

- **Alignment**

二個以上の核酸配列やアミノ酸配列をそれらの相同性に基づき整列させたもの。三個以上の配列を用いたものは **multiple alignment** と呼ばれる。核酸配列やアミノ酸配列の内よく保存されているもの（多くの遺伝子・タンパク質に見られるもの）は何らかの機能を有するものが多いが、そのような保存配列・領域を見出すのに有用である。

- **Bimolecular fluorescence complementation (BiFC、二分子蛍光相補)**

タンパク質間相互作用解析の手法の一つ。ある蛍光タンパク質 (FP) の N 末端側 ( $N_{FP}$  とする) と C 末端側 ( $C_{FP}$  とする) に目的タンパク質 (X と Y とする) が融合した形のタンパク質 ( $N_{FP}$ -X と  $C_{FP}$ -Y) を細胞に共発現させる。当該細胞内で  $N_{FP}$ -X と  $C_{FP}$ -Y が相互作用すると  $N_{FP}$  と  $C_{FP}$  の距離が物理的に近くなり、FP が再構成され、蛍光を発しうようになる。これを指標に X と Y とが相互作用するか評価する。偽陽性 (false positive) を排除するため、 $N_{FP}$ -X +  $C_{FP}$  (Y なし) や  $N_{FP}$  +  $C_{FP}$ -Y (X なし) といったコントロールを用いて実験を行うことが必須である。  
Bimolecular ... ではなく bimolecular ... である。

- **Gel shift assay (gel retardation assay, electrophoretic mobility shift assay, EMSA)**

DNA-タンパク質間相互作用解析の手法の一つ。DNA を電気泳動する際に、その DNA に結合するタンパク質が存在すると、それが存在しない場合よりも当該 DNA の電気泳動は遅れ（電気泳動度が小さくなり）、シフトしたバンドとして検出される。これを利用して目的の DNA-タンパク質間相互作用の有無を評価する。目的の DNA 断片はプローブと呼ばれる。シフトしたプローブ DNA が少量であっても検出できるようにする（高感度化の）ため、プローブはビオチンや DIG で標識することが多い (ISH の項も参照されたい)。過剰な量の非標識 DNA を加えることでプローブ-目的タンパク質間の相互作用を競合的に阻害する（ことによりバンドシフトを減衰させる）という実験もよく行われる。この場合の非標識 DNA をコンペティターという。核酸や

タンパク質の電気泳動度は、電荷と形とかさ（分子量）により決まる。小さなタンパク質よりも大きなタンパク質のほうが大きなバンドシフトを引き起こすというのは必ずしも真ではない（と思われる）ので注意すること。目的タンパク質に対する抗体が反応液中に含まれる場合、それが無い場合よりもプローブのシフトの程度は大きくなる（スーパーシフト）が、この場合は、かさの増大の影響が大きいと考えられる。

- **GFP (green fluorescent protein、緑色蛍光タンパク質)**

広義では緑色の蛍光を発するタンパク質一般。狭義ではオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から単離されたものを指す。2008年のノーベル化学賞の受賞対象（発見者は下村脩、Martin Chalfie、Roger Y. Tsien。下村博士は家族総出で10万匹以上のクラゲを捕ったらしい。下村博士はウミホタルのルシフェリンの精製・結晶化やオワンクラゲからのイクオリンの単離も行っており、生物発光に関して多大な功績を残している）。オワンクラゲのものはモル質量約27 kDa。小さく水溶性も高いので扱いやすい。点変異の導入により様々な改変型 GFP が作られており、EGFP (enhanced GFP), YFP (yellow fluorescent protein), BFP (blue fluorescent protein), mGFP (monomeric GFP), Venus (YFP の改変版) などがその例。煩雑な操作をすることなく光（励起光）を当てただけでそのシグナルを観察できるというのが (G) FP の非常に優れた点である。興味あるタンパク質と FP とが融合した形のキメラタンパク質を細胞に発現させてそのシグナルを観察することにより、当該タンパク質の細胞内局在を調べることができる。他にも FP の使用例は枚挙にいとまがない。なお RFP (red fluorescent protein) は、もとはサンゴ (*Discosoma* sp.) から単離されたものであり、改変型 GFP ではない。mCherry などは改変型 RFP である。

