

モデル多細胞生物発生の遺伝子システムの全体像解明と計算機モデル化

●小原 雄治

国立遺伝学研究所生物遺伝資源情報総合センター

＜研究の目的と進め方＞

1. 研究目的

生命は分子から細胞、組織／器官、個体、集団という階層構造をとる複雑なシステムである。そのような生命システム解明の究極のゴールはそれらを計算機モデル化し計算機上で再現すること（コンピュータシミュレーション）である。そのためには、遺伝子システムの全貌解明やコンピュータモデル化さらにはその検証に向けた実験系で始めることが重要であるし、コンピュータシミュレーションを複雑な生命現象理解の有効な手段とするには、計算手法や実験結果の取り入れかた等に多くの革新が必要である。そこで、本研究では線虫を用いて構造、発現、機能、進化研究をいわば四位一体で進め、全遺伝子の構造、発現パターン、機能情報を得、さらに近縁種について発生メカニズムの違いと関連する遺伝子領域について比較ゲノム解析をおこない、これらの結果を逐次統合し、発生の遺伝子システムの解明をおこなう。さらに、いくつかの発生過程について計算機モデル化を試みる。

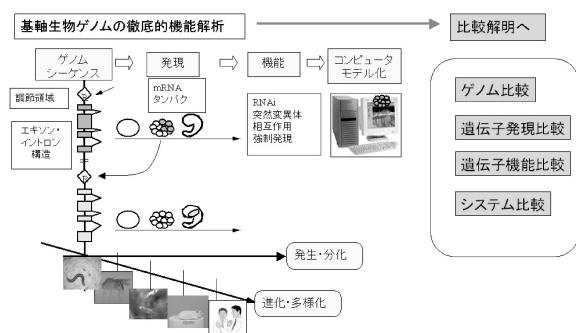


図1. ゲノムの発現・機能マップ

2. 研究開始時の目標計画

- 1) 線虫C.elegansのcDNAプロジェクトを徹底的に進め全遺伝子構造を明らかにする。
- 2) 全遺伝子の全生涯におけるmRNAの発現パターンを明らかにする。
- 3) 初期胚など細胞運命決定時期に発現する遺伝子タンパクの局在を明らかにする。
- 4) 各現象で発現する遺伝子の機能解明を体系的なRNAiによりおこなう。
- 5) 以上のデータを統合するデータベースを構築し遺伝子ネットワーク解明をおこなう。
- 6) 上記のデータをもとに初期胚発生の計算機モデル化をおこなう。
- 7) 発生・細胞分裂・細胞接触パターンが異なる近縁種の比較ゲノム解析を進め、発生メカニズムの進化を研究する。

3. 研究成果

- 1) 線虫C.elegansのcDNAプロジェクト

数種のcDNAライブラリー（通常法、オリゴキャップ法による完全長濃縮）からcDNAクローン合計約16万クローン端読み解析を行い、EST配列（5' タグ数：126,431、3' タグ数：116,616、両側あり：107,031クローン）を得た、クラスタリングの結果、14,222遺伝子に分類された（図2参照）。

EST配列としてデータベースに登録するのは一定以上のクオリティ部分のみ（400-500塩基）である。しかし、その先も配列情報は十分保持しているので、ゲノム配列と比較してエキソン・イントロン構造を確定していくためのプログラムAcemblyを開発した。まず最初の高クオリティの部分がアラインされるが、エキソン・イントロン境界に来ると突然合わなくなる。しかし、その先を調べるとまたうまく合う部分がでてくるので、これを繰り返す。このやりかたでは、800塩基程度まで合わせることができ、mRNAの平均鎖長（1.5-2Kb）のクローンであれば、両側からのクロマトデータがあれば全領域をカバーできる。より長い遺伝子については、途中クローンを利用した「unigene」方式になる。完全オートマチックではなく手作業が入るが、その結果、10,126遺伝子のエキソン／イントロン構造を確定した。多数のalternative splicingを検出し、遺伝子あたり平均1.7種のmRNA、1.4種のタンパク質コーディング配列を見いだした。ちなみに、最小のエキソンは9ベースであり、アスパラギン酸・アスパラギン・アラニンをコードしていた（これらのアミノ酸の略号はD・N・Aである！）（図4）。この情報は、ゲノム配列からの遺伝子予測を大いに助けることになり、C.elegansゲノムの統合データベースであるWormBaseで活用されている（図3）。実際、遺伝子予測をもとにしたWormPepデータベースは間違いが多いことが判明した。111個の新たに予測された遺伝子では33%しか正確ではなかった。第1エキソン、最終エキソンは35%、28%で修正が必要であり、33%で内部エキソンの

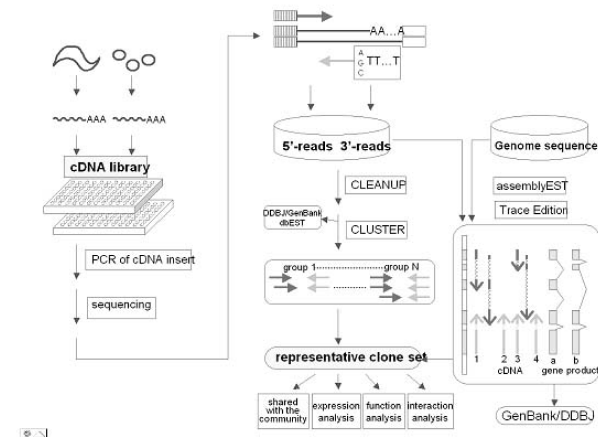


図2. cDNAプロジェクトの流れ

修正が必要であった。

一方で、この時点の結果から、ゲノム配列のクオリティが非常に高いこと、恐らくまだ0.7～1.2Mbの欠如ある

ことが示唆された。また、EST側の問題も修正した。例えば、キメラクロン、内部欠失や逆位、内部プライミング、スプライシングのミス、などである。このような問題配列の割合は通常cDNAライブラリーでは1%、オリゴキャップ法ライブラリーは5%、公的データベースのものは2%であった。

同時に我々は、体系的な遺伝子命名法を提唱した。例えば1K18 (mec-8)と表記し、染色体番号 (1-6、6はX染色体)、染色体を1 Mb毎に区切ったブロック (20Mbの染色体ならA-V、I、O、Zは除く)、遺伝子3'末端の位置 (Kbで表示、偶数、奇数で向きを表示)、通常遺伝子名 (もしあれば) とする。この場合では、第1染色体のKブロック (端から10Mb) の18Kbのところに3'末端があり、逆方向に転写、遺伝子名はmec-8である。

オリゴキャップライブラリーは新たな知見を多くもたらした。80%が5'-capからポリAまで含むものであり、線虫特有のトランススプライスリーダー配列 (SL) が65%の遺伝子に見出された。12のSL (4つは既知) に分類され、これらは15箇所30のSL前駆体遺伝子由来であることがわかった。遺伝子の76%はSL1をもち、24%はSL2からSL12であった。後者の多くは前の遺伝子との間が300bp以下であり、オペロン様の転写であることが示唆された。SL1以外のマイナー配列は胚発生期には5%であったものが、成虫期には25%に増加するなど、スプライスリーダー配列の使い分けが示唆された。

