。1 試料当りに用いたバッファーの量は、16 ウェル・コームの場合は 6 μ l、24 ウェル・シヤークコームの場合は 4 μ l であった。プレ・ラン終了後、再びゲルの各ウェルを丁寧にリンスし、90°C で 2 分間処理し、急冷した試

料を敏速にロードした。ブレ・ランと同様にして定電力で泳動を行った。データは、Macintosh 内の 373A ソフトウェアで自動解析した。

(5) ホモロジー検索

コード領域、アミノ酸への変換の決定は、GENETYX (ver. 5.0.0., Software Development) により行った。決定したコード領域のアミノ酸配列のホモロジー検索は蛋白質データベース SWISS-PROT Rel. 24 を用いて行った。

(b) pLRG11 の塩基配列の決定

pLRG11 は、インサート DNA が約 0.3 kbp であるのに対し、それに対応する mRNA の長さが約 0.7 kbp であり、全長がクローン化されていないと考えられた (第 1 節参照)。そこでライブラリーからのバックスクリーニングにより全長に近いクローンを検索した。

① 全長に近いクローンの検索

(1) ブラークハイブリダイゼーションによるライブラリーからのスクリーニング

第 2 章第 1 節 1-2 ⑤(1) と同様にして、1 枚当たり約 1,000 個のブラークが存在する NZY プレート (10 x 14 cm 角シャーレ 5 枚) を作製し、各プレートに対してナイロンフィルター (9 x 12 cm) 1 枚を用いてファージの DNA を移し取った。第 2 章第 1 節 1-2 ⑤(5) と同様の手法を用いて pLRG11 インサートをプローブとしてブラークハイブリダイゼーションを行った (一次スクリーニング)。

二次スクリーニングまで行い、シグナルを示すブランクについて、第2章第1節1-2⑤(4)と同様にして、ファージ内のインサートDNAをpBLUESCRIPT SK⁻にサブクローニングした。インサートはEco RIあるいはNot Iにより切り出して電気泳動を行い、マーカー(λ Hind III)と比較することによりインサートの長さを調べた。

(2) ノーザンハイブリダイゼーションによる確認

第2章第1節におけるGA₃処理種子の全RNA 10 μ gを用いて、pLRG11とバックスクリーニングで得られたクローンのインサートをそれぞれプローブとして1-2⑤(5)と同様にしてノーザンハイブリダイゼーションを行い、各々のクローンに対するmRNAの長さを比較・検討した。

② 制限酵素地図の作製

(a)のpLRG5の場合と全く同様にして制限酵素地図を作製した。

③ 塩基配列の決定

制限酵素地図で明らかになったインサートDNAの認識配列部位とpBLUESCRIPT SK⁻のマルチクローニングサイト内の認識配列部位を利用して、ある特定の長さの断片を除いたクローンとそのままのインサートDNAの塩基配列をM13-21プライマー、reverseプライマーを用いて決定し、それらの組合せによりバックスクリーニングで得られたクローンのマスター配列を決定した。なお、pLRG11についても両方向のプライマーを用いて塩基配列を決定した。塩基配列の決定は(a)のpLRG5の場合と全く同様にして行った。

4-3 結果及び考察

(a) pLRG5 の塩基配列の決定

pLRG5 の制限酵素地図を図 2-7 に示す。図のように、制限酵素の認識配列部位は EcoR V が 1 箇所認められた。これより明らかになった EcoR V 切断部位とマルチクローニングサイトの EcoR V 切断部位を利用して約 800 bp の DNA を除いたクローン、及び pLRG5 のインサート DNA のデリーションクローンの塩基配列を決定し、各クローンの重複した配列を考慮して順次つないでいき (図 2-7)、インサート DNA の全長の塩基配列を決定した。その結果を図 2-8 に示す。これより、pLRG5 は全長が 1313 bp の塩基対からなることが明らかになった。図 2-8 に示した通り、6 塩基目のアデニンから 1146 塩基目のアデニンまでがコード領域であると考えられ、それに対応するアミノ酸は 380 残基であった (以後このペプチドを LRG5 と略記)。この LRG5 に対してホモロジー検索を行ったところ、表 2-2 に示すようにアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH, E.C. 1.1.1.1) と高いホモロジーがあった。ADH は図 2-9 に示すようにアルコールとアルデヒド間の酸化還元を触媒する Zn 要求性の細胞質酵素であり、生物が嫌氣的条件でエネルギーを獲得するために利用することが知られている。一次代謝系における ADH の位置は図 2-10 に示す。ADH のアイソザイムは、現在シロイヌナズナ (Dolferus and Jacobs 1984; Chang and Meyerowitz 1986) 等では 1 種類しか知られていないが、多くの高等植物では 2 種類以上のアイソザイムが存在する (Tanksley and Jones 1981; Gottlieb 1982; Brzezinski et al. 1986; Llewellyn et al. 1987; Good and Crosby 1989; Xie and Wu 1989)。一般に、ADH は嫌氣的条件で誘導されると考え

