

## 体系的遺伝子機能破壊による線虫ゲノムの機能解析

●杉本 垂砂子

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

### 〈研究の目的と進め方〉

多細胞生物の発生は、ゲノムに含まれている遺伝子群が協調的にはたらくことで可能となる。線虫Caenorhabditis elegansはゲノム配列情報や細胞系譜が完全に明らかにされていることから、発生メカニズムを遺伝子レベルで理解するのもっとも適したモデル生物の一つであるといえる。ゲノム配列からC. elegansには約20,000遺伝子が存在すると予測されているが、研究開始時には大多数の遺伝子については機能が明らかになっていなかった。ゲノムに書き込まれた発生プログラムを解明するためには細胞レベル・個体レベルでの個々の遺伝子機能を知る必要があるが、その手段としては遺伝子機能を阻害した際に見られる表現型から推測するのが最も有効である。C. elegansでは、二本鎖RNA (dsRNA)を導入することで特異的なmRNA分解を誘導するRNAi法によって個体レベルの遺伝子機能破壊を行うことができる。われわれは本研究を開始する以前より、ゲノム機能解析に適用することを目指してRNAi法のハイスループット化を試みてきた。dsRNAを線虫体内に導入する方法を検討し、従来はRNAi効果が低いとされていたsoaking法を改変し、再現性よく強いRNAi効果を得ることに成功した。また、非重複cDNAライブラリー（遺伝研・小原雄治博士作成）を鋳型としてdsRNAを合成することによってRNAi用遺伝子ライブラリーを作成することとした。

本研究では、われわれが確立してきた体系的RNAi by soaking法をさらに効率化して大規模に行うことによって線虫個体レベルでのゲノム機能解析を行い、多細胞生物における遺伝子制御ネットワークと発生制御の全貌を解析する基盤を作ること、および、線虫を用いた関連研究を進展させられるような技術開発を行うことを主な目的とした。

具体的には、

- 線虫におけるハイスループットRNAi法のさらなる改良
- 体系的RNAi法による、発生過程に必須な遺伝子群の網羅的同定
- 発生過程における遺伝子機能阻害表現型の体系的記録法の開発および表現型データ収集
- 発生過程表現型データの解析法の開発を順次実施することとした。

### 〈研究開始時の研究計画〉

- 1) RNAi by soaking法のさらなるハイスループット化 体系的RNAiをさらに効率的に行うために、従来はマニュアルで行っていた二本鎖RNAの合成過程を自動化する。また、実体顕微鏡観察による表現型一次解析の表現型指標の定義を明確化する。
- 2) 体系的RNAi法による必須遺伝子の網羅的探索 非重複cDNAライブラリーを鋳型として、上記で決定した条件により二本鎖RNAを合成してRNAiを行い、得られた表現型を記録する。表現型としては、胚性致死・幼虫致死・不稔（生殖細胞形成異常）・形態異常・運動能

力異常等の発生過程における異常に着目する。

- 3) 胚性致死遺伝子群の表現型解析 上記の体系的RNAiで胚性致死となったものについて最終表現型を微分干渉顕微鏡で観察し、表現型を記録する。その際に、コンピュータ解析に用いることを念頭に置いて表現型記録法を開発する。
- 4) 時期特異的RNAiを用いた、複数の発生時期に働く遺伝子群の機能解析 孵化直後の一齢幼虫をdsRNA溶液に浸すことによって孵化後発生特異的に遺伝子機能を破壊するL1 soaking法をハイスループット化する。この手法を用いて、必須遺伝子群の孵化後発生における機能を体系的に明らかにする。
- 5) RNAi表現型プロファイルによる遺伝子クラスタリング法の開発 表現型プロファイルの類似度を客観的に評価し、遺伝子クラスタリングを行う。その結果を、未解析遺伝子の機能予測や、同じ発生現象に関わる遺伝子グループの抽出に活用する。
- 6) RNAi表現型のデータベース化と公開 2)～5)の結果を統合したデータベースを構築し公開する。
- 7) 組織特異的抗体・GFPマーカーを利用した必須遺伝子群の表現型解析 3)および5)で得られた胚性致死遺伝子群のうち、形態形成過程に異常を示すものに着目し、さらなる解析を進める。組織特異的抗体や組織特異的GFPマーカーを利用して、RNAi胚における各組織の分化・形態変化等について検討する。

