

# 機能ゲノミクスによる感覚受容と神経機能に関わる遺伝子ネットワークの解明

●飯野 雄一 ◆國友 博文

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。この目的のため、次のアプローチで研究を進める。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。それぞれの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そこで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。

## <研究開始時の研究計画>

研究開始時の 2005 年度は、まず、単一ニューロンの遺伝子発現解析をおこなうための技術的な基盤を確立することを計画した。左右一対ある ASE 感覚神経は水溶性のイオン物質を感受するが、左右の ASE で受容するイオンが異なることがわかっている。さらに、左右のどちらか一方でのみ発現する遺伝子が知られていること、化学走性学習に関して右の神経が重要なことなどから、左右の細胞の性質に大きな違いがあることが示唆されている。左右の ASE の間、あるいはこれらと匂い受容感覚神経の AWC との間で、遺伝子発現の違いや感覚入力による遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析し、インフォマティクスにより特徴の抽出をおこない、細胞特異的な遺伝子の候補について実際の発現パターンを確認し、そのうちいくつかについて機能解析を進めることを予定した。また、化学走性の可塑性に欠損を示す変異体について、原因遺伝子を同定することと、既に原因遺伝子を特定したインスリン-PI3 キナーゼシグナル伝達経路、*scd-2* および *cas-1* などの各遺伝子については、化学走性学習における分子機能の解明を進めることを予定した。

## <研究期間の成果>

1. mRNA tagging 法による神経特異的遺伝子の同定と機能解析  
mRNA tagging 法は、mRNA のポリ A に結合する性質のあるポリ A 結合蛋白質 (PABP) にタグ配列をつけたものを細胞特異的プロモーターで特定の細胞群に発現させ、タグに対する抗体を用いて免疫沈降することにより、その細胞群に含まれる mRNA を特異的に回収する方法である。これまでに、この方法を約 50 細胞からなる感覚神経に適用し、単離した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行うことにより、感覚神経に発現する遺伝子群の同定に成功している (Kunitomo et al., 2005)。

### Principle of the mRNA-tagging method

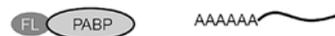
(1) Express FLAG-PABP in target cells



(2) *In vivo* crosslink  
(3) Purify poly(A) RNA/FLAG-PABP complex



(4) Reverse crosslinks, purify poly(A) RNA



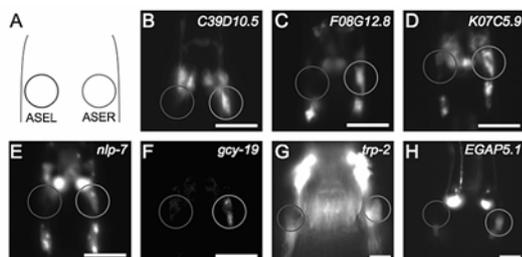
(5) Use as microarray probes



この方法を左右の ASE 神経に適用し、左右で非対称に発現する遺伝子の体系的な同定を目指した。まず、右の ASE (ASER) で特異的に発現する *gcy-5* プロモーターと、左の ASE (ASEL) で特異的に発現する *gcy-7* プロモーター下に FLAG タグ付加 PABP をつなぎ、線虫に導入して安定な形質転換株を作製した (それぞれ ASER 株、ASEL 株と呼ぶ)。ASE 神経は左右それぞれ一個しか存在しないため、わずかに一個の標的細胞であっても mRNA tagging 法で特異的な mRNA の濃縮がかかるかを調べる必要がある。mRNA tagging 法で mRNA を単離後、RT-PCR で左右非対称に発現することが既知の遺伝子の mRNA の回収量を調べた。その結果、ASER 株由来 mRNA : ASEL 株由来 mRNA での量比に関して、右の ASER で発現する *gcy-5* では 5.4 倍、左の ASEL で発現する *gcy-6* で 10 倍、*gcy-7* で 91 倍の濃縮が確認された。しかしながら他のいくつかの遺伝子では濃縮がみられなかった。

単離した mRNA をプローブに用いて、全ゲノムオリゴアレイにハイブリダイゼーションを行った。ASER 株由来 mRNA : ASEL 株由来 mRNA のシグナル比によりランク付けを行った。

興味深いことに、ASERあるいはASELで高い濃縮を示した遺伝子のリストの上位には、膜貫通型ゲ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 チャンネルの *trp-2* が ASER に偏って発現していることを見出した。



プロモーター融合Venus遺伝子により、発現パターンを確認した。  
※上記以外に *nlp-5* が ASER に *ins-32* が ASEL に偏っていることを見出した。

