

## 機能ゲノミクスによる感覚受容と神経機能にかかわる遺伝子ネットワークの解明

●飯野 雄一<sup>1,2)</sup> ◆國友 博文<sup>2)</sup>

1) 東京大学大学院理学系研究科 2) 東京大学遺伝子実験施設

### <研究の目的と進め方>

線虫 *C. elegans* の化学走性行動に注目し、それを制御する神経のはたらきを分子から細胞、神経回路、個体の運動まで全体を明らかにする。これを通して、神経系による行動の普遍的な制御機構を見出すことを目指す。次のアプローチで研究を進めている。①化学物質受容とその情報処理に関わるニューロンの遺伝子発現からの特徴づけ、②神経特異的遺伝子の機能の解明、③化学走性行動の基本原則の解明とモデル化、およびそれにかかわる神経ネットワークの解明。

①では、mRNA tagging 法とマイクロアレイを用いてニューロンの種類ごとに遺伝子発現解析を行い、結果を相互に比較して、それぞれのニューロンがどのような遺伝子発現の差異によって特徴付けられているか記述する。②では、①によって明らかになった細胞特異的遺伝子を RNAi 法によって順次機能阻害し、行動アッセイを含む複数の指標を用いて個々のニューロンの働きに対する各遺伝子の関与を評価する。遺伝子の分子機能を明らかにし、化学物質受容とその情報処理に関わるニューロンのはたらきを特異的に発現している遺伝子の機能のネットワークとして理解する。

一方、神経系の動作を数理的に解析し、それに関わる遺伝子機能と神経回路を明らかにするためには、神経系の機能発現としての行動の定量化が必要である。そこで③では、化学物質への走性行動を画像解析により定量化し、そこから行動の基本原則を抽出し、さらに、その動作を実現する神経回路を明らかにする。

### <2007年度の研究の当初計画>

1) 個体あたり一細胞のニューロンについて発現解析を行う手法の確立を目指し、個体の頭部に左右一対ある ASE 感覚神経の発現解析を進めてきた。昨年度までに条件検討を行い、手順を確立した。今年度は細胞特異的遺伝子の候補について実際の発現確認を行う。細胞特異的遺伝子の機能欠損の効果を調べて、左右の機能の差異にかかわる遺伝子を明らかにする。また、発現解析の対象を他の感覚神経にも広げる。感覚神経 (ASH, AWA, AWB, AWC) と感覚情報処理に関わる介在神経 (AIY, AIA) に注目する。

2) 細胞特異的に発現する遺伝子の機能を RNAi によって阻害し、感覚神経の構造の形成維持、および感覚受容のシグナル伝達にかかわる遺伝子を見出す。全感覚神経の発現プロファイリングで得られた遺伝子の候補から順に、実際に機能スクリーニングを開始する。

3) ビデオトラッキングシステムを用いて線虫の化学走性行動を定量的に解析し、新たな行動メカニズムを見出した。ニューロン分化の変異体や特定のニューロンをレーザー除去した線虫の行動解析により、このメカニズムを作り出す神経回路を決定する。

### <2007年度の成果>

A) 形態的に対称な ASE 感覚神経の左右の細胞は、異なる機能をもつことが知られている。これらの発現解析を行い、左右の ASE 細胞それぞれに特異的に発現している遺伝子の候補をリストアップした。興味深いことに、この中には膜貫通型グアニル酸シクラーゼ (*gcy*) およびニューロペプチド (*nlp, flp, ins*) の遺伝子が複数含まれた。そのいくつかについてレポーターを作製し実際の発現部位を観察したところ、*gcy-19, gcy-22, nlp-5*、および *nlp-7* は右側の ASE (ASER)、*gcy-14* と *gcy-20* は左側の ASE (ASEL) に偏って発現していることを見出した。このほかにも、機能未知の新規遺伝子に加え、TRPC チャネルの *trp-2* が ASER に偏って発現していることを見出した。

細胞特異的に発現していることが明らかになった新規遺伝子の機能を調べるため、その幾つかについて遺伝子欠損株を用いて化学走性の表現型を観察した。線虫は塩化ナトリウムに誘引される性質を持つ。先行研究により、ナトリウムイオンはおもに ASEL、塩化物イオンは ASER で感受されることが知られている。ASEL 特異的な *gcy-14* の欠損株では、ナトリウムイオンやリチウムイオンへの走性が野生型に比べて若干低下していた。一方、ASER で特異的に発現する *gcy-19* または *trp-2* の欠損株では、化学走性に顕著な異常は観察されなかった。

B) 感覚神経特異的遺伝子の RNAi による機能阻害の方法と効率の検討を行った。経口で二本鎖 RNA を取り込ませる方法は簡便でこれまでも大規模なスクリーニングに用いられている。しかし神経細胞は RNAi が効きにくいことが知られ、実際に、感覚神経ではたらく遺伝子の阻害は十分ではなかった。一方、感覚ニューロン内でヘアピン RNA を発現させる方法は、経口法よりも効果が強いことがわかった。両者の組合せにより阻害効果は増強され、感覚繊毛の形成や行動アッセイを指標とした機能スクリーニングを組み立てられる可能性が示唆された。

