

**シロイヌナズナ cDNA マイクロアレイを用いた
光環境応答および器官特異的発現の系統的解析**

安藤 候平

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学講座

(横田 明穂 教授)

平成 16 年 1 月 8 日提出

目次

緒論	3
第 1 章 シロイヌナズナ均一化 cDNA ライブラリーを適用した cDNA マイクロアレイ実験系の構築 (第 1 章 図表	6 19)
第 2 章 器官特異的遺伝子発現の系統的解析 (第 2 章 図表	28 39)
第 3 章 光環境応答の系統的遺伝子発現解析 (第 3 章 図表	60 76)
総括	92
謝辞	95
参考文献	96
論文目録	106

緒論

植物は動物と異なり移動することができない。その生活は環境に極めて強く依存している。そのため、周囲の環境の変化に最大限の機能発現を示して適応する。そして、種子形成、発芽、栄養生長、生殖の過程である生活環を刻んで行く。植物に関する人間の関心は、食物としての植物という認識からだと考えられる。古くは弥生時代の農耕の始まりとともに、日本の人々は、植物の特性を知る必要性があった。植物がどのような場所で生育し、どのような条件で実を結び、収穫を多くするには、どのような土壌を与えれば良いのか、そして収穫物を保存するにはどのようにすれば良いのかという知見である。つまり、農耕の始まりとともに植物の性質と機能を知り、それをコントロールすることを目的とした植物の研究が始まったといえる。

植物の性質、機能を知る上で、数限りなく存在する植物種から、研究に扱いやすく、植物の特性を普遍的に持つ植物を選択し、研究を進めていくことが重要である。その中でも、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、アブラナ科に属する双子葉植物であり、実験室内において、2 ヶ月程度で次世代の種子を得ることができ、真の2倍体 ($2n=10$) で既知の高等植物の中で最も小さなゲノムサイズ (約 130 Mbp) であることから、植物の分子遺伝学研究のモデル植物として利用されている。また、植物研究においては穀物などの農業植物が重要視されているが、世代時間の長さ、倍数性やゲノムサイズなどの様々な問題があり、ミヤコグサのような一部の例外を除いて分子遺伝学の対象にはなりにくい。そのような背景の中で、シロイヌナズナは、これらの問題点がない顕花植物であり、進化的にも植物としての基本的な性質 (生長、開花、栄養要求、耐病、耐害虫性など) が穀類、マメ類などの産業植物と共通しており、その遺伝的制御も類似していると考えられることから、産業面での利用性も高く、学術的立場のみならず欧米の企業も有用遺伝子単離や発現制御機構の解明のために、研究材料として使用されてきた(Meinke et al., 1998)。

2000年12月には、日本、米国、欧州による国際共同プロジェクトによって、セントロメアリピート領域と rDNA クラスター領域を除くゲノム中のユニーク部分の 118.7 Mbp のシロイヌナズナゲノム構造解析が終了した(The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。シロイヌナズナゲノム上には、25,907 のタンパク質遺伝子と 614 の tRNA 遺伝子が同定された。タンパク質遺伝子のうちの約 55% が既知のタンパク質遺伝子と相同性を示した。その結果、DNA 複製、DNA 修復、翻訳などに機能分類される遺伝子は、他の真核生物の遺伝子と高い保存性を示す一方、転写調節因子を含む転写のカテゴリーや代謝のカテゴリーでは保存性が低くなる傾向があった。さらに、シロイヌナズナの特徴として、線虫、ショウジョウバエの2倍以上に相当する 1,709 の転写調節因子が同定された。他の生物種から比べると明らかに高い割合を示す転写因子の存在は、植物特有の発生、分化、形態形成、高い環境適応性、二次代謝産物合成系に裏打ちされていると考えられている(Riechmann and Ratcliffe, 2000)。言い換えれば、植物特有の現象を解明するためには、転写因子による制御を調べるのが有効な

アプローチであるとも考えられる。

ゲノム塩基配列決定により、存在が明らかにされた遺伝子が多数ある。しかしながら、それら遺伝子の個々の特徴、機能については、実験的に証明しなければならない。現在、ゲノムに記されている遺伝情報を解明しようとする研究は新しい段階に入ろうとしている。そして、従来の生化学的、遺伝学的手法ではなしえなかったゲノム規模での包括的なアプローチによる遺伝子の機能解析が可能となってきた。これには、転写レベルの全体像を調べるトランスクリプトーム解析、タンパク質レベルの全体像を調べるプロテオーム解析、代謝系全体を調べるメタボローム解析が挙げられる。特にトランスクリプトーム解析は、(1) cDNA のランダムシーケンス法による頻度情報の記録、(2) ディスプレイ法、(3) ディファレンシャルハイブリダイゼーション法、(4) 定量的 PCR の 4 種類の技術に大別される。頻度情報の記録は、Digital expression profiling、Serial analysis of gene expression (SAGE)などの技術が挙げられる(Audic and Claverie, 1997; Velculescu et al., 1995)。ディスプレイ法は、ディファレンシャルディスプレイ、分子インデックス、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)などに代表される(Liang and Pardee, 1992; Ito, 1994; Kato, 1995; Vos et al., 1995)。ディファレンシャルハイブリダイゼーションは、マクロアレイ、マイクロアレイ、オリゴヌクレオチドチップが急速に広がったことで、現在普及が著しい技術である (Hoheisel and Lehrach, 1993; Lockhart, et al., 1996; Wodicka, et al., 1997; Schena, et al., 1995)。定量的 PCR は、リアルタイム PCR、Adapter Tagged Competitive PCR (ATAC-PCR)により、網羅的な発現プロファイル解析に耐える技術となった (Ponchel et al., 2003; Kato, 1997)。シロイヌナズナゲノム構造解析の結果から、転写レベルの全体像を捉えるトランスクリプトーム解析は、植物特有の現象を解明するための解析法として、適した方法であると考えられ、これまでの個別解析では明らかにできなかった知見を得ることが可能であると期待される。

本研究論文では、ゲノム規模での包括的なアプローチによる遺伝子発現解析を行うことで、「植物の遺伝子発現ネットワーク図」を作成し、これまでの個別解析では明らかにできなかった知見を得ることを目的としている。そこで、トランスクリプトーム解析を基盤とした技術の構築を行い、植物の分子応答機構の解明を目指した。具体的には、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、EST(Expression Sequence Tags)解析、マイクロアレイ解析、定量的 PCR 技術を利用した系統的な遺伝子発現解析を行うことで、植物の器官における遺伝子発現の特異性、光環境応答における遺伝子発現の動態から、植物の分子生理機構を考察した。

第 1 章では、シロイヌナズナ由来の均一化 cDNA ライブラリーを利用した効率的な EST の収集を行い、それら由来のクローンを用いて、cDNA マイクロアレイ実験系の構築を行った。第 2、3 章では、第 1 章で構築した cDNA マイクロアレイ実験系を利用し、「遺伝子発現プロファイル」を作成することで、植物の分子応答機構の解明を目指した系統的な遺伝子発現解析を行った。第 2 章では、植物の器官における遺伝子発現の特異性を解析することで、植物器官の全体像を捉えた。また、器官特異的発現

遺伝子を同定した。第3章では、光環境応答における網羅的な遺伝子発現解析を行うことで、系統的な遺伝子発現解析によって示される Molecular Phenotype(分子表現型)(Perez-Amador et al., 2001)と生理現象に即した従来の表現型である Physiological Phenotype(生理表現型)の相関性を示した。さらに、生理表現型では見られない分子生理機構について考察した。

第 1 章

シロイヌナズナ均一化 cDNA ライブラリーを適用した cDNA マイクロアレイ実験系の構築

序論

シロイヌナズナは、遺伝子の総数が 26,000 程度である。わずか 26,000 程度の遺伝子ならば、cDNA からのアプローチによって、植物の発生、分化、形態形成、環境に対する応答性などの様々な現象を「植物の遺伝子ネットワーク」として解明することが可能ではないかと考えられる。そのことを踏まえ、我々のグループでは、シロイヌナズナ由来 cDNA からのアプローチを進めている(Takemura et al., 1999; Hyodo et al., 2000)。cDNA からのアプローチを進める上で、EST クローンの収集が重要である。現実には、GenBank 登録されているシロイヌナズナの EST データも 196,988 シーケンスという膨大なデータ量が蓄積されている

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)。しかし、EST を収集していく上での問題として、従来の cDNA ライブラリー由来の解析であると、発現レベルの比較的高い cDNA クローンの重複が増して、解析を進めれば進めるだけ、新規 EST を見出す頻度が低下する。この問題を解決するためには、重複頻度の低い cDNA ライブラリーを解析することである。この重複頻度の低い cDNA ライブラリーが均一化 cDNA ライブラリーである。通常の cDNA ライブラリーでは、発現量や mRNA サイズなどの違いに起因し、cDNA 種の存在比が大きく異なる。一方、均一化 cDNA ライブラリーでは、発現量の少ない cDNA 種と発現量の多い cDNA 種をほぼ均一に存在させる均一化操作を加えている。このため、発現する遺伝子を発現量に依存せず同等に扱え、非常に効率良く様々な種類の EST を獲得することができる(Ko, 1990; Patanjali, et al., 1991; Asamizu, et al., 2000)。

EST を効率的に収集することで、様々な発現遺伝子の配列情報を獲得することができる。それら配列情報、獲得クローンを利用することで、系統的な遺伝子発現解析システムを構築することが可能である。系統的な遺伝子発現解析システムを構築するに当たり、緒論で述べたトランスクリプトーム解析に当てはめると、獲得したクローンを全て利用し、1 枚のメンブレン、スライドガラス上で系統的な発現解析が行えるマイクロアレイ、マイクロアレイが適用しやすいと考えられる。その中でも特にマイクロアレイ技術に注目した。そして、均一化 cDNA ライブラリーを適用した cDNA マイクロアレイ実験系の構築を行った。

DNA マイクロアレイは 1995 年に米国スタンフォード大学の Brown らのグループによって開発されて以来、急速に展開し、医学、薬学、農学、生物学などの研究分野で注目されている技術である。DNA マイクロアレイの基本原理は、非常に単純であり、従来のノザンプロットやサザンプロットと同様、相補的な核酸同士のハイブリダイゼーションに基づく検出法である。まずスライドガラスなどの基板上に異な

るプローブ DNA をピン方式またはインクジェット方式によるアレイヤーを用いて、高密度にスポッティングした DNA マイクロアレイを作製する。次に細胞や組織から抽出した mRNA や全 RNA から逆転写反応を行い、この際に蛍光色素で標識した cDNA を合成する。この蛍光標識した cDNA をターゲット DNA と呼ぶ。蛍光色素としては Cy3 と Cy5 が良く使われており、二蛍光標識法が一般的である。このターゲット DNA をマイクロアレイ上で競合的ハイブリダイゼーションを行うことで、サンプル間での遺伝子発現の違いを相対的に比較することができる(Schena, et al., 1995)。最近では、大規模な市販のオリゴ DNA アレイなどが販売され、凄まじい技術進歩を遂げている(Duyk, 2002)。

本章では、ゲノム規模での包括的なアプローチによる遺伝子発現解析を行うことで、これまでの個別解析では明らかにできなかった知見を得ることを目指し、トランスクリプトーム解析の基盤技術構築を行った。具体的には、シロイヌナズナを材料として、器官、組織別（花序茎頂、栄養生長期茎頂、根、葉）均一化 cDNA ライブラリー由来の cDNA マイクロアレイを作製し、様々な発現プロファイルを作成するための実験系を確立した（図 1-1）。

まず、器官、組織別の均一化 cDNA ライブラリーを作製した。次に、均一化 cDNA ライブラリー由来のランダムシーケンスを行い、約 10,000 クローンの塩基配列を決定後、クラスタリングを行い、重なりを省き、それらクローンを整列保存した。さらに整列保存後のクローンを鋳型として PCR 産物を調製し、それらをポリ陽イオン処理したスライドガラス上に配列し、cDNA マイクロアレイを作製した。その際、cDNA マイクロアレイ実験系の条件検討が必要と考えられたため、整列保存クローンの一部を使ったテストアレイの作製を行った。実験系を評価するために、近年までに詳細に解析され、知見が多い塩ストレス現象を例として扱った(Seki et al., 2002)。そして、テストアレイでの条件検討を行い、基本的な実験系構築を行った。

材料と方法

大腸菌株 (*Escherichia coli*)

器官、組織別均一化 cDNA ライブラリー作製をする際に、TOP10F'(Genotype:F' {lac^q,Tn10(Tet^R)}mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔ M15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7962 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG)、DH5α(Genotype:F' φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17(rK⁻;mK⁺) recA1 endA1 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λ)、2種類の大腸菌株に形質導入を行った。

植物材料

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* は、エコタイプ、Columbia を用いた。葉、栄養生長期茎頂は、土を入れた育苗箱へ播種し、22℃、白色連続光下の人工気象室で、播種後 10-14 日経った植物体より採取した。根は、1/2MS 液体培地の入った三角フラスコに無菌播種し、暗所で、14 日間、振とう培養を行ったものより採取した。

塩ストレス処理の植物体は、滅菌したナイロンメッシュに乗せた 1% ショ糖を含む 1.2% 寒天 MS 培地上に滅菌種子を播種後、白色連続光下の人工気象室で 2 週間栽培し、植物体を上に乗せたナイロンメッシュごとピンセットで持ち上げ、250 mM NaCl を含む液体 1/2MS 培地に浸し、5 時間処理を行った。

均一化 cDNA ライブラリーの作製

全 RNA 調製にはセパゾール RNA(Nippon Genes, Tokyo)を用いた。その後、DNase I 処理を行った(Promega, USA)。約 500 μg の全 RNA からオリゴテックス(dT)₃₀(Takara, Kyoto)を用いて mRNA 調製を行った。次に、2 μg の mRNA を用いて、cDNA を合成後、Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 法により均一化操作を行った(Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996)。均一化操作には PCR-Select cDNA Subtraction Kit(Clontech, USA)を使用し、実験操作は、添付プロトコールに従った。その際のテスターcDNA とドライバーcDNA を同一分子にすることによって均一化操作を行った。Advantage PCR Cloning Kit(Clontech)を使用し、均一化操作での最終的な PCR 産物の TA クローニングを行い、cDNA のクローン化をした。その後、大腸菌 TOP10F'、または DH5α株に形質導入を行い、青白コロニー選抜後、白コロニーについて 96 穴タイタープレートを用いてグリセロールストックの状態、整列保存をした。

シロイヌナズナ均一化 cDNA ライブラリー由来クローンの塩基配列の決定

既存の花序茎頂、今回作製の葉、栄養生長期茎頂、根由来の均一化 cDNA ライブラリーについてのランダムシーケンスを行った。シーケンス鑄型調製のため、PCR 産物の調製を行った。10 μl の 10 × ExTaq PCR Buffer、8 μl の 2.5mM dNTPmix、2 μl の 10 μM M13 Forward primer、2 μl の 10μM Reverse primer、0.35 μl の ExTaq DNA polymerase(5 units/μl, Takara)に滅菌水を加え、100 μl の反応系にした。さらに、整列保

存してあるグリセロールストックから大腸菌液 1.5 μ l を反応液に加えて、PCR 反応を行った。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C -1 分、55 $^{\circ}$ C -1 分、72 $^{\circ}$ C -1 分を 30 サイクルで行った。反応後、10 μ l を別の 96-PCR プレートに移し、シーケンス鋳型調製用のサンプルとした。

PCR 産物 10 μ l に対して、0.1 μ l の Exonuclease I(10 units/ μ l, Amersham Biosciences, USA)、0.1 μ l の Shrimp Alkaline Phosphatase(2 units/ μ l, Amersham Biosciences)を加えて、37 $^{\circ}$ C で 30 分、その後 81 $^{\circ}$ C で 30 分の反応を行い、シーケンス鋳型を調製した。シーケンス反応系は、2 μ l の Dye Terminator mixture(Applied Biosystems, USA)、1 μ l の 1 μ M M13 Forward primer に滅菌水を加え 4.3 μ l にし、0.7 μ l の酵素精製したシーケンス鋳型を反応液に加え、シーケンス用 PCR 反応を行った。シーケンス用 PCR 反応は、96 $^{\circ}$ C -10 秒、50 $^{\circ}$ C -5 秒、60 $^{\circ}$ C -4 分を 30 サイクルで行った。シーケンス反応サンプルを Sephadex G-75(Amersham Biosciences)により精製した。精製法は、Multiscreen N45(Millipore, USA)に G-75 樹脂を詰め、300 μ l の滅菌水を加えて、樹脂を膨潤化した。その後、樹脂から水を抜き、水抜きした G-75 樹脂にシーケンス反応サンプルをアプライした。そして、3,000 rpm、10 分の遠心を行い、溶出した。溶出したサンプルに適量の滅菌水 (Run1 : 5 μ l、Run2 : 10 μ l、Run3 : 15 μ l、Run4 : 20 μ l) を加えて、95 $^{\circ}$ C で 3 分の熱変性操作を行った。その後、ABI PRISM 3700 DNA Analyzer(Applied Biosystems)により解析を行った。

シーケンスデータの解析

3700 アナライザーにより解析したシーケンスデータの解析を、DNA SPACE Ver.3.7(Hitachi software, Tokyo)を用いて行った。まず、3700 アナライザーからの text 形式シーケンスデータを FASTA 形式に変換し、適切なベクターの切断部位と 5'側の 100 塩基、3'側の 500 塩基を無条件で切断させたシーケンスデータの質を判断させた。質は、トリミングしたシーケンスデータ中の N の頻度が 1 割以下のシーケンスデータを解析可能と判断した。そして、解析可能と判断されたシーケンスをデータベース化し、それらのシーケンスを集めたローカルデータベースを構築した。構築したローカルデータベースに対して、ローカルデータベース化した全てのシーケンスに関して、BLASTN 検索を行い、重複を調べた。BLASTN の設定値は、E-Value が 0.0001 以下、Score が 100 以上の設定にした。さらに、シーケンスデータのアノテーションを付けるために、GenBank データベースに対する BLASTN、BLASTX プログラムによる検索を行った。

DNA マイクロアレイの作製

DNA マイクロアレイ用のプローブ DNA を調製するために、塩基配列決定の鋳型調製と同じ 100 μ l の PCR 反応系を用いた。その PCR 産物に 10 μ l の 3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)、100 μ l のイソプロパノールを加えて、攪拌した。そして、-20 $^{\circ}$ C で 15 分置き、4 $^{\circ}$ C で、3,000 rpm (2,150 \times g) 45 分遠心後、デカントで上清を捨てた。さらに 70%エタノールを 150 μ l 加えて、4 $^{\circ}$ C で、3,000 rpm、45 分遠心を行った。その後、ア

スピレーターで手早く上清を吸引した。そして、サンプルを乾燥させ、35 μ l の 3 \times SSC で溶解させて、シールを貼り、4 で一晩静置した。その後、96-PCR プレートから 384-PCR プレートにサンプルを移し、-20 で保存した。

384-PCR プレートの保存したプローブ用サンプルを、4 ピン方式アレイヤー (SPBIO-E, Hitachi Software)によって、アミノシランコーティングスライドガラス (Matsunami, Osaka)上にスポットした。約 60 の温水が入ったトレイの上に、スポットティングの完了したスライドガラスを DNA の付いている面を下にして乗せ、約 1 分間保持した。そして、スライドガラスの全体が曇ったところで直ちにスライドガラスを取り出し、水蒸気の曇りが消えていくのを確認した。その後、UV クロスリンク機を 60 mJ に設定し、DNA の付いている面を上向きにしてスライドガラスに UV を照射し、DNA をクロスリンクさせた。さらに、スライドガラスをラックに入れて、3 g の無水コハク酸、175 ml の N メチルピロリドン、7.5 ml の 1 M ホウ酸ナトリウム溶液 (pH 8.0)を混合し、調製したマスキング溶液に浸し、手で上下に約 5 分間以上振り動かした。そして、スライドガラスをラックごとマスキング溶液に沈め、30 分間軽く振とうした。その後、95 の蒸留水に 2 分間浸した。そして、95%エタノールに浸し、脱水操作を行ったスライドガラスを室温で保存した。

cDNA マイクロアレイ用全 RNA 調製

液体窒素を加えながら、組織破碎を行った。そして、450 μ l の RNeasy 用の Lysis/Binding sol.に対して、200 mg 程度の組織を加えた。80 μ l の Plant RNA Isolation Aid(Ambion, USA)を加えて良く攪拌し、室温で 15,000 rpm、5 分の遠心を行い、上清を採取した。以下 Plant RNeasy Kit(Qiagen, Germany)を使用した。操作手順は、添付プロトコールに従った。さらに、抽出 RNA 溶液 150 μ l に対して、4M LiCl を 150 μ l 加えて、良く混合し、-70 で 1 時間以上置いた。そして、4 で 15,000 rpm、15 分の遠心後、上清を捨て、2M LiCl で沈殿を懸濁後、4 で 15,000 rpm、15 分の遠心を行った。上清を捨てて、沈殿を 100 μ l の滅菌水に溶解した。等量のフェノール・クロロホルムを加えて、攪拌後、室温で 15,000 rpm、5 分の遠心をした。水層を採取し、等量のクロロホルムを加え、攪拌後、室温で 15,000 rpm、5 分の遠心を行った。水層を採取し、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム、等量のイソプロパノールを加えて混合後、4 、1 時間置いた。その後、4 で、15,000 rpm、20 分の遠心後、上清を捨てて、500 μ l の 70%エタノールを加えて、4 で、15,000 rpm、5 分の遠心をした。上清を捨て、乾燥後、100 μ l の滅菌水に沈殿を溶解させ、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム、3 倍量のエタノールを加えて混合後、4 で、1 時間置いた。その後、4 で、15,000 rpm、20 分の遠心後、上清を捨てて、500 μ l の 70%エタノールを加えて、4 で、15,000 rpm、5 分の遠心を行った。上清を捨てて、乾燥後、適量の滅菌水に沈殿を溶解させ、全 RNA を調製した。

Cy3、Cy5 蛍光標識ターゲットの調製

30 µg の全 RNA に 1.5 µl の 2 µg/µl Oligo dT primer(以下の配列のオリゴヌクレオチドを等量混合したプライマー : 5'-GGATCC(T)₁₈A-3'、5'-CAGCTG(T)₁₈C-3'、5'-CTCGAG(T)₁₈G-3') を混合した最終 14 µl の溶液を調製した。そして、70 °C で 10 分間の熱変性を行い、氷上に 3 分間置いた。次に、Cy3、Cy5-dUTP(1 mM, Amersham Biosciences) を 3 µl ずつアニール化したサンプルに各々加え、6 µl の 5 × Superscript II Buffer、3 µl の 0.1M DTT、1.5 µl の 20 × dNTPs(10 mM dATP, dCTP, dGTP, 4 mM dTTP; Amersham Biosciences)、0.5 µl の RNase Inhibitor (Ambion) を混合した。42 °C であらかじめ保温し、その後、2 µl の逆転写酵素 Superscript II(200 U/µl, Invitrogen, USA)を加えて、30 µl の反応系にした。そして、42 °C で 2 時間のインキュベーションを行った。反応後、氷上に置き、5 µl の 0.5 N NaOH/50 mM EDTA を加えて、70 °C で 10 分間の保温後、5 µl の 1 M Tris-HCl (pH 7.5)を加えて混合した。この溶液に、各々220 µl の TE Buffer を加え、Cy3、Cy5 の両方の反応液を 1 つにまとめて 500 µl に調製してから Microcon-30(Millipore)に移した。8,000 rpm、15 分の遠心をして、上のカップの液量が 10 µl 程度になっているのを確認後、下のカップの液を捨て、上のカップに 500 µl の TE Buffer を加え、再び 8,000 rpm、15 分の遠心をして、上のカップの液量が 10 µl 程度になっているのを確認した。この操作を 2 回繰り返し、最終的に、10 µl まで液量を濃縮し、濃縮したサンプルをターゲット溶液とした。

DNA マイクロアレイによる解析

作製した cDNA マイクロアレイを 20 ml のプレハイブリダイゼーション溶液 (4 × SSC、0.2% SDS、20 × Denhart) に浸し、37 °C で 1 時間以上置き、プレハイブリダイゼーション操作を行った。次に、10 µl のターゲット溶液、0.5 µl の 10% SDS、2.5 µl の 10 µg/µl polyA(Amersham Biosciences)、5 µl の 20 × SSC、5 µl の 100 × Denhart、2 µl の滅菌水で調製したハイブリダイゼーション溶液を 95 °C、3 分間で熱変性を行い、その後、室温で 30 分置いた。画像化データ取得条件の検討の際に利用した 4 ピン方式の cDNA マイクロアレイに関しては、ハイブリダイゼーション溶液 12.5 µl を 22 × 22mm カバーガラス(Matsunami)上に塗布し、表面張力でマイクロアレイ上に吸い上げるようにしてマイクロアレイ上に乗せた。また 32 ピン方式の cDNA マイクロアレイの際には、ハイブリダイゼーション溶液を 24 × 45mm カバーガラス(Matsunami)上に 25 µl を塗布した。そして、4 × SSC を下に置いて、容器内を湿潤させた状態にして、65 °C で 16 時間以上保温し、ハイブリダイゼーション操作を行った。ハイブリダイゼーションさせたマイクロアレイを 1 × SSC-0.2% SDS 溶液で 10 分間洗浄後、0.2 × SSC-0.2% SDS 溶液で 10 分間の洗浄を行った。最後に、0.2 × SSC 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回を行い、マイクロアレイを軽く遠心をかけて、余分な水分を飛ばした。操作が終わったら、遮光箱の中にマイクロアレイを保存した。

Scan Array 4000(Perkin Elmer Life Sciences, USA)を使い、マイクロアレイの画像化を行った。画像化後、TIF 形式のファイルに保存した。画像定量化アプリケーションソフトウェアの Quant Array(Perkin Elmer Life Sciences)を用いて、TIF 形式に保存した画

像化ファイルを開き、定量化した。

定量化したデータをタブ切 text 形式でエクスポートしたファイルを Excel ソフトウェア(Microsoft, USA)で変換し、解析を行った。内部標準サンプル、*Actin 8 (ACT8)*、*Actin 2 (ACT2)* 遺伝子によって、インターナル補正を行った。また同時に、全遺伝子発現量を同等と仮定し補正するグローバル補正も行い、両補正法によって、マイクロアレイ解析の定量化データを算出した。

ノザン解析

10 μg の全 RNA を 1% 変性アガロースゲルによって、40 分間、100 V (定電圧) で電気泳動後、ナイロンメンブレン(Hybond-N, Amersham Biosciences)を泳動後ゲルに置き、一晩トランスファーを行った。転写後のメンブレンを UV 照射 (120 mJ) することにより、RNA をメンブレンに固定した。プローブには cDNA マイクロアレイのプローブとして調製した PCR 産物を用いた。これらの PCR 産物を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3,000 Ci/mmol, Applied Biosystems) で標識し、プローブとした。また標識反応は、Prime It-II(Stratagene, USA)を使い、添付プロトコールに従った。ハイブリダイゼーションは、標準的な方法に従った(Church and Gilbert, 1984)。プレハイブリダイゼーションを 60 で 30 分以上行った後、熱変性させたプローブを加え、60 で一晩ハイブリダイゼーションを行った。そして、 $2 \times \text{SSC}-0.1\% \text{SDS}$ 溶液を用いて、室温で 5 分間の振とうを 4 回繰り返した後、 $0.2 \times \text{SSC}-0.1\% \text{SDS}$ 溶液を用いて、60 で 15 分間の振とうを 2 回繰り返してメンブレンの洗浄を行った。検出は、バイオイメージングアナライザー BAS2500(Fuji Film, Tokyo)を用いた解析および X 線フィルムに露光して行った。

結果

均一化 cDNA ライブラリー由来の EST 収集

均一化 cDNA ライブラリーを作製するために、Subtractive Hybridization と Suppression PCR を組み合わせた Suppression Subtractive Hybridization (SSH)法を利用した (Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996)。原理は図 1-2(A)に示す。テスターとドライバー分子を同一にする self-subtraction を行うことで、均一化操作が可能である。そして、シロイヌナズナの根、葉、栄養生長期茎頂由来の 3 種類の器官、組織別均一化 cDNA ライブラリーを作製した。作製した根、葉、栄養生長期茎頂由来、3 種類の均一化 cDNA ライブラリーの平均インサート長は、コロニーPCR による電気泳動確認で、約 0.3kb であることが示された。また、インサートを持たないクローンは 2 割程度存在した。一方、既存の花序茎頂由来の均一化 cDNA ライブラリーは、均一化サイクル法で作製されており (図 1-2(B)) (Kohchi et al., 1995)、この均一化 cDNA ライブラリーの平均インサート長は、約 0.4kb であった。

EST 情報を持つクローンを獲得するために、作製した根、葉、栄養生長期茎頂由来の 3 種類の均一化 cDNA ライブラリーと既存の花序茎頂由来均一化 cDNA ライブラリーについて、ランダムシーケンスを行った。まず、栄養生長期茎頂、花序茎頂、根由来の均一化 cDNA ライブラリー由来クローン、各 3,072 クローン、葉由来の均一化 cDNA ライブラリー由来クローン、1,152 クローン、合計 10,368 クローンについてのランダムシーケンスを行った。ランダムシーケンスを行った後、ベクターシーケンスを切断し、質の検定を行い、失敗シーケンスを除いた。その結果、7,914 クローンの信頼できる塩基配列を決定することができた (図 1-3)。

均一化の評価を行うために、それぞれの均一化 cDNA ライブラリーごとの重複を調べた。その結果、葉は 804 クローン中で独立した 702 クローンが存在した。以下同様に、栄養生長期茎頂は 2,215 中 1,838、花序茎頂は 2,518 中で 1,972、根は 2,377 中 1,835 存在することが明らかとなった (表 1-1、図 1-3)。これにより、均一化の評価を行うことが可能であった。図 1-4 は、均一化の評価を行うために、横軸に塩基配列を決定した総クローン数、縦軸に独立したクローン数を示したものである。一般的なシロイヌナズナの cDNA ライブラリーは、ランダムに 1,500 の塩基配列を決定した場合、900 の独立した塩基配列が獲得できることが示されている (Newman et al., 1994)。つまり、ランダムシーケンスを行った 4 種類の均一化 cDNA ライブラリーは、非均一化 cDNA ライブラリーと比較して、重複頻度が低く、効率良く様々な cDNA を獲得していることが示された。

独立したクローン数を調べるために、各 cDNA ライブラリーで独立していたクローン、702、1,838、1,972、1,835 の合計 6,347 クローンに対して、各均一化 cDNA ライブラリー間での重複を調べた。その結果、ライブラリー間で重複のないクローン数、つまり 1 種類のライブラリーのみで存在しているクロー数が、5,173 クローン、以下同様に、2 種類のライブラリー間で存在するクロー数が 486 クローン、3 種類で存在す

るクローンが 60 クローン、4 種類全てで存在するクローンが 8 クローンであった。つまり、今回のランダムシーケンスによって、独立した EST 情報を持つクローン数が、合計 5,722 であることが明らかとなった (図 1-3)。

獲得したクローンの特性を調べるために、各 cDNA ライブラリーで独立していたクローン、702、1,838、1,972、1,835 の合計 6,347 クローンを対象とした、クローンのアノテーション付けを行った。検索方法は、GenBank に登録されたゲノム、タンパク質、EST データベースに対する BLSAT 検索を行った (表 1-1)。シロイヌナズナゲノムデータベースに対して、BLASTN 検索を行った。その結果、ゲノムデータとして検索されたものが 6,262 クローン、未知データが 85 クローンであった。シロイヌナズナタンパク質データベースに対して、BLASTX 検索を行った。その結果、5,641 クローンがデータベース上に存在し、未知データが 706 クローンであった。GenBank 由来の EST データベース (est-others) に対して、BLASTN 検索を行った。その結果、EST データベース上で検索されたものが 5,962 クローン、検索されなかったものが 385 クローンであった。検索されなかった 385 クローンの中で、オルガネラ DNA 由来などの核 mRNA 由来以外の配列と予想されるクローンを除くと、327 クローンであった。これら 327 クローンが新規 EST クローンと予測された (表 1-1)。

cDNA マイクロアレイ実験系の構築

実験系の構築を行うために、3 種類の検討を行った。まず、Cy3-dUTP と Cy5-dUTP により標識されたターゲットによる定量解析が可能な画像データを取得できるか、次に cDNA マイクロアレイが全体を捉えることを目的とした解析法であるので、あらかじめ設定した解析条件に当てはまる遺伝子発現を全体的な傾向として示しているか、さらに個々のスポット定量が正しいかという 3 点である。そこで、1,152 クローン由来の 2 連スポットの cDNA マイクロアレイを作製し、それらの検討を行った。

Cy3-dUTP と Cy5-dUTP により標識されたターゲットによる定量解析が可能な画像データを取得できるかを検討したところ、図 1-5 に示すように、以後の定量化解析が可能な画像データを取得可能であった。

cDNA マイクロアレイの全体的な発現変動の評価をするために、同じサンプルを解析した発現プロファイルと塩ストレス処理を行ったサンプル (250 mM NaCl、5 時間) を解析した発現プロファイルを作成した (図 1-6)。同じサンプル同士の競合ハイブリダイゼーションを行った場合、遺伝子発現の変動が起こらない。そのプロファイルの各スポットのシグナル強度を定量した値について、Cy3 を縦軸、Cy5 を横軸にプロットした散布図は、直線性を描くはずである。また Cy3、Cy5 の蛍光強度の相関性を示す相関係数は、1 に近いと予測される。一方、塩ストレス処理サンプルの解析をした場合、遺伝子発現の変動が起こると予測されるので、上と同様な散布図を描くと同一サンプルと比較して、直線性が乱れ、相関係数は 1 から遠ざかると予測できる。同一サンプルを解析したところ、Cy3 を横軸、Cy5 標識ターゲットを縦軸にした、蛍光強度の散布図は、Cy5/Cy3 比が 0.5-2.0 の間に 99% 以上存在しており、直線性を示した。

また、Cy3、Cy5 標識ターゲット間の相関係数は、 $R = 0.99$ と非常に高かった(図 1-6(A))。それに対し、塩ストレス処理と非処理による比較解析を行ったところ、Cy3 標識ターゲット(コントロール)を横軸、Cy5 標識ターゲット(塩ストレス処理)を縦軸にした、蛍光強度の散布は、Cy5/Cy3 比が 2.0 以上の範囲に 7%、0.5 以下の範囲に 0.6%、つまり 0.5-2.0 の間以外に 7.6%存在していた(図 1-6(B))。また、Cy3、Cy5 標識間の相関係数は、 $R = 0.93$ であり、同一サンプルと比較して、直線性が低かった(図 1-6)。以上の結果は、期待した通りの結果であり、cDNA マイクロアレイが、全体を捉えることを目的とした解析法として機能することが明らかとなった。

