

3-1-1 植物を識る（シロイヌナズナ）

概要

生態学的に言えば、植物は生産者として消費者である我々動物の生命活動を支えている。植物なくして我々の生存はありえないのだから、植物は決して馬鹿にしてはいけない存在である。昔はどちらかと言えば博物学的であった植物の研究は、モデル植物シロイヌナズナの登場により一変した。この小さな植物を研究することで、細胞、タンパク質、遺伝子のレベルで植物の持つ様々な能力が説明できるようになったのである。そして、シロイヌナズナの研究で得られた知識は、作物や薬用植物などの有用植物に応用されはじめている。この章では、モデル植物であるシロイヌナズナの栽培方法と遺伝資源、ウェブサイトからのデータ取得方法、メーリングリストについて概説する。

1. モデル植物シロイヌナズナ

アブラナ科の一年草であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) は 2000 年に全ゲノム配列が解読され、モデル植物として世界中で広く研究に利用されている。シロイヌナズナは個体が小さいため、研究室の限られたスペースで多くの個体を栽培することが出来る。さらに、シロイヌナズナは世代時間がおよそ一月半と高等植物としては短く、土壌細菌を利用することで容易に形質転換を行えるなどの利点がある。

2. 栽培方法

シロイヌナズナの栽培方法は二種類に分けることが出来る。一つは無機塩類を含む寒天培地で無菌的に栽培する方法であり、もう一つは土を詰めたポットなどの容器で栽培する方法である。

シロイヌナズナの栽培には温度と光環境が制御された培養器か小部屋を用いる。許容的な長日植物であるシロイヌナズナは長日条件（16 時間明期，8 時間暗期）の光周期の下，22℃で育てるのが標準的である。長日条件ではシロイヌナズナはおよそ一ヶ月で花が咲くが，短日条件（8 時間明期，16 時間暗期）では花が咲くまでおよそ二ヶ月かかる。

2. 1 無機塩類を含む寒天培地で無菌的に栽培する方法

シロイヌナズナの無菌的な栽培には，無機塩類を含む寒天培地を分注したシャーレを使用する。培地には無機塩類濃度を 1/2 にした MS 培地，あるいはそれを改変したもの（GM 培地）がよく使われる。培地に加える無機塩類，糖類の濃度を調節することで様々な栄養条件下での栽培が可能になり，寒天培地に薬剤を加えることで薬剤に耐性を示す形質転換体を選抜することが出来る。しかし，シャーレという密閉された小さな容器で栽培するのでポット

執筆者 客員所員 宮崎裕士 (s07x606@swms1.itc.kagawa-u.ac.jp)
科研費研究員 小倉康裕 (yasunobu.ogura@gakushuin.ac.jp)
生命科学科 助教 高瀬智敬 (tomoyuki.takase@gakushuin.ac.jp)
生命科学科 教授 清未知宏 (tomohiro.kiyosue@gakushuin.ac.jp)

で栽培した植物に比べると個体は小さく、植物の成長に伴って寒天培地の水分や栄養分が減少していくので長期間の栽培には不向きである。

2. 1. 1 GM 寒天培地の調製(1L)

- ① MS 培地成分 (SIGMA: M5519) 4.4 g, MES (DOJINDO: 343-01621) 0.5 g を 900 ml の純水に加え攪拌する (#1).
- ② 1N KOH を使い、溶液を pH 5.6 に調整する.
- ③ 寒天末 8 g を加え (#2), さらに純水を加えて 1,000 ml とする.
- ④ 121°C (250°F) で 30 分間オートクレーブし、培地が 60°C 程度に冷めたらクリーンベンチ内で滅菌済みのシャーレ (φ 90 mm × H 20 mm) に培地を 25 ml ずつ分注する.

#1: 植物体を大きく育てるために、終濃度 1% (w/v) のショ糖を添加することがある.

#2: シャーレを立てかけて栽培する場合、寒天の濃度を 1.5% (w/v) に上げる.

2. 1. 2 シロイヌナズナ種子の無菌播種 (クリーンベンチ内で作業を行う)

- ① 50 ml のプラスチックチューブに 3 ml のハイター, Triton X-100 を一滴加え, さらに純水を加えて 30 ml とする (滅菌液の調製) (#1).
- ② 種子を 1.5 ml のマイクロチューブに入れ, 滅菌液を 1 ml 加える.
- ③ 5 分間攪拌する.
- ④ 軽く遠心して種子を落とし, 滅菌液を廃棄する.
- ⑤ 1 ml の滅菌水 (#1) を加え, 種子を洗浄する (合計 3 回滅菌水で種子を洗浄).
- ⑥ チップを使って種子を寒天培地上に播種する.
- ⑦ 播種後, シャーレをサージカルテープで密閉する.