### 〈研究期間の成果〉

- 1) RNAi by soaking法のさらなるハイスループット化 ラボラトリーオートメーションシステム(Beckman社 Biomek)を用いて、96穴プレートフォーマットで非重複cDNAセットからの高濃度のdsRNAを合成および精製を行うことにより、dsRNA合成ステップを効率化した。また、実体顕微鏡によるRNAi表現型一次解析における表現型指標を明確に定義し直し、複数の観察者が解析を行っても整合性のある結果が得られるように改善した。(成果公表リスト9, 11, 12, 14)
- 2) 体系的RNAi法による必須遺伝子の網羅的探索 上記で決定した条件によりdsRNAを合成し、四齢幼虫をdsRNA溶液に浸すことによって行う“L4-soaking法”

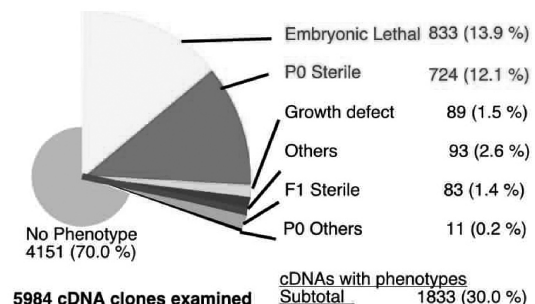


図1 体系的RNAiによる表現型一次解析結果

によってRNAiを行い、計約6000遺伝子について実体顕微鏡下で表現系解析を行った(図1)。その結果、約30%に相当する1833遺伝子が発生過程における何らかの表現型(致死性、成長遅延、生殖細胞形成異常、形態異常、運動能力異常等)を示した。これらのうち、胚性致死遺伝子群(833遺伝子)、および、生殖細胞形成異常を示した遺伝子群(P0 sterile 724遺伝子、F1 sterile 83遺伝子)は発生過程で特に重要な働きをしていると考えられるため、さらに詳細なRNAi表現型解析を行うこととした。(成果公表リスト9, 11, 12)

3)胚性致死遺伝子群の表現型解析 2)で同定された833の胚性致死遺伝子群について、微分干渉顕微鏡によるさらに詳細なRNAi表現型解析を行った。線虫の胚発生は14時間かかるため、胚発生過程全体を観察するとスループットを上げることができない。そこで、受精後約14時間後まで発生させた最終表現型のみを観察することとした。表現型の記録には、顕微鏡写真イメージを保存することに加え、情報科学的に解析することを目的としてRNAi表現型の体系的記述法をあらたに構築した。具体的には、細胞数・核の形態、各組織の分化・形態、細胞死等の独立したカテゴリーについて63の表現型指標を定義し、その組み合わせで体系的に表現型プロファイルを記述することとした。さらに、RNAi表現型の浸透度(penetrance)や発現度(expressivity)が低い場合にも信頼性の高い表現型データを得るために、各RNAi実験あたり40個以上の胚を観察し、最も多い表現型グループと次に多い表現型グループについて、上述の63の表現型指標を用いて表現型プロファイルを記録した(図2)。胚性致死833遺伝子のうち、致死性の浸透度が10%以下のものと表現型のばらつきが大きいものを除いて、606遺伝子について表現型プロファイルを得た。(成果公表リスト9, 11, 論文執筆中)