左右の ASE がそれぞれ受容するイオン性物質のレセプターは不明であるが、ASER、ASEL それぞれに複数の *gcy* 遺伝子が発現していたことから、これらがイオンのレセプターである可能性が浮上した。そこで、新たに分離した *gcy* 遺伝子について遺伝子破壊株の作製を行い表現型の解析を行った。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。

## 2. 神経細胞における RNAi による遺伝子機能の阻害の試み

遺伝子機能の逆遺伝学的解析のための別の手法として、RNAi による感覚神経特異的遺伝子の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が、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。

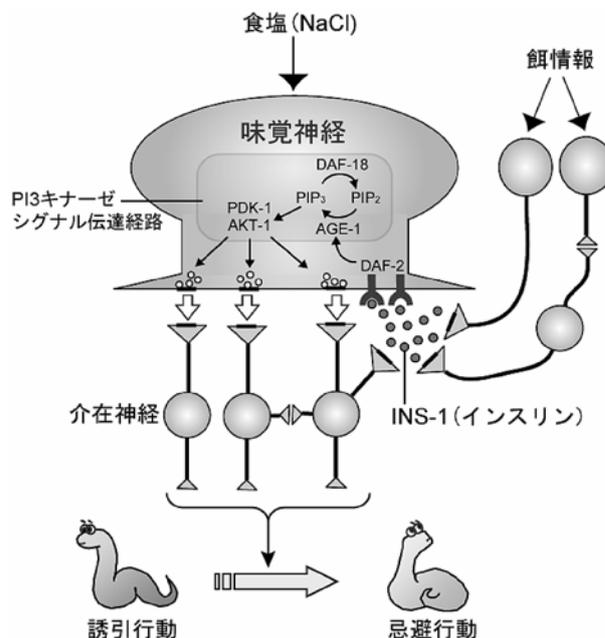
## 3. 感覚神経で繊毛内輸送に関わる DYF-11 の同定

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する因子であることを明らかにした。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 は他の繊毛タンパク質との相互作用を介して繊毛の必須な構成因子の輸送に重要な役割を

担っていることを示唆する。

## 4. 学習に関わるインスリンの機能細胞の同定

線虫は本来、塩化ナトリウムに対して正の化学走性を示す。ところが、塩化ナトリウムと飢餓を同時に経験すると、塩化ナトリウムへの化学走性が著しく低下する。この行動の変化は、餌の情報と感覚情報とを統合して記憶する学習 (化学走性学習) と考えることができる。化学走性学習の分子機構を明らかにするため、この表現型に欠損を示す変異体を複数分離した。研究開始以前に、インスリン-PI3 キナーゼシグナル伝達経路が化学走性学習に関与していることを明らかにした。また、化学走性学習には、左右一対ある ASE 神経のうち右側の細胞である ASER、および、ASE から入力を受ける AIA 介在神経のはたらきが重要であることを明らかにしていた。この経路について、いくつかの介在神経からインスリン様ペプチドが分泌され、ASER 感覚神経に作用し、ASER 内で PI3 キナーゼのシグナル伝達が働くことが学習に重要であることがわかった。



## 5. 学習に関わるカルシニンホモログ CASY-1 の解析

*casy-1* は、化学走性学習に欠損を持つ変異体の原因遺伝子として同定した遺伝子で、カドヘリンドメインを持つ膜貫通蛋白質をコードする。哺乳類の相同遺伝子、カルシニン/アルカデインは中枢神経系の神経細胞のポストシナプス部位に局在することが知られている。また、アルツハイマーの原因遺伝子のひとつ、アミロイド前駆蛋白質と、足場蛋白質 X11L を介して三者複合体を作ること、この三者複合体の形成がアミロイド前駆蛋白質およびカルシニン/アルカデインのプロセッシングを調節することが明らかとなっている。新たに *casy-1* の変異体の分離を行い、以前に単離した変異体と合わせ、細胞外ドメインが学習に重要であることを示唆する結果を得た。また、ヒートショックプロモーターを用いたレスキュー実験により、学習欠損は発生の異常ではなく、成熟後の神経で CASY-1 が働くことが示唆された。

