

## 機能未知（カオナシ）遺伝子群のインフォマティクスとノックダウン法を駆使した解析

●清水 厚志

慶應義塾大学医学部分子生物学教室

### <研究の目的と進め方>

本研究は何らかの生物学的情報から手がかりを得て、より詳細な機能解析を進めるといった従来の遺伝子解析では対象にされない、カオナシ遺伝子・タンパク質に関して積極的に“遺伝子—表現型”の解析を試みるものである。この研究において、発生初期から成体に至るまでの各種材料を採取でき、ノックダウンが容易なメダカを活用する。さらに発現動態に特徴のある遺伝子や疾患関連領域に局在するカオナシ遺伝子については、ヒト培養細胞でノックダウンを行うとともに、カオナシ遺伝子・タンパク質と発現動態を共にする遺伝子・タンパク質を既知のデータベースから抽出し、集積したデータの再構築を行う。これらのカオナシ遺伝子サイドから推進した“遺伝子—表現型”データおよび遺伝子ネットワーク情報を、その他モデル生物の情報と統合することで、生命システム解明のための重層的な遺伝子ネットワークを構築することを目的とする。

### <研究開始時の研究計画>

#### 1) データベースの構築

本研究を推進するにあたり必要な情報・条件および得られる結果のすべてをデータベースで管理し、集積したデータの表示をウェブブラウザで確認できるようにする。

A) 1000 個のカオナシ遺伝子についてデータベースを構築し、相同性のある遺伝子および他の生物種の相同遺伝子のデータを BLAST を用いて自動で集積するシステムを立ち上げる。

B) ヒトおよびメダカのカオナシ遺伝子に関しては、ゲノム構造の表示や cDNA の増幅のために必要なプライマーの設計も自動で行い、データベースに追加する。

C) ゲノム構造を元にノックダウンを行うための MO（モルフォリノアンチセンスオリゴ）の設計を行い、データベースに追加する。

D) RT-PCR の結果、メダカ胚の画像、条件、表現型の変化をデータベースに入力する。

E) 上記のデータをウェブブラウザで表示できるシステム構築を行う。

#### 2) カオナシ遺伝子に対する RT-PCR 及び Whole mount *in situ* (WISH) 法による発生初期ステージの発現解析

メダカの発生過程は標準的に 40 ステージに分類されており、それぞれのステージをヒトの発生に対応付けることができる。

A) ステージごとに受精卵を 100 - 1000 個採取し、mRNA を抽出し、cDNA を合成する。

B) これらの発生各ステージおよび成体各組織の cDNA パネルを鋳型にしてヒトカオナシ遺伝子のメダカオルソログの RT-PCR を行ない、発現情報を決定する。

C) データベースに入力した発現情報をもとにカオナシ遺伝子のクラスタリングを行い、MO が有効な初期胚から発現しており、かつ発現部位に特徴のある遺伝子を選択する。

D) WISH 法により、発現部位の詳細な解析を行う。

E) 得られた画像データは 1) で述べたデータベースに入力する。

#### 3) ノックダウン法による機能解析

遺伝子機能探索を行う簡便な方法として、RNAi や MO を用いて機能低下を引き起こすノックダウン法があり、メダカでは MO によるノックダウンを有効に適用することができる。

A) WISH 法の結果から発現部位がそれぞれ異なる遺伝子を 20 個選択し、メダカ胚に MO を注入し対象遺伝子のノックダウンを行う。

B) 得られたフェノタイプを分類するとともに WISH 法で得られた発現部位との相関からカオナシ遺伝子の機能を推定する。

C) これらの画像データを 1) で作成したデータベースに入力する。

### <研究期間の成果>

#### 1) データベースの構築

1000 個のカオナシ遺伝子についてデータベースを構築し、相同性のある遺伝子および他の生物種の相同遺伝子のデータを BLAST を用いて集積するシステムを立ち上げた。ヒトカオナシ遺伝子に関しては、cDNA の増幅のために必要なゲノム構造の入力を行いプライマーの設計も自動で行うシステムを構築した。設計した 20 個の MO の配列データおよび位置の登録を行った。RT-PCR の結果やメダカ胚の画像、条件などをインジェクション機器に付属した PC からデータベースにアップロードするシステムを構築した。さらに、これらのデータをウェブブラウザで表示できるシステム構築を行った。