個々のスポットでの定量性を確認するために、塩ストレスにより発現上昇が確認されたクローンを Cy5/Cy3 2.0 の基準で抽出した。その結果、35 の塩ストレス誘導性遺伝子をマイクロアレイデータから抽出できた(表 1-2)。それら遺伝子の詳細を文献情報で調べると、ストレス誘導遺伝子として報告されている遺伝子が 22、報告されていない遺伝子が 13 遺伝子であった(Yoshida et al., 1995; Gilmour et al., 1992; Wilhelm et al., 1993; Kuromori and Yamamoto, 1994; Chen et al., 1996; Zhou and Goldsbrough, 1994; Koizumi et al., 1993; Chang and Meyerowitz, 1986; Seki et al., 2001; Seki et al., 2002)。つまり、過去の知見との一致が見られたと判断できる。さらに、35 遺伝子の中からランダムに選んだ 5 種類の遺伝子、*D1-Pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS, At2g39800)*、*Alcohol dehydrogenase (ADH, At1g77120)*、*Glutathione S-transferase 6 (GST6, At2g47730)*、*Hypothetical Protein (At1g79270)*、*Putative Protein (At4g27520)*のプロープを用いて、塩ストレス処理全 RNA とコントロール全 RNA に対してのノザン解析を行った。また内部標準として使用した 2 種類 (*ACT2*、*ACT8*) をコントロールとした。5 種類の遺伝子、全てについて、塩ストレス処理による発現誘導が確認された(図 1-7)。さらに、cDNA マイクロアレイによる Cy5/Cy3 比(平均値)とノザン解析の定量による塩ストレス/コントロール比(平均値)の値を比較した(図 1-7)。P5CS は、cDNA マイクロアレイによる Cy5/Cy3 比が 21.3 に対して、ノザン解析による定量結果、塩ストレス/コントロール比が 12.8 であった。以下同様に、ADH は、5.6 に対して 6.1、GST6 は、3.9 に対して 3.9、At1g79270 は、5.2 に対して 3.8 であった。At4g27520 は、6.2 に対して、6.8 であった。cDNA マイクロアレイデータとノザン解析のデータがほぼ一致したことから、cDNA マイクロアレイ実験系の個々のスポットにおける定量性の正確性が示された。

考察

均一化 cDNA ライブラリー

均一化操作と均一化を行っていない cDNA ライブラリーを比較することによって、均一化の有効性を考察した。シロイヌナズナの非均一 cDNA ライブラリーにおいて、1,500 クローン中で独立した約 900 クローンを獲得できるという報告がされている (Newman et al., 1994)。この報告によると、シロイヌナズナの一般的な cDNA ライブラリーにおいて、独立クローンの存在している確率は、約 0.6 ということになる。今回のランダムシーケンスによる解析で、1,500 以上の塩基配列決定クローンが存在する 3 種類の均一化 cDNA ライブラリーで、独立クローンの存在している確率が約 0.8 という数値を示したことから、均一化の有効性が示されている (表 1-1)。均一化評価の結果をよりわかりやすくするために、横軸に塩基配列決定クローン数、縦軸に重複を省いた独立クローン数を示したグラフを描き、均一化評価を行っている (図 1-4)。最大の収集効率を示す理想直線は、総クローン数 = 独立クローン数である。今回シーケンス解析を行った均一化 cDNA ライブラリーの全てが、非均一化 cDNA ライブラリーよりも理想直線に近く、効率良く様々な種類のクローンが獲得できていることが示されていた。

今回作製した均一化 cDNA ライブラリー (葉、栄養生長期茎頂、根) と既存の均一化 cDNA ライブラリー (花序茎頂) の均一化操作が異なっている (図 1-2)。そのことから、ランダムシーケンス後の解析により、均一化操作の比較が可能であった。SSH 法と均一化サイクルを比較しても、均一化のレベルに差異は見られなかった (表 1-1、図 1-4)。しかしながら、実験的に煩雑な操作を行う、均一化サイクルによる均一化操作と比べて、SSH 法の方が簡便で短期間に操作を行うことができるので、迅速に効率良く研究を進める目的がある場合は、SSH 法が有効な操作法であると考えられる。

しかしながら、SSH 法には、弱点がある。cDNA をランダムに 4 塩基認識の制限酵素、*RsaI* での消化を行うために、1 遺伝子であっても 2-3 種類の cDNA 断片を獲得する可能性がある。現実には、BLSATN による LOCUS 情報の検索、BLASTX でのタンパク質データベースによる検索結果から、5,722 の独立した EST を獲得したにも拘わらず、獲得遺伝子数は、約 5,000 種類 (4,800-5,100 種類の間と予測) であった。今回のシーケンスを行った結果、SSH 法では、配列が重ならないにも拘わらず、同一遺伝子である EST が、12 遺伝子中 1 種類の割合で出現することが明らかとなった。

本研究では、ランダムシーケンスにより、独立した 5,722 クローンを EST として獲得した。シロイヌナズナの遺伝子数が約 26,000 であるので、収集した EST は、1/5 以上の遺伝子を網羅していることになる。そのことを考察するために、例として、花成制御関連遺伝子群の 45 遺伝子の核酸配列を今回収集した EST ローカルデータベースに対して、BLASTN 検索を行った。その結果、45 遺伝子中 14 遺伝子が存在した。14/45 であるので、約 1/5 に相当しており、収集した EST が全遺伝子に対して、約 1/5 を網羅していることが考察できた。

現在(2004年1月) 196,988のシロイヌナズナ EST が登録されている。データベースが充実した現在にも拘わらず、新規 EST として予測されるクローンが 327 種類存在した(表 1-1)。均一化 cDNA ライブラリー作製法を単純に考えた上で、低発現性遺伝子と考えられる新規 EST クローンを獲得している可能性がある。以上のことを考えると、均一化 cDNA ライブラリーを適用することで、新規 EST を含む様々な cDNA 種を獲得することが可能であった。今回用いたシロイヌナズナは、モデル植物であるため、全ゲノム構造解析が終了し、データベースも充実している。そのため、データベースと比較した詳細な均一化 cDNA ライブラリーの評価を行うことが可能であった。この評価は、データベースが充実していない植物種などを解析する場合、基礎的な知見となり得ると考えられる。

cDNA マイクロアレイ

同じサンプルを解析した発現プロファイルの横軸に Cy3、縦軸に Cy5 蛍光強度をプロットした散布図は、図 1-6(A)のようにほぼ直線上に存在していた。また、Cy3 標識ターゲットを非塩ストレス処理、Cy5 標識ターゲットを塩ストレス処理とした発現比較を行った結果、同じサンプルを解析した散布図と比較して、図 1-6(B)のように直線性が低かった。統計的な処理を行うために、両解析結果から相関係数 R を算出したところ、同ターゲット解析の場合、 $R = 0.99$ 、塩ストレス解析の場合、 $R = 0.93$ であった。つまり、同ターゲット解析の場合、 R の値が、1 に非常に近いということが明らかであり、Cy3、Cy5 蛍光強度の相関性が非常に高いことが示されている。そこで、Z 変換による相関係数の比較を行ったところ、同ターゲット解析と塩ストレス解析の R 値が、99%以上の確率で相違することが示され、同ターゲット解析と比較して、塩ストレス解析による遺伝子発現の方が、発現が変化していることが示唆された。このことから、全体を捉えた時の cDNA マイクロアレイの信頼性を確認できた。

加えて、スポットごとの信頼性を確認するために、塩ストレスにより、発現上昇を示した、35 の塩ストレス誘導性遺伝子をマイクロアレイデータから抽出した(表 1-2)。その結果、ストレス誘導遺伝子として報告されている遺伝子が 22、報告されていない遺伝子が 13 遺伝子であった。従来知られている *P5CS*、*COR15a* (At2g42540)、*COR47* (At1g20440)、*ADH*、*Protein phosphatase 2C (PP2C)* (At3g11410)、*Metallothionein (MT)* (At1g07600)、*GST6*、*Thiol protease (Rd21A)* (At1g47128)などの遺伝子が確認された。*P5CS* は、適合溶質であるプロリンの合成系酵素であり、水ストレス下において、律速酵素として働いていることが示唆されている(Yoshida et al., 1995)。*COR15*、*COR47* は低温馴化の過程で誘導される遺伝子であり、*PP2C* は、シグナル伝達系に参与している脱リン酸化酵素であり、*GST6*、*MT* は、酸化ストレスにより誘導され、活性酸素消去系で働くということが知られている(Gilmour et al., 1992; Wilhelm et al., 1993; Kuromori and Yamamoto, 1994; Chen et al., 1996; Zhou and Goldsbrough, 1994)。*RD21* は、乾燥ストレスにより誘導される遺伝子として、ディファレンシャルスクリーニング法でスクリーニングされてきた遺伝子である(Koizumi et al., 1993)。*ADH* は、ストレスにより生体

膜の流動性が低下することで、呼吸活性が低下して嫌氣的代謝に移行し、発現が誘導されたと考えられる(Chang and Meyerowitz, 1986)。これらの遺伝子が同定されたことは、cDNA マイクロアレイが遺伝子同定ツールとして、十分に機能していることが考えられる。しかしながら、これらの既知遺伝子に加えて、塩ストレスにより発現が高まる遺伝子として、At1g79270、At4g27520 などの新規遺伝子もスクリーニングすることが可能であった(表 1-2)。さらに、5 遺伝子を抽出したノザン解析の結果から(図 1-7)、それら遺伝子が、塩ストレスにより発現上昇することが確認できた。これらの事実を考えると、cDNA マイクロアレイ実験系は、スクリーニング効率が非常に高く、正確な実験系であると結論付けられた。

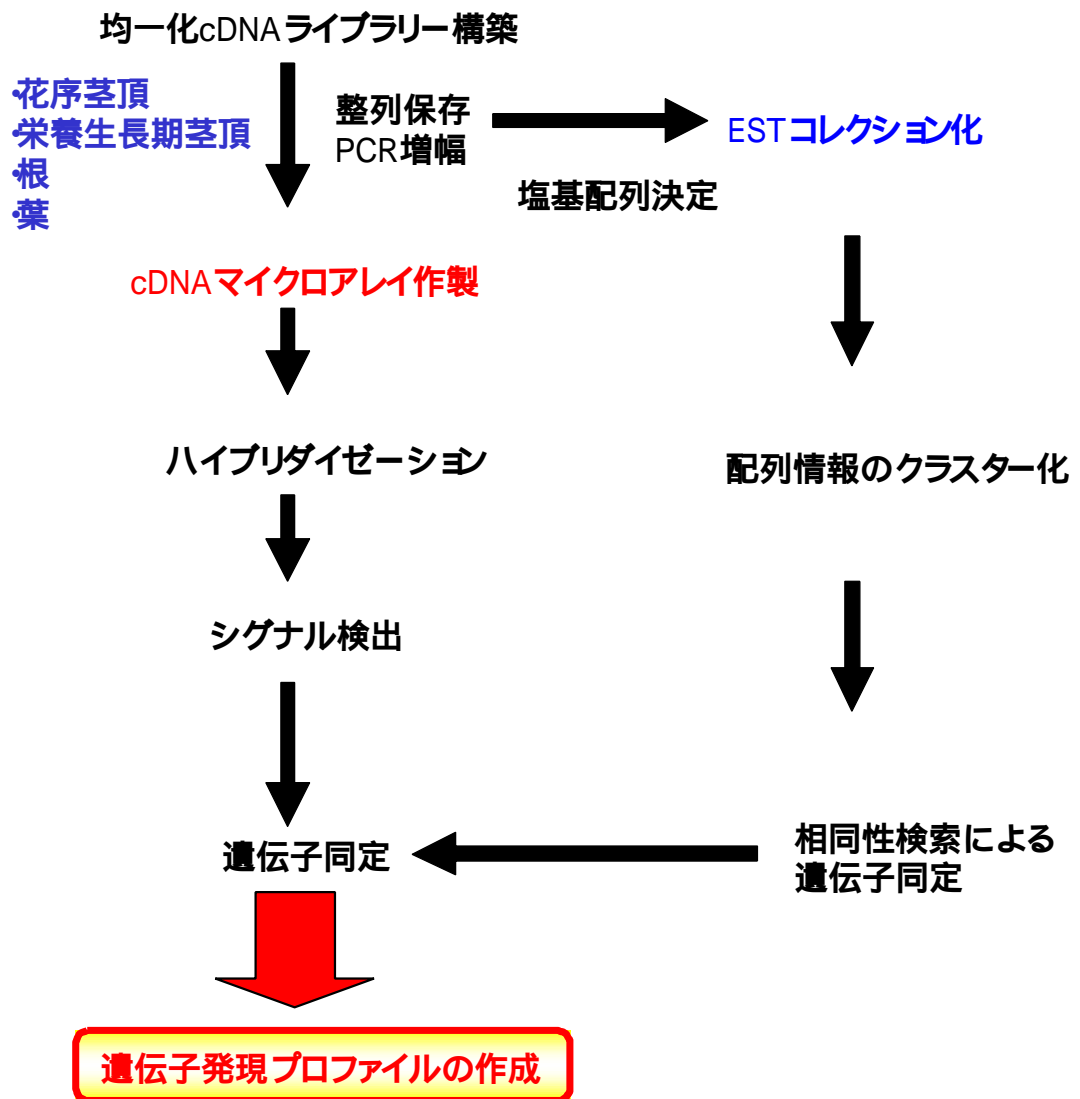


図1-1. 均一化cDNAライブラリー由来cDNAマイクロアレイ実験系構築の手順
均一化cDNAライブラリーを利用したESTコレクション化、迅速なcDNAマイクロアレイ実験系の構築を行い、様々な遺伝子発現プロファイルを作成する。

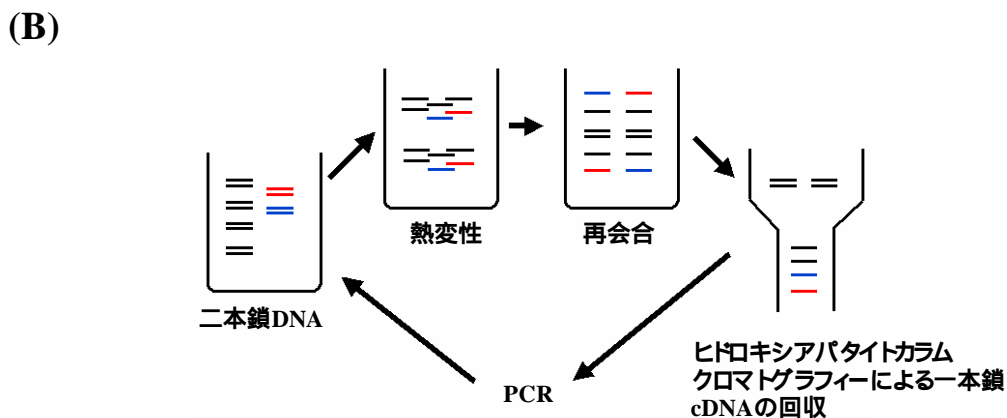
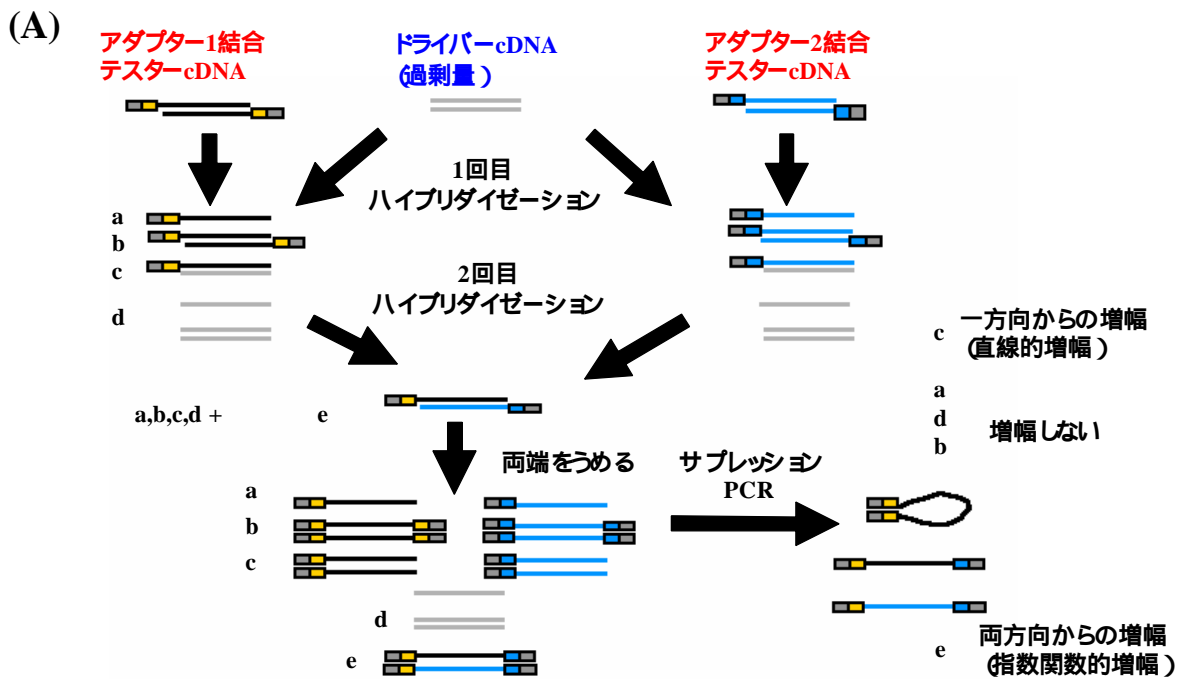


図1-2. 均一化操作法の原理

(A) Suppression Subtractive Hybridization (SSH)法の原理を示す。SSH法は、SubtractionとSuppression PCRによる効果で、効率良くSubtractionを行うことが可能なシステムである。テスター-cDNAとドライバー-cDNAを同一にすることで、均一化操作が可能である。(B)均一化サイクル法の原理を示す。増幅したcDNAを熱変性により一本鎖にした後、再会合させる。そして、一本鎖のまま残っているcDNAだけをヒドロキシアパタイトカラムによって回収し、この過程で減少した絶対量をPCR法で補う。

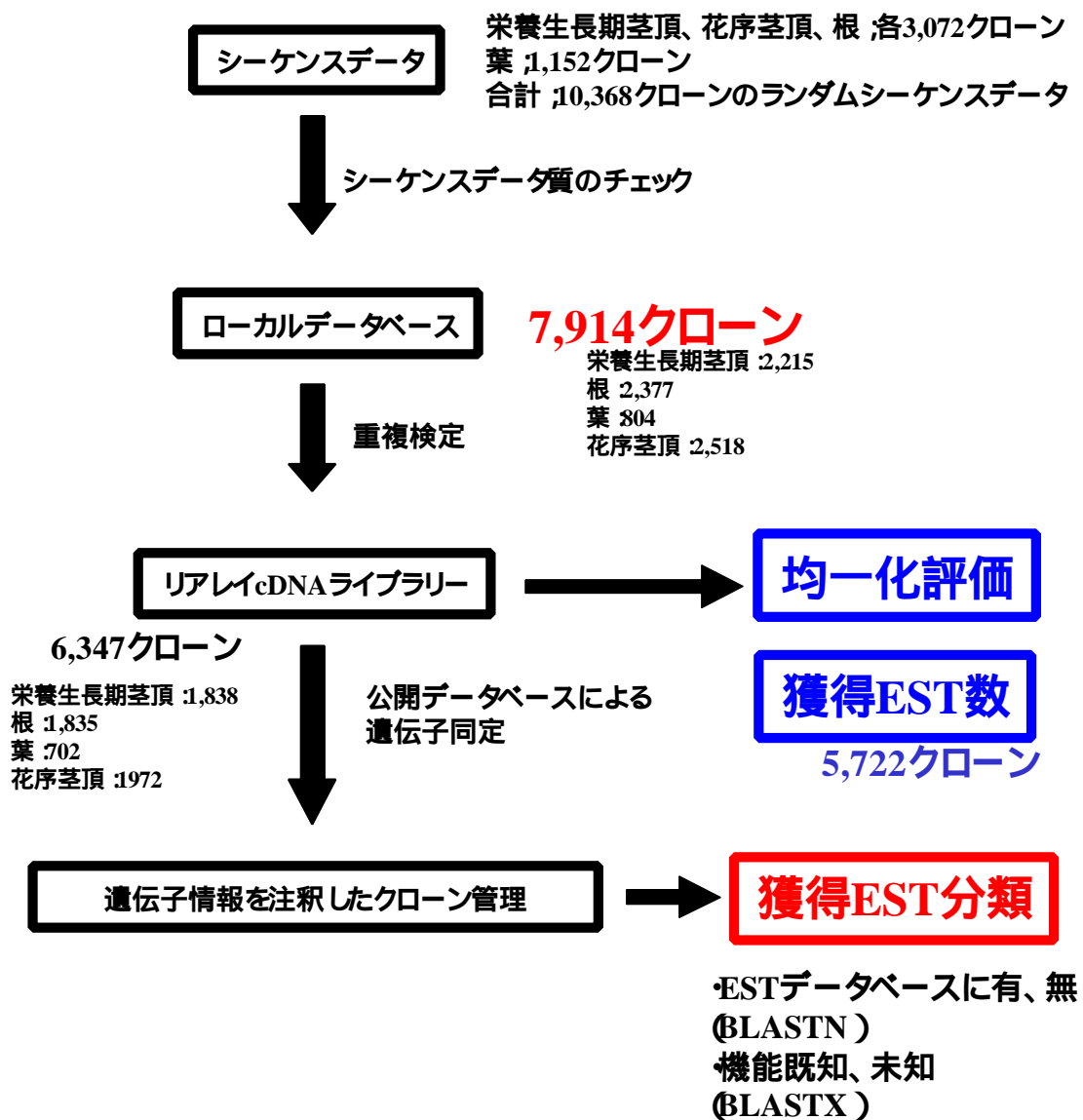


図1-3. ランダムシーケンス以降の解析、管理
ランダムシーケンス後の解析、クローン管理体制の流れを示している。DNA Space Ver. 3.7、Microsoft Excelでの解析、クローン管理を行っている。

表 1-1. ランダムシーケンス解析

Library	Total ESTs ^a	Independent ^b	Genome	Protein	EST	
			Known ^c	Known	Known	Novel ^d
Vegetative apex	2215	1838	1826	1672	1716	109
Root	2377	1835	1818	1669	1757	70
Leaf	804	702	700	651	672	28
Inflorescence apex ^e	2518	1972	1928	1622	1817	120
Total	7914	6347	6262	5641	5962	327

a : シーケンスを確定したクローン数、b : 独立クローン数、c : 独立クローンに関して、公開データベース(Genome, Protein, EST)に対して BLSAT 検索を行った結果、検索されたクローン数、d : 新規 EST 予測数、e : 花序茎頂は、SSH 法ではなく、均一化サイクル法による均一化操作を行った。

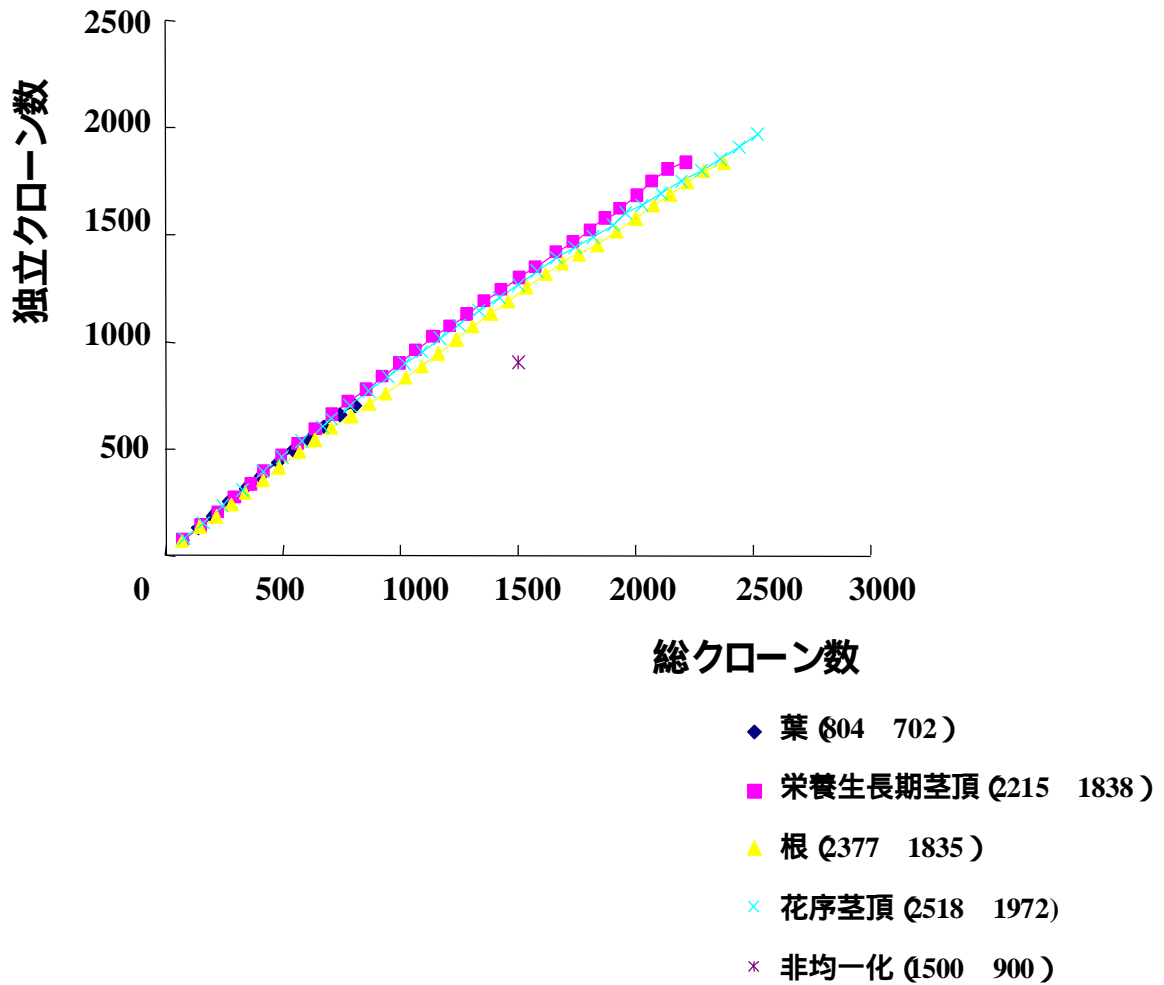


図1-4. 各cDNAライブラリーの均一化評価

ランダムシーケンス後、各均一化cDNAライブラリーでのクローン重複解析を行った結果を示している。横軸はシーケンスを行ったクローン数、縦軸は独立クローン数を示している。○は、最終的なシーケンス確認クローン数と独立クローン数を示している。非均一化の指標は、Newman et al. Plant Physiol. 1994, 106: 1241-1255の報告結果を示している。

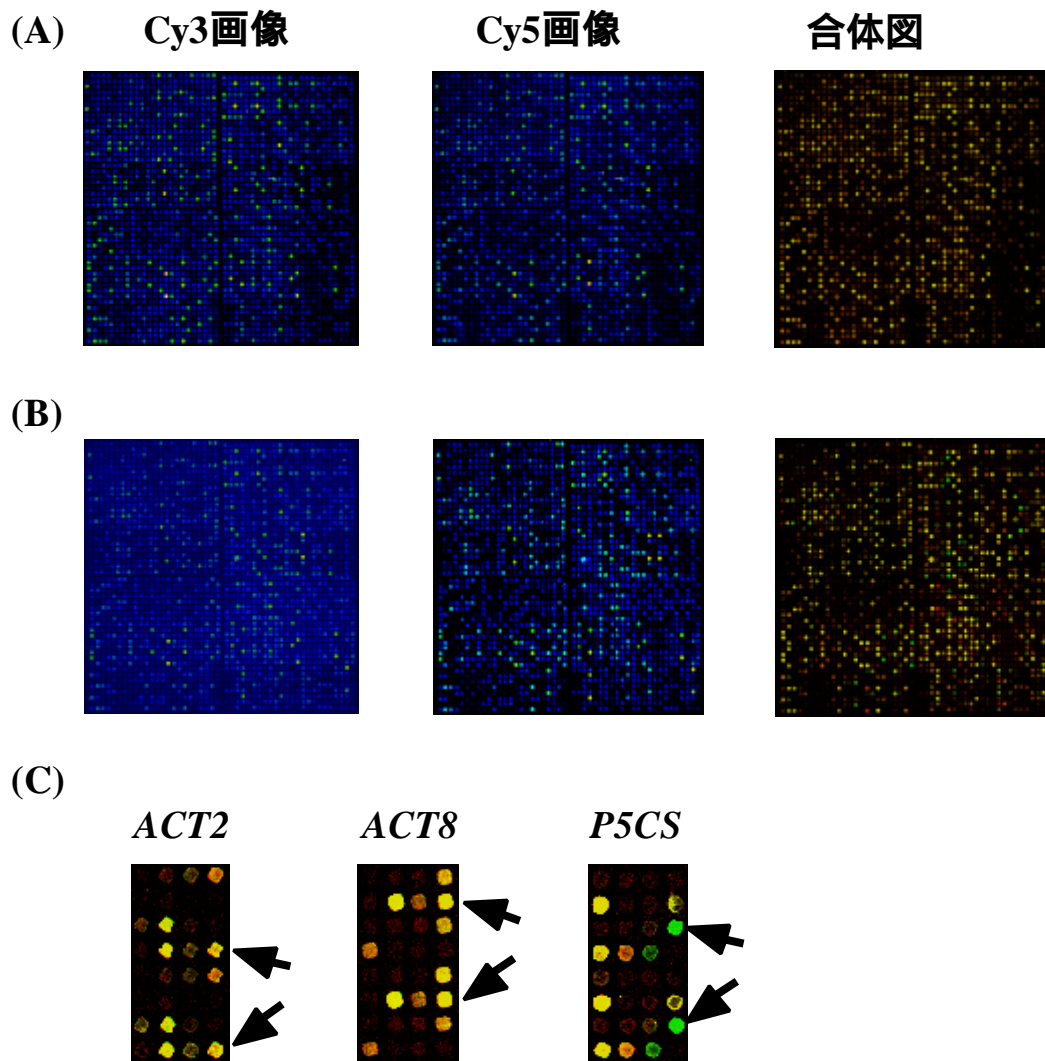


図1-5. 塩ストレス処理および対照サンプルのcDNAマイクロアレイの画像化
 Cy3、Cy5取り込み画像とその画像を合わせた合体図を示している。合体図はCy3を赤色、Cy5を緑色で示しており、同程度の発現であれば中間色である黄色のスポットが表示される。(A)は同一サンプル(両者とも非塩ストレス処理)によるCy3、Cy5標識ターゲットを用いた解析、(B)は非塩ストレス処理の対照サンプルをCy3標識ターゲットとして、塩ストレス処理サンプルをCy5標識ターゲットとして解析している。(C)は内在性コントロールの*ACT2*、*ACT8*、塩ストレス処理により著しく発現上昇した*P5CS*スポットの合体図を拡大している。矢印は、それらのスポットを示している。

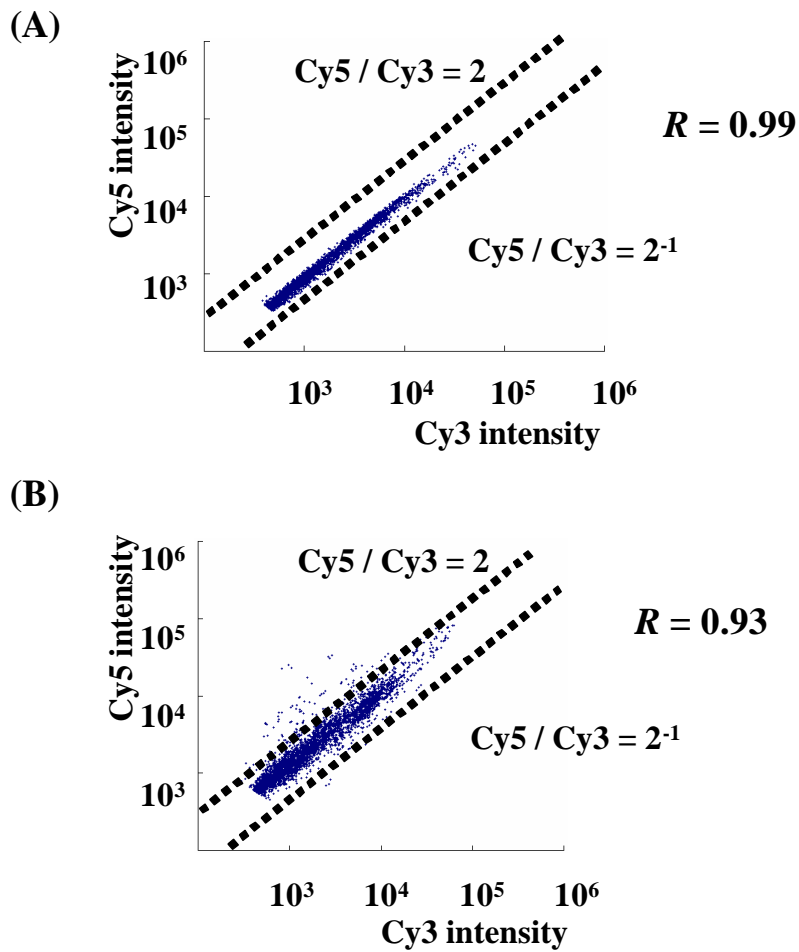


図1-6. 塩ストレス処理および対照サンプルのcDNAマイクロアレイの定量解析による散布図
 横軸にCy3シグナル強度、縦軸にCy5シグナル強度を示した。またCy5/Cy3値が2以上、0.5以下を示すために、 $Cy5/Cy3=2$ および 0.5 の破線を描いている。(A)は同一サンプルによるCy3、Cy5標識ターゲットを用いた解析、(B)は非塩ストレス処理の対照サンプルをCy3標識ターゲット、塩ストレス処理サンプルをCy5標識ターゲットで解析を行った結果を示している。

表 1-2. 塩ストレス発現上昇遺伝子

LOCUS	Gene Identification	Target / Control (\pm S.D.)
At2g39800	Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase (<i>P5CS</i>)	21.27(\pm 4.53)
At1g20440	<i>COR47</i>	8.80(\pm 3.29)
At2g42540	<i>COR15a</i>	7.79(\pm 0.37)
At1g79270	Hypothetical protein	6.77(\pm 1.08)
At3g11410	Protein phosphatase 2C	6.74(\pm 0.45)
At4g27520	Putative protein	6.24(\pm 3.21)
At2g46270	G-box factor 3	6.16(\pm 1.03)
At1g77120	Alcohol dehydrogenase (<i>ADH</i>)	5.62(\pm 0.52)
At1g62570	Hypothetical protein	5.18(\pm 1.18)
At1g07600	Metallothionein (<i>MT</i>)	4.22(\pm 0.64)
At3g51250	Putative lipase	4.19(\pm 0.77)
At4g23630	Hypothetical protein	4.11(\pm 0.66)
At2g47730	Glutathione S- transferase 6 (<i>GST6</i>)	3.87(\pm 0.17)
At3g05880	Hydrophobic protein (<i>RCI2A</i>)	3.84(\pm 0.88)
At2g25450	Putative dioxygenase	3.73(\pm 0.54)
At2g36630	Hypothetical protein	3.68(\pm 0.22)
At4g33150	Lysine-ketoglutarate reductase	3.63(\pm 0.49)
At1g58360	Amino acid transporter	3.40(\pm 0.62)
At3g06500	Neutral invertase	3.11(\pm 0.09)
At2g38540	Lipid transfer protein 1	3.05(\pm 0.10)
At1g61890	Hypothetical protein	2.92(\pm 0.36)
At1g47128	<i>RD21A</i>	2.82(\pm 0.23)
At5g03240	Polyubiquitin (ubq3)	2.77(\pm 0.13)
At4g12000	Hypothetical protein	2.75(\pm 0.40)
At1g29395	Unknown protein	2.72(\pm 0.17)
At3g03570	Unknown protein	2.66(\pm 0.29)
At2g35680	Senescence-related protein	2.66(\pm 0.37)
At4g15760	Monooxygenase 1	2.50(\pm 0.17)
At3g58750	Citrate synthase-like protein	2.49(\pm 0.33)
At5g47560	Sodium-dicarboxylate cotransporter-like	2.46(\pm 0.16)
At5g18130	Unknown protein	2.40(\pm 0.25)
At3g53420	Plasma membrane intrinsic protein 2a	2.27(\pm 0.14)
At5g16840	Hypothetical protein	2.17(\pm 0.15)
At2g15620	Nitrite reductase	2.16(\pm 0.13)
At2g40880	Cysteine proteinase inhibitor homolog	2.14(\pm 0.15)

