

アサガオ遺伝子ライブラリーの作製及び 花成誘導ペプチド遺伝子の単離の試み

久保浩義

信州大学理学部生物学科

(1992年8月31日受理)

はじめに

光周性を示す植物は、日長を葉で感受し、その情報を芽に伝達し花芽を形成する。この葉から芽への情報を伝達する物質として花成ホルモン（フロリゲン）の存在が示唆されているが、その正体は明らかではない。最近、竹葉ら（1990）により植物の水抽出物中に非常に低濃度でもアオウキクサに花芽形成を誘導することのできるペプチドが存在することが報告され、花成ホルモンがペプチドである可能性が示唆された。さらにアオウキクサ、アサガオおよびダイコンにおいて、このペプチドをコードする cDNA が単離されており（竹葉ら1992、久保1992）、その塩基配列は、各植物間で90%前後の高い相同性があることが示されている。またノーザン分析の結果から、この cDNA と相同性の高い少なくとも2種類の mRNA（0.6kb および2kb）がこれらの植物体内に存在することが示されている。本研究では、この遺伝子の機能をより詳しく調べるために、アサガオの遺伝子ライブラリーを作製し、そこからアサガオで得られている cDNA をプローブに用い、花成誘導ペプチドをコードする遺伝子を単離しその構造を解析することを目的とした。

材料及び方法

アサガオ (*Pharbitis nil*) の品種 Violet の種子を30分間濃硫酸で処理した後、よく水洗し発芽させ、展開した子葉を収穫し使用時まで -80°C で保存した。

ゲノム DNA の調製：アサガオ子葉約40g を液体窒素中でコーヒーミルおよび乳鉢により粉末状になるまで摩砕し、抽出バッファー（100mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM EDTA, 250mM NaCl）に懸濁した。終濃度1%となるようにサルコシルを加え、 56°C で5時間インキュベートした。つぎに、6000rpm で10分間遠心することにより不溶性画分を除き、上清に0.6容のイソプロパノールを加え -20°C で静置した。さらに2000rpm で10分間遠心し、沈澱した核酸を TE バッファー（10mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA）に溶かした。この溶液 1 ml に対し塩化セシウムを1.5g の割合で溶かし30分間氷上に静置した後、6000rpm で10分間遠心し不溶性の沈澱を除き200 μl の臭化エチジウムを加えさらに氷上に30分間静置した。6000rpm で10分間遠心した後上清を遠心管にいれ0.85g/ml の塩化セシウム溶液を上層し45000rpm で20時間遠心を行った（Beckman 80Ti ローター）。遠心後 DNA のバンドを注射器で抜き取り、2-ブタノールにより臭化エチジウムを除去し、エタノール沈澱を2回行った後、沈澱を TE バッファーに溶かし

ゲノム DNA 試料とした。

遺伝子ライブラリーの作製：ベクターのインサートとして適当な長さの DNA 断片を得るため、4 塩基認識の制限酵素 Sau3AI により DNA を部分分解し、フェノール抽出後、エタノール沈澱を行い DNA 断片を回収した。10—40%のショ糖密度勾配を作製し、TE に溶かした DNA を上層し 26000rpm で 20 時間遠心した (Beckman SW41 ローター)。遠心後分画し、適当な長さの DNA を含む画分からエタノール沈澱により DNA を回収し、calf intestine alkaline phosphatase により DNA を脱リン酸化し、ベクター (λ DASH II, ストラタジーン社) とライゲーションを行った。in vitro パッケージング (Gigapack Gold, ストラタジーン社) によりファージ粒子を形成させた後、大腸菌 P 2392 を宿主に用い増殖させ遺伝子ライブラリーとした。

