

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

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

植物の花芽形成誘導は、日長、温度、栄養条件等、種々要因によって制御されている。そのうち日長により花芽形成が制御されている場合においては、日長は葉で感じ取られ、その情報が芽に伝えられて花芽が形成される。この情報を伝達する物質（フロリゲン）の存在が1930年代に示唆されて以来、多くの研究者によってフロリゲンの単離が試みられてきたが、いまだにその実体は不明である。最近、滝本ら（1989）により植物体の水抽出物中に、ごく微量でアオウキクサに花芽を誘導する物質が存在することが明らかにされた。さらに竹葉ら（1990）により、植物体の水抽出物中に存在する高分子性のペプチドがアオウキクサの花芽形成を誘導することが明らかにされ、ペプチド性の花成誘導物質の存在が示唆された。さらに、ペプチドのアミノ酸配列の情報をもとに合成したオリゴヌクレオチドをプローブに用いて、そのペプチドをコードする遺伝子の cDNA がアオウキクサから単離され塩基配列が決定されている（木戸ら1991）。このような花成誘導ペプチド遺伝子が、アオウキクサ以外の植物にも存在するかどうかは興味深い問題である。

本研究で用いたダイコンは、種子の時期に低温処理を行うことで花芽形成が誘導される品種で、短日植物のアオウキクサとは異なった花芽形成誘導機構を持っていると考えられる。そこでアオウキクサで得られている cDNA をプローブに用いてダイコンからその cDNA を単離し、低温要求性のダイコンと短日植物のアオウキクサの間で比較した。

材料及び方法

本研究に使用した材料は低温で花芽形成が誘導されるダイコン (*Raphanus sativus* L.) の品種ミノワセダイコンである。種子を土に蒔き、出てきた子葉を収穫し、使用時まで -80°C で保存した。

全 RNA の調製：子葉 15g を液体窒素中でコーヒーマルを用い粉末にし、GIT バッファー (4M グアニジンチオンアネート, 5mM クエン酸ナトリウム (pH7.0), 0.1M メルカプトエタノール, 0.5% サルコシル) に懸濁した。6000rpm で15分間遠心後、上清をキムワイプで濾過し、上清 1ml につき塩化セシウムを 0.4g の割合で溶かした。あらかじめ 2ml の 5.7M 塩化セシウムを入れた遠心チューブにこの溶液を上層し、Beckman SW41 ローターを用いて 30000rpm で20時間遠心した。遠心管の底に沈澱した RNA を TE-SDS に溶かし、クロロフォルム：ブタノール (4 : 1) で 2 回抽出した後、エタノール

沈澱として RNA を回収し全 RNA とした。

ポリ (A)⁺RNA の調製：3.5mg の全 RNA を 5ml の溶出バッファー (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mMEDTA, 0.1% SDS) に溶解し、65 °C で 5 分間処理した後氷冷した。0.8ml の 5M 塩化ナトリウムと 1.2ml の oligotex-dT30 を加え 37 °C で 5 分間保温し、ポリ (A)⁺RNA を oligotex-dT30 に吸着させた。15000rpm で 10 分間遠心し沈澱を回収した後、同じ操作をもう一度繰り返した。得られた沈澱に溶出バッファーを加え、65 °C で 5 分間保温し oligotex-dT30 から RNA を溶出した。上清を回収し、フェノール抽出を 2 回繰り返した後、エタノール沈澱として RNA を回収した。SDS を除くためにエタノール沈澱を繰り返し、cDNA 合成用のポリ (A)⁺RNA 試料とした。

cDNA 合成：cDNA 合成は、ファルマシア社の cDNA 合成キットの使用説明書にしたがって行った。2 μ g のポリ (A)⁺RNA を 65 °C で 10 分間保温した後、逆転写酵素により第一鎖合成を行った。次に、DNA ポリノラーゼ I により第二鎖合成を行い、さらに Klenow Fragment により両端を平滑末端にした。T4DNA リガーゼにより両端に EcoRI アダプターをつけた後、スパンカラムで未反応のアダプターを除き、両端をリン酸化し、 λ gt11 ベクターとライゲーションを行った。ストラタジーン社の *in vitro* パッケージングキット Gigapack GOLD を用いパッケージングを行い、形成されたファージを増殖させ cDNA ライブラリーとし 4 °C に保存した。

