

線虫の胚発生致死温度感受性変異株の網羅的単離とデータベース構築

●中村 邦明

大阪大学微生物病研究所

<研究の目的と進め方>

多細胞生物体が構築されるためには受精卵がプログラム通りの細胞分裂、細胞分化、形態形成を行なう必要がある。しかし、プログラムを構成する遺伝子ネットワークは複雑なため、単純な遺伝子破壊法による解析だけでは、発生プログラムの理解はむずかしい。この問題に取り組む一つの方法論として、我々は線虫の温度感受性変異株の網羅的解析を行う。発生過程では、1つの遺伝子が複数のターゲットを持つ場合や複数のステージで機能している場合が多く存在する。温度感受性変異株はステージ特異的な機能の解析、サプレッサーの解析ができるだけでなく、ドミナントネガティブな表現型を呈したり、複数の基質の中でアレル特異的に特定の基質への活性を失う等、シグナル経路の分別、特定に有用であり、空間的、時間的に複雑に絡み合った発生プログラムを紐解く強力なツールとなる。我々は温度感受性変異株の特性を利用して、多細胞体の構築という複雑な生命現象における遺伝子ネットワークの解明をめざす。

本研究課題の目的は、網羅的に取得された線虫の温度感受性胚発生変異株をライブラリー化し、すべての表現型を解析することによって線虫の胚発生のプログラムの全貌を明らかにすることである。現実的には、1つの研究室ですべての発生プログラムを明らかにすることは不可能であるので、温度感受性変異株のデータベースを構築し、他の研究者が閲覧、使用できるようにし、共同研究によりそれぞれの研究分野の発生プログラムを局面ごとに明らかにするという進め方をする。

我々も解析する局面をしばり、その変異株クラスターの原因遺伝子のクローニングを行なう。同定された遺伝子についてはGFP マーカーを指標にして遺伝子間相互作用について解析を行ない、解析する表現型における遺伝子ネットワークを明らかにしていく。

<2007年度の研究の当初計画>

線虫の胚発生致死温度感受性変異株のデータベース作成・公開のために、以下の実験を行なう予定である。

・温度感受性変異株の原因遺伝子のクローニング

昨年度から、温度感受性変異株ライブラリーのデータベースのための基礎情報として、できる限り多くの変異株について遺伝子クローニングを行っている。2007年度も引き続き、温度感受性変異株の遺伝子クローニングを行ない、変異表現型と原因遺伝子との関連を明らかにしていく。これまで遺伝子クローニングを行なった結果、通常の方法で変異株を取得しやすい初期発生に関しては、かなりの数の変異株が既に取得されていると考えられたので、今後は温度感受性変異株を用いなければ解析が難しい後期発生過程に異常を示す温度感受性変異株を中心にクローニングを行なっていく。

・温度感受性変異株ライブラリーのデータベース構築

基盤ゲノム支援班の支援をうけて、温度感受性変異株のデータ

ベースの構築と公開に着手している。このデータベースの対象者および予想される使用法を考慮して、データベースには自身で遺伝子クローニングを行なった変異株に加えて、これまで報告されている温度感受性変異株のデータも登録する。2007年度中のデータベースの公開を予定している。

<2007年度の成果>

これまでのところ温度感受性変異株ライブラリーの中の約60株(39遺伝子)について遺伝子クローニングに成功している。この中には、これまで欠損変異株等がとられているものもあったが、新規の変異株、温度感受性変異株として初めてのものが多く含まれており、この温度感受性変異株ライブラリーは有効に機能することが確認された。変異株の原因遺伝子のほとんどはヒトと高い相同性を示す分子であり、疾病や生物に共通した生命現象に関する有効な解析系を提供すると考えられた。以下にクローニングされた遺伝子をカテゴリー別に列記する。

