解説

柴田 大輔

シロイヌナズナのゲノム配列からわかること

アブラナ科の一年草シロイヌナズナは、いま最も注目されている高等植物の一つである。シロイヌナズナの全ゲノム塩基配列の解読が国際協力事業として進められており、2000年末にはほぼ全領域の解読が終了する予定である。全ゲノム配列が既知となれば、従来とは異なる視点から植物の生命現象をみる事が可能になり、同時に、新たな植物バイオテクノロジーが開けてくると期待されている。

Functional Genomics of *Arabidopsis thaliana*

*Daisuke SHIBATA, (株)三井物産植物バイオ研究所(現在、かずさDNA研究所)

生命現象を分子レベルで解明する研究は、植物においては、微生物、動物の研究に後れをとりつつ進んできた。しかし近年、シロイヌナズナという強力な研究材料を手に入れたことにより、独創的な観点から基本的な生命現象を解明する研究が植物でも始まっている。ゲノム解析の成果を利用した植物バイオテクノロジーも注目されており、21世紀の食糧問題、環境問題への貢献が期待されている。本稿では、シロイヌナズナのゲノム塩基配列解読プロジェクトと植物学・植物バイオテクノロジーへのインパクトを紹介する。

モデル植物としてのシロイヌナズナ

シロイヌナズナが優れている点は、遺伝学を武器にして分子レベルの現象に迫れることであり、従来の分子生物学では手が出せなかった多くの生命現象が研究の対象になってきた。シロイヌナズナで解明された多くの現象は、他の植物にも当てはまる事が多く、その意味でシロイヌナズナは植物のモデルであるといえる。現在では、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学の影響を受けている研究分野は多い。

1. シロイヌナズナとはどんな植物？

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) は、アジア、ヨーロッパ、アメリカに広く自生するアブラナ科の一年草である。背丈が低く（研究室で栽培すると30 cmぐらい）、蛍光灯下などの弱い光の条件でも栽培が可能であり、特殊な栽培技術も必要としない(図1)。通常は自家受粉で種子が採れるが、交配も簡単にできる。種子の数も1個体あたり数千は採れ、長期間の保存も可能である。発芽してから種子ができるまでのライフサイクル

図1 ■ 実験室で栽培しているシロイヌナズナ
蛍光灯の下でもよく育つ。

が2~3カ月と短い。このような性質は、遺伝学の材料としては大変に都合がよく、動物材料と比べれば格段に取り扱いが容易である。突然変異処理した種子(M₂世代)も市販されているので、すぐにでも遺伝学的な研究を開始することができる。

2. シロイヌナズナの分子遺伝学

急速に進展してきた植物分子生物学も、1980年代の後半には新たな方向性を模索するようになり、シロイヌナズナの突然変異を利用した分子遺伝学が登場してきた。分子遺伝学のスタイルは、①対象とする生命現象に関係する突然変異体を探し出し、②その突然変異の原因となっている遺伝子を単離し機能を解析すること、と要約できる。

分子遺伝学的に遺伝子を単離する方法の中で、ポジショナルクローニング (positional cloning あるいは map-based cloning) は最も重要な手法である。この方法は、変異が生じた遺伝子の染色体上の位置を遺伝学的に決め、その位置情報に基づいて遺伝子を単離する方法である (シロイヌナズナからのポジショナルクローニングの詳細や他の遺伝子単離法に関しては、成書⁽¹⁾を参照されたい)。

分子遺伝学の基盤を整備するために、シロイヌナズナの DNA マーカー⁽²⁾やゲノム DNA クローン⁽³⁾が作製されてきた。このような研究材料は、ゲノム塩基配列プロジェクトにそのまま利用されている。1996年には、シロイヌナズナの第4染色体のほぼ全域が YAC (yeast artificial chromosome) クローンによってカバーされ (コンティグ化)、それ以降、塩基配列解読が容易な BAC (bacterial artificial chromosome) クローンや P1 クローンなどで全染色体がカバーされてきた⁽⁴⁾。これらの研究材料は、アメリカのオハイオ州立大学内に設置されている Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) などから入手できる (<http://aims.cps.msu.edu/aims/>)。

シロイヌナズナの研究が急速に進展してきた背景の一つとして、研究者が研究材料を積極的に公開し、誰でもが自由に研究に参加できる状況を作りだしたことは特記されるべきだろう。