スクリーニング：シャーレに適当な濃度となるようにファージをプレーティングし、プラークを形成させた後、フィルターにファージ粒子を移し取った。アルカリ処理で DNA を変性させた後、80 °C で 2 時間ベーキングを行い DNA をフィルターに固定し、プレウォッシング (3xSSC/0.1% SDS, 65 °C, 40 分間) を 2 回行った。42 °C で一晚プレハイブリダイゼーション (20%ホルムアミド, 5x デンハルト液, 5xSSPE, 0.1% SDS, 0.1mg/ml 変性サケ精巢 DNA) を行った後、³²P でラベルしたプローブを加え 42 °C で一晚ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション用のプローブはベリンガーマンハイム社のランダムプライム DNA ラベリングキットの使用説明書にしたがって行った。鋳型 DNA としてはアオウキクサで得られている cDNA (pLK1) を用いた。鋳型 DNA を熱変性させた後、dNTP 混合液, reaction mixture, ³²P-dCTP, Klenow enzyme を加え、1 時間反応させた後、エタノール沈澱により未反応の ³²P-dCTP を除去しプローブとした。ハイブリダイゼーションの後、ウォッシング (3xSSC/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ーを行った。

サブクロニング：スクリーニングにより単離したファージから DNA を回収し、EcoRI によりインサート DNA を切り出した後、プラスミド (Bluescript SK⁺または KS⁺) のマルチクロニングサイトの EcoRI サイトに結合し、大腸菌 MV1184 を用いて形質転換を行った。

ノーザンハイブリダイゼーション：全 RNA をホルムアミドで変性し、ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルで泳動を行った。RNA をフィルターに移しベーキングを行った後、42 °C で一晚プレハイブリダイゼーション (20%ホルムアミド, 5x デンハルト液, 5xSSPE, 0.1% SDS, 0.1mg/ml 変性サケ精巢 DNA) を行った。アオウキクサの cDNA (pLK1) を鋳型とし ³²P でラベルしたプローブを合成し、42 °C で一晚ハイブリダ

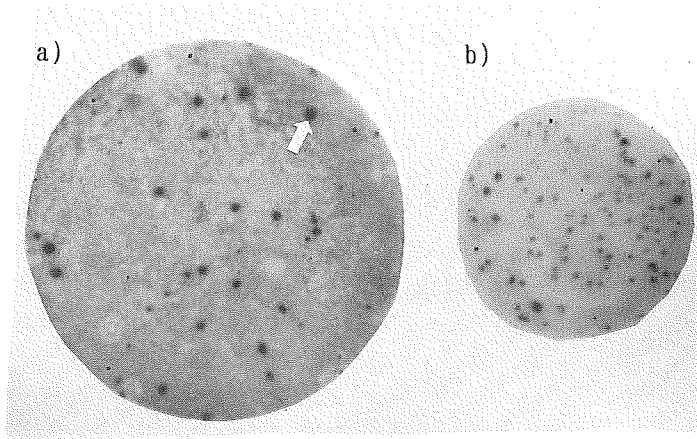


図1 a) 一次スクリーニングでみられたシグナルの一例。アオウキクサのcDNA (pLK1) をプローブにハイブリダイゼーションを行った後、ウォッシング (3xSSC/0.1% SDS, 42°C, 40分間) を2回繰り返し、オートラジオグラフィーを行った。b) 二次スクリーニング。一次スクリーニングでシグナルのみられた部分 (矢印) のフェージに対し二次スクリーニングを行った。ハイブリダイゼーション、ウォッシングの条件は一次スクリーニングと同じ。

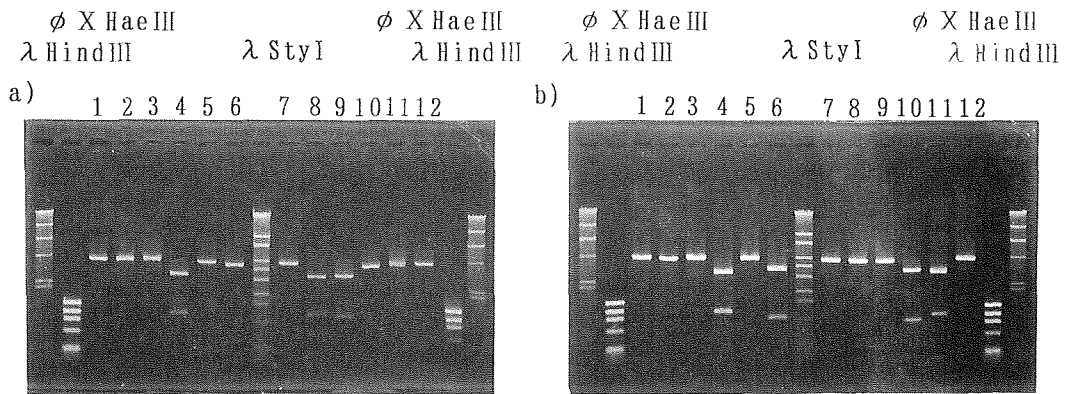


図2 pRK4の制限酵素による切断。1.1kbpのcDNAが挿入されたプラスミド (pRK4) を種々制限酵素で切断した。a) と b) はプラスミドとのライゲーションの時にインサートがお互いに逆向きに挿入されたものである。1. *Apal*, 2. *KpnI*, 3. *PstI*, 4. *EcoRI*, 5. *EcoRV*, 6. *HincII*, 7. *SmaI*, 8. *XhoI*, 9. *XbaI*, 10. *SacI*, 11. *SacII*, 12. *BamHI*

