

1. 研究テーマ

高等植物における細胞分裂と生理機能の制御機構の分子遺伝学的解析

2. 代表者名

応用生物科学科 助手 安積良隆

3. 研究プロジェクトメンバー

学内：神奈川大学	理学部	応用生物科学科	助手	安積良隆
神奈川大学	理学部	応用生物科学科	教授	鈴木秀穂
学外：名古屋大学	生命分子応答研究センター		助教授	山口淳二
明治大学	農学部	農学科	講師	川上直人

4. 概要

生き物は成長するために細胞分裂し細胞増殖しなければならない。しかしそれも植物の場合にはその時期が適切でなければならない。移動能力のある動物の場合は受精と同時に発生を開始し、できるだけ速やかに成長することが生き残るためにもっとも大事なことといえる。しかし移動能力のない植物の場合は適切な時期に発生や成長をしなければ、枯死する運命が待ち受けている。成長に不利な時期を耐え、生き残るために、植物は発生や成長の時期を制御したり、種子を形成して休眠する。そして適当な時期が到来すると発芽し発生を開始する。生殖を行うために花を形成するのにも時期が大切である。さらに植物に特有な現象であるがセネッセンスと呼ばれる現象がある。これは環境がその植物の成長に不適切で個体を維持するのが困難であったり不利であったりする場合に、その個体の一部あるいは大部分の生理機能を低下させたり枯死させたりし、環境が回復するのを待つというものである。このように植物はその生活環の様々な場面で細胞分裂や生理機能の調節を行っている。我々は i) 種子の発芽の誘導機構、ii) 栄養成長から生殖成長への転換（花器官形成）の誘導機構、iii) 緑葉におけるセネッセンスの誘導機構の3つの現象に着目し分子遺伝学的手法を用いて解析を行う。

5. 結果

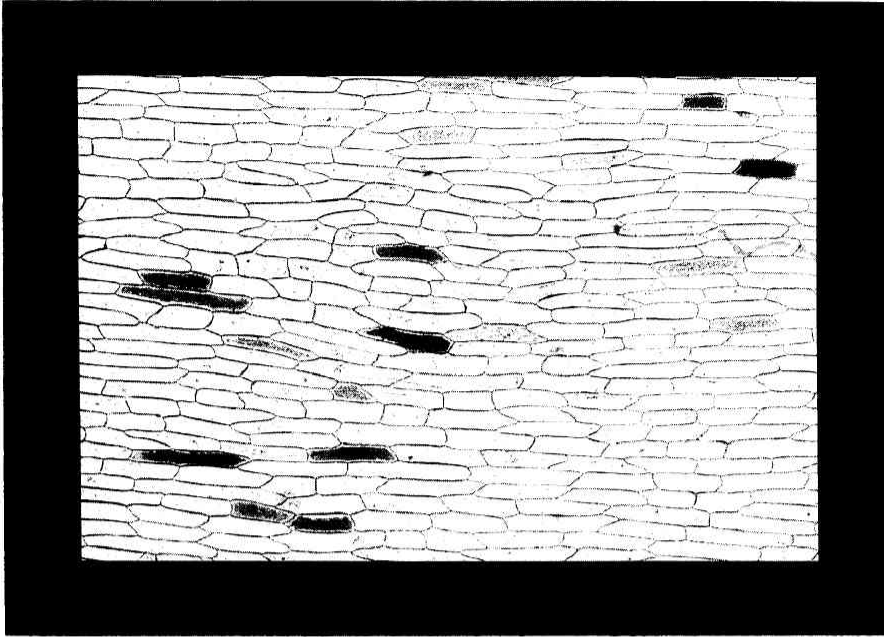
i) 植物は種から発芽して細胞分裂を開始するのに必要なエネルギーを胚乳中にでんぷんなどの高分子化合物中の化学エネルギーの形で蓄え、発芽時にはこれをアミラーゼ等の酵素によってグルコースのような低分子量物質に分解した後代謝することによって利用する。稲の発芽後の成長に、エネルギー代謝を調節するアミラーゼの働きは非常に重要でいつどこで発現するべきかを厳密に制御されていなければならない。アミラーゼの遺伝子はアブシジン酸やジベレリンといった植物ホルモンや糖濃度によって発現が調節されていることが知られている。しかしこれらの因子による制御が分子機構については知られていない。本年度、アミラーゼ遺伝子の発現の制御機構について調べた結果、アミラーゼ遺伝子は組織によってこれらの因子に対して異なる反応を示すことを明らかにすることができた。種子中、アミラーゼ遺伝子は胚の細胞で合成されたジベレリンによって誘導されエピセリウム細胞およびアリユロン層で発現する。しかしエピセリウムではグルコースなどの糖によって発現が抑制される