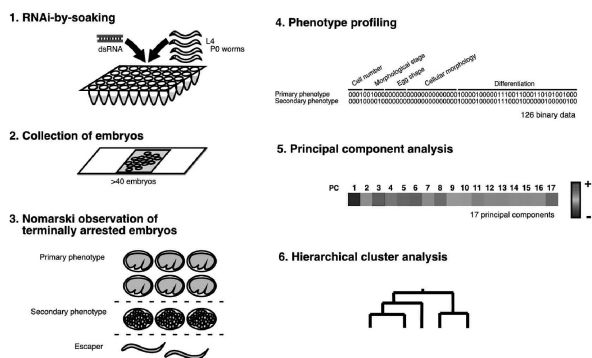


図2 胚性致死最終表現型解析のストラテジー

4)時期特異的RNAiを用いた、複数の発生時期に働く遺伝子群の機能解析 複数の発生時期や複数の組織で機能する遺伝子の例は知られているが、どの程度の割合の遺伝子が複数の機能を有するかという体系的な解析はこれまで行われていなかった。その理由は、変異体やRNAiで表現型解析を行う際に解析できるのは最初に現れた表現型のみであり、発生を停止した後の発生過程の解析が不可能になってしまうためである。この問題点を解決するためには、発生時期特異的あるいは組織特異的遺伝子機能破壊を行う必要があるが、従来の技術ではハイスループット化は困難であった。そこでわれわれは、複数の発生時期に機能を持つ可能性のある遺伝子の機能解析を体系的に行うため、RNAi by soaking法を改変することにより、孵化後発生期特異的に遺伝子機能破壊を行う手法を確立した。この“L1-

soaking”法は、孵化直後の一齢幼虫(L1)をdsRNA溶液に24~48時間浸すことにより孵化後にmRNA特異的に分解させ、幼虫期特異的に遺伝子機能破壊を行うものである。われわれはL1 soaking法をハイスループット化し、必須遺伝子群の孵化後機能の体系的解析を行った。3)で解析した胚性致死遺伝子群のうち、約300についてL1 soaking解析を行ったところ、約6割について幼虫致死や生殖細胞形成異常が観察され、多くの胚性致死遺伝子は複数の発生時期において機能していることが明らかになった(図3)。

さらに、2)のL4 soaking法でP0世代が不稔(生殖細胞形成異常)となった遺伝子群についてもL1 soaking法による孵化後発生表現型を解析した。その結果、これらの遺伝子群の大多数は幼虫初期に致死となり(図3)、このクラスには体細胞でも生殖細胞でも必要なハウスキープ遺伝子が多く含まれている可能性が示唆された。

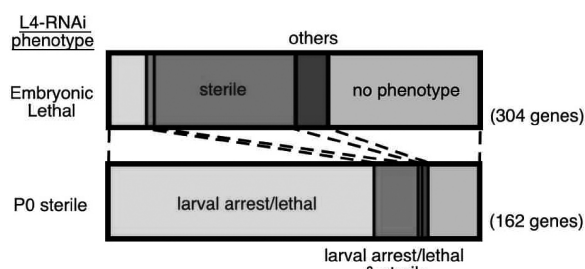


図3 L1 soaking 法による孵化後発生表現型解析

また、孵化後表現型および生殖細胞形成異常表現型についても胚性致死表現型の記述法と同様に、あらかじめ定義した表現型指標による表現型記述法を構築し、孵化後発生表現型プロファイルのデータベースを作成した。これらの孵化後発生および成虫の表現型プロファイルは、3)の胚性致死表現型プロファイルと合わせて、発生過程における遺伝子ネットワーク解明の基盤となる情報となると期待される。(成果公表リスト9, 11, 論文執筆中)

5)RNAi表現型プロファイルによる遺伝子クラスタリング法の開発 3)で記録した606遺伝子についての胚性致死最終表現型プロファイルを用いて、表現型の類似度による遺伝子分類を行った。まず、各表現型指標が観察されたか否かによって0または1に置き換えることにより、表現型プロファイルを126次元のバイナリーデータに変換した。次に、次元数を下げ、表現型指標間の相関を明らかにする目的で主成分分析を行った。第20主成分得点までを使用して階層的クラスタ分析を行い、表現型の類似度によって遺伝子を分類した(図4)。その結果、胚性致死遺伝子群はa)細胞分裂異常、b)細胞運命決定・分化異常、c)形態形成異常、の3つの表現型グループに分けられ、それぞれがさらに細かい表現型クラスターに分類できた。得られた樹形図においては同じ発生過程で機能することが示されている既知遺伝子が近傍に位置づけられることが確認できた。したがって、この手法は機能未知遺伝子の機能予測や、協調して働く遺伝子群の抽出に役立つと考えられる。(成果公表リスト9, 11, 論文執筆中)