#1: 界面活性剤として最終濃度 0.02% ~ 0.05% (v/v) Triton X-100 の代わりに 0.3% (v/v) 程度の Tween-20 を使用しても良い. ハイターの代わりに有効塩素濃度 0.5~1.0% 程度の次亜塩素酸ナトリウム溶液を使用しても良いが, 前者の方が安価である.

#2: オートクレーブで滅菌した純水.

2. 2 土を詰めたポットなどの容器で栽培する方法

培養土とバーミキュライトを任意の割合で混合し, 水を加えた後, ポットなどの容器に詰めて植物の栽培に使用する. 植物体を大きく育てる場合には化成肥料を与える. バーミキュライトのみをポットに詰める場合は, 無機塩類を含む水耕液 (例: ハイポネックス希釈液) を水の代わりに与える. また, 多数の植物個体を効率よく栽培する際には, アラシシステムが使われる.

2. 2. 1 バーミキュライトを詰めた栽培用ポットの作成

- ① バーミキュライト (大粒) に 1,000 倍希釈したハイポネックス液を加え, よく混合する.
- ② 直径 60 mm のポリポットにバーミキュライトを詰める.
- ③ ポットに種子を播種, あるいは寒天培地で育てた植物体を移植する.

④ 栽培中は、適宜 1,000 倍希釈したハイポネックス液を与える。

2. 2. 2 ロックウールの利用

土の代わりに鉱物繊維であるロックウールを使う場合もある。ロックウールには養分がないため、水の代わりに無機塩類を含む水耕液を与える必要がある。ロックウールはある程度の大きさのブロックに分かれており、植物体を効率よく栽培することが出来るが、土で育てた場合に比べると個体は小さくなる。

3. 遺伝資源

細菌や動物と比べて高等植物は相同組換えの効率が非常に悪いため、シロイヌナズナでは標的遺伝子が破壊された植物体を得るために、ランダムに突然変異を誘発させた変異体を多数作成し、その中から目的の遺伝子が破壊された個体を探し出すことが行われている。現在では、目的の遺伝子に T-DNA やトランスポゾンといった外来 DNA が挿入されている変異体をデータベースから容易に検索出来るようになっている。シロイヌナズナの変異体を使った研究で得られた知見は、他の植物を対象とした研究を行う際の重要な基礎的情報となる。シロイヌナズナの遺伝資源に関する各種情報は、4.1 シロイヌナズナのデータベース【遺伝資源】で紹介するウェブサイトを参照されたい。

3. 1 アクセッション (Accession)

シロイヌナズナは世界各地に分布しており、それぞれの環境に適応して分化している。現在一般的な研究の標準系統として多く用いられているのは *Columbia* と *Landsberg erecta* である。これらは異なった産地から採取された種子をもとに、植物を繰り返し自家受粉させて維持されてきた近交系統（アクセッション）であり、遺伝学的解析に用いることができる。現在では *Columbia* と *Landsberg erecta* 以外の多くのアクセッションが入手可能であり、単独のアクセッションの遺伝子解析だけでは理解できない特殊な環境への植物の適応メカニズムが明らかになりつつある。これらのアクセッションは ABRC, NASC, 理研 BRC, Lehle Seeds から入手可能である。

3. 2 タグライン (Tag line)

シロイヌナズナは、ゲノム塩基配列の解析から、およそ 25,000 の遺伝子がタンパク質をコードしていると予測されている。これらの遺伝子の機能を調べるには、目的の遺伝子が働かない突然変異体（遺伝子破壊個体）や、本来働いているのとは別の組織や細胞で（異所的に）その遺伝子を働かせた形質転換体などを解析することが重要である。シロイヌナズナの遺伝子破壊個体の作成には T-DNA やトランスポゾンが利用されている。T-DNA は植物病原菌である *Agrobacterium tumefaciens* が保有する Ti plasmid 上に存在する DNA 領域で、感染によって *Agrobacterium* から植物細胞内へ送り込まれ、最終的には感染した植物細胞の核ゲノムに組み込まれる。T-DNA 内の領域を人工的に改変して薬剤耐性遺伝子を組み込むことで、薬剤による形質転換体の選抜が可能となっている。T-DNA がある遺伝子内に挿入されれば、その

