

# 線虫の網羅的な温度感受性変異株ライブラリーによる生命システムの理解

●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、本研究で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。この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を解明し、胚発生のプログラムの全貌を明らかにすることが本研究の目的である。

本研究課題では、網羅的に線虫の温度感受性胚発生変異株を取得し、解析するという方向から線虫の胚発生のプログラムを明らかにし、それらのプログラムを生命システムとして捉え、将来的にはコンピューター上で再構成することを目標としている。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解析する。

昨年度までに線虫の温度感受性変異株ライブラリーのデータベースを構築し、外部に公開可能なサーバー上に設置したので、今後は構築した線虫の温度感受性変異株のデータベースの運用を開始すると同時に、その拡充をはかる。特に、温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化事業の律速段階となっている変異株の原因遺伝子のクローニング方法に関する技術の開発に取り組む。また、本研究課題においても解析する局面をしぼり、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。

## <2008年度の研究の当初計画>

当研究課題はこれまでの2年間の研究において、網羅的に線虫の温度感受性胚発生変異株を取得し、その変異株ライブラリーのデータベース化を行ってきた。2008年度からの当領域研究においては、このデータベースを拡充し、その有用性を示すための研究を推進する計画である。

2008年度には、まず構築した線虫の温度感受性変異株のデー

タベースの運用を開始する。Reverse Geneticsの局面を迎えた研究者が、解析に必要な遺伝子変異株を検索するために、データベースを参照し、温度感受性変異株を供与依頼することが見込まれる。温度感受性変異株ライブラリーのデータベースを拡充するため、今後も引き続き、データベースに登録する温度感受性変異株の遺伝子クローニングを行なう。

同時に、温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化事業の律速段階となっている変異株の原因遺伝子のクローニング方法に関する技術の開発に取り組む。変異株の原因遺伝子はこれまでSNP解析を用いた従来の方法でクローニングしてきたが、温度感受性変異株のライブラリー数は4000株と膨大であるので、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2008年からの当研究課題では、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する研究計画である。

新規の遺伝子クローニング法の開発には各段階に困難な点が存在すると考えられるので、2008年度においては既知の変異株を用いて各段階の条件検討を行ない、プロトコルを確立する予定である。DNAマイクロアレイ解析における最大の困難は、蛍光色素検出時の高いバックグラウンドと予想される。そこで通常の遺伝子マッピング法により狭めることが可能である200~300kbの範囲の狭い領域において遺伝子が同定できる技術の確立を2008年度の到達目標とする。

## <2008年度の成果>

温度感受性変異株のデータベース：WorTS (Worm TS mutant Database)を公開し、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、供与依頼が行なえるようにした (<http://worts.biken.osaka-u.ac.jp>)。データベースにはこれまでクローニングした60変異株44遺伝子に加え、既存の温度感受性変異株の情報も登録し、現在、150変異株、98遺伝子を収録している。実際に国内外から供与依頼があり、温度感受性変異株を供与している。また、海外からの温度感受性変異株に対する問合せに端を発して、ある特定の発生段階で発生を停止する温度感受性変異株から生殖前駆細胞を分離し、網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析するという共同研究を開始した。

温度感受性変異株ライブラリーの中からクローニングされた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。2008年度は、30~50細胞期で細胞分裂を停止してしまう表現型を示す一群の変異株の遺伝子クローニングを行なった。その結果、2

種類のミトコンドリアの電子伝達系の還元酵素と低分子型 GTP 結合たんぱく質 Rho の GAP 分子が同定された。また、これらの変異株は、同時に受精卵の卵殻が通常より浸透圧力に弱く、極性形成にも異常が見られた。これまで、このような表現型を示す分子として、上記とは別のミトコンドリアの電子伝達系の還元酵素と APC 複合体の構成分子が報告されている。今回の結果から卵殻の形成および極性形成の際に、ミトコンドリアの電子伝達系、APC によるたんぱく質分解系および Rho シグナルが関与していることが示唆され、これらのシグナルがどのようにクロストークしているのか非常に興味深い。現在、細胞極性の指標となるマーカー分子を用いて解析を行なっているところである。

#### <国内外での成果の位置づけ>

線虫研究では網羅的な解析が幅広く行なわれており、そこから得られた情報も線虫コミュニティで共有されている。しかし、当研究のようなゲノムワイドの規模での温度感受性変異株分離プロジェクトは世界でも存在しない。多くのゲノムワイドのプロジェクト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。

この温度感受性変異株ライブラリーの中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、データベース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たと考えられる。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。将来的には、全ての線虫研究者が検索するデータベースとしたいと考えている。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

変異個体の遺伝学を基礎とした通常の方法では遺伝子クローニングできる数に限りがあるため、4000 株という膨大なライブラリーの変異株をクローニングするには、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。当初の研究計画では、Tilling 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予定していた。しかし、次世代シーケンサー SOLEXA が登場したことで、SOLEXA を用いて特定部位のゲノム配列を直接シーケンスする方が効率的に遺伝子クローニングできるのではないかという方向性に軌道修正した。そのため、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遅れている。

#### <今後の課題>

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遅れているので、鋭意取り組む。変異株の原因遺伝子の同定のためには、どのような手法を用いても最低 1 度は交配して原因遺伝子のゲノム上の位置を知る必要がある。この点を考慮して、原因遺伝子クローニングの戦略として、最初の交配でゲノム上の原因遺伝子の位置を決定した後、その部位特異的にゲノムの部分配列を決定して遺伝子変異を同定するという手順を考えている。この場合、原因遺伝子がゲノム上の異なる位置に存在するものを個別に増幅し、複数の変異株（の領域）を同時に SOLEXA を用いてシーケンスを行なうことにより、コストの問題も解決できるのではないかと期待している。まず第 1 段階として、既知の変異株の原因

遺伝子付近の 200kB くらいのゲノム領域を 20kB くらいの小領域に分けて PCR 増幅し、それらを混合した試料を SOLEXA でシーケンスして既知の遺伝子変異が見いだせるかについて検討を行いたい。また、PCR などの実験条件の効率化等も図っていく。

この温度感受性変異株データベースの世界における認知度は低いと思われる。外部の研究者の注目度を高めるためには、公開するデータベースの量と質を充進させる以外に方法はない。データベースを充実させ、外部の研究者との連携を深め、それらの共同研究により、遺伝子情報がフィードバックされるような軌道にのせなければならない。

その一環として、このデータベースの注目度を高めるため、温度感受性変異株の特性を活かした研究を開始する。これまでには解析できなかった方法論として、温度感受性変異株を用いて生命システムの一局面の解析を行ない、将来的にはコンピューター上で再構成することにつなげて行きたい。具体的には、研究代表者の専門分野である Wnt シグナル経路の温度感受性変異株を用いて、その特性を活かしたスクリーニングを行なうことにより、新たな知見を得ることで、変異株の有用性をアピールしたい。

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>

1) 論文/プロシーディング  
なし

2) データベース/ソフトウェア  
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