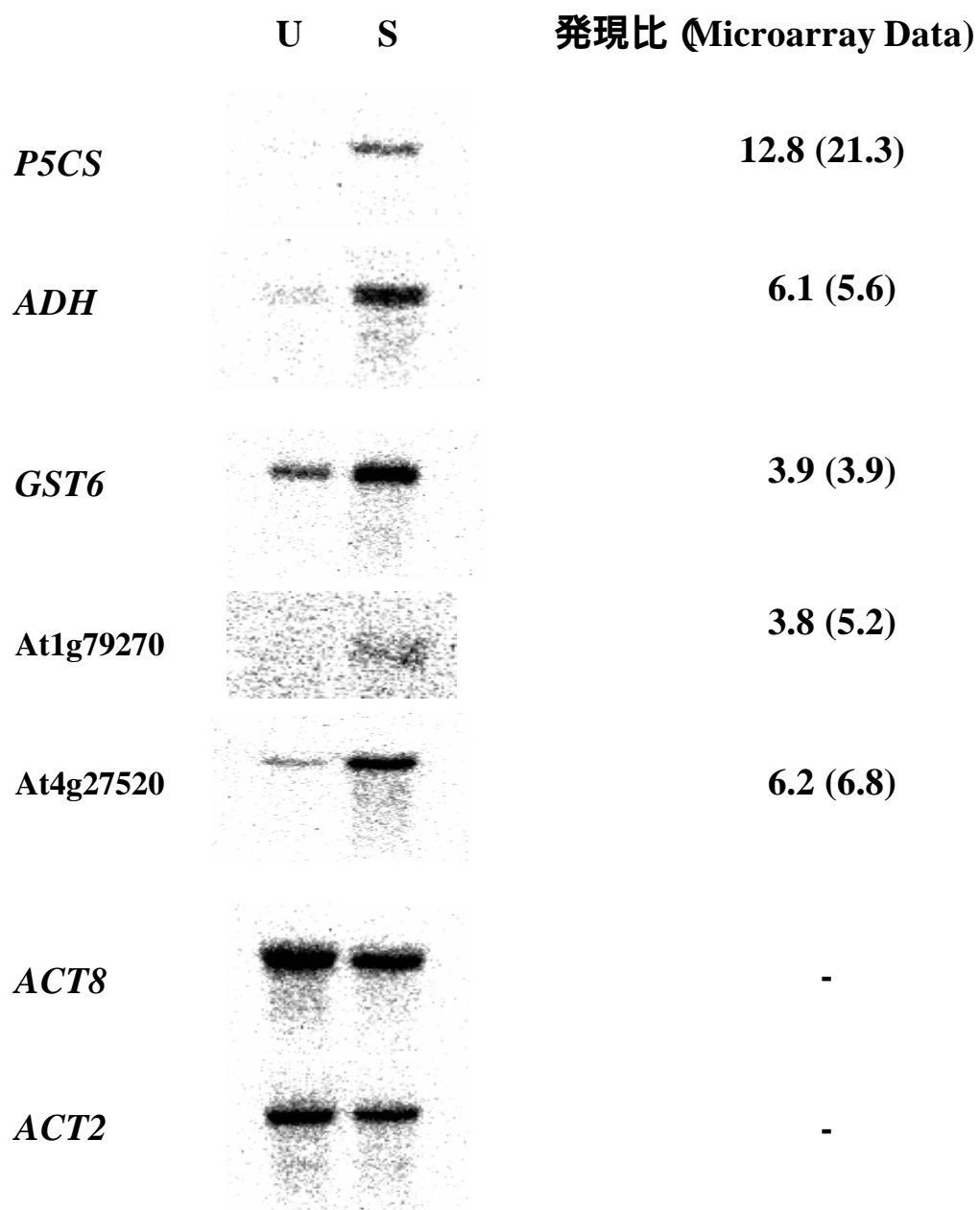


図1-7. 塩ストレス処理サンプルのノザン解析

塩ストレスにより誘導された遺伝子の一部分に関して、ノザン解析を行った。Uは非塩ストレス処理、Sは塩ストレス処理サンプルを示している。数値は内在性コントロールとしてACT2、ACT8を用いて、各遺伝子での発現比を算出した結果である。()内の数値はマイクロアレイデータによる発現比を示している。

第2章 器官特異的発現遺伝子の系統的解析

序論

植物の器官形成は胚発生から始まる。胚発生では、芽生えの体制が確立される。芽生えは2つの体軸で形成される。1つは上下方向に伸びる頂端と基部の軸であり、これに沿って頂端から順に茎頂分裂組織、子葉、胚軸、幼根、根端分裂組織が並ぶ。もう1つは、頂端基部軸に直交する放射軸で、外側から順に表皮、皮層、内皮、内鞘、維管束の5種類の組織が同心円状に並ぶ。この胚発生で確立する体制は、発芽後も維持される。胚発生以後の器官、組織形成は、二種類の分裂組織、茎頂分裂組織と根端分裂組織の分化によって決定される(Benfey, 1999)。

高等植物の地上部の形態形成は、茎頂分裂組織が源となっている。茎頂分裂組織は栄養生長期には葉を繰り返し発生する。この間は、節間の伸長が抑制されているために、地面に張り付くような葉がらせん状に次々と発生する。この葉は、ロゼット葉と呼ばれる。その後、生殖生長期に移行し、節間生長が起こって花茎が抽苔し、はじめに茎生葉をつける。次に、花の原基が花茎上でらせん状に発生し、葉を伴わない単性花を次々に作り、種子形成を行う。花および花芽の集合体を花序と呼ぶ。また、茎生葉の葉腋には頂芽が形成するとともに副花序が形成される。

一方、地下部の形態形成は、根端分裂組織にある少数の始原細胞の分裂と、細胞の縦方向の伸長によって、根の生長が起こる。そして主根を形成し、主根からは側根が分岐し、そこからさらに側根が分岐して根系は複雑化している。

このように、植物の器官は、分裂組織を源として、様々な器官、組織に分化する。そして、分化した器官は各々で特殊化されていて、各々の機能を担っている。葉は、主に葉緑体内での光合成を中心とした物質生産の場、茎は根からの水分・養分などを輸送する物質輸送の場、花は次世代に種子を残すための生殖器官、根は根圏からの水分・養分を吸収する場である。それぞれの器官で特異的に発現する遺伝子を同定することは、器官の発生・分化、生理機能、進化などを考える上で非常に興味深いものである。

また、最近の植物遺伝子工学技術の急速な進歩によって、工学や農学を対象とした応用研究の分野において、様々な有用トランスジェニック植物が作出されている。その中で、求められていることはプロモーター配列などに代表される制御配列の選択性である(Yoshida and Shinmyo, 2000)。そこで、様々な器官特異的発現プロモーターの獲得が望まれている。

本章は、cDNA マイクロアレイによる、植物の器官別遺伝子発現プロファイルを作成し、植物体の全体像を遺伝子発現のレベルから考察した。また、器官特異的発現遺伝子の同定を行った。さらに、今回同定した器官特異的発現遺伝子とそのプロモーター配列の考察も行った。

材料および方法

植物材料

シロイヌナズナはエコタイプ、Columbia を利用した。器官別の発現解析を行うために、地上部器官は土を入れた育苗箱へ播種し、人工気象室内、22℃、白色連続光下で栽培した。播種後 10-14 日経った植物体より葉をサンプリングした。また花と茎は、播種後 1 ヶ月の植物体からサンプリングを行った。地下部器官である根に関しては、滅菌したナイロンメッシュを乗せた 1% ショ糖を含む 1.2% 寒天 MS 培地上に滅菌種子を播種後、人工気象室内、22℃、白色連続光下で 3 週間栽培した根をサンプリングした。

植物体からの全 RNA 抽出

第 1 章、ターゲット調製用の全 RNA 抽出法と同様な方法で行った。

cDNA マイクロアレイの作製

リアレイ操作後の cDNA ライブラリー由来 6,347 クローンに加えて、各研究室からの供与クローン、コントロールなどを含めた約 400 クローン、合計 6,665 クローンを鋳型として、PCR 反応を行い、その PCR 産物を DNA マイクロアレイ用の DNA プローブとした。以後の操作は、第 1 章のマイクロアレイ作製法を一部改変して行った。改変箇所は、アレイヤーを 4 ピン方式アレイヤーから 32 ピン方式アレイヤー (SPBIO-2000, Hitachi Software) に変更し、スライドガラスをアミノシランコーティングスライドガラスから poly-L リジンコーティングスライドガラス (Matsunami) 上にスポットする実験系に改変した。

ターゲット調製

第 1 章のターゲット調製法を改良して行った。改良点は、PCR Purification kit (Qiagen) を用いてターゲット精製を行った。操作方法は添付プロトコールに従った。溶出したサンプルを DNA Speed Vac を用いて、最終的に 10 μ l まで液量を調製し、調製したサンプルをターゲット溶液とした。

DNA マイクロアレイによる解析

第 1 章の方法と同様に行った。

クラスター解析

グローバル補正後のデータを図 2-1(A) のような 16 種類のプロファイルをもとに 4 器官での各遺伝子の発現比を算出した。算出法として、以下のような計算を行った。Cy5 を葉で標識した場合のプロファイルでのある遺伝子における値の算出を例に挙げる。

Cy3 を葉、Cy5 を葉で標識した発現プロファイルの Cy3 シグナル強度値を a、Cy5 を b とする。Cy3 を根、Cy5 を葉としている発現プロファイルの Cy3 強度を c、Cy5 強度を d、Cy3 を花、Cy5 を葉としている発現プロファイルの Cy3 強度を e、Cy5 強度を f、Cy3 を茎、Cy5 を葉としている発現プロファイルの Cy3 強度を g、Cy5 強度を h とする。

各プロファイルで Cy3/Cy5 の値を求める。その結果、 a/b 、 c/d 、 e/f 、 g/h の値が算出される。

これらの値を平均した、 $(a/b+c/d+e/f+g/h)/4$ を A とする。

さらに、各々の比を平均値 A で割ると、 $(a/b)/A$ 、 $(c/d)/A$ 、 $(e/f)/A$ 、 $(g/h)/A$ の値が算出される。 $(a/b)/A$ は葉、 $(c/d)/A$ は根、 $(e/f)/A$ は花、 $(g/h)/A$ は茎での発現を示す。

また、これらの値の和は、 $(a/b)/A+(c/d)/A+(e/f)/A+(g/h)/A=4$ 、4 である。仮に 4 器官の全てで同じ発現を示す遺伝子であるならば、 $(a/b)/A=1$ 、 $(c/d)/A=1$ 、 $(e/f)/A=1$ 、 $(g/h)/A=1$ と示すことになる。

以下同様に Cy3 を葉で標識したプロファイル、その他 3 器官でのプロファイル(Cy3、Cy5 のダイスワッピングを考慮すると 3×2 、6 回の計算が必要)に関する計算を行うと、合計 8 種類の計算値が出てくる。

その値を平均して、各器官での値として解析を行った。計算した発現を示す値は、1 が平均値であり、1 より大きければ平均よりも発現が大、1 より小さければ発現が平均よりも小と判断できる。

これらの算出した各遺伝子の各器官別発現比データをタブ切 text 形式で、GeneSpring ソフトウェア(Silicon Genetics, USA)に import することでクラスター解析を行った。解析法としては、平均距離法を用いることで、実験クラスタリング、遺伝子クラスタリングを組み合わせたペアワイズ相関係数解析を行った。また k-means クラスタリング解析により、発現パターンによる遺伝子のクラスター化を行った。

結果

4 器官発現プロファイルの作成

器官別の系統的な遺伝子発現解析を行うために、葉、茎、根、花由来の全 RNA から Cy3 標識、Cy5 標識ターゲットを調製し、4×4、16 種類の遺伝子発現プロファイルを作成した(図 2-1(A))。再現性を取得するために、Cy3 と Cy5 を入れ替えた解析(ダイスワッピング解析)も行った。アレイ上の 6,665 クローンの中で、解析不能と判断された 272 クローンが存在した。そこで、6,665 から 272 を除いた 6,393 クローンを解析した。6,393 クローン中には、5,241 種類の遺伝子が含まれていた。

植物器官の系統

4 器官の系統を調べるために、各実験条件での発現類似性を調べる実験クラスタリング、遺伝子ごとの発現の類似性を調べる遺伝子クラスタリングを組み合わせたペアワイズコリレーション解析を行った。実験条件とは、4 器官の場合、花、葉、茎、根での発現解析結果である。また、3 器官の場合、花、葉、茎での発現解析結果である。図 2-2 は、4 器官解析および地上部 3 器官解析に関するペアワイズコリレーション解析の結果を示している。縦方向は器官の系統を示しており、横方向は遺伝子クラスタリングの結果を示している。4 器官解析の結果から、最も近縁関係にある器官は、花と葉であった。根は他の 3 器官と比較して最も遠い関係を示していた(図 2-2(A))。また、地上部の 3 器官解析の結果でも、最も近縁関係にある器官は、花と葉であり、花と葉のグループに茎が統合している系統を示した(図 2-2(B))。

各器官での発現特異性の解析

器官ごとの遺伝子発現の特異性を調べるために、k-means クラスタリング解析を行い、4 器官での発現パターンが類似している遺伝子を分類した。4 器官での発現特異性を考えた場合、理論的に 1 器官で発現している場合が 4 分類、2 器官で発現している場合が 6 分類、3 器官で発現している場合が 4 分類、4 器官で発現している場合が 1 分類、合計 15 分類になる。そこで、発現パターンが類似している遺伝子を 15 種類のクラスターに分割した。その結果を図 2-3 に示している。表 2-1 は、各クラスターにおけるクローン数、LOCUS 情報をもとに検索された遺伝子数、発現が見られる器官をまとめている。しかしながら、今回の k-means クラスタリング解析では、15 種類に分類されたが、必ずしも理論通りの期待された分類にはならなかった。

各器官での発現特異性が高い遺伝子を含むクラスターを挙げると、花での発現特異性が高い遺伝子を多く含む CL6、葉での発現特異性が高い遺伝子を含む CL1、CL2、CL13、茎での発現特異性が高い遺伝子を含む CL3、CL7、CL9、根での発現特異性が高い遺伝子を含む CL11、CL14、CL15 であった。この中でも CL14 は、特に根で発現特異性が高い遺伝子のみを含むクラスターを形成していた(図 2-3、表 2-1)。それに対し、CL14 以外、他の器官特異的発現性が高い遺伝子を含むクラスターは、各器官

の特異的発現を示す遺伝子だけでなく、他の器官でも発現が示される遺伝子も含まれていた。例えば CL6 は、花での特異発現性を示す遺伝子と花および葉での発現を示す遺伝子も含まれていた (図 2-3、表 2-1)。

各クラスターの特徴を捉えるために、MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences) Functional category での機能分類によって、各クラスターで含まれる遺伝子を分類した (表 2-2)。特徴的なクラスターとして、CL4、CL6 で転写因子の数が多く示された。CL4、CL6 は、どちらも花での発現が示される遺伝子を含むクラスターである。

次に、各クラスターでの特徴を捉えるために、細胞内局在性を調べた。TargetP プログラムを利用し、プラスチド移行、ミトコンドリア移行、分泌タンパク質に分類した (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (表 2-3)。各クラスターの特徴を比較するために、全ゲノム配列から推定された 25,225 遺伝子での検索結果も示している。その結果は、葉緑体移行シグナルを持つタンパク質は 14%、ミトコンドリア移行シグナルを持つタンパク質は 10%、分泌シグナルを持つタンパク質は 17% である (図 2-4)。ゲノム全体での示される比率と比較して、特徴的なクラスターは、38%、48%、42% とプラスチド移行シグナルを持つタンパク質が多い CL1、CL2、CL5 が挙げられる (図 2-4)。CL1、CL2、CL5 は、葉での発現特異性の高い遺伝子を多数含むクラスターであり、特に CL2、CL5 は、葉緑体数が多いとされている緑色器官である葉、茎での発現性が高い遺伝子を含むクラスターである (表 2-1)。また、35% と分泌タンパク質の割合が多い CL14 が挙げられる (図 2-4)。CL14 は、根で発現特異性が高い遺伝子のみを含むクラスターである (表 2-1)。ミトコンドリア移行シグナルを持つタンパク質の各クラスターでの割合は、4-12% の間であり、全てのクラスターで、特徴的な変化を示さないと判断した。

器官特異的発現遺伝子の同定

器官特異的発現遺伝子を同定するために、図 2-1(B) のような操作を行った。例えば、葉特異的発現遺伝子の同定の手順を示すと、ダイスワッピングでの解析終了後、葉対根(2,5)、葉対花(3,9)、葉対茎(4,13) の全ての場合、葉が 2 倍以上を示すクローンを抽出し、葉特異的と判断した (図 2-1(A, B))。以下、他の器官についても同様に行い、4 種類の器官特異的発現クローンを同定し、器官特異的発現遺伝子の同定を行った。その結果、葉で 56 種類、茎で 24 種類、花で 23 種類、根で 141 種類のクローンを同定された。これらの選抜クローンの遺伝子重複を省くために、WEB 上検索によるアノテーション作業を行い、LOCUS 情報をもとに、同定された遺伝子数を決定した。その結果、葉で 55 種類、茎で 22 種類、花で 21 種類、根で 131 種類の遺伝子が同定された (表 2-4)。

同定された遺伝子の発現特異性と発現量の相関を調べるために、縦軸に発現特異性を示すターゲット/コントロールの値、横軸に発現強度を示すターゲットのシグナル強度をプロットした分布グラフを図 2-5 に示した。ターゲット/コントロールの値が大き

ければ、発現特異性が高いことを示し、ターゲットのシグナル強度が大きければ、発現量が高い遺伝子であることを示す。また、同定された遺伝子のほとんどが、ターゲット蛍光強度が 3,000 以上、ターゲット蛍光強度/コントロール蛍光強度の値が 2.5 以上と比較的高い値を示していた(表 2-4)。このことは、低発現性遺伝子を選抜できていないことを示しており、cDNA マイクロアレイにおける低発現遺伝子解析の限界を示す結果となった。また、全体的な傾向として、特に根で特異性、発現量の高い遺伝子が多く選抜されていることが明らかとなった。

実験上の再現性を確認するために、根特異的発現遺伝子候補の 27 遺伝子、葉特異的発現遺伝子候補の 1 遺伝子、合計 28 遺伝子に関して、ノザン解析を行った(図 2-6)。その結果、すべての場合でマイクロアレイデータとノザン解析データの一致が確認された。この結果から、今回のスクリーニング結果が正しいと判断できた。

器官特異的発現遺伝子の MIPS アノテーションと機能分類

同定された遺伝子の特徴を捉えるために、MIPS アノテーション、MIPS Functional category での機能分類による分類を行った。機能既知、および機能予測がされている遺伝子数は 4 器官合計、162 遺伝子であった。また機能分類の結果を表 2-5 にまとめた。

葉、根において、代謝、エネルギー系として分類される遺伝子が多数同定された。葉においては、*Fructose-bisphosphate aldolase* (At4g38970)、*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (At1g42970)、*Ribulose bisphosphate carboxylase* (At5g38410)、*Sedoheptulose-bisphosphatase* (At3g55800)、*Phosphoglycerate kinase* (At3g12780)、*Fructose-bisphosphatase* (At3g54050)といったプラスチド移行シグナルを含み光合成、炭素同化で働く遺伝子が同定された(表 2-4)。これら遺伝子は、過去の知見からも葉を中心とした緑色器官での高発現性が報告されている(Kagaya et al., 1995; Kwon et al., 1994; Ewing et al., 1998; Willingham et al., 1994; Podkowinski et al., 2003; Strand et al., 1997)。根においては、*Alcohol dehydrogenase (ADH)* (At1g77120)、*b-1,3-glucanase* (At4g16260)、*Aspartate aminotransferase* (At5g19550)、*Glutamate dehydrogenase* (At5g07440)などが同定された(表 2-4)。これら遺伝子は、根器官での強い発現が報告されている(Chung and Ferl, 1999; Cruz-Ortega, 1997; Schultz, 1998; Purnell, 1997)。

根と花において、転写関連に分類される転写因子が同定された。その中でも形態形成に参与する転写因子がいくつか同定された。花においては、花のホメオティック遺伝子 *APETALA1 (AP1)* (At1g69120)、*APETALA3 (AP3)* (At3g54340)、MADS-box タンパク質 *PISTILLATA (PI)* (At5g20240)、*SEPALLATA3 (SEP3)* (At1g24260)、*LUMINIDEPENDENS protein (LD)* (At4g02560)が同定された(表 2-4) (Gustafson-Brown et al., 1994; Jack et al., 1994; Li et al., 2001; Honma and Goto, 2000; Zhang and van Nocker, 2002)。根では、GRAS ファミリーに属する bZIP 型の転写因子として予測されている *Scarecrow-like protein* (At3g46600)が同定された(表 2-4) (Sabatini, 2003)。

根において、細胞修復・防御、細胞死・老化に分類される遺伝子が同定された。

Osmotin (At4g11650)、*HSP 90-like protein* (At4g24190)は、根での高発現が報告されている(表 2-4) (Kononowicz, 1992; Yabe, 1994)。

また、今回の解析で同定された遺伝子の中で、unknown protein、hypothetical protein、putative protein にアノテーションされた機能未知遺伝子数は4器官合計、67遺伝子であった。そこで、アノテーションから機能既知(予測可能を含む)および未知と器官別に分類した(図 2-7)。その結果、葉では機能未知遺伝子が24%と低く、根では31%と高いことが明らかとなった。

同定した器官特異的発現遺伝子の特徴を捉えるために、細胞内局在性を調べた。TargetP プログラムを利用し、プラスチド移行、ミトコンドリア移行、分泌タンパク質に分類した(表 2-6)。特に、50以上の同定遺伝子数が存在した葉と根での細胞内局在の全体傾向を調べた結果、葉ではプラスチド移行シグナルを有するタンパク質が56%と大部分を占めていた。一方、根では分泌タンパク質が19%と比較的高いことが明らかとなった(図 2-8)。他の2器官に関しては、同定した遺伝子数が少ないために、傾向を示せないと考えているが、茎に関しては葉緑体移行シグナルを有するタンパク質が31%、分泌タンパク質が32%という特徴的な結果が示された。

考察

4 器官発現プロファイルを利用した器官特異的発現遺伝子の同定

16 種類の遺伝子発現プロファイルを作成し、作成した遺伝子発現プロファイルを用いた器官特異的発現遺伝子の同定を行った(図 2-1)。その同定法は、Cy3、Cy5 を交換するダイスワッピング解析、および他器官との総当り解析を行うことで、2×3 のデータ再現性を検定していると考えられる。つまり、このスクリーニング法で器官特異的発現と同定されたクローンが器官特異的発現を示す信頼度は高いと考えている。実際、ノザン解析によるデータからもそれは実証されている(図 2-6)。

各器官での発現特異性に注目して、k-means クラスタリング解析を行った。理論的には 15 種類に分類されると予想し、k 値を 15 に設定し、15 種類の遺伝子クラスターに分類した。しかしながら、必ずしも理論通りの結果ではなかった(図 2-3)。根特異的発現を示す遺伝子クラスター、CL14 は存在したが、他の器官特異的発現遺伝子を含むクラスター、CL1、CL2、CL3、CL7、CL6 は他の地上部器官での発現も示すクラスターであった。この原因は、地上部器官では完全な器官特異性を示す遺伝子が少ないことが考えられる。実際、今回、総当り解析により器官特異的発現遺伝子を同定したが(図 2-1(B))、その結果からも根では発現特異性が高い遺伝子が多数同定されてきたが、その一方で、地上部の 3 器官では根と比較して発現特異性の高い遺伝子が同定されていなかった(図 2-5)。また、根で同定された遺伝子数が 131 と多いのに対し、地上部 3 器官の合計が 98 と少ないことも、地上部器官では完全な器官特異性を示す遺伝子が少ないことを反映していると考えられる。

クラスター解析による器官系統

解析した全ての遺伝子を用いた器官別遺伝子発現プロファイルを使い、ペアワイズコリレーション解析することで、各器官の系統を示すことができた(図 2-2)。4 器官での解析、地上部 3 器官での解析からも同様の結果であり、最も近縁関係にある器官は、花と葉であった。これは、花は葉の相同器官であるという説を支持する結果となった。実際、花の ABC モデルに關与する ABC クラス遺伝子の 3 重変異体では、花が葉様化器官に置換されることから、花が葉の特殊化された相同器官であると証明されている事象である(Saedler, 2001)。また 4 器官での解析から、根と地上部の系統が分離されていた。このことは地上部のシュートは、茎頂分裂組織由来であるのに対し、地下部の根は根端分裂組織由来であることの違いであると考えられる(Benfey, 1999)。つまり、系統的な遺伝子発現解析を行うことで、これまでの器官系統の知見を示すことが可能であった。

器官特異的発現遺伝子

葉での発現特異性を示す遺伝子として、*Fructose-bisphosphate aldolase* (At4g38970)、*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (At1g42970)、*Ribulose bisphosphate*

carboxylase (At5g38410)、*Sedoheptulose-bisphosphatase* (At3g55800)、*Phosphoglycerate kinase* (At3g12780)、*Fructose-bisphosphatase* (At3g54050)といったプラスチド移行シグナルを含み光合成、炭素同化で働く遺伝子が同定された。これらの遺伝子は、葉を中心とした緑色器官での高発現性が報告されており、同定結果の正しさを示している。また、この結果は、葉が葉緑体を多数含む物質生産の場として特殊化された器官だということを示している(Kagaya et al., 1995; Kwon et al., 1994; Ewing et al., 1998; Willingham et al., 1994; Podkowinski et al., 2003; Strand et al., 1997)。

根での発現特異性を示す遺伝子として、*Alcohol dehydrogenase* (ADH, At1g77120)が同定された。ADH はピルビン酸からエタノールへの還元反応を触媒し、連続的なNAD⁺の再生を起こしている嫌氣的反応関連タンパク質の1つである。ADH 活性は、嫌氣的な条件下において、植物の生存のために必要であると考えられている。シロイヌナズナのADHは、根器官で構成的に発現しているが、地上部緑色器官では発現が見られないとの報告がある(Chung and Ferl, 1999)。このことから、この同定結果が正しいといえる。また、*Osmotin* (At4g11650)、*HSP 90-like protein* (At4g24190)などの細胞修復・防御、細胞死・老化に関する遺伝子が同定された。根は浸透圧を中心とした水ストレスを最初に感受する器官であると考えられている。根は、浸透圧、塩などの様々なストレスに対しての感受性が高く、最近の報告では、ストレスに対して、地上部よりも地下部で10-100倍の感受性の高さを示す遺伝子の存在も報告されている(Kreps et al., 2002)。そのために、今回の解析からもストレスに関する遺伝子が根器官で多く同定されたものと考えられる。

花において、転写関連に分類される転写因子が同定された。その中でも形態形成に関する転写因子がいくつか同定された。花においては、花のホメオティック遺伝子 *APETALA1* (*API*, At1g69120)、*APETALA3* (*AP3*, At3g54340)、MADS-box タンパク質 *PISTILLATA*, (*PI*, At5g20240)、*SEPALLATA3*(*SEP3*, At1g24260)、*LUMINIDEPENDENS* protein (*LD*, At4g02560)が同定された(Gustafson-Brown et al., 1994; Jack et al., 1994; Li et al., 2001; Honma and Goto, 2000; Zhang and van Nocker, 2002)。しかしながら、葉では器官形成に関する転写因子が同定されなかったことは、ペアワイズコリレーション解析の結果と一致しているように(図2-2)、花は葉が特殊化された器官であるという説を支持する結果だと考えられる(Saedler, 2001)。

今回の解析で同定された遺伝子に関して、unknown protein、hypothetical protein、putative protein にアノテーションされた機能未知遺伝子は合計67遺伝子であった。これら遺伝子は、潜在的に新規遺伝子の可能性がある。今回同定した29%の遺伝子が新規遺伝子であることが考えられる。

細胞内局在

全体でのk-meansクラスタリング解析を行った結果、CL1、CL2、CL5クラスターは、高い割合でプラスチド移行シグナルを有するタンパク質を含んでいた(図2-4)。これらクラスターは、葉での発現が高い遺伝子を多数含むクラスターであった(図

2-3)。また、総当り解析を行った結果(図 2-1)、葉特異的発現遺伝子と同定された遺伝子群は、プラスチド移行シグナルを有するタンパク質が 56%と大部分を占めていた(図 2-8)。このことは、アノテーションからの考察と同様、葉が葉緑体を多数含む物質生産の場として特殊化されている器官だということを示している。

それに対し、ミトコンドリア移行シグナルを有するタンパク質の検索を行ったが、どのクラスターでもほぼ同様な割合で存在していた。これは、ミトコンドリアがどの器官でもほぼ均等に存在していることが考えられる。

CL14 に含まれる遺伝子は、分泌タンパク質が 35%と高い割合を占めていた(図 2-4)。このクラスターは、15 種類に分類したクラスターの中でも、唯一、非常に強い根での発現特異性を示す遺伝子群が形成するクラスターであった。それに重なる形で、総当り解析を行った結果、根特異的発現遺伝子と同定された遺伝子群では分泌タンパク質が 19%と比較的高いことが示されていた。CL14 クラスターの遺伝子は、総当り解析を行った場合の根特異的発現遺伝子と同定された遺伝子とすべて重複しており、他器官との発現比が 4.0 以上の遺伝子群であった。根で発現性の高い遺伝子群に分泌タンパク質が多数含まれているが、この理由の 1 つとして、根圏での水分・養分吸収を最適化するために、細胞外に多数の分泌物を排出していると考えられる。例えば、根圏からのリン吸収に参与する酸性ホスファターゼなどが挙げられる(Haran et al., 2000)。つまり、根圏での分泌物の排出現象は、根で発現する遺伝子に多数の分泌タンパク質が含まれることを説明できる 1 つの現象である。

今後の展望

これまで、Differential Display などの手法によって、網羅的な遺伝子同定が行われてきている(Mandaokar et al., 2003)。しかしながら、これらの手法は、遺伝子同定を主な目的としているために、遺伝子発現の変化が見られない遺伝子は、ほとんどの場合で同定されない。マイクロアレイは、アレイ上のスポットを全体的に解析するので、遺伝子同定だけではなく、全体像を追跡するのに都合が良いシステムである。今回の解析で、系統的な遺伝子発現解析を行い、全体像を捉えたことで、花は葉の相同器官であるという植物の器官系統に関する知見を示した。また、新たな知見として、細胞内局在の解析から根で特異的に発現する遺伝子は、分泌タンパク質の占める割合が高いということが示された。このことは cDNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析が、全体像を捉えることで、新たな知見を得るのにも有効であることが示された。

さらに、今回の解析で、総当り解析を行うことで、効率的かつ精度が高い器官特異的発現遺伝子の同定を行うことができた。ノザン解析での結果、および過去の知見からの一致を考えると、その精度は高いと考えている。その際、多数の未知遺伝子の同定も可能であった。

これら器官特異的発現遺伝子の同定は、分子育種分野でも非常に興味深い内容である。トランスジェニック植物体を用いた分子育種において、器官特異的発現プロモーターの利用は、目的に応じた生産性を目指す上で、非常に興味深いものであり、現実

に利用可能とされているプロモーターも存在する。例えば、緑色器官に關すれば、光合成に關与する ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase の小サブユニット(rbcS)、chlorophyll a/b binding protein (CAB)、glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase の A サブユニット(GapA)をコードする遺伝子のプロモーターが利用されている。これらは緑色器官で高発現し、光によって誘導される。根での発現調節可能なシステムは、産業的な目的のために重要性があると考えられる。この理由としては、ファイトレミディエーション、リゾセクレーションへの適用が考えられるからである(Yoshida and Shinmyo, 2000)。例えば、根特異発現プロモーターとして、hyoscyamine 6 β -hydroxylase (AbH6H)、purescine N-methyltransferase (PMT)、mannopine synthase (mas2')をコードする遺伝子のプロモーターなどが解析されている(Suzuki et al., 1999; Shoji et al., 2000; Borisjuk et al, 1999)。改変 mas2' プロモーターに分泌シグナルペプチドと GFP を連結させた融合タンパク質をタバコに形質導入し、根におけるリゾセクレーションの可能性を調べた報告もある(Borisjuk et al, 1999)。今回の解析で、229 種類の器官特異発現遺伝子を同定できた。言い換えれば、新規な器官特異的発現の有用プロモーター候補を得たともいえる。次の段階として、新規プロモーターを収集するために、今回の同定結果と公開されているゲノム、完全長 cDNA 情報を組み合わせることが重要である(The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Seki et al., 2002)。現在、我々のグループでは、特に根特異性プロモーターについて注目をして、プロモーター配列のカタログ化を行っている。その中でもノザン解析を行い、根での特異発現性が確認された 27 遺伝子について、完全長 cDNA 情報とゲノム情報を組み合わせた形でのシス因子検索を行った(表 2-7)。完全長 cDNA 情報が存在する 26 遺伝子は、転写開始点と予測される上流 1kb についての検索を行った。完全長 cDNA 情報が存在しなかった At3g54580 は、開始コドン上流の 1.5kb についての検索を行った。シス因子検索には PLACE 上の PLACE Signal Scan Search を用いて行った(<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>)。特に根器官での発現に關与するとされているシス因子、*as-1* element、ACGT motif、NtBBF1 binding site、ATATT motif、telo-box の 5 種類に關しての有無を調べた(表 2-7)(Redman et al., 2002; Klinedinst et al., 2002; Salinas et al., 1992; Baumann et al., 1999; Elmayer and Tepfer, 1995; Tremousaygue et al., 1999)。その結果、26 遺伝子のプロモーター予測部位において、上記 5 種類、いずれかのシス配列が検索された。しかしながら、At1g76930 に關しては、検索されなかった。つまり、At1g76930 に關しては、他のシス配列の關与、あるいは mRNA 安定性の現象などが起因となる mRNA の蓄積が考えられる(Hua et al., 2001)。今後、同定された遺伝子プロモーターがどのような応答を示すのかを調べるために、レポーター遺伝子を用いた解析、シス配列を認識する転写因子同定を行うなどの詳細な解析が期待される。

(A)

Cy3 Cy5	葉	根	花	莖
葉	1	5	9	13
根	2	6	10	14
花	3	7	11	15
莖	4	8	12	16

(B)