スクリーニング：ファージのプラークが適当な密度になるようにシャーレにプレーティングし、プラークを形成させた。ファージ粒子をフィルターに移し取り、DNA をアルカリ変性した後、ベーキング (80°C, 2 時間) によりフィルターに固定した。プレウォッシング (3×SSC/0.1% SDS, 42°C, 40 分間) を 2 回繰り返す、42°C で一晩プレハイブリダイゼーション (50%ホルムアミド, 5×デンハート液, 5×SSPE, 0.1% SDS, 0.1mg/ml 変性サケ精巢 DNA) を行った後、プローブを加え 42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。³²P ラベルしたプローブは、アサガオの cDNA (pPK1) を鋳型にベリンガーマンハイム社のランダムプライム DNA ラベリングキットにより合成した。ハイブリダイゼーション終了後ウォッシング (3×SSC/0.1% SDS, 42°C, 40 分間) を 2 回繰り返す、オートラジオグラフィを行った。

サザンハイブリダイゼーション：ファージから DNA を回収し、種々制限酵素で分解後アガロースゲル電気泳動を行った。ゲルをアルカリ処理し DNA を変性させた後、プロットティングを行った。ベーキングにより DNA をフィルターに固定し、プレハイブリダイゼーション (50%ホルムアミド, 5×デンハート液, 5×SSPE, 0.1% SDS, 0.1mg/ml 変性サケ精巢 DNA) を行った。アサガオの cDNA (pPK1) を鋳型に³²P ラベルしたプローブを合成しハイブリダイゼーションを行い、ウォッシング (3×SSC/0.1% SDS, 42°C, 40 分間) を 2 回繰り返した後、オートラジオグラフィを行った。

遺伝子クローンのマッピング：ストラタジーン社のマッピングキットの使用説明書にしたがって行った。ゲノミッククローンを Not I で完全に分解し、フェノール抽出、エタノール沈澱を行なった後、滅菌水に溶かし種々制限酵素で部分分解しアガロースゲル電気泳動を行った。ゲルをアルカリ変性後フィルターにプロットティングし、ベーキングで DNA を固定した。アルカリフォスファターゼを結合したプローブとハイブリダイゼーションを行い、ウォッシングの後発光基質を用いて X 線フィルムを感光した。

結果及び考察

ベクター (λ DASH II) に挿入可能なインサートの長さは 9~23kbp であるため、サルコシル法により調製したゲノム DNA を制限酵素 Sau3A I で部分分解し、適当な長さのゲノム DNA 断片を得た。Sau3A I は 4 塩基認識の制限酵素であり、平均すると数百塩基対に一つの割合で切断部位があるため、比較的ランダムに切断された DNA 断片が得ら