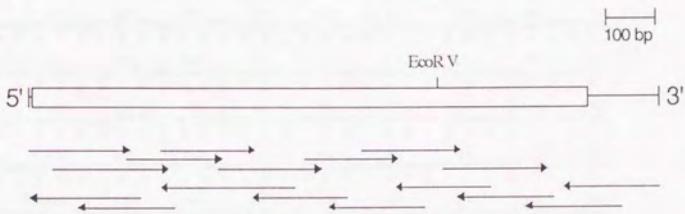


図 2-7 pLRG5 の制限酵素地図と sequencing strategy

Sequencing strategy は矢印で示した. 白抜き四角はコード領域を示す.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
TATTAATGTCGAGCCTACTAACCGGTGATTCGATGCAANGCGCGGTAGCATGGGAAGCCGGAAGCCACTAGTGATTGAAGAAGT
M S S T T N Q V I R C K A A V A W E A G R P L V I E E V
100     110     120     130     140     150     160     170     180
GAGTGGCGCCACCCAAAAATGGAAATCCGAATCAAAATACTCTTCACTCCCTGCCACACCGATCTTACATTTGGGAAGCCAG
E V A P P Q K M E V R I K I L F T S L C H T D V Y F W E A K
190     200     210     220     230     240     250     260     270
GCTCAGAAATCCCGGTGTTCCCGGAATTTTAGGACATGAAGCTGGAGGGTGTGGAGAGTGTGGGGAAAGAGTACTGAAGCTCAGGCC
G Q N P V F P P R I L G H E A G G V V E S V G E G V T E L Q P
280     290     300     310     320     330     340     350     360
GGAGATCATGTCCTCCCTGTTTCACCGGGAATGCAAMGAATCCGCTCACTGTAAATCGGAAGGAGCAACATGTGTGACCTTTTGAG
G D H V L P V F T G E C K E C A H C K S E E S N M C D L L R
370     380     390     400     410     420     430     440     450
ATCAACCCGACAGGGGATCATGATCACAGATCAAAAATCCCGATTTCCATCAACGGAAAAGCCATTTCCATTTCGTGGAACTCA
I N T D R G V M I H D Q K S R P S I N G K F I F H F V G T S
460     470     480     490     500     510     520     530     540
ACTTTCAGTGAATACCCGTCGTTTCATGTTGTTCTCGGCAAAATCAACCCCTTGCCTCTTGACAAAAGTCTGTGTCCCTCAGTTGT
T F S E Y T V V H V G C L A K I N P L A P L D K V C V L S C
550     560     570     580     590     600     610     620     630
GGATCTCCACAGGTCTGTGCTACTCTGAAGCTTGCAAAGCCTAAAAAGGCTCACTGTGGCCATTTTGGATGGGAGCTGTGGGG
G I S T G L G A T L N V A K P K K G S S V A I F G L G A V G
640     650     660     670     680     690     700     710     720
CTGTGCTGCTGAAGTGCAGAATTGCAAGTCTCAAGGATCATTGGTGTGATCTCAATGCCACAGATTTGAGCTTCAAAAGAAA
L A A A E G A R I A G A S R I I G V D L N A N R F E L A K K
730     740     750     760     770     780     790     800     810
TTGGAGTACTGAGTTTGAACCTTAAGACTACA AAAAGCCAGTACAGGAGTGTTCAGAGATGACAAATGGAGGACTGACAGG
F G V T E F V N P K D Y K K P V Q E V I A E H T N G G V D R
820     830     840     850     860     870     880     890     900
AGTGTGAATGCTACGTCATATGATGCTATGATATCTGCTTCCGAATGTTTCATGATGATGGTGGGGTGTGCTGTTCTGTGGGTGT
S V E C T G H I D A M I S A F E C V H D G W G V A V L V G V
910     920     930     940     950     960     970     980     990
CCACATAAAGATGCTTTTCAAGACAGTCCATTGAATCTGTGAAAGGAGGACTCTGAAGGAACTTTTTTTGAAACTATAAAGCT
P H K D A V F K T S P L N L L H E R T L K G T P F P G N Y K P
1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
CGATCAGATATCCCTCTGTGGTTGAAAGTATATGAATAGGAACTTGAATGGGAAGTTTATTACATGAATGCCATTTCTGAG
R S D I P S V V E K Y N H K E L E L E K F I T H E L P F S E
1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
ATAAATAAGCCTTTGATGCTCAAGGTGAAGTCTCCGATGCAATAATCGATGGTGAATAAATGTAGAGGAAGTTTTTAAA
I N X A F D L M L K G E G L R C I I R H G E
1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
AATGTGTATAATAGTACCTCATATTTTCATATGATAACACATCAAGTCTCTTTGATCTTATTATGTACGCAAGTGTCTGTGTGGG
1270    1280    1290    1300    1310
ATCCGACTTTGAGTTTATATATCCAAATGATTATAGTCCAAAAA