にもかかわらず、アリュロン層では糖では発現が抑制されないことが判明した。さらにこの糖による抑制はジベレリンやアブシジン酸を介して起こるのではなく、別の情報伝達経路が存在する可能性が示唆された。また *in situ hybridization* によってアリュロン層におけるアミラーゼ遺伝子の発現は胚近くから徐々に起こることを発見した。これは胚近くのでんぷんから順次エネルギー源として利用されるよう調節されていることを示している。

ii) 生殖は自分の遺伝情報を子孫に伝える非常に重要な行為である。これも適切な環境下で行われるよう制御されていなければ、その個体が受け継いできた遺伝情報は絶えてしまう。植物にとっては花が生殖器官であり、花の各器官の形成過程は関心を集め多くの研究がなされた。その結果ホメオティック遺伝子がクローン化され、細胞が花のがく、花弁、雄しべ、雌しべのどの器官になるかを決定する遺伝子が解析されるようになった。しかし現在のところまだ生殖細胞を形成する過程については研究は進んでいない。そこで我々は卵の形成過程を標的にして、まず雌しべで特異的に発現している遺伝子をクローニングすることにした。昨年度よりディファレンシャルディスプレイ法によって、葉では発現せず雌しべや花では発現する遺伝子のPCR産物の確認を行ってきた。昨年度の5個に加え、本年度もさらに5個のPCR産物を確認することができた。花全体、雌しべ、葉から調製したRNAから逆転写酵素を用いて作製したcDNAを鋳型としてPCRを行い、それに対して各PCR産物から合成したプローブをハイブリダイズさせ、各遺伝子の発現量の違いを確認したところ、C-20-13は全く葉では発現せず、雌しべにきわめて特異性が高いことが判明した。現在まだこの遺伝子の機能は不明であるが、その機能や発現の調節機構を解明することは雌しべ、そしてそこにつくられる卵の形成過程を調べるのに大きな手がかりとなるのではないかと考えられる。

iii) 植物は環境の悪化などに対応するために、成長を停止し細胞の生理機能を低下させ、自らの一部あるいは全体を枯死させる(セネッセンス)という戦略を進化の途上、発達させた。しかしこの戦略も発動する場所時期を間違えれば植物体全体に崩壊をもたらす危険性がある。そのためこの現象に関わる遺伝子の発現は正確に制御されている必要があると考えられるが、これに関する分子遺伝学的な研究は、動物の世界で近年始められたアポトーシスと呼ばれる計画された死に関する研究に触発され、始められたばかりである。我々はこれまでの研究によりハツカダイコンより緑葉のセネッセンス時に発現する遺伝子 *din1* を単離することに成功し、この遺伝子の解析を行っている。現在までにこの遺伝子は細胞中の糖濃度を感知し、これを通じて葉のもっとも重要な任務である光合成が正常に機能しているかどうかを判断することがわかっている。もし光合成能が低下し細胞の糖含量が減少すれば、その葉は植物にとって負担になっていると裁定を下され、セネッセンスを開始しその葉を枯死させられる。この糖の濃度を感知するシステムを解明するため、様々な長さの *din1* 遺伝子上流域をGUSリポーター遺伝子上流に連結してキメラ遺伝子を作製し、これをタバコに導入して形質転換体を準備した。レポーター遺伝子の発現量を調べたところ、遺伝子上流609塩基対以上を有する場合には強い発現が認められ、417塩基対より少ない場合には発現が認められないことが明らかになった。このことをさらに詳しく調べるため、遺伝子銃を用いることが可能かどうかを検討した。遺伝子銃を用いた実験は形質転換体を作製する実験に比べ非常に短い時間で結果が得られる。*din1* の上流802塩基対まで含むキメラ遺伝子は遺伝子銃で打ち込まれたとき強く発現したが (Fig.1A)、417塩基対までしか含まないものは同時に打ち込んだGFP遺伝子は発現しているにもかかわらず、発現していなかった (Fig.1B)。遺伝子銃を用いた実験でも形質転換体を用いた場合と同様の結果が得られ、遺伝子銃の有効性が実証されたので、遺伝子上流802塩基対から417塩基対の間をさらに細かく遺伝子銃を用いて解析を行っている。