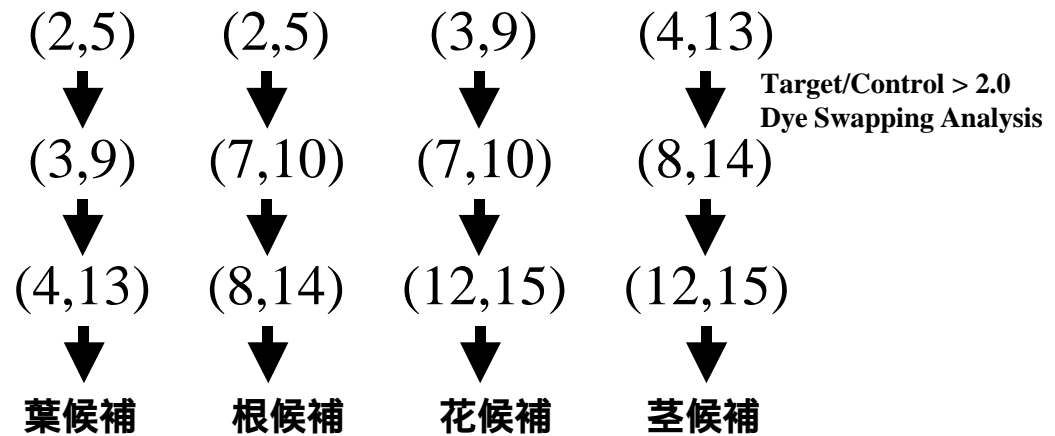


図2-1. 器官別遺伝子発現プロファイルの作成

(A)は、Cy3、Cy5のダイスワッピングも含めて作成した16種類の遺伝子発現プロファイルを示している。赤字は、同一サンプルによる解析を示している。(B)は、器官特異的発現遺伝子を同定するために行った手順を示している。例えば、葉候補を同定するために、葉(Target)/根(Control)>2.0 葉/花>2.0 葉/莖>2.0以上の全てであてはまるクローンを選抜する。

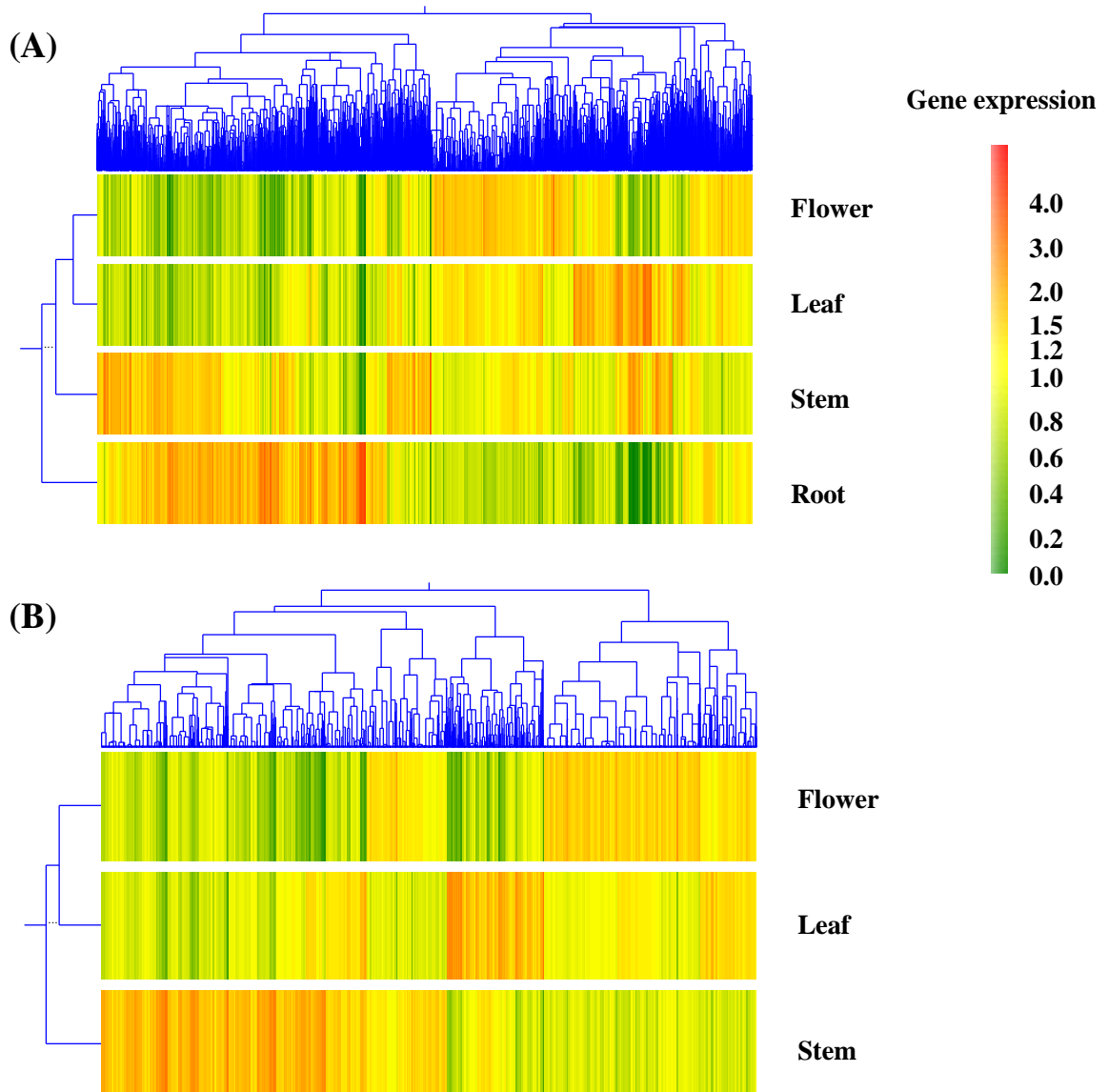


図2-2. 器官別遺伝子発現プロファイルのペアワイズ相関解析
 5,241遺伝子の遺伝子発現に関して、遺伝子クラスタリング（横方向）、実験クラスタリング（縦方向）を行った結果を示す。(A)は、花、葉、茎、根の4器官での解析を示す。(B)は、花、葉、茎の地上部3器官での解析を示す。

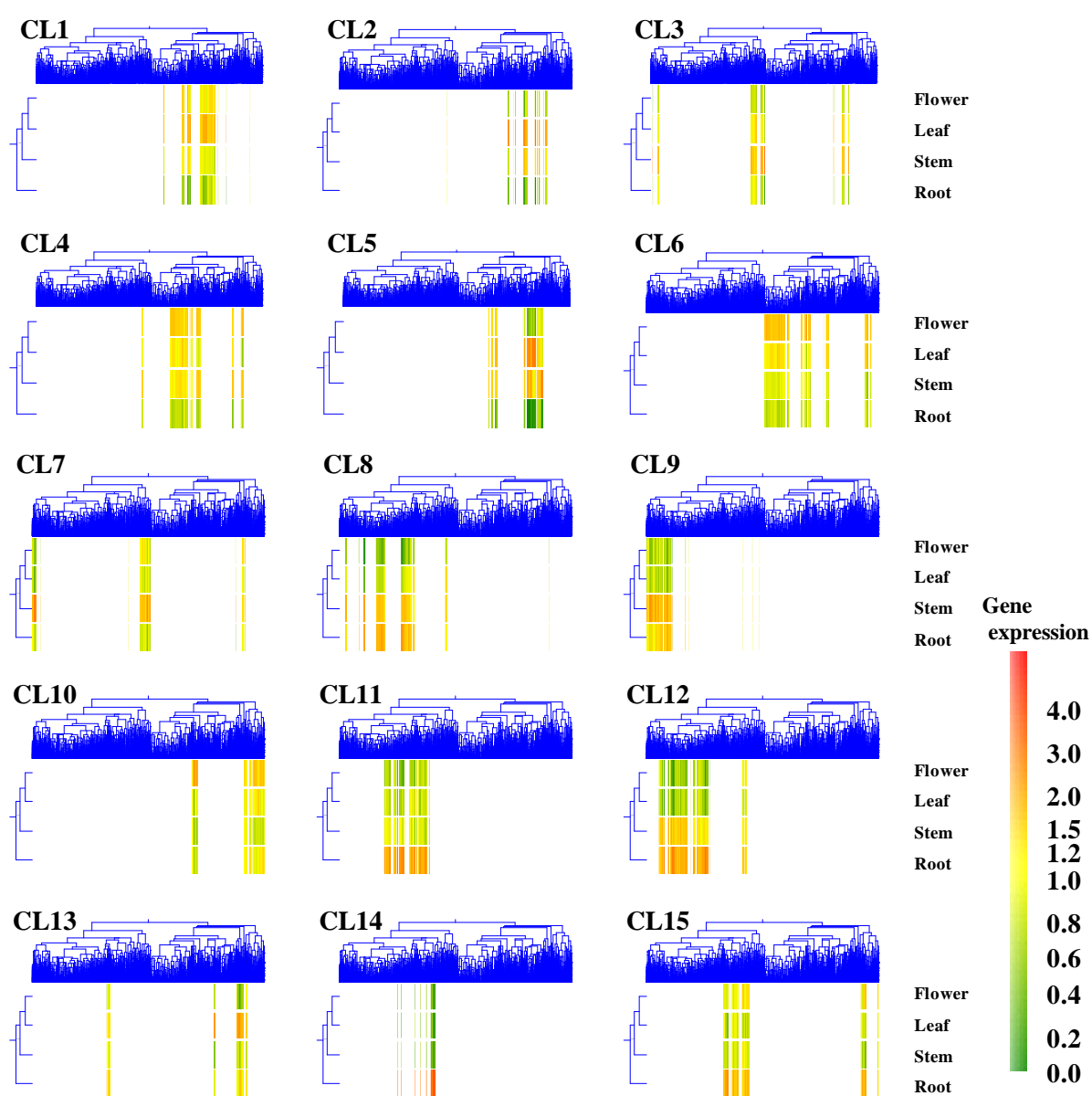


図2-3. 器官別遺伝子発現のk-meansクラスタリング解析

5,241遺伝子の遺伝子発現に関して、k-meansクラスタリング解析を行った結果を示している。発現パターンの違いで、各々の遺伝子を15種類のグループに分類した。CL数字は便宜的に名付けたクラスター名である。例えば、CL14は、根での発現特異性が高い遺伝子が集合しているクラスターである。

表 2-1. k-means クラスタリング解析による各クラスター情報

Cluster	Genes ^a	Clones ^b	Expression Pattern ^c
CL1	375	429	Leaf, Flower/Leaf, Flower/Leaf/Stem
CL2	187	222	Leaf, Leaf/Stem
CL3	190	235	Stem, Leaf/Stem
CL4	479	537	Flower/Stem, Flower/Leaf/Stem
CL5	243	388	Leaf/Stem
CL6	679	780	Flower, Flower/Leaf
CL7	250	307	Stem, Flower/Stem
CL8	326	443	Root/Stem, Leaf/Root/Stem
CL9	408	486	Stem, Root/Stem
CL10	358	412	Flower/Leaf/Root/Stem
CL11	418	515	Root, Root/Stem
CL12	642	818	Root/Stem, Flower/Root/Stem
CL13	182	216	Leaf, Leaf/Root
CL14	86	125	Root
CL15	418	480	Root, Flower/Root

a : クラスタに含まれる遺伝子数を示している。b : クラスタに含まれるクローン数を示している。c : クラスタに含まれる遺伝子が発現を示す器官を表している。例として CL1 は、Leaf は葉のみで発現する遺伝子、Flower/Leaf は葉と花で発現する遺伝子、Flower/Leaf/Stem は花と葉と茎で発現する遺伝子を示しており、3 種類の発現パターンを示す遺伝子が存在するクラスターであることを意味している。

表 2-2. k-means クラスタリング解析による各クラスターへの MIPS Functional Category による分類

	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CL6	CL7	CL8	CL9	CL10	CL11	CL12	CL13	CL14	CL15
METABOLISM	31(0.1)	23(0.0)	14(0.0)	22(8)	23(0.6)	30(0.1)	8(4)	29(0.3)	26(0.0)	11(5)	49(3.2)	33(0.9)	15(5)	11(0)	19(0)
ENERGY	9(4)	13(9)	9(8)	6(5)	23(19)	8(6)	4(3)	16(13)	10(8)	6(5)	39(3.2)	19(1.7)	4(4)	6(6)	9(7)
TRANSCRIPTION	4	2(1)	5(1)	13(6)	3(1)	17(8)	10(5)	5(3)	17(5)	9(6)	18(5)	23(8)	6	2	6(1)
DEVELOPMENT	0	1(1)	2(2)	0	0	4(3)	1(1)	0	2(1)	1(1)	2(1)	3(2)	1(1)	0	0
CELL GROWTH, CELL DIVISION AND DNA SYNTHESIS	0	1(1)	1(1)	1	2(2)	8(4)	2	2(2)	1	4(1)	2(2)	3(2)	0	0	2(1)
CELLULAR BIOGENESIS	4(4)	1(1)	5(5)	3(2)	2(1)	6(2)	2(1)	1(1)	2(1)	2(1)	3(3)	6(3)	4(2)	1(1)	1
CELLULAR ORGANIZATION	8(7)	9(6)	6(4)	10(8)	17(0.4)	16(0.1)	4(3)	22(0.6)	10(6)	13(7)	17(0.4)	10(8)	2(2)	3(2)	7(6)
CELLULAR COMMUNICATION SIGNAL TRANSDUCTION	8(3)	1(1)	7(2)	11(2)	3	19(8)	8(1)	14	11(5)	5	8(2)	14(2)	4	1(1)	11(2)
TRANSPORABLE ELEMENTS, VIRAL AND PLASMID PROTEINS	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TRANSPORT FACILITATION	2(1)	1	2	5(1)	2(1)	7(2)	1	14(9)	3	1	6(4)	3	5(1)	0	2(1)
PROTEIN SYNTHESIS	4(1)	6(1)	0	1	2	8(1)	0	3	2(1)	13(0)	13	17(0)	2	1	30(0)
PROTEIN DESTINATION	4(2)	4	0	6(2)	2(2)	10(2)	5(1)	11(2)	7(3)	7(3)	8(2)	13(5)	3(1)	2	11(2)
CELLULAR TRANSPORT AND TRANSPORT MECHANISM	3(3)	0	2(1)	2(1)	2(2)	4(1)	1(1)	10(5)	5(2)	3(1)	5(3)	10(4)	1(1)	0	3(1)
CELL RESCUE, DEFENSE, CELL DEATH AND AGEING	7(1)	1	1	4	1(1)	7(1)	3(1)	6(1)	8(4)	4(1)	14(4)	8(4)	3(1)	3(1)	9(1)
UNCLASSIFIED, CLASSIFICATION NOT YET CLEAR-CUT	309	141	152	410	192	564	211	228	327	296	292	520	142	65	323
Total	375	187	190	479	243	679	250	326	408	358	418	642	182	86	418

0内の数字は他の分類との重複を示している。

表 2-3. k-means クラスタリング解析による各クラスターの TargetP 解析

Cluster No.	Plastid	Mitochondria	Secretory pathway	No target ^a	Total Genes
CL1	143	37	52	143	375
CL2	91	9	16	71	187
CL3	39	12	30	109	190
CL4	59	39	75	306	479
CL5	103	9	32	99	243
CL6	117	83	84	395	679
CL7	32	25	32	161	250
CL8	58	30	35	203	326
CL9	48	33	41	286	408
CL10	46	45	36	231	358
CL11	54	58	48	258	418
CL12	69	67	63	443	642
CL13	35	14	25	108	182
CL14	3	6	30	47	86
CL15	36	66	50	266	418
Genome ^b	3592	2604	4237	14792	25225

a : TargetP により、分類されなかったタンパク質

b : 全ゲノム構造解析から予測されるタンパク質に関する TargetP 解析の結果を示す。

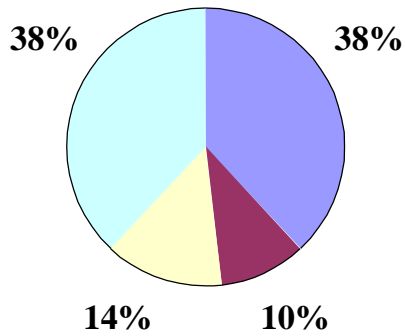
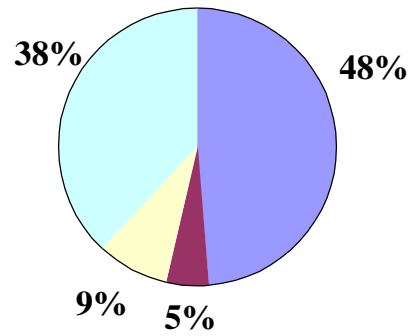
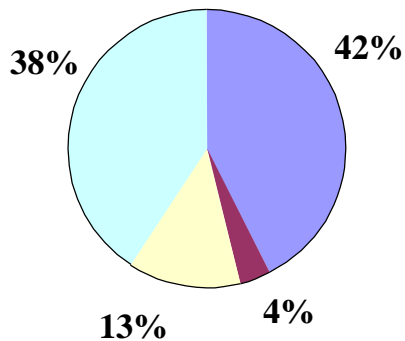
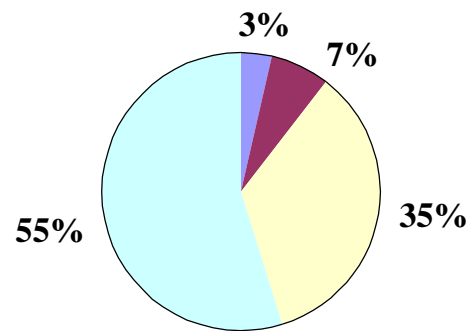
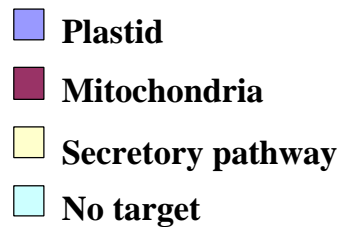
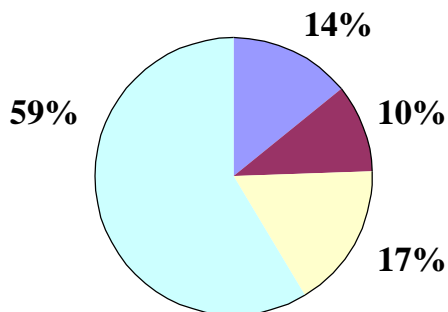
CL1**CL2****CL5****CL14****Genome**

図2-4. k-meansクラスタリング法により分類された代表的なクラスターに含まれる遺伝子の細胞内局在予測
 k-meansクラスタリング法によって分類した15種類の遺伝子群の特徴を捉えるために、TargetP解析による細胞内局在予測を行った。その中でも特徴的なクラスターを示す。CL1、CL2、CL5は、葉での発現特異性が高い遺伝子を多数含むクラスターである。CL14は、根での発現特異性が高い遺伝子が集合したクラスターである。Genomeは、ゲノム構造解析により予測された全遺伝子をTargetPによる解析を行い、細胞内局在予測を行った結果を示している。

表 2-4. 器官特異的發現遺傳子

Leaf-specific expression genes

LOCUS	Gene Identification	Control	Leaf	Leaf/Cont.
At3g45140	lipoxygenase (AtLox2)	1385	20193	14.6
At3g01500	carbonic anhydrase, chloroplast precursor	2864	40735	14.2
At1g09340	putative RNA-binding protein	2976	31901	10.7
At4g38970	fructose-bisphosphate aldolase like protein	6238	61433	9.8
At3g09630	putative 60S ribosomal protein L1	15797	155422	9.8
At1g42970	putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2272	21023	9.3
At5g38420	RuBisCO small subunit 2b	5852	53483	9.1
At2g39730	Rubisco activase	4546	40369	8.9
At3g55800	sedoheptulose-bisphosphatase precursor	2447	20650	8.4
At5g14740	CARBONIC ANHYDRASE 2	2376	19333	8.1
At4g37930	glycine hydroxymethyltransferase like protein	3930	31183	7.9
At2g17340	unknown protein	23531	181106	7.7
At1g12900	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A	4498	33493	7.4
At2g39010	putative aquaporin (water channel protein)	2064	15314	7.4
At5g64040	photosystem I reaction centre subunit psaN precursor	6965	48129	6.9
At5g38410	RuBisCO small subunit 3b	39151	267023	6.8
At5g65010	asparagine synthetase	1133	7640	6.7
At1g69530	expansin-like protein	1332	8814	6.6
At5g09660	microbody NAD-dependent malate dehydrogenase	2506	16568	6.6
At5g66880	protein kinase	6166	37421	6.1
At1g30380	Photosystem I Subunit K (PsaK)	8102	48147	5.9
At4g00360	probable cytochrome P450	1595	9354	5.9
At1g20340	Plastocyanin (PetE2)	7560	41393	5.5
At4g31160	unknown protein	3098	16954	5.5
At3g12780	phosphoglycerate kinase like protein	8862	48264	5.4
At4g09580	unknown protein	2104	11322	5.4
At1g20020	ferredoxin--NADP reductase precursor, putative	1699	9059	5.3
At1g08380	unknown protein	6628	35076	5.3
At4g27520	early nodulin-like 2 predicted GPI-anchored protein	1075	5680	5.3
At5g40610	dihydroxyacetone 3-phosphate reductase (dhaprd)	5082	26589	5.2
At2g21330	fructose bisphosphate aldolase like protein	1270	6646	5.2
At5g04140	ferredoxin-dependent glutamate synthase	1566	8089	5.2
At5g53930	unknown protein	1878	9467	5.0
At1g60950	ferredoxin precursor	5142	25667	5.0
At3g14420	glycolate oxidase like protein	2444	12161	5.0
At3g50820	putative protein 1 photosystem II oxygen-evolving complex	4717	23331	4.9
At3g62410	CP12 protein precursor-like protein	2676	12901	4.8
At4g21280	photosystem II oxygen-evolving complex protein 3 - like	10786	51490	4.8
At2g35330	unknown protein	2789	13312	4.8
At4g03280	unknown protein	4217	20029	4.7
At1g21600	unknown protein	3880	18325	4.7
At3g04790	putative ribose 5-phosphate isomerase	1314	6170	4.7
At1g79040	unknown protein	5241	24193	4.6
At1g11860	aminomethyltransferase-like precursor protein	5393	24358	4.5

At1g25540	hypothetical protein	2363	10457	4.4
At3g24030	hydroxyethylthiazole kinase, putative	3779	16336	4.3
At3g63160	unknown protein	1760	7581	4.3
At1g44575	Photosystem II chlorophyll-binding protein PsbS	3280	13920	4.2
At2g15620	ferredoxin--nitrite reductase	1123	4688	4.2
At1g16880	Unknown protein (F6I1.12)	3115	12870	4.1
At3g54050	fructose-bisphosphatase precursor	2232	9149	4.1
At1g67080	unknown protein	4992	20449	4.1
At4g22890	unknown protein	3006	12194	4.1
At3g02730	thioredoxin f1	1438	5477	3.8
At3g11630	putative 2-cys peroxiredoxin	4213	15691	3.7

Root-specific expression genes

LOCUS	Gene Identification	Control	Root	Root/Cont.
At1g21310	extensin 3 (atExt3)(AtExt5)	2550	144463	56.6
At3g54580	extensin precursor -like protein	1755	75621	43.1
At4g33720	pathogenesis-related protein 1 precursor, 19.3K	1868	78632	42.1
At1g11580	unknown protein	1787	74685	41.8
At1g76930	extensin 4 (atExt4)	2485	96613	38.9
At2g05510	putative glycine-rich protein	1689	43558	25.8
At5g26280	unknown protein	1841	44900	24.4
At2g17440	unknown protein	1873	45679	24.4
At1g66270	beta-glucosidase	2158	50672	23.5
At1g77120	alcohol dehydrogenase	1440	30118	20.9
At3g16400	putative jasmonate inducible protein	2405	43071	17.9
At4g33070	pyruvate decarboxylase-1 (Pdc1)	2255	39914	17.7
At3g61860	ARGININE/SERINE-RICH SPLICING FACTOR RSP31	1575	26908	17.1
At3g43190	sucrose synthase like protein	1936	31802	16.4
At5g20830	sucrose-UDP glucosyltransferase	2885	44688	15.5
At1g69880	thioredoxin like protein	1913	29059	15.2
At1g66280	beta-glucosidase, putative	1815	26689	14.7
At2g01520	unknown protein	2103	28500	13.6
At4g11650	osmotin precursor	1358	17828	13.1
At1g73260	putative trypsin inhibitor (At1g73260)	2373	29976	12.6
At1g26250	hypothetical protein	2819	34769	12.3
At1g19530	unknown protein	1444	17248	11.9
At1g49570	peroxidase like protein	1593	18158	11.4
At3g52930	fructose bisphosphate aldolase - like protein	4106	46562	11.3
At2g01530	unknown protein	2461	27764	11.3
At2g31390	putative fructokinase	2080	22957	11.0
At5g26260	unknown protein	1457	14963	10.3
At3g16460	putative jasmonate inducible protein (MDC8.9/AT3g16460)	2059	20893	10.1
At2g44080	unknown protein (At2g44080)	3024	29655	9.8
At2g02130	protease inhibitor II	2524	23148	9.2
At3g09100	putative mRNA capping enzyme, RNA guanylyltransferase	2280	20134	8.8
At2g36220	unknown protein	2161	18969	8.8
At4g16260	beta-1,3-glucanase class I precursor	1976	16698	8.5
At1g19180	unknown protein	2329	19670	8.4
At4g11320	cysteine proteinase like protein	1568	12916	8.2
At3g32980	peroxidase, putative	2157	17569	8.1
At3g02550	unknown protein	1697	13736	8.1
At4g21830	unknown protein	1752	13956	8.0
At5g61220	unknown protein	2557	20103	7.9
At5g07350	unknown protein	2442	18544	7.6
At3g10040	unknown protein	1353	10039	7.4
At4g32480	putative protein	4039	29443	7.3
At1g66590	hypothetical protein	8100	58418	7.2
At1g54010	unknown protein	1235	8634	7.0
At1g17290	alanine aminotransferase (ALAAT1)	2461	16879	6.9
At4g14320	ribosomal protein	5660	35270	6.2

At4g10040	cytochrome c	5138	30951	6.0
At4g34050	caffeoyl-CoA O-methyltransferase - like protein	6952	41314	5.9
At3g15210	ethylene responsive element binding factor 4	5414	31694	5.9
At1g09740	putative ER6 protein	1302	7444	5.7
At1g13260	unknown protein	3572	20296	5.7
At1g06620	oxidoreductase, putative	3427	19193	5.6
At5g19550	aspartate aminotransferase (Asp2)	2388	13350	5.6
At3g02220	unknown protein	8032	43976	5.5
At1g49240	actin 11 like protein	13777	74946	5.4
At4g38470	protein kinase like protein	2935	15341	5.2
AK118194	(No entry)	5344	27325	5.1
At3g12580	putative protein	3202	16232	5.1
At1g35140	phosphate-induced (phi-1) protein, putative	1380	6898	5.0
At1g03220	unknown protein	2758	13765	5.0
At2g16060	class 1 non-symbiotic hemoglobin (AHB1)	1410	6944	4.9
At4g30450	glycine-rich protein	1915	9420	4.9
At3g23430	PHO1 protein (PHO1)	1947	9571	4.9
At4g09030	arabinogalactan-protein AGP10	2092	10044	4.8
At4g30280	xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase-like protein	1328	6267	4.7
At2g01140	putative fructose-bisphosphate aldolase, plastidic form	2443	11390	4.7
At1g09560	germin-like protein	2612	12101	4.6
At5g44380	berberine bridge enzyme-like protein	1453	6728	4.6
At1g27730	putative salt-tolerance zinc finger protein	2666	12181	4.6
At2g38470	putative WRKY-type DNA binding protein	3168	14465	4.6
AK118085	(No entry)	3439	15691	4.6
At1g35580	invertase, putative	3429	15445	4.5
At5g07440	glutamate dehydrogenase 2 (GDH2)	4893	22013	4.5
At4g31720	Transcription factor II homolog	2106	9390	4.5
At5g17920	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	13786	58491	4.2
At3g23170	unknown protein	3072	12965	4.2
At3g16450	putative lectin	1840	7682	4.2
At1g06640	putative Iron/Ascorbate oxidoreductase family protein	6549	27260	4.2
At1g62975	putative bHLH transcription factor (bHLH125)	1568	6488	4.1
At5g27640	TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 9-like protein	6164	25459	4.1
AC009243	(No entry)	2029	8272	4.1
At5g23020	2-isopropylmalate synthase-like protein	2254	9154	4.1
At2g40000	putative nematode-resistance protein	8420	33731	4.0
At4g26970	aconitase like protein	2229	8920	4.0
At4g39675	(No entry)	1534	6071	4.0
At5g56010	heat shock protein 90	5615	22228	4.0
At1g21110	O-methyltransferase like protein	1755	6890	3.9
At4g29780	unknown protein	2007	7807	3.9
At3g22850	unknown protein	1917	7426	3.9
At5g22630	chorismate mutase/prephenate dehydratase-like protein	1574	6057	3.8
At1g18270	unknown protein (At1g18270)	3014	11464	3.8
At4g39980	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase	3367	12786	3.8
At1g76790	catechol O-methyltransferase like protein	1810	6843	3.8
At5g08690	H ⁺ -transporting ATP synthase beta chain (mitochondrial) -like protein	2581	9647	3.7

At5g28540	luminal binding protein	2935	10838	3.7
At1g17450	hypothetical protein	5776	21035	3.6
At2g27080	Unknown protein (At2g27080; T20P8.13)	2281	8302	3.6
At4g36990	heat shock transcription factor HSF4	2187	7878	3.6
At4g17500	ethylene responsive element binding factor 1	2856	10238	3.6
At1g18740	unknown protein	3434	12216	3.6
At1g72360	putative AP2 domain transcription factor	1747	6211	3.6
At1g43800	stearoyl acyl carrier protein desaturase, putative	2008	7111	3.5
At3g45640	mitogen-activated protein kinase 3	3027	10701	3.5
Y08501	(No entry)	25396	87893	3.5
At2g36460	putative fructose biphosphate aldolase	5095	17588	3.5
At1g75200	unknown protein (At1g75200)	1889	6382	3.4
At1g15750	unknown protein (At1g15750)	3292	11115	3.4
At4g34200	Phosphoglycerate dehydrogenase - like protein	5582	18750	3.4
At2g40140	putative CCCH-type zinc finger protein	4775	15808	3.3
At5g08670	H ⁺ -transporting ATP synthase beta chain (mitochondrial) -like protein	3853	12712	3.3
At5g02500	dnaK-type molecular chaperone hsc70.1	2684	8764	3.3
At4g23850	acyl-CoA synthetase - like protein	3366	10860	3.2
At3g08580	adenylate translocator	8686	27684	3.2
At5g64260	phi-1-like protein	2277	7169	3.1
At3g23030	auxin-inducible gene (IAA2)	4728	14735	3.1
At4g33090	Aminopeptidase like protein	2053	6381	3.1
At4g13940	adenosylhomocysteinase	28084	86648	3.1
At3g09630	putative 60S ribosomal protein L1	5638	16907	3.0
At1g26270	unknown protein	2139	6400	3.0
At3g03270	unknown protein	2153	6421	3.0
At1g15670	putative protein	3749	11140	3.0
At5g37510	putative NADH dehydrogenase (ubiquinone) 76K chain precursor protein	2937	8664	2.9
At3g46600	scarecrow-like protein	3179	9147	2.9
At4g30440	nucleotide sugar epimerase-like protein	2562	7235	2.8
At4g00570	putative malate oxidoreductase	2112	5731	2.7
At3g01470	homeobox protein (HAT5)	1958	5214	2.7
At5g03300	adenosine kinase (MOK16.21)	3210	8236	2.6
At3g02090	putative mitochondrial processing peptidase	2604	6638	2.5
At4g24190	HSP90-like protein	2962	6836	2.3
At5g58430	leucine zipper-containing protein	3934	9057	2.3

Flower-specific expression genes

LOCUS	Gene Identification	Control	Flower	Flower/Cont.
At1g24020	pollen allergen-like protein	770	11734	15.2
At4g03210	putative xyloglucan endotransglycosylase	1516	21075	13.9
At3g08770	putative nonspecific lipid-transfer protein	747	9771	13.1
At5g20240	PI protein (PISTILLATA)	1431	17240	12.0
At2g16590	unknown protein	25455	239270	9.4
At1g69120	unknown protein	578	4657	8.1
At3g54340	floral homeotic protein APETALA3 (AP3)	893	7021	7.9
At1g53160	squamosa promoter binding protein-like 4 (spl4)	605	3586	5.9
At1g24260	floral homeotic protein, AGL9	1338	6989	5.2
At5g23940	Acyltransferase	640	2969	4.6
At3g28500	acidic ribosomal protein P2b (rpp2b), putative	828	3573	4.3
At5g45670	GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein	1092	4657	4.3
At3g58760	unknown protein	42447	160354	3.8
At2g28250	putative protein kinase	958	3226	3.4
At1g55510	branched-chain alpha-keto acid decarboxylase E1 beta subunit	1880	5982	3.2
At3g41950	(No entry)	85716	268077	3.1
At3g08520	hypothetical protein	1681	5196	3.1
At1g53070	protein kinase, putative	969	2863	3.0
At4g01410	putative hypoersensitive response protein	996	2907	2.9
At3g12740	unknown protein	12521	35635	2.8
At4g02560	LUMINIDEPENDENS protein	27213	76996	2.8

Stem-specific expression genes

LOCUS	Gene Identification	Control	Stem	Stem/Cont.
At1g20620	unknown protein	3111	39346	12.6
At1g28280	unknown protein	2756	28108	10.2
At5g45560	unknown protein	1362	10848	8.0
At2g21660	glycine-rich RNA binding protein	3455	23083	6.7
At3g13750	galactosidase, putative	3730	23631	6.3
At2g34420	photosystem II type I chlorophyll a/b binding protein	10983	57390	5.2
At1g75800	thaumatin, putative	2951	13247	4.5
At4g39090	drought-inducible cysteine proteinase RD19A precursor	15061	65899	4.4
At3g56940	putative dicarboxylate diiron protein (Crd1)	20892	90070	4.3
At5g56870	beta-galactosidase (emb CAB64740.1)	3466	14548	4.2
At5g19140	aluminium-induced protein - like	2530	10535	4.2
At1g05850	putative endochitinase	4433	16333	3.7
At2g22980	putative serine carboxypeptidase I	1406	5055	3.6
At5g09440	unknown protein	4397	15422	3.5
At3g22970	unknown protein	2967	10347	3.5
At2g03890	unknown protein	2399	8068	3.4
At5g49980	transport inhibitor response 1 protein	1743	5712	3.3
At1g75380	wound-responsive protein, putative	3951	12916	3.3
At5g25280	serine-rich protein	2244	6938	3.1
At3g59060	putative bHLH transcription factor (bHLH065)	1967	5582	2.8
At5g09220	amino acid transport protein AAP2	2132	5809	2.7
At3g01690	unknown protein	1648	4163	2.5