シロイヌナズナ的全ゲノム塩基配列の解読

シロイヌナズナの核には5組の相同染色体があり、半数体あたり約1億2千5百万対の塩基が含まれている。全ゲノムの塩基配列を解読するプロジェクトが国際協力

事業として進行しており、2000年末にはほぼ全領域の解読が終了する予定である。

1. 国際協力プロジェクト

シロイヌナズナのゲノムを解析する国際共同プロジェクトが1990年に開始され、遺伝子地図の作製、ゲノム DNA クローンのコンティグ化、EST (expressed sequence tag) クローンの収集などが進められてきた。このような成果を受けて全ゲノム塩基配列を解読する機運が高まり、1996年にヨーロッパ、アメリカ、日本の研究者を中心とした Arabidopsis Genome Initiative (AGI) が設立された。AGI のメンバーグループは、それぞれの地域の事情に応じた体制に基づいて配列の解読作業を進めているが、全体としての統一性を持たせるために、①解読するシロイヌナズナのエコタイプはコロンビアとし、②データは即時に公開することが取り決められている⁽⁵⁾。

ヨーロッパでは、EU コンソーシアムが設立され、それに属する多くの研究室が、解読する領域を少しずつ分担し、イギリスのジョン・イネス研究所が全体を統括している。EU コンソーシアムは第4染色体と第5染色体の短腕部分の解読を行なっている (<http://websvr.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/>)。米国では、SPP コンソーシアム (<http://pgec-genome.pw.usda.gov/spp.html>) に参加しているスタンフォード大学、ペンシルバニア大学、アメリカ農務省植物発現センターが第1染色体を分担し、第2染色体はゲノム研究所 (TIGR)、カーネギー研究所が分担している (<http://www.tigr.org/tdb/at/at.html>)。また、第4、5染色体に関しては、EU コンソーシアムと協力して、米国のコールドスプリングハーバー研究所、ワシントン大学ゲノムシークエンスセンター、アプライドバイオシステムズ社が参加している (<http://nucleus.cshl.org/protarab/>)。フランスのゲノスコープは、EU コンソーシアムとは独自に第3染色体の解読を計画している (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/arabidopsis/>)。日本では、かずさ DNA 研究所が第5染色体と第3染色体の解読を行なっている (<http://www.kazusa.or.jp/arabi/>)。各国の解読領域を図2に示した。

2. 塩基配列の解読

ヨーロッパとアメリカでは国の資金を用いてプロジェクトを進めているが、日本では、千葉県が出資しているかずさ DNA 研究所がこのプロジェクトに貢献している。アメリカとヨーロッパのグループは、染色体をカバ

図 2 ■シロイヌナズナのゲノム塩基配列解読の国際協力関係

図 3 ■シロイヌナズナのゲノム塩基配列解析の一例

TAC クローン K18P6 のゲノム塩基配列からコンピュータで予測される遺伝子構造 (各々の予測された領域を、+鎖と-鎖についてアミカで示した)。かずさ DNA 研究所の許可を得て掲載。

ーしている YAC クローンから BAC クローンを単離して、それらを整列化してから塩基配列の解読を行なっている。これに対し、かずさ DNA 研究所では、三井業際植物バイオ研究所から提供された P1 クローン、TAC クローン(後述)などを用いて染色体をカバーし、解読を行なっている。

各グループごとに、解読した塩基配列の公開の仕方や、配列解析のスタイルが異なっている。アメリカのグループは、なるべく早く研究者に配列情報を提供することに重点を置いて、配列を解読した元のデータも公開している。しかし、配列解析がなされていない配列情報は間違いも多く、生データの公開は混乱を招くとの判断からヨーロッパと日本のグループは確定配列のみを公開している。配列解読作業が始まったクローン(クローンの位置と名前は事前に公開される)は、通常、4~6 カ月で配列情報が各ホームページ上で公開される(配列解読結果の一部を図3に示した)。当初は、ヨーロッパと日本から出されるデータが遅れ気味であったことに対してアメリカ側から懸念が表明されたが、各国の事情を考慮しないアメリカ流の正義感には反発もあったようである。