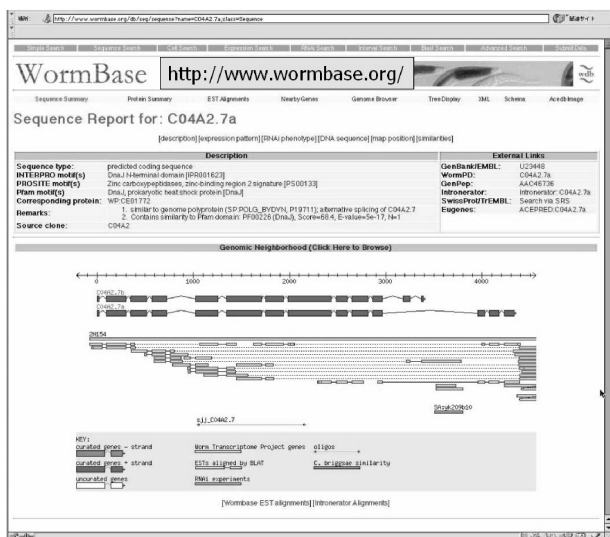
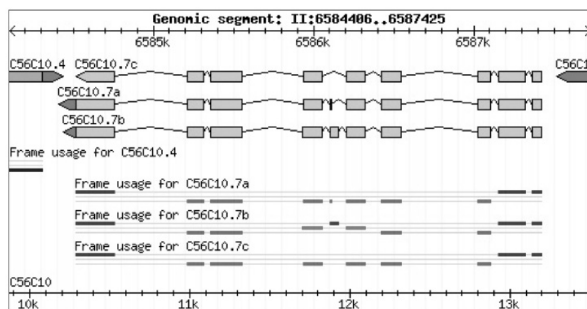


図3. WormBaseのcDNAアラインメント画面例



The shortest exon: /GACAATGCG/
Asp Asn Ala
D - N - A

図4. Alternative splicing例。下部は最小エキソン。

これらの情報はNEXTDB <nematode.lab.nig.ac.jp>、及びWormBase <www.wormbase.org/>で公開した。

2) 全生涯におけるmRNAの発現パターン

whole mount embryoのマルチウェルフォーマット in situハイブリダイゼーション法を用いた大量試料の解析をおこなった (図5,6)。ESTプロジェクトから分類したcDNAのうちこれまでに10,800種をプローブにハイブリダイゼーションをおこなった。線虫は小さいので胚発生全ステージが8ウェルスライドの1ウェルで検出できる。幼虫から成虫は少し大きくなるので4ステージに分け、それぞれ1ウェルで検出する。プローブはDIG標識し発色法で検出した。通常、試料とプローブ毎に条件の最適化が必要であるが、大量試料を扱うために比較的安定な条件を見出し、各遺伝子についてプローブ濃度を2点とって安全を期した。

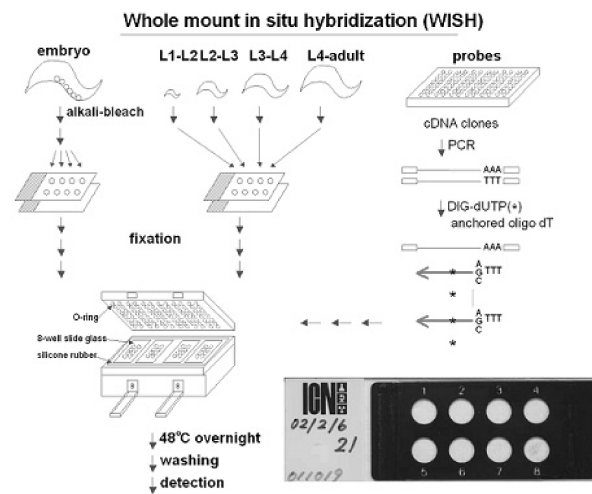


図5. Whole mount in situハイブリダイゼーションの流れ

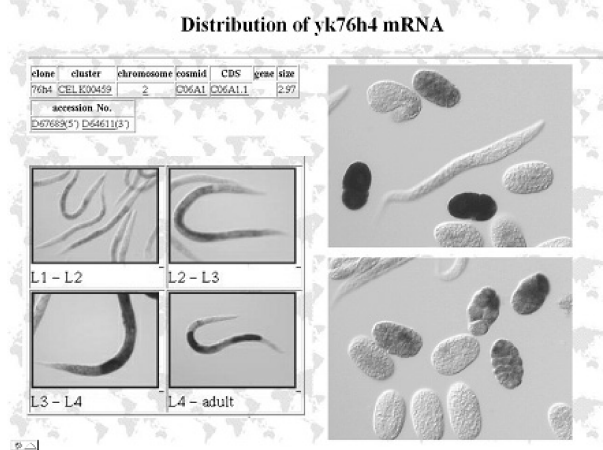


図6. Whole mount in situハイブリダイゼーション例

そして、画像を残し、以下のような最小限のアノテーションをつけてデータベース化している。胚発生については典型的な10ステージに分類し、それぞれについて10-20程度の典型的な細胞、組織、領域の発現パターンに分け、シグナル強度を3段階とっている。幼虫-成虫は4段階に分け、やはりそれぞれ10程度の典型的な領域と3段階のシグナル強度でアノテーションを与えている。結果的に (ステージが胚発生10+幼虫4)x領域10x強度3=420次元の情報となる。

これらはNEXTDB <http://nematode.lab.nig.ac.jp>に統合化し公開している。発現パターンの類似性を検索する

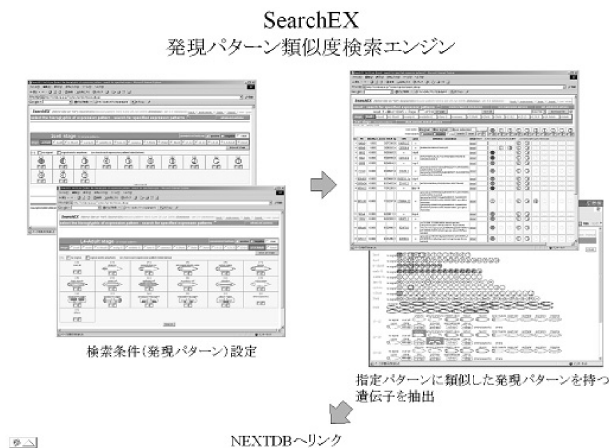


図7. 類似発現パターン探索システムSearchEX

システム (SearchEX) も構築した (図7)。いわば発現パターンのBLASTともいえる。

これらをもとに以下のような世界各地との共同研究を推進した。

- ・ C.elegansのunc-32遺伝子がV-ATPaseの α サブユニットのアイソフォームをalternative splicingで産生することと組織特異的な機能をもつことを明らかにした (論文3)
- ・ OST (open-reading-frame sequence tag) 解析により少なくとも17300のC.elegans予測遺伝子の発現を確認した。 (論文5)
- ・ 生物間で保存されたRNA heliaseであるC.elegans cgh-1遺伝子は配偶子形成に必要であり、卵巣で発達過程の卵母細胞のアポトーシスを阻害することに働いていることを明らかにした。 (論文6)
- ・ cDNAマイクロアレイを用いたcDNAサブトラクションとRNAiを組み合わせたスクリーニングによりC.elegansの生殖腺発生に働く遺伝子群を同定した。 (論文7)
- ・ C.elegansの介在神経分化の細胞運命決定をコントロールする3つのホメオボックス遺伝子ceh-10, ttx-3, ceh-23からなる調節カスケードを明らかにした。 (論文8)
- ・ mRNA cap結合タンパク質であるeIF4Eのアイソフォームは生殖顆粒の構成物であり、C.elegansの精子形成に働いていることを明らかにした。 (論文9)
- ・ C.elegansのTGF- β リガンドであるDBL-1はpolyploidizationと体長を制御するPR-relatedタンパク質であるLON-1の発現を調節していることを明らかにした。 (論文11)
- ・ cDNAマイクロアレイを用いて、グラム陰性菌Serratia marcescensのC.elegansへの感染により誘導される遺伝子群を明らかにし、他の生物で免疫応答に関与するlectinやlysozymeなどが含まれることがわかった。これらはDBL-1/TGF β パスウェイで制御され、lysozymeの過剰発現は菌への抵抗性を上昇した。C.elegansにおける自然免疫ともいえる誘導性の抗菌防御の最初の報告である。 (論文12)
- ・ 癌抑制遺伝子VHLに結合する新規タンパク質VBP-1について、RNAi解析により、C.elegansの形態形成に働いていることを明らかにした。 (論文14)
- ・ cDNAマイクロアレイを用いてC.elegansをステロイドホルモンに暴露した際に誘導される遺伝子群を同定した。 (論文17)
- ・ RING-H2フィンガータンパク質RBX1がC.elegansの減数分裂、有糸分裂における染色体凝縮と分離、及び細胞質分裂に必要であることを示した。 (論文19)
- ・ C.elegansにおけるヒトSARMのオルソログTIR-1 (TIRドメインアダプタータンパク質) によるTLR (Toll-like

receptor) には依存しない自然免疫シグナル経路を見出した。 (論文20)