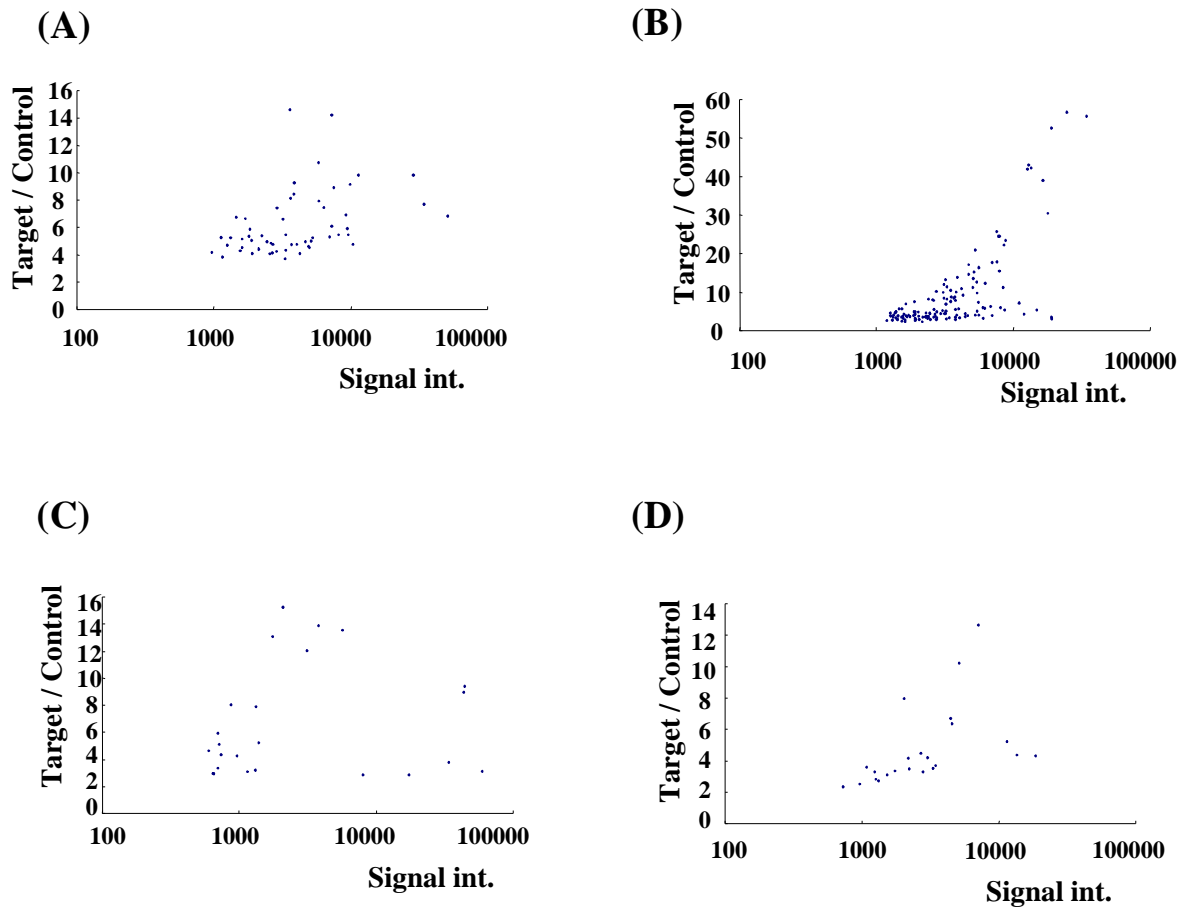


図2-5. 器官特異的発現遺伝子の発現特異性と発現量の相関
 総当り解析により同定した遺伝子の発現比（縦軸）とシグナル強度（横軸）を示した。(A)は葉特異的発現と判断した55遺伝子、(B)は根特異的発現と判断した131遺伝子、(C)は花特異的発現と判断した21遺伝子、(D)は茎特異的発現と判断した22遺伝子を示している。

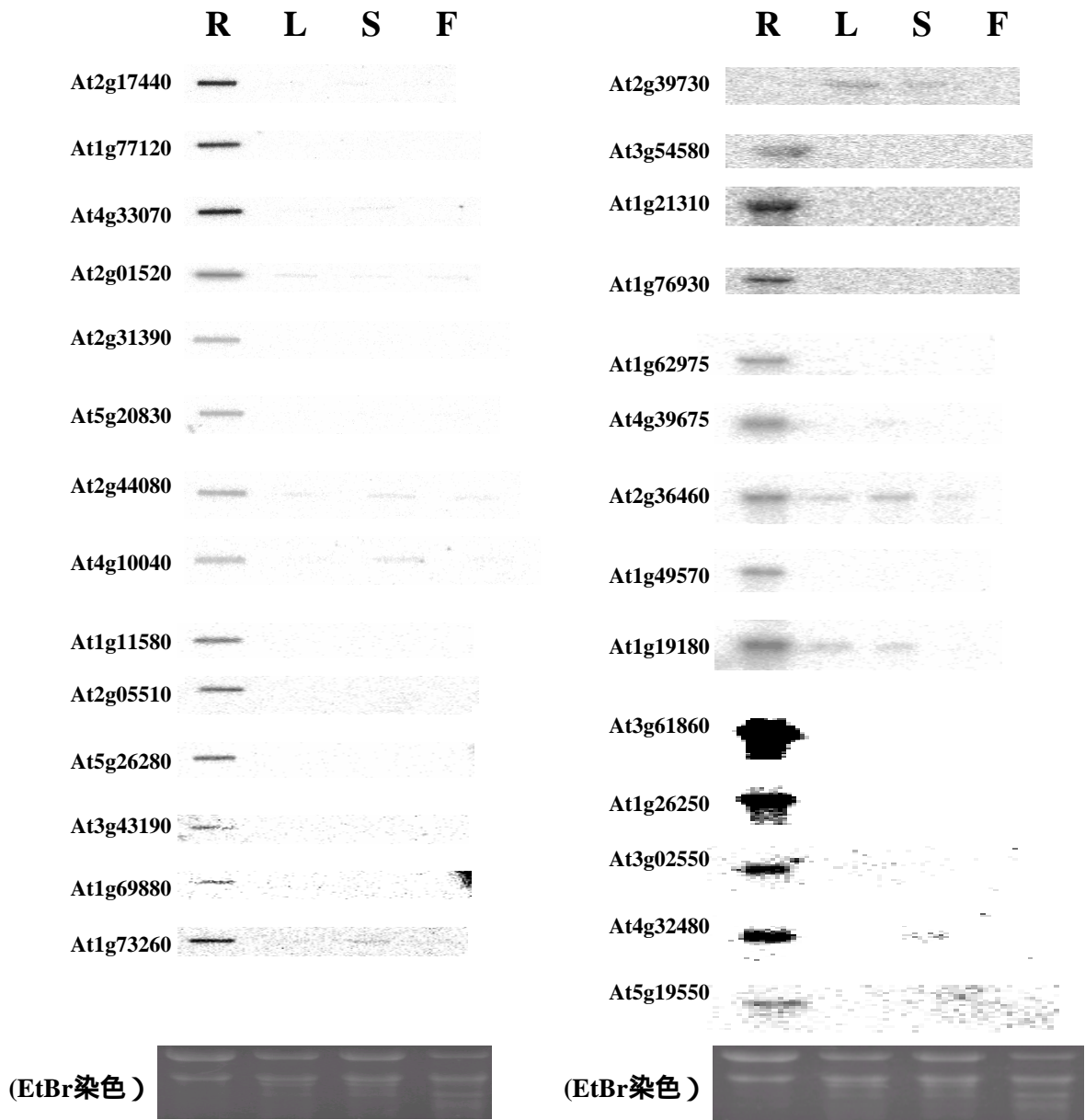


図2-6. 器官特異的発現遺伝子のノザン解析

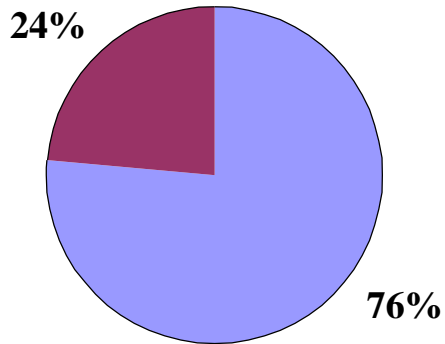
器官特異的発現遺伝子として同定してきた遺伝子のランダムに選んだ28遺伝子について、実験的な正確性を確認するためにノザン解析を行った。Rは根、Lは葉、Sは茎、Fは花由来の全RNAを2 μg使用している。また、最下段の画像は、同量の各器官由来の全RNAを変性アガロースゲル電気泳動を流し、EtBr染色した画像である。At2g39730は、葉特異的発現遺伝子として同定された遺伝子であるが、他の27遺伝子は全て根特異的発現遺伝子として同定された遺伝子である。

表 2-5. 器官特異的発現遺伝子の MIPS Functional Category による分類

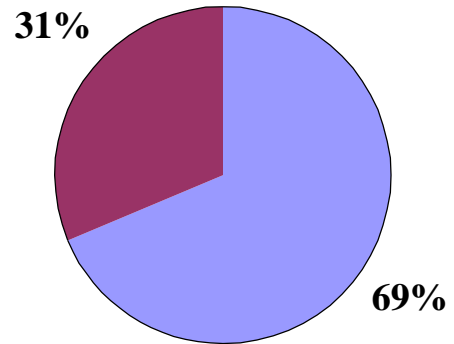
	Leaf	Root	Flower	Stem
METABOLISM	18(13)	22(13)	1(1)	0
ENERGY	14(11)	16(13)	0	0
CELLULAR ORGANIZATION	7(5)	6(5)	0	0
CELL RESCUE, DEFENSE, CELL DEATH AND AGEING	1(1)	5(3)	1	0
TRANSCRIPTION	0	7(3)	5(5)	2
PROTEIN SYNTHESIS	0	2	0	0
PROTEIN DESTINATION	0	1	0	1
CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION	0	3(1)	0	0
CELLULAR BIOGENESIS	0	2(1)	1(1)	0
TRANSPORT FACILITATION	0	2(2)	0	1
CELLULAR TRANSPORT AND TRANSPORT MECHANISMS	0	1(1)	0	0
DEVELOPMENT	0	0	5(5)	0
UNCLASSIFIED PROTEINS	26	61	9	14
CLASSIFICATION NOT YET CLEAR-CUT	6	24	5	4

()内の数値は他の分類との重複数を示している。

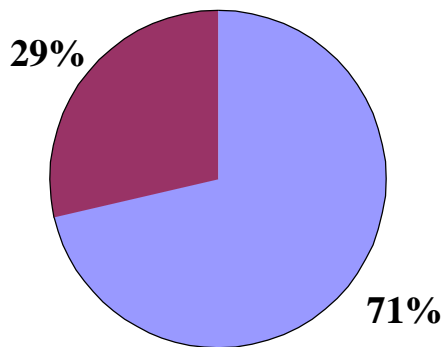
Leaf



Root



Flower



Stem

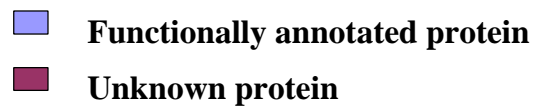
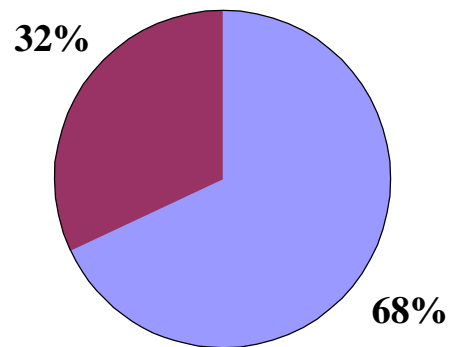


図2-7. 各器官特異的発現遺伝子の機能既知および機能未知遺伝子の分布
器官特異的発現遺伝子として同定してきた遺伝子について、アノテーション情報をもとに、機能既知（および機能推定可能）、機能未知に分類した結果を示す。

表 2-6. 器官特異的発現遺伝子の TargetP 解析

	Leaf	Root	Flower	Stem
Plastid	31	8	2	7
Mitochondria	2	11	3	1
Secretory pathway	3	25	4	7
No target	19	87	12	7

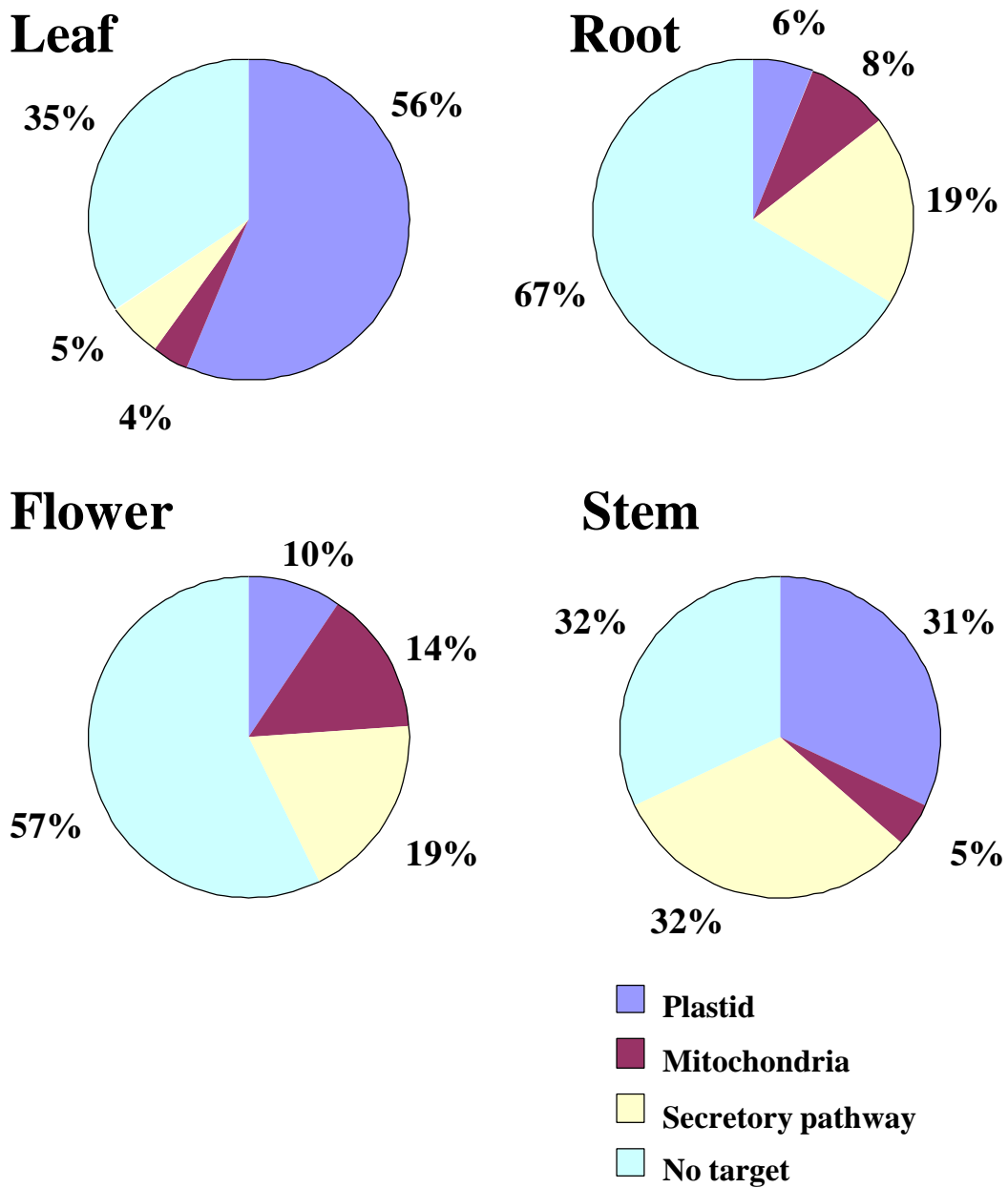


図2-8. 器官特異的発現遺伝子の細胞内局在予測
 器官特異的発現遺伝子として同定してきた遺伝子について、TargetP解析による細胞内局在予測を行った結果を示している。

表 2-7. 根特異的発現遺伝子の予測プロモーター領域の根発現関与シス配列検索

LOCUS	Gene Identification	Cis-element ^a
At1g11580	unknown protein	<i>as-1</i> , ATATT
At1g19180	unknown protein	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At1g21310	extensin 3	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At1g26250	hypothetical protein	<i>as-1</i> , ATATT
At1g49570	peroxidase like protein	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At1g62975	putative bHLH transcription factor	<i>as-1</i> , ATATT
At1g69880	thioredoxin like protein	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At1g73260	putative trypsin inhibitor	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At1g76930	extensin 4	(No entry)
At1g77120	alcohol dehydrogenase	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At2g01520	unknown protein	ATATT
At2g05510	putative glycine-rich protein	NtBBF1, ATATT
At2g17440	unknown protein	<i>as-1</i> , ATATT
At2g31390	putative fructokinase	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At2g36460	putative fructose bisphosphate aldolase	NtBBF1, ATATT
At2g44080	unknown protein	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At3g02550	unknown protein	NtBBF1, ATATT
At3g10040	unknown protein	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At3g43190	sucrose synthase like protein	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At3g54580 ^b	extensin precursor -like protein	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At3g61860	ARGININE/SERINE-RICH SPLICING FACTOR RSP31	<i>as-1</i> , ATATT, telo-box
At4g32480	putative protein	<i>as-1</i> , ATATT
At4g33070	pyruvate decarboxylase-1 (Pdc1)	<i>as-1</i> , NtBBF1, ATATT
At4g39675	(no entry)	<i>as-1</i> , ATATT
At5g19550	aspartate aminotransferase (Asp2)	<i>as-1</i> , ATATT
At5g20830	sucrose-UDP glucosyltransferase	<i>as-1</i> , ATATT
At5g26280	unknown protein	NtBBF1, ATATT

a : 根器官での発現に関与するとされているシス因子、*as-1* element、ACGT motif、NtBBF1 binding site、ATATT motif、telo-box の 5 種類に関する有無を示す。b : 開始コドン上流の 1.5kb についての検索を行った。

第3章 光環境応答の系統的遺伝子発現解析

序論

植物にとっての光は、光合成によるエネルギー生産、概日リズムを導入するなどの生活環境を感知するための情報源である。植物は光量、光質を光受容体により感知し、生理応答を制御している。植物の光受容体は、青色光受容体であるクリプトクロム、フォトトロピン、赤・遠赤色光受容体であるフィトクロムがある (Sullivan and Deng, 2003)。

植物の赤・遠赤色光受容体であるフィトクロムは、種子発芽、芽生えの胚軸伸長、開花、避陰反応、光周性、茎や葉柄の伸長抑制に関与する(Gyula et al., 2003; Chory et al., 1996)。フィトクロムは、アポタンパク質と発色団であるフィトクロモビルン(P Φ B)から構成されている分子量約 125 kD の可溶性色素タンパク質であり、細胞内ではホモダイマーを形成している。構造は、N 末端領域、発色団、C 末端ドメインに分けられる。N 末端領域のフォトリアーゼ反応により、P Φ B が発色団ドメインのシステイン残基にチオエーテル結合する。C 末端ドメインには、2 つの PAS 配列、ヒスチジンキナーゼ様ドメイン、核移行シグナル、ダイマー形成サイトが存在する(Montgomery and Lagarias, 2002)。フィトクロムの光受容部は、発色団である P Φ B である。赤色光を受容することで P Φ B は、ピロール環 C15-C16 位の二重結合部位が Z 型から E 型に光異性化を起こす。P Φ B の光異性化に伴って、フィトクロムタンパク質の構造が Pr 型から Pfr 型に変換される。フィトクロムを介した光シグナルは、P Φ B が光可逆的にフィトクロムタンパク質を吸収極大波長 660 nm の赤色光(Red, R)吸収型 (Pr 型) から吸収極大波長 730 nm の遠赤色光(Far-Red, FR)吸収型 (Pfr 型) に構造変換することで下流に伝達される (図 3-1)。

フィトクロムの生理応答は、フィトクロム分子種、光量、光質によって分類される。遺伝学的な解析を通じて、フィトクロム生理応答の解析が進んでいるシロイヌナズナでは、5 種類のフィトクロム分子種(phyA-E)が存在し、それらが生理応答に作用していることが知られている。PHYA と PHYB は他のフィトクロム分子種よりも生体内での発現量が多く、主要な光応答に関与している。phyA は、強光に不安定で Pfr 型になると速やかに分解され、非可逆的なシグナル伝達の引き金として機能する(Jordan et al., 1997)。また phyB は光に安定で、R による反応の誘導、FR による誘導の打ち消しという光可逆的なスイッチの役割を果たしている。生理的機能として phyA は、種子発芽に関与する超低光量反応(very low fluence responses, VLFR)、胚軸伸長抑制に関与する FR の高照射反応(FR-driven high irradiance responses, FR-HIR)、FR による開花促進、FR の連続照射(continuous FR, cFR)による緑化抑制に作用している。また phyB は、種子発芽での低光量反応(low fluence responses, LFR)、胚軸伸長抑制に関与する R の高照射反応(R-driven high irradiance responses, R-HIR)、R による開花誘導の抑制、避陰反

応、End of Day 反応に作用する。FR-HIR、R-HIR は、 $100 \mu\text{mol m}^{-2}$ 以上の FR および R に対する応答で、発芽直後の芽生えに数日間の連続照射、または 24 時間以上の間歇照射を行うと胚軸伸長抑制を示す。また LFR は、 $0.1-100 \mu\text{mol m}^{-2}$ の R に対して種子発芽の誘導、FR に対しての発芽誘導の打ち消しを示す。VLFR は、 1 nmol m^{-2} 以下の全波長での光によって、種子発芽の誘導を示す (篠村、2001)。

フィトクロムのシグナル伝達経路についても研究が進められている。フィトクロムの細胞内局在性が示されており、VLFR と FR-HIR により、phyA が細胞質から核に移行することが明らかにされている (Kim et al., 2000)。また、R を受容した Pfr 型の phyB は細胞質から核に移行することが示されている (Sakamoto et al., 1996)。さらに、phyB は、細胞質から核に移行後、転写因子である PIF3 と相互作用し、光初期応答遺伝子のプロモーターに結合することで遺伝子発現の活性化を起こしている (Quail, 2000; Kim et al., 2003; Ni et al., 1999)。フィトクロムを初発とした光シグナル伝達経路の詳細を明らかにするために、シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析により R-HIR、FR-HIR の応答性に異常が見られる様々な変異体の探索、原因遺伝子の同定が行われており、*FAR1*、*FIN219*、*SPA1* などが同定されている。それに加えて、酵母 two-hybrid 法などを利用した、直接フィトクロムに相互作用する因子の探索も行われている。その結果、フィトクロムの下流に位置する *PIF3*、*PKS1*、*NDPK2* などがクローニングされてきた。これまでの知見を図 3-2 にまとめている (Fankhauser, 2001; Quail, 2002)。また phyA は、シグナルの作用機構について不明な点が多い。phyA の VLFR は極めて微弱な光により Pfr 型に変換して種子発芽を誘導するが、FR-HIR は Pr 型で誘導される。この FR-HIR で機能する Pr 型について Shinomura らは、Pfr 型が FR により Pr 型に構造変換する際の間体 (Pr*型) が FR-HIR に作用することを生理学的解析により示した (Shinomura et al., 2000)。しかし、Pr*型がどのような因子と相互作用して下流にシグナルを伝えているのかについては明らかになっていない。また FR-HIR に応答しない変異体の中には VLFR に応答する変異体と応答しない変異体が報告されており、phyA のシグナル伝達経路の予測を複雑にしている (Yanvsky et al., 2000)。

フィトクロム発色団の構造と波長認識特性の研究は、これまでシアノバクテリア由来のフィコシアノビルリン (PCB) を用いた *in vitro* 再構成による生化学的な解析が行われてきた。PCB は PΦB と類似した構造であり、その違いは D 環 C18 位側鎖の二重結合の有無である (図 3-3)。非常に類似した構造的な特徴から、PCB は PΦB の代替化合物として利用され、その特性について調べられてきた。大腸菌、酵母で発現させたアポフィトクロムタンパク質に PCB を添加すると、光可逆的なホロフィトクロムを形成する。そして、Pr 型、Pfr 型の差スペクトルの極大と極小は、PΦB を発色団に持つフィトクロムよりも、10-20 nm 短波長側に移行することが明らかとなっている。また *in vitro* の再構成系を利用して、様々なアナログ誘導体の構造と波長認識が調べられた結果、PΦB の波長認識にはピロール環 18 位のビニル基が重要であることが示された (Li et al., 1992)。さらに、PΦB と PCB を添加した PΦB を持たないシロイヌナズナ *hy1*、*hy2* 変異体のホロフィトクロムの差スペクトルは、*in vitro* 再構成による生化学的

な知見と同様の結果を示した。また、PCB を添加した *hy1*、*hy2* が FR-HIR に応答しないことが示された(Hanzawa et al., 2002)。

シロイヌナズナ *hy1*、*hy2* 変異体の解析により、HY1 がヘムオキシゲナーゼ、HY2 が PΦB シンターゼであることが同定され(Muramoto et al., 1999; Kohchi et al., 2001)、葉緑体における PΦB 生合成経路が明らかとなった(図 3-4)。HY2 のアミノ酸配列をもとにシアノバクテリアのビリルン化合物生合成に關与するフェレドキシン依存ビリルン還元酵素が同定された。シアノバクテリアの PCB 生合成経路は、植物の PΦB と同様にアミノレブリン酸からビルベルジン IX α を経て生合成されるが、最終段階の反応の違いによって、PΦB とは異なる構造の化合物、PCB あるいはフィコエリスロビリルン(PEB)が生合成される(Fankenberg et al., 2001)。

シアノバクテリアのビリルン化合物、PCB 生合成に關与するフェレドキシン依存ビリルン還元酵素 PcyA が植物の葉緑体でフェレドキシン依存ビリルン還元酵素として機能すれば、PΦB 以外の発色団が *in vivo* で生合成されると考えられた。つまり、PΦB が PCB に変換された発色団を持つフィトクロムは、従来とは異なった波長認識特性を持つ植物体が作製される。そこで、葉緑体で構成的に発現させるために 35S プロモーター下流にダイズの *rbcS* のトランジットペプチドをコードする塩基配列を挿入したシアノバクテリア由来の *pcyA* 遺伝子を、シロイヌナズナの *hy2* 変異体に導入した(図 3-5(A))。これは、発色団を PΦB から PCB に改変させた植物体であり、その中でも特に安定して PcyA が発現している形質転換植物体を PCYA1 と名付け、生化学、生理学的な解析が行われた。PCYA1 の黄化芽生えより抽出したフィトクロム A タンパク質の差スペクトルを調べたところ、PCYA1 の差スペクトルの極大が 650 nm、極小が 715 nm であった。野生型の差スペクトルの極大が 660 nm、極小が 730 nm であるので、PCYA1 は、R/FR 可逆性を持ち、野生型よりも 10-15 nm 短波長側に移行した波長認識特性をもつことが明らかとなった(図 3-5(C))。また、フィトクロム A の光安定性を調べたところ、PCYA1 において光による *phyA* の分解が示されたことから、PCYA1 がホロフィトクロムを形成し、光による *phyA* の分解調節が正常に機能していることが示された。以上の結果から、PCYA1 は、PCB を発色団に持つフィトクロムタンパク質(PCB-*phy*)を持つことが示唆された(Kami et al., 2004)。さらに、生理学的に PCYA1 の光応答が調べられた。大型スペクトログラフ施設(Okazaki large spectrograph, OLS)の単色光を用いた全波長における PCYA1 の HIR を調べた結果、PCYA1 は、705 nm、715 nm、720 nm において FR-HIR を示した(図 3-5(B))。また 730 nm における PCYA1 の応答は、野生型と比較して、胚軸伸長抑制が弱く、FR-HIR を完全に示していなかった。これらのことから、前述した差スペクトルで確認された結果と同様に、植物体においても PCYA1 の波長認識特性が 10-15 nm 短波長側に移行していることが考えられた(Kami et al., 2004)。

本章では、FR-HIR の光環境応答を遺伝子発現の動態から調べるために、特に 730 nm における PCYA1 の FR-HIR の生理応答が、完全に示されないことに注目した。そして、系統的な遺伝子発現解析を行い、PCYA1 の生理応答が分子応答に反映するか否

かを調べた。さらに、それら遺伝子発現の動態から、生理応答からは見られない、FR-HIR の詳細な光応答の生理分子機構を考察した。

材料および方法

植物材料

シロイヌナズナは、エコタイプ、Landsberg erecta (*Ler*)を野生型として利用した。phyA 欠損変異体は、*phyA-201* を利用した。発色団を PΦB から PCB に改変した植物体 PCYA1 は、Kami らによって作製された植物体を使用した。それら植物について、1/10 MS 培地 (0.6% agar、シヨ糖なし) に無菌播種し、phyB リセットのための FR 照射後、4 日、2 日間暗所に置いた。低温処理後、種子発芽誘導のために、室温で白色光 4 時間照射後、21 日、40 時間暗所で育成後、各波長での光を 1 分間と暗黒を 2 分間の合計 3 分間を 1 サイクルとして 24 時間照射した。間歇照射後、即座に植物体を液体窒素により凍結させることで、サンプル回収を行った (図 3-6)。単色光照射については、岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所の大型スペクトログラフ施設 (Okazaki large spectrograph, OLS) を利用した。使用した波長は、730、715、695 nm である。光照射した平均積算光量は、730、715、695 nm の単色光照射時に 1.4、1.8、 $1.6 \times 10^6 \mu\text{mol m}^{-2}$ であった。

cDNA マイクロアレイの作製

プローブ調製のため、PCR 産物の調製を行った。反応系は、10 μl の 10 \times PCR Buffer、10 μl の 2mM dNTPmix、2 μl の 10 μM M13 Forward primer、2 μl の 10 μM Reverse primer、0.5 μl の rTaq DNA polymerase (5 units/ μl , Toyobo) に滅菌水を加え、100 μl の系にした。さらに、整列保存してあるグリセロールストックから 1.5 μl の大腸菌液を反応液に加えて、PCR 反応を行った。PCR 反応は、94 $^{\circ}\text{C}$ -1 分、55 $^{\circ}\text{C}$ -1 分、72 $^{\circ}\text{C}$ -1 分を 40 サイクルで行った。PCR 反応後、PCR 産物精製のために、96-well PCR Clenaup Kit (Whatman, USA) を利用し、操作は添付マニュアルに従った。また最終的に 40 μl の滅菌水で溶出した。溶出した PCR 産物に等量の Microarray Crosslinking Reagent D (Amersham Biosciences) を加えて、スポット用プローブ液とした。その後、96 プレートから 384 プレート (Amersham Biosciences) にサンプルを移し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。384 プレートの保存したプローブ用サンプルを、Lucidea Array Spotter (Amersham Biosciences) によって、Microarray slides Type 7 Star (metalcoated, DMSO optimized) (Amersham Biosciences) 上にスポットした。アレイデザインは、均一化 cDNA ライブラリー由来 6,347 クローン、約 1,000 の外部クローンを含んだ 7,680 クローンを 2 連でスポットした 15,360 スポットの cDNA マイクロアレイを作製した。

植物体からの全 RNA 抽出

液体窒素を加えながら、乳鉢によって組織破碎を行った。そして、450 μl の RNeasy 用の Lysis/Binding sol. に対して 100 mg 程度の組織を加えた。80 μl の Plant RNA Isolation Aid (Ambion) を加えて良く攪拌し、室温で 15,000 rpm、5 分の遠心を行い、上清を採取した。以下 Plant RNeasy Kit (Qiagen) を使用した。また RNA 抽出過程で、RNeasy

Column membrane 上での DNase I(Qiagen)処理を行った。操作手順は、添付プロトコールに従った。最終的に 50 μ l の滅菌水による溶出を 2 回繰り返した。

リニア増幅法を用いたターゲット調製

5 μ g の全 RNA から RiboAmp RNA Amplification Kit (Arcturus, USA)を用いて、T7-based RNA amplification 操作を行った。操作手順は、添付プロトコールに従った。その結果、約 1,000 倍に増幅されたアンチセンス RNA(aRNA)が合成された。二蛍光標識法により遺伝子の発現変化の検出を行うために、Cy3-dCTP と Cy5-dCTP(Amersham Biosciences)を用いた逆転写反応を行い、aRNA からターゲット cDNA を合成した。合成には、CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit (Amersham Biosciences)を用いた。逆転写の際、4 μ g の aRNA を鋳型として、random nonamers primer を利用した。操作手順は、添付プロトコールに従った。その後、PCR Purification kit(Qiagen)を用いてターゲット精製を行った。操作方法は添付プロトコールに従った。溶出したサンプルを DNA Speed Vac を用いて、最終的に 45 μ l まで液量を調製し、調製したサンプルをターゲット溶液とした。

DNA マイクロアレイによる解析

DNA マイクロアレイを使用した解析の方法として、ハイブリダイゼーション、画像化、定量化による解析の流れで行った。45 μ l のターゲット溶液、15 μ l の 4 \times Hybridization Buffer (Amersham Biosciences)で調製したハイブリダイゼーション溶液を 95 $^{\circ}$ C、3 分間で熱変性を行い、その後、室温で 30 分置いた。60 μ l のハイブリダイゼーション溶液を 24 \times 60 mm カバーガラス(Matsunami)上に塗布し、表面張力でマイクロアレイ上に吸い上げるようにしてマイクロアレイ上に乗せた。以降の操作は、第 1 章と同様な方法で行った。

GeneSpring ソフトウェアによるデータマイニング

Ignore Filter 機能を用いて、解析不能スポットとして解析から除去した解析データをタブ切 text 形式で、GeneSpring ソフトウェア(Silicon Genetics)に import することで解析を行った。データの平均化法として、Median、Lowess 法を用いた。クラスター解析法としては、平均距離法を用いることで、実験クラスタリング、ジーンクラスタリングを行い、ペアワイズコリレーション解析を行った。

リアルタイム PCR 法による発現解析

リアルタイム PCR の方法として、SYBR Green 試薬を利用した方法で行った。発現解析を行う全ての遺伝子について、花、栄養生長期茎頂、葉、茎、根全 RNA 由来 cDNA を混合した cDNA を鋳型とした RT-PCR を行い、1% アガロース、6% アクリルアミドゲル電気泳動による確認をすることで、Primer 能力を検定した。目的バンド以外のバンドが存在しない Primer セットのみを利用した。各遺伝子で使用した Primer、産物の

サイズを表 3-1 で示す。遺伝子ごとの検量線用のコントロールサンプルを調製した。調製法は、前述した PCR 産物 100 μ l に対して、1 μ l の Exonuclease I(10 units/ μ l, Amersham Biosciences)、1 μ l の Shrimp Alkaline Phosphatase(2 units/ μ l, Amersham Biosciences)を加えて、37 °C で 30 分、その後 81 °C で 30 分の反応を行った。その後、エタノール沈殿を行い Pico Green 試薬(Molecular Probes, Netherlands)による定量を行った。DNA 定量法は、添付プロトコールに従った。定量を行った既知濃度の PCR 産物を検量線用コントロールサンプルとした。検量線用コントロールサンプルは、1-10⁻⁶ pg を 7 点で測定した。鋳型 cDNA の調製として、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)を使用した。操作は添付プロトコールに従った。計測サンプルの鋳型として一反応液中 20 ng の全 RNA 由来 cDNA を用いた。反応系は、15 μ l の 2 \times SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)、1.5 μ l の 10 μ M Forward Primer、1.5 μ l の 10 μ M Reverse Primer (終濃度 0.5 μ M)、鋳型 DNA、滅菌水を加えて 30 μ l に調製した。調製後、ABI7700(Applied Biosystems)によるリアルタイム PCR 測定を行い、発現解析を行った。