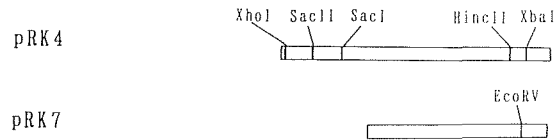
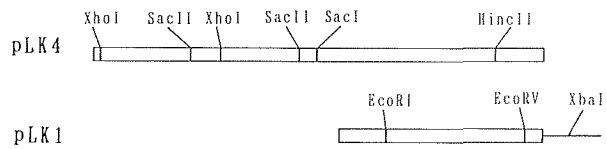
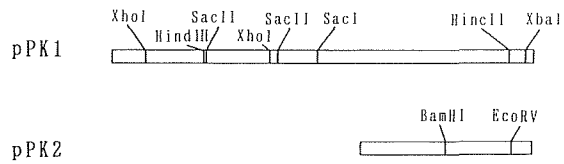
Raphanus sativus L.Lemna paucicostata 441Pharbitis nil

図3 pRK4およびpRK7の制限酵素切断地図。
比較のためにアオウキサ及びアサガオで得られたcDNAの制限酵素切断地図も示す
(竹葉ら 1992)。

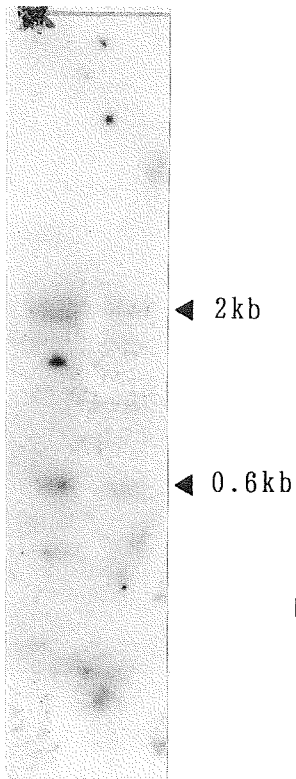


図4 ノーザンハイブリダイゼーション。アオウキサのcDNAをプローブにハイブリダイゼーションを行った後、ウォッシング(3xSSC/0.1% SDS, 42°C, 45分間)を2回繰り返し、オートラジオグラフィーを行った。

イゼーションを行った。ウォッシング (3xSSC/0.1% SDS, 42°C, 45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。

結 果

組換えファージ数が約40万のcDNAライブラリーが作製された。このライブラリーを15のロットに分け、各ロットごとに1次スクリーニングを行った。直径15cmのシャーレに約3万のファージをまき、フィルターに写し取った後、アオウキクサから得られたcDNAをプローブにハイブリダイゼーションを行った。図1aはその一例を示したものである。シグナルが見られた部分のファージのプラークを寒天ごと打ち抜き、ファージ希釈用のバッファーで適当な濃度になる様に希釈し2次スクリーニングを行った(図1b)。2次スクリーニングでもシグナルの見られたプラークを24種類選び、その部分のファージを増殖させてDNAを回収した。制限酵素MluIでDNAを切断しインサートの長さ確かめ、そのうちで最も長い1.1kbpのインサートをもったクローンおよび、0.6kbpのインサートをもったクローンの2種類について調べることとし、それぞれをプラスミドにサブクローンし、以後の実験に用いた。

図2は1.1kbpのインサートをもったクローンのDNAを各種制限酵素で切断した時の図である。aとbはプラスミドとのライゲーション時にインサートがお互いに逆向きに挿入されたものである。調べた12種類の制限酵素のうち、XhoI, SacI, SacII, HincII, XbaIについては切断部位が存在したが、他の酵素に対する切断部位は見られなかった。同様に0.6kbpのインサートをもつファージのクローンからDNAを回収し同じ制限酵素で切断したところ、EcoRVでのみ切断された。図3は、制限酵素で切り出されたDNA断片の長さから制限酵素切断地図を作製したものである。

得られたcDNAがfull lengthであるかどうかを確かめるためノーザンハイブリダイゼーションを行った。アオウキクサのcDNA(pLK1)をプローブに用いハイブリダイゼーションを行ったところ、約2kbと0.6kbの位置にバンドがみられた(図4)。この事より、生体内にはこのcDNAと相同性の高い約2kbと0.6kbの少なくとも2種類のmRNAが存在することが示唆された。