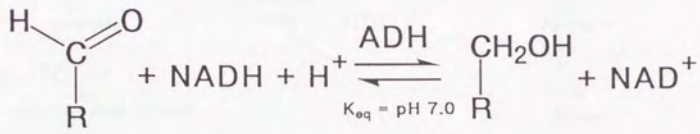
```

図 2-8 pLRG5 の塩基配列と推定アミノ酸配列

表 2-2 LRG5 に対するホモロジー検索

INT. Score	酵素	植物種 (カッコ内は日本名)
1. 1785	ADH2	<i>Solanum tuberosum</i> L. (ジャガイモ)
1785	ADH1	<i>Solanum tuberosum</i> L. (ジャガイモ)
3. 1782	ADH3	<i>Solanum tuberosum</i> L. (ジャガイモ)
4. 1697	ADH	<i>Fragaria ananassa</i> Duch. (イチゴ)
5. 1685	ADH3	<i>Hordeum vulgare</i> L. (オオムギ)
6. 1672	ADH1	<i>Zea mays</i> L. (トウモロコシ)
7. 1670	ADH2	<i>Zea mays</i> L. (トウモロコシ)
8. 1667	ADH1	<i>Pennisetum americanum</i> Trinius. (トウジンビエ)
9. 1661	ADH1	<i>Trifolium repens</i> L. (シロツメクサ)
1661	ADH1	<i>Pisum sativum</i> L. (エンドウ)
11. 1657	ADH1	<i>Hordeum vulgare</i> L. (オオムギ)
12. 1645	ADH	<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynhold. (シロイヌナズナ)
13. 1285	ADH2	<i>Hordeum vulgare</i> L. (オオムギ)
14. 1115	ADH1	<i>Petunia hybrida</i> Vilm. (ツクバネアサガオ)
15. 1105	ADH2	<i>Oryza sativa</i> L. (イネ)

ホモロジー検索は、蛋白質データベース SWISS-PROT Rel. 24 により行ない、INT. Score の高いものから上位 15 個を抜粋した。



Acetaldehyde
(R = CH₃)

Ethanol
(R = CH₃)

図 2-9 アルコールデヒドロゲナーゼの触媒する
反応

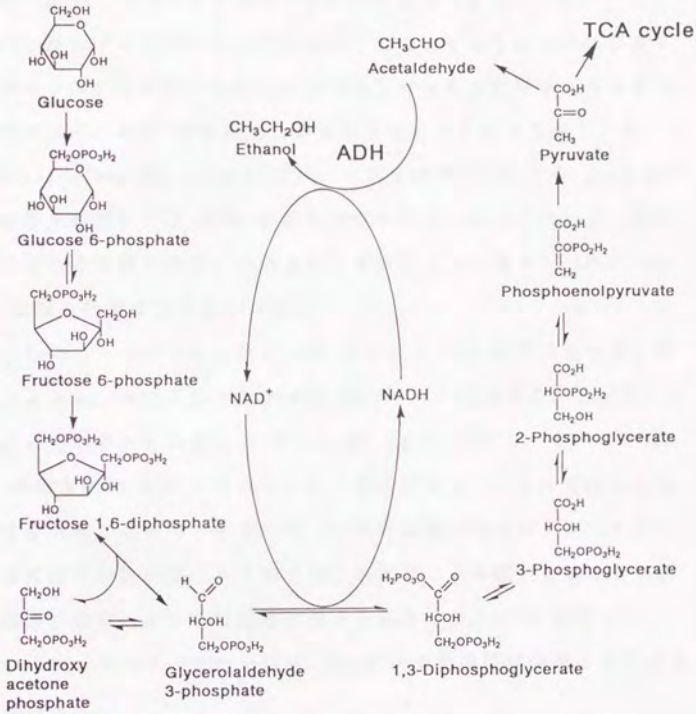


図 2-10 アルコールデヒドロゲナーゼの一次代謝系における位置

られており、種子発芽の初期、植物の根部で特に活性が高い。種子が嫌氣的であるのは、外側が硬い果皮で覆われており、しかも土中あるいは水中で発芽する場合が多いためと考えられている。

ADH 遺伝子についてはトウモロコシについてよく研究されており、トウモロコシの根部においては発現の上昇は転写活性が上昇するためではなく、mRNA の安定化によるものであると考えられている (Rowland and Strommer 1986)。レタス種子においても GA あるいは赤色光処理により mRNA の転写は増加しているのではなく、安定化している可能性が考えられるが、そのことを証明するには、run-on 実験を行わなければならない。

さらに、トウモロコシ根部 ADH のゲノム DNA のプロモーター解析によると、そのプロモーターは GA や ABA にはほとんど反応しないことも示されている (Jacobsen and Close 1991)。このことは、GA が直接的に ADH のプロモーターを活性化しているのではない可能性を示唆するものであり、GA と ADH の間に他のシグナルが介在する可能性が高いが、トウモロコシ根部とレタス種子では異なる制御機構が機能している可能性も考えられるので、LRG5 のゲノム DNA のプロモーター解析を行い、GA による発現調節機構を追究する必要がある。

上述のこと以外にも、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現部位の特定等により LRG5 の機能がさらに明らかになると考えられる。

(b) pLRG11 の塩基配列の決定

pLRG11 インサートをプローブとして約 4,000 個のブラークをスクリーニングしたところ、pLRG11 とハイブリダイズするクローンが

3種類得られた。これらのうち、2種類はベクターが変異により異常であり、今後の解析に不都合であったので、残りの1種類のクローン(pLRG11-BS1)について塩基配列を決定することにした。このpLRG11-BS1のインサートの長さは約0.6 kbpであった。ノーザンハイブリダイゼーションにより、このpLRG11-BS1とハイブリダイズするmRNAは、pLRG11のそれとほぼ同じ長さであることが明らかとなり(図2-11)、pLRG11-BS1はpLRG11と同種のmRNA由来のcDNAをクローン化したものであると考えられる。pLRG11-BS1の制限酵素地図を図2-12に示す。図のように、EcoRIとClaIの認識配列部位が1箇所ずつ認められたので、図中の矢印で示したsequencing strategyに従い塩基配列を決定した。また同時に、pLRG11についても塩基配列を決定した。その結果、pLRG11-BS1は562 bpの塩基対から、pLRG11は170 bpの塩基対から成ることが明らかとなり、各々の重複配列を考慮すると、図2-13に示すような塩基配列が想定された。図のように、pLRG11-BS1は5'側が十分に伸びておらず、全長がコードされていないクローンであると考えられ、図2-13に示す想定塩基配列が最も全長に近いと思われたので、これをpLRG11Tと名付け、その後の解析に用いた。図2-13に示した通り、2塩基目のアデニンから286塩基目のチミンまでがコード領域であると考えられ、それに対応するアミノ酸は95残基であった(以後このペプチドをLRG11Tと略記)。このLRG11Tに対してホモロジー検索を行ったところホモロジーの高いもの(Int. Score 100点以上)はなかった(データ無掲載)。ペプチドの構造についても、図2-14に示すように特徴的なものはみられなかった。しかしながら、部分的にホモロジーが高いタンパク質はいくつかあり、

