

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780030

研究課題名（和文） レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いた花卉内組織別遺伝子発現解析

研究課題名（英文） Analysis of gene expression in the cells isolated by laser capture microdissection from different petal tissues

研究代表者

原田 太郎（HARADA TARO）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・共同研究員

研究者番号：80468256

研究成果の概要（和文）：レーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより、カーネーション花卉から表皮組織、柔組織および維管束から細胞を単離し、組織間での遺伝子発現の違いを明らかにした。また、マクロアレイ解析により、花卉屈曲部柔細胞の向軸側と背軸側との間での遺伝子発現の違いを明らかにした。脂質輸送タンパク質をコードする遺伝子 *DcLTP1* は花卉腋部表皮において比較的高い発現レベルを示す一方で、屈曲部花卉柔組織では向軸側で発現が顕著であった。

研究成果の概要（英文）：Cells from epidermis, parenchyma and vascular bundles were isolated from carnation petals by laser capture microdissection and differential gene expression among these petal tissues was demonstrated. In addition, differential gene expression between adaxial and abaxial sides of parenchyma in a bending zone of carnation petals was revealed by macroarray analysis. One gene encoding lipid transfer protein (*DcLTP1*) showed relatively high expression level in blade epidermis, while its expression was higher in the adaxial side of parenchyma from the bending zone.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2011 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花卉，カーネーション，開花，遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

花きの観賞期間の延長するために、花卉をゆっくり開かせることが有効であるとの考え方があり、開花速度を制御するための技術が期待されている。開花には花卉生長に伴い、花卉細胞の肥大生長に関与すると考えられる細胞壁の構築や糖質による浸透圧調節などの生理過程が注目されているが、花卉生長

の分子機構に関する知見は少ない。研究代表者らはこれまでに、カーネーション開花花卉で発現する 200 種類以上の遺伝子を単離し、花卉生長への関与が推察されるいくつかの遺伝子の発現変動と花卉の形態変化との関連を明らかにしていた。その中には、表皮におけるワックス形成や柔組織における細胞肥大、維管束における細胞壁構築過程など、

花卉を構成する組織の機能との関連が推察される遺伝子が多く含まれていた。これらの遺伝子の発現組織を明らかにすることで、花卉内組織が花卉の伸長や展開などの形態変化において果たす役割に関する手がかりが得られるのではないかとこの着想に基づき、本研究を行った。

2. 研究の目的

(1) 組織ごとに細胞を単離し、RNA を抽出して遺伝子発現を解析することができるレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 技術を用いて、花卉から細胞を回収し、RNA を抽出する実験系を確立する。

(2) 花卉から表皮、柔組織および維管束を構成する細胞を回収し、遺伝子発現レベルを組織間で比較することにより、花卉における遺伝子発現の組織特異性を実証する。

(3) 開花を特徴づける形態変化である花卉の屈曲に関与する遺伝子を明らかにするために、花卉屈曲部の向軸側と背軸側との間で発現レベルの異なる遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LCM を用いて、イネ種子の解析事例を参考にして、カーネーション ‘ライトピンクバーバラ’ の展開期花卉上部 (舷部) 中央から細胞を回収し、良質の RNA を得ることを目指す。

(2) これまでに研究代表者により単離された遺伝子の中で組織機能との関連が予想される複数の遺伝子について、リアルタイム RT-PCR により表皮、柔組織および維管束の間で発現レベルを比較する。

(3) 展開期花卉屈曲部柔細胞を向軸側と背軸側とに分けて回収するとともに、データベースに登録されているすべての EST を対象としたカスタムアレイを作製し、それらを用いたマクロアレイ解析により向軸側と背軸側との間で発現レベルの異なる遺伝子を探索する。

4. 研究成果

(1) 5 mm 角程度のカーネーション花卉切片を未固定の状態に 3%カルボキシメチルセルロースに包埋して凍結した後、クリオスタットを用いて凍結切片を作製して、LCM により細胞を回収した。細胞はバッファー中で凍結保存し、その後微量 RNA 抽出キットによる RNA 抽出に供した。RNA の量・品質は、バイオアナライザを用いた電気泳動により分析した。切片融解から細胞回収までの時間を極力短くすること (数分程度)、実験室内の温度を高温になり過ぎないように注意することなどが、RNA の分解を防ぐために必要であった。続いて微量 RNA を適用可能な cDNA 増幅