考 察

作製したライブラリーはやや小さいものであったが、アオウキクサのプローブと反応する多数のシグナルがみられた。ノーザンハイブリダイゼーションの結果からみると、1.1kbpのcDNA(pRK4)は2kbのmRNAの一部に相当すると考えられる。0.6kbpのcDNA(pRK7)に関しては、ノーザンハイブリダイゼーションで見られた0.6kbのバンドに相当する可能性が考えられる。しかし、このcDNAの塩基配列を調べてみるとポリA鎖や翻訳開始点と思われる配列が見あたらないため、このクローンも完全な形ではないと思われる。さらに、pRK7と相同性の高いアオウキクサのpLK1のfull lengthが約2kbpである事が確かめられていることより、pRK7のfull lengthも2kbp程度である可能性も考えられる。さらにスクリーニングを行いfull lengthのcDNAを取ることが必要であると思われる。

ダイコンの cDNA をアオウキクサやアサガオの cDNA と比較すると、制限酵素切断地図のパターンがよく似ており、相同性の高さを予測させる (図3)。データは示していないが塩基配列を決定し比較してみたところ、各植物間で90%前後の相同性がみられた。またアミノ酸レベルではかなりの部分で完全に一致した。ダイコン、アオウキクサ、アサガオと系統的にそれほど近くない植物間でこれほど高い相同性がみられる事は興味深いと思われる。

花成誘導ペプチドがアオウキクサに花芽形成を引き起こす場合には、ペプチドの大部分はペプチダーゼで切り取られ、その一部分のみが作用すると考えられている (竹葉ら1992)。すなわち、このペプチドのかんりの部分は花芽形成の誘導には直接関与しておらず、その部分ではアミノ酸配列が保存されている必要はないように思われる。それにも関わらずこの cDNA が異種植物間で高い相同性を示すことを考えると、この cDNA をコードしている遺伝子が花芽形成誘導以外にもなんらかの機能をもっている可能性が考えられる。今後、この遺伝子がどのような組織で、まだどのような条件で発現するかなどを調べる必要があると思われる。

摘 要

花成誘導に対し低温要求性を示すダイコンの品種ミノワセダイコンの芽生えから cDNA ライブラリーを作製し、アオウキクサに花芽形成を誘導するペプチドをコードする cDNA の単離を試みた。アオウキクサで取られている cDNA (pLK1) をプローブにスクリーニングを行ったところ長さが 1.1kbp と 0.6kbp の2種類のクローンが得られた。それぞれのクローンに対する制限酵素切断地図を作製したところ、ダイコンで得られたクローンはアオウキクサやアサガオで得られているものとよく似た制限酵素切断パターンを示した。アオウキクサの cDNA をプローブに用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、2kb 及び 0.6kb の位置にバンドがみられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり多大のご助力、ご助言をいただいた京都府立大学生活科学部の竹葉剛助教授に深く感謝いたします。また、実験にあたりご助力をいただいた京都大学農学部の木崎暁子氏、近畿大学農学部の木戸毅氏、伴隆之氏に感謝いたします。

引 用 文 献

- 木戸 毅・木崎暁子・田中 修・葛西善三郎・竹葉 剛 (1991) アオウキクサ花成誘導ポリペプチド cDNA の単離と構造解析。日本植物学会第56回大会研究発表記録：p280
- 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
- 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.
- Takimoto, A., Kaihara, S., Hirai, N., Koshimizu, K., Hosoi, Y., Oda, Y., Sakakibara, N. and Nagakura, A. (1989) Flower-inducing activity of water extract of *Lemna*. *Plant Cell Physiol.*

30 : 1017-1022.

Isolation of cDNA clones for flower-inducing peptide in *Raphanus*

Hiroyoshi KUBO

Department of Biology, Faculty of Science,
Shinshu University

(Received August 31, 1992)

Abstract

Complementary DNAs coding for flower-inducing peptide were isolated from a cDNA library of *Raphanus* seedling. The cDNA library was screened by using the *Lemna* cDNA clone (pLK1) as a heterologous probe. From the positive plaques, two plaques were purified and each insert DNA was subcloned into plasmid (pRK4 and pRK7). The restriction enzyme maps for pRK4 and pRK7 had similar pattern to those for pLK4 and pLK1 obtained from *Lemna*, respectively. Northern hybridization analysis showed that *Raphanus* seedling contained two kinds of mRNAs (0.6kb and 2kb in length) which hybridized with *Lemna* cDNA (pLK1).