

シロイヌナズナを用いた実験系

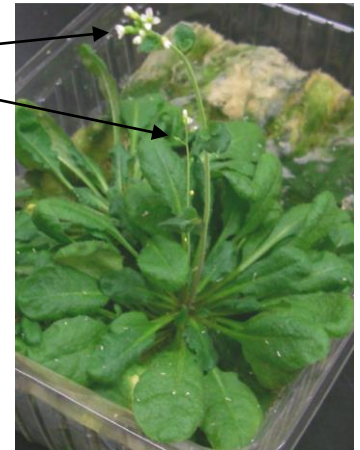
2016年10月24日 津釜大侑

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*、一般名 thale cress) は元祖モデル植物であり、これを用いた実験系は強固で有用です。そのような実験系について紹介します。

シロイヌナズナの特徴

- アブラナ科の一年草
- ゲノムサイズ：~135 Mb
 - *イネのゲノムサイズは ~430 Mb。バレイショのゲノムサイズは ~850 Mb。コムギのゲノムサイズは ~17 Gb。ヒトのゲノムサイズは ~3 Gb。
- 5対の染色体を持つ二倍体 ($2n = 10$)
- 遺伝子数：~33000 (タンパク質をコードするものは ~27000)
 - *平均すると $(135 \times 10^6) / (33 \times 10^3) = \sim 4090$ b に一個の遺伝子が存在することになる。
- 自殖性、長日植物
 - *長日(明期 16 時間)条件下で育てると、発芽から 1 ヶ月程度で花成し 2~3 ヶ月で種がとれる。
- Col-0 (はじめにゲノムが読まれた標準品種) や Ler-0 などの系統がよく使われる

これが長角果 (種子を内包する細長い果実) になる



シロイヌナズナを用いた順遺伝学と逆遺伝学

- 順遺伝学 (forward genetics) : 表現型の差異を基に、その原因となる遺伝子を特定しようとするもの (マッピング、QTL 解析、GWAS などが例)
- 逆遺伝学 (reverse genetics) : 特定の遺伝子に着目してその過剰発現や発現抑制などを行い、その遺伝子の生理機能を明らかにしようとするもの
- シロイヌナズナにおいては変異原 (mutagen) 処理により様々な変異体が作出され、これらは重要な遺伝子の発見に寄与してきた

- 変異原としては EMS (メタンスルホン酸エチル) や T-DNA が用いられることが多い
- *EMS は C→U の塩基置換を誘起する。T-DNA は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を介して植物のゲノム中に挿入される DNA 断片であり、LB (left border) と RB (right border) に挟まれた DNA 領域である。
- 米国 Salk Institute などが大規模な T-DNA 挿入系統 (T-DNA insertion lines, T-DNA タグライン) を作製してくれた (たくさんの形質転換体を得、それらにおける T-DNA の挿入部位を決定してくれた) ため、多くの遺伝子について、その領域内又は近傍に T-DNA が挿入された系統が利用可能である
 - それらの T-DNA 挿入系統は ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center、米国) や NASC (Nottingham (European) Arabidopsis Stock Center、英国) から 1 系統 1000 円程度で購入可能であり、逆遺伝学的な解析を行う上で極めて有用である
- *それらの系統においては目的遺伝子がノックアウト又はノックダウンされていると考えられるため。
- LB・RB の近傍にレポーター遺伝子が配された T-DNA を持つ形質転換体のプール (エンハンサートラップライン) や、LB・RB の近傍に 35S プロモーターが配された T-DNA を持つ形質転換体のプール (アクチベーションタグライン) も利用可能である