結果

730 nm、715 nm、695 nm の単色光照射植物体の系統的な遺伝子発現解析

PCB-phyA の FR-HIR 波長認識特性を遺伝子発現レベルから調べるために、単色光照射による系統的な遺伝子発現解析を行った。白色光での発芽誘導後、暗所で 40 時間育成させた野生型(*Ler*)、*phyA*、PCYA1 の芽生えに 730 nm、715 nm、695 nm の単色光の間歇照射を 24 時間行った。この時期の芽生えは、胚軸が完全に伸長する前の状態である。対照サンプルは、暗所 64 時間育成させた *Ler*、*phyA*、PCYA1 の芽生えを使用した (図 3-6)。そして、対照サンプルに対して、単色光照射サンプルを比較した遺伝子発現プロファイルを作成した。つまり、今回作成した遺伝子発現プロファイルは、730、715、695nm の単色光の間歇照射を行った *Ler*、*phyA*、PCYA1 での比較解析である。3×3、9 種類の発現解析を行った。

光照射時と暗所における遺伝子発現の相関性を調べるために、縦軸を光照射時、横軸を暗所コントロールの発現強度を示す散布図を描き、相関係数を求めた (図 3-7)。相関係数 R が 1 に近ければ、光照射による全体の遺伝子発現の変化が小さいことを示している。逆に、数値が小さいほど、全体の遺伝子発現の変化が大きいことを示している。730 nm 単色光照射時は、*Ler*、*phyA*、PCYA1 での相関係数は、0.80、0.93、0.89 であった。これは、*phyA* では、730 nm の単色光を照射しても、暗所とほとんど変わらない遺伝子発現であることを意味する。また、*Ler* よりも PCYA1 の遺伝子発現の動きが小さいことを示している。つまり、730 nm の波長域で、PCB-phyA は、PΦB-phyA による *phyA* シグナルよりも小さいが、*phyA* シグナルを生じている可能性が示唆された。715 nm 単色光照射時の *Ler*、*phyA*、PCYA1 での相関係数は、0.84、0.94、0.84 であった。695 nm 単色光照射時の *Ler*、*phyA*、PCYA1 での相関係数は、0.81、0.80、0.83 であった。730、715 nm の両波長ともに *phyA* は、暗所コントロールとほとんど変わらない遺伝子発現を示している。また、715 nm 単色光照射時は、*Ler* と PCYA1 で、同じ程度の遺伝子発現の変化が示されている。また、730 と 715 nm 照射時 PCYA1 の遺伝子発現の変化を比較すると、715 nm の方が遺伝子発現の変化が大きかった。これは、PCB-phyA の *phyA* シグナルが 730 よりも 715nm の方が、より強いシグナルを生じていると考えられる。これらのことから、*Ler*、PCYA1 は、730、715 nm の単色光照射で、強弱はあるが、*phyA* シグナルが下流に伝達されていることが予測された。また、695 nm 照射時の *phyA* の遺伝子発現プロファイルから、695 nm の単色光を照射することで、*phyA* シグナル以外のシグナルが生じ、下流に伝達されていることも予測された。

光照射発現変動クローンの解析

各波長の単色光照射による *Ler*、*phyA*、PCYA1 の分子応答の特徴を調べるために、各遺伝子発現プロファイルで発現変動が起こったクローン、発現比 2.0 以上、0.5 以下であったクローンを抽出した。*Ler* では、730 nm の単色光照射時に 757 (発現上昇：

472、減少：285)、715 nm の単色光照射時に 576(発現上昇：379、減少：197)、695 nm の単色光照射時に 640(発現上昇：429、減少：211) 合計 1,028 クローンを抽出した。*phyA* では、730 nm の単色光照射時に 52 (発現上昇：42、減少：10) 715 nm の単色光照射時に 93 (発現上昇：92、減少：1) 695 nm の単色光照射時に 302 (発現上昇：236、減少：66) 合計 324 クローンを抽出した。PCYA1 では、730 nm の単色光照射時に 417(発現上昇：234、減少：183) 715 nm の単色光照射時に 467(発現上昇：321、減少：146) 695 nm の単色光照射時に 393 (発現上昇：250、減少：143) 合計 725 クローンを抽出した(表 3-2)。全体で、発現変動が起こったクローンは、1,251 であった。

さらに、各波長での単色光照射による *Ler*、*phyA*、PCYA1 の発現パターンの類似性を調べるために、抽出した 1,251 クローンを対象に、実験クラスタリング、遺伝子クラスタリングを組み合わせたペアワイズ相関解析を行った(図 3-7)。縦方向は実験条件、つまり各波長での単色光照射による *Ler*、*phyA*、PCYA1 を示しており、横方向は 1,251 クローンが発現パターンをクラスタリングした結果を示している。695 nm と 715 nm 単色光照射時の PCYA1 の発現パターンが似ていた。また、715 nm と 730 nm 単色光照射時の *Ler* の遺伝子発現パターンが似ていた。さらに、695 nm と 715 nm 単色光照射時 PCYA1 の発現パターンの系統と 715 nm と 730 nm 単色光照射時 *Ler* の遺伝子発現パターンの系統が類似していた。つまり、*Ler* では 730、715 nm で起こっている遺伝子発現様式が、PCYA1 だと 715、695 nm で起こっている発現様式に似ていることが示唆される。このことは、PCYA1 の PCB-*phyA* による分子応答が短波長側に認識波長域を移行させていることを意味している。そして、この結果は、FR-HIR の PCB-*phyA* の作用スペクトルが短波長側に移行して、胚軸伸長抑制の生理応答を示す知見と一致していた(Kami et al., 2004)。

730 nm の単色光照射時植物体の遺伝子発現解析

PCYA1 は、730 nm の単色光に対して胚軸伸長抑制を指標としている FR-HIR を完全に示さない(Kami, et al., 2004)。FR-HIR は、*phyA* による生理応答であり、*phyA* 変異体では示さない。*phyA* では発現が変わらず、*Ler* で発現が変化する遺伝子の中で、PCYA1 でも *Ler* と同様な発現変化を示す遺伝子は、*phyA* シグナルに依存するが、胚軸伸長抑制に関与する FR-HIR とは別な制御を受けている遺伝子と予想される。そこで、*phyA* シグナルに依存するが、胚軸伸長抑制に関与する FR-HIR とは別な制御を受けている遺伝子の存在を調べるために、表現型が顕著に示されている 730 nm の単色光照射時の *Ler*、*phyA*、PCYA1 で発現比 2.0 以上、0.5 以下のクローンを抽出した。発現上昇、発現減少のグループに分けて、それらクローンの重複をベン図に示した(図 3-9)。

730 nm 単色光照射によって、発現上昇を示すクローンを調べると、*Ler* と PCYA1 で重複し、*phyA* では発現上昇を示さない 173 クローンを抽出した(図 3-9(A))。これら 173 クローンは、122 遺伝子を含んでいた。122 遺伝子の中で、PCYA1 の方が *Ler*

よりも強く発現誘導を受ける遺伝子は、*Ferredoxin-NADP reductase, putative* (At1g20020)の1遺伝子であった。*Ler*の方がPCYA1よりも高い発現誘導を受ける遺伝子は、98遺伝子存在した。また、PCYA1と*Ler*が同程度の発現上昇を示す遺伝子は、23遺伝子存在した。

730 nm 単色光によって、発現減少を示すクローンを調べると、*Ler*とPCYA1で重複をし、*phyA*では発現減少を示さない69クローンを抽出した(図3-9(B))。これら69クローンは、58遺伝子を含んでいた。58遺伝子の中で、PCYA1の方が*Ler*よりも発現抑制を受ける遺伝子は、*Adenine phosphoribosyltransferase 1, APRT* (At1g27450)、*Serine protease-like protein* (At5g51750)の2遺伝子であった。次に、*Ler*の方がPCYA1よりも発現抑制を受ける遺伝子は、36遺伝子存在した。また、PCYA1と*Ler*が同程度の発現抑制を示す遺伝子は、20遺伝子存在した。

PCYA1でも発現上昇を示すが、*Ler*の方が発現誘導を受ける98遺伝子とPCYA1での発現減少を示すが、*Ler*の方が発現抑制を受ける36遺伝子を同定した。これら計134遺伝子は、PCYA1が730 nmの単色光に対して胚軸伸長抑制を指標としているFR-HIRの応答が弱いという生理表現型の一致を示す遺伝子だと考えられる。実際、*Xyloglucan endotransglycosylase-related protein XTR-7* (At2g35010)、*Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase-like protein* (At4g30280)のような細胞壁合成関連遺伝子が光照射により発現減少しており、この結果は、表現型を説明することが可能であった。

また、PCYA1と*Ler*で同程度の発現上昇を示した23遺伝子、発現抑制を示した20遺伝子、合計43遺伝子を同定した。つまり、*phyA*シグナルに依存はしているが、胚軸伸長抑制のFR-HIR制御系とは異なる制御に関与する可能性がある遺伝子だと考えられる(表3-3)。このような遺伝子の存在は、生理表現型では見ることのできない制御系の存在を示唆する。また、これら43遺伝子について、TAIR (The Arabidopsis Information Resource) GO Annotations サイトの functional search システムを利用し、機能的アノテーションを行ったところ(<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>)、26の機能既知遺伝子と17の機能未知遺伝子が存在した(表3-3)。

フィトクロムシグナル関連遺伝子群のリアルタイムPCRによる発現解析

生理表現型、分子表現型解析により、PCYA1のFR域の波長認識特性が10-15 nm短波長側に移行することで、*phyA*シグナルを正常に生じていることが示された。既知の光シグナル経路関連遺伝子群の遺伝子発現解析をリアルタイムPCR法により、詳細に行うことで、PCYA1の波長認識特性、波長認識特性の変化によるシグナル伝達の影響を調べた(図3-2)。発現解析を行った遺伝子は、光合成、テトラピロール合成、概日リズム、フィトクロムシグナル関連遺伝子の24遺伝子である(表3-1)。内在性コントロール遺伝子は、*Eukaryotic translation initiation factor 4A-1 (eIF4A-1)*, At3g13920)遺伝子を利用した。

光誘導性の *Lhcb2 protein (CAB, At2g05100)*、*Putative protein I photosystem II oxygen-evolving complex (PSII, At3g50820)*、*Chlorophyll a oxygenase (CAO, At1g44446)*の

発現解析を行った(図 3-10(A)) (Tepperman et al., 2001)。フィトクロムシグナルの階層において、これら光合成関連遺伝子は、最下流に位置すると考えられている(図 3-2)。CAB、PSII は、730 nm の単色光照射時の Ler と PCYA1 では、暗所コントロールに比べて発現が上昇していたが、Ler の方が PCYA1 に比べて発現量が高かった。しかしながら、715 nm の単色光照射時では、Ler と PCYA1 での発現量が同程度であった。CAO は、730、715 nm の単色光照射の Ler、PCYA1 での発現量が同程度であった。また、695 nm の単色光照射時では、phyA でも発現上昇が見られる。このことは、695 nm の単色光照射の場合、赤色光認識の phyB シグナルの影響が現れると考えられた。

Glutamyl-tRNA reductase 1 (HEMA1, At1g58290)、Ferrochelatase (FECH, At2g30390)、Heme oxygenase (HY1, At2g26670)、PFB synthase (HY2, At3g09150)、Mg-chelatase (MGCH, At5g13630)、NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA, At5g54190)、NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase B (PORB, At4g27440)の発現解析を行った(図 3-10(B))。これらテトラピロール生合成経路の遺伝子もフィトクロムシグナルの階層において、最下流に位置すると考えられている。HEMA1、MGCH は光誘導性、PORA、PORB は光照射により発現抑制されることが知られている(Ma et al., 2001)。テトラピロール生合成の初発物質 Glu-tRNA を還元する HEMA1 は、730、715 nm の単色光照射時の Ler、PCYA1 での発現量が同程度であった。クロロフィル合成系に分岐する MGCH は、730 nm の単色光照射時の Ler と PCYA1 において、暗所育成時に比べて発現が上昇していたが、Ler の方が PCYA1 に比べて発現量が多かった。しかしながら、715 nm の単色光照射時では、Ler よりも PCYA1 での発現量が若干増加していた。PORA、PORB は、730 nm の単色光照射時の Ler と PCYA1 において、暗所育成時に比べて発現が減少していたが、Ler の方が PCYA1 に比べて発現量が減少していた。しかしながら、715nm の単色光照射時の Ler と PCYA1 での発現量は同程度であり、光照射による発現減少が認められた。それに対し、PΦB 合成に分岐する FECH、PΦB 合成経路の HY1、HY2 は、目立った発現変動を示さなかった。また、PCYA1 が hy2 変異体由来であるために、HY2 が減少していた。

概日リズム関連遺伝子の Myb-related transcription factor (CCA1, At2g46830)、Myb family transcription factor (LHY, At1g01060)の発現解析を行った(図 3-10(C))。これらの遺伝子は、フィトクロムシグナル経路において、比較的下流に位置する(図 3-2)。CCA1、LHY の両者において、695 nm の単色光照射時の phyA で、顕著な発現上昇が見られた。

phyA シグナル関連遺伝子の Far-red impaired response protein (FAR1, At4g15090)、Putative auxin-responsive protein (FIN219, At2g46370)、bHLH protein (HFR1, At1g02340)、Phytochrome A signal transduction 1 (PAT1, At5g48150)、Phytochrome A (PHYA, At1g09570)、Photomorphogenesis repressor protein-related (SPA1, At2g46340)の発現解析を行った(図 3-2、図 3-10(D))。FAR1 は、全ての解析条件で、発現の変化が見られなかった。FIN219、PAT1、PHYA は、730 nm の単色光照射時の Ler と PCYA1 で、暗所育成時と比較して、発現が減少していたが、Ler の方が PCYA1 に比べて発現量が減少していた。しかしながら、715 nm の単色光照射時では、Ler と PCYA1 での発現量が同程度あり、光照射

による発現減少が見られた。*SPA1* では、730、715 nm の単色光照射時の *Ler*、*PCYA1* において、発現量が同程度であった。*HFR1* に関しての挙動は、695 nm の単色光照射時の *Ler*、*phyA* において、暗所と比較すると発現減少を示していた。

DNA-binding homeotic protein Athb-2 (ATHB2, At4g16780)、*GIGANTEA protein (GI, At1g22770)*、*Phytochrome B (PHYB, At2g18790)* の発現解析を行った (図 3-10(E))。これら遺伝子は、*phyB* シグナル関連遺伝子であって、*GI* は、概日リズムにも関与する遺伝子である (図 3-2)。*ATHB2* は、730 nm の単色光照射時の *Ler* と *PCYA1* の発現が、暗所育成時と比較して、減少していた。また、*Ler* の方が *PCYA1* に比べて発現量が減少していた。しかしながら、715 nm の単色光照射時では、*Ler* と *PCYA1* での発現量が同程度あり、光照射による発現減少が見られた。また 695 nm の単色光照射時の *phyA* では、*Ler*、*PCYA1* と同様に発現減少が認められた。*GI* は、730、715 nm の単色光照射時の *Ler*、*PCYA1* では、暗所と比較して、同程度の発現上昇が示された。しかしながら、暗所と比較した 695 nm の単色光照射時では、*Ler* と *phyA* で発現減少が確認されたが、*PCYA1* での発現変動は見られなかった。*PHYB* は、全ての条件での発現変動が見られなかった。

Phytochrome kinase substrate 1 (PKS1, At2g02950)、*Nucleotide diphosphate kinase Ia (NDPK2, At5g63310)*、*Phytochrome interacting factor 3 (PIF3, At1g09530)* の発現解析を行った (図 3-10(E))。これらの遺伝子は、*phyA* および *phyB* シグナル双方に関連することが知られている (図 3-2)。*PKS1* は、全ての条件で、目立った発現変動は見られなかった。*NDPK2* は、暗所と比較して、730、715 nm の単色光照射による発現上昇が *Ler*、*PCYA1* で見られたが、若干 *PCYA1* での発現量が多かった。*PIF3* は、光照射による発現の減少が見られた。730 nm の単色光照射時に *Ler* と *PCYA1* に関しては、暗所育成時に比べて発現が減少していたが、*Ler* の方が *PCYA1* に比べて発現量が減少していた。しかしながら、715 nm の単色光照射時では、*Ler* と *PCYA1* での発現量が同程度の減少であった。

以上のリアルタイム PCR 解析を行った 24 遺伝子は、以下 5 種類の発現パターンに分類することができる。

CAB、*PSII*、*HEMA1*、*MGCH* は、暗所と比較して、730 nm の単色光照射時に *Ler* の方が *PCYA1* よりも発現量が高くなっているが、*phyA* での変化は見られない。715 nm の単色光照射時に *Ler* と同程度、またはそれ以上に *PCYA1* での発現上昇が見られるが、*phyA* での変化は見られない。695 nm の単色光照射時は、*Ler*、*phyA*、*PCYA1* の全て、発現上昇が見られる。*PORA*、*PORB*、*FIN219*、*PAT1*、*PHYA1*、*ATHB2*、*PIF3* は、暗所と比較して、730 nm の単色光照射時に *Ler* の方が *PCYA1* よりも発現量が低くなっている。そして、*phyA* での変化は見られない。715 nm の単色光照射時に *Ler* と同程度、またはそれ以上に *PCYA1* での発現抑制が見られるが、*phyA* での変化は見られない。695 nm の単色光照射時は、*Ler*、*phyA*、*PCYA1* の全て、発現抑制が見られる。これらの 11 遺伝子は、*PCB-phyA* の波長特性が 10-15 nm 程、短波長側に移行したことが原因と考えられる遺伝子発現を示している。

CAO、SPA1、NDPK2の3種類は、暗所と比較して、730 nmの単色光照射時に *Ler* とPCYA1での発現量が同程度、あるいはそれ以上の発現上昇が見られるが、*phyA* での変化は見られない。715 nmの単色光照射時に *Ler* と同程度、またはそれ以上にPCYA1での発現上昇が見られるが、*phyA* での変化は見られない。695 nmの単色光照射時は、*Ler*、*phyA*、PCYA1の全て、発現上昇が見られた。これらの遺伝子は、*phyA* シグナル経路上に存在するが、照射した光量が少なくても、*phyA* シグナルを認識することが可能な遺伝子と考えられる。

CCA1、LHYは、730、715 nm 単色光照射時に *Ler*、*phyA*、PCYA1の発現変動が見られないが、695 nmの単色光照射では、*phyA* で強い発現上昇が見られた。これら遺伝子は、赤色光認識に関与する *phyB* に関与している遺伝子であると考えられる。

FECH、HY1、HY2、FAR1、PHYB、PKS1は、全ての条件で、発現変化が見られなかった遺伝子である。

HFR1、GIの発現パターンは、他の22遺伝子とは共通性が見られなかった。

考察

これまで、PCYA1の生理学的な解析が行われている(Kami et al., 2004)。しかしながら、遺伝子発現レベルにおいて、PCB-phyAが植物体内でPΦB-phyAと同様な光応答による構造変換を起こし、下流にシグナルを生じているか否かは明らかにされていなかった。今回、*Ler*、*phyA*、PCYA1の暗所芽生えに730、715、695 nmの単色光を24時間の間歇照射をした植物体から全RNAを抽出し、cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。暗所育成させたコントロールに対して、それぞれの光照射条件で比較した遺伝子発現プロファイルを作成した。そして、発現変動を示した1,251クローンを用いたペアワイズコリレーション解析を行った(図3-7)。その結果から、波長特性が短波長側に移行するが、PCB-phyAはPΦB-phyAと同様なタンパク質の構造変換を起こし、下流遺伝子群に正常なシグナル伝達が起こる分子機構が予測された。このことは、胚軸伸長抑制を指標に調べられた表現型と系統的な遺伝子発現により解析された結果が一致していることを示している。

発現変動を示すと判断された遺伝子を調べた。730 nmの単色光照射時の各遺伝子における発現変動の傾向は、*Ler*の変動が大きく、PCYA1は、*Ler*と*phyA*の中間の変動である遺伝子が多数を占めた。これに対して、715 nmの単色光照射時には、*Ler*と比較して、PCYA1の遺伝子発現変動が同程度、あるいは大きく示されている遺伝子が多数を占めた。リアルタイムPCRによる解析結果からも、11種類の遺伝子で同様な傾向が示された。つまり、植物体内においても、PCB-phyAは、FR波長認識特性を短波長側に移行させて、PΦB-phyAと同様な光応答による構造変換を起こし、下流にシグナルを生じていることが示唆された。しかしながら、PCB-phyAのFR認識波長が715 nmであるにも関わらず、730 nmの単色光照射時のPCYA1でも、胚軸伸長抑制が弱いながらも示される生理応答、マイクロアレイによる遺伝子発現解析による結果から、PCYA1が730 nmの波長も認識し、弱い*phyA*シグナルを生じていることも示された。このことは、PCYA1にとって、730 nmの単色光照射を行った場合、FR-HIRを起こすには不十分な光量であるために、*Ler*と同様な生理表現型を示すには不完全であることが1つには考えられる。

また、これまでにPΦB-phyAの胚軸伸長抑制を指標とした作用スペクトル解析の結果から、PΦB-phyAの作用スペクトルが690-750nmであった(Shinomura et al., 2000)。PΦB-phyAの作用スペクトルとPCB-phyAの差スペクトルの結果を考え、PCB-phyAがPΦB-phyAと比べて、仮にFR認識波長域を単純に15 nm短波長側にシフトしたのであれば、PCB-phyAは675-735 nmで胚軸伸長抑制に作用するはずである。しかしながら、730 nmの単色光照射のPCYA1では、完全な胚軸伸長抑制を示さなかった。実際にPCYA1で、胚軸伸長抑制が認められる波長は、720 nmよりも短波長側であった(Kami et al., 2004)。今回の発現解析の結果からも730 nmでは、PΦB-phyAと比較して、PCB-phyAが不完全なシグナル伝達を起こしていることが明らかであった。一方、715nmでは、PCB-phyAがPΦB-phyAと同様なシグナルを生じていることが示されて

いる。予想された PCB-phyA の作用スペクトルの最長波長側 735 nm、実際に測定された 720 nm との 15 nm の差を考えると、胚軸伸長抑制に関与する FR-HIR を起こすために、PCB-phyA は、PΦB-phyA よりも長波長側の認識に限界があり、その限界値が 720nm であることが考えられる。PCB と PΦB は、D 環 C18 位側鎖の二重結合の有無という構造的に類似した 2 種類の化合物であるが (図 3-3) 海中から陸上に上がった原始植物の中で、PCB ではなく PΦB を発色団として獲得した新規植物が、720 nm 以上の長波長側の光を認識することで、ラン藻を始祖とする PCB-phy 型の原始植物を淘汰し、現在の PΦB-phy 型の植物に進化を遂げたのかもしれない。

730nm の単色光照射条件において、*phyA* 変異体での遺伝子変動は示さないが、*Ler*、PCYA1 での遺伝子変動が見られた遺伝子が多数存在した。その中でも、43 遺伝子が *Ler* と PCYA1 の両方で同程度の遺伝子変動を示した。*phyA* 依存の経路には、胚軸伸長抑制の FR-HIR とは全く異なる系が存在することを示している。この系は、*phyA* が種子発芽に関与する超低光量反応 (VLFR) のような低光量で、300-780 nm と広い波長域の応答をする反応への関与が考えられる (Shinomura et al., 1996)。PCYA1 の VLFR を調べるために、発芽誘導実験が行われている。その結果、PCYA1 は、FR に対しても正常な VLFR を示すことが明らかとなっている (Kami et al., 2004)。つまり、これら 43 遺伝子中に VLFR に関与する遺伝子がスクリーニングされた可能性が十分に考えられる。

スクリーニングされた 43 遺伝子について、アノテーションからの推測を行った結果、26 の機能既知遺伝子が含まれていた。その中にオーキシン誘導される Zn フィンガー型の DNA 結合タンパク質である *Putative DNA-binding protein* (At1g11950)、オーキシン誘導性の GH3 homolog をコードする *Putative auxin-responsive protein* (At2g47750) が存在した。両者ともにオーキシン誘導性のタンパク質であったが、特に *Putative auxin-responsive protein* は、*phyA* シグナル関連遺伝子の *FIN219* に類似しており、FR 照射後、1 時間以内での発現誘導性が示されていた。さらに、8,000 遺伝子を含む Genechip 解析の結果、FR 照射後、1 時間以内で発現誘導あるいは抑制された、FR 照射に早い応答を示す遺伝子が、これら 26 遺伝子の中に 7 遺伝子含まれていた (Tepperman et al, 2001)。これらのことから、今後、様々な光照射時間、光量、光質条件を調べることで、*phyA* シグナル経路に関与するが、胚軸伸長抑制の FR-HIR とは異なる制御系が明らかになるかもしれない。また、機能未知である遺伝子が 17 種類同定されたことから、機能未知遺伝子の中に、表現型では示されなかった経路の決定要因が存在するかもしれない。

概日リズム関連遺伝子、*GI*、*LHY*、*CCA1* の発現解析により、赤色光受容に関与する *phyB* が関与するシグナルを考察することも可能であった。695 nm の単色光照射時の *GI* は、暗所コントロールと比較して、*Ler*、*phyA* で発現減少を示している。それに対し、PCYA1 では発現減少を示していない。また *CCA1*、*LHY* では、暗所コントロールと比較して、*Ler*、*phyA* で発現上昇を示しているが、PCYA1 では発現上昇を示していない。また、*GI*、*LHY*、*CCA1* の全てで、*phyA* の発現変動幅が大きくなっている

が、*phyA* の赤色光の感度は、*Ler* よりも高い傾向を示すとされているので、この現象に当てはまると考えられる(Nagatani et al., 1993)。実際、695 nm の単色光照射時の *phyA* における生理応答を見ると、緩やかであるが、胚軸伸長抑制が見られる。つまり、695 nm の単色光照射時に PΦB-*phyB* であれば、若干の *phyB* シグナルを生じるが、PCB-*phyB* は PCB-*phyA* と同様に波長特性が短波長側にシフトすることで、695 nm の波長を認識することができず、*phyB* シグナルを生じていないと考えられる。PCYA1 の R-HIR は、OLS による単色光の解析から調べられているが、680 nm よりも短波長側の光だと、*Ler* よりも PCYA1 の胚軸伸長抑制が強くなってしまっているため、仮に PCB-*phyA* と同様に PCB-*phyB* の認識波長特性が、10-15 nm、短波長側にシフトしても、*Ler* と同様な生理応答を示す可能性が高い。今後、PCB を発色団に持つフィトクロムの波長認識特性を調べるために、OLS を利用した単色光照射によって、PCYA1 と *phyB*、*phyAB* 変異体を組み合わせた PCB-*phyB* の作用スペクトルの測定を行う必要がある。

これらのことを示すことによって、PCB を発色団に持つフィトクロムの波長吸収特性の詳細が明らかにされるであろう。フィトクロムの波長吸収特性とその感度の強さにはアポフィトクロムのアミノ酸配列と発色団の構造が関与している。PCYA1 は、フィトクロムタンパク質に全く変異を持たないことから、PCB-*phy* の波長吸収特性とこれまでの発色団結合ドメインに変異を持ち、*phyA* の波長認識特性が短波長側にシフトしている *phyA Lm*、構造変換に関与するアミノ酸置換変異を持つ *phyB-401* のようなフィトクロムタンパク質のアミノ酸置換変異による解析結果と組み合わせることで、ホロフィトクロムタンパク質と波長吸収特性との構造活性相関について考察することができると期待される(Maloof et al., 2001; Elich et al., 1997; Kretsch et al., 2000)。

今回の解析で、フィトクロム発色団を PΦB から PCB に改変させた PCYA1 を用いることで、植物体内での PCB-*phyA* が生化学、生理学的な解析に加えて、遺伝子発現のレベルでも波長特性を短波長側にシフトすることで、PΦB-*phyA* と同様なタンパク質の構造変換を起こし、下流遺伝子群に正常なシグナル伝達が起こることが明らかになった(図 3-11)。また、*phyA* 依存の反応の中に、胚軸伸長抑制の FR-HIR とは異なる制御系の存在を示すことができた。つまり、従来遺伝学的に解析されている生理表現型のみには依存せず、cDNA マイクロアレイを用いた系統的な遺伝子発現解析により、環境応答における情報伝達系の遺伝的関係を明らかにできた。遺伝子同定ツールとして利用されている cDNA マイクロアレイが、系統的な遺伝子発現解析を行うことで、生理表現型では示されない、隠された分子機構を明らかにできることが示唆された。

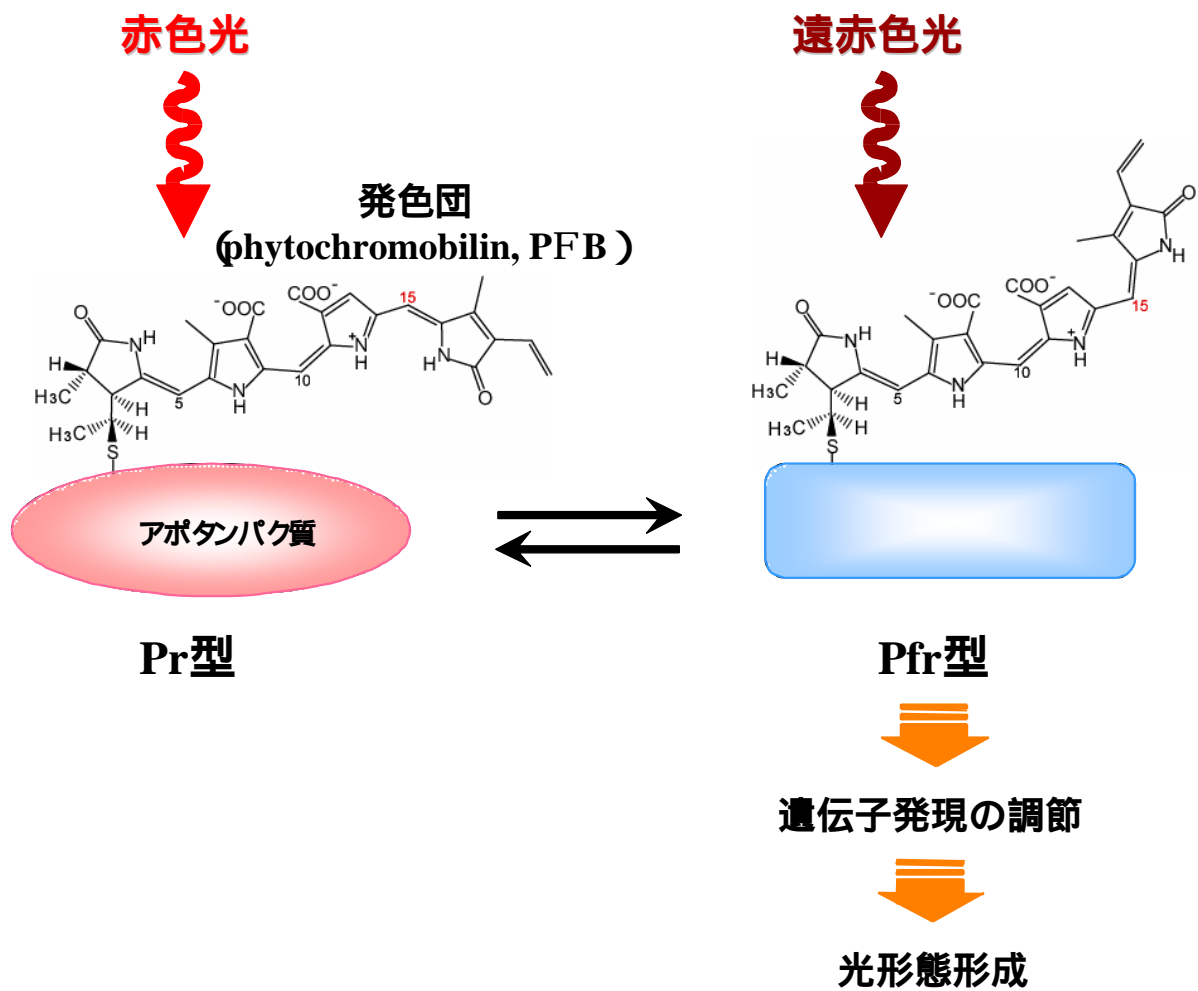


図3-1. フィトクロム分子の赤、遠赤色光照射による典型的な応答
 典型的なフィトクロムの応答を示す。赤色光照射により、PFBは、ピロール環C15-C16位の2重結合部位がZ型からE型に光異性化を示す。

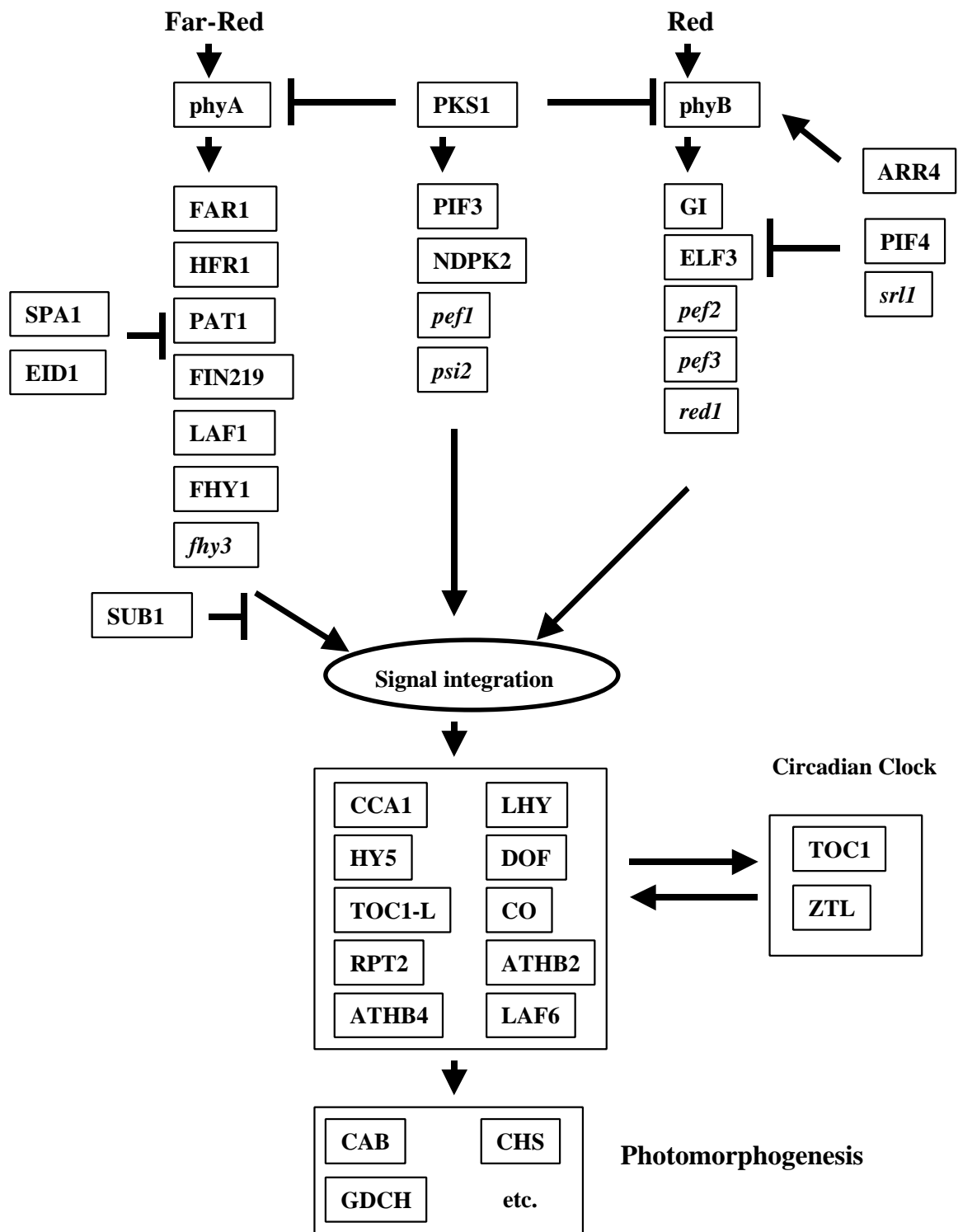
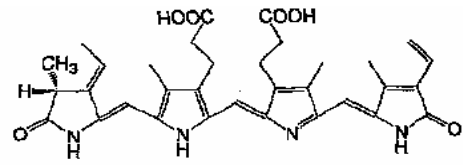
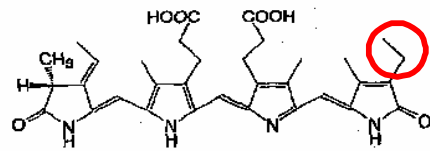