6)RNAi表現型のデータベース化と公開 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター・豊田哲郎博士との共同研究により、2), 3)および5)の結果を統合したRNAi胚性致死表現型データベース(C. elegans RNAi Phenome Database)を構築し、約250遺伝子分について公開した。

このデータベースでは、遺伝子名、表現型指標の組み合わせ、および表現型クラスターから検索が可能となっている。特に、表現型クラスター樹形図から表現型が類似している遺伝子セットを選択して表示できる機能は従来の表現型データベースにはなかった機能であり、本データベースの大きな特徴となっている。3)および5)で解析した全606 遺伝子についてのデータの公開に向けて現在準備中である。(成果公表リスト7)

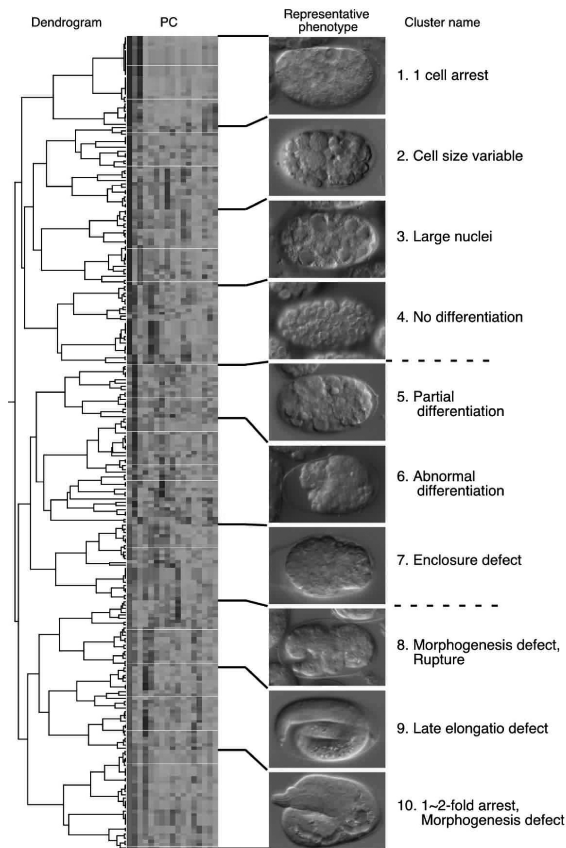


図4 表現型プロファイルによる遺伝子クラスタリング

7)組織特異的抗体・GFPマーカーを利用した必須遺伝子群の表現型解析 さらに詳細な表現型解析を行うための準備段階として、*C. elegans* 胚発生過程のマーカーとして利用できるモノクローナル抗体の作出と解析を行った。胚抽出液を抗原としてマウスを免疫し、胚の免疫染色によって特異的な細胞・組織特異的構造物を認識するモノクローナル抗体を約40種取得した。認識する構造には、生殖顆粒 (P granules)、筋肉、表皮、咽頭内壁、核膜、中心体等が含まれている。これらの抗体の時間的空間的染色パターンのデータベースを作成中である。これまで*C. elegans* のマーカーとして広く利用されてきた既存のモノクローナル抗体は十数種に限られており、今回得られた新規モノクローナル抗体は発生マーカーとしての利用価値が高いことが期待される。実際、予備的な解析結果から、従来の抗体やGFPマーカーでは同定されていなかった特異的構造を認識する抗体が複数得られている。この抗体ライブラリーは5)で分類した胚性致死遺伝子群のさらに詳細なRNAi表現型解析に活用していく予定である。また、この抗体ライブラリーは線虫研究者コミュニティで広く使用されることが予想されるため、公共的リソースとするための整備も開始している。

