

シロイヌナズナのフェノーム解析と4000遺伝子についての破壊株の作製

●黒森 崇¹⁾ ◆和田 拓治²⁾

1) 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター

2) 理化学研究所植物科学研究センター

〈研究の目的と進め方〉

ゲノムプロジェクトにより全塩基配列が決定されたシロイヌナズナは、高等植物を用いた基礎研究の分野において最もよく使われているモデル生物である。これまでの実験手法の進展や各種の研究リソースの充実により、また植物の利点として種子の状態で大変異株が維持できることなどから、シロイヌナズナは単に植物研究のモデルというだけでなく、一つの生物種に存在する全遺伝子について変異体を作製し解析が可能な (Saturation Mutagenesisが実現し得る) モデル生物であると考えられる。このような観点から、私たちは多数の遺伝子の破壊株を収集することを目的に、トランスポゾンを用いたタグラインの作製を行ってきた。

本研究では、これまでに作製してきた約12,000ラインの中からトランスポゾンが遺伝子コード領域に挿入されているラインを選別し、一ライン毎に様々な表現型解析 (フェノーム解析) を行い、シロイヌナズナの遺伝子と表現型を対応させた機能ゲノム学的解析を行うことが目的である。同時に、トランスポゾンのホモ挿入固体の選別を通して、系統的な遺伝子破壊株の作製を行うことで新しいリソースを創生することを計画している。

植物の育成の各段階で、先ず地上部の各器官における、目に見える形態異常 (Visible phenotype) について記録を取り、表現型の項目から検索できるデータベースを作製する。また、形態異常が観察されなかったタグラインについてもホモ挿入個体を選別していく。その後、これらのホモ挿入個体から得られた種子ラインを用いて、植物体の他の器官や条件的な表現型の効率的なスクリーニングを行うことも目標にしている。

〈研究開始時の研究計画〉

トランスポゾン・タギングラインの中からトランスポゾンが遺伝子コード領域に挿入されている約4,700ラインの種子を順番にプレート培地に50粒ずつ播種する。プレートでの育成中 (3週間) に幼少植物体の形態観察を行い、その後各ラインについて8個体ずつを土に植え換えて植物体を育成させる。生育の各段階で形態異常の観察されるラインについてデジタル画像によって記録を取る。フェノーム解析は、二段階の過程で表現型データの収集を行う。F3世代では通常の育成条件で植物体を育てる際に見ることができる、植物体の色や育成具合、地上部の各器官の形態など観察を約100項目のリストにまとめる。また全て耐性となるライン (ホモライン) を遺伝子破壊系統としてF4世代での解析を行う予定である。F4世代ではF3世代で見ることのできない、根などの細かい器官の観察や植物体の環境ストレス応答に関して表現型データを得るため、効率的な方法やスクリーニングのやり方について検討を進める。

〈研究期間の成果〉

1) 植物体の育成段階に沿った表現型の記録

トランスポゾン・タギングラインの中からトランスポ

ゾンが遺伝子コード領域に挿入されている約4,700ラインを選別した (文献1,5,6)。植物体の生育の各段階で、目に見える明らかな形態異常 (Visible phenotype) について記載を行い、デジタル画像によって記録を取った。植物体の矮性、アルビノ形質、植物体の色が薄い、遅咲き、葉の形態異常、茎の形態異常、花の形態異常、さやの形態異常などのいろいろな表現型が見られた。表現型の再現性を確認した139ライン (219表現型) について記載された表現型を大きく8つのカテゴリーと43のサブカテゴリーに分類した (表1)。

2) 表現型から検索可能なデータベースの作製

上記の画像データを使い、表現型の項目から変異体を検索できるデータベースの作製を行った。検索結果のページにはサムネール方式で写真を載せ、変異体のトランスポゾン挿入位置の情報を加えた。(現在、論文投稿中である。)

3) トランスポゾン・ホモ挿入個体の選別

表現型の記載がないラインについても、プレート培地における薬剤耐性率を指標にして、トランスポゾンがホモに挿入されている個体の選抜を行った。薬剤耐性率が100%になるラインが、F3世代 (表現型解析を行った世代) で1,965ライン、その次の世代の選抜では1,537ライン見つかり、これらはトランスポゾンがホモに挿入されていると予測され、次世代での解析を行うことができる新しいリソースと考えられる (文献2,3,4)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

(i) シロイヌナズナにおける各種リソース (特に、挿入変異体) の充実 (ii) 遺伝子破壊系統のコレクションとフェノーム解析への関心 (iii) 出芽酵母で既に全遺伝子の破壊株に関して報告があり、また線虫をはじめとした他のモデル生物でも遺伝子機能抑制型の各種変異体の大規模作製が始まっている。以上のような状況と、材料となるリソースを持っていることを考えて、遺伝子破壊系統の収集とそのフェノーム解析に着手した。シロイヌナズナの遺伝子破壊株の系統的な作製はまだ少数の報告しかなく、新しい有用なリソースになると期待される。また植物のフェノーム解析は世界的な標準があるとは言えない状況であり、本研究で得た結果は全遺伝子へ解析を広げていく際の基盤データの一つになると考えられる。Cold Spring Harbor Laboratory Meeting の Plant Genomes : From Sequence To Phenomeでは当研究に関する発表の機会が与えられた。なお、今回行ったフェノーム解析の結果については現在、論文投稿中である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