・ nfi-1 (Nuclear Factor 1) はC.elegansの行動と寿命に関わるがDNA複製過程には必須ではないことを見出した。 (論文25)

・ cDNAマイクロアレイを神経細胞など少数の特異的な細胞に応用するためにpolyA テールのtargeted pull-down法を開発し、繊毛感覚神経特異的な遺伝子群を同定した。 (論文23)

3) 母性発現遺伝子の体系的RNAi

線虫は不等卵割を含む卵割を繰り返し、母性遺伝子産物の局在やそれによって引き起こされる細胞間相互作用によって、運命の異なった細胞を生じる。この過程は多くを母性遺伝子に依存している。しかし、母性で発現する遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子を含み全遺伝子の半分を占める。そこで、このうち「2細胞期から原腸陥入開始期までにその発現が消失あるいは局在する遺伝子群」に注目した。経験上、胚発生に重要な役割をもつ遺伝子はこのような発現をすることが多いからである。約5000遺伝子の発現解析が行われた時点でこのクラスに分類された477遺伝子についてRNAi (RNA mediated interference)による機能解析を行った。具体的には標準N2株に各遺伝子の2本鎖RNAを顕微注入し、注した親虫、F1胚、孵化した幼虫(escaper)の成長、生殖能、形態等の表現型観察を行った。その結果、65%という高率で表現型が見られた。5%にF1数の減少、33%にF1胚致死、27%にescaperのみでの異常であった。強いF1胚致死を示す61遺伝子について4D顕微鏡で詳細に調べた結果、受精/最終減数分裂から8細胞期までの時系列での異常に分類できた。

そのうち最も早期の異常である「受精後分裂なし」の12遺伝子のうち6遺伝子はプロテアソーム関連遺伝子であった。線虫では20Sプロテアソームとして14遺伝子、19S複合体として19遺伝子が予測されており、これらのうち、われわれのライブラリーに存在するが上記5000遺伝子に含まれていなかったものについて調べたところ、類似の母性発現を示し、RNAi実験では受精卵は全く分裂が観察されず、減数分裂の途中で停止が示唆された。プロテアソームは他生物で卵母細胞成熟や受精に関与していることが明らかにされており、線虫における機能解析を進めた。

また、班員の杉本亜砂子のグループと共同で分類済みcDNAの最初の2500種をsoaking RNAiにより解析した。 (論文4、及び杉本の項参照)

4) NEXTDBデータベースへの統合

線虫C.elegansは、受精卵から成虫までの全細胞系譜が明らかにされており、また約100Mbのゲノムの全塩基配列が既に決定されているため、ゲノムから個体発生へ至る経路を解析するのに最も適した系である。このため我々はC.elegansの各遺伝子の発現パターンを、全発生過程にわたって系統的に解析してきた。約13万のcDNAクローンより取得したEST配列を分類することで同定した約12,000遺伝子、うち約10,000遺伝子のin-situ hybridization画像およびその発現パターンによる分類結果、系統的な抗体作成/染色によるタンパク発現パターン、体系的なRNAiによる遺伝子機能破壊の表現型などを統合したデータベース NEXTDB (Nematode EXpression paTtern Data Base) を構築し、以下のURLより公開してきた (図8)。データ総容量は123Gbytesに上

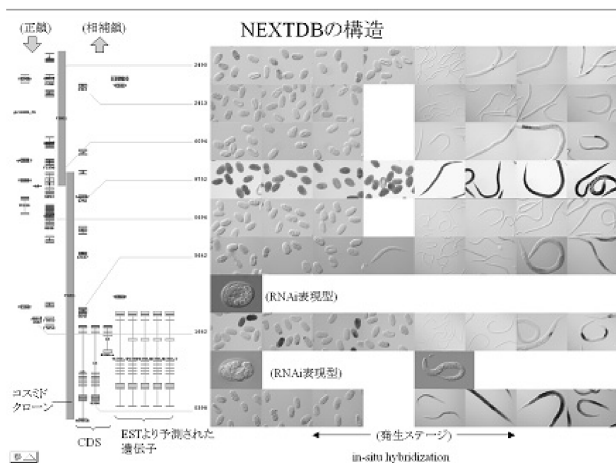


図8. NEXTDB

っている。

<http://nematode.genes.nig.ac.jp>

5) 発現クラスタリング、調節領域の解析 クラスタリング解析

遺伝子の半数は母性発現であったが、残りは発生開始後にmRNAが見られる、いわゆる胚性発現である。これらは時間的空間的な発現制御を受けており、発現制御システムの抽出のためには、共通の制御を受ける遺伝子群の抽出と制御領域の比較が必要であるので、発現パターンデータのクラスタ解析をおこなった。約7000遺伝子のデータを、まず因子分析を行った結果、発現時期（時間軸）と発現細胞（空間軸）にそって54クラスターに分類された。これをさらにワード法で詳細なクラスタリング解析をおこなった。最大のクラスターは腸系譜に関わるものであった。この系譜は6細胞期のEという1個の細胞に由来するが、さらに細分すると、E細胞が分裂して腸に分化する時系列で少しずつずれて時期特異的に発現（この場合は転写）開始するものに分類された（図9）。興味深いことに、解析データに含まれていたリボゾームタンパクの9割以上が腸系譜で中期胚から発現が開始するグループに含まれていた。タンパクとしては全ての細胞に存在するものであり、転写が特定細胞の特定時期に一斉に開始するのは意外ではあるが、リボゾームという構造体の構成成分が共通制御を受けるのは理にかなっている。これを含め種々の組織、細胞系譜で発現制御を受けている遺伝子群について上流配列1000bpを切り出し、様々な手法により共通配列（モチーフ）の探索を進めて

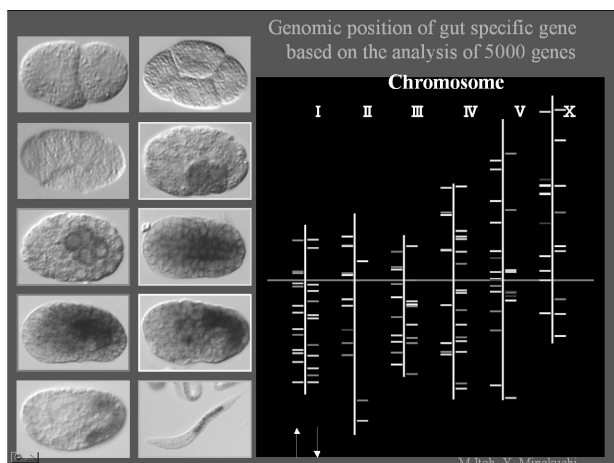


図9. 腸系譜細胞で時間順に発現開始が見られる遺伝子

いる。候補モチーフについてはGFPレポーターコンストラクトの導入などにより実験的検証を進めている。

細胞特異的エンハンサーの系統的解析

遺伝子の特異的発現はどのようなメカニズムによって制御されているのか？本研究では、線虫*C. elegans*で細胞特異的に発現する多数の遺伝子の調節領域を解析し、その発現の細胞特異性を制御する転写調節機構の解明をめざした。