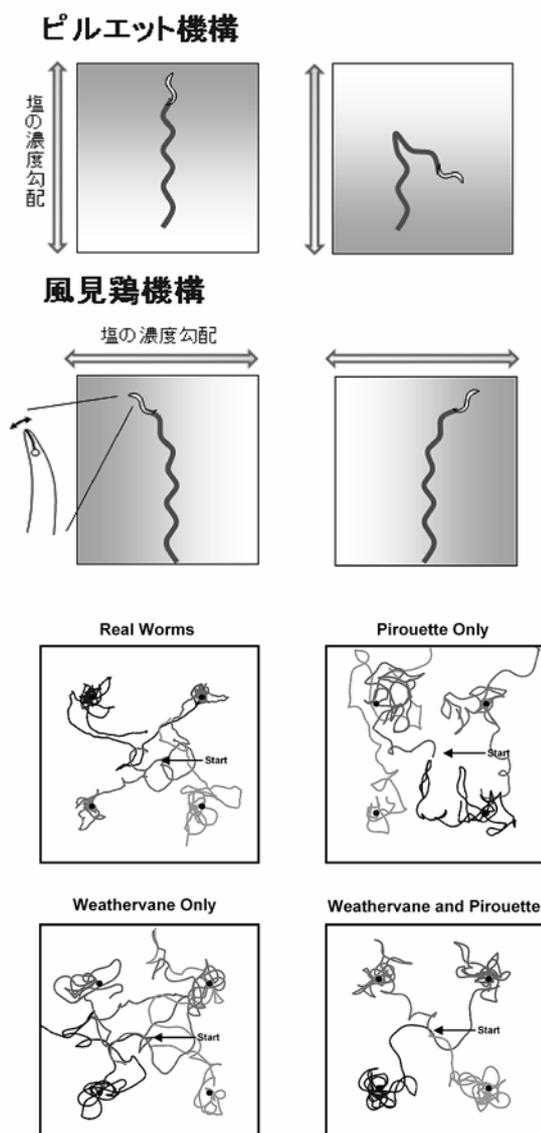
## 6. 嗅覚順応を制御する Go/Gq 経路の機能解析

また、G 蛋白質 Go と Gq が嗅覚順応に関わることを見出した。Go の欠損変異体では嗅覚順応が著しく減少する。また、Gq の活性化型変異体でも嗅覚順応の欠損が起こる。Gq の下流ではジアシルグリセロールが働くことを薬理的、遺伝学的解析から明らかにした。また、Go が Gq の上流で働くことが示唆された。これ

らの経路はいずれも嗅覚神経 AWC の中で働くことがわかった。嗅覚順応に関わる遺伝子はこれまでにいくつか知られていたが、Go、Gq のシグナル伝達経路については全く知られておらず、細胞外からのシグナルが順応を制御する可能性を示した点でこの研究成果は重要である

### 7. 化学走性の新規行動メカニズムの発見

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. elegans* 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：Pirouette mechanism）。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：Weathervane mechanism）。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におけ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て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>

左右の ASE 神経に遺伝子発現レベルでの非対称性があることは *gcy-5,6,7* 遺伝子について 1997 に最初に報告され、その後これらの遺伝子の左右非対称な発現に関わる複数の遺伝子が主にコロンビア大学の Oliver Hobert のグループにより順次明らかにされている。左右の ASE 神経の受容するイオンが異なることは 2001 年にオレゴン大学の Shawn Lockery のグループから報告された。一方、mRNA tagging 法は我々と独立にスタンフォード大学の Stuart Kim のグループによっても開発されたが、少数の細胞に適用した例は報告されていない。線虫の胚の時期の細胞については、フローサイトメトリーにより特定の神経細胞を分離して mRNA を得る方法も行われており、最近この方法を用いた報告がいくつか出されている。このような状況のもと、ASE 神経の左右非対称性について遺伝子発現プロファイリングからアプローチする我々の研究は最先端に位置づけられる。

カルシンテニン/アルカデインは 2001 年に Peter Sonderegger のグループにより発見され、鈴木利治らのグループも参入して生化学的解析が進められ、アミロイド前駆蛋白質との関連性から重要性が認識されているが、生体内の機能については全く見解がない。線虫ホモログ *casy-1* については論文報告はまだないため、変異体の学習欠損に基づく我々の研究は重要な位置を占める。

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、行動の基本原理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>

左右の ASE 感覚神経について mRNA tagging とマイクロアレイによる解析を行った結果、グアニル酸シクラーゼ遺伝子など、特異的な遺伝子の同定に成功した。しかし、レポーター解析により発現を確認して非対称的な発現が確認される率は 35% とあまり高くはなかった。マイクロアレイ解析では発現量の低い遺伝子については信頼性のある結果が得られにくいことは知られており、この方法は候補遺伝子のリストアップのための方法と位置づけ、別の方法（レポーター解析など）により確認するステップが必ず必要である。また、当初計画では左右の ASE 神経に加え、AWC 神経についても解析を行う予定であったが、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 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はかなり行ったが、はっきりした表現型を示すものが少なかった。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を用いて遺伝子欠損の影響を評価するが、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。