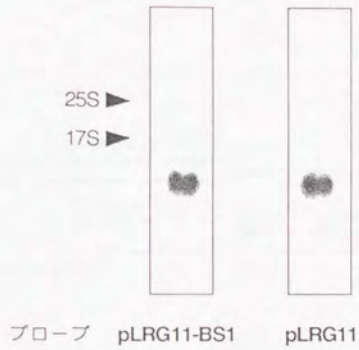


図 2-11 pLRG11-BS1 と pLRG11 のノーザン
ハイブリダイゼーションによる比較

第1節で用いたGA処理種子から抽出した全RNAの10 µgについて変性アガロースゲル電気泳動を行った後、pLRG11-BS1、pLRG11インサートをそれぞれプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。

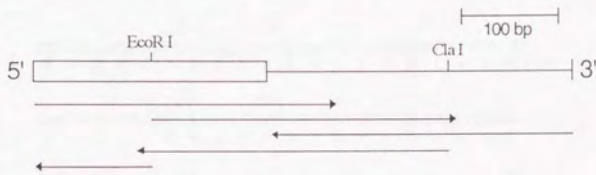


図 2-12 pLRG11-BS1 の制限酵素地図と sequencing strategy

Sequencing strategy は矢印で示した. 白抜き四角はコード領域を示す.

						#													
10	20	30	40	50	60														
<u>TATGGATTTTAAGGATGGCCAAAGCTAAATCACACTGGATCTCCTCCACCACAACTCGGCC</u>																			
M	D	F	T	I	A	K	A	K	S	H	S	I	S	S	T	T	T	P	P
<u>GGAAACCGATGATCTGGGTCACTGGTCTACAGATCCGGTAACTACTCAACTCCAACTGGC</u>																			
E	T	D	D	L	G	H	G	A	T	D	P	V	T	T	Q	L	Q	L	A
<u>TCATTAACAGTCGGCTGCTTCTCTCGACAAAGAGGGGGTTCTCCGGGGATTCGGTTACCA</u>																			
H	Y	Q	S	A	A	S	L	D	K	E	A	V	L	R	R	I	R	Y	H
<u>CAAACGCTTAACGAAACTCAAATGCCATTTTGAGTCTCTGGTGAATAAGAGCCCTAGCGA</u>																			
K	R	L	R	K	L	K	C	T	F	E	S	L	V	N	K	S	P	S	D
<u>TOGATAAGACAAGTGGTTTGAAACCCACCGATTCATTCACTTCTCCTTGAAGATTAATAC</u>																			
G	Y	D	K	W	F	E	P	T	D	S	F	T	S	P					
<u>CCCCGACAGATGATTTCCGTATGGAAATACTACACGATGACTTGAATGTACGACAAGTA</u>																			
<u>CTCCCGAGAGTACAAGGGGGTGTTCCAAAGACGACACTTGGAGGTTGAGATTTAAGAA</u>																			
<u>TGGAAGGTGTTTGAACTTTGAATGCCCTTCAATCCTGGTAGTATATAATATTAATCGATA</u>																			
<u>AACATCTGTTTCTTTTTTTAGAAAGGTTAGAATATTAGTATTATCGTATATTTTTTATTCT</u>																			
<u>CITTTTGTAAATTCGGATCTTTTATACATCCATATTAATAAATAATTTATGTAGTATTTT</u>																			
<u>CTAAAAAAAA</u>																			

図 2-13 pLRG11T の塩基配列と推定アミノ酸配列

図中の下線はpLRG11を、#印はpLRG11-BS1の5'末端を示す。

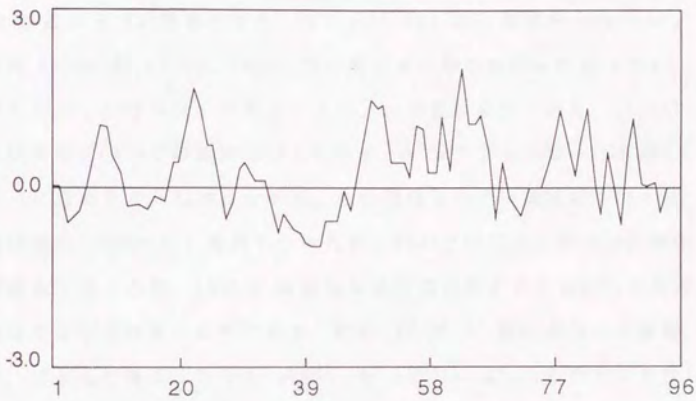


図 2-14 LRG11T の Hoop&Wood プロット

パラメーターは Hoop&Wood を用いて, GENETYX によりプロットは作製した. 正側が親水性を, 負側が疎水性を示す.

そのホモロジーの高い部分配列の中で最も興味深かったのは GAL4 の DNA 結合領域であった (図 2-15; アミノ酸 8 残基に対して 75 %). GAL4 とは, 酵母においてガラクトース誘導遺伝子の発現に対する正の制御因子であり (Laughon and Gesteland 1984), ジンクフィンガーにより DNA と結合し, 発現を制御していると考えられている (Pan and Coleman 1990). 図 2-15 に示すように GAL4 の 15 残基から 22 残基までと, あるいは DNA 結合領域の consensus 配列 (Kraulis et al. 1992) の一部と高いホモロジーがあったが, ジンクフィンガーはシステイン (C) の位置が重要であり, LRG11T ではそれについての相同性がみられず, ジンクフィンガーは形成しないと思われる. しかしながら, その相同性の高い領域は, DNA 結合領域の consensus 配列でもみられ, DNA との結合に何らかの関係があると考えられ, LRG11T が遺伝子発現制御因子であるという可能性は否定はできないと思われる. pLRG11T は 5' 側の非コード領域が, ほとんど無く, しかも pLRG11 と pLRG11-BS1 から想定したクローンであるので, 今後, このクローンの 5' 側が十分に伸びたものを再度バックスクリーニングによりクローニングし, 完全なコード領域を決定する必要がある. さらに, このクローンの mRNA の発現調節機構を追究していくとともに, 発現部位の特定, DNA 結合実験等を通してペプチドの機能解析を行うことにより, GA による発芽誘導機構の解明研究に貴重な示唆を与えるものと考えられる.

