



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シロイヌナズナを用いた光合成研究
Author(s)	鹿内, 利治
Description	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 6
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 35-37
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39089
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-007.pdf



6. シロイヌナズナを用いた光合成研究

鹿内 利治¹⁾

シロイヌナズナは個体のサイズが小さく、遺伝学では有利に働くこの特徴は、光合成の生理学、生化学においては問題になる場合がある。しかしながら、多くの突然変異株が単離、解析されていることや、ノックアウトラインなどリソースの充実は光合成研究においても魅力的である。植物の基本的な扱いはプロトコル集¹⁾が手に入るのので、ここでは特にノックアウトラインの入手法、解析法を解説したい。

Photosynthesis research using *Arabidopsis*

Toshiharu Shikanai

Recent advance in plant science depended on the genetics using a model plant *Arabidopsis thaliana*. Although its small size is not ideal for physiology and biochemistry, the *Arabidopsis* genetics is providing many breakthroughs also in photosynthesis research. This protocol focuses on one of the powerful resources, the T-DNA knock out lines, and describes how to use them in photosynthesis research.

6.1 ノックアウトラインの検索のしかた

1. ノックアウトラインを解析したい遺伝子があれば、まずその遺伝子番号 (例えば At2g05620) をメモし、Salk Institute Genomic Analysis Laboratory のサイトである SIGnAL を開く (<http://signal.salk.edu/>). そこから、T-DNA Express のページを選ぶ。
2. Search の Query にメモした遺伝子番号を入力し検索する。
3. 遺伝子の下にたくさんの矢印が出てくる。ノックアウトラインはいくつかの機関で独立に整備されており、その情報がまとまっている。やや複雑であるが、短い矢印で SALK, SAIL, GABI などのラベルがついているのがそれである。よくわからないものがあれば、クリックすると詳しい情報が得られる。目的の遺伝子について複数のノックアウトライン候補が得られることが望ましい (後述参考)。
4. 良さそうな候補があればクリックする。まず [seq] を確認する。これは T-DNA のレフトボーダーから境界配列を読んだもので、T-DNA がどこにささっているのかを知ることができる。この情報は、大量の T-DNA ラインの挿入サイトを PCR によって決めたものに由来し、やや高い確率 (2~3 割?) で実際の挿入サイトではない配列を含んでいる (キメ

ラな PCR 産物を読んでいると思われる)。この可能性を下げる為に、読まれている配列の長さが短いものは避けた方が無難である。

5. 候補が決まれば [order from ABRC] をクリックする。ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) は、種子などを配布してくれるストックセンターである。実際に分与を依頼するには TAIR (The Arabidopsis Information Resource) user としての登録が必要である。Register 画面に進んで情報を入力する。登録はまず、研究室の PI に行ってもらった必要がある。種を送ってもらった場合、送料などを負担しなければならない。研究室の構成メンバーが独自に種を依頼した場合でも、登録の際 PI とリンクさせておけば、PI から一括して支払い可能である。種子送付の際、express mail を使うか選べるが、2008 年 11 月現在、フェデックスが日本への植物種子の送付を受け付けておらず、選ばない方が無難である。それでも ABRC の場合には、1 か月ほどで種子が届く。ラインによっては ABRC ではなく NASC (The European Arabidopsis Stock Center) を経由したり GABI-Kat に直接依頼する場合もあるが、時間と手間がかかり、ABRC から手に入るラインがある場合は、それを優先させた方が良いでしょう。

