

植物のストレス応答

2606 伊藤 なずな 2506 今井 穂香 2508 大橋 菜々美

要旨

私たちは、環境ストレスに対する植物のストレス応答に興味を持ち、その中でも塩害に着目した。この研究ではモデル植物のシロイヌナズナ、トマトを用いた。植物を育てていく中で塩水を与え、植物の遺伝子の変化を調べるため、RT-PCR (cDNA を用いて PCR 法を行う方法)、電気泳動法を用いて実験した。結果は、ゲル上にバンドが見られず、遺伝子発現したかどうか調べるができなかった。今後は、他の植物にも塩ストレスを与えて反応を調べていく。

1. 仮説

ストレスを受けたことによって植物の遺伝子が何らかの外見的または、内面的変化をする。

2. 目的

- ・ ストレスを与えたときの遺伝子発現の変化から植物を生育する際の最も良い環境条件を調べる。
- ・ 環境の変化に伴って植物も変化する。
→どのような反応があるか調べる。
- ・ PCR 法を実際に用いて研究する。

3. 使用した道具・装置

- ・ シロイヌナズナ種子 ・ トマト種子
- ・ 温室 (トマトを育てるのに使用)
- ・ ポット ・ 土 ・ 水 ・ 食塩水 (15%)
- ・ ビーカー ・ 脱脂綿 ・ 試験管
- ・ ReliaPrep™ RNA Cell Ministep System (Promega 社)
- ・ PrimeScript™ RT-PCR Kit (タカラバイオ社)
- ・ トマトのプライマー (設計済み/FASMAC 社)
- ・ サーマルサイクラー ・ 遠心分離機
- ・ ミニシェーカー・アガロースゲル
- ・ 電気泳動装置・TE バッファー
- ・ マイクロピペット・1%酢酸
- ・ DNA 染色液 ・ 液体窒素

4. 実験手順・結果・考察

[実験 I シロイヌナズナ 1]

- ①ポットに土を入れシロイヌナズナの種子を捲く。
- ②水を3日に1回与える。
- ③子が発芽し、ある程度の大きさまで育ったら塩ストレスを与える。
(塩ストレス→濃度 15%食塩水を3日に1回与える)
- ④ストレスを与えたシロイヌナズナの葉を用いて RT-PCR 法を行う。
- ⑤電気泳動法から遺伝子のバンドを得て調べる。

[結果 I]

種子が発芽しなかったので失敗した。

[考察 I]

シロイヌナズナの栽培条件において温度は 22℃~23℃であったが夏の暑い時期に栽培したため室温が 30℃を超えており、種子が発芽しなかった。改善策は温室の中で育てるなどして、最適な温度を一定に保つ場所で栽培する。

[実験 II シロイヌナズナ 2]

- ①試験管の底に脱脂綿をしき、脱脂綿が浸るほどの水を入れ、そこにシロイヌナズナの種子を入れ温室で育てる。

- ②種子が発芽しある程度の大きさまで育ったら、ポットに植え替える。
- ③ストレスを与えて育てる。
(塩ストレス：シロイヌナズナ 1 と同様)

[結果Ⅱ]

種子は発芽したが、そこから大きさが変化せず育たなかったので失敗した。

[考察Ⅱ]

- ・土の代わりに脱脂綿を敷いて行った。
→根の侵入（根の張り）が良くなかった。
→発芽後育たなかった。
- ・発芽後に子葉を濡らした。
→育たなかった。
- ・シロイヌナズナの生育が難しかった。
→今後はモデル植物のトマトを実験の対象とすることにした。

[実験Ⅲ トマト]

- ①ポットに土を入れトマトの種子を蒔く。
- ②ポットを温室に入れカイワレ大根と同様に 1日1回水を与えて育てる。
- ① ストレスを与えて育てる。
(塩ストレス:濃度 15%食塩水を毎日1回与える)



図1 トマトの苗（種から育てたもの）

- ④ストレスを与えて育てたトマトの葉、茎を液体窒素で凍らせ、粉状にする。
- ⑤④で得た細胞を用い、ReliaPrep™ RNA Cell Ministep System (Promega 社)で RNA を精製する。
- ⑥PrimeScript™ RT-PCR Kit(タカラバイオ社)と、プライマーを用いて、⑤で作ったものを調整する。