```
LRG11T 56 RIRYHKRLRKLKCTFESLVNKSPSDGYDKWFEP
          ** .**** .
GAL4      9 QACDICRLKLLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYE
Consensus AC--CR-KKXKCD---P-C--C-K--X-C
          S      RR  S          S
          G          Q
```

図 2-15 LRG11T と GAL4 の DNA 結合領域との相同性

ホモロジー検索は、蛋白質データベース SWISS-PROT Rel. 24 により行なった。
*印は一致したアミノ酸を、・印は性質が似ているアミノ酸を示す。
図中の consensus 配列は、GAL4 とそれ以外の 8 種の菌遺伝子の DNA 結合領域との比較により推定されたもので、Kraulis et al. (1992) の論文より抜粋した。
X は疎水性アミノ酸を示す。

第5節 まとめ

オーキシンや ABA に比べると、GA の作用機構に関する分子レベルの知見は極めて少なく、受容体の研究とともにこれから発展が期待される研究である。GA がレタス種子の発芽誘導において重要な役割を担っていることを第1章で記したが、第2章においては、GA によるレタス種子発芽誘導機構に関する基礎的知見を得るために、レタス種子において GA 処理により誘導される遺伝子をクローニングすることを試みた。

第1節においては、GA 処理種子と無処理種子との間でディファレンシャルスクリーニングを行い、GA 誘導性遺伝子の cDNA を 2 種クローニングすることに成功した (pLRG5 と pLRG11; 図 2-3)。それらに対応する mRNA の長さはそれぞれおよそ 1.3 kb と 0.7 kb であった。

第2節においては、pLRG5 と pLRG11 について GA 処理による mRNA の発現の経時変化を調べるとともに、赤色光処理による発現の経時変化も調べた。両クローンとも、対照 (R/FR 処理種子) が光処理開始から時間とともにその発現は減少していったのに対し、GA 処理種子と R 処理種子においては 10 時間後に発現の増加が認められた (図 2-4 と図 2-5)。赤色光照射による発現量の増加は、内生 GA₁ レベルの上昇 (図 1-6) に起因すると考えられ、対照においては発現量、内生 GA₁ 量 (図 1-6) ともに減少するという事実を考えた場合、これら遺伝子の発現レベルの変動は、内生 GA₁ レベルの変動とよく対応しているといえる。

一方、ABA は、GA や赤色光処理により誘導されるレタス種子の発芽を完全に抑制する。そこで、第3節においては、GA 誘導性遺伝子である pLRG5 と pLRG11 について、GA あるいは赤色光処理により増加する mRNA の発現が、発芽を完全に抑制する濃度の ABA によるどのような影響を受けるかを調べた。ノーザン解析の結果、両クローンとも GA あるいは赤色光処理により誘導される mRNA の発現に対して、ABA 処理による影響はほとんどみられなかった(図 2-6)。このことは、GA あるいは赤色光が誘導する発芽誘導過程において、これら遺伝子は、ABA の作用段階より上流で、あるいは ABA とは異なるシグナル伝達経路で機能している可能性を示唆するものである。

第4節においては、2種の GA 誘導性クローンの塩基配列を決定した。pLRG5 については 1313 bp の塩基対から成り、アミノ酸 380 残基(LRG5)をコードしていると考えられた(図 2-8)。この LRG5 に対してホモロジー検索を行ったところ、アルコールとアルデヒド間の酸化還元を触媒する細胞質酵素である ADH と高いホモロジーがあった。一般に、ADH は生物が嫌氣的条件でエネルギーを獲得するために誘導されると考えられており、種子発芽の初期、植物の根部で特に活性が高い。種子が嫌氣的であるのは、外側が硬い果皮で覆われており、しかも土中あるいは水中で発芽する場合が多いためと考えられ、レタス種子発芽過程における発現誘導遺伝子としてクローン化されたことは合目的である。pLRG11 については、全長がクローン化されていないと考えられたので、バックスクリーニングにより全長に近いクローン pLRG11-BS1 をクローン化した(図 2-11)。しかしながら、このクローンは 5' 側が十分に伸びておらず、pLRG11 との重複配列を考慮して pLRG11T というクローンを想定し

た(図 2-13)。この想定した pLRG11T は 611 bp の塩基対から成り、アミノ酸 95 残基(LRG11T)をコードしていると考えられた。この LRG11T についてホモロジー検索を行ったところ、ホモロジーの高いものはみられなかったが、酵母におけるガラクトース誘導遺伝子の発現に対する正の制御因子である GAL4 の DNA 結合領域の一部と高い相同性(アミノ酸 8 残基に対して 75%)があった(図 2-15)。しかしながら、GAL4 の DNA 結合領域は、ジンクフィンガーを形成して DNA と結合すると考えられており、LRG11T についてはそれがみられず(システインの配置; 図 2-15)、関係が薄いようにも思われるが、その一部は DNA 結合領域の consensus 配列の一部と高い相同性が認められ(図 2-15)、DNA との結合に何らかの関係があるという可能性は考えられる。

今後、これらクローンについて、*in situ* ハイブリダイゼーションによる発現部位の特定、プロモーター解析等により機能や発現調節機構を追究することにより、GA によるレタス種子発芽誘導機構を解明する上での重要な知見が得られるものと考えられる。

使用機器, 試薬類, 使用キット

【使用機器】

1. 遠心機

H-103RS (国産遠心; 集菌, スパンカラム等で使用)

MRX-150 (トミー; 1.5 ml チューブ用)

himac CP56 (日立; 30 ml 遠心管用)

L-80 (ベックマン; 超遠心スイングローター用)

2. 電気泳動関連

Mupid-2 (コスモバイオ; 小型電気泳動槽)

AH-16 型 (和科盛; 大型電気泳動槽)

AE-6100 型 (アトー; 中型電気泳動槽)

クロスパワー-150 (アトー; AH-16, AE-6100 型泳動槽用電源)

3. トランスイルミネーター関連

トランスイルミネーター (TDM-20 型, フナコシ)

ポラロイドカメラ (77a-FP-600, フナコシ)

4. 分光光度計

200-20 型ダブルビーム分光光度計 (日立)

DU 640 型分光光度計 (ベックマン)

【試薬類】

試薬類はすべて生化学用を用いた。本文中#印を付けたものの組成を以下に記す。

RNA の抽出精製に用いる試薬

1. GTC 溶液

グアニジンチオシアン酸塩 100 g を水で溶かして 200 ml にする。使用直前にグアニジンチオシアン酸塩溶液 1 ml につきラウロイルサルコシナトリウム塩 5 mg, メルカプトエタノール 7 μ l を加える。

2. 5.7 M CsCl

96 g の CsCl を 0.1 M EDTA (pH 7.5) に溶かして 100 ml とすし、オートクレーブ。遮光保存。

3. CsTFA 溶液

市販の CsTFA 溶液 (比重 2) と 0.25 M EDTA (pH 7.0) 溶液、滅菌水を 5:4:1 の割合で混ぜる。遮光保存。

4. 75% EtOH

特級 EtOH を滅菌水と 3:1 の割合で混合し、 -20°C に冷やしたものの。

5. 10 M LiCl

42.4 g LiCl を水に溶かして 100 ml にする。オートクレーブ後、 -20°C 保存。

6. TE 溶液

100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA

mRNA の精製に用いる試薬 (Dynabeads mRNA 精製キット)

1. 2x 結合バッファー

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 M LiCl, 2 mM EDTA

2. 洗浄バッファー

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA

3. 溶出バッファー

2 mM EDTA (pH 7.5)

cDNA 合成及びベクターへの組み込みに用いる試薬

1. 5x ファーストストランド合成バッファー

250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl_2 , 375 mM KCl

2. 0.1 M DTT

0.31 g DTT を 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 20 ml に溶解。

3. セカンドストランド合成バッファー

100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl_2 , 500 mM KCl, 5 mM DTT

4. フェノール/クロロホルム

フェノール (pH 9.0) 250 ml, クロロホルム 240 ml, イソアミルアルコール 10 ml を混ぜて、上層を除く。遮光保存。

5. 10x ライゲーションバッファー

1 M Tris-HCl (pH 7.6) 3.3 ml, 1 M MgCl_2 0.5 ml, 水 45 ml を混ぜ、オートクレーブ。冷却後スベルミジン 7.25 ml, 1 M DTT

0.75 ml, BSA (20 mg/ml) 0.5 ml を加え, -20°C 保存.

6. Eco RI/Not I アダプター

下記のような Eco RI と Not I の認識配列を持つ脱リン酸化されたアダプター.

AATTCGGGCGCCG
GCGCCGGCGp

7. 泳動用色素 (グリセリン色素液)

50% グリセリン, 0.1 mg/ml プロモフェノールブルー,
0.1 mg/ml キシレンシアノール, 1 mM EDTA

in vitro パッケージング 及びタイトレーションに用いる試薬

1. SM バッファー (100 ml 当り)

NaCl 0.58 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 5 ml,
2% ゼラチン 0.5 ml

2. LB 培地 (100 ml 当り)

Bacto tripton 1 g, yeast extract 0.5 g, NaCl 1 g, 1 N NaOH
0.5 ml

3. 0.5 M IPTG 溶液

0.258 g IPTG を水 20 ml に溶かす. 濾過滅菌し, -20°C に保存.

