

比較ゲノムのアプローチを用いた真核生物ヘリカーゼ様遺伝子群の体系的機能解析

● 浴 俊彦

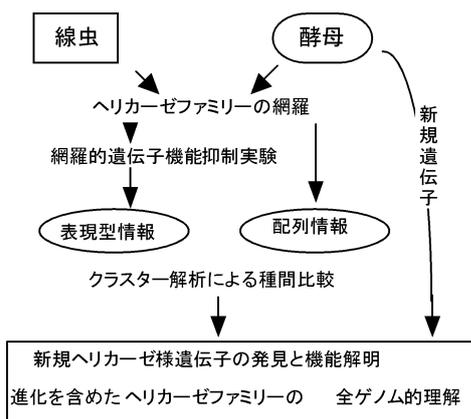
理化学研究所細胞生理学研究室

〈研究の目的と進め方〉

ヘリカーゼ様タンパク質群（ヘリカーゼファミリー）は、核酸やクロマチンの動態制御複合体の中核因子であり、遺伝子機能の発現や制御において重要な役割を果たしている。本研究では、代表的なモデル生物として、単細胞生物の出芽酵母と多細胞生物の線虫を選び、網羅的なヘリカーゼファミリーの解析を行った。酵母については新規遺伝子の機能解明を目的とした。線虫については、全ヘリカーゼ様遺伝子の機能抑制個体を作成し、それらの表現型について比較ゲノム的な解析を行うことで、ヘリカーゼファミリーに関する進化的な知見を得るとともに、新規な機能遺伝子を探索することを旨とした（下図参照）。

研究は、以下の目標に従って進めた。（1）公表された酵母と線虫のゲノム情報より相同性検索プログラムにより、ヘリカーゼファミリーを網羅的に同定し、比較ゲノム的な解析を行うこと、（2）酵母については、これまでの申請者らの研究から同定された13個の新規ヘリカーゼ遺伝子に関して、酵母two-hybrid法によるタンパク質間相互作用解析を手がかりに機能解明を目指す、（3）線虫ヘリカーゼについては、feeding RNAi法を用いて網羅的な遺伝子機能抑制個体を作成し、酵母遺伝子破壊株との間で表現型についての比較解析を行うことで、ヘリカーゼファミリーの進化的な変遷を明らかにすることを目指す、（4）RNAiを利用したゲノム安定化に関連する線虫ヘリカーゼ遺伝子の探索法の検討を進める。

本研究の概要



〈研究開始時の研究計画〉

2000年度の計画

- 機能未知の酵母新規ヘリカーゼ様遺伝子について
 - 遺伝子クローニング、
 - タンパク質発現系により調製した精製タンパク質を用いた生化学的解析、
 - 酵母two-hybrid法によるタンパク質間相互作用解析、に必要な準備を行い、パイロット実験を実施する。
- 線虫ヘリカーゼファミリーの同定とfeeding RNAiによる遺伝子機能抑制法の確立を行う。

2001年度の計画

- 前年度に引き続き、酵母新規ヘリカーゼ様遺伝子についてのタンパク質間相互作用解析を継続する。
- 線虫ヘリカーゼ様遺伝子群の網羅的RNAiによる表現型解析を実施する。
- Feeding RNAiを用いた機能遺伝子（ゲノム安定化関連遺伝子）の探索法を確立し、評価を行う。

〈研究期間の成果〉

2000年度の研究成果

- 酵母ヘリカーゼファミリーの解析に関しては以下の成果を挙げた。
 - 13個の酵母の新規ヘリカーゼ様遺伝子（YHR031C, YDR332W, YIR002C, YDR291W, YDL084W, YGL064C, YMR128W, YLR419W, YOL95C, YLR247C, YKL017C, YLR276C, YNL218W）について、遺伝子クローニングを完了した。
 - 3遺伝子（YDL084W, YNL218W, YLR276C）について、タンパク質発現実験を進めた。
 - 出芽酵母S288C株より酵母two-hybrid用ライブラリーを独自に作成し、12遺伝子について網羅的な酵母two-hybrid解析を開始した。
- 線虫ヘリカーゼの解析については以下の成果を挙げた。
 - 線虫ゲノム情報からヘリカーゼファミリーに属する約150個の遺伝子を同定した（参考：遺伝子数は、その後の公共データベース更新の結果、2006年時点で約140個に修正されている）。タンパク質のアミノ酸配列相同性によるクラスター解析を他種のヘリカーゼファミリーと比較検討した結果、高度に保存されたサブファミリー（MCMタンパク質、多くのDEADボックスタンパク質群など）、多細胞生物で多様化したサブファミリー（SNF2様タンパク質群、recQヘリカーゼなど）、種特異的サブファミリー（酵母のY' 特異的ヘリカーゼなど）の3群に分類できることを明らかにした。
 - feeding RNAiによる遺伝子機能抑制法の確立と評価を完了した。
 - 約150個の遺伝子に対応するPCRプライマーセットを合成し、ゲノムDNAあるいはcDNAプールからのPCR増幅した遺伝子断片のクローニングを進めた。feeding RNAi用コンストラクトの作成を進め、約100遺伝子についてDNA断片のクローニングを完了した。

2001年度の研究成果

- 酵母ヘリカーゼの解析について以下の成果を挙げた。
 - 11遺伝子について酵母two-hybrid解析を進め、独自に3遺伝子（YDR332W, YKL017C, YNL218W）において相互作用データベースにない酵母タンパク質を同定した。
 - タンパク質の発現実験を継続した。YDL084WにATPase活性を見いだした。その後、共同研究により、YLR276C(DBP9)遺伝子について、DNA依存性ATPase

