

シロイヌナズナの KNAT2 および KNAT6 の機能解析

Analyses of the functions of KNAT2 and KNAT6 in arabidopsis

研究代表者 名古屋大学大学院理学研究科 助手 上野宜久
Yoshihisa UENO, Assistant Professor
Graduate School of Science, Nagoya University

要旨

Class1-KNOX と呼ばれるファミリーに属する植物のホメオボックス遺伝子は、メリステムの機能に重要だと考えられている。シロイヌナズナの class1-KNOX に属する KNAT2 と KNAT6 は、一次構造が酷似していることなどから、機能は重複している可能性が示唆されていたが、解析が進んでいない。本研究では、KNAT2 と KNAT6 に完全保存されている配列を利用して RNAi を試みることで、これら二遺伝子の発現を同時に抑制することを試みた。ヘアピン型二本鎖 RNA を形成する領域に保存配列を、ループには KNAT6 特異的配列をそれぞれ用いて設計した人工的な配列を、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで強制発現させるような形質転換体を作成した。その結果、この形質転換体では、野生型に比べ KNAT6 の転写産物の蓄積は有意に低下していたが、KNAT2 の転写産物の蓄積はほとんど影響を受けていなかった。

Abstract

The all aerial architectures of higher plants are generated from shoot apical meristem (SAM). Class1-KNOX homeobox genes play important roles in the formation and/or maintenance of SAM. In whole genome sequence of arabidopsis, 4 members of class1-KNOX genes, *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), *KNAT1/BREVI-PEDICELUS* (*BP*), *KNAT2* and *KNAT6*, were identified. Analyses of loss-of-function mutants revealed that *STM* and *KNAT1* play essential roles for the full activity of SAM. However, the roles of *KNAT2* and *KNAT6* remain unknown. Deduced amino acid sequences of them are highly similar each other. To analyze the effect of loss of function of both *KNAT2* and *KNAT6*, we attempted to generate the transgenic plants whose *KNAT2* and *KNAT6* are knocked down using RNAi.

1. 研究目的

高等植物の地上部は茎頂メリステム (SAM) より生み出される。SAM の機能に重要だと考えられている遺伝子のなかに、Class1-KNOX と呼ばれるファミリーに属する植物のホメオボックス遺伝子がある。シロイヌナズナゲノムには class1-KNOX は4つ存在する。SHOOT MERISTEMLESS (STM) は SAM の形成・維持に必須であることが知られている。KNAT1/BREVIPEDICELLUS (BP) は、花・枝 (これらは側方に新生したメリステムより生み出される) の器官形成の方向に重要な役割を担っていることが知られている。これらはいずれも機能欠損変異体の表現型の解析から明らかになった。一方、残るメンバーの KNAT2 と KNAT6 (以後 KNAT2/6) は、一次構造が酷似していることから、機能は重複している可能性が示唆されていたが、解析が進んでいない。実際、通常の栽培条件下では *knat2* 単独変異体は、野生型と区別することができないことを、Byrne ら (2002) と著者らは独立に確認している。本研究では、KNAT2/6 の生物学的な機能を理解する目的で、両遺伝子に完全保存されている配列を利用して RNAi を試みることで、これら二遺伝子の発現を同時に抑制することを試みた。

2. 研究経過

2. 1. KNAT2/6 の同時抑制の試み

stm と *knat1* はそれぞれ単独変異体で特有の表現型を呈するが、ある遺伝的背景では KNAT1 が *stm* を相補しうるなどから、重複した機能を有することが知られている。このように KNAT2/6 が KNAT1 と重複した機能も有する可能性を想定し、KNAT2/6 の発現を同時抑制することを期待したコンストラクト pSKIK26 (図1) を用いて、野生型シロイヌナズナおよび *knat1* 変異体である *bp-1* をそれぞれ形質転換した。

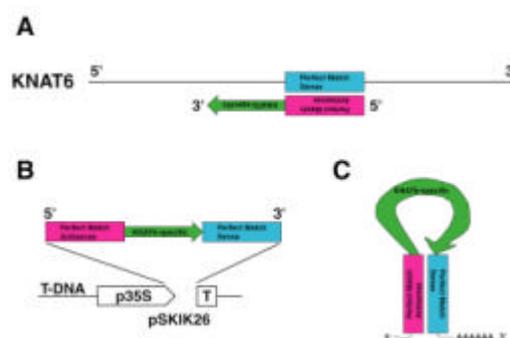


図1. 本研究で用いた手法の概略. KNAT6 の mRNA には、KNAT2 と 35nt 以上完全に一致する配列が二か所存在する。そのうちの一つ (Perfect Match Region, PMR, A の青い四角形で表示した領域) を用いて、C で示したようなヘアピン型の二本鎖 RNA を形成することを期待して設計した配列の DNA を合成し、B のようにカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (p35S) に連結したコンストラクト (pSKIK26) を作成し、シロイヌナズナを形質転換した。A, KNAT6 の mRNA を模式的に示した図。赤い四角形で示した領域は PMR の相補的な配列を意味する。PMR の 5' 側に隣接する配列を KNAT6 特異的配列の相補鎖として緑矢印で示した。

得られた形質転換体 *bp-1* *pSKIK26* は、予想していなかった形質を示した。*bp-1* の表現型が緩和されたのである(図2)。これは *KNAT1* の機能欠損の影響を打ち消していることを意味する。この形質転換体で