#### 2) カオナシ遺伝子に対する RT-PCR 及び Whole mount *in situ* (WISH) 法による発生初期ステージの発現解析

メダカの発生ステージごとに受精卵を 100 - 1000 個採取し、mRNA を抽出し、cDNA を合成した。これらの cDNA ライブラリーを用いて 130 個のヒトカオナシ遺伝子のメダカオルソログの RT-PCR による発現解析を行った。これらの発現情報をもとに MO が有効な初期胚から発現している遺伝子 20 個をノックダウン解析の対象遺伝子とした。

#### 3) ノックダウン法による機能解析

2) で選択した 20 個のカオナシ遺伝子について MO を作製しメダカ初期胚に対しノックダウンを行った。その結果、脳室の肥大、発生障害、アポトーシスなどを引き起こす MO を得ることができた。これらのことから機能推定が全くできず、逆遺伝学の対象から外れているカオナシ遺伝子の中に発生に関与する遺伝子が含まれていることが確認できた。

一方で、より安価にノックダウン解析を進めるため、MO の他に市販されているアンチセンスオリゴである GripNA や LNA な

どもちいてノックダウン解析を行ったが MO と同様の表現型を得ることができなかった。

#### <国内外での成果の位置づけ>

米国の ENCODE プロジェクトでは特定の領域を対象にゲノム機能の解明を進めている。当研究室では近年ゲノム関連の国際学会等で「カオナシ」という概念を提唱し、その戦略的解析を始めたが、多くの注目を引くところとなっている。一方、諸外国のプロジェクトは、特に遺伝子に付随する情報を効率よく統合的に収集して機能解析を促進するということが基本的なストラテジになっており、カオナシ戦略は最もユニークな位置付けとなっている。我々のカオナシ戦略は特定機能のさらなる追求ではなく、生命システムを構成する網羅的な情報基盤を全く新しい角度から充実せしめるという点で国際会議での発表においても発生や疾患に関与する新規遺伝子の発見という意味合いからも注目を浴びている。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ヒトカオナシ遺伝子のメダカオルソログの自動同定システムを立ち上げるためにはメダカのゲノムシーケンスが必須である。しかし、現在までにメダカのゲノムシーケンスセットは BLAST インターフェースを通じた形で公開されているのみであり自動同定システムを構築することができなかった。そのため、1000 個のカオナシ遺伝子について手動で BLAST をかける必要がありメダカオルソログの同定に予想外の時間がかかった。

当初の予定では少数の遺伝子について WISH 法を行う予定であったが、今後の研究の発展を見据えてクローニングを優先させることにした。その結果 100 個の遺伝子がクローニングできた。

#### <今後の課題、展望>

今回の研究で多数のメダカ胚の表現型データを取得することができたが、表現型には遺伝子機能を表記する GO(Gene Ontology) のような一般化された表記方法が整備されていないため、データベースへの入力には画像データとフリーワードによるコメントで行った。しかし、今後のノックダウン解析を考慮すると GO のような表現型の表記の一般化が必須である。今後、国内外のメダカ・ゼブラフィッシュの研究グループと連携して Phenotype Ontology の基盤を進め、脊椎動物のノックダウン解析を支援するような電子カルテの作製を目指す。

今年度はデータベースの構築、RT-PCR による発現解析、メダカオルソログのクローニング、MO によるノックダウン解析を中心に進めてきたが、今後はクローニングしたベクターを用いて WISH による発現解析や mRNA のインジェクションによる強制発現も試みる。