β -glucuronidase (802*din1*-GUS gene)



GFP (35S-GFP gene)

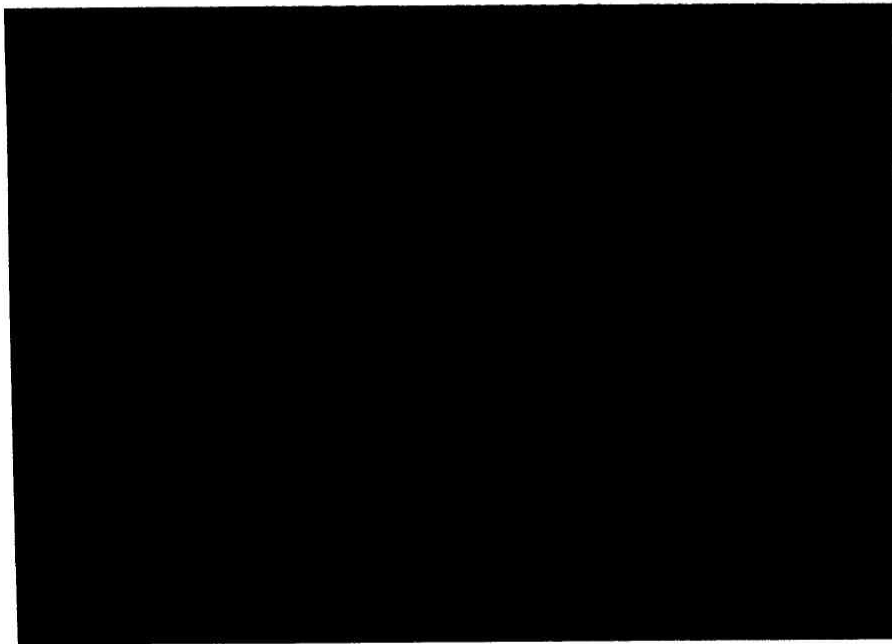
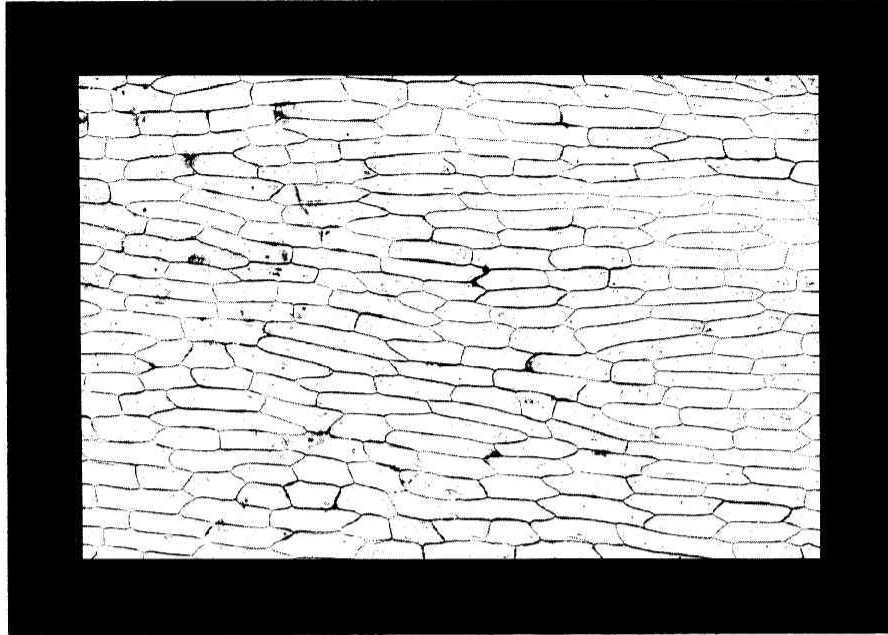


Fig. 1A. β -glucuronidase and GFP in epidermis cells of onions, into which 802*din1*-GUS gene and 35S-GFP gene were co-delivered by particle bombardment. β -glucuronidase was expressed from 802*din1*-GUS fusion gene, which was driven by *din1* upstream region from +7 to -802 bp from transcription start site. For standardization, 35S-GFP fusion gene was co-delivered, which expressed GFP under control of cauliflower mosaic virus 35S promoter.