- **GUS ( $\beta$ -glucuronidase)**

D-グルクロン酸の $\beta$ 型配糖体を加水分解する酵素。GUS 活性は多くの植物細胞において低いことから、GUS 遺伝子（特に大腸菌由来の *uidA*）は植物用のレポーター遺伝子としてよく用いられる。興味ある遺伝子のプロモーターの下流に *uidA* を配置し、これを植物に導入して GUS

活性染色を行うと、当該プロモーターが活発である（当該遺伝子がよく発現しているはずの）部位が染色される。GUS 染色は植物体を殺してしまう上、やや煩雑で時間がかかり定量性も乏しいため、GFP がレポーターとして用いられることも増えてきた。しかし、GUS は GFP よりも検出感度が高いこともある（と考えられる）ため、依然としてよく用いられている。

- **Immunoprecipitation (IP、免疫沈降)**

抗体を用いて溶液中の目的タンパク質を精製する手法。目的タンパク質に対する抗体を当該溶液に加えて暫く待つと目的タンパク質-抗体の複合体が形成される。この状態で抗体を回収すると目的タンパク質も一緒に回収されることになる。免疫グロブリンに親和性を持つタンパク質（細菌由来の Protein A や Protein G など）を担体（アガロースビーズなど）に結合させたものが抗体の回収によく利用される。タンパク質の翻訳後修飾を調べる場合など、IP しなければならない場合は多い。溶液中の目的タンパク質の濃度が十分に高くても、抗体の性質（力価やエピトープ）によっては目的タンパク質を全く回収できない場合もある。IP 目的で抗体を購入する場合には、なるべく IP に用いられた実績があるものを選ぶこと。

- ✓ **ChIP (chromatin IP、クロマチン免疫沈降)**

DNA-タンパク質間相互作用解析の手法の一つ。細胞にホルムアルデヒドを加えて目的タンパク質と（ゲノム）DNA との間に架橋（クロスリンク）を形成させた後、核を単離し、超音波処理（ソニケーション）によりクロマチンを剪断する。これに対して IP を行い、目的タンパク質を回収した後、タンパク質を変性させて脱架橋する。これにより生じた溶液中には、当該目的タンパク質と相互作用する DNA 断片が遊離した状態で存在するはずである。これを PCR や NGS などにより検出する。NGS により検出する場合は ChIP-Seq などと呼ばれる。ヒストンや転写因子が目的タンパク質とされる場合が多い。

- ✓ **Co-IP (共免疫沈降)**

タンパク質間相互作用解析の手法の一つ。IP して生じた溶液（IP サンプル）中に別の目的タンパク質が存在するか western blotting や LC-MS などにより調べる。目的タンパク質の *in vivo* での相互作用を解析する上で最も優れた手法とされる。この場合の *in vivo* というの