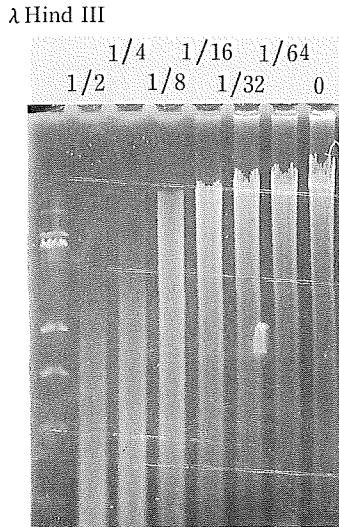


図1 Sau3AIによるゲノムDNAの部分分解。1 μgのDNAを1/2-1/64ユニットのSau3AIで部分分解した後、0.4%アガロースで電気泳動を行った。

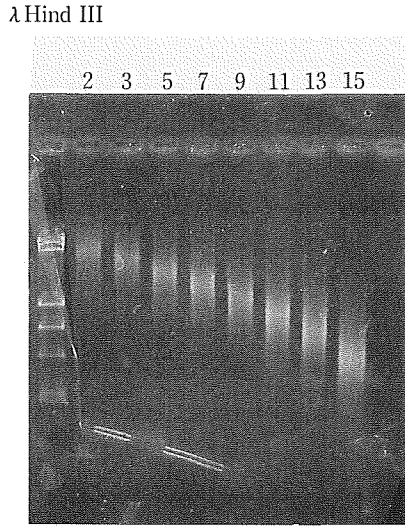


図2 部分分解したDNAのショ糖密度勾配による分画。番号はフラクションナンバーを示す。

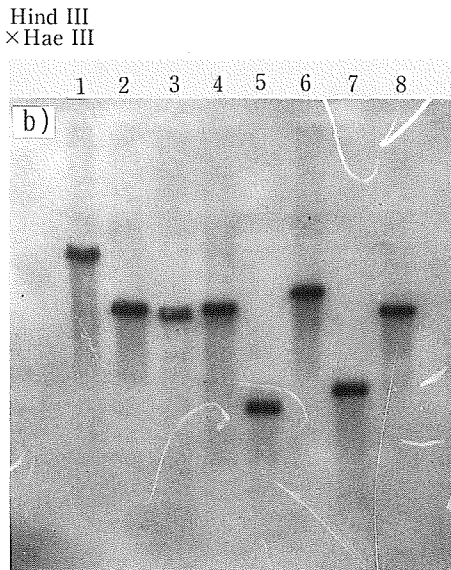
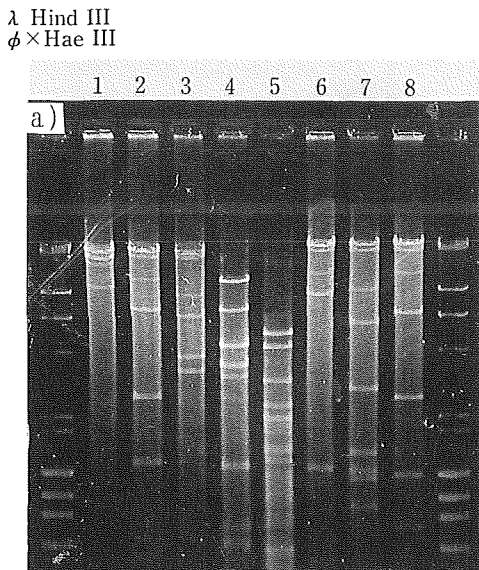


図3 PG5クローンのサザンハイブリダイゼーション。各種制限酵素で分解した後、0.8%アガロースで電気泳動を行った。a) 臭化エチジウムによる染色 b) pPK1をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション。1. ApaI, 2. BamHI, 3. EcoRI, 4. EcoRV, 5. HincII, 6. HindIII, 7. SalI, 8. SacII

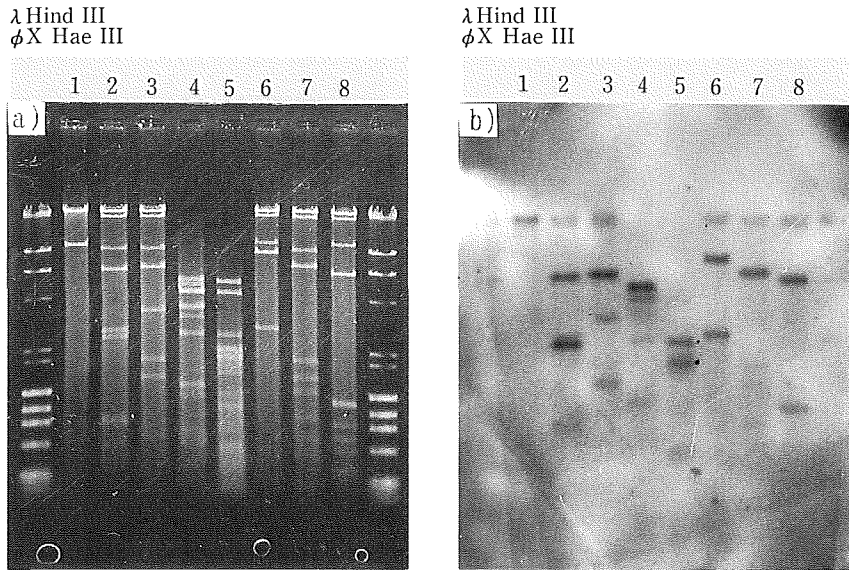


図4 PG7 クロンのサザンハイブリダイゼーション。a) 臭化エチジュウムによる染色 b) pPK1 をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション。制限酵素の順番は図3と同じ。