個体はその遺伝子の機能を失った個体（遺伝子破壊個体）となる。T-DNA のシロイヌナズナゲノムへの挿入が非選択的に起こると考えると、多数の形質転換植物体を作成すれば、致死とならない限り、理論上はどのような遺伝子でもその機能を失わせた個体を取得できることになる。これまでに SIGnAL, syngenta (SAIL line), GABI-Kat project, FST project などにより多数の T-DNA タグラインが作成されており、T-DNA 挿入部位の情報が ABRC (SIGnAL, SAIL lines), Max-Planck Institute (GABI-Kat), INRA (FST) より提供されている。特に SIGnAL が提供するウェブサイトでは、自分が興味のある遺伝子について T-DNA 挿入ラインがあるか、T-DNA がその遺伝子のどこに挿入されているかを検索することができ、TAIR を通じて ABRC に任意の T-DNA 挿入ラインの種子を請求することが出来る。

トランスポゾンタグラインはゲノム上を転移する遺伝子（トランスポゾン）の挿入による変異を利用したもので、トランスポゾンを指標として破壊された遺伝子を知ることが出来る。理化学研究所ゲノム科学総合研究センター（理研 GSC）が作成したラインは、トランスポゾン挿入位置が決定され、理研 BRC より提供されている。

3. 3 MTA (Material Transfer Agreement)

前項で紹介した遺伝資源を入手する際には、提供する側と受け取る側との間で生物遺伝資源移転同意書 (MTA) を取り交わす場合が多い。遺伝資源を利用するにはこの MTA で定められた事項を遵守する必要がある。種子の輸入には植物検疫を受ける必要があり、タグラインなどの遺伝子組換え植物を入手する際には、カルタヘナ議定書の批准に伴って施行された法律および省令に従い、手続きをする必要がある。

4. ウェブサイトからのデータ取得方法

シロイヌナズナやイネをはじめとするモデル植物の研究から重要な遺伝子やタンパク質が次々と報告されてきている。最近では、マイクロアレイを用いることで遺伝子発現の変化を網羅的に解析することや、様々な手法で目的のタンパク質と相互作用する因子を同定することができる。新しい研究を開始する際にウェブサイトを利用して研究対象の遺伝子についての基本情報を知ることが、研究計画を立てる上で非常に重要である。

モデル植物を用いた研究は世界中で活発に行なわれており、研究で得られた情報は用途ごとにウェブサイトで管理、公開されている。ここでは特に研究の進んでいるシロイヌナズナとイネを扱う代表的なウェブサイトを紹介する。総合的なウェブサイトでは任意の遺伝子について、cDNA クローンの有無や塩基配列、関連文献、変異体や形質転換体の種子が入手可能かどうかなど、様々な情報が検索できる。マイクロアレイ解析のウェブサイトでは目的の遺伝子が発現する時期や組織、各種ストレスや植物ホルモン応答による遺伝子発現の変化を知ることができる。

4. 1 シロイヌナズナのデータベース

【総合】

The Arabidopsis Information Resource (TAIR): <http://www.arabidopsis.org/>

RIKEN Arabidopsis Genome Encyclopedia (RARGE): <http://rarge.gsc.riken.jp/index.html>

【マイクロアレイ解析データ】

ATTED-II: <http://atted.jp/>

Arabidopsis eFP Browser: <http://www.bar.utoronto.ca/efp/development/>

AtGenExpress Visualization Tool: <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>

Genevestigator: <https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>

【タンパク質の機能情報】

Arabidopsis Small RNA Project (ASRP): <http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/db/>

Arabidopsis Gene Regulatory Information Server (AGRIS):

<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>

【遺伝資源】

TAIR（総合の項を参照）

Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC):

<http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm>

Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC): <http://arabidopsis.info/>

理化学研究所バイオリソースセンター（理研 BRC）：<http://www.brc.riken.jp/lab/epd/>

Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL): <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

Lehle Seeds: <http://www.arabidopsis.com>

Max-Planck Institute: <http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/>

INRA Versailles: <http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml>

4. 2 イネのデータベース

【総合・配列情報】

International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP):

<http://rgp.dna.affrc.go.jp/J/IRGSP/index.html>

National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS): <http://www.nias.affrc.go.jp/index.html>

Oryzabase: <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>

Rice Annotation Project (RAP): <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>

【マイクロアレイ解析データ】

The Rice Expression Database (RED): <http://red.dna.affrc.go.jp/RED/index.html>

Rice Microarray Opening Site (RMOS): <http://red.dna.affrc.go.jp/RMOS/>

【タンパク質の機能情報】

Database of Rice Transcription Factors (DRTF): <http://drtf.cbi.pku.edu.cn/>

Genomes TO Protein structures and functions (GTOP):