は、「過剰発現やタグの利用などの遺伝子工学的な手法を用いずに」などを含意する。そのような解析には質のよい抗体が必要不可欠であると思われる。

- ***In situ* hybridization (ISH)**

*In situ* は「本来の場所で」の意。組織や器官に対して DNA・RNA プローブを作用させ、それにハイブリダイズする DNA・RNA を検出する手法。mRNA を検出する場合は mRNA ISH、ゲノム DNA（の特定の領域）を検出する場合には genomic ISH と呼ばれる。mRNA ISH は遺伝子発現の組織特異性を解析する手法として有用である。プローブは DIG (digoxigenin)、ビオチン、蛍光物質等で標識しておく。標的核酸とプローブをハイブリダイズさせた後、プローブの標識物質を検出する。DIG の場合は、アルカリホスファターゼ (AP) 結合型の抗 DIG 抗体と反応させた後、AP 用の発色（又は蛍光）基質を作用させることで検出することが多い。ビオチンは、AP などで標識されたアビジン（強いビオチン結合能を持つタンパク質）を用いて検出することが多い（抗ビオチン抗体なども使用可能である）。プローブを蛍光物質で標識した場合にはそれを直接検出できるが、抗体などと反応させた方が感度は高くなる。最終的に蛍光を検出する場合（蛍光標識抗体などを使う場合も含む）、fluorescence ISH (FISH) と呼ばれる。染色体の単離や組織切片の作製を伴わない場合、whole-mount ISH と呼ばれる。

- **Next-generation sequencing (NGS、次世代シーケンス解析)**

次世代シーケンサーを用いて行う DNA 配列の解読。従来の方法（dye terminator 法など）に比べて飛躍的に多くの配列情報が出力される。次世代シーケンサーの種類や原理等については院生向け講義（作物生産生物学特論）のためのスライドなどを参照されたい。下に挙げるように様々な種類の解析があるが、それらの違いは主として標的 DNA・RNA の調製・精製法の違いによるものである。

- ✓ **ゲノムシーケンス解析**

ゲノム DNA の配列を解読するための次世代シーケンス解析。

- ✓ **RNA-Seq**

広義では RNA（の逆転写により生じた cDNA）を対象とした次世代シーケンス解析。狭義では mRNA の種類と量を網羅的に解析することを目的としたものを指す。このようなものは mRNA-Seq とも呼ばれる。Small RNA を対象としたものは Small RNA-Seq などと呼ばれる。これらの違いは、対象となる RNA の精製・解析方法の違いに基づくものである。

✓ **RAD-Seq** (restriction site-associated DNA sequencing)

ゲノム DNA における制限酵素認識配列の近傍の配列を対象とした次世代シーケンス解析。ゲノム DNA を制限酵素で切断し、これにより生じた末端を利用してシーケンス反応を行う。全ゲノムでなく制限酵素認識配列の近傍にターゲットを絞ることで、当該領域に関して信頼性の高い配列情報を得ることができる。一度のランで多くのサンプルの DNA 多型（特に一塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism)) をゲノムワイドに検出することができるため、連鎖地図の作製や GWAS などには特に有用である。

✓ **ChIP-Seq**

ChIP (chromatin immunoprecipitation) により得られた DNA 断片を対象とした次世代シーケンス解析。

✓ **Amplicon-Seq**

PCR 産物を対象とした次世代シーケンス解析。当該 PCR 産物（遺伝子など）の中の非常に出現頻度の低い多型・変異を検出することができる。

● **Northern blotting** (RNA gel blotting)

目的遺伝子の転写産物（量）の解析手法の一つ。ホルムアルデヒドを含む変性ゲル中で RNA を泳動・分離し、これをメンブレンに転写し、その中の特定の配列・領域を持つ断片をプローブにより検出する。メンブレンとしてはポジティブチャージのナイロンメンブレンがよく用いられる（RNA-メンブレン間で疎水性相互作用と静電相互作用が起こる）。プローブの検出は ISH の項で述べたような方法で行う。うまくいけば説得力のあるデータが得られるが、目的の転写産物の存在量が少ない場合、その検出には多量の RNA が必要となる。このため最近では、RT-PCRの方がよく行われるようになってきている。