シロイヌナズナを用いた実験・解析の流れ

1. 解析対象となる遺伝子の選定・情報収集

- ✓ 先行研究 (論文を読んだり実験をしたり) から選定 (逆遺伝学的アプローチ)
- ✓ 目的の表現型を示す変異体・品種などの単離・選定
 - マッピングや QTL 解析、GWAS 等による原因遺伝子の絞り込み (遺伝学的アプローチ)
- ✓ TAIR (The Arabidopsis Information resource, <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) は非常に有用なデータベース。各遺伝子について、アノテーション、配列、T-DNA 挿入系統、関連論文など様々な情報が手に入る。他種の遺伝子を扱う場合でも、TAIR で得られる情報は有用。遺伝子の情報は、遺伝子名又は AGI (Arabidopsis Genome Initiative) コード (遺

伝子座名、ATxGabcde で表現) を用いて検索する。サーバーの不調が多いのが玉に瑕。

2. 当該遺伝子の生理機能の解析

✓ 相補試験 :

例えばある異常な表現型を示す変異体において特定の遺伝子の機能が損なわれていると考えられる場合、その変異体に当該遺伝子 (正常型) を人為的に発現させ、表現型が回復する (相補される) か調べるような実験。「この表現型の差異はこの遺伝子における変異により生じる」などと言いたい場合に最も重視すべき試験である (と思う)。

✓ T-DNA 挿入系統の特徴づけ :

当該遺伝子に T-DNA が挿入された系統が ABRC や NASC などから入手可能であればそれを入手し、ゲノミック PCR で T-DNA の挿入を確認すると共に、その表現型を観察する。T-DNA の挿入についてホモであるものを解析に用いる。T-DNA 挿入系統が野生型と異なる表現型を示した場合、相補試験につなげることも可能。

✓ 人為的な (形質転換による) 過剰発現、ノックダウン、ノックアウト

当該遺伝子の発現量・様式を人為的に改変し、それが表現型にどのような影響を与えるか調べる。構成的 (あらゆる組織・器官・成育時期において) 高発現を促す 35S (カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S) プロモーターが利用されることが多い。ノックダウンは、アンチセンス RNA や amiRNA (artificial micro RNA) を過剰発現させる (ことにより RNAi (RNA interference) を誘起する) ことで行われることが多い。植物においては相同組換えによる目的遺伝子のノックアウトは困難である (効率が著しく低い) が、ゲノム編集技術を用いることにより効率よくこれを行うことができるようになってきた。

*冗長性 (redundancy) について

遺伝子・タンパク質の中には冗長な (redundant、似た) 生理機能を持つものがある。例えば一つの遺伝子をノックアウトしても表現型に影響が出ない場合があるが、それは他の遺伝子が冗長な機能を持つからであるからかもしれない。自分の興味のある遺伝子について何個のホモログ (似た配列を持つ遺伝子) が存在するのか把握することは重要である。RNAi やゲノム編集を用いれば一度に複数の遺伝子をノックダウンないしノックアウトすることも可

能であり、実際そのようなことが必要となることも多い（と思われる）。

3. 当該遺伝子の発現様式の解析

- ✓ RT-PCR
- ✓ Northern blotting
- ✓ プロモーター-GUS、プロモーター-(G) FP

目的遺伝子のプロモーターに *GUS* 又は (G) FP 遺伝子を連結したものをシロイヌナズナに導入し、当該形質転換体を GUS 染色や (G) FP 観察に供する。それらのシグナルは、当該プロモーターが活発である（当該遺伝子が活発に転写されうる）部位・時期において見られるはずである。

- ✓ *In situ* hybridization 等々...

4. 当該遺伝子の産物の細胞内の解析

- ✓ GFP と融合させた形で発現させる
- ✓ 細胞・オルガネラ分画 → Western blotting 等々...

5. 当該遺伝子（の産物）に特化した解析

- ✓ （酵素なら）酵素活性の解析など
- ✓ （転写因子なら）標的遺伝子の発現解析、DNA との相互作用の解析など
- ✓ 翻訳後修飾（リン酸化、ユビキチン化、糖鎖・脂質修飾など）の解析
- ✓ タンパク質間相互作用の解析
- ✓ 多重変異体を利用した遺伝的相互作用・上位性（epistasis）などに関する解析
- ✓ 二次構造予測プログラム、細胞内局在予測プログラムなどの利用 等々...