図3-2. フィトクロムのシグナル伝達経路

Quail PH. Current Opinion in Cell Biology 2002, 14: 180-188より図の一部を改変した。



**フィクロモビルン
(PFB)**



**フィコシアノビルン
(PCB)**

図3-3. フィクロモビルン(PFB)、フィコシアノビルン(PCB)の構造
赤丸は、D環C18位側鎖を示している。

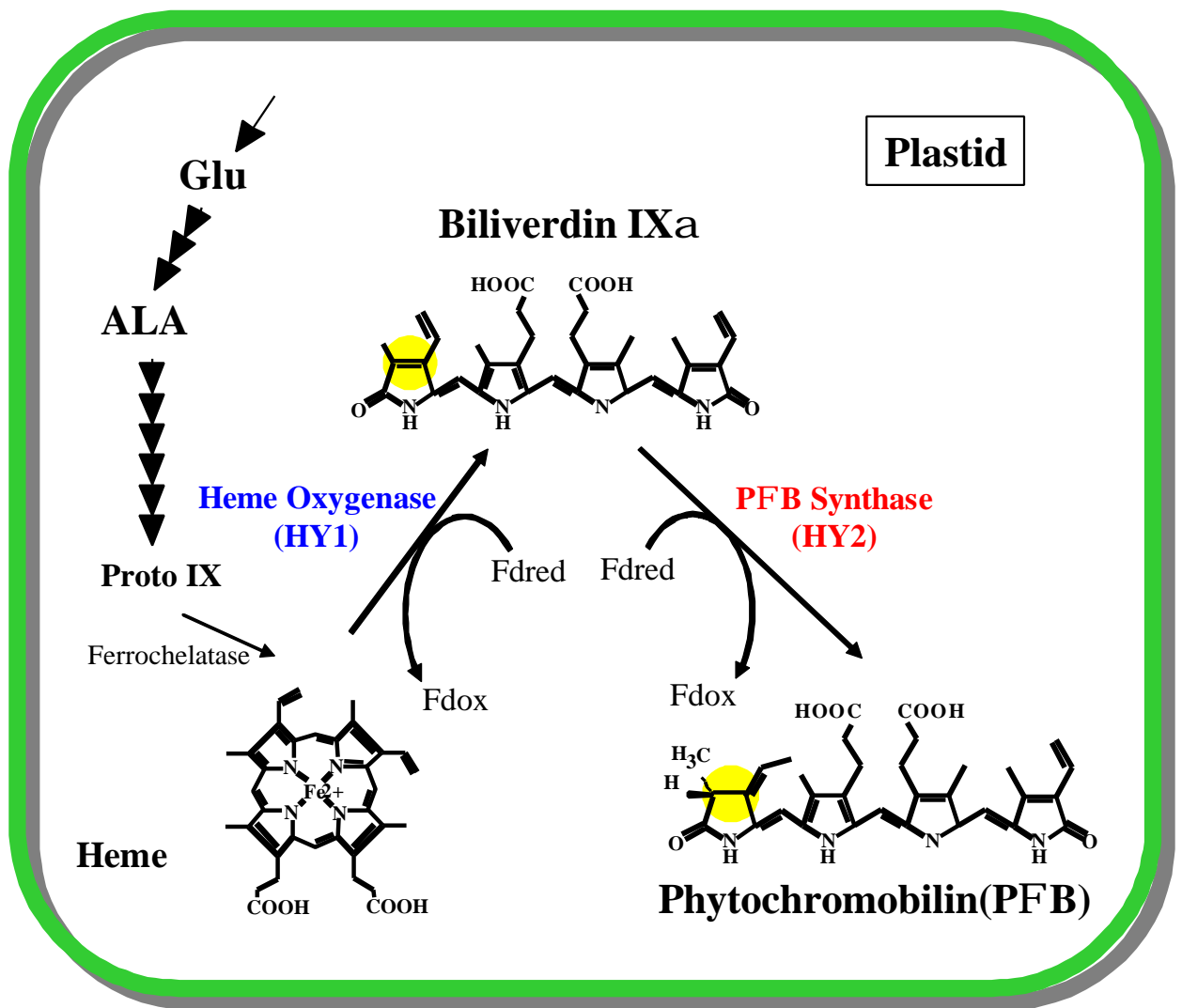


図3-4. フィトクロモビルン(PΦB)生合成経路
葉緑体におけるPΦB合成経路を示している。

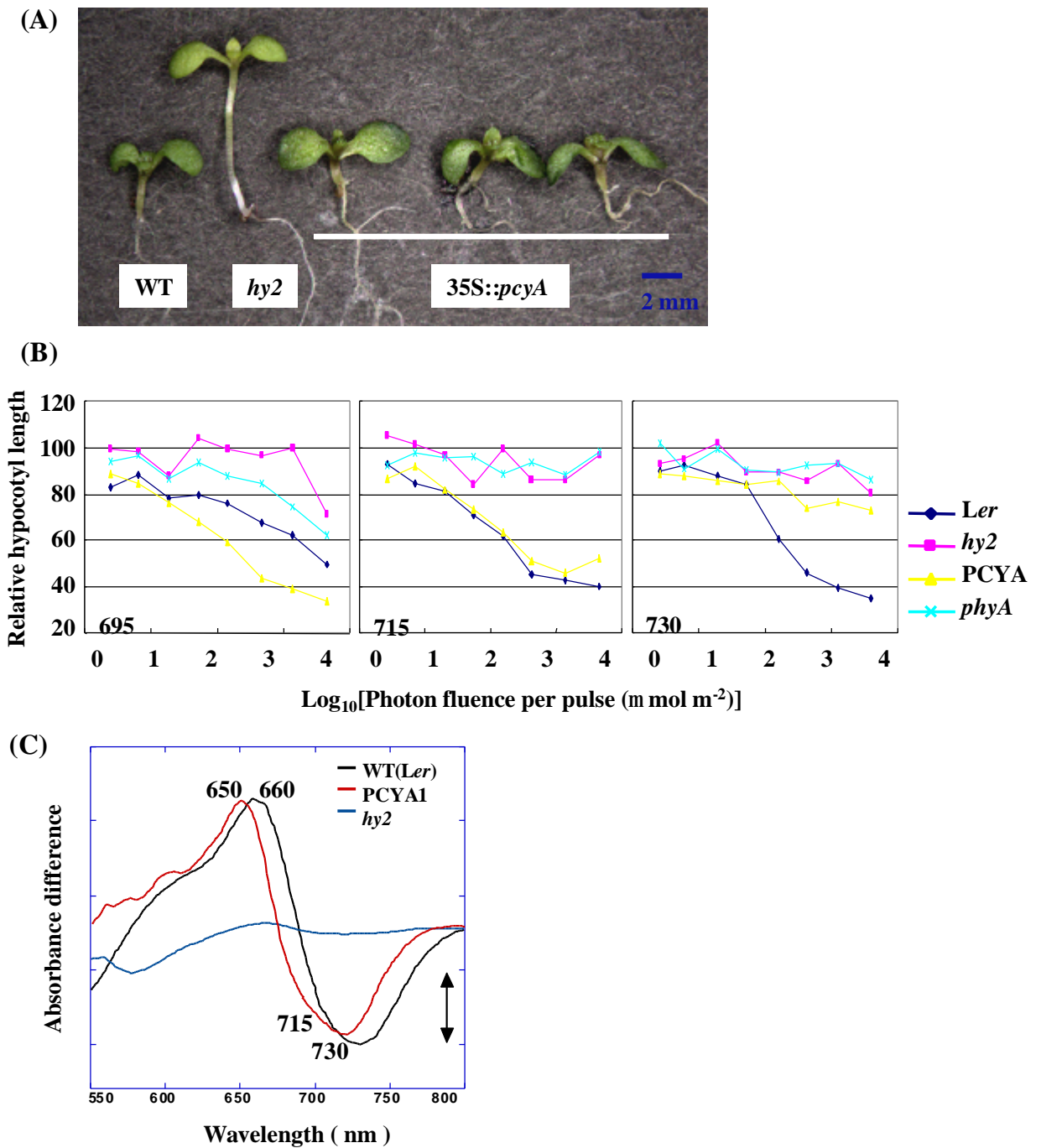


図3-5. 発色団改変型植物(PCYA1)の特徴

(A)は、白色光照射時の芽生えを示す。(B)は、芽生えにおける大型スペクトログラフ施設(OLS)を用いた単色光、695、715、730 nm照射時の胚軸伸長を調べた結果である。縦軸は暗所を100とした胚軸長の相対値を示しており、横軸は光量を示している。(C)は、PCYA1におけるフィトクロムAタンパク質の差スペクトルを示している。Kami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004より図の一部を改変した。

表 3-1. 光シグナル関連遺伝子群のリアルタイム PCR 解析用プライマー

Gene	Left primer(5'→3')	Right primer(5'→3')	Size	Note	Reference
<i>CAB</i>	aacgcttgcttcaagctac	caaagcagagagattatgaagca	79	Photosynthesis biosynthesis	Tepperman et al., 2001
<i>CAO</i>	ctgtggagacatttgcctga	gctccggtttaaactccgttc	83	Photosynthesis biosynthesis	Ma et al., 2001
<i>PSII</i>	tccgctggagagatcaacttt	cgaacactccgatcacttca	70	Photosynthesis biosynthesis	Tepperman et al., 2001
<i>FECH</i>	atgctggagatccgtaaccag	caccttgcttttagctctt	75	Tetrapyrrole biosynthetic pathway	Strand et al., 2002
<i>HEMAI</i>	tgagcgagacccttgaagaat	tgcttaagcttttctctca	83	Tetrapyrrole biosynthetic pathway	Strand et al., 2002
<i>HVI</i>	tcctcaagcattcatttgtca	cctttctgccaatcattcgtt	77	Tetrapyrrole biosynthetic pathway	Muramoto et al., 1999
<i>HY2</i>	gtgaagcaaaaggcaaaaggag	cctaaactcctccacccatt	61	Tetrapyrrole biosynthetic pathway	Kohchi et al., 2001
<i>MGCII</i>	tcgataaacaatgggataaaagc	cagagagaagaagctgtttgg	98	Tetrapyrrole biosynthetic pathway	Tepperman et al., 2001
<i>PORA</i>	tgggcttggcctataaaact	cttogaattggtaccgagag	64	Tetrapyrrole biosynthetic pathway	Ma et al., 2001
<i>PORB</i>	tcaaggtggtgagatccaa	tcaaaaagaagcagaagcatt	75	Tetrapyrrole biosynthetic pathway	Ma et al., 2001
<i>FAR1</i>	ggagctgagttgcaatgaca	catcataaaggcaatcccaaaa	75	PHYA signaling	Wang et al., 2002
<i>FIN219</i>	atcgatcgggttcaagtttag	tctttttggacaactctca	75	PHYA signaling	Wang et al., 2002
<i>HFR1</i>	gagttccaaataggaagtttgtg	tacaaaaccacccgggaaaaa	69	PHYA signaling	Tepperman et al., 2001
<i>BAT1</i>	cgaactcctaggaataatgga	attcaccaggggactcaaacg	76	PHYA signaling	Quail, 2000
<i>PHYA</i>	ccaatgtttggactgaggg	cttcaccaattccggcttaa	73	PHYA signaling	Ma et al., 2001
<i>SPAI</i>	atcccaatttctggaaaagaa	ctcccaacagcgtctgacac	64	PHYA signaling	Wang et al., 2002
<i>ATHB2</i>	gctgaaagcaaacggaggtag	ttgtagccagcggttctctt	79	PHYB signaling	Tepperman et al., 2001
<i>PHYB</i>	agcaaatggctgagggattc	ctctggaggcagaccctcac	77	PHYB signaling	Quail, 2000
<i>GI</i>	ctagcagttggtcgacggttt	gggtgaaaggcaccgtaatt	73	PHYB signaling and Circadian rhythms	Tepperman et al., 2001
<i>NDPK2</i>	ggaaaaacagatccgcttcaa	cacaatgtccctccggttt	77	PHYA and PHYB signaling	Quail, 2000
<i>PIF3</i>	ggaagcaaacacaccagtg	attgccaaatcgtccgaaagac	83	PHYA and PHYB signaling	Quail, 2000
<i>PKSI</i>	tcaaatcaatttaaaaggtttctt	tccaatcattgtcactctttga	78	PHYA and PHYB signaling	Quail, 2000
<i>CCA1</i>	gcaactttcgtctcatcatt	cagatctcggaggtgagctc	79	Circadian rhythms	Tepperman et al., 2001
<i>LHY</i>	agagaccagttgggaaaca	cttccaatcgaagccttttg	68	Circadian rhythms	Tepperman et al., 2001
<i>sIF4A-1</i>	accaggctaaaggttgattg	ctctcaaacaccagagaca	76	Control	-

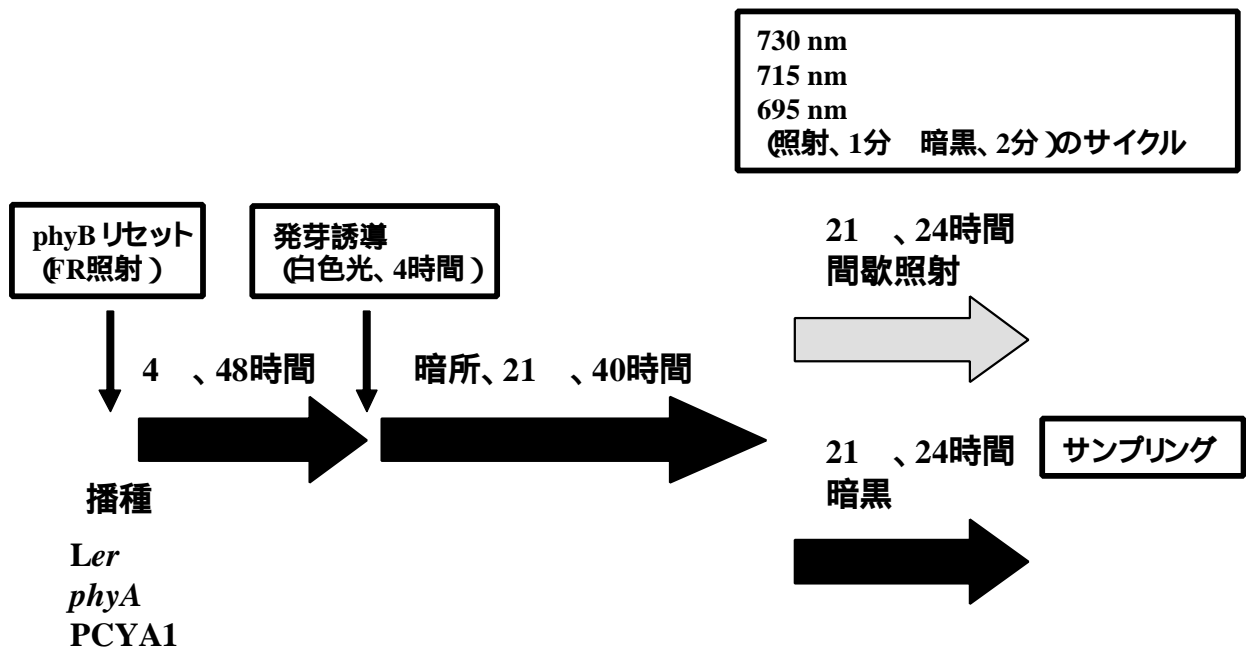


図3-6. 単色光照射実験の手順

播種後、phyBリセットのために、FR照射を行う。低温処理後、発芽誘導のために白色光を4時間照射する。その後、暗所で40時間育成後、24時間の間歌照射を行う。対照サンプルは、24時間、暗所に置く。

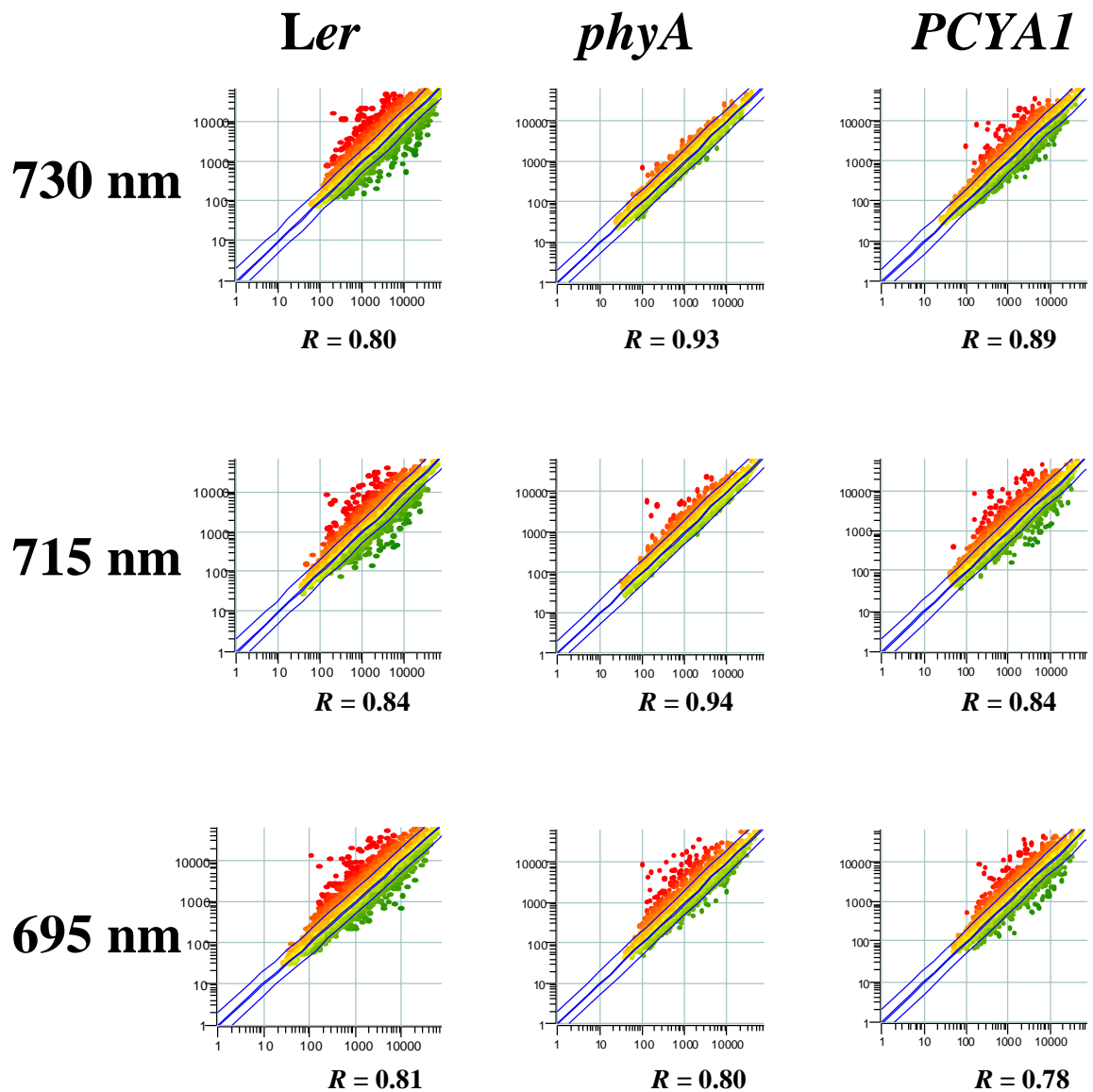


図3-7. cDNAマイクロアレイによる単色光照射遺伝子発現の相関性
 暗所育成させた野生型(*Ler*)、*phyA*欠損体(*phyA*)、発色団改変植物体(*PCYA1*)の芽生えに、730、715、695 nmの単色光を24時間、間歇照射したサンプルの蛍光強度を縦軸に、対照サンプルである暗所芽生えの蛍光強度を横軸にした散布図を示す。また相関係数 R 値を散布図の下に示す。

表 3-2. 単色光照射による遺伝子発現変動クローン数

	<u>Ler</u>			<u>phyA</u>			<u>PCYA1</u>		
	730 nm	715 nm	695 nm	730 nm	715 nm	695 nm	730 nm	715 nm	695 nm
Light-induced	472	379	429	42	92	236	234	321	250
Light-repressed	285	197	211	10	1	66	183	146	143
Total	757	576	640	52	93	302	417	467	393

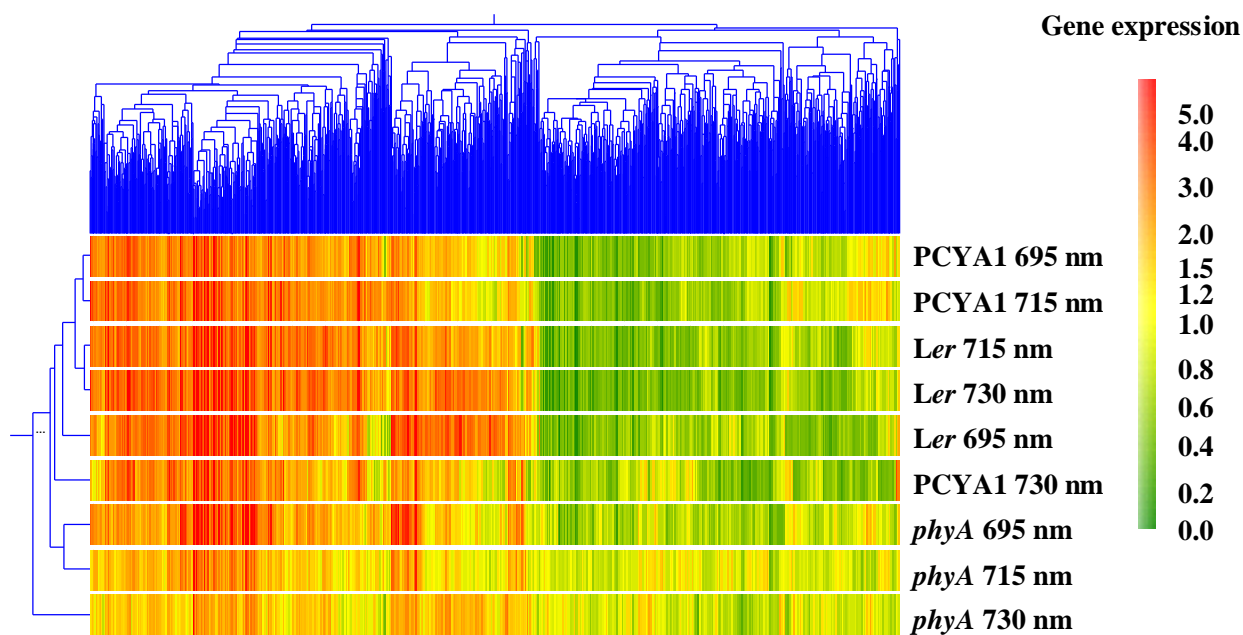
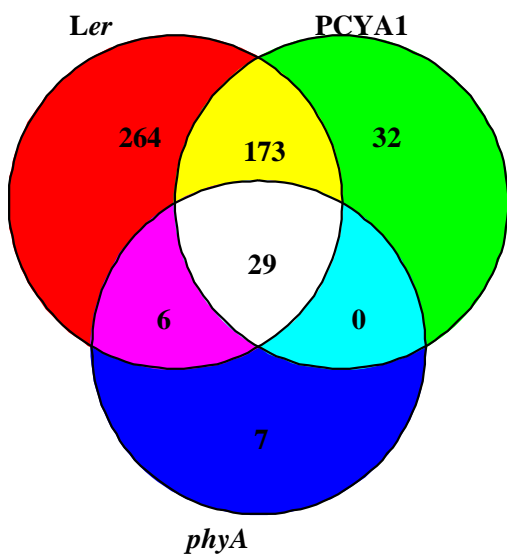


図3-8. 単色光照射遺伝子発現プロファイルのペアワイズコリレーション解析
発現変動を示すと判断された1,251クローンに関して、遺伝子クラスタリング（横
方向）、実験クラスタリング（縦方向）を組み合わせた解析を示している。

Up-regulated



Down-regulated

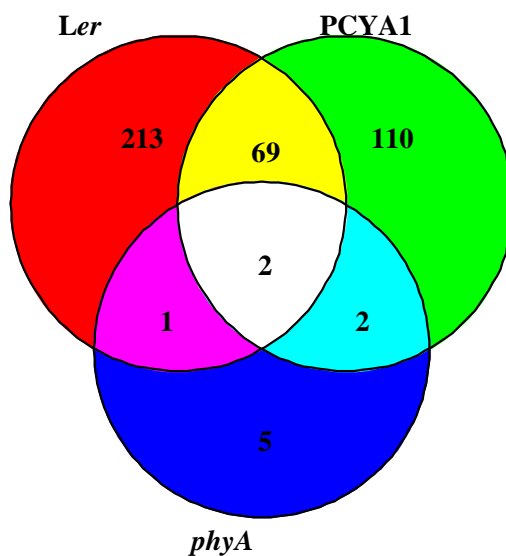


図3-9. 730 nm単色光照射時の発現変動クローンの重複
730 nm単色光照射時に*Ler*、PCYA1、*phyA*で発現変動したクローンを抽出後、ベン図による解析を行った結果を示す。発現比2.0以上を発現上昇、0.5以下を発現減少クローンとして扱った。

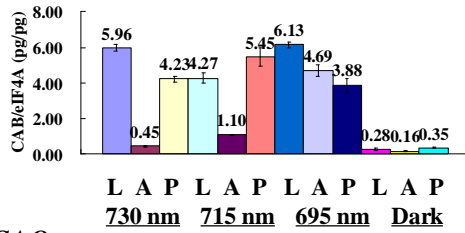
表 3-3. 表現型に依存しない phyA シグナル関連遺伝子候補

LOCUS	Gene identification	I _{er}	nhvA	PCYA1
At1g11950	putative DNA-binding protein	2.55	0.92	2.75
At1g13280	unknown protein	0.41	1.06	0.41
At1g13930	putative hydroxyproline-rich glycoprotein	2.66	0.83	2.36
At1g16080	unknown protein	2.76	1.13	2.54
At1g20910	hypothetical protein	0.35	0.91	0.36
At1g26270	hypothetical protein	0.41	0.83	0.48
At1g50250	FtSH	2.49	1.00	2.42
At1g68010	hydroxypyruvate reductase (HPR)	5.21	1.59	5.32
At1g75680	endo-beta-1,4-glucanase, putative	0.36	0.80	0.33
At2g14890	arabinogalactan-protein AGP9	0.25	0.88	0.26
At2g26500	unknown protein	2.34	1.04	3.33
At2g30520	RPT2	11.87	1.44	10.26
At2g41680	putative thioredoxin reductase	2.37	1.09	2.78
At2g42940	hypothetical protein	2.10	1.32	2.59
At2g44080	unknown protein	0.41	0.88	0.39
At2g47750	putative auxin-responsive protein	2.10	1.10	2.01
At3g01500	carbonic anhydrase, chloroplast precursor	2.18	1.12	2.06
At3g17090	protein phosphatase-2c, putative	0.50	0.97	0.50
At3g19820	cell elongation protein, Dwarf1	0.48	0.87	0.46
At3g21055	unknown protein	2.36	1.47	2.30
At3g26570	phosphate transporter, putative	2.51	1.30	2.53
At3g47340	glutamine-dependent asparagine synthetase	2.23	0.93	2.15
At3g57750	protein kinase - like protein	0.26	0.80	0.27
At3g59970	methylenetetrahydrofolate reductase MTHFR1	2.03	1.26	2.03
At4g02520	Atpm24.1 glutathione S transferase	0.42	0.98	0.49
At4g12800	probable photosystem I chain XI precursor	2.14	1.44	2.13
At4g16985	hypothetical protein	2.99	1.23	3.53
At4g21280	photosystem II oxygen-evolving complex protein 3 - like	2.58	1.16	2.68
At4g21830	putative protein	0.49	1.02	0.33
At4g27450	putative protein	0.42	0.89	0.37
At4g27520	putative protein	3.28	1.12	3.54
At4g32020	putative protein	0.47	0.89	0.39
At4g34200	Phosphoglycerate dehydrogenase - like protein	0.41	0.83	0.29
At4g37870	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) -like protein	0.35	0.77	0.38
At5g01015	unknown protein	2.17	1.03	2.32
At5g04140	ferredoxin-dependent glutamate synthase	3.35	1.37	3.88
At5g04710	aspartyl aminopeptidase -like protein	2.10	1.07	2.19
At5g21010	Unknown protein	0.29	0.97	0.25
At5g26850	putative protein	0.49	0.91	0.42
At5g46800	carnitine/acylcarnitine translocase-like protein	2.49	1.02	2.33
At5g64120	peroxidase (emb/CAA67551.1)	0.44	0.88	0.37
At5g64260	phi-1-like protein	0.48	0.93	0.49
At5g66800	unknown protein	0.44	0.94	0.45

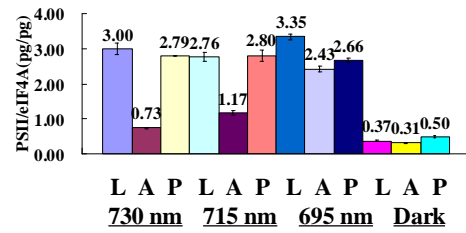
数値は、730 nm 単色光照射サンプル/暗所コントロールの比を示す。

(A)

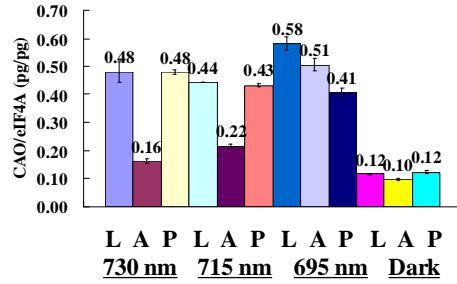
CAB



PSII

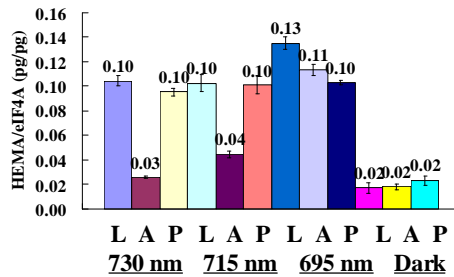


CAO

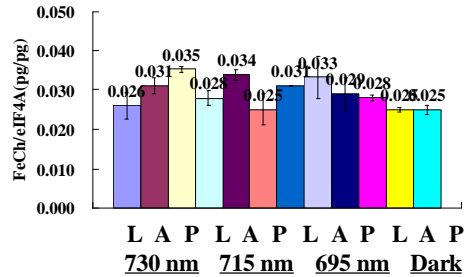


(B)

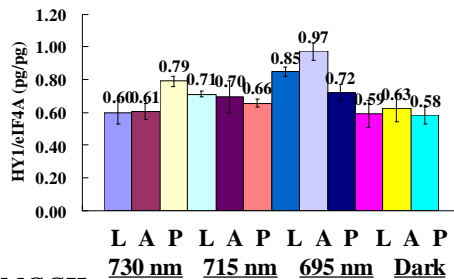
HEMAI



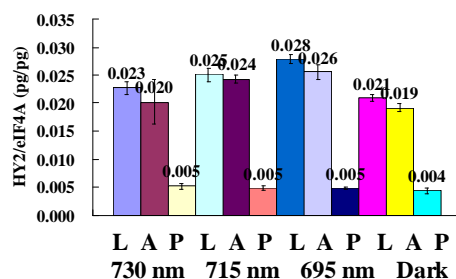
FECH



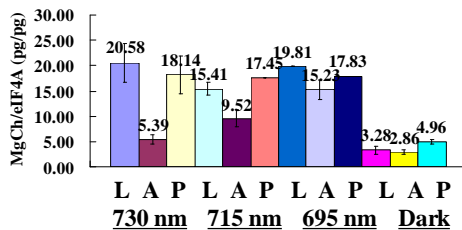
HY1



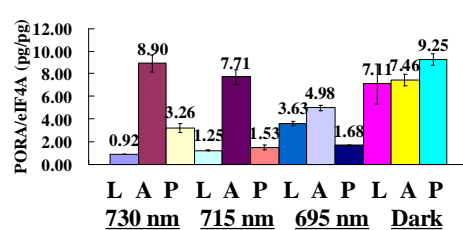
HY2



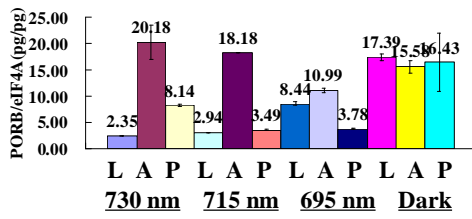
MGCH



PORA

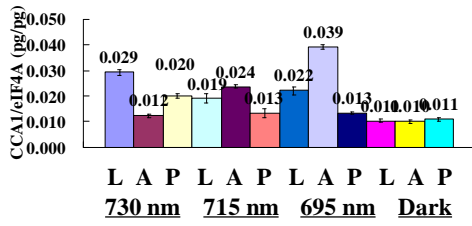


PORB

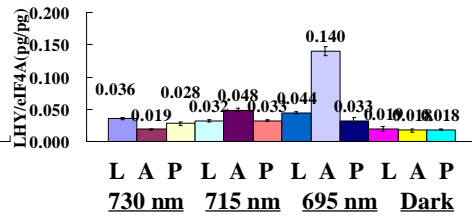


(C)

CCA1

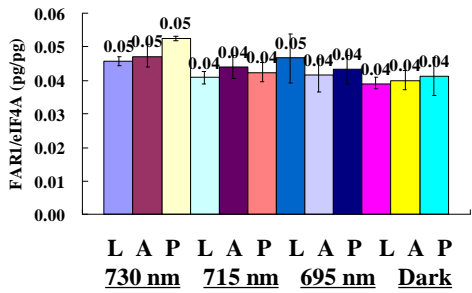


LHY

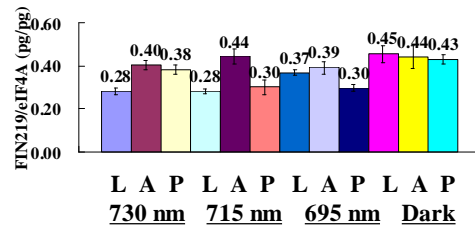


(D)