線虫においては、特定の細胞で発現する遺伝子が数多く報告されている。同一の細胞で発現する遺伝子群の中には、同じ転写因子(群)によって制御を受ける遺伝子が存在すると考えら、これらは共通の調節配列を持つ可能性が高い。そこで、特定の細胞(特に感覚神経細胞)で発現している遺伝子を多数集め、これら遺伝子の調節領域を系統的に欠損させた配列とGFP遺伝子とを持つレポーターDNAを線虫に導入し、その発現パターンを*in vivo*で観察することにした。この方法によって細胞特異的な発現に最小限必要な領域を絞り込み、これらを比較することによって個々の細胞での発現を制御する調節配列を同定する。

我々はまず、温度受容神経AFDに特異的な発現を行う遺伝子群について解析を行った。その結果、現在までに、ホモボックス型転写因子*ceh-14*、グアニル酸環状化酵素*gcy-8*、核受容体型転写因子*nhr-38*、および7回膜貫通型受容体*srq-6*のAFDでの特異的発現を制御する領域が、それぞれ上流0.7kb、0.1kb、0.2kb、1kbであることを明らかにした。また、細胞特異的発現のための制御領域は比較的小型で、一ヶ所に固まって存在していること、特異性を決めるためには負の転写制御機構が重要な役割を果たすことが示唆された。

6) 様々な遺伝子機能の研究

母性 mRNA の翻訳調節における POS-1 と SPN-4 の役割
線虫*C. elegans*の卵は受精後不等分割をおこない、体細胞系創始細胞の前割球ABと生殖系列の後割球P1を生じる。これら割球およびその子孫細胞の運命決定には卵割に伴って局在化する母性因子（いわゆるデターミナント）が重要な働きをしていることが示唆されている。この時母性 mRNA の翻訳調節が重要であることが知られている。glp-1 遺伝子（Notch ホモログ）の母性 mRNA 全割球に様に分配されるが、2 細胞期の前側割球ABでのみ翻訳され、4 細胞期には前側 2 割球（ABa, ABp）の細胞膜に局在する（図10）。同様に後側割球P2でのみ翻訳される apx-1 遺

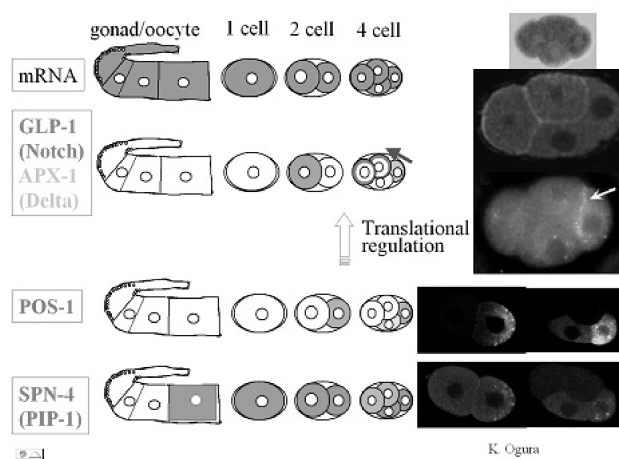


図10. 翻訳制御の例（glp-1, apx-1 遺伝子）

伝子 (Deltaホモログ) とシグナル伝達をおこない、本来等価であったABa, ABpのうちP2と接触したABpの運命を変える。この $glp-1$ mRNAの翻訳制御は369塩基長の3'-UTRを介しておこなわれ、その中央部の66塩基長領域 (SCR) が空間的制御、そのうしろ125塩基領域 (TCR) が時間的制御に重要であることが知られている。

われわれはCCCH Zinc fingerタンパクである母性遺伝子 $pos-1$ タンパクが $glp-1$ SCRに結合して、 $glp-1$ の翻訳を負に制御していることを、 $pos-1$ 変異体での $glp-1$ タンパクの発現解析と $pos-1$ タンパクと $glp-1$ 3'-UTR間のTri-hybrid解析をおこない、明らかにした。さらに、 $pos-1$ と相互作用する遺伝子をTwo-hybrid解析で探索し、RNPタイプRNA結合ドメインをもつ $spn-4$ 遺伝子を同定した。 $spn-4$ タンパクは $pos-1$ タンパクより早く卵母細胞から発現があり、2細胞期以降の後側割球の細胞質で $pos-1$ タンパクと分布が重なる。 $glp-1$ mRNAの翻訳への役割を調べた結果、 $pos-1$ とは反対に $spn-4$ は正に制御しており、TCRの一部に結合することがわかった。これらの結果から、前後細胞でのPOS-1/SPN-4の濃度の違いで $glp-1$ mRNAの翻訳をfine tuningしている機構を提唱した (図11)。(論文18)

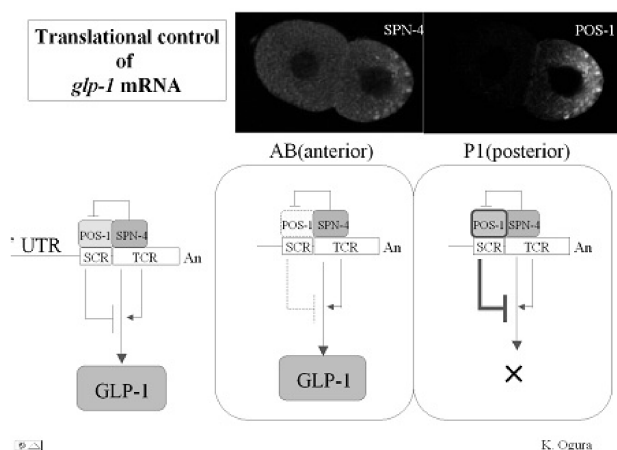


図11. POS-1, SPN-4による $glp-1$ mRNAの翻訳制御機構

NT-1—Wntシグナルと細胞の非対称分裂を仲介するRUNX転写因子 $rnt-1$ の機能解析

線虫 $C. elegans$ の $rnt-1$ 遺伝子は、急性骨髄性白血病、胃癌などのヒトの重要疾患の原因となるRUNX遺伝子族に属する転写因子である。哺乳類のRUNX遺伝子族については、その臨床的重要性からこれまでも多数の報告がなされているが、生体内での役割があまりに多様で複雑なため、未だ分子機能についての統一した見解が得られていなかった。

これに対して我々は、線虫 $C. elegans$ において $rnt-1$ 遺伝子の解析を行い、これがH0-2、V1-6、T細胞と名付けられた一連の幹細胞で発現していることを示した。我々はこれらの幹細胞の中から特にT細胞に注目して解析を行い、 $rnt-1$ がT細胞の非対称分裂を制御していることを明らかにした。この細胞の非対称分裂は、Wntシグナルによって制御されていることが判明しているが、我々は、 $rnt-1$ の異常がWntシグナルの伝達を阻害し、逆にWntシグナル伝達分子LIN-44/Wnt、LIN-17/Frizzledが $rnt-1$ の発現に影響を与えることを示した (図12)。(論文24)

哺乳類においてRUNX遺伝子の異常によって影響を受ける組織はいずれも、成体においても増殖を続ける幹細胞を持つことが知られており、実際に、RUNX1による白血病の場合、幹細胞からの分化阻害と、未分化細胞の増殖亢進に起因することが判明している。また、血球の

増殖・分化の制御にはWntシグナルが重要な役割を果たしていること、さらにRUNX1がこのシグナルの伝達に必須の転写因子であることから、線虫のT幹細胞の非対称分裂と、ヒトの血球の増殖・分化との間に深い関連があることが示唆された。

これまでの解析によって我々は、「Wntシグナル→RUNX→細胞の非対称分裂」という情報の流れが、線虫からヒトに至る生物で保存されていることを見出した。現在、RUNX遺伝子族の本質的な機能は幹細胞の非対称分裂制御にある、という作業仮説を設定し、さらなる研究を進めている。