細胞運命決定異常を示す変異株としては、従来から温度感受性変異株として取得されていた *cdk-1*(cyclin-dependent kinase)、*par-2*、*apx-1/delta* 分子等の変異株に加えて、*mex-5* および *elc-1* が取得された。*mex-5* は2細胞期の前側の細胞運命を規定する重要な細胞運命決定因子である。*elc-1*(*elonginC*) はユビキチン化酵素複体のアダプターたんぱく質であり、*elc-1*(RNAi) の表現型と比較すると表現型が非常に限定的であり、部位特異的な変異株であることが示唆されている。ユビキチン化酵素複体が時空間的にどのように制御されて細胞運命決定に寄与するのかについて、現在解析を進めている。

形態形成異常変異株としては、これまでクローニングされていた *gex-3/Nap*、*gex-4* (新規)、*gad-1*、*spt-6* 等の分子の変異株の他に、*let-2*、*klp-18*、*rga-2* 等の分子が変異株の原因遺伝子として同定されている。特に、*klp-18*(kinesin-like protein-18) と *rga-2*(*rho-gap*) はそれぞれ微小管とアクチンを制御する分子であり、胚発生の複数の過程で働いていると考えられるため、温度感受性変異株が有効な解析手段となることが期待される。*klp-18* についてはこれまで RNAi 法を用いて減数分裂時の表現型が報告されていたが、温度感受性変異株を用いた解析で、その後の初期発生過程でも細胞運命決定に重要な役割を果していることが判明している。

細胞分裂異常変異株としては、*let-99*、*mei-1*、*div-2* 等がクローニングされている。胚発生において細胞分裂は時空間的に厳密に制御されており、その破綻にこれらの分子の変異がどのように関与するのか非常に興味を持たれる。

以上のように有用な温度感受性変異株が多数同定されている。

続いて、外部の研究者がこの温度感受性変異株ライブラリーを閲覧できるように、我々は基盤ゲノム支援班の支援をうけて温度感受性変異株のデータベース(WorTS: Worm TS mutant Database)を構築し、現在そのデータベースを公開した(<http://>

worts.biken.osaka-u.ac.jp)。このデータベースには逆遺伝学の研究局の線虫研究者がアクセスし、ある特定の遺伝子の変異株を検索することが期待される。このようなデータベースの対象者および予想される使用法を考慮して、データベースは表現型に基づいたものというよりは、遺伝子情報に立脚したものである。今後は、変異株の依頼に応じて供与を行なっていく予定である。

<国内外での成果の位置づけ>

この温度感受性変異株は研究代表者が University of Massachusetts Medical School の Craig Mello 研究室で取得したものであり、許可を得てデータベース構築を行なっている。この意味でこの課題は Craig Mello 教授との共同研究である。それ以外の線虫の研究室でこのようなゲノムワイドの規模での研究プロジェクトは世界中でも存在しない。多くのゲノムワイドのプロジェクが線虫で先駆けて達成されているので、この研究課題も他のモデル生物の先駆けとなるように努めたい。

当研究は、網羅的な線虫の胚発生致死の温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化を図り、次世代の研究基盤を創出しようとするものである。データベースは遺伝子名で検索することが可能であり、依頼に応じて変異株を供与する体制をとっている。この温度感受性変異株ライブラリーでクローニングされた遺伝子数は現在のところ少ないが、包含する遺伝子数が増えれば、日本発の貴重な研究基盤としてインパクトを与えられたい。実際、国内外で発表した際には、幾つかの温度感受性変異株について供与の依頼がなされている。このデータベースが保有する変異株数の増加に応じて、当研究は線虫研究の貴重な研究基盤として線虫研究分野全般の発展に貢献す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>

温度感受性変異株のライブラリー数は 4000 株存在するが、そのうち複数の変異株が同一の原因遺伝子（相補グループ）として同定される。我々は、ある特徴的な表現型をモデルとした予備実験により、同じ相補グループに属するものは多くても 10 株くらいと見積もっていた。しかし実際に遺伝子クローニングを始めたところ、遺伝子によっては 1 つの相補グループが多数の変異株を含むことがわかり、想像以上に温度感受性となる遺伝子には偏りがあることが考えられた。現在のところ、我々は、このライブラリーに含まれる遺伝子数は 1 相補グループあたり 5 ~ 10 遺伝子として、400 ~ 800 遺伝子と考えている。(ゲノムワイドの RNAi 実験により、1000 弱の遺伝子が胚発生に必須であることが判明している)。胚発生致死変異株を飽和させるにはこのライブラリーの少なくとも 2 ~ 3 倍の変異株数が必要であると考えられた。

