

DMS 法及びバイサルファイト法による CAM 型光合成関連遺伝子の発現制御機構の解明
近藤侑梨¹*M2・佐藤稜真^{1D2}・John C. Cushman²・齋藤和幸³・東江栄³
(¹九州大学大学院生物資源環境科学府・²ネバダ大学リノ校・³九州大学大学院農学研究科)

Elucidation of regulatory mechanism of CAM photosynthesis-related gene expression
by DMS and bisulfite methods

Yuri Kondo¹, Ryoma Sato¹, John C. Cushman², Kazuyuki Saitou³, Sakae Agarie³

(¹ Graduate school of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University,

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Nevada, Reno,

³ Faculty of Agriculture, Kyushu university)

【背景及び目的】 アイスプラントは環境ストレス及び老化によって、光合成様式を C3 から CAM に変換する。CO₂ 固定酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)は、PEPC キナーゼ(PPCK)により、リン酸化され、夜間に活性化される。アイスプラントの PPCK をコードする遺伝子 *ppck1* の発現量は、CAM が誘導する条件下で増加し、日変化を示す。本研究では、*ppck1* の発現制御機構を明らかにするために、DMS-PCR 法を用いて転写調節因子結合部位ならびに転写調節因子を推定し、アグロインフィルトレーションによるレポーターアッセイを用いてシス因子を確認した。さらに、ゲノム上のメチル化された部位を検出できるバイサルファイト法を用い、CAM 遺伝子の発現に及ぼす DNA のメチル化の影響を検討した。

【材料及び方法】 アイスプラントの第 6 葉及び展開直後の葉身を供試した。400mM NaCl を 2 週間処理して CAM を誘導した葉に DMS 処理を行った。レポーターアッセイに供試した葉は、同様な CAM 誘導処理を 12 日間行った。任意の長さに調整した *ppck1* のプロモーターを含むゲノム DNA 断片をベクターに組み込み葉身に導入した。導入後 2 日目にレポーター遺伝子のコードする緑色蛍光タンパク質 (GFP) の蛍光を観察した。バイサルファイトシーケンスに供試した葉は上記と同様に NaCl 処理した。葉身から DNA を抽出後、バイサルファイト変換処理をし、次世代シーケンサーで塩基配列を決定した。

【結果及び考察】 DMS-PCR の結果、転写調節因子が結合した領域の増幅産物は低分子で、クロマチン領域での増幅産物は高分子であると考えられた。CAM 化した葉では、*ppck1* が発現する時間帯で、開始コドン上流-1410~-1119 bp 及び-276~-69 bp に転写調節因子が結合することが示唆され、C3 では、前者にのみ同様な結果が得られた。若葉では、高分子の DNA の増幅が認められたことから、ゲノムがクロマチン構造をとっていることが示唆された。*ppck1* の発現していない時間帯においても同様な結果となった。レポーターアッセイの結果、CAM 化した葉では、*ppck1* 開始コドン上流-276 bp より 3'側にエンハンサーが存在していると考えられた。C3 との比較から開始コドン上流-1410~-1119 bp では、老化誘導性転写因子が、開始コドン上流-276 bp より 3'側では、塩誘導性転写因子が制御していると考えられた。バイサルファイトシーケンスの結果、C3 と CAM の DNA メチル化の程度が異なり、CAM では、CpG 領域が 61.3%、CHG 領域が 30.5%、CHH 領域が 6.7%であった。講演では、ストレスに伴う CAM 遺伝子の発現に及ぼす DNA のメチル化の関与をあわせて考察する。