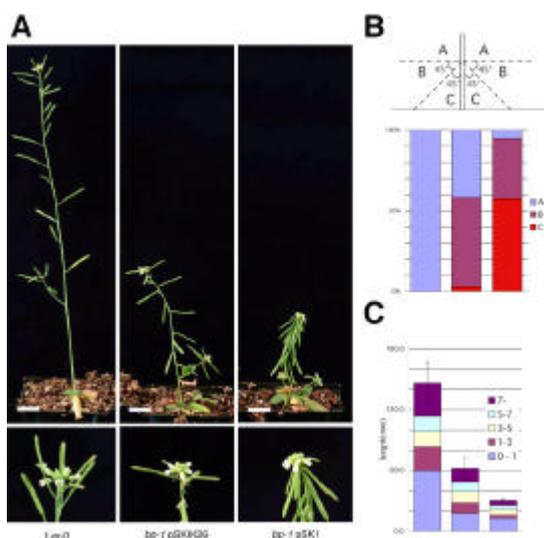


図2. *pSKIK26* で *bp-1* を形質転換すると表現型が緩和された。*bp* 変異体では矮化し、さやが基部側(下)方向に形成されるが、*pSKIK26* を導入すると、これらの表現型がいずれも緩和された。いずれのパネルも、左から野生型、*bp-1* に *pSKIK26* を導入、*bp-1* にベクターを導入。A, 個体の外観。B, 茎に対するさやの角度。C, 節間長。基部からそれぞれの節に番号をふり、節間長を測定。

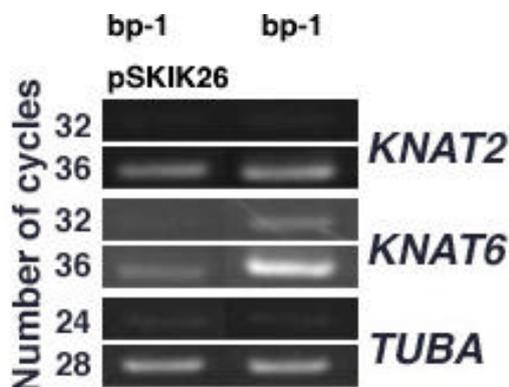


図3. *pSKIK26* の導入により *KNAT6* のみの転写産物蓄積が抑制された。*bp-1 pSKIK26* (左)および *bp-1* (右)の茎頂よりRNAを抽出し、*KNAT2*, *KNAT6* および α -tubulin の特異的プライマーを用いて、左記のサイクル数でRT-PCRを行った。

実際に *KNAT2/6* 両者の転写産物蓄積量が減少していることを確認するためRT-PCRを行った。しかし、結果は再び予想と異なり、*KNAT6* の転写産物の蓄積のみが抑制され、*KNAT2* はほとんど影響を受けていなかった(図3)。

2. 2. *bp-1 knat6* 二重変異体

KNAT6 の機能低下で *knat1* (*bp*) の表現型を抑圧することができることを遺伝学的に確認するため、T-DNA タグライン(SALK 研究所)より *knat6* 変異体を取得し、*bp-1* との二重変異体の作出を試みた。*bp-1* アリルの性質上、現段階では遺伝子型の決定に不確かさを排除しきれないが、現在得られている結果は、すべて上述の解釈と矛盾していない。すなわち、遺伝子型が *bp-1; knat6* 二重変異体と判定された個体は、野生型と識別が困難であった。

2. 3. *knat2 knat6* 二重変異体

計画どおり T-DNA タグラインより単離した *knat2* 変異体を上述の *knat6* 変異体と交配し、二重変異体を得た。現在、その表現型を解析中である。

2. 4. *KNAT2/6* の異所過剰発現

35S プロモーターで *KNAT2/6* どちらかを構成的に発現させる形質転換体を作成した結果、いずれも *KNAT1* の異所過剰発現と似た形質を示した。このことは *KNAT1/2/6* はいずれも共

通の生化学的機能を有することを示唆する。しかし、機能欠損の影響はそれぞれの遺伝子に特有であることから、生体内での使い分けには発現領域が極めて重要であると考えられた。

2. 5. KNAT2/6 の発現領域

KNAT2/6 の 5' シス領域を GUS に連結し、形質転換体を作成した。GUS の染色パターンから、個々の遺伝子の機能の推定にまではいたっていないが、発現が共通の領域と特異的な領域が見いだされていることから、部分的に異なった生物学的機能を有すると判断して矛盾はない。

2. 6. まとめ

本研究着手以前は、KNAT2/6 は重複する機能を有すると想像されていた。そこで、pSKIK26 によって形質転換を行ったが、KNAT6 のみが発現抑制された。すなわちシロイヌナズナでは、ヘアピン型二本鎖 RNA を人為的に発現させると、二本鎖形成領域(のみ)の配列ではなく、おそらくループの配列に依存して、転写産物が不安定化したと推測される結果を得た。この現象は報告例がないだけでなく、動物とは異なったシステムの存在を示唆している。また pSKIK26 は KNAT6 単独の抑制で表現型を呈し、しかもそれは KNAT1 の機能欠損を相補することができるものである、という三重に意外な結果を得ることになった。

3. 研究成果

予想しなかった三つの現象を見いだした。1)ヘアピン型 RNA のループの配列に依存した mRNA の不安定化。2) KNAT2 と KNAT6 の生化学的機能は類似しているが、生物学的機能は異なっている可能性がある。3) KNAT6 の機能低下は KNAT1 の機能欠損を相補できる。

4. 今後の課題と発展

進化的な意義も含め、KNAT1/2/6 の具体的な働き方に対して理解が進むにつれ、謎も増えている。本研究をさらに発展させることで、統一的な理解に迫りたい。また今回得られた成果から、植物の RNA 不安定化機構の新しい側面の発見や、ポストゲノム技術の発展にも貢献することが期待される。

5. 発表論文リスト

The roles of KNAT2 and KNAT6 in arabidopsis. M. Ikezaki, Y. ueno, C. Machida, and Y. Machida (投稿準備中)