4. 250 mg/ml X-gal

250 mg X-gal をジメチルホルムアミド 1 ml に溶かす. -20°C ,
遮光保存.

5. NZY 培地 (100 ml 当り)

NaCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, yeast extract 0.5 g,
N-Z-Amine 1 g, 1 N NaOH 0.4 ml

6. NZY プレート (100 ml 当り)

NZY 培地 100 ml, バクトアガー 1.5 g

7. トップアガー (100 ml 当り)

NZY 培地 100 ml, アガロース 0.7 g

ディファレンシャルスクリーニングに用いる試薬

1. アルカリ変性液

0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

2. 中和液

0.5 M Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl

3. 20x SSC

3 M NaCl, 0.7 M クエン酸ナトリウム

4. 2x SSC

20x SSC を 10 倍希釈して用いる.

5. 4x SSC/0.1% SDS

20x SSC を 5 倍希釈し, 10% SDS を 1/100 容加える. 3x SSC/
0.1% SSC 他も同様にして調製.

6. サケ DNA

1 g サケ精子 DNA (ベーリンガー) を 100 ml 水に溶解する. オ
ートクレーブ後, 急冷, 分注して -20°C 保存.

サブクローニングに用いる試薬

1. 2x YT 培地 (100 ml 当り)

Bacto tripton 1.6 g, yeast extract 1 g, NaCl 0.5 g,
1 N NaOH 0.5 ml

2. LB/amp 培地 (100 ml 当り)

LB 培地 100 ml, 50 mg/ml アンピシリン溶液 0.1 ml

3. LB/amp プレート (100 ml 当り)

LB/amp 培地 100 ml, バクトアガー 1.5 g

4. TEG 溶液

25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 50 mM グルコース

5. アルカリ-SDS

0.2 N NaOH, 1% SDS

6. TAE

50x TAE (2M Tris-HOAc pH 8.0, 0.1 M EDTA) を 50 倍希釈し
て用いる.

ノーザンブロットイングに用いる試薬

1. 20x MOPS バッファー (pH 7.0)

0.4 M MOPS, 0.1 M NaOAc, 0.02 M EDTA

2. 変性ゲル用泳動バッファー

ホルムアルデヒド 1.6 ml, ホルムアミド 5.0 ml,
20x MOPS 0.5 ml, グリセリン色素液 1.6 ml

3. NEW WASH (GENE CLEAN II キット)

NEW concentrate (NaCl, Tris-EDTA) 14 ml, 滅菌水 280 ml,

EtOH 310 ml

制限酵素用バッファー (宝酒造)

10x L : 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10 mM DTT
10x M : 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 mM NaCl
10x H : 500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10 mM DTT,
1000 mM NaCl
10x K : 200mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1000 mM KCl
10x T : 330mM Tris-acetate, 100mM Mg-acetate, 5 mM DTT,
660 mM K-acetate

各制限酵素 (宝酒造) の適用バッファーを示す.

L: Apa I, Kpn I, Sac I

M: Acc I

H: Cla I, Eco RI, Eco RV, Pst I, Sal I, Xho I

K: Bam HI, Hind III

H+0.01% BSA+0.01% Triton: Not I

T+0.01% BSA: Xba I

デリーションクロン作製に用いる試薬

1. 20% PEG/2.5 M NaCl

Poly (ethylene glycol)₆₀₀₀ 20 g と NaCl 14.6 g に水を加えて 100 ml にして、オートクレーブ。よく攪拌する。

2. 10x Exo III バッファー

500 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM MgCl₂, 20 μg/ml tRNA

3. 10x MB Nuclease バッファー

300 mM NaOAc pH 5.0, 500 mM NaCl, 10 mM ZnCl₂, 50% グリセロール

4. Klenow バッファー (60 μl 当り)

10x L 制限酵素用バッファー 6 μl, デオキシヌクレオシド三リン酸 (各 0.5 mM) 6 μl, 0.1% BSA 2 μl, 滅菌水 46 μl

5. SOC

Bacto tripton 20 g, yeast extract 5 g, 5 M NaCl 2 ml,
2 M KCl 1.25 ml に水を加えて 990 ml にし, 2 M Mg²⁺
(1 M MgSO₄·7H₂O, 1 M MgCl₂·6H₂O) 10 ml と 2 M グルコース
10 ml を加えオートクレーブしたもの。

シークエンスに用いる試薬

1. 5x TACS バッファー
400 mM Tris-HCl pH 9.0, 10 mM MgCl₂, 100 mM (NH₄)₂SO₄
2. 40% アクリルアミド・ストック液 (70 ml)
アクリルアミド・ビス 30 g に脱イオン水 48 ml を加える.
3. 10x TBE (100 ml 当り)
Tris 10.8 g, ホウ酸 5.5 g, EDTA 0.83 g に脱イオン水を加えて
100 ml にし, 0.22 μフィルターで濾過したもの.

【使用キット】

Dyanbeads mRNA 精製キット (ベリタス社)
メガプライム DNA 標識システム (アマシャム社)
GENE CLEAN II キット (フナコシ)
Predigested λ ZAP II/Eco RI cloning kit (STRATAGENE)
pBluescript EXO/MUNG DNA sequencing system (STRATAGENE)
GIGAPAK II packaging extract (STRATAGENE)
Ligation kit (宝酒造)
キロシークエンス用デリーションキット (宝酒造)
Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

総括

光発芽種子の中で代表的なものであるレタス種子は、これまで数多くの研究者達がその発芽誘導機構の解明を試みてきたが、いまだに未解明のままである。本博士論文研究は、レタス種子において、異なる光条件における内生 GA と ABA の量的変動の追究、GA により誘導される遺伝子のクローニング等を行うことにより発芽誘導機構を化学的・植物生理学的、分子生物学的手法を用いて追究したものである。

レタス種子の内生 GA の分析に関しては、かねてから多くの研究者が着目していたが、信頼度の高いデータは得られていなかった。本博士論文研究は、光条件と発芽率及び内生 GA と ABA の経時変化の関係を詳細に追究し、発芽誘導における GA と ABA の生理的機能を追究する上で、重要な知見を提供したと思われる。

また、高等植物において GA により誘導される遺伝子のクローニングについては、数多く試みは行われているものの、成功している例はきわめて少ない。本博士論文研究では、レタス種子において GA 誘導性遺伝子のクローニングに成功し、発芽誘導機構を解明する糸口とすることができた。

以上、本博士論文研究により得られた成果は、レタス種子ばかりでなく他の光発芽種子の発芽誘導機構の解明、さらには高等植物の発芽機構の解明研究に貴重な示唆を与えるものと考えられる。

参考文献

- Akazawa T, Yamaguchi J and Hayashi M (1990) Rice α -amylase and gibberellin action - a personal view. In: Takahashi N, Phinney BO and Mac-Millan (eds) Gibberellins. Springer-Verlag, New York, pp 114-124
- Baulcombe DC, Barker RF and Jarvis MG (1987) A gibberellin responsive wheat gene has homology to yeast carboxypeptidase Y. *J Biol Chem* 262: 13726-13735
- Bewley JD and Black M (1982) Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH and Toole VK (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* 38:662-666
- Braun JM and Khan AA (1975) Endogenous abscisic acid levels in germinating and nongerminating lettuce seed. *Plant Physiol* 56:731-733
- Brzezinski R, Talbot BG, Brown D, Klimuszko D, Blakeley SD and Thirion J (1986) Characterization of alcohol dehydrogenase in young soybean seedlings. *Biochem Genet* 24:643-655
- Butler WL, Norris KH, Siegelman HW and Hendricks SB (1959) Detection, Assay, and preliminary purification of the pigment controlling photo-responsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 45:1703-1708