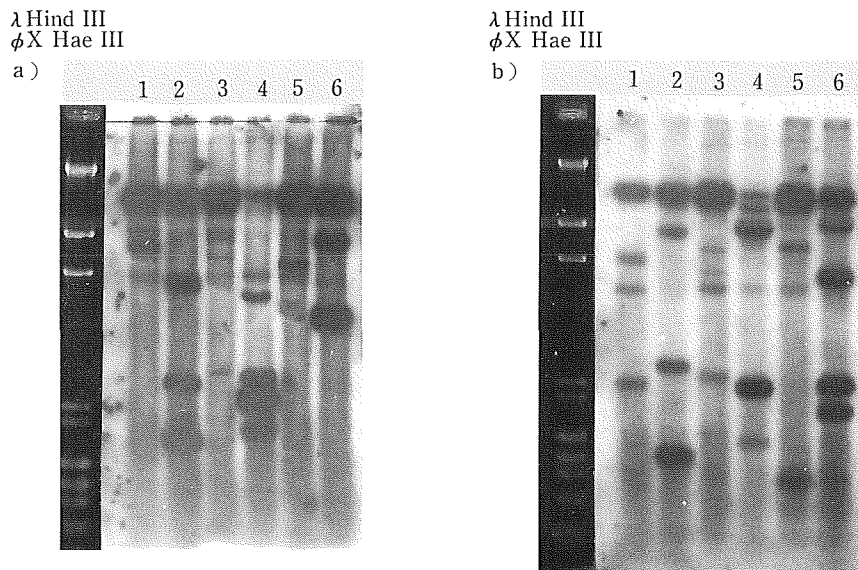


図5 PG5 クロンの各種制限酵素による部分分解。各種制限酵素で部分分解を行った後、0.8%アガロースで電気泳動を行った。a) λ DASHII の T3 プロモーター配列をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。b) λ DASHI I の T7 プロモーター配列をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。1. BamHI, 2. Sall, 3. SacI, 4. SacII, 5. XbaI, 6. XhoI

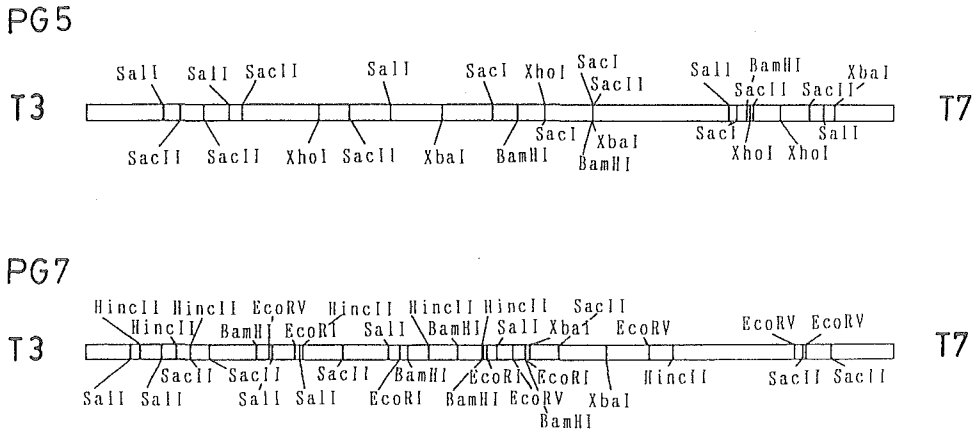


図6 PG5 クローンおよびPG7 クローンの制限酵素切断地図

れる。また切断末端が GATC となり, BamH I で切断したベクターのアームとライゲーションが可能である。まず部分分解の条件を決めるため, 1 μ g の DNA に対し 1/2—1/64 ユニットの制限酵素を用い 37°C で 30 分間反応させ, 0.4% アガロースで電気泳動を行った (図 1)。1 μ g の DNA に対し 1/8 ユニットの制限酵素を用いた場合に適当な大きさの DNA 断片が得られたが, よりランダムな DNA 断片を得るため複数の切断条件 (1/4—1/32 ユニットの制限酵素/ μ gDNA) で部分分解を行うこととした。