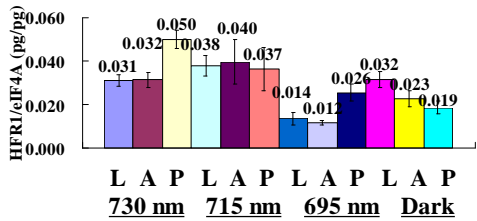
FARI



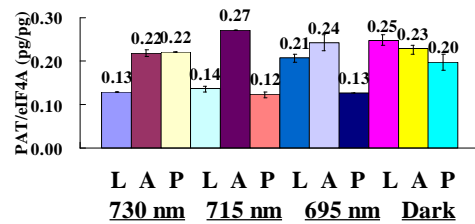
FIN219



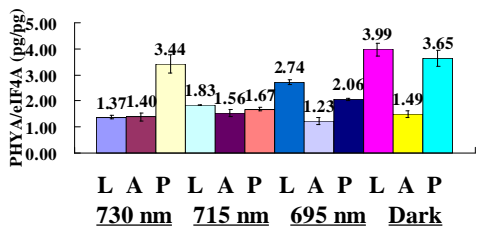
HFR1



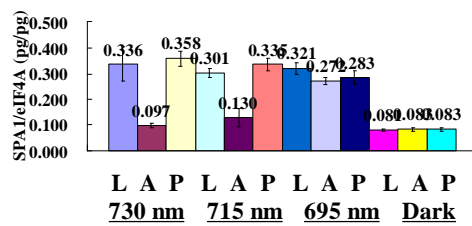
PAT1



PHYA

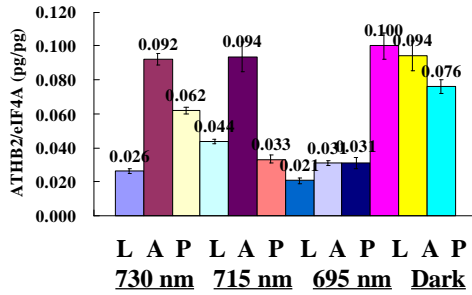


SPA1

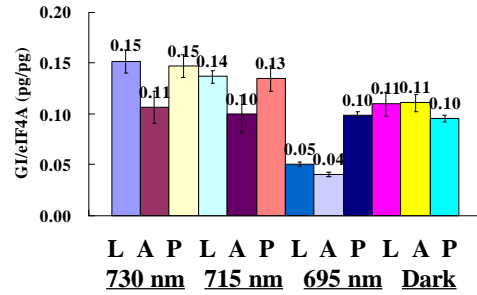


(E)

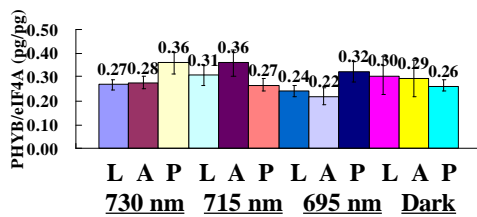
ATHB2



GI

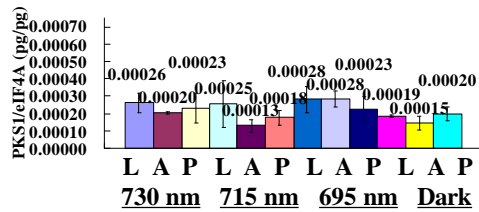


PHYB

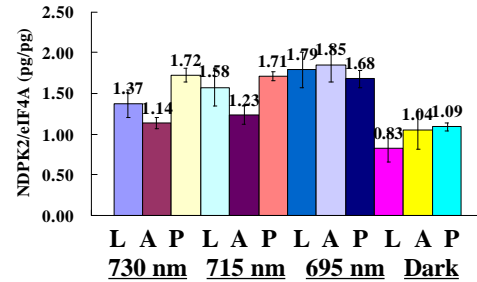


(F)

PKSI



NDPK2



PIF3

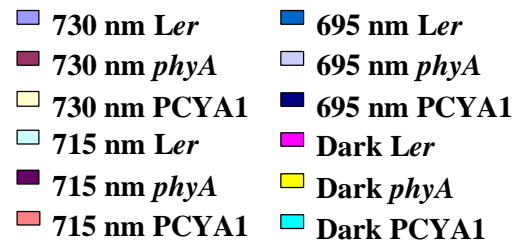
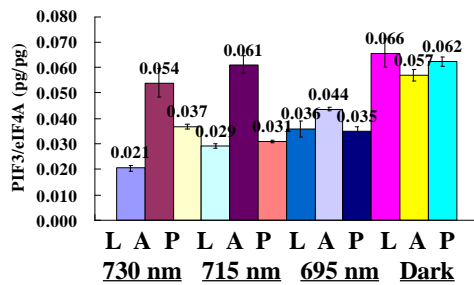


図3-10. フィトクロムシグナル関連遺伝子群のリアルタイムPCRによる発現解析
 暗所育成させたL：野生型(*Ler*)、A：*phyA*欠損体(*phyA*)、P：発色団改変植物体
 (*PCYA1*)の芽生えに、730、715、695 nmの単色光を24時間、間歇照射、暗所芽生え
 サンプルの発現解析を示している。(A)は光合成関連遺伝子、(B)はテトラピロール
 生合成経路遺伝子、(C)は概日リズム関連遺伝子、(D)は*phyA*シグナル関連遺伝子、
 (E)は*phyB*シグナル関連遺伝子、(E)は*phyA*および*phyB*シグナル関連遺伝子の発現解
 析である。barは標準偏差を示し、検定数が3回での解析結果である。数値は、内在
 性コントロール遺伝子として利用した*eIF4A-1*の発現量を基準として、標準化した
 値を示している。

PCB-phyA

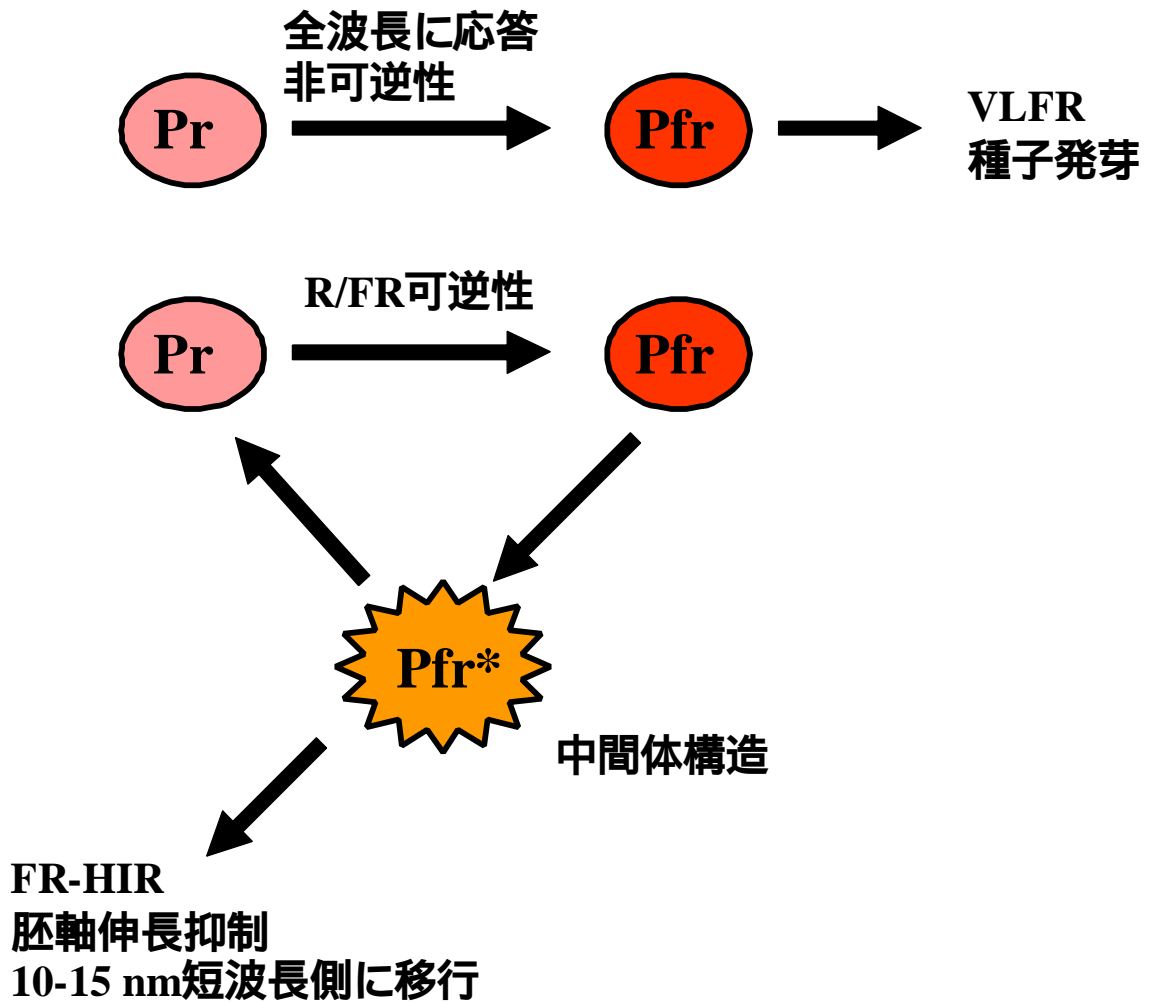


図3-11. PCYA1におけるフィトクロム応答
PCYA1におけるPCB-phyAの生理応答、および分子応答のまとめを示す。嘉美千歳、奈良先端科学技術大学院大学博士論文、2003より図の一部を改変した。

総括

本研究は、ゲノム規模での包括的な遺伝子発現解析を行うことで、これまでの個別解析では明らかにできなかった植物の分子応答機構の知見を得ることを目指した。そこで、シロイヌナズナを材料として、効率良く様々な種類の cDNA を獲得可能な均一化 cDNA ライブラリーをマイクロアレイ技術に適用した。そして、系統的な遺伝子発現解析を行うことにより、植物の器官における遺伝子発現の特異性、光環境応答における遺伝子発現の動態から、その分子生理機構を考察した。

第 1 章においては、均一化 cDNA ライブラリーを利用した cDNA マイクロアレイ実験系構築を行い、その実験系の有効性、正確性を評価した。最初に SSH 法を用いた self-subtraction による均一化操作を行うことで、器官、組織別の均一化 cDNA ライブラリーが構築された。そして、均一化 cDNA ライブラリー由来クローンのランダムシーケンスを行い、クローンの重複頻度を調べた結果、均一化操作を行わない一般的な cDNA ライブラリーよりも均一化を行うことで、効率良く様々な cDNA 種を獲得できることも示された (図 1-4)。また、従来の均一化操作は、均一化サイクル法で行われていたが、操作が煩雑なこともあり、時間的効率が悪い。それに対し、SSH 法は操作が簡便であるため、時間的効率が良い。実際、両者の均一化効率に差異は認められなかった (図 1-4)。これらのことから、均一化操作を SSH 法で行った、均一化 cDNA ライブラリーを利用することで、cDNA マイクロアレイ作製のために、様々な種類の cDNA を迅速かつ効率的に収集することが示された。この実験系は、ゲノム情報などが乏しい生物種に適用することが可能であり、時間、作業効率、経済的に優れていると考えられる。次に、均一化 cDNA ライブラリー由来 cDNA を用いて、cDNA マイクロアレイを作製した。同一の全 RNA 由来の Cy3、Cy5 標識 cDNA ターゲット、および非塩ストレス処理全 RNA 由来の Cy3、塩ストレス処理全 RNA 由来の Cy5 標識ターゲットを利用した二蛍光標識法による競合ハイブリダイゼーションの解析結果、同一サンプルの発現プロファイルは発現変動が起こらず、塩ストレス処理サンプルの発現プロファイルは発現変動を示すという期待通りの結果となった (図 1-6)。また塩ストレス処理により発現上昇を示した遺伝子をランダムに抽出し、ノザン解析を行った (図 1-7)。その結果、マイクロアレイデータとほぼ一致していた。これらのことから、実験的に、均一化 cDNA ライブラリーを利用して、cDNA マイクロアレイを作製し、正しい実験系を構築可能であることが示された。

第 2 章では、花、茎、葉、根といった植物の 4 器官について、cDNA マイクロアレイを利用した遺伝子発現プロファイルを作成し、器官特異発現性を考察した。5,241 遺伝子の発現パターンを器官の系統関係を調べるために、ペアワイズ相関解析を行った。その結果、従来唱えられてきた花が葉の相同器官であるという説が支持された。また発現に類似性のある遺伝子を分類するために、k-means クラスタリング解析を行った。その結果、葉での発現特異性が高い遺伝子を含むクラスターは、プラスチド移行シグナルを持つタンパク質の割合が高いこと、根での発現特異性が高い

遺伝子を含むクラスターは、分泌タンパク質の割合が高いことが示された。これまで、系統的な解析により、根で発現特異性が高い遺伝子は、分泌タンパク質の割合が高いという知見を示した報告例はなく、本研究により明らかにされた。次に、器官別遺伝子発現プロファイルを組み合わせることで、器官特異的発現遺伝子の同定を行った。その結果、葉で 55、茎で 22、花で 21、根で 131 種類の計 229 遺伝子を同定した。葉では光合成、炭素固定で働く遺伝子などが多数同定されており、根では Alcohol dehydrogenase、 β -1,3-glucanase などが同定された。花においては、花器官形成に關与する転写因子などが同定された。これらの既知遺伝子に加えて、各器官での特異的発現を示す 67 遺伝子の機能未知遺伝子を同定した。以上の結果から、cDNA マイクロアレイを利用した系統的な解析により、全体像を捉えることで、遺伝子発現のレベルから、花が葉の相同器官であるという知見を支持することができ、さらに、根での発現特異性が高い遺伝子は、分泌タンパク質の割合が高いという新たな知見を得ることが可能であった。また、cDNA マイクロアレイを利用した系統的な解析による遺伝子同定は、既知の遺伝子だけではなく、新規遺伝子を同定するにも効果を発揮した。

第 3 章では、環境応答における遺伝子発現ネットワークの解析として、フィコシアノビルリン(PCB)をフィトクロム発色団に持つ発色団改変植物体(PCYA1)の遠赤色光高照射反応(FR-HIR)の光応答初期における遺伝子発現を、本アレイシステムによって解析した。これまでの解析で、PCB を発色団に持つ phyA(PCB-phyA)の FR-HIR の作用スペクトルの波長認識特性がフィトクロムビルリン(P Φ B)を発色団に持つ phyA(P Φ B-phyA)と比べて、短波長側に移行していることが明らかとなっている。また大型スペクトログラフ施設(OLS)を利用した PCYA1 の胚軸伸長抑制を調べた表現型観察の結果からも、植物体内で PCB-phyA によって引き起こされる生理応答の波長域が短波長側に移行することが示唆されている。PCYA1 の詳細な光応答の分子機構を解明するために、OLS を利用して、野生型(*Ler*)、*phyA*、PCYA1 の暗所芽生えに 730、715、695 nm の単色光を 24 時間の間歇照射した植物体から全 RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。暗所育成させたコントロールに対して、それぞれの光照射条件で比較をした cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを作成し、ペアワイズコリレーション解析を行った。その結果、波長特性は短波長側に移行するが、PCB-phyA は P Φ B-phyA と同様なタンパク質の構造変換を起こし、下流遺伝子群に正常なシグナル伝達が起こる分子機構が明らかとなった。このことは、生理表現型と系統的な遺伝子発現により解析された分子表現型が一致していることを示している。また、730 nm の光照射時に、*phyA* 依存であるが、野生型と PCYA1 では同様な発現変動を示す遺伝子も存在した。このことは、胚軸伸長抑制の FR-HIR とは全く異なる制御系の存在を示している。以上のことから、生理表現型と分子表現型が一致すること、および生理表現型では隠された表現型を分子表現型により発見することが可能であることが判明した。

DNA マイクロアレイを中心とした系統的な遺伝子発現解析は、非常に強力な遺伝子同定技術である。最近では、植物の組織、細胞レベルでの発現解析も始まっている。

Laser Capture Microdissection (LCM)を利用し、トウモロコシの表皮細胞と維管束組織を分離し、cDNA マイクロアレイ解析を行った報告例が示されている(Nakazono et al., 2003)。また、シロイヌナズナの根において、細胞特異的プロモーターに GFP を連結させて遺伝子導入を行った形質転換体と cell sorter を利用することで、目的細胞、組織を分離し、GeneChip 解析を行った例も報告されている(Brinbaum et al., 2003)。加えて、シロイヌナズナのゲノム情報を基礎として作製されたオリゴヌクレオチドアレイを利用することで、5,817 の新規転写単位が発見されている(Yamada et al., 2003)。しかしながら、このような大規模な遺伝子同定だけではなく、本論文では、全体像を捉えることで、新たな知見を得ることもできた。実際、生理表現型と cDNA マイクロアレイを用いた系統的な発現解析結果の分子表現型を考慮した解析が行われており(Ma et al., 2001; Wang et al., 2002; Srand et al., 2003)、遺伝子発現の全体像を捉えた知見も蓄積されて行くだろう。今後、様々な変異体、生理条件などを組み合わせ、マイクロアレイを中心とした系統的な遺伝子発現解析を行うことで、植物の遺伝子発現のネットワークが明らかとなり、それを突破口にした植物生理現象の解明が期待できる。

謝辞

本研究を行うにあたり、色々と熱心に御指導していただきました横田明穂教授に厚く御礼申し上げます。また、直接御指導をいただきました河内孝之助教授には、時には厳しい御言葉、しかしながら筆舌に尽くし難いほどの暖かい保護を受けました。あまりにも感謝の思いが大きく、何を記せば良いのかわかりません。竹村美保助手、明石欣也助手、三宅親弘博士には議論する機会を与えていただき、感謝しております。

本研究は、様々な方々の支えがあって行われたものです。実験は、「バイオ組合」の集中研究室で行われたものです。色々と有益な議論をして頂いた、集中研究室で働く企業研究員、博士研究員の大平和幸氏、澤田和敏氏、幸田勝典氏、宮下京子氏、山川清栄氏、瀧田英司氏、志澤暢子氏、皆様に感謝しております。事務的な仕事をお願いするにあたり、快く引き受けて頂いた須藤要氏に御礼を申し上げます。また、実際に実験を手助けして頂いた徳田玲奈さん、亀山淳子さん、奥山恵理さんに感謝致します。さらに、吉田和哉助教授、プロジェクトリーダーであります新名惇彦教授には、非常に御世話になりました。

マイクロアレイ実験を先行して行っていた松原研の的場亮助手、樋口浩文氏、小笠原研の小林和夫助手には適切なアドバイスにより、ここまでの系を構築することができました。非常に感謝しております。

PCYA1の解析を行うにあたり、様々な助言、手助けを与えてくれた嘉美千歳博士、OLSでは村本拓也博士、昔の同期である蘆田佳子さん、後輩の小林聡和君に支えて頂きました。この場で感謝の言葉を述べたいと思います。

また、縁があって、様々な方々を教える機会がありました。特に密度の濃い時間を過ごした富川泉さん、松田優子さん、平良安聡君、落合春奈さん、小島久美子さん、稲垣英明君、吉田裕香さんには、これから社会に出るにあたり、最良の経験をさせて頂いたと感じております。

まだまだたくさんの方々を支えられて、本研究が行えたことを自覚しております。最後に、この年齢までの学生生活を許してくれた両親に感謝の言葉を贈り、本博士論文を終わりたいと思います。

参考文献

- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. and Tabata, S.** (2000) A large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Res.*, **7**, 175-180.
- Audic, S. and Claverie, JM.** (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.*, **7**, 986-995.
- Baumann, K., De Paolis, A., Costantino, P. and Gualberti, G.** (1999) The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *Plant Cell*, **11**, 323-334.
- Benfey, PN.** (1999) Is the shoot a root with a view? *Curr Opin Plant Biol.*, **2**, 39-43.
- Birnbaum, K., Shasha, DE., Wang, JY., Jung, JW., Lambert, GM., Galbraith, DW. and Benfey, PN.** (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*, **302**, 1956-1560.
- Borisjuk, NV., Borisjuk, LG., Logendra, S., Petersen, F., Gleba, Y. and Raskin, I.** (1999) Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nat Biotechnol.*, **17**, 466-469.
- Capel, J., Jarillo, JA., Salinas, J. and Martinez-Zapater, JM.** (1997) Two homologous low-temperature-inducible genes from *Arabidopsis* encode highly hydrophobic proteins. *Plant Physiol.*, **115**, 569-576.
- 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.
- Chen, W., Chao, G. and Singh, KB.** (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J.*, **10**, 955-966.
- Chory, J., Chatterjee, M., Cook, RK., Elich, T., Fankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J. and Vitart, V.** (1996) From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 12066-12071.
- Chung, HJ. and Ferl, RJ.** (1999) *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase expression in both

shoots and roots is conditioned by root growth environment. *Plant Physiol.*, **121**, 429-436.

Church, GM. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 1991-1995.

Cruz-Ortega, R., Cushman, JC. and Ownby, JD. (1997) cDNA clones encoding 1,3-beta-glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiol.*, **114**, 1453-1460.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 6025-6030.

Duky, GM. (2002) Sharper tools and simpler methods. *Nat. genet.*, **32 Suppl**, 465-468.

Elich, TD. and Chory, J. (1997) Biochemical characterization of Arabidopsis wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *Plant Cell*, **9**, 2271-2280.

Elmayan, T. and Tepfer, M. (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res.*, **4**, 388-396.

Ewing, RM., Jenkins, GI. and Langdale JA. (1998) Transcripts of maize RbcS genes accumulate differentially in C3 and C4 tissues. *Plant Mol. Biol.*, **36**, 593-599.

Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T. and Lagarias, JC. (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell*, **13**, 965-978.

Gilmour, SJ., Artus, NN. and Thomashow, MF. (1992) cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 13-21.

Gurskaya, NG., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, PD., Khaspekov, GL., Lukyanov, KA., Vagner, LL., Ermolaeva, OD., Lukyanov, SA. and Sverdlov, ED. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.*, **240**, 90-97.

Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and Yanofsky, MF. (1994) Regulation of the arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Cell*, **76**, 131-143.

Gyula, P., Schafer, E. and Nagy, F. (2003) Light perception and signalling in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**, 446-452.

Hanzawa, H., Shinomura, T., Inomata, K., Kakiuchi, T., Kinoshita, H., Wada, K. and Furuya, M. (2002) Structural requirement of bilin chromophore for the photosensory specificity of phytochromes A and B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4725-4729.

Hoheisel, JD. and Lehrach, H. (1993) Use of reference libraries and hybridisation fingerprinting for relational genome analysis. *FEBS Lett.*, **325**, 118-122.

Honma, T. and Goto, K. (2000) The *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development*, **127**, 2021-2030.

Hua, XJ., Van de Cotte, B., Van Montagu, M. and Verbruggen, N. (2001) The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J.*, **26**, 157-169.

Hyodo, H., Takemura, M., Yokota, A., Ohyama, K. and Kohchi, T. (2000) Systematic isolation of highly transcribed genes in inflorescence apices in *Arabidopsis thaliana* from an equalized cDNA library. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1538-1541.

Ito, T., Kito, K., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H. and Sakaki Y. (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett.*, **351**, 231-236.

Jack, T., Fox, GL. and Meyerowitz, EM. (1994) *Arabidopsis* homeotic gene APETALA3 ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell*, **76**, 703-716.

Jordan, ET., Marita, JM., Clough, RC. and Vierstra, RD. (1997) Characterization of regions within the N-terminal 6-kilodalton domain of phytochrome A that modulate its biological activity. *Plant Physiol.*, **115**, 693-704.

Kagaya, Y., Nakamura, H., Hidaka, S., Ejiri, S. and Tsutsumi, K. (1995) The promoter

from the rice nuclear gene encoding chloroplast aldolase confers mesophyll-specific and light-regulated expression in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, **248**, 668-674.

Kami, C., Mukougawa, K., Muramoto, T., Yokota, A., Shinomura, T., Lagarias, JC. and Kohchi, T. (2004) Complementation of phytochrome chromophore-deficient *Arabidopsis* by expression of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Kato, K. (1995) Description of the entire mRNA population by a 3' end cDNA fragment generated by class IIS restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3685-3690.

Kato, K. (1997) Adaptor-tagged competitive PCR: a novel method for measuring relative gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4694-4696.

Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, PS. and Choi, G. (2003) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell*, **15**, 2399-2407.

Klinedinst, S., Pascuzzi, P., Redman, J., Desai, M. and Arias, J. (2000) A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 679-688.

Ko, MS. (1990) An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 5705-5711.

Kohchi, T., Fujishige, K. and Ohyama, K. (1995) Construction of an equalized cDNA library from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **8**, 771-776.

Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A., and Lagarias, JC. (2001) The *Arabidopsis* *hy2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell*, **13**, 425-436.

Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H. and Shinozaki, K. (1993) Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **129**, 175-182.

Kononowicz, AK., Nelson, DE., Singh, NK., Hasegawa, PM. and Bressan, RA. (1992) Regulation of the Osmotin Gene Promoter. *Plant Cell*, **4**, 513-524.

Kreps, JA., Wu, Y., Chang, HS., Zhu, T., Wang, X., and Harper, JF. (2002) Transcriptome

changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.*, **130**, 2129-2141.

Kretsch, T., Poppe, C., and Schafer, E. (2000) A new type of mutation in the plant photoreceptor phytochrome B causes loss of photoreversibility and an extremely enhanced light sensitivity. *Plant J.*, **22**, 177-186.

Kuromori, T. and Yamamoto, M. (1994) Cloning of cDNAs from *Arabidopsis thaliana* that encode putative protein phosphatase 2C and a human Dr1-like protein by transformation of a fission yeast mutant. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5296-5301.

Kwon, HB., Park, SC., Peng, HP., Goodman, HM., Dewdney, J. and Shih, MC. (1994) Identification of a light-responsive region of the nuclear gene encoding the B subunit of chloroplast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **105**, 357-367.

Li, J., Jia, D. and Chen, X. (2001) HUA1, a regulator of stamen and carpel identities in *Arabidopsis*, codes for a nuclear RNA binding protein. *Plant Cell*, **13**, 2269-2281.

Li, L. and Lagarias JC. (1992) Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19204-19210.

Liang, P. and Pardee, AB. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.

Lockhart, DJ., Dong, H., Byrne, MC., Follettie, MT., Gallo, MV., Chee, MS., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. and Brown, EL. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1675-1680.

Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. and Deng, XW. (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*, **13**, 2589-2607.

Maloof, JN., Borevitz, JO., Dabi, T., Lutes, J., Nehring, RB., Redfern, JL., Trainer, GT., Wilson, JM., Asami, T., Berry, CC., Weigel, D. and Chory, J. (2001) Natural variation in light sensitivity of *Arabidopsis*. *Nat. Genet.*, **29**, 441-446.

Meinke, DW., Cherry, JM., Dean, C., Rounsley, SD. and Koornneef, M. (1998)

Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*, **282**, 679-682.

Montgomery, BL. and Lagarias, JC. (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.*, **7**, 357-366.

Muramoto, T., Kohchi, T., Yokota, A., Hwang, I. and Goodman, HM. (1999) The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell*, **11**, 335-348.

Nagatani, A., Reed, JW. and Chory, J. (1993) Isolation and Initial Characterization of *Arabidopsis* Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol.*, **102**, 269-277.

Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, LA. and Schnable, PS. (2003) Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell*, **15**, 583-596.

Newman, T., de Bruijn F. J., Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohlrogge J, Raikhel N, Somerville S, Thomashow M, Retzel, E., and Somerville, C. (1994) Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.*, **106**, 1241-1255.

Ni, M., Tepperman, JM. and Quail, PH. (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light., *Nature*, **400**, 781-784.

Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., Fukushima, A., Kojima, Y. and Matsubara, K. (1992) Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat. Genet.*, **2**, 173-179.

Patanjali, SR., Parimoo, S. and Weissman, SM. (1991) Construction of a uniform-abundance (normalized) cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 1943-1947.

Perez-Amador, MA., Lidder, P., Johnson, MA., Landgraf, J., Wisman, E. and Green, PJ. (2001) New molecular phenotype in the *dst* mutants of *Arabidopsis* revealed by DNA microarray analysis. *Plant Cell*, **13**, 2703-2713.

Podkowinski, J., Jelenska, J., Sirikhachornkit, A., Zuther, E., Haselkorn, R. and Gornicki, P. (2003) Expression of cytosolic and plastid acetyl-coenzyme A carboxylase genes in young wheat plants. *Plant Physiol.*, **131**, 763-772.

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, FT., Douglas, SH., Field, SL., Bell, SM., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, AJ., Robinson, PA., Inglehearn, CF., Isaacs, JD. and Markham, AF. (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.*, **3**, 18.

Purnell, MP., Stewart, GR. and Botella, JR. (1997) Cloning and characterisation of a glutamate dehydrogenase cDNA from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Gene*, **186**, 249-254.

Quail, PH. (2000) Phytochrome-interacting factors. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **11**, 457-466.

Redman, J., Whitcraft, J., Johnson, C. and Arias, J. (2002) Abiotic and biotic stress differentially stimulate as-1 element activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **21**, 180-185.

Riechmann, JL. and Ratcliffe, OJ. (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Cur. Opin. Plant Biol.*, **3**, 423-434.

Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M and Scheres, B. (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev.*, **17**, 354-358.

Saedler, H., Becker, A., Winter, KU., Kirchner, C. and Theissen, G. (2001) MADS-box genes are involved in floral development and evolution. *Acta. Biochim. Pol.*, **48**, 351-358.

Salinas, J., Oeda, K. and Chua, NH. (1992) Two G-box-related sequences confer different expression patterns in transgenic tobacco. *Plant Cell*, **4**, 1485-1493.

Schena, M., Shalon, D., Davis, RW. and Brown, PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.

Schultz, CJ., Hsu, M., Miesak, B. and Coruzzi, GM. (1998) *Arabidopsis* mutants define an in vivo role for isoenzymes of aspartate aminotransferase in plant nitrogen assimilation. *Genetics*, **149**, 491-499.

Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, **13**, 61-72.

Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.*, **31**, 279-292.

Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A. and Shinozaki, K. (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science*, **296**, 141-145.

Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M. and Furuya, M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8129-8133.

Shinomura, T., Uchida, K., and Furuya, M. (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **122**, 147-156.

Shoji, T., Nakajima, K. and Hashimoto, T. (2000) Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1072-1076.

Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, JR. and Chory, J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature*, **421**, 79-83.

Strand, A., Hurry, V., Gustafsson, P. and Gardestrom, P. (1997) Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *Plant J.*, **12**, 605-614.

Sullivan, JA. and Deng, XW. (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev Biol.*, **260**, 289-297.

Suzuki, K., Yun, DJ., Chen, XY., Yamada, Y., and Hashimoto, T. (1999) An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6beta-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 141-152.

Takemura, M., Fujishige, K., Hyodo, H., Ohashi, Y., Kami, C., Nishii, A., Ohyama, K.

and Kohchi, T. (1999) Systematic isolation of genes expressed at low levels in inflorescence apices of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.*, **6**, 275-282.

Tepperman, JM., Zhu, T., Chang, HS., Wang, X., and Quail, PH. (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 9437-9442.

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.

Tremousaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N. and Lescure, B. (1999) Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.*, **20**, 553-561.

Velculescu, VE., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, KW. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, **270**, 484-487.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4407-4414.

Wang, H., Ma, L., Habashi, J., Li, J., Zhao, H. and Deng, XW. (2002) Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **32**, 723-733.

Wilhelm, KS. and Thomashow, MF. (1993) *Arabidopsis thaliana* cor15b, an apparent homologue of cor15a, is strongly responsive to cold and ABA, but not drought. *Plant Mol. Biol.*, **23**, 1073-1077.

Willingham, NM., Lloyd, JC. and Raines, CA. (1994) Molecular cloning of the *Arabidopsis thaliana* sedoheptulose-1,7-biphosphatase gene and expression studies in wheat and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 1191-1200.

Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, MH. and Lockhart, DJ. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1359-1367

Wu, SH. and Lagarias, JC. (1996) The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* synthesizes a functionally active chromophore precursor of the plant photoreceptor phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 8989-8994.

Yabe, N., Takahashi, T. and Komeda, Y. (1994) Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiol.*, **35**, 1207-1219.

Yamada, K., Lim, J., Dale, JM., Chen, H., Shinn, P., Palm, CJ., Southwick, AM., Wu, HC., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann, G., Liu, SX., Lam, B., Sakano, H., Wu, T., Yu, G., Miranda, M., Quach, HL., Tripp, M., Chang, CH., Lee, JM., Toriumi, M., Chan, MM., Tang, CC., Onodera, CS., Deng, JM., Akiyama, K., Ansari, Y., Arakawa, T., Banh, J., Banno, F., Bowser, L., Brooks, S., Carninci, P., Chao, Q., Choy, N., Enju, A., Goldsmith, AD., Gurjal, M., Hansen, NF., Hayashizaki, Y., Johnson-Hopson, C., Hsuan, VW., Iida, K., Karnes, M., Khan, S., Koesema, E., Ishida, J., Jiang, PX., Jones, T., Kawai, J., Kamiya, A., Meyers, C., Nakajima, M., Narusaka, M., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Tamse, R., Vaysberg, M., Wallender, EK., Wong, C., Yamamura, Y., Yuan, S., Shinozaki, K., Davis, RW., Theologis, A. and Ecker, JR. (2003) Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science*, **302**, 842-846.

Yanovsky, MJ., Whitelam, GC. and Casal, JJ. (2000) *phy3-1* retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiol.*, **123**, 235-242.

Yoshida, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999) Stress-responsive and developmental regulation of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 766-772.

Yoshida, K. and Shinmyo, A. (2000) Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 353-362.

Zhang, H. and van Nocker, S. (2002) The VERNALIZATION INDEPENDENCE 4 gene encodes a novel regulator of FLOWERING LOCUS C. *Plant J.*, **31**, 663-673.

Zhou, J. and Goldsbrough, PB. (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **6**, 875-884.

嘉美千歳 (2003) フィコシアノビルリンをフィトクロム発色団にもつ植物の光応答に関する研究、奈良先端科学技術大学院大学博士論文

篠村知子 (2001) 植物の光センシング、**16**、39-45

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

1. **Ando, K., Yamakawa, S., Miyashita, K., Yoshida, K., Yokota, A., Shinmyo, A., and Kohchi, T.**, Efficient construction of cDNA microarrays utilizing normalized cDNA libraries of *Arabidopsis thaliana.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 85-88 (2004)

2. **Ando, K., Yamakawa, S., Miyashita, K., Yoshida, K., Yokota, A., Shinmyo, A., and Kohchi, T.**, Systematic isolation of organ-specific expression genes utilizing cDNA microarray of *Arabidopsis thaliana.*, in preparation

参考論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

1. **Shikata, M., Matsuda, Y., Ando, K., Nishii, A., Takemura, M., Yokota, A., and Kohchi, T.**, Characterization of Arabidopsis ZIM, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family., *J. Exp. Bot.*, in press

2. トランスクリプトーム解析と DNA マイクロアレイ、**安藤候平・河内孝之**、2002年、植物代謝工学ハンドブック、164-175