体系的RNAiによるゲノム機能解析で発生過程に重要な役割を果たしていることが示された遺伝子群のなか

から、いくつかの遺伝子に着目して詳細解析を行った。その一つ、*eya-1* 遺伝子は2)のRNAi解析において、胚発生では致死性を示さないが孵化後の形態形成および運動能力に異常を示すという、希な表現型グループの遺伝子の一つとして同定された。*eya-1* 遺伝子は進化的に広く保存されている*eyes absent/EYA* 遺伝子ファミリーに属しているが、*C. elegans* においてはその機能は明らかにされていない。RNAiおよび欠失変異体 (ナショナルバイオリソースプロジェクトより供与) を用いてさらに詳細な表現型解析を行った結果、多様な組織において形態異常が見いだされ、胚発生後期以降の細胞分化・組織形成に異常が起きていることが示唆された。また、*PAX6* ホモログ *pax-6* 遺伝子との相互作用を調べた結果、胚発生後期において *eya-1* 変異と *pax-6* 変異は相乗的に頭部形態形成異常を引き起こすことが示され、*eya-1* 遺伝子と *pax-6* 遺伝子が部分的に重複した機能を持っていることが示唆された。(成果公表リスト6)

さらに、RNAiと抗体およびGFPマーカーによる表現型解析により、体細胞および生殖細胞の細胞周期に関する遺伝子群 (*gmn-1*, *daz-1*, *coh-1*, *scc-1/coh-2*, *coh-3*, および *rec-8*) 表皮細胞の形態形成に関する遺伝子群 (*paf-2* および *Arp2/3* complex components) の機能解析を行った。(成果公表リスト1~5)

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

海外の二つのグループ (Ahringerグループ、および Cenix社) でもゲノムワイドなRNAi解析が行われたが、表現型が観察された遺伝子の比率は他のグループが13%程度であるのに対し、われわれの解析では30%と高くなっている。これは、soaking法を最適化したことと、低浸透度の表現型も記録したことにより、表現型を効率よく検出できたためと考えられる。また、海外の2グループは主に初期胚の最初の数回の細胞分裂に着目した解析を行っており、胚発生後期および孵化後発生までも網羅した表現型プロファイリングおよびそのクラスター解析はわれわれのグループを除いて他に例をみない。

複数の発生時期においてはたらく遺伝子の体系的機能解析は、RNAi by soaking法による時期特異的遺伝子機能破壊を活用してはじめて可能になったものである。従来の個別遺伝子機能解析から複数の発生時期や複数の組織で機能する遺伝子が存在することは知られていたが、大規模に調べられたのは今回がはじめてである。L4 soakingとL1 soakingによる表現型データを統合的に解析することにより、発生という時間軸に沿って遺伝子ネットワークがどのように変動していくかという新たな視点での解析が可能になると期待される。

線虫の発生過程マーカーとしてのモノクローナル抗体は、1980年代にスクリーニングされたが、現在広く用いられているのは十数種ほどしかない。今回多様な組織や細胞内構造を認識する新たなモノクローナル抗体が約40種類得られたことで、発生現象をさらに詳細に解析するためのリソースが充実したといえる。実際、筋肉繊維や表皮細胞のサブセットを認識する抗体については、国内外の数グループからすでに試料請求が来ており、配布をはじめている。今後、線虫研究者コミュニティからの請求が増加すると予想されるため、抗体を配布できる体制を整える必要があると考えている。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

発生過程の表現型をできるかぎり客観的に表現型指標の組み合わせで表現する手法を構築しようとしてきたが、

言語で表現する限り観察者の技量や主観を完全に排除するのは不可能であり、観察者によって結果に若干のばらつきが生じてしまう。そのため、すべての遺伝子について表現型プロファイリングは熟練した一人の観察者が行うことが望ましく、スループットを上げることが非常に困難であった。

新規発生マーカーとしてのモノクローナル抗体マーカー作成の重要性が研究途中で明確になったため、研究開始時の計画で行う予定であった、形態形成過程に関わる遺伝子群についての詳細解析を行うことができなかった。

#### 〈今後の課題〉

胚発生期表現型データベースを完成させて公開するとともに、孵化後発生表現型データベースの構築も行う。表現型プロファイルと、それ以外のゲノム機能解析データ（トランスクリプトーム、プロテオーム、インタラクトーム、等）を統合的に解析するための手法について検討する。