- Chang C and Meyerowitz EM (1986) Molecular cloning and DNA sequence of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1408-1412
- Cross BE, Grove JF and Morrison A (1961) Gibberellic acid. XVIII. Some rearrangements of ring A. *J. Chem Soc* :2498-2515

- De Greef JA and Fredericq H (1983) Photomorphogenesis and hormones. In: Shropshire W and Jr Mohr H (eds) Encyclopedia of plant physiology, new series, Vol. 16A. Springer-Verlag, Berlin, pp. 401-427
- Dolferus R and Jacobs M (1984) Polymorphism of alcohol dehydrogenase in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.: Genetical and biochemical characterization. *Biochem Genet* 22:817-838
- Durley RC, Bewley JD, Railton ID and Pharis RP (1976) Effects of light, abscisic acid, and ³H-benzyladenine on the metabolism of [³H]gibberellin A₄ in the seeds and seedlings of lettuce, cv. Grand Rapids. *Plant Physiol* 57:699-703
- Eldan M and Mayer AM (1974) Acid invertase in germinating Lactuca sativa: evidence for de novo synthesis. *Phytochemistry* 13:389-395
- Eldan M, Mayer AM, Poljakoff-Mayber A and Eldan M (1974) Difference in subcellular localisation of isocitrate lyase in lettuce seeds of different ages. *Plant Cell Physiol* 15:169-173
- Endo K, Yamane H, Nakayama M, Yamaguchi I, Murofushi N, Takahashi N and Katsumi M (1989) Endogenous gibberellins in the vegetative shoots of tall and dwarf cultivars of Phaseolus vulgaris L. *Plant Cell Physiol* 30:137-142
- Fincher GB (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:305-346
- Good AG and Crosby WL (1989) Induction of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in hypoxically induced barley. *Plant Physiol* 90:860-866
- Gottlieb LD (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216:373-380

- Halmer P, Bewley JD and Thorpe TA (1976) An enzyme to degrade lettuce endosperm cell walls. Appearance of a mannanase following phytochrome- and gibberellin-induced germination. *Planta* 130:189-196
- Ingram TJ, Reid JB, Murfet IC, Gaskin P, Willis CL and MacMillan J (1984) Internode length in Pisum sativum, The Le gene controls the β -hydroxylation of gibberellin A_{2a} to gibberellin A₁. *Planta* 160:455-463
- Ikuma I and Thimann KV (1963) The role of the seed-coats in germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 4:169-185
- Inoue Y (1990) Role of gibberellins in phytochrome-mediated lettuce seed germination. In: Takahashi N, Phinney BO and MacMillan J (eds) *Gibberellins*. Springer-Verlag, New York, pp 289-295
- Jacobsen JW and Close TJ (1991) Control of transient expression of chimeric genes by gibberellic acid and abscisic acid in protoplasts prepared from mature barley aleurone layers. *Plant Mol Biol* 16:713-724
- Jones MG and Zeevaart JAD (1980) The effect of photoperiod on the levels of seven endogenous gibberellins in the long-day plant Agrostemma githago L. *Planta* 149:269-273
- Khan AA (1968) Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. *Science* 125:645-646
- Kraulis PJ, Raine RC, Gadhavi PL and Laue ED (1992) Structure of the DNA-binding domain of zinc GAL4. *Nature* 356:448-450
- Laughon A and Gesteland RF (1984) Primary structure of the Saccharomyces cerevisiae GAL4 gene. *Mol Cell Biol* 4:260-267
- Leung DW and Bewley JD (1981) Immediate phytochrome action in inducing α -galactosidase in lettuce seeds. *Nature* 289:587-588

- Leung DW, Reid JSG and Bewley JD (1979) Degradation of the endosperm cell walls of Lactuca sativa L., cv. Grand Rapids in relation to the mobilization of proteins and the production of hydrolytic enzymes in the axis, cotyledons and endosperm. *Planta* 146:335-341
- Llewelyn DJ, Finnegan EJ, Ellis JG, Dennis ES and Peacock WJ (1987) Structure and expression of alcohol dehydrogenase 1 gene from Pisum sativum (cv. greenfeast). *J Mol Biol* 195:115-123
- Mayer AM, Krishmaro N and Poljakoff-Mayber A (1968) Isocitrate lyase and isocitric dehydrogenase in germinating lettuce. *Physiol Plant* 21:183-189
- Meyer AM, Mayer AM and Harel E (1971) Acid phosphatases in germinating lettuce - evidence for partial activation. *Physiol Plant* 24:95-101
- Murakami Y (1968) A new rice seedling test for gibberellins, microdrop method, and its use for testing extracts of rice and morning glory. *Bot Mag* 81:334-343
- Nakayama M, Yamane H, Yokota T, Yamaguchi I, Murofushi N, Takahashi N, Nishijima T, Katsura N, Nonaka M, Gaskin P, MacMillan J, Mander LN and Chu A (1990) Endogenous gibberellins in mature seeds of Raphanus sativus L. cv. Taibyosobutori. *Agric Biol Chem* 54:837-840
- Nakayama M, Yamane H, Murofushi N, Takahashi N, Mander LN and Seto H (1991) Gibberellin biosynthetic pathway and the physiologically active gibberellin in the shoot of Cucumis sativus L. *J Plant Growth Regul* 10:115-119