C) 感覚神経で特異的に発現していることを見出していた C02H7.1 遺伝子の詳細な機能解析を行った。その結果、この遺伝子は、変異株が得られていたがクローニングされていなかった *dyf-11* 変異の原因遺伝子であることをつきとめた。*dyf-11* 変異体では感覚繊毛が正常に形成されず、化学走性に欠損を示す。遺伝子産物は感覚繊毛に局在し、繊毛の形成に必須な鞭毛内輸送によって繊毛内を移動した。DYF-11 は繊毛を持つ生物に保存されており、ほ乳類のオルソログ、Traf3ip1 も繊毛に局在することを明らかにした。興味深いことに、DYF-11 はオルソログ間でよく保存されたアミノ末端の領域ではなく、タンパク質間相互作用を担うと考えられる coiled-coil 領域が機能に必須であった。これらの結果は、DYF-11 は繊毛の形成に必須な因子であり、それ自身が繊毛の構成成分であるか、または他の繊毛タンパク質との相互作用を介して繊毛内の輸送に重要な役割を担っていることを示唆

する。

D) 線虫の化学走性行動のメカニズムを調べるため、ビデオトラッキングシステムによる行動解析を行った。これまでにC.エレガンスは、前進行動によって塩化ナトリウムの濃度が低下しているときに高頻度に大きく方向転換する結果、正の化学走性を示すことが報告されている（ピルエット機構）。今回新たに、濃度勾配に依存して前進中に方向転換する角度を徐々に変えるメカニズムが存在することを見出した（風見鶏機構）。シミュレーションの結果、この2つの機構の両者が効率よい化学走性行動に必要であった。風見鶏機構は匂い物質への化学走性でも観察され、さらに、学習によって化学走性が低下した（むしろ忌避反応を示す）場合には、濃度勾配と方向転換の相関が逆転することから、この機構は線虫の前進運動を制御する基本的なしくみと考えられる。

ピルエット機構が化学物質濃度の時間変化の認識による行動の制御であるのに対し、風見鶏機構は濃度勾配、すなわち濃度の空間的な認識による行動の制御であり、両者には異なる分子・神経メカニズムが関与していると推測される。レーザー照射または遺伝子変異によって特定の細胞の機能を失わせた線虫を用いた行動解析を行った結果、左右のASE感覚神経およびその入力を受けるAIY介在神経が風見鶏機構に重要なことを明らかにした。

#### <国内外での成果の位置づけ>

線虫の個体あたり一個の細胞の発現プロファイリングは、国内外で前例がない。ASE感覚神経の研究成果は今年度の国際学会で反響を呼び、*gcy* 遺伝子の機能解析について一部共同研究を開始した。個々の感覚神経の発現プロファイリングについては、我々のほかにも興味を持つ研究グループが複数あり、競争となる可能性がある。感覚神経で特異的に発現している遺伝子の網羅的な機能解析も、同様な研究を進めるグループが国外にある。

行動解析の研究成果は、行動の基本原則の発見に結びついた非常に独創性の高いものである。こちらも国際学会で高い評価を受けた。線虫の行動のモデル化、および行動を制御する神経回路の働きの解明は、工学的な視点から興味を持つ研究グループが国内にも複数あり、それらとの連携によって著しく研究が進展する可能性がある。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1) マイクロアレイ実験を評価するためのレポーター作製と発現解析に予想外の時間を要し、ASE以外の感覚神経や介在神経の発現解析に着手できなかった。ASE感覚神経のプロファイリングでは新規の細胞特異的遺伝子を同定できている反面、特異的発現を観察できなかった候補遺伝子（擬陽性）、左右いずれかの細胞に偏って発現することが既に知られていた遺伝子のうち検出できなかったもの（偽陰性）も相当数あり、検出感度の点で問題を残している。この解決のためにはmRNA taggingの一層の条件検討、あるいはマイクロアレイ実験の試行数を大幅に増やす必要がある。

ASE特異的遺伝子の機能解析においては、遺伝子欠損株の表現型解析に時間を要している。左右それぞれの細胞の性質の変化を検出できるアッセイ系で評価しているが、そもそも全く表現型を示さない遺伝子が多い。細胞特異的発現で絞り込んでいるとはいえ、逆遺伝学のアプローチで遺伝子機能を明らかにすることの困難さを実感させられる。

2) 感覚神経で特異的に発現している遺伝子の機能解析では、

*dyf-11* を集中的に進めた結果、RNAiによる機能スクリーニングの実施は遅れている。感覚神経でRNAiを作用させる方法は大きな課題であったが、これは一定の成果が得られたので、アッセイ系を確立し早期にスクリーニングを開始したい。

#### <今後の課題>

前項に記述したように、残念ながら未達成の課題が多かった。研究のスピードアップが課題である。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文

##### 1. 0801291146

Kunitomo H and Iino Y

*Caenorhabditis elegans* DYF-11, an orthologue of mammalian Traf3ip1/MIP-T3, is required for sensory cilia formation. *Genes Cells*. 13(1) 13-25 (2008)

##### 2. 0801291056

Delawary M, Nakazawa T, Tezuka T, Sawa M, Iino Y, Takenawa T and Yamamoto T

Molecular characterization of a novel RhoGAP, RRC-1 of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 377-82 (2007)

##### 3. 0801291034

Matsubara Y, Kawasaki I, Urushiyama S, Yasuda T, Shirakata M, Iino Y, Shibuya H, Yamanashi Y

The adaptor-like protein ROG-1 is required for activation of the Ras-MAP kinase pathway and meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*. 12(3) 407-420 (2007)

##### 2) データベース/ソフトウェア

なし。