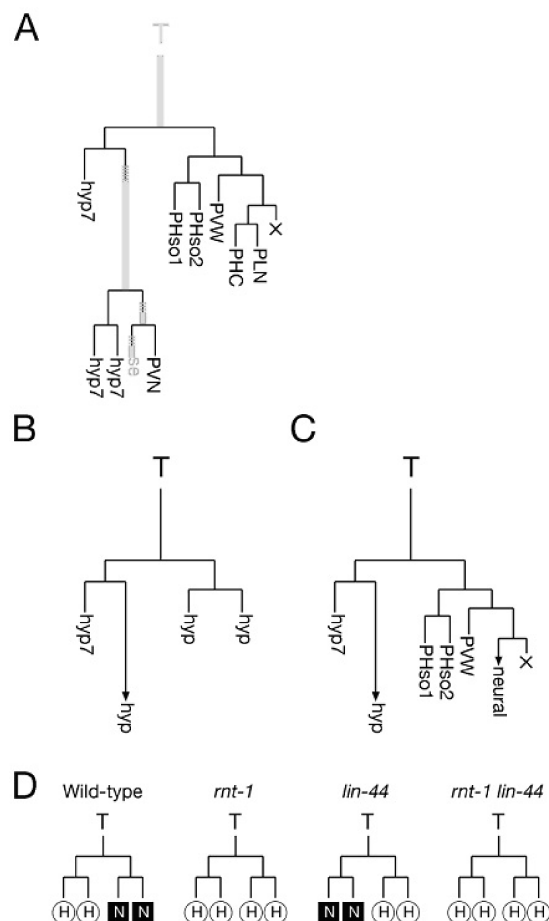


図12. T細胞系譜。

A:野生型、B,C: $rnt-1$ 変異体の細胞系譜、D:野生型、 $rnt-1$ 、 $lin-44$ の場合の系譜の模式図 (H:上皮、N:神経)

Polo様キナーゼPLK-1の機能解析

$C. elegans$ の初期胚発生においては一連の非対称分裂によって様々な細胞系譜が形成される。これらの非対称分裂は胚の前後軸にそって行われる。従って初期胚の細胞における前後軸方向の細胞極性は多様な細胞をつくり出すために重要である。特に一細胞期における細胞極性は胚の前後軸全体を形成する為、非常に重要である。一細胞期胚の前後方向の細胞極性の成立はPARタンパク質およびMEX-5タンパク質を必要とする。これらのタンパク質の非対称的な局在が多様な細胞系譜の形成に重要である。

我々は $C. elegans$ のPolo様キナーゼであるPLK-1がPAR-1の非対称的な局在および、MEX-5および生殖細胞系譜の運命決定に関わるタンパク質であるPIE-1の非対称的な局在の維持に必要である事を明らかにした。

Polo様キナーゼは真核生物において広く保存された

ser/thrプロテインキナーゼであり、細胞周期の進行の様々な側面に関わっている事が知られている。しかしながらPolo様キナーゼの発生における役割は全く知られていない。

plk-1に対するRNAiは一細胞期胚において偽分割の終了後に本来後極に局在すべきP granuleの顆粒の細胞質全体への分散、および本来それぞれ前側および後側に局在すべきMEX-5およびPIE-1の細胞全体への拡散を引き起こした。plk-1へのRNAiはまた偽分割の終了後にMEX-5およびPIE-1の細胞質全体に分散したP granuleへの局在を引き起こした。さらに、後極の細胞表層に局へのPAR-1の局在がI胚では見られなくなっていた。これらの結果からPLK-1は細胞極性の確立および維持の両方に必要であると考えられた。

PLK-1は一細胞期胚において前側細胞質に局在し、より後期の胚では体細胞系譜の細胞の細胞質および生殖細胞系譜の細胞のP granuleに局在した。興味深いことにPLK-1の1細胞期における正常な局在にはPARタンパク質、MEX-5およびPIE-1が必要であった。従ってPLK-1とMEX-5、PIE-1は互いに互いの局在を制御しあっており、細胞極性を維持する上でフィードバックループを作っていると考えられる。

線虫母性mRNA翻訳制御におけるpoly(A)鎖伸長の役割

初期胚発生に関わるタンパク質の多くは、卵形成期に転写されたmRNAの胚での選択的翻訳により作られる。線虫*C. elegans*で母性発現するNotchホモログglp-1は、2細胞期の前側細胞ABに由来する系譜の細胞運命決定に関わり、mRNAが両方の細胞に受け継がれるのに対し、翻訳はAB細胞のみで開始される。この翻訳制御はmRNA 3'側非翻訳領域(3'UTR)により担われており、卵形成期から1細胞期までの翻訳を抑えるTemporal Control Regionと、後方細胞P1での翻訳を抑えるSpatial Control Regionが見出されている。この翻訳制御を担う因子として、GLD-1がこれらの時期を通じた翻訳抑制に、またPOS-1がP1細胞での翻訳抑制に、そしてSPN-4がAB細胞での翻訳活性化に必要である。mRNA翻訳制御におけるpoly(A)鎖の役割については様々な生物で解析されているが、相反する実験結果があり結論に至っていない。我々はこれまでに、glp-1 mRNAのpoly(A)鎖長を測定し、卵母細胞ではpoly(A)鎖は約40塩基と短く、P1細胞でも70塩基程度であったのに対し、AB細胞では160塩基まで伸長していることなど、GLP-1翻訳とpoly(A)鎖長の相関関係を見出してきた。

この関係をさらに調べるために、翻訳パターンが変化する変異体で測定したところ、pos-1変異体の2細胞期胚には約150塩基のpoly(A)鎖を持つmRNAがあるのに対し、spn-4変異体では長くても30塩基のものしかなかった。この結果は、glp-1 mRNA翻訳活性化とpoly(A)鎖伸長の関係を強く示唆している。そこで次に、lacZレポーター配列にglp-1 3'UTRとpoly(A)鎖をつないだ合成mRNAを生殖腺にマイクロインジェクションしその翻訳パターンを見る実験を行なった。通常使用する30塩基のpoly(A)鎖を繋いだ合成mRNAは、内在性glp-1 mRNAと同じ翻訳制御が見られた。この合成mRNA poly(A)鎖長を150塩基としたところ、生殖腺や卵母細胞においてlacZ活性が認められ、一方初期胚ではAB細胞系譜のみlacZ活性が認められた。このことは、生殖腺や卵母細胞では抑制されていた翻訳が長いpoly(A)鎖により活性化することを示唆している。一方初期胚では翻訳制御タンパク質が代わることから、poly(A)鎖伸長だけでは不十分な翻訳制御の可能性や、

合成mRNAのpoly(A)鎖長の変動などの可能性があり、これらについて検討を進めている。

6) 細胞の形状を力学モデル化の試み

物理モデルを用いた線虫初期胚の細胞配置シミュレータの構築

細胞配置は、発生過程において重要な役割をはたしている。線虫*C. elegans*の初期発生過程では、細胞配置によって空間的に制限された細胞間相互作用のために細胞の運命が決定されることが知られている。例えば、4細胞期のABp割球はP2割球と接触することによって初めてABp固有の細胞運命が決定される。線虫は卵から成虫までの全細胞系譜が調べられており、その細胞系譜や細胞配置は非常に再現性である。一方、個々の細胞は状況に合わせてダイナミックに変形したり、動くことができる。ダイナミックな発生過程にも関わらず一定の細胞配置が再現されるのは、細胞が持つ力学的特性が大きく関わっていると考えられる。