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、アッセイ系として用いる可能性は残されている。

#### <今後の課題、展望>

今後、神経細胞の個性についての研究は、神経回路の働きの観点に重点を置いて行う予定である。すなわち、化学走性行動や学習に欠損を生じる変異体から、原因遺伝子の機能部位を決めるアプローチ、特定の神経細胞を破壊して行動の変化を検討するアプローチを主とする。また、行動定量化の系をさらに充実させ、行動と神経回路の関係を明らかにしていくことを通じて、生物全体を系統的に理解することに迫りたい。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

1. 0912042159

Takayama, J., Faumont, S., Kunitomo, H., Lockery, S.R. and Iino, Y.: Single-cell transcriptional analysis of taste sensory neuron pair in *Caenorhabditis elegans*, Nucl. Acids. Res. Epub Oct 29 (2009)

2. 0912042150

Iino, Y. and Yoshida K.: Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*, J. Neurosci. 29(17), 5370-5380 (2009)

3. 0801291146

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

4. 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, 407-20 (2007).

5. 0801291056

Delawary, M., Nakazawa, T., Tezuka, T., Sawa, M., Iino, Y., Takenawa, T. & Yamamoto, T.: Molecular characterization of a novel RhoGAP, RRC-1 of the nematode *Caenorhabditis elegans*., Biochem. Biophys. Res. Commun., 357, 377-82 (2007).

6. 0601272310

M. Matsuki, H. Kunitomo and Y. Iino.

"Gq[alpha] regulates olfactory adaptation by antagonizing Gq[alpha]-DAG signaling in *Caenorhabditis elegans*"

Proc Natl Acad Sci U S A 103: 1112-7 (2006)

7. 0601272031

E. Kage, Y. Hayashi, H. Takeuchi, T. Hirotsu, H. Kunitomo, T. Inoue, H. Arai, Y. Iino and T. Kubo

"MBR-1, a novel helix-turn-helix transcription factor, is required

for pruning excessive neurites in *Caenorhabditis elegans*"

Curr Biol 15: 1554-9 (2005)

##### 2) 学会発表

1. Kazushi Yoshida and Yuichi Iino: Analysis of the neural circuit for the regulation of two behavioral strategies for salt chemotaxis, 17th International *C. elegans* Meeting (2009)

2. 吉田和史、飯野雄一: 線虫 *C. elegans* の塩走性における2つの機構を制御する神経回路と分子, 第32回 日本分子生物学会年会 (2009)

3. Jun Takayama, Serge Faumont, Hirofumi Kunitomo, Shawn Lockery, Yuichi: Identification of genes expressed left/right asymmetrically in ASE neurons of *C. elegans*, Neuronal development, synaptic function & behavior *C. elegans* topic meeting (2008)

4. Jun Takayama, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino: Gene expression profiling of single chemosensory neurons of the nematode *Caenorhabditis elegans*, 第31回日本神経科学大会(2008)

5. 吉田和史、飯野雄一: 線虫の塩に対する化学走性を制御する機構に関与する神経回路の解析, 第31回 日本分子生物学会年会 (2008)

6. Yuichi Iino: wo different mechanisms contribute to salt chemotaxis in *C. elegans*, 16th International *C. elegans* Meeting(2007)

7. Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino: *dyf-11* encodes a novel component of intraflagellar transport machinery required for sensory cilia formation., 16th International *C. elegans* Meeting(2007)

8. 國友博文、飯野雄一: DYF-11/Traf3ip1の繊毛形成における機能, 第30回 日本分子生物学会年会・第80回 日本生化学会大会 合同大会(2007)

9. 高山順、國友博文、飯野雄一: 単一神経細胞の遺伝子発現プロファイリングによる線虫ASE神経で左右非対称に発現する遺伝子の同定, 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会(2007)

10. Jun Takayama, Takeshi Adachi, Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino: Identification of genes expressed asymmetrically in the left/right ASE sensory neurons by the mRNA tagging method, 16th International *C. elegans* Meeting(2007)

11. Yuichi Iino: Behavioral strategy of salt chemotaxis in *C. elegans*., 第30回 日本神経科学大会(2007)

12. Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino: *dyf-11* encodes a putative microtubule-binding protein required for sensory cilia formation., 2nd East Asia *C. elegans* Meeting(2006)

13. Jun Takayama, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino: Gene expression profiling of amphid sensory neurons of the nematode *C. elegans*, 2nd East Asia *C. elegans* Meeting (2006)

14. 高山順、國友博文、飯野雄一: 線虫 *C. elegans* 感覚神経細胞の遺伝子発現プロファイリング, 第28回 日本分子生物学会年会 (2005)

15. Hirofumi Kunitomo, Jun Takayama, Hiroko Uesugi, Yuji Kohara and Yuichi Iino: Genome-wide gene expression profiling of ciliated sensory neurons in *C. elegans*., 15th International *C. elegans* Meeting (2005)