解読された塩基配列は、遺伝子コード領域の推定が行なわれ、その推定配列に基づいてデータベース検索が行なわれる。また、エクソンとイントロンの位置の予測も同時になされる。ただし、現在の配列解析ソフトでは、高等生物の塩基配列から正確な遺伝子コード領域を予測することは困難である。自分が研究対象としている領域、遺伝子の配列データに関しては各自で注意深く解析し直すことが大切であり、ホームページのデータの過信は禁物である。

1999 年 3 月の時点では、全体の約 2 分の 1 に相当する約 5 千万塩基対の配列が決定されており、国際データベースに登録されている。

ゲノム配列解読のインパクト

全ゲノム塩基配列が解読されることによって、何がわかるのか? この問いかけは、シロイヌナズナだけではなく、ゲノム塩基配列の解読が終了した生物、進行している生物に共通の課題である。大量の塩基配列情報をコンピュータでどのように処理し、有効な情報をいかにして引き出すのかは、これからの重大な課題である。それと同時に、遺伝子の機能解析の面では、functional genomics という言葉が使われて、ポストシーケンス期の研究の動向に注目が集まっている⁽⁶⁾。以下では、シロイヌナズナのゲノム塩基配列の解読から直接的な影響を

受ける例を紹介する。

1. ポジショナルクローニングの高速化

ゲノム塩基配列が解読されれば、最初に恩恵を受けるのはポジショナルクローニングによる遺伝子の単離である。分子遺伝学の手法は、農学を中心とした応用分野にも広がっているので、ポジショナルクローニングの高速化は植物バイオテクノロジーの進展に大きく寄与することになる。

ポジショナルクローニングは、遺伝学を用いた組換え価の算出を出発点としているので、塩基配列がわかったからといってすぐに遺伝子が単離されるわけではない。しかし、配列情報を用いれば、目的の遺伝子領域の絞り込みに用いる DNA マーカーの検索が容易になり、格段に早く遺伝子が単離されることになる。

ゲノム配列が既知になると、ポジショナルクローニングをさらに高速化させることが可能になる。長いゲノム DNA を、アグロバクテリウムを介して植物に遺伝子導入することができるベクター(TAC クローン)が開発されている⁽⁷⁾。このベクターを用いて作製したゲノム DNA クローンの両末端の塩基配列を解読すれば、解読されたゲノム配列と比べることによって、そのクローンの染色体上の位置が正確に決まる。もし、多数のクローンを同様に解析すれば、全染色体がこのようなクローンでカバーされることになる。このような状況になれば、目的遺伝子が存在している領域の絞り込みが一挙に進み、すばやく遺伝子を単離することが可能になる。かずさ DNA 研究所では、塩基配列解読プロジェクトに P1 クローン以外に、TAC クローンも用いており、染色体上の位置が正確に決まった TAC クローンの数は増えつつある。

2. 遺伝子ノックアウト

遺伝子機能を解析するための重要な手法の一つが、特定の遺伝子機能を破壊する方法(遺伝子ノックアウト)である。植物遺伝子のノックアウトに成功した例も報告されているが、まだ一般的ではない。しかし、ゲノム塩基配列がわかれば、トランスポゾンと組み合わせて、遺伝子ノックアウトが可能になる。トウモロコシ由来のトランスポゾン Ac/Ds 因子は、シロイヌナズナで機能することが知られている。Ds 因子(それ自身では動くことができない)をシロイヌナズナに遺伝子導入した系統が作製され、TAIL-PCR 法⁽⁸⁾(TAIL=thermal asymmetric interlaced)により染色体上の位置が決められている⁽⁹⁾。Ds 因子をジャンプさせるためには、Ac 因子を

もつ系統とかけ合わせる。トランスポゾンがジャンプする先は、多くの場合は1 Mb 以内に限定されているので、ターゲット遺伝子がDs 因子の近くにある場合にはノックアウトが可能になる。現在のところは、染色体上の位置が正確に決まっているシロイヌナズナのDs 系統の数は限られているが、その数が数百になれば、すべての遺伝子のノックアウトが可能になってくる。

トランスポゾンを利用せずに遺伝子をノックアウトする方法として、T-DNA を導入した多数の形質転換植物を調べる方法がある。世界中で約20 万以上の組換え体シロイヌナズナが作製されており、TAIL-PCR 法などを用いて、T-DNA が挿入された場所の遺伝子を特定すれば、各形質転換植物ごとにどの遺伝子が破壊されているのが判明する。