そこで本研究では、細胞の形状を力学モデルによって構成し、細胞分裂にともない細胞配置が決定される現象を再現するシミュレータの構築を試みた(図13)(論文15、16)。本シミュレータは、(1)細胞の形状を質点のメッシュ状の袋としてモデル化、(2)体積を一定に保つ、そして細胞形状を保つルールを導入、(3)細胞分裂を紡錘体構造による細胞伸長・収縮環の収縮による細胞質分裂という二つの現象で構成、(4)卵殻による細胞移動の制限の導入、以上により実装した。このためにわれわれは、細胞配置を再現するシミュレータを構築し、野生型と1細胞期での変異体のシミュレーションを行い検証し、野生型の26細胞期までのシミュレーションを行い検証した(図14)。

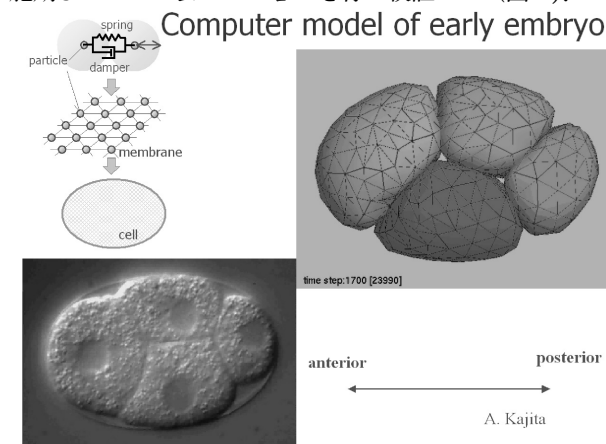


図13. 初期胚のコンピュータモデル。

Simulation up to 26-cell stage

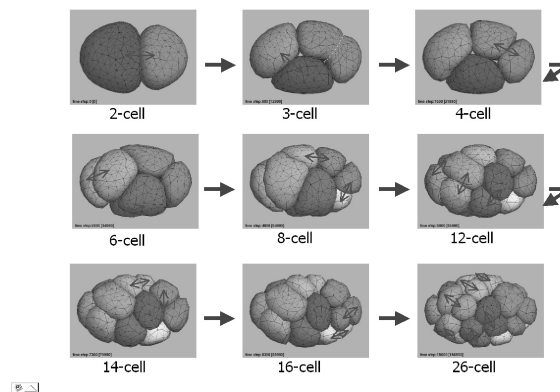


図14. 26細胞期（原腸陥入開始時）までのコンピュータシミュレーション

ついで、紡錘体に働く力と細胞膜に働く力がどのように初期胚における不等分裂と細胞配置を決定しているのかを、これまで開発した紡錘体のシミュレーションと細胞膜・細胞質のシミュレーションを組み合わせることで検証を行う。まず1細胞期での紡錘体の運動に対して逆動力学計算に基づいた解析を行った。最初に、1細胞期の紡錘体形成から細胞分裂後期までの時系列画像を用いて、画像処理によって紡錘体の両端（中心体）とその中心の変位、そして紡錘体の向きを測定した。その変位を逆動力学計算して紡錘体に働く力とトルクを推定した。この解析によって、1細胞期での紡錘体の振動運動は一様に分布したランダムな力によるのではなく、胚の前側と後ろ側に指向性のある力によって起きていることがわかった。次に、推定された紡錘体に働く力とトルクは紡錘体に働くすべての力の合力を表しているの、紡錘体に働く力の発生機構と考えられるいくつかのモデルに対してシミュレーションを行う。現在はモデルの検証を行っているところである。

今後は、1細胞期では細胞膜の移動を考慮する必要がなく紡錘体だけの運動に注目できたが、2細胞期以降は紡錘体と細胞の移動を考慮する必要があるの、細胞膜・細胞質のモデルと組み合わせることによってどのような力が働いて細胞配置が決定されるのかを検証していく予定である。

線虫胚発生における細胞形状モデルの半自動生成システム

線虫 *C. elegans* は、透明で細胞数が少ないため、発生の過程を詳細に観察することができる優れた系である。発生においては細胞間相互作用が重要な役割を果たすので細胞の形状・配置・隣接関係の把握が非常に重要である。当研究室では、線虫の初期発生の時系列3次元微分干涉顕微鏡画像から各細胞の形状のポリゴンモデルを作成し、初期発生における遺伝子発現調節モデルや卵割の力学モデルを構成するための基礎データとして、あるいは様々なタンパク質の抗体染色像と重ね合わせて局在を同定するための鋳型として利用してきた。しかし、微分干涉画像から細胞境界を自動的に抽出することは極めて困難であるため、このポリゴンモデルの構築には、画像上で各細胞の輪郭を手作業によりトレースする、ということを経ざるを得ず、作成には多くの時間と労力が必要であった。

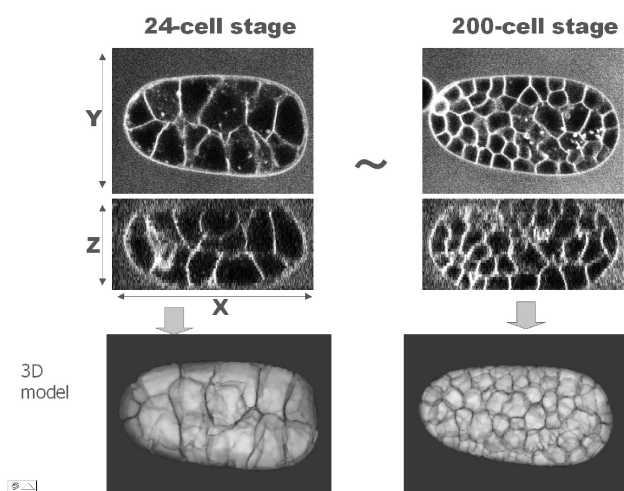


図15. 膜蛍光標識胚から3次元モデルへ

そこで本研究では、細胞膜を蛍光染色して共焦点顕微鏡で観察した時系列3次元画をもとに、計算機を用いて自動的に細胞モデルを構築するシステムの開発を進めてきた（図15）。具体的には、3次元画像上における領域拡張法により細胞形状を抽出するプログラムと、画像の距離変換フィルタを用いて各領域の種（たね）にする点の候補を抽出するプログラムを作成し、24–200細胞期の画像データに応用した結果、各時期の細胞の形状モデルを生成することに成功したが、作成した4次元（3次元+時間軸）の形状データは、そのままでは膨大なため全体を把握することが難しい。そこで、各細胞の重心の座標や、細胞間の境界面をそれぞれ一つの平面で近似したときの法線の向きなどを計算し、それらを用いて例えば細胞の変形を境界面の移動と回転の量で表現されるモデルに単純化した。その結果、細胞の形状・配置・隣接関係とその変化に関する数値情報を、データベースに格納して検索し、さらに統計処理を行うことが可能となった（図16）。今後さらに自動化や改善を進め、近縁種やRNAi等による変異体の間の比較に応用する予定である。

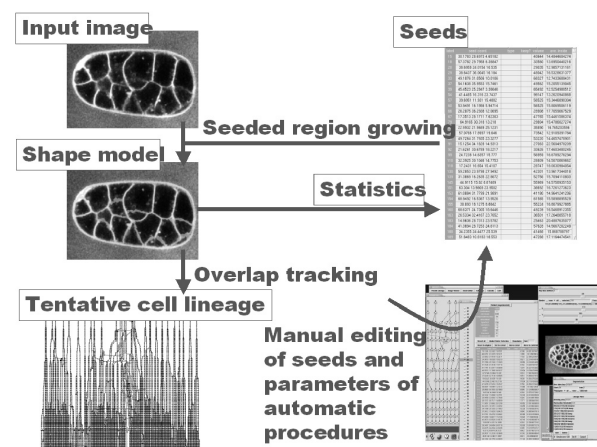


図16. 半自動の膜蛍光標識胚から3次元モデル作成の流れ

線虫 *C. elegans* 初期胚の4次元遺伝子発現データベースの構築へむけて

ゲノムプロジェクトや発現パターン解析プロジェクトの究極の目標のひとつが発生過程のコンピューターシミュレーションである。*C. elegans* はこの目標に最も適した材料であり、世界の各地でこれに向けた試みがおこなわれているが、われわれの発現パターン解析プロジェクトの結果を取り込めるように、胚発生過程のコンピューターグラフィックス（CG）化、その上に遺伝子発現パターンの重