- **PCR (polymerase chain reaction)**

鋳型 (テンプレート) DNA、プライマー、dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)、耐熱性 DNA ポリメラーゼを含む溶液の温度を上げ下げすることにより鋳型 DNA の一部の領域・配列を増幅する反応・技術。1993 年のノーベル化学賞の受賞対象 (発見者はアメリカ人の Kary B. Mullis。彼女とドライブ中に閃いたらしい)。PCR サイクルは、denaturation (熱変性。DNA を二本鎖から一本鎖にするステップ。90-100°C)、annealing (プライマーを一本鎖化した DNA に結合させるステップ。プライマーにより 30-72°C)、extension (伸長。DNA ポリメラーゼが dNTP を取り込んで 5'→3'方向に鎖を伸ばすステップ。68-72°C) から成る。

- ✓ **Genomic PCR**

Genomic DNA を鋳型として用いて行う PCR。目的の遺伝子・ゲノム領域を検出したりクローニングしたりするために行う。

- ✓ **Nested PCR**

PCR を行い、その産物を鋳型にして、その産物の一部を増幅するようにして (そのようなプライマーを用いて) 行う PCR。PCR の特異性を向上させることができる。はじめの PCR でバンドが得られなくても nested PCR を行うとバンドが得られることがある。

- ✓ **Quantitative PCR (qPCR、定量 PCR)**

PCR 産物の増幅の様子をリアルタイムに検出できる装置を用いて、鋳型 DNA を定量するために行う PCR。定量法としては比較 C<sub>T</sub> (cycle threshold) 法 (相対定量) や検量線法 (絶対定量) が用いられる。そのような装置を用いずに PCR 産物の電気泳動像 (バンドの濃さ) を基に鋳型 DNA の量を比較することも可能であり、これは半定量 PCR (semi-quantitative PCR) と呼ばれる。

- ✓ **Real-time PCR (リアルタイム PCR)**

PCR 産物の増幅の様子をリアルタイムに検出できる装置を用いて行う PCR。リアルタイム PCR 装置は、PCR 産物に取り込まれた蛍光色素 (SYBR Green など) を 1 サイクル毎に定量する。定量 PCR とほぼ同義。

✓ **RT-PCR** (reverse transcription-PCR、逆転写 PCR)

RNA の逆転写により生じた cDNA を鋳型として行う PCR。目的遺伝子をクローニングしたり、その発現量を調べたりするために行う。Real-time PCR を略して RT-PCR としている論文も散見されるが、reverse transcription-PCR の略であるとした方が適切なのではないと思われる場合も多い。字義を考えて使い分けるのが肝要と思われる。

✓ **TAIL-PCR** (thermal asymmetric interlaced PCR)

鋳型 DNA の一部の領域の配列がわかっている場合に、それに隣接する配列未知の領域を含む DNA 断片を増幅するために行う PCR。配列未知領域に annealing させるためのランダムプライマーと配列既知領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行う。PCR サイクルには、比較的低温でランダムプライマーを annealing させるステップと比較的高温で既知配列特異的なプライマーを annealing させるステップが含まれ、これが TAIL (サイクル) の所以である。既知配列特異的なプライマーを 3 種用意して nested PCR を行うことが普通である (これを行わないと特異的なバンドが得られないことが殆どである)。

● **Pull-down assay**

タンパク質間相互作用解析の手法の一つ。二種の目的タンパク質をタグ付きの形で発現させ、それらを混合する。タグを利用したアフィニティクロマトグラフィにより一方のタンパク質を精製した際に他方のタンパク質が共精製されれば、それらのタンパク質は相互作用していたことになる。共精製の有無は western blotting などにより評価する。タグとしては、GST (グルタチオン S 転スフェラーゼ) や MBP (maltose-binding protein、マルトース結合タンパク質)、His タグ (6-8×His) などが使われる。*In vitro* の系を利用して行われることが多いため、*in vitro* pull-down assay などとも呼ばれる。

● **Southern blotting** (DNA gel blotting)

ゲノム DNA を制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動によって分離し、それをメンブレンに転写し、その中の特定の配列・領域を持つ断片をプローブにより検出する方法。メンブレンと