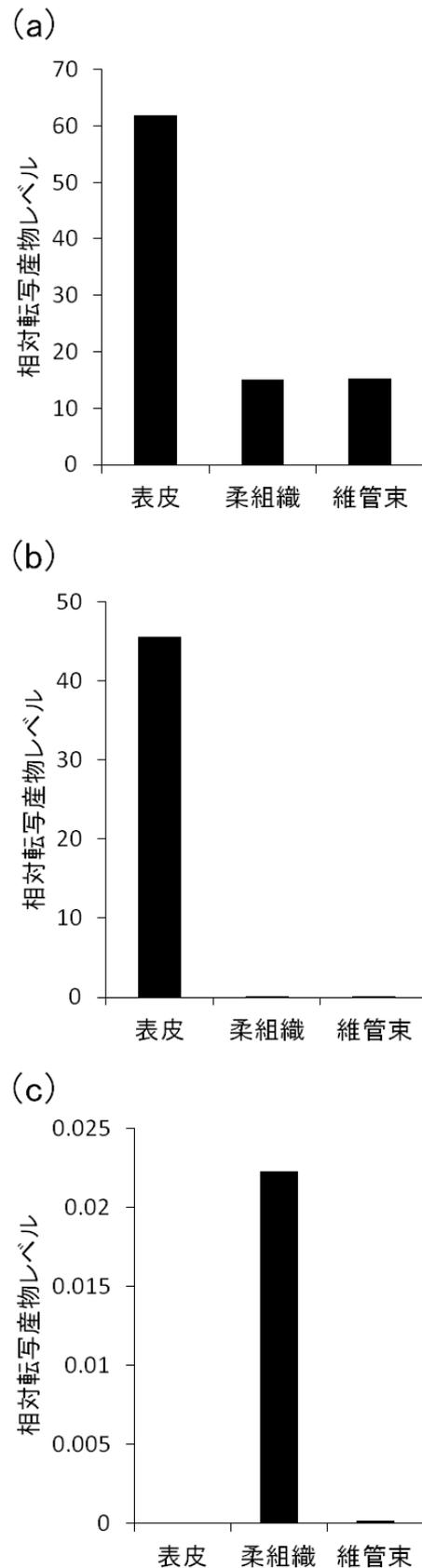


図1 *DcLTP1* (a), *DcLTP2* (b) および *DcPIP* (c) の転写産物レベルの比較 (内部標準としてユビキチン遺伝子を使用, n=3)

キットにより、RT-PCR およびマクロアレイ解析に用いるのに十分な量の cDNA を合成した。これらのことから、市販の試薬類を用いて、LCM 解析を花卉細胞に適用できることが明らかになった。

(2) 脂質輸送タンパク質 (LTP) をコードする遺伝子 (*DcLTP1*, *DcLTP2*) および原形質膜アクアポリンをコードする遺伝子 (*DcPIP*) の発現レベルの組織間での比較を行った。*DcLTP1* および *DcLTP2* はいずれも転写産物レベルが表皮で顕著に高く、柔組織に比べそれぞれ約 4 倍、630 倍であった (図 1)。*DcPIP* は柔組織で転写産物レベルが高く、表皮に比べ約 1620 倍であった (図 1)。これらの結果から、展開期花卉腋部において、遺伝子の発現に組織特異性が見られることが明らかになった。なお、現段階では、維管束で特異的に発現する遺伝子を同定するには至っていない。発現レベルがより低い他の複数の遺伝子について、今後解析を進める予定である。