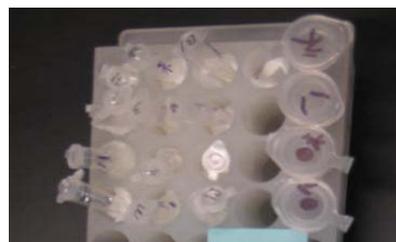


図2 調整液&DNAが入ったチップ



図3 使用したキット (左上: ReliaPrep™ RNA Cell Ministep System、右上: PrimeScript™ RT-PCR Kit、下: プライマー)

- ⑦サーマルサイクラーで DNA 断片を増幅する。
- ⑧アガロースゲルを制作し、緩衝液として TE バッファーを用いて⑦を電気泳動させる。



図4 電気泳動中の様子



図5 電気泳動後のゲル

- ⑨DNA を染色し、バンドの動きから遺伝子発現の結果を観察する。



*染色液は実験後、活性炭で吸着処理した。

図6 DNA 染色液

[結果Ⅲ]

ゲル上にバンドが見られず、遺伝子発現がどのように行われているかを観察することができなかった。

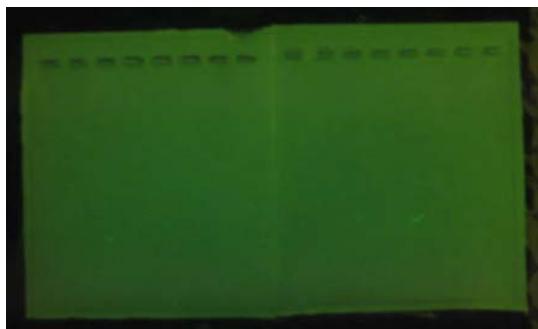


図7 最終結果のゲル

[考察Ⅲ]

失敗した原因は、

- ・採取した細胞の量が少なく、RNAを十分に得られなかった。
- ・電気泳動が終わってから1週間の保存期間があったため、バンドを得られなかった。
- ・実験中にDNAを分解する酵素が何らかの経路で混入してしまったと、考えられる。

5. 結論

仮説を裏付ける結果は得られなかったが、塩水を与えたときのトマトの外の変化(しおれた)や、電気泳動の流れの違いから、少なくとも、ストレスを受けて植物の中で何らかの変化が起きたと考えられる。

6. 今後の展望

①他のストレスを与える。

例: 乾燥ストレス、高温ストレス、水ストレス

②他の植物に同じストレスを与える。

→同じ反応を示すかどうか調べる。

7. 事前に調べた内容

(1) RT-PCR について

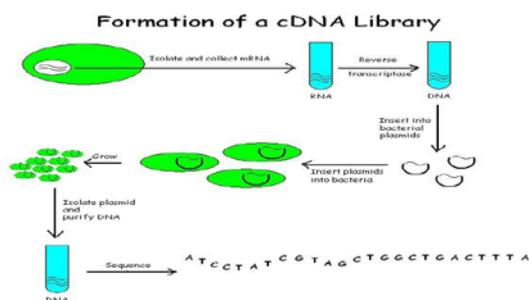


図8 RT-PCRの説明

- ・RT-PCR法とはcDNA(逆転写により合成されたDNA)を用いてPCRを行う方法のこと。
- ・植物にストレスを与えると耐性遺伝子が発現すると考えられるが、その際に作られるたんぱく質を直接つきとめることが難しかったので、RT-PCR法を用いようと考えた。
- ・たんぱく質が存在するという事はDNAが転写されmRNAが合成されたということである。mRNAを逆転写するとcDNAが合成される。そのcDNAを何本も合成することでcDNAを用いて電気泳動を行うことができ、その結果を示すバンドより、求めたいたんぱく質がどの種類のものかつきとめることができる。上記の理由よりRT-PCR法を用いようと考えた。