- Orlandini M, Barthe Ph and Bulard C (1984) Metabolism of $(\pm)2$ -[^{14}C]-abscisic acid in lettuce seeds germination. *Physiol Plant* 21:190-195
- Ou-Lee TM, Turgeon R and Wu R (1988) Interaction of a gibberellin-induced factor with the upstream region of an α -amylase gene in rice aleurone tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6366-6369

- Pan T and Coleman JE (1990) GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. Proc Natl Acad Sci USA 87:2077-2081
- Pearce D, Miller AL, Robert LW and Pharis RP (1987) Gibberellin-mediated synergism of xylogenesis in lettuce pith cultures. Plant Physiol 84: 1121-1125
- Phinney BO and Spray C (1982) Chemical genetics and the gibberellin pathway in Zea mays L. In: Wareing PF (ed) Plant growth substances. Academic Press, London, pp 101-110
- Rowland LJ and Strommer JN (1986) Anaerobic treatment of maize roots affects transcription of Adh1 and transcript stability. Mol Cell Biol 6:3368-3372
- Sakamoto A, Takeba G, Shibata D and Tanaka K (1990) Phytochrome-mediated activation of the gene for cytosolic glutamine-synthetase (GS₁) during imbibition of photosensitive lettuce seeds. Plant Mol Biol 15:317-323
- Sankhla N and Sankhla D (1968) Reversal of (±)-abscisin II-induced inhibition of lettuce seeds germination. Physiol Plant 21:190-195
- Shain Y and Mayer AM (1965) Proteolytic enzymes and endogenous trypsin inhibitor in germinating lettuce seeds. Physiol Plant 18:858-859
- Skriver K, Olsen FL, Rogers JC and Mundy J (1991) Cis-acting elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. Proc Natl Acad Sci USA 88:7266-7270
- Suzuki Y, Kuroguchi S, Murofushi N, Ota Y and Takahashi N (1981) Seasonal changes of GA₁, GA₁₉ and abscisic acid in three rice cultivars. Plant Cell Physiol 22:1085-1093
- Tanksley SD and Jones RA (1981) Effect of O₂ stress of tomato alcohol dehydrogenase activity: description of a second ADH coding gene.

Biochem Genet 19:397-409

- Toyomasu T, Yamane H, Yamaguchi I, Murofushi N, Takahashi N and Inoue Y (1992) Control by light of hypocotyl elongation and levels of endogenous gibberellins in seedlings of Lactuca sativa L. Plant Cell Physiol 33:695-701
- Waycott W, Smith VA, Gaskin P, MacMillan J and Taiz L (1991) The endogenous gibberellins of dwarf mutants of lettuce. Plant Physiol 95: 1169-1173
- Whittier R, Dean DA and Rogers JC (1987) Nucleotide sequence analysis of α -amylase and thiol protease genes that are hormonally regulated in barley aleurone cells. Nucl Acid Res 15:2515-2535
- Xie Y and Wu R (1989) Rice alcohol dehydrogenase genes: anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones. Plant Mol Biol 13:53-68
- Yamaguchi I, Nakagawa R, Kurogochi S, Murofushi N, Takahashi N and Weiler EW (1987) Radioimmunoassay of gibberellin A₅ and A₂₀. Plant Cell Physiol 28:815-824
- Yamaguchi I, Nakazawa H, Nakagawa R, Suzuki Y, Kurogochi S, Murofushi N, Takahashi N and Weiler EW (1990) Identification and semi-quantification of gibberellins from the pollen and anthers of Zea mays by immunoassay and GC/MS. Plant Cell Physiol 31:1063-1069
- 竹葉 剛 (1984) 「種子発芽のメカニズム」 植物の化学調節 19:91-101
- 辻 博子 (1988) 「レタス種子の光発芽機構の解明」 東京大学卒業論文
- 豊増知伸 (1991) 「レタスの初期生長における光制御機構に関する研究」 東京大学修士論文

謝 辞

本研究を行うにあたり、多くの方々の御指導、御助力を頂きました。ここに、厚く御礼申し上げます。

本研究中最高の研究の場を与えて頂きました東京大学農学部農芸化学科農薬学研究室の室伏 旭教授、ならびに山口五十鷹助教授に深く感謝致します。また、農薬学研究室の助手時代から、6年間にわたって直接ご指導して戴きました東京大学生物生産工学研究センターの山根久和助教授、共同研究者として東京大学理学部の講師時代から貴重な御助言を戴き、また困難な試料調製を行って下さった東京理科大学理工学部の井上康則助教授、この御二人の協力無しではこの論文は完成しませんでした。本当に心から感謝致します。そして、卒研究生として農薬学研究室に配属されたときの指導教官であられました高橋信孝東京大学名誉教授（現 理化学研究所理事）、ならびに当時農薬学研究室の講師で、現在は帝京大学理工学部の横田孝雄教授には絶えず激励して戴き、深く感謝致します。

東京大学農学部農芸化学科農薬学研究室の鈴木義人博士、中嶋正敏助手には貴重な御助言、御協力を戴きました。また、農薬学研究室の先輩に当たります理化学研究所の斎藤臣雄博士、梁 泳烈博士、ならびに帝京大学理工学部の中山真義博士にも貴重な御助言、暖かい激励を戴きました。この場をかりて厚く御礼申し上げます。

理化学研究所の三橋 涉博士、長谷あきら博士、富澤健一博士、安部 弘博士にも我々が苦手としている分子生物学の方面に関する知見、御助言を戴きました。心から御礼申し上げます。

以上の方々に加えて、以下の方々（次頁）の様々な御協力により本研究は行われました。厚く御礼申し上げます。

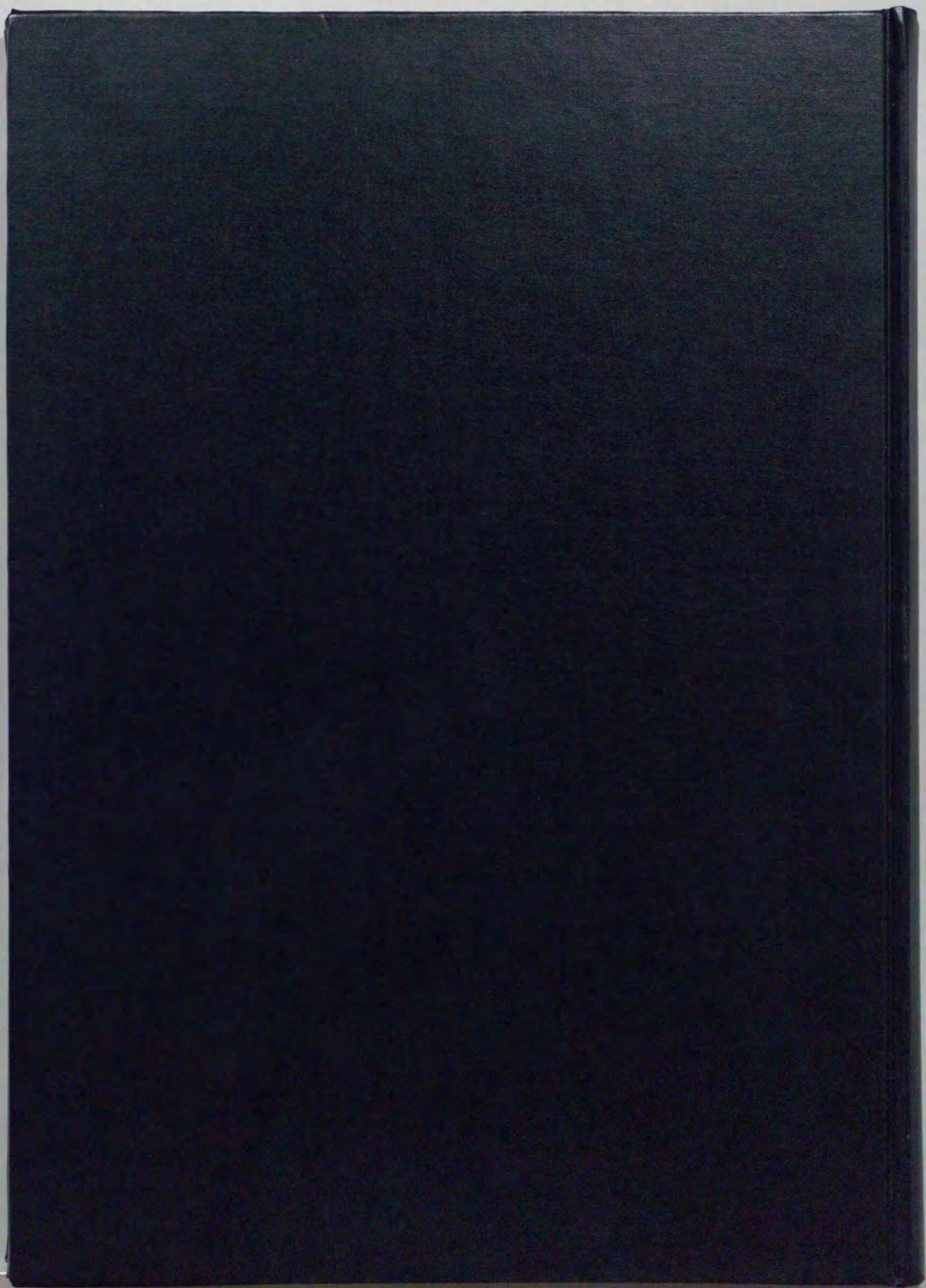
- ・吉田茂男博士（理化学研究所）： $[^2\text{H}]$ ABA の御供与
- ・Mander LN 教授（オーストラリア国立大学）： $[^2\text{H}]$ GGA の御供与
- ・中西友子助教授をはじめとする RI 管理室の皆様：RI の使用
- ・日高真誠博士（東大応用生命科学科
育種生産工学研究室）：イメージングアナライザーの使用
- ・東京大学農学部農芸化学科の以下の方々
荒井宗一教授，阿部啓子博士，
三坂 巧氏 他食糧化学研究室の皆様：超遠心器，ローターの貸
与及びホモロジー検索
上野川修一教授，鮎谷章夫助教授，
他畜産物利用学研究室の皆様：超遠心ローターの貸与
海老原 充博士（生物化学研究室）
ならびに岡本和子技官（機器分析室）：DNA シーケンサーの使用

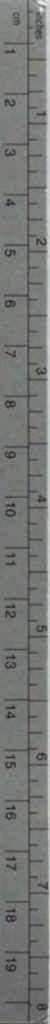
また，本研究の足場を築いて下さった辻博子氏（現 働長銀），
分子生物学的手法を一から伝授して戴いた山内忠幸氏，DNA のシー
クエンスにおいて協力して戴いた蝶野真喜子氏，丹羽倫平氏をはじ
めとする東大農芸化学科農薬学研究室の皆様，農業研に研究生とし
て来られた方々には，研究上は勿論，研究以外のことでもいろいろ
とお世話になりました，この場をかりて深く御礼申し上げます。

最後になりましたが，長い学生生活において学費，生活費を援助
して戴いた我が両親に感謝致します。

1994 年 3 月

豊 増 知 伸





Kodak Color Control Patches

© Kodak 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]
[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]

Kodak Gray Scale



© Kodak 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

