

## 実験 B C. elegans の遺伝学的マッピング

(文責：杉本亜砂子 10/2002)

<目的> 変異体の優性・劣性を調べる。また、マーカー変異との連鎖を調べることにより、どの染色体に存在するかを決定する。

<解説および手順>

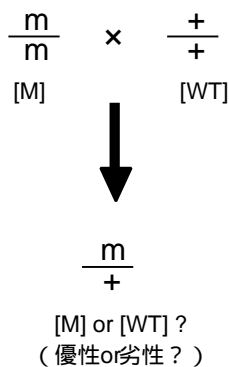
### (1) 優性・劣性

新規の変異体（通常は雌雄同体）を分離した場合、遺伝学的解析の最初のステップは野生型の雄と交配することである。

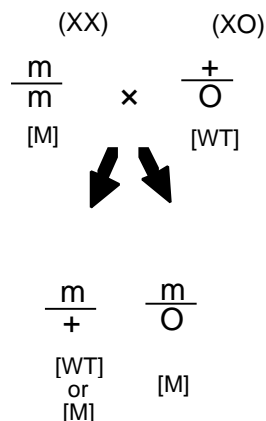
交配の結果生まれた F1 世代の表現型を観察してわかること：

- その変異体が優性(dominant)であるか劣性(recessive)であるか
  - “semidominant”の概念も説明。semidominant dpy も使用したが、表現型が解りにくかったようである。
- その変異が X 染色体上にあるか否か

常染色体の場合



X染色体の場合



手順：

本実習では、3種類の dpy 変異体について調べる。それぞれの dpy 株について以下の作業を行う。

1) L4 または若い成虫の野生型の雄を 10 匹新しいプレートに移す。(雌雄同体が混じっていないことを確認)

- 可能であれば、実験 A で作成した male plate から雄を拾う。

2) L4 または成虫の dpy 変異体 5 匹を 1)のプレート に移す。

3) 次の日に全ての P0 世代の線虫を新しいプレート に移す。

1 枚目のプレート上に産み落とされた卵のほとんどは変異体の自家受精によるもの。

4) 次の日に再度、全ての P0 世代の線虫を新しいプレート に移す。

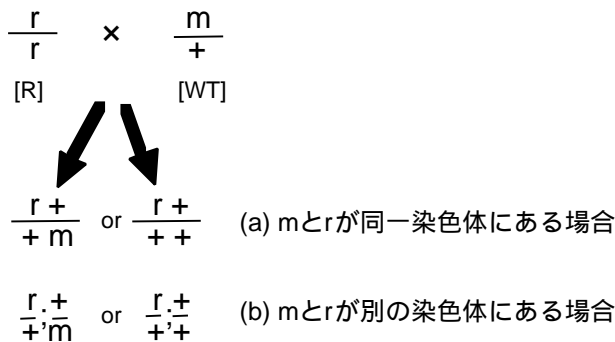
プレート上のF1世代の数を増やしすぎず、かつ、同調させるため。

4) 2~3日後にプレートのF1の表現型を観察し、各 dpy 変異の優性・劣性、X染色体上にあるか否かを判断する。

(2) Linkage Analysis

変異体が常染色体上の劣性変異であった場合、I~Vのどの染色体に位置するかを決定する。通常、各染色体上にすでにマップされた変異 (reference marker, 以後 "r") との連鎖(linkage)を調べることによって染色体を決定する。

ホモ接合の変異体の雄(m/m)は交尾しないことが多いので、(1)で得られたヘテロ接合の雄(m/+)を reference mutation のホモ接合の雌雄同体 (r/r) と交配する。



いずれも[WT]なので  
区別できない

欲しいF1はrとmのそれぞれについてヘテロ接合となっているもの(r+/+ mまたはr/+; +/m)であるが、この交配によって得られるF1世代はすべて野生型の表現型を示すのでr+/++またはr/+;+/+も区別できない。そこで、F1世代の線虫を一匹ずつ別個のプレートに移し、次世代(F2世代)に[R]と[M]の両方の表現型が出たプレートからのみ、データを収集する。

r+/+ mまたはr/+; +/mの遺伝子型を持つF1から生まれるF2世代の表現型は[M], [R], [MR](二重変異), [WT]の4種類に分類できるはずである。

(a) もしもmとrが独立に分離する場合(別個の染色体上に存在する場合)には以下のようになる。

		Egg			
		+ ; +	r ; +	+ ; m	r ; m
Sperm	+ ; +	WT	WT	WT	WT
	r ; +	WT	R	WT	R
	+ ; m	WT	WT	M	M
	r ; m	WT	R	M	RM

$$[WT] : [R] : [M] : [RM] = 9 : 3 : 3 : 1$$

(b) 一方、m と r が同一の染色体上の近接した位置に存在している（”連鎖”している）場合には、

		Egg	
		r +	+ m
Sperm	r +	R	WT
	+ m	WT	M

$$[R] : [WT] : [M] = 1 : 2 : 1$$

となる。

m と r が同一の染色体上に有る場合は、[RM]は組み換えが起こったときにのみ生じうる。

問： m と r が同一の染色体上にあり、組み換え率が 10% だった場合の [RM] 二重変異体が生じる頻度を計算せよ。

手順：

本実習では、(1)で X 染色体上にないことが示された dpy 変異が第 I 染色体に存在するかどうかを調べる。

1) (1)で得られた dpy/+の雄 (L4~young adult) 10 匹と第 I 染色体上の変異である unc-13 変異体の雌雄同体 (L4~young adult) 5 匹を同じプレートに移す。

2) 2 日後に P0 世代の虫を新しいプレートに移す。(予備として取っておく。)

3) 最初に産み落とされた卵は unc-13 変異体の自家受精のため Unc 表現型を示すが、交配によって生じた F1 世代は野生型となる。野生型を示す雌雄同体の L4 を一匹ずつ新しいプレートに移す (6~10 枚分)。成虫になると F1 の雄と交配を始めてしまい、次世代の表現型が解析できなくなるので、必ず L4 を拾うこと。

4) 毎日、F1 世代の虫を新しいプレートに移す。(どのプレートがどの虫由来かが分かるようにしておくこと。)

5) F2 世代の表現型がわかるようになるまで培養し、[Dpy]がいるプレートを選択する。

6) 各プレートについて [WT], [Dpy], [Unc], [Dpy Unc]の数を数える。total で 100 匹程度数えればよい。

7) dpy と unc-13 が連鎖しているかどうか考察する。

- バクテリアやカビのコンタミのせいで表現型が観察しにくくなる班が多い。
- (したがって、助手は常にバックアップ用のプレートを準備しておく必要があるのだった。)