1) 京都大学理学研究科

6.2 ホモラインの選抜方法

1. 種子が届いたら、多くの場合それは、T-DNA をホモに持つものとヘテロに持つもの、さらには持たないものの混合である（ラインによってはホモ化されたものも入手可能。T-DNA がささっているのが確認済みなので重宝。）。そこで、T-DNA をホモに持つものを選ぶ必要がある。20 粒ぐらいの種子を播種する。T-DNA は多くの場合複数箇所に入っているので、薬剤耐性を T-DNA 挿入のマーカーに用いることは危険である。
2. T-DNA をホモに持つラインの選抜は PCR で行う。そのため植物から DNA を抽出する。我々は、子葉一枚から簡便に DNA を抽出する方法を用いているが、最近はキットや抽出装置が普及しており、ここでは詳細な解説を避ける。
3. ホモライン選抜のための PCR プライマーを設計する。SALK ラインの場合、T-DNA 挿入株の配列情報は T-DNA のレフトボーダーから読まれているので、レフトボーダー上の配列に設計されたプライマー (Pr-LB) と読まれているゲノム配列上に逆向きに設計したプライマー (Pr-F とする) では、T-DNA を含む植物で必ず産物が得られるはずである (図 1 A)。期待される PCR 産物は 300-500 塩基程度が望ましい。ここで産物が得られなければ、実際にここに T-DNA が挿入していない可能性がある。レフトボーダー上のプライマーの配列は SIGnAL のページから得られる (http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html)。ラインの出所が違えば使われているベクターが違うので、プライマーについては、それにあわせて確認する必要がある。一般に用いられているプライマーは必要以上に長く、我々の研究室では 21 塩基までプライマーを短くして用いている。
4. 上述のプライマーセットで T-DNA 挿入染色体由来する PCR 産物を増幅可能である。さらに T-DNA をホモに持つ植物とヘテロに持つ植物を区別する必要がある。その目的で、レフトボーダーから読まれた配列の上流に、シークエンス同じ向きにもう一つプライマー (Pr-R) を設計する (図 1 A)。先ほど設計した Pr-F と Pr-R の組み合わせで、T-DNA を含まない染色体 DNA から 300-500 塩基程度の産物が期待できる位置が望ましい。一般に T-DNA のサイズはこの PCR であればいくつに大きいので、T-DNA をホモに持つ植物では PCR 産物が得られない。このことは、DNA の抽出の問題などで PCR 産

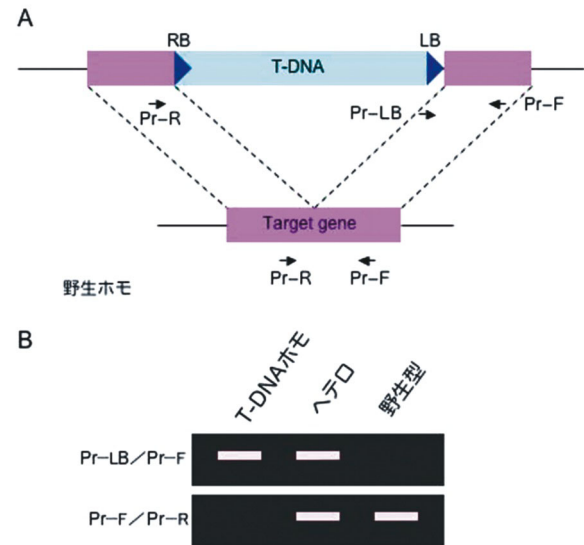


図 1：ホモライン選抜方法
A. Target gene が T-DNA の挿入により破壊されている。Pr-LB はレフトボーダー上に設定されたプライマー。Pr-F と Pr-R はこの位置に設計する。
B. PCR による遺伝子型の判定。

物が得られない場合と区別できないので、Pr-F と Pr-R の組み合わせの PCR では、同様に抽出した野生株 DNA を用いて安定に PCR 産物が得られることが条件になる。

5. 目的の T-DNA をホモに持つ植物は、プライマー Pr-LB と Pr-F で PCR 産物が得られ、Pr-F と Pr-R の組み合わせで PCR 産物が得られないものである (図 1 B)。このような植物が得られない場合は、遺伝子のノックアウトが致死になる可能性がある。その場合は、T-DNA をヘテロに持つ個体を育てて採種し、次世代を解析する。
6. 3. で得られた PCR 産物をシークエンスする。データベースと同じ配列が得られるはずで、レフトボーダー側の挿入位置が確認できる。T-DNA のライトボーダーに対応するプライマー (SIGnAL に情報がある。) とゲノムのプライマー Pr-R を用いて PCR を行い、産物が得られればシークエンスを行う。ライトボーダー側の境界配列が得られる。しばしば複数の T-DNA がつながってゲノムに挿入し、T-DNA の構造によっては両側がレフトボーダーになる場合がある。ライトボーダーの境界配列が得られない場合には、Pr-LB とゲノムの Pr-R プライマーとの PCR も試みる。