3. ゲノム DNA アレイ法

ゲノム解析の時代にふさわしい方法論が各分野で模索されているが、ゲノム全体の遺伝子発現をモニターする技術として、DNA アレイ法が注目されている。この方法の原理は、分子生物学実験で用いられているドットハイブリダイゼーションと同じである。全遺伝子のDNA 断片(あるいは可能な限り多数の遺伝子のDNA 断片)を適当な支持体に固定し、対象とする組織からmRNA を抽出して、それを酵素的にcDNA に変換したものをプローブとして用いる。多数の遺伝子断片を扱うために、高密度にDNA 断片を支持体に固定する技術(マイクロアレイ技術)や高感度検出法が開発されている⁽¹⁰⁾。

DNA アレイ法に用いられるDNA 断片は、高等生物の場合にはEST クローンが用いられることが多い。これに対し、筆者らはシロイヌナズナのゲノム配列を応用したDNA アレイ技術(ゲノムDNA アレイ法)をかずさDNA 研究所と共同開発した(図4)⁽¹¹⁾。ゲノム塩基配列の解読は、ゲノムクローンをショットガンクローニングして行なわれているが、解読結果をチェックするためにブリッジクローンと呼ばれる3~4 kb のクローンが用いられている⁽¹²⁾。ゲノム塩基配列上に整列化させたブリッジクローンのDNA 断片を支持体に固定したものがゲノムDNA アレイである。現在までに、シロイヌナズナ第5 染色体に由来する約3,000 個のブリッジクローンが整列化されており、乾燥、低温、短日条件、長日条件での遺伝子発現が調べられている。ブリッジクローンの塩基配列は解読されているので、どの遺伝子がどのような条件で発現しているのがすぐに決定される。

ゲノムDNA アレイ法の特徴は、EST クローンとして登録されていない領域も含めて、アレイ上に乗って

図4 ■ゲノムDNA アレイ法による多量遺伝子発現解析

るすべての遺伝子領域が発現解析の対象となることである。また、プロモーター領域も支持体に固定されているので、遺伝子発現制御に関わるようなDNA 結合タンパク質の解析も可能になってくるだろう。

DNA アレイ技術は、ゲノム生物学的アプローチの代表的な例であり、従来の研究手法が苦手としていたネットワークの解析に大きな威力を発揮する。分子遺伝学的手法は、対象とする現象を詳細に解析するには有効な方法であるが、その反面、その現象が全体の中でどのように位置づけられているのかを調べるのには向いていない。DNA アレイ技術による遺伝子発現のネットワークの解析は、ゲノム全体の中で生命現象を位置づける重要な手法となっている。

4. 進化へのアプローチ

ゲノム配列の視点から生命現象を捉える研究としては、進化の問題は重要である。最近、単子葉植物を代表する作物であるイネの全ゲノム塩基配列の解読が、日本の農林水産省を中心にして開始された⁽¹³⁾。双子葉植物に属するシロイヌナズナのゲノム配列との比較は、1 億年以上前に双子葉植物と単子葉植物が分化してきたゲノムの姿を映し出すことになる。ただし、単純な塩基配列の

比較だけでは本質的なところは見えないので、ポストシークエンス期の新たな方法論や情報工学のレベルアップが必要となってくるだろう。

新たな植物バイオテクノロジーへの期待

シロイヌナズナの分子遺伝学で解明された成果は、次第に植物バイオテクノロジーに取り込まれている。たとえば、シロイヌナズナから単離された *LEAFY* 遺伝子を用いて交雑ポプラ (hybrid aspen, *Populus tremula* × *tremuloides*) の開花時期を劇的に早めることができることが報告されている⁽¹⁴⁾。研究に使われた交雑ポプラは通常 8~20 年で開花するが、*LEAFY* 遺伝子を過剰発現させた組換え体では、植物体として再生されてから 7 カ月ほどで開花するようになった。林木の研究は、育種に時間がかかる代表的な分野であり、遺伝子操作の恩恵を受けにくいと考えられていたが、分子遺伝学の成果はこのような考え方を覆したのである。シロイヌナズナのゲノム配列の解読は分子遺伝学を進展させると同時に、様々な分野で植物バイオテクノロジーを促進させると考えられる。