(3) マクロアレイ解析により、展開期花卉屈曲部柔細胞の向軸側と背軸側との間で遺伝子の転写産物レベルを比較した。実験は独立したサンプルを用いて 2 反復行った。向軸側と背軸側との間で転写産物レベルの大小関係が反復間で逆転したものを除いて結果を集計したところ、カーネーション由来の 646 件の cDNA (一部同一遺伝子由来の配列が複数の異なる cDNA 断片として登録されているものも含まれている) のうち、転写産物レベルが背軸側に比べ向軸側で 3 倍以上高いもの (①) が 28 個、3 倍未満のもの (②) が 51 個、向軸側に比べ背軸側で 3 倍以上高いもの (③) が 6 個、3 倍未満のもの (④) が 342 個見いだされた (表 1)。このことから、展開期花卉屈曲部柔細胞において、背軸側でやや多く発現するものが大部分を占めているが、一部向軸側で顕著に発現する遺伝子も存在し、発現に軸性があることが明らかになった。

表 1 向軸側と背軸側との間で転写産物レベルの違いに基づく遺伝子の分類

| | 比率 | |
|---------|-------|---------|
| | 3 倍以上 | 1~3 倍未満 |
| 向軸側/背軸側 | 28 | 51 |
| 背軸側/向軸側 | 6 | 342 |

また、偏差生長による花卉屈曲との関連が予想される①のグループの中には、*DcLTP1* および *DcLTP2* の他、オーキシン内向き輸送体をコードする遺伝子が含まれていた。リアルタイム RT-PCR による解析の結果、*DcLTP1* の転写産物レベルは背軸側に比べ向軸側で約 200 倍高いことが明らかになった (図 2)。*DcLTP2* の転写産物レベルについては、向軸側と背軸側との間で顕著な差が見られないものの、向軸側で高い傾向が見られた。

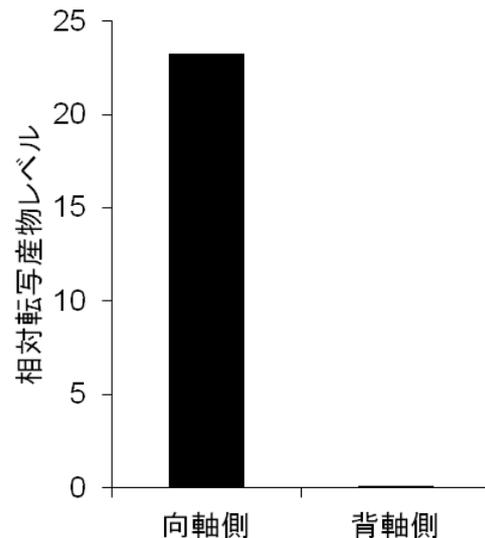


図 2 *DcLTP1* の転写産物レベルの比較 (内部標準としてユビキチン遺伝子を使用, n=3)

本研究は、LCM を用いて花卉内組織レベルで遺伝子発現解析を行う方法を示した初めての事例である。今回解析に用いたのは腋部および屈曲部という花卉内の限られた部位であり、細胞が液胞に富むためか、表皮細胞、柔細胞の回収効率は高くはないと思われた。花卉下部 (爪) や縁辺部、開花ステージ初期の花卉を用いた場合にはより高い回収効率が見込めるのではないかと考えており、今後の検討が望まれる。

DcLTP1, *DcLTP2* については、研究開始当初までに解析していた遺伝子の中で開花花卉での発現レベルが比較的高く、また既往の知見から表皮で発現することは想定しており、今回顕著な発現の組織特異性を示す遺伝子の事例として明確に示すことができた。*DcLTP2* に比べ、*DcLTP1* は柔組織と表皮の間での発現レベルの差が小さく、屈曲部柔組織では向軸側で顕著に発現していることから、LTP 遺伝子ファミリーのメンバーの間でも発現様式が異なり、*DcLTP1* は表皮だけでなく、柔組織の機能との関連が強いことが推察された。LTP については、他の植物において防御応答やワックス形成に関与することが示唆されているが、花卉における機能は不明である。LTP と細胞壁伸展性との関連を示す報告もあることから、花卉生長における LTP の機能とその局在に関してさらに追究する必要があると考える。

本研究で得られた成果は、花卉での遺伝子発現における組織特異性および軸性に関する新たな知見を加えるものであり、開花過程における花卉内組織機能の解明に寄与し、園芸学的、植物生理学的に重要な意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 太郎 (HARADA TARO)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・共同研究員

研究者番号：80468256