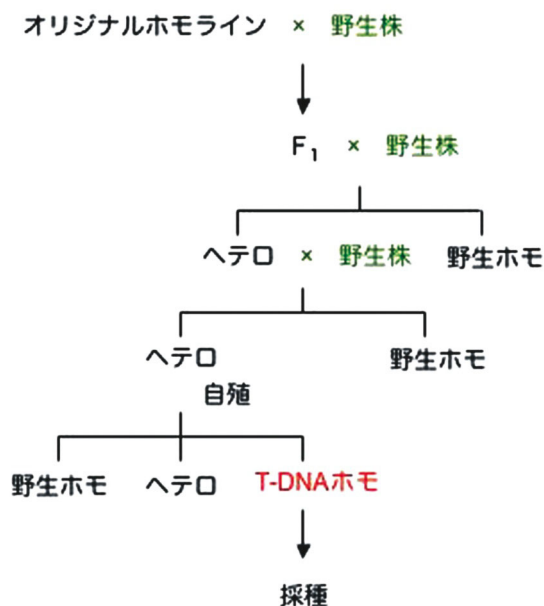


図2：戻し交配作業の流れ

6.3 戻し交配と連鎖解析

目的のノックアウト株(T-DNA 挿入ホモライン)が得られれば、採種と同時に戻し交配を行う。クロロフィル蛍光解析のような非破壊の解析はこの植物を用いて予備的に行うことができる。しかしながら、この植物は、目的の遺伝子への T-DNA 挿入以外に多くの変異を含んでいる。目的遺伝子ノックアウト以外の異常が表現型を引き起こしている可能性が高く、これに気づかず結論を誤った例がいくつもある。また、他の研究室からノックアウトラインの分与を受けた場合、分与先にこの認識がなければ、問題を含むラインを解析することになる。十分な注意が必要である。

1. ノックアウト株が開花すれば、対応する野生株により戻し交配を行う。ノックアウト株の生育が著しく

悪くない限り、ABRC から届いた種子を播種する際に同時に野生株も蒔いておく。本来戻し交配は、得られた F_1 植物からその都度 F_2 を得るが、バッククロスを急ぐ際には、 F_1 植物にさらに野生株を交配する(図2)。次世代では、T-DNA ヘテロと野生株に分離するので、PCR でヘテロ株を選抜し、その植物にさらにもう一度野生株を交配する。我々は三度の戻し交配を基本としており、次世代からヘテロ株を選抜し、 F_2 世代を得る。 F_2 から PCR で T-DNA 挿入ホモ株を選抜し、大量に採種する。ここで(必要があればさらに早い世代で)、T-DNA と表現型の連鎖を確認する。

2. 3 回の戻し交配により目的遺伝子に連鎖していない異常の影響の多くを排除できる。しかし、目的遺伝子に強く連鎖した異常は残る。独立のノックアウトラインを持ち、同一の表現型が見られた場合、この問題が起きる確率は大きく下がる。この問題を排除するための最も直接的な方法は、ノックアウト株に野生型遺伝子を導入し、変異株の表現型が見られなくなることを確認することである。この場合は、形質転換にもとの T-DNA が持っている薬剤耐性マーカー以外を用いる必要がある。場合によって、この相補実験は不要である。例えば、EMS 処理で得られた変異株できっちりと遺伝学解析を行っていて、表現型がノックアウト株と同一であれば、必要は感じない。

注意

一連の作業は遺伝子組換え実験であり、機関による承認を受けていなければ行うことはできない。

参考文献

- 1) 島本功, 岡田清孝, 田畑哲之「モデル植物の実験プロトコール」(改訂3版) 秀潤社, (2005)