β -glucuronidase (417*din1*-GUS gene)



GFP (35S-GFP gene)

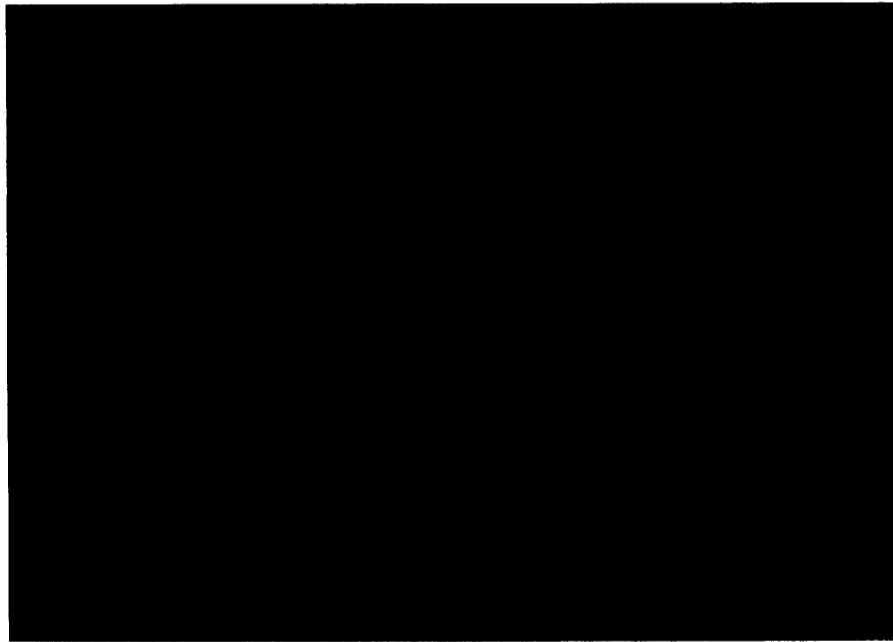


Fig. 1B. β -glucuronidase and GFP in epidermis cells of onions, into which 417*din1*-GUS gene and 35S-GFP gene were co-delivered by particle bombardment. β -glucuronidase was expressed from 417*din1*-GUS fusion gene, which was driven by *din1* upstream region from +7 to -417 bp from transcription start site. For standardization, 35S-GFP fusion gene was co-delivered, which expressed GFP under control of cauliflower mosaic virus 35S promoter.

6. 研究発表

i) 学会発表

Yoshitaka Azumi, and Hideho Suzuki (1997) FLOWER ORGAN-SPECIFIC GENES OF A, THALIANA INDICATED BY DIFFERENTIAL DISPLAY. 5th International Congress of Plant Molecular Biology

Pierdomenico Perata, Chiaki Matsukura, and Junji Yamaguchi (1997) SUGAR REPRESSION OF GIBBERELLIC ACID-INDUCED α -AMILASE GENES IN BARLEY SEEDS: POSSIBLE CROSSTALK BETWEEN HORMONE AND SUGAR REGULATION OF GENE EXPRESSION. 5th International Congress of Plant Molecular Biology

ii) 論文発表

Pierdomenico Perata, Chiaki Matsukura, Paolo Vernieri, and Junji Yamaguchi (1997) Sugar Repression of a Gibberellin-Dependent Signaling Pathway in Barley Embryos. *Plant Cell*, 9, 2197-2208.

Noriko Sugimoto, Genkichi Takeda, Yasuo Nagato, and Junji Yamaguchi (1998) Temporal and Spatial Expression of the α -Amilase gene during Seed Germination in Rice and Barley. *Plant Cell Physiol.*, 39, 323-333