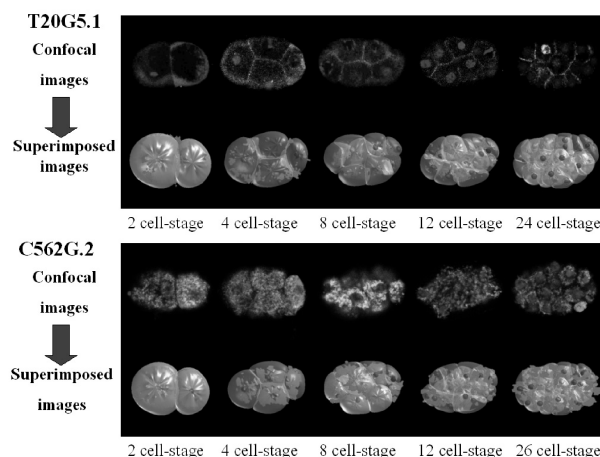


図17. 4次元遺伝子発現データベース構築

ね合わせの試みをおこなった。発生過程を正確に表現したCGを作るために、いわゆる4D画像（発生の様子を一定の時間間隔でノマルスキー微分干渉顕微鏡で焦点の段階的变化による光学的切片像を多数とったもの。プレイバックすることにより発生過程を再現できる）の元画像を用いて細胞と核の輪郭をトレースし3次元再構成をおこない、さらに次の像との間で補間をおこない44細胞期までCG化した。さらに、この上に母性遺伝子や極初期の接合体型遺伝子の発現パターン（共焦点顕微鏡による3DのmRNAの分布、蛋白の分布）を重ね合わせる仕組（SPIシステム）を開発した（図17）。重ね合わせのマーカーにはPOS-1タンパク（P1-P4）とDAPI染色（すべての核）を用い、調べたい遺伝子産物をもう1色の蛍光で染めて、3重標識にしてCGと重ねるものである。これまでに、*skn-1*、*glp-1*、*mex-3*などの多数の母性遺伝子の発現結果をCGデータベースに重ね合わせて取り込んだ。（論文21）

7) 近縁線虫の比較ゲノム解析

発生過程の多様性および可塑性に関して比較解析することはそれぞれの遺伝子システムの比較となり、そこから逆に発生の遺伝子システムの原理的な構造が得られる期待がある。そこで、原腸陥入までの卵割およびその配置が異なる近縁の線虫 *Diploscapter coronatus*（ケルン大学Einhard Schierenbergより供与、図18）についてESTおよびゲノム解析を行った（図19）。7万のcDNAクローンより取得したEST配列は10,000クラスタに分類され、うち5,800種に*C.elegans* のホモログが見出された（図20）。また、全ゲノムショットガン法により100Mbpの高クオリティゲノム断片配列を取得し、PCAPを用いてアセン

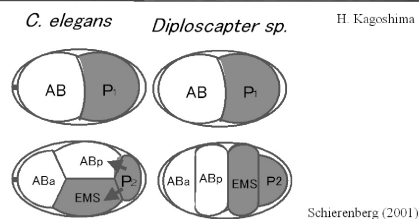


図18. *C.elegans*(左) と近縁線虫*D.coronatus* (右) の初期卵割

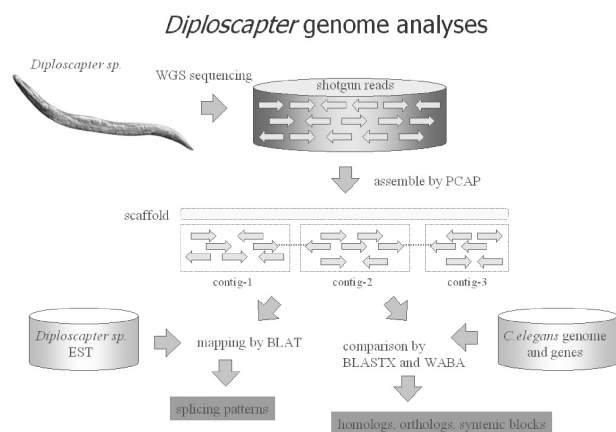


図19. 近縁線虫*D.coronatus*の比較ゲノム解析の流れ

ブルした。得られた総延長66Mbpのscaffoldを*C.elegans* ペプチド配列と比較することで、さらに650種のホモログを見出した。また、scaffoldとESTの詳細な比較により、選択的スプライシングと考えられる例が見出された。これらすべての結果はNEXTDB上に統合され、相互参照可能である。

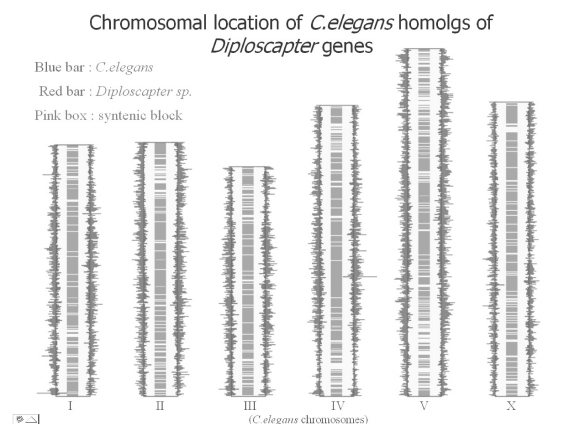


図20. *C.elegans*ゲノム上への*D.coronatus*のホモログのマップ

〈国内外での成果の位置づけ〉

- ・*C.elegans*の発現パターン情報としては内外で随一であり、世界のセンターとして機能した。
- ・発現パターンをベースに初期胚で重要な遺伝子を見出し、翻訳制御ネットワークにつなげられたことは大きい。
- ・コンピュータモデル化や測定技術などにおいて人材育成が進んだ。今後に期待したい。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初目標に対して：

- 1) 全遺伝子構造解明の目標についてはcDNAからの限界があり100%は達成できていない
- 2) 全生涯の発現パターン解明については、得られた遺伝子については達成できた。ただし、研究コミュニティから要望があった雄でのパターンは技術的な問題から達成できなかった。
- 3) 遺伝子タンパク質の局在解析については、システムティックなアプローチについては他経費のプロジェクトで遂行したので本報告には載せなかった。
- 4) 体系的なRNAiによる機能解析については、発現パターンベースで効率的な解析を進めることはできたが、表現型の分類、データベース化、そこからの解析が技術的に困難であり、今後に残された。
- 5) 統合データベース化についてはNEXTDBで達成したが、WormBaseとのリンクが遅れた。また表現型記述の英語化が、後の計算機処理との整合性をとるために遅れた。
- 6) 計算機モデル化は一定程度進行したが、突然変異体による検証が今後の課題として残った。
- 7) 近縁種の比較ゲノム解析については、近縁線虫は一般に増殖が遅く、試料準備に予想外の時間がかかったために進行が遅れた。また、2本鎖RNA導入によるRNAiが効かないあるいは効が悪いことがあり、機能比較が今後の課題として残された。

〈今後の課題〉

- ・遺伝子ネットワーク解析や調節領域探索については体系的な解析だけでなく個別の解析が必要であり、今後

残された。

・比較ゲノム解析ではRNAiのためにsiRNAの設計など機能比較に向けた技術整備が課題である。また、線虫ではマウスやショウジョウバエのような遺伝子入れ替えが困難であり、比較システム解析に向けた技術開発が必要である。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