<http://structure.rice.dna.affrc.go.jp/gtop/gtop.html>

Rice Kinase Database (RKD): <http://rkd.ucdavis.edu/>

Rice Protein Structure Database (RPSD): <http://structure.rice.dna.affrc.go.jp/>

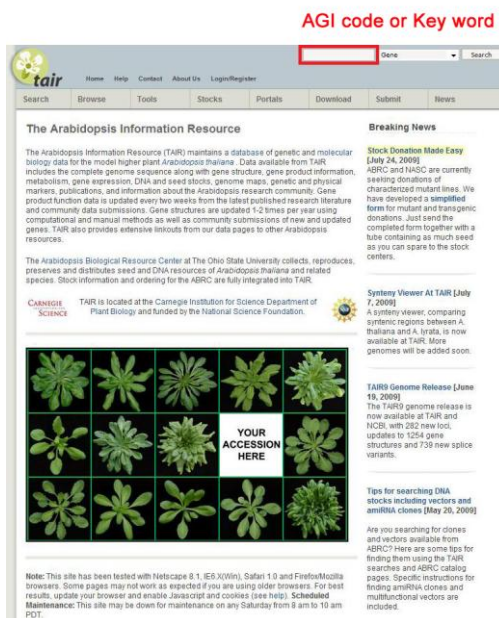
Rice Proteome Database: <http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/>

4. 3 ウェブサイトの利用例

4. 3. 1 TAIR

TAIR はシロイヌナズナ研究の情報がまとめられている総合情報サイトであり、シロイヌナズナの研究者がよく利用するサイトである。任意のキーワードや AGI コード (#1) での検索、遺伝子やタンパク質配列での BLAST 検索ができる。

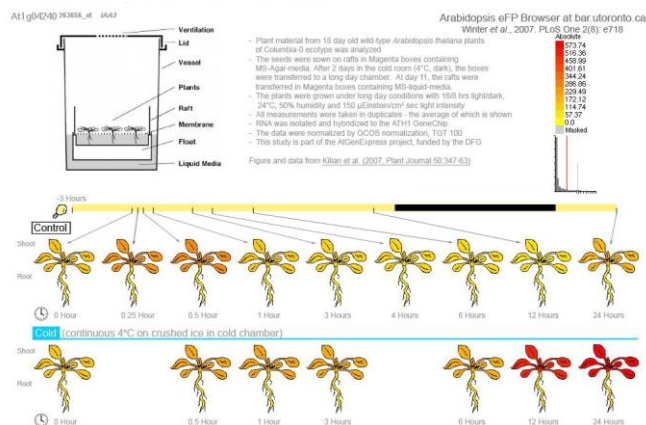
#1 : AGI コードとは AGI (Arabidopsis Genome Initiative) によって設定された各遺伝子の ID である。AtXgXXXXX (X は任意の数字) で表記される。



アノテーションのページでは RNA, DNA データ, 変異体, 論文などの情報が取得できる。各データは外部サイトとリンクしており、さらに詳細な情報も取得できる。

Protein Data

Publication



低温ストレス下での遺伝子発現変化

(左図). 上段はコントロール, 下段は低温ストレス処理条件下での遺伝子の発現を示している. *At1g04240* は低温ストレス処理後 12 時間, 24 時間目の地上部で発現が高くなる.

5. 植物研究分野のメーリングリスト

植物研究の分野でも研究者間の情報交換にメーリングリストが利用されている. メーリングリスト上では研究を遂行する上で有用な情報の交換に加え, 各種セミナー, 公募の告知も行われている. 研究の対象としている植物種などによって様々なメーリングリストが設置されているが, 複数のメーリングリストに重複投稿される場合も多い. 国内の主な植物研究分野のメーリングリストは下記の通りである. 何れのメーリングリストも各々の登録用ホームページから氏名, 所属機関などを入力すれば簡単に登録できる.

名称	運営機関	主な利用者
nazuna ML	かずさ DNA 研究所	シロイヌナズナの研究者
mameka ML	かずさ DNA 研究所	マメ科植物の研究者
nasuka ML	かずさ DNA 研究所	ナス科植物の研究者
rice-net	NBRP	イネの研究者
mugi-net	NBRP	ムギの研究者
Phytoinformatics	AFFRIT	植物バイオインフォマティクスの研究者

参考文献

- [1] モデル植物の実験プロトコール, 秀潤社 (2005)
- [2] バイオリソース&データベース活用術, 秀潤社 (2009)