

形態を制御する細胞内骨格制御系の網羅的解析

●天野 陸紀¹⁾ (門田 裕志²⁾)

1)名古屋大学大学院医学系研究科 2)奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

〈研究の目的と進め方〉

多細胞生物における組織形態形成や神経発生を理解するためには、細胞の形態変化や移動に伴う細胞骨格の制御機構を解析することが重要である。線虫などのモデル生物におけるゲノム解析の進展により、これまで困難であった、多重に存在する細胞骨格分子や制御分子の網羅的な解析が可能となってきた。本研究では、線虫及び培養細胞を用いて細胞骨格及び細胞骨格制御分子による細胞・組織の形態制御機構や神経発生機構を包括的に理解することを目的としている。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 線虫において、yeast two-hybrid法とRNAi法を組み合わせた新規の機能的スクリーニング法の開発を行う(図1)。
- 2) 上記の方法を用いて、線虫の組織形態形成に関与する遺伝子について網羅的に結合分子探索、及び遺伝子破壊実験を行う。
- 3) 組織特異的プロモーターを利用した組織特異的RNAi法の確立を目指す(図2)。
- 4) 1),2)の方法で得られた遺伝子について、線虫において機能解析を行う。また、線虫では困難である生化学的解析、および細胞内ダイナミクスの解析を哺乳類培養細胞系を用いて行う。

〈研究期間の成果〉

- 1) yeast two-hybrid法とRNAi法を組み合わせた機能的スクリーニング法の開発を行った(文献1)。
- 2) 線虫の組織形態形成に関与する遺伝子 [GEX2, GEX3, W07B3.2 (GEI-4)] について上記方法により網羅的に結合分子探索、及び遺伝子破壊実験を行った。本スクリーニングにより多数の結合分子を同定し、この中からさらに遺伝子破壊により形態形成に異常が認められる分子を同定した(文献1)。
- 3) 組織特異的プロモーター (lin-26p, myo-3p) を用いたRNAi非感受性株 (rde-1 mutant) の組織特異的RNAi感受性回復株を樹立した。GFPを指標にこれらの株の評価を行ったところ、RNAi感受性を回復させた組織において特異的に遺伝子破壊が起こっていることが確認出来た。
- 4) GEX2結合分子のひとつであるUNC-33/CRMP-2の機能解析を行った結果、哺乳類初代培養神経細胞においてLysophosphatidic acidやEphrin等の神経ガイダンス因子による成長円錐の退縮にRho-kinaseを介したCRMP-2のリン酸化が重要な役割を果たしていることを見出した(文献2)。さらに、CRMP-2が軸索・樹状突起の運命決定に重要な役割を果たすことを示した(文献3)。また、線虫unc-33変異体では神経の走行に異常があることが報告されているが、unc-33(e204)変異体においてはUNC-33の局在に異常があることを見出し、UNC-33の局在化に関与する遺伝子(unc-116: kinesin heavy chain, unc-51: ULK-kinase, unc-14)を同定した(文献

4)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

細胞内骨格の制御系は様々な分野において研究が進められているが、ゲノムワイドでの機能解析はまだ明らかにされておらず、そのような解析をシステムティックに行おうとしている研究者は少ない。本研究によって細胞内骨格を包括的に理解する上で重要な知見が得られることが期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- ・ yeast two-hybridスクリーニングレベルの最適化が不十分で(おそらく偽陽性を含む)陽性クローンが非常に多数得られた。
- ・ yeast two-hybridスクリーニングで単離されたいくつかのクローン中において、線虫ゲノムデータベースに未登録のORFと思われる配列が得られた。
- ・ RNAi法による表現型を観察する際に、複数の組織にわたり形態形成異常が起こると解析が非常に困難であった。
- ・ 線虫の神経細胞の形態形成についても解析を行いたいが、神経細胞にはRNAi法による効果が弱く、上記の方法による解析が困難であると思われる。

〈今後の課題〉

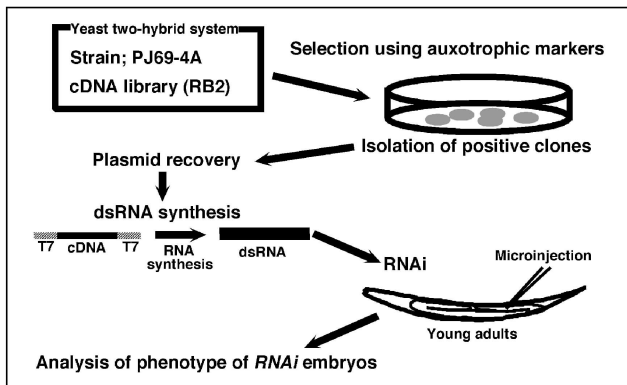
- ・ 組織形態形成に関与する遺伝子群のスクリーニングの継続
- ・ 形態形成に関与する遺伝子群の組織特異的RNAi法を用いた機能解析
- ・ 組織形態形成、神経発生関与分子の同定、及びその分子メカニズムの解析
- ・ 神経細胞に有効なRNAi法の開発

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Tsuboi, D., Qadota, H., Kasuya, K., Amano, M., and Kaibuchi, K. Isolation of the interacting molecules with GEX-3 by a novel functional screening. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 697-701. (2002)
2. 0111121511
Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Menager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y., and Kaibuchi, K. Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein-2 by Rho-kinase: Evidence for Two Separate Signaling Pathways for Growth Cone Collapse. *J Biol Chem* 275, 23973-23980. (2000)
3. 0111121514
Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. CRMP-2 induces axons in cultured

hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4, 781-782. (2001)

4. Tsuboi, D., Hikita, T., Qadota, H., Amano, M., and Kaibuchi, K. Regulatory machinery of UNC-33 Ce-CRMP localization in neurites during neuronal development in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 95, 1629-1641. (2005)



← 図 1 : 線虫を用いた機能的スクリーニング法

図 2 : 組織特異的RNAi法 →