交雑ポプラの例だけでなく、植物の基本的な機能に関わる現象を応用する場面では、シロイヌナズナは単なるモデル植物ではなくなっている。最近の外国での農学関係の学会では、ポストシークエンス期を意識したシロイヌナズナの研究が大きな位置を占めているのには驚かされる。

植物バイオテクノロジーの大きな課題も視野に入ってきた。1980 年代の初めに遺伝子操作が可能になったと

きに、夢のような作物が作りだされると吹聴されていたが、現実には「窒素固定ができるイネ」だとか、「塩害地や砂漠でも生育できる組換え体作物」はいまだに作られていない。しかし、ポストシークエンス期には、このような人類の夢をかなえるテクノロジーへの挑戦が可能になりつつある。

謝辞：かずさ DNA 研究所田畑哲之室長には、本稿の執筆にあたり数々の御教示をいただきました。ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) 島本 功, 岡田清孝(編): “モデル植物の実験プロトコル”, 秀潤社, 1996.
- 2) D. Shibata, M. Seki, N. Mitsukawa, N. Hayashida, T. Ito, T. Taji, T. Tsuge, M. Matsui, Y.-G. Liu, R.F. Whittier & K. Shinozaki: *Gene*, **225**, 31 (1998).
- 3) Y.-G. Liu, N. Mitsukawa, A. Vazquez-Tello & R.F. Whittier: *Plant J.*, **7**, 351 (1995).
- 4) D.W. Meinke, J.M. Cherry, C. Dean, S.D. Rounsley & M. Koornneef: *Science*, **282**, 662 (1998).
- 5) 佐藤修正, 小谷博一, 田畑哲之: 蛋白質 核酸 酵素, **42**, 3078 (1997).
- 6) D. Bouchez & H. Höfte: *Plant Physiol.*, **118**, 725 (1998).
- 7) Y.-G. Liu, Y. Shirano, H. Fukaki, Y. Yanai, M. Tasaka, S. Tabata & D. Shibata: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press (1999).
- 8) Y.-G. Liu & R.F. Whittier: *Genomics*, **25**, 674 (1995).
- 9) D. Smith, Y. Yanai, Y.-G. Liu, S. Ishiguro, K. Okada, D. Shibata, R.F. Whittier & N.V. Fedoroff: *Plant J.*, **10**, 721 (1996).
- 10) 君塚房夫, 加藤郁之進: 蛋白質 核酸 酵素, **43**, 2004 (1998).
- 11) 花野 滋, 金子貴一, 光川典宏, 田畑哲之, 柴田大輔: 日本植物生理学会第 38 回シンポジウム(札幌), 1998.
- 12) S. Sato, H. Kotani, R. Hayashi, Y.-G. Liu, D. Shibata & S. Tabata: *DNA Research*, **5**, 163 (1998).
- 13) T. Sasaki: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2027 (1998).
- 14) D. Weigel & O. Nilsson: *Nature*, **377**, 495 (1995).

お知らせ

公益信託エスベック地球環境研究・技術基金応募要項

目的: この公益信託は、地球環境保全に関する科学的、技術的な知見を高める各種活動のための費用の一部または全部を助成することにより、地球環境問題の克服に寄与することを目的としています。

助成対象者: 地球環境問題の解決に資する調査研究、観測監視または技術開発をしようとする大学、大学院またはそれに付属する研究機関の構成員またはそのグループを対象とします。

助成の金額と期間: ①平成 11 年度の助成総額は 250 万円程度で、2~5 件の助成となります。ただし申請金額が助成金額より少ない時は申請金額を上限として助成します。②助

成期間は、原則として助成金給付日より 1 年間とします。

応募方法: 所定の申請書を安田信託銀行株式会社(下記)からお取り寄せ下さい。申請書に必要事項を記入の上、安田信託銀行株式会社宛お送り下さい。

応募期間: 平成 11 年 4 月 1 日~5 月 31 日 (必着)

助成金交付: 平成 11 月 7 日

申請書請求先/問合せ先:

〒541-6501 大阪市中央区北浜 3 丁目 7 番 12 号

安田信託銀行(株) 大阪支店 事業法人営業部営業第 3 課
公益信託 エスベック地球環境研究・技術基金 宛

Tel: 06-6202-1242, Fax: 06-6202-4443