本研究で行った表現型プロファイルによる遺伝子クラスターリングの結果から、未解析遺伝子の機能予測が行えるようになったので、その検証実験を行いたいと考えている。

表現型をさらに客観的・定量的に解析するための手法をさらに開発する。具体的には、今回新たに得られたモノクローナル抗体による染色やGFP融合タンパク質などの、特異的な組織・構造マーカーを利用して、顕微鏡画像の定量的解析を行いたいと考えている。特に、変異体における形態形成期の細胞の形態変化などの大量の4次元（3次元+時間軸）データを比較解析するための手法は確立されたものがなく、今後の大きな課題である。

新規モノクローナル抗体群については、公共的リソースとするために、発生の各時期における染色パターンをデータベース化して公開するとともに、抗体の配布体制を整備する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文

- 0305121605  
Sawa, M., Suetsugu, S., Sugimoto, A., Miki, H., Yamamoto, M. & Takenawa, T. (2003) Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J Cell Sci* 116, 1505-1518.
- 0403261720  
Mito, Y., Sugimoto, A. & Yamamoto, M. (2003) Distinct Developmental Function of Two *Caenorhabditis elegans* Homologs of the Cohesin Subunit Scc1/Rad21. *Mol Biol Cell* 14, 2399-409.
- 0502092029  
Inoue, T., Sugimoto, A., Suzuki, Y., Yamamoto, M., Tsujimoto, M., Inoue, K., Aoki, J. & Arai, H. (2004) Type II platelet-activating factor-acetylhydrolase is essential for epithelial morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13233-8.
- 0502092013  
Maruyama, R., Endo, S., Sugimoto, A. & Yamamoto, M. (2005) *Caenorhabditis elegans* DAZ-1 is expressed in proliferating germ cells and directs proper nuclear organization and cytoplasmic core formation during oogenesis. *Dev Biol* 277, 142-54.
- 0602060922

- Yanagi, K., Mizuno, T., Tsuyama, T., Tada, S., Iida, Y., Sugimoto, A., Eki, T., Enomoto, T. & Hanaoka, F. (2005) *Caenorhabditis elegans* geminin homologue participates in cell cycle regulation and germ line development. *J Biol Chem* 280, 19689-94.
- 0602060924  
Furuya, M., Qadota, H., Chisholm, A. D. & Sugimoto, A. (2005) The *C. elegans* eyes absent ortholog EYA-1 is required for tissue differentiation and plays partially redundant roles with PAX-6. *Dev Biol* 286, 452-63.
  - データベース  
0602060930  
*C. elegans* RNAi phenome database  
<http://omicspace.riken.jp/Ce/rnai/jsp/index.jsp>
  - その他  
0408131411  
杉本亜砂子. 線虫*C. elegans*のゲノム機能解析. 第27回阿蘇シンポジウム 2003「医学をゲノムする」(山村研一, 丸山征郎, 西村泰治, 柳雄介 編) 47-55 (南山堂, 熊本, 2003).
  - 0406232030  
Sugimoto, A. (2004) High-throughput RNAi in *Caenorhabditis elegans*: genome-wide screens and functional genomics. *Differentiation* 72, 81-91.
  - 0406232037  
杉本亜砂子. 動物のゲノム解析: 線虫. 「ゲノミクス・プロテオミクスの新展開」(今中忠行 編) 338-346 (エヌ・ティー・エス, 東京, 2004).
  - 0406232030  
Sugimoto, A. High-throughput RNAi-by-soaking in *Caenorhabditis elegans*. In *RNA interference technology: From basic science to drug development* (ed. Appasani, K.) 419-432 (Cambridge University Press, Cambridge, 2005).
  - 0602060940  
Sugimoto, A. WormMethod, Reverse genetics: RNAi by soaking. In *WormBook* (ed. The *C. elegans* Research Community) (2005).
  - 0602060927  
杉本亜砂子, 小原雄治. (2005) 線虫ゲノムの体系的発現・機能解析. *蛋白質核酸酵素* 50, 2140-2145.
  - 0602060949  
飯田直子, 杉本亜砂子. 線虫 (*C. elegans*) におけるRNAiの応用. 「RNA工学の最前線」(中村義一, 大内将司 編) 41-51 (シーエムシー出版, 東京, 2005).