Sau3A I で部分分解したゲノム DNA を 10—40% のショ糖密度勾配遠心にかけて後約 300 μ l ずつ分画し (図 2), 15—20kbp の長さの DNA 断片を含むフラクション (2—5) から DNA を回収した。CIP 処理によりゲノム DNA の両端を脱リン酸化した後, BamH I /Hind III でダブルダイジェストしたベクターとライゲーションを行った。in vitro パッケージングによりファージ粒子を形成させ, タイトレーションを行ったところ, 組換えファージ数が約 42 万であった。

アサガオの cDNA (pPK1) をプローブに用いスクリーニングを行ったところ, いくつかのクローンがプローブと反応した。反応がみられた部分のファージを増殖させ DNA を回収し, 種々制限酵素で切断後, 0.8% アガロースゲルにより電気泳動を行った。スクリーニングに用いたものと同じプローブを用いサザンハイブリダイゼーションを行ったところ, 2 つのクローンがプローブと反応する DNA 断片を含んでいた。図 3 および 4 にそれらのクローン (PG5 および PG7) のサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。

サザンハイブリダイゼーションでプローブと反応した 2 つのクローンについて制限酵素切断地図を作製した。インサートを Not I で切り出し種々制限酵素で部分分解した後, λ DASH II のクローニングサイトに隣接する T3 および T7 プロモーター配列に対するプローブを用いハイブリダイゼーションを行った (図 5)。サザンハイブリダイゼーションの結果と併せて考えると, PG5 クローンでは, プローブが反応する部分は T3 および T7 プロモーターから 3—6kbp 付近である。また PG7 クローンは T7 プロモーターから 3kbp 付近と反応したが, T3 プロモーターから 3kbp 付近でも弱く反応がみられた (図 6)。

制限酵素切断地図の結果(図6)からみると得られた2つのクローンは別々のものであると考えられる。しかし現在のところ、まだこれらのクローンがcDNAライブラリーから得られているクローン(pPK1, pPK2)に対応する遺伝子であるかどうかは明らかでない。今後、プローブと反応する部分の塩基配列を調べこれらのクローンが花芽形成を誘導するペプチドの遺伝子であるかどうかを確かめることが必要である。

摘 要

アサガオ(品種 Violet)の遺伝子ライブラリーを作製し、花成誘導ペプチド遺伝子の単離を試みた。サルコシル法によりゲノムDNAを調製し、 λ DASH IIをベクターに用い遺伝子ライブラリーを作製したところ組換えファージ数が約42万のライブラリーが作製された。アサガオのcDNA(pPK1)をプローブにこのライブラリーをスクリーニングしたところ、2種類のクローンが得られた。各々のクローンについて制限酵素切断地図を作製した。

謝 辞

本研究を行うにあたってご助力ご助言をいただいた京都府立大学生生活科学部の竹葉剛助教授に深く感謝いたします。またアサガオのcDNAをいただいた京都大学農学部の木崎暁子氏に感謝いたします。

引 用 文 献

- 久保浩義(1992) アオウキクサ花成誘導ペプチドcDNAのダイコンからの単離及びその解析について。信州大学理学部紀要27:7-13
- Takeba, G., Nakajima, Y., Kozaki, A., Tanaka, O., and Kasai, Z. (1990) A Flower-inducing substance of High Molecular Weight from Higher Plants. *Plant Physiol.* 94:1677-1681.
- 竹葉 剛, 木崎暁子, 木戸 毅(1992) ペプチドによる植物の花成誘導機構 植物の化学調節 27:80-89

Construction of genomic library and isolation of gene coding for flower-inducing peptide in *Pharbitis nil*.

Hiroyoshi KUBO

Department of Biology, Faculty of Science, Shinshu University

(Received August 31, 1992)

Abstract

A genomic library for *Pharbitis nil* was constructed. Genomic DNA was prepared by Sarcosyl method and cloned into λ DASH II vector. The library contained about 420 thousand different clones. The library was screened with *Pharbitis* cDNA clone (pPK1) as probe to isolate the gene coding for flower-inducing peptide. Two positive clones were obtained and the restriction enzyme maps of these two clones were determined.