(2) 電気泳動について

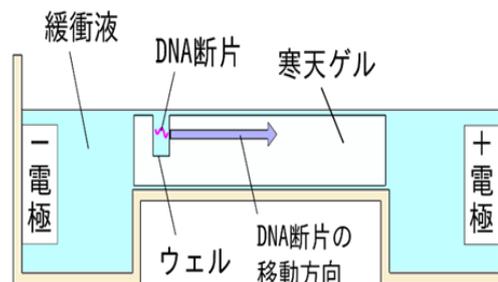


図9 電気泳動の模式図

- ・電気泳動とは、たんぱく質やDNAが電圧をかけたときに移動する性質を用いて、その移動距離の違いによってバンドの判別を行う方法である。
- ・結果はバンドの泳動した距離から読み取る。

(3) モデル植物のストレスに対応する遺伝子や、特定の部位を切断するプライマーを調べた方法について

『ストレス対応遺伝子』

“Genome Data Viewer”

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=genome&acc=GCF_00080110.5

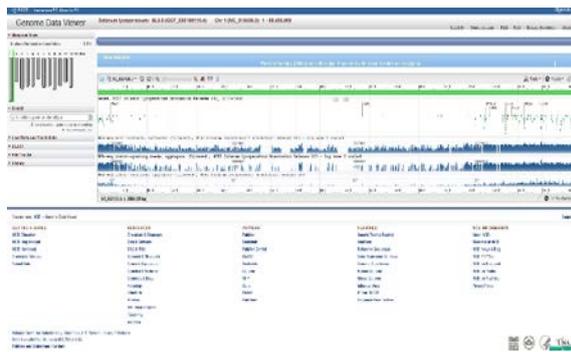


図 10 Genome Data Viewer

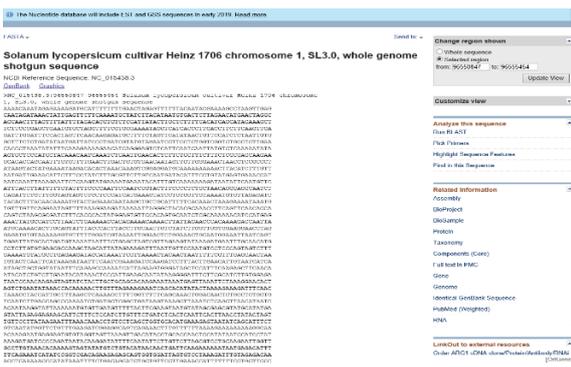


図 11 Genome Data Viewer (FASTA VIEW)

このサイトで、事前に調べた、ストレスによって変わる遺伝子の名前を入力し、その DNA の塩基配列を特定した。

『プライマー』

“Primer3Plus”

<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>



図 12 Primer3Plus (1)

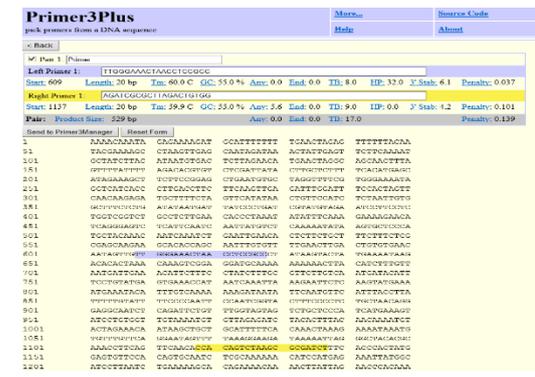


図 13 Primer3Plus (2)

このサイトで、Genome Data Viewer で得た DNA の塩基配列を入力し、5' 末端、3' 末端を特定する。この操作によってプライマー設計で使う配列を発見することができた。

8. 参考文献、参考資料

シロイヌナズナの塩ストレス応答に対するサリチル酸シグナルの解析

http://www.jstage.jst.go.jp/article/jsc-rpan/47/0/47_KJ00008228800/_article_char/ja/

ストレス特異的な転写複合体形成に基づくシロイヌナズナの環境ストレス誘導性転写因子 DREB2A の制御機構解析およびその応用的な利用方法の検討

https://repository.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=8330&item_no=1&page_id=28&block_id=31