

分子遺伝学と逆遺伝学による線虫の神経発生の解析

- ポストゲノムシーケンス解析モデルとしての線虫実験系の開発 -

三谷 昌平

(東京女子医科大学・医学部・第二生理学)

1. 研究のねらい

ヒトを含めて多くの生物で、ゲノムおよびcDNAの塩基配列解析が進んでいる。近い将来、生物で使われているタンパク質の構造が、データベース中に網羅的に記載されると予想される。線虫*C. elegans*は、最も早くゲノム構造解析が進んだモデル多細胞生物であり、遺伝解析に適している。本研究では、線虫の既知転写因子を使い、その標的遺伝子を同定することにより、実際の表現型に至る経路を担う遺伝子群を見つけ出し、さらに、欠失変異体を分離することで、機能解析が出来る実験系の開発を目指した。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) Green Fluorescent Protein (GFP) をエピトープタグとして用いる転写制御因子の標的遺伝子探索法の開発

線虫の多種類のニューロン(雌雄同体で302個あるうちの約5分の1)で発現し、それらの分化制御等を支配していると考えられる転写制御因子UNC-86をモデルとして、実験法の開発を行った。unc-86変異体の異常を、その正常ゲノムDNAのコード領域にフレームが合うようにGFPのcDNAを挿入することにより、GFPの蛍光タンパク質としての性質と、UNC-86転写制御因子本来の発現と機能の両方を持った分子をトランスジェニック個体として、unc-86変異体内で発現させた。このタンパク質は、抗体染色で記載されているような細胞および核特異的な発現を示した。さらに、unc-86変異体では失われている触覚異常の表現型や、神経伝達物質セロトニンの免疫反応性が回復した。従って、GFPをエピトープタグとした改変型転写因子は、蛍光タンパク質と本来の転写調節の両方の性質を保持したキメラタンパク質として機能していると考えられる。トランスジェニック個体を集め、抗GFP抗体で、タンパク質-DNA複合体を免疫精製し、DNAを抽出後、4塩基認識制限酵素で消化してクローン化した。ランダムにピックアップしたクローンの挿入DNA断片をシーケンスし、Blast解析により、線虫ゲノムDNAのどこに相当するかを調べた。

1,000クローン強の配列を染色体上にマップし、どのような遺伝子の近傍の塩基配列かを調べた。約5%がトランスジーン由来の配列であり、unc-86遺伝子の自己制御領域に結合したために、選択的に回収されたものと考えられた。その他の配列については、同一遺伝子の周辺部に複数の配列が回収されているものを有力候補として、約50個の遺伝子が得られた。この中から若干の遺伝子について発現様式を調べている。f47e1.1遺伝子は、既知の相同遺伝子が知られておらず、頭部、腹部、尾部において各々1対のニューロンで発現が見られ、野生型UNC-86タンパク質の発現細胞の一部であると考えられた。unc-86変異体のバックグラウンドでは発現が消失したことから、野生型動物ではUNC-86によって活性化を受けていると考えられる。f25e2.1遺伝子は、Gタンパク質共役型受容体に相同性があり、野生型動物では、咽頭部の非神経組織で発現している。unc-86変異体のバックグラウンドでは(野生型個体でUNC-86が発現している細胞の一部らしい)、頭部のニューロンで発現が見られるようになり、野生型動物ではUNC-86によって抑制を受けていると考えられる。これらの遺伝子がどのような機能を持っているか、遺伝子破壊法を用いて解析中である。本研究で開発に成功した、GFPを用いるエピトープタグ法は、他の生物種やタンパク質・タンパク質相互作用解析においても有用な技術であると考えられる。

(2) 線虫での遺伝子破壊法の効率化と応用

線虫では、RNA干渉法と呼ばれる手法で一過性に遺伝子機能を阻害することが可能である。しかし、神経系では作用しない例が多く、安定な遺伝子破壊株の分離が重要である。これまで、技術的な問題点のために変異体の分離には膨大な労力が必要とされてきた。本研究では、この手技を最適化し、変異体分離をルーチン化することに成功した。具体的には、トリメチルソラレンと紫外線で処理し、ランダムな欠失変異を導入した個体のプールを作っておき、遺伝子特異的なプライマーを用いて欠

失を持つ個体を含むプールを見つけ出し、そこから変異個体を同定する。過去約1年半で、200以上の新規変異体を分離済みであり、それらの変異体の表現型解析を通して、遺伝子機能を理解するための重要な生物遺伝資源となりつつある。また、国際C.elegans遺伝子破壊コンソーシアムに加盟し、株の配付を行っている。線虫を用いた遺伝子解析全体への貢献が期待されている (<http://elegans.bcgsc.bc.ca/knockout.shtml>)。

自己評価

本研究は、線虫を用いたポストゲノムシーケンス解析の開発に焦点を絞り行われた。近年、多種類の生物で、ゲノム構造解析が進展し、その構造的・機能的な保存性が明らかになるケースが多々ある。本研究は、そのような生物学の方向性に合致しており、この方法論が他のモデル生物も含めて、ポストゲノムシーケンス解析に応用できるだけでなく、この延長線上で見て来る生命のメカニズムが一般的な理解に貢献する可能性が期待される。

3. 領域総括の見解

線虫における転写制御因子タンパク質（ここでは多種類のニューロンで発現し、その分化に関係すると示唆されている UNC-86 タンパク質）を GFP でマークし、その転写支配下にある遺伝子を抗 GFP 抗体で効率よく分離し、ゲノム上の位置を決定する方法で被支配遺伝子を同定する方法を開発した。また、トリメチルソラレンと紫外線処理で欠失変異体を得る方法を考案し、国内外の研究者に向けて多くの突然変異体を供給している。自身の論文はいまだ少ないが、この努力は評価されるべきである。

4. 主な論文

1. Gengyo-Ando, K., and Mitani, S. (2000). Characterization of mutations induced by ethylmethanesulfonate, UV and trimethylpsoralen in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269, 64-69.

5. その他

招待講演： 3件