してはポジティブチャージのナイロンメンブレンがよく用いられる (DNA-メンブレン間で疎水性相互作用と静電相互作用が起こる)。開発者の **Edwin Southern** (イギリス人) にちなんで名づけられた。プローブに結合しうる配列・領域がゲノム中に何コピーあるか調べるのに用いられる。プローブの特異性は重要である。プローブの検出は **ISH** の項で述べたような方法で行う。RNA をメンブレンに転写後検出する実験は **northern blotting** と呼ばれ、タンパク質をメンブレンに転写後検出する実験は **western blotting** と呼ばれるが、**Northern** さんや **Western** さんが開発したわけではない。

- **Western blotting (protein gel blotting)**

タンパク質を **SDS-PAGE** により分離し、メンブレンに転写し、その中の特定のタンパク質を検出する方法。検出に抗体を用いる場合は **immunoblotting** などとも呼ばれる。メンブレンとしては **PVDF** メンブレン (柔らかくて扱いやすくタンパク質結合容量も大きい) がバックグラウンドが出やすい) か **ニトロセルロース** メンブレン (バックグラウンドは出にくい) がもろい) を用いる。タンパク質のメンブレンへの転写を伴えば、検出に抗体以外のプローブを用いる場合でも **Western blotting** という (と思う。この場合 **immunoblotting** とは言えない)。

- **Yeast one-hybrid experiments (Y1H expt.)**

DNA-タンパク質相互作用解析の手法の一つ。酵母細胞に目的タンパク質を発現させた際にレポーター遺伝子が活性化されるか調べる。レポーター遺伝子としては、栄養要求性マーカー (**auxotrophic marker**) 遺伝子、薬剤耐性遺伝子、酵素遺伝子 ( $\beta$ -galactosidase など) が使われる。これらの上流に目的の DNA 配列 (特定の遺伝子のプロモーターや *cis* 因子のタンデムリピート) を持つような酵母を作製しておき、様々な種類の転写活性化ドメイン融合型のタンパク質 (cDNA ライブラリー由来) をこれに発現させてレポーター遺伝子の活性化を調べることで、当該 DNA 配列に結合するタンパク質 (に相当する cDNA) をスクリーニングすることもできる。Y2H 用の **BD** 発現用ベクターに目的遺伝子をクローニングし、これを Y2H 用の酵母に導入し、レポーター遺伝子の活性化について調べ (Y2H の項を参照されたい)、これにより当該遺伝子の

産物に転写活性化能があるか評価するという系があるが、これも Y1H (の変法) である。

- **Yeast two-hybrid experiments (Y2H expt.)**

酵母細胞を利用したタンパク質間相互作用解析。転写因子の転写活性化ドメイン (AD) と DNA 結合ドメイン (BD) に目的タンパク質 (X と Y とする) が融合した形のタンパク質 (AD-X と BD-Y) を Y2H 用の酵母細胞に共発現させる。Y2H 用の酵母においては、ゲノムが人為的に改変されており、レポーター遺伝子上流に BD 結合配列が存在する。この酵母細胞内で AD-X と BD-Y が相互作用すると AD と BD の距離が物理的に近くなり、レポーター遺伝子が活性化されるはずである。この活性化を指標に X と Y とが相互作用するか評価する。レポーター遺伝子としては、栄養要求性マーカー (auxotrophic marker) 遺伝子、薬剤耐性遺伝子、酵素遺伝子 ( $\beta$ -galactosidase など) が使われる。偽陽性 (false positive) を排除するため、AD-X + BD (Y なし) や AD + BD-Y (X なし) といったコントロールを用いて実験を行うことが必須である。AD-X の発現に cDNA ライブラリーを用いることで (X が当該 cDNA 由来のタンパク質にあたる)、(BD-) Y の相互作用因子をスクリーニングすることもできる。このような実験は Y2H screen と呼ばれる。AD-X と BD-Y に加えて第三の目的タンパク質を共発現させる系もあり、これは Y3H と呼ばれる。