およびDNAヘリカーゼ活性を持つことを初めて発見した(論文1)。

③ YOL095C, YGL064Cの欠損によりミトコンドリア呼吸機能の障害が生じることを発見した。

2. 線虫ヘリカーゼの解析について以下の成果を挙げた。

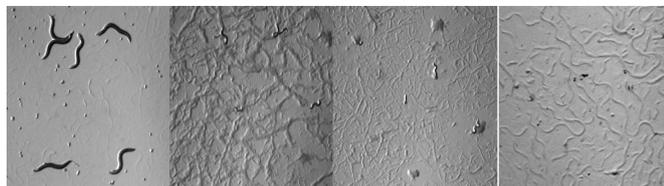
① 約150個の線虫の全ヘリカーゼ様遺伝子について、RNAi処理個体の表現型の解析を完了した。その結果、検討した137遺伝子のうち、遺伝子機能抑制により見かけ上確認できる表現型(胚性致死:22遺伝子;発生停止:10遺伝子;成長遅延:18遺伝子;雄高頻度発生:4遺伝子)を示す遺伝子が53個(39%)同定された(図参照)。

② 線虫ヘリカーゼ様遺伝子機能抑制個体の表現型について、酵母ヘリカーゼ遺伝子破壊株の表現型と比較した結果、ホモログな遺伝子については種間でほぼ同様の結果が得られた。一方、線虫で増加した遺伝子の多くでは殆どが遺伝子機能抑制による(見かけ上検出できる)表現型を示さなかった。

③ 表現型を示さない遺伝子群の機能解明を目的に、feeding RNAiを利用したゲノム安定性維持の関与する遺伝子群の探索法を検討した。X線と紫外線に対する感受性を指標に、複数の候補遺伝子を同定し、新規遺伝子については詳細な解析を継続している。また共同研究で、MCMヘリカーゼと密接に関連する線虫geminin遺伝子の機能解明を行い、細胞増殖と分化に関与することを明らかにした(論文2)。



- * 保存された遺伝子群(MCM遺伝子など)
- * 多細胞生物で多様化した遺伝子群(recQ様遺伝子など)
- * 種特異的遺伝子群(酵母Yヘリカーゼなど)



- * 多くが酵母の必須遺伝子ホモログ
- * 種間で機能と配列の保存性あり

RNAiを利用したゲノム安定化に関与するヘリカーゼの探索 → * 複数の新規候補遺伝子の同

線虫ヘリカーゼファミリーの解析に関しては、feeding RNAiの実験系が有効に機能した結果、当初想定した以上のスピードで計画を達成できた。一方、酵母の新規ヘリカーゼの機能解明に関しては、幾つかの遺伝子(DBP9, YNL218Wなど)については機能解明が進んだ。しかし、残りの多くは、網羅的な酵母two-hybrid解析等からの機能データは得られたものの、最終的な機能解明には至らなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ヘリカーゼファミリーの網羅的な機能研究については、国内外で本研究以外に報告はなく、ユニークなものであると考える。申請者らが1999年に報告した出芽酵母ヘリカーゼ遺伝子群のゲノムワイドな解析(Shiratori et al., Yeast, 1999)に次いで、本研究により、多細胞生物の線虫ヘリカーゼファミリーについても同様の解析を完了した

ことで、今後、真核生物ヘリカーゼファミリーの機能理解に向けた研究基盤が確立できた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初の研究計画通りに実施できた。特に線虫ヘリカーゼの解析については、想定以上に進み、網羅的な機能解析を完了し、機能遺伝子の探索と同定にまで至った。一方、酵母ヘリカーゼの解析では、数個の遺伝子については意味のある機能情報を得ることに成功したが、当初目標にした全ての新規ヘリカーゼの機能解明には至らなかった。その主な原因として、網羅的な手法として重点的に行った酵母two-hybrid解析からのデータを有効に機能推定に利用できなかったことが挙げられる。すなわち、同定された候補遺伝子について、それが意味のある相互作用がどうかを評価するのに想定外の時間と労力を要し、かつその相互作用の意義を明らかにするために様々な追加的な解析が必要であった。さらに、網羅的な解析から導かれた新規遺伝子の詳細な機能解明に際しては、表現型データなどに基づいて、更に少数の対象遺伝子を絞り込む必要もあろう。

〈今後の課題〉

1. 線虫ヘリカーゼファミリーについてfeeding RNAiを利用した網羅的な機能遺伝子の探索が可能になったので、ゲノム安定化関連遺伝子の探索を継続するとともに、薬剤感受性などの新たな指標について、手法を適用できるか検討を進める。
2. 同定されたゲノム安定性維持に関与する新規遺伝子の分子機能を解明する。現在、RNAヘリカーゼ様遺伝子(D1)を含めた遺伝子機能解明を進めている。
3. 個別の酵母新規ヘリカーゼに関する機能解析(生化学的解析、遺伝学的解析等)を継続する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
1.0602081855
Kikuma, T., Ohtsu, M., Utsugi, T., Koga, S., Okuhara, K., Eki, T., Fujimori, F., and Murakami, Y.: Dbp9p, a member of the DEAD box protein family, exhibits DNA helicase activity. The Journal of Biological Chemistry, 279(20), 20692-20698 (2004).
- 2.0602060922
Yanagi, K., Mizuno, T., Tsuyama, T., Tada, S., Iida, Y., Sugimoto, A., Eki, T., Enomoto, T., and Hanaoka, F.: Caenorhabditis elegans geminin homologue participates in cell cycle regulation and germ line development. The Journal of Biological Chemistry, 280(20), 19689-19694 (2005).
- 4) その他
4件(登録番号: 0602090915, 0602090922, 0602090926, 0602090930)
項目2)、3)については該当無し