比較的顕著な表現型をもつ個体が数多く得られたが、一部のラインについては個体差が大きく、また表現型の再現性が確認できないものもあった。形態観察とホモ挿入ラインの選別を効率的に行うため、プレートでの初期育成時に薬剤を加えていることが一因と考えられる。特に、植物体の色が薄い、植物体が弱々しい、種子のつき

が悪いなどといった生育が悪いことにより現れる表現型に関しては、マーカー薬剤が予想外に生育に影響を与えてしまったと考えられる。これに関しては、予備データを元に薬剤の入っていないプレートで表現型の再現性を確認することで対応した。

表現型の記載方法 (phenotyping) について、当初100項目を編成していたが、最終的には8カテゴリー (43サブカテゴリー) へと分類を簡略化した。表現型に関しては、オントロジーなどの基準となる言葉が整っていないために独自の分類表を作成した (表1)。

表 1 観察された表現型 (Visible phenotype) の分類

large category	subcategory	count
1. Seedling	albino	13
	pale green	11
	variegated leaves	1
	rumpled leaves	4
	abnormal shape	7
	others	1
	subtotal	37
2. Leaves	pale green	16
	variegated leaves	4
	dark green	3
	hyponastic	4
	short petioles	4
	twisted petioles	1
	abnormal shape	7
	rough surface	6
	others	3
	subtotal	48
3. Flowering & Growth	late flowering	9
	early flowering	3
	dwarf/small	7
	slow growth	2
	growth defective	11
	subtotal	32
4. Stems	pale green	5
	fasciation	1
	waxy	2
	dark green	1
	thin	2
	others	2
	subtotal	13
5. Branching	bushy	1
	inflorescence	3
	short internode	3
	others	3
	subtotal	10
6. Flowers	carpel	3
	petal	6
	sepal	1
	stamen	9
	others	3
	subtotal	22
7. Siliques	short	8
	abnormal shape	5
	others	3
	subtotal	16
8. Seed yield	sterile	13
	semi-sterile	14
	low yield	6
	seed color	1
	seed shape	7
	subtotal	41
total		219

〈今後の課題〉

前述のように、網羅的な解析において表現型を記録することは予想外の困難があった。本来言葉を使って記録する形態や植物体の様子の変化を数値化する基準を導入する必要がある。

フェノーム解析の対象として、外見で分かる表現型以外にも、植物体の内的変化や環境条件による応答の変化も解析対象に含まれる。これらの解析には遺伝子破壊系統を用いることが効率的と考えられ、今回得られた合計3,500ラインのトランスポゾンのホモ挿入ライン (残りの1,200ラインについても準備中) の活用は今後の大きな課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 403241255

Kuromori, T., Hirayama, T., Kiyosue, Y., Takabe, H., Mizukado, S., Sakurai, T., Akiyama, K., Kamiya, A., Ito, T., and Shinozaki, K., A collection of 11800 single-copy Ds transposon insertion lines in Arabidopsis, *Plant J.*, 37, 897-905 (2004).

2. 403241324

Takahashi, N., Kuroda, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Seki, M., Shinozaki, K., Shimada, H., and Matsui, M., Interaction and expression analysis of Arabidopsis SKP1-related genes, *Plant Cell Physiol.*, 45, 83-91 (2004).

3. 0602061741

Harada, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., and Leigh, R.A., Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in Arabidopsis leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, AtCLC-c, to variation in nitrate levels, *J Exp Bot.*, 55, 2005-2014 (2004)

4. 0602061746

Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., and Sakakibara, H., AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.*, 45, 1053-1062 (2004)

5. 0602061750

Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Iida, K., Seki, M., Kuromori, T., Ito, T., Konagaya, A., Toyoda, T., and Shinozaki, K., RARGE: a large-scale database of RIKEN Arabidopsis resources ranging from transcriptome to phenome, *Nucleic Acids Res.*, 33, D647-50 (2005)

6. 0602061752

Ito, T., Motohashi, R., Kuromori, T., Noutoshi, Y., Seki, M., Kamiya, A., Mizukado, S., Sakurai, T., and Shinozaki, K., A Resource of 5814 Dissociation Transposon-Tagged and Sequence-Indexed Lines of Arabidopsis Transposed from Start Loci on Chromosome 5, *Plant Cell Physiol.*, 46, 1149-1153, (2005)

2) データベース

RARGE, トランスポゾン挿入変異体データベース

理研GSC植物ゲノム機能情報研究グループが作製してきましたシロイヌナズナのトランスポゾン挿入変異体約12,000ラインの挿入位置情報や近傍遺伝子についてWEB上で検索できます。

<http://rarge.gsc.riken.jp/dsmutant/index.pl>