- 1) 0603201150
Cassata, C., Kagoshima, H., Andachi, Y., Kohara, Y., Durenberger, M.B., Hall, D.H., and Burglin, T.R.: The Lim Homeobox Gene *ceh-14* Confers Thermosensory Function to the AFD Neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 25, 587-597 (2000)
- 2) 0603201330
Asahiha, M., Ishihara, T., Jindra, M., Kohara, Y., Katsura, I. and Hirose, S.: A member of the ancient nuclear receptor class Ftz-F1 is required for embryogenesis, molting and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* 5, 711-723 (2000) .
- 3) 0202282001
Nathalie Pujol, Claire Bonnerot, Jonathan Ewbank, Yuji Kohara and Danielle Thierry-Mieg: The *C. elegans* *unc-32* gene encodes alternative forms of the 100-kDa α subunit of Vacuolar-ATPases. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, Issue 15, 11913-11921, April 13, 2001
- 4) 0111251912
Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., and Sugimoto, A. (2001) . Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*, 11 No.3, 171-176.
- 5) 0111251913
Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-I, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Lee, H., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Hartley, J., Temple, G., Brasch, M., Vandenhaute, J., Lamesch, Pl., Hill, D. & Vidal, M.: Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C.elegans*. *Nature Genetics*, 27, 332-336 (2001)
- 6) 0111251915
Rosa E. Navarro, Eun Yong Shim, Yuji Kohara, Andrew Singson and T. Keith Blackwell: *cgh-1*, a Conserved Predicted RNA Helicase Required for Gametogenesis and Protection from Physiological Germline Apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128: 3221-3232 (2001)
- 7) 0202051940
Momoyo Hanazawa, Makoto Motii, Naoto Ueno, Yuji Kohara and Yuichi Iino: Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8686-8691 (2001) .
- 8) 0111251916
Zeynep Altun-Gultekin, Yoshiki Andachi, Ephraim L. Tsalik, David Pilgrim, Yuji Kohara and Oliver Hobert: A regulatory cascade of three homeobox genes, *ceh-10*, *ttx-3* and *ceh-23* , controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C.elegans*. *Development* 128, 1951-1969 (2001)
- 9) 0202282002
Amiri, A., Keiper, B.D., Kawasaki, I., Fan, Y., Kohara, Y., Rhoads, R.E., Strome, S.: An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* 128, 3899-3912 (2001) .
- 10) 0603201340
Morino K, Katsumi H, Akahori Y, Iba Y, Shinohara M, Ukai Y, Kohara Y, Kurosawa Y.: Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. *J. Immunol Methods*. 2001 Nov 1;257(1-2) :175-84.
- 11) 0202282003
Kiyokazu Morita, Anthony J. Flemming, Yukiko Sugihara, Makoto Mochii, Yo Suzuki, Satoru Yoshida, William B. Wood, Yuji Kohara, Armand M. Leroi, and Naoto Ueno: A *C. elegans* TGF- β , DBL-1, controls the expression of LON-1, a PR-related protein, that regulates polyploidization and body length. *EMBO J.* 21, 1063-1073 (2002)
- 12) 0305051625
Gustav V. Mallo, C. Leopold Kurz, Carole Couillault, Nathalie Pujol, Samuel Granjeaud, Yuji Kohara and Jonathan J. Ewbank: Inducible Antibacterial Defence System in *C.elegans*. *Current Biology* 12, 1209-1214 (2002)
- 13) 0603201345
Jun Iwahashi, Ichiro Kawasaki, Yuji Kohara, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Yasumi Ohshima, Nobuyuki Hamada, Koyu Hara, Takahito Kashiwagi and Tetsuya Toyoda: *Caenorhabditis elegans* reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis. *BBRC* 293, 698-704 (2002) .
- 14) 0305051627
Harumi Ichimiya, Okio Hino, Yuji Kohara and Naoaki Ishii: VBP-1 is necessary for morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Oncology Reports* 10, 293-295 (2003) .
- 15) 0305051629
Atsushi Kajita, Masayuki Yamamura and Yuji Kohara: Computer Simulation of the Cellular Arrangement in Early Cleavage of the Nematode *C. elegans*. *Bioinformatics* 19, no6, 704-716 (2003) .
- 16) 0305051634
Atsushi Kajita, Masayuki Yamamura and Yuji Kohara: Physical Modeling of the Cellular Arrangement in *C. elegans* Early Embryo: Effect of Rounding and Stiffening of the Cells. *Genome Informatics Workshop 2002*, 13, 224-232 (2002) .
- 17) 0603201350
Matsuno, T., Ura, K., Sonoda, R., Kohara, Y., Uesugi, H., Arizono, K., Iguchi, T and Tominaga, N.: Sensing of chemical substances using gene expression patterns in *Caenorhabditis elegans*. *Sensors and Materials*, 14 No7, 395-406 (2002)
- 18) 0305051631
Ken-ichi Ogura, Norihito Kishimoto, Shohei Mitani, Keiko Gengyo-Ando and Yuji Kohara: Translational control of maternal *glp-1* mRNA by POS-1 and its interacting protein SPN-4 in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 130, 2495-2503 (2003) .

- 19) 0312041524
Yohei Sasagawa, Takeshi Urano, Yuji Kohara, Hideyuki Takahashi and Atsushi Higashitani: *Caenorhabditis elegans* RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes to Cells*, 8, 857-872 (2003)
- 20) 0401041627
Carole Couillault, Nathalie Pujol, Jérôme Reboul, Laurence Sabatier, Jean-François Guichou, Yuji Kohara and Jonathan J. Ewbank: TLR-independent control of innate immunity in *C. elegans* by the human SARM homolog, TIR-1, a TIR-domain adaptor protein. *Nature Immunology*, 5, 488 - 494 (2004)
- 21) 0401041634
Yohei Minakuchi, Masahiro Ito and Yuji Kohara: SPI: A tool for incorporating gene expression data into a four-dimensional database of *C. elegans* embryogenesis. *Bioinformatics* 20,1097-1109 (2004)
- 22) 0312041530
Motoko Sato, Kayoko Moroi, Mariko Nishiyama, Jing Zhou, Hirokazu Usui, Yoshitoshi Kasuya, Mitsunori Fukuda, Yuji Kohara, Issei Komuro, Sadao Kimura: Characterization of a novel *C.elegans* RGS protein with a C2 domain: evidence for direct association between C2 domain and G-q subunit. *Life Sciences* 73, 917-932 (2003) .
- 23) 0503200005
Hirofumi Kunitomo, Hiroko Uesugi, Yuji Kohara, and Yuichi Iino: Identification of ciliated sensory neuron-expressed genes in *Caenorhabditis elegans* using targeted pull-down of poly(A) tails. *Genome Biol.* 6(2) , R17 (2005)
- 24) 0602111726
Hiroshi KAGOSHIMA, Hitoshi SAWA, Shohei MITANI, Thomas R. BÜRGLIN, Katsuya SHIGESADA and Yuji KOHARA: The *C. elegans* RUNX transcription factor MAB-2/RNT-1 is required for asymmetrical cell division of the T blast cell. *Developmental Biol.* 287, 262-273 (2005)
- 25) 0602111806
Elena Lazakovitch, John M Kalb, Reiko Matsumoto, Keiko Hirono, Yuji Kohara, Richard M Gronostajski: nfi-1 affects behavior and life-span in *C. elegans* but is not essential for DNA replication or survival. *BMC Developmental Biology*, 5:24 (2005)

データベース公開

・ NEXTDB (Nematode Expression Pattern DataBase)

URL: <nematode.lab.nig.ac.jp>

線虫*C.elegans*のESTプロジェクト、体系的in situハイブリダイゼーション、RNAiの表現型、抗体染色など当研究室から生み出された情報のデータベース。