温度感受性変異株のライブラリーが飽和に達していないとしても、その数は 4000 株と膨大であるので、できるだけ効率よく変異株の原因遺伝子のクローニングを行なう必要がある。そのため、本研究では通常の遺伝子クローニング方法の最適化を行い、より迅速に遺伝子クローニングを行なった。しかし、個体の遺伝学を基礎とした通常の方法では、取り扱える数に限りがあるため、目標の数値を達成できなかった。今後、取り扱える変異株数を増やすためには、個体を用いた SNP 解析からではなく、ゲノム DNA から直接的に原因遺伝子に迫る方法論の開発が必要であると考えられた。

<今後の課題>

今後の課題としては、より効率的な遺伝子クローニング法を開発する必要がある。そこで Tilling (Targeting induced local

lesions in genomes) 法を用いて変異株の原因遺伝子を効率よく同定できる手法の開発を試みる。Tilling 法は特定遺伝子の変異株を単離するために使用されている技術であるが、これとジーンチップを組み合わせることで当研究課題の遺伝子クローニングに応用できるようにしたい。

遺伝子クローニングという律速段階が解消される技術は線虫に限らず、広くモデル生物における研究様式を変化させるほどインパクトを持つと考えられる。すなわち、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ、イネなど様々なモデル動物/植物において表現型に立脚して変異株を網羅的に分離するという研究の流れが形成されることである。ヒトの場合は、個人間の遺伝子配列が異なっており、モデル動物の野生型に相応するものがないため、単純な応用はできない。しかし、疾患患者の SNP 連鎖解析等により、ゲノム上の狭い部位に候補領域が絞り込まれている場合には、シグナル検出の際のバックグラウンドのほとんどを排除できる可能性があり、将来的にはヒトの遺伝子疾患の原因遺伝子同定法にもつながると期待される。

これまでに構築したデータベースは表現型に基づいたものというよりは、遺伝子情報に立脚したものとなった。今後は、表現型に基づいた情報もデータベースに組み込んでいきたい。ただ、表現型の記述として DIC イメージ像のみではデータの信頼性が低いと考えられるため、標準株に予め GFP マーカー分子を発現させ、その分子動態の変化をもとに変異表現型を記述したい。これまで、形態形成を評価するのに適していると考えられる GFP マーカー分子を導入した株の温度感受性変異株を同様の方法で取得している。今後は細胞分裂を評価するためのマーカー分子やある特定の組織への分化を評価するためのマーカー分子等を導入した標準株から温度感受性変異株を順次取得することを計画している。

<成果公表リスト>

論文

0701122211

Wnt signaling drives WRM-1/ β -catenin asymmetries in early *C. elegans* embryos. Nakamura, K., Kim, S., Ishidate, T., Bei, Y., Pang, K., Shirayama, M., Trzepacz, C., Brownell, D., and Mello, C. *Genes Dev.*19, 1749-1754 (2005)

0701122219

The conserved kinases CDK-1, GSK-3, KIN-19, and MBK-2 promote OMA-1 destruction to regulate the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans* Shirayama, M., Soto, M., Ishidate, T., Kim, S., Nakamura, K., Bei, Y., van den Heuvel, S., and Mello, C. *Curr. Biol.*16, 47-55 (2006)

0701122224

Wnt シグナルによる極性形成機構 - 線虫胚を例として - 中村邦明 生化学 78, 1073-1077 (2006)

データベース

0801281653

WorTS: 線虫の胚発生致死温度感受性変異株のデータベース <http://worts.biken.osaka-u.ac.jp>

表現型および遺伝子名から温度感受性変異株が検索可能