

「生命活動のプログラム」

平成 7 年度採択研究代表者

小原 雄治

(国立遺伝学研究所 教授)

「線虫全発生過程の遺伝子発現プログラム」

1. 研究実施の概要

ゲノム DNA にはその生物を規定するすべての遺伝情報のセット（これをゲノムとよぶ）が書き込まれている。生物が卵から発生していくいわば「台本」が書き込まれているのである。ゲノム DNA の塩基配列の決定は多くの生物で決定あるいは進行中であるが、われわれはまだ塩基配列から「台本」を読み取るルールを知らない。本研究のねらいは、シンプルで優れたモデル系である線虫を使って、その「台本」を明かにしようとするものである。このために「役者」である遺伝子のすべてを見つけだし、それらが発生「いつ、どこで、何を」しているかを網羅的に調べる。その結果から、情報学的手法を駆使して、発生プログラム（すなわち台本）を逆にあぶりだそうとするものである。線虫でのプログラムは高等生物でも共通なことが多いので、ヒトゲノムなどの機能解析への利用価値は測りしれない。

線虫のゲノム DNA の塩基配列は 97% が決定されたが、われわれは相補的なアプローチとして、発現遺伝子の総ざらえをおこなってきた。すなわち mRNA を DNA の形にかえた cDNA のセットを作成し、塩基配列をもとに分類し、これまでに約 10,000 遺伝子を見いだした。これは予想される全遺伝子の 1/2 以上である。これについて、まず発生「どの時期のどの細胞/組織」で発現しているかを解析中である。これまでに 4,000 遺伝子の解析を終え、残りも今年度中に終了予定である。その発現パターンを情報学的手法で似たものに分類する作業（クラスタリング）を進めている。共通パターンの遺伝子群については、発現調節領域や遺伝子機能が共通する可能性が高い。発現調節領域はゲノム DNA の上流領域を情報学的な比較により候補の抽出、実験的検証をおこなっている。遺伝子機能については、RNAi（2 本鎖 RNA 注入による遺伝子機能阻害）で体系的に検討している。現在はまず初期胚に焦点をあて、この局面に関わる全遺伝子の働きと関係付けを行なっている。今後、対象の発生局面を少しずつ後期にずらして、発生「台本」読み取り作業を進めて行く予定である。

2. 研究実施内容

研究内容としては (1) cDNA クローンの系統的分類、(2) 分類した cDNA クローンをを用いた発現パターンと機能の系統的解析、(3) 特異的発現を示す遺伝子について発現パターンの4次元解析、(4) 各細胞系譜での遺伝子発現カスケードの解析、(5) 情報のデータベース化と公開、(6) 生物情報学的解析、に大別できる。

(1) cDNA クローンの系統的分類：

これまでに約 65,000 クローンを両端からの部分塩基配列決定をおこない、約 10,000 の cDNA グループ（同じ遺伝子に由来する）に分類した。Jean Thierry-Mieg との共同研究でゲノムシーケンスとのアラインメントを行なった結果、ゲノムシーケンシングチームによって予測された遺伝子のうち半数はスプライシングパターンや遺伝子構造に修正が必要であることがわかったことから、EST 解析の重要性がまだ残っていることが明らかになった。まずは、この解析で明らかになった alternative splicing を示す遺伝子について cDNA 全長シーケンシングを体系的に進めて、発現遺伝子情報を蓄積する予定である。また、EST の追加、完全長 cDNA クローンの整備も予定している。また、この分類済み cDNA を用いて cDNA マイクロアレイを作成した。

(2) 発現パターンと機能の系統的解析：

胚発生期、幼虫期、成虫期の一生をカバーするマルチウェルフォーマットの in situ ハイブリダイゼーション法が設定でき、第3染色体、X染色体を中心に約 4,000 種をおこなった。残りについても今年度中にハイブリダイゼーションを完了する。発現パターンの縦横な検索が可能になるようアノテーション作業を進めている。

母性発現を示す遺伝子群については、その中でも第1卵割後比較的速やかに消失していくタイプが初期胚の運命決定にかかわる遺伝子に典型的であり、焦点をあてている。これらは総数でも 100-200 と推定されることと、翻訳段階、局在性などの制御を受けている可能性が高いので、順次抗体作成をおこない、タンパクの発現パターン解析を進めている。これらの遺伝子については並行して RNAi 実験をシステムティックに進め、遺伝子機能の検討、関係付けを進めている。

(3) 特異的発現を示す遺伝子について発現パターンの4次元解析：

特異的発現を示す遺伝子については、蛍光標識/共焦点顕微鏡の解析に移し、マーカーとの多重標識法で正確な発現細胞（系譜）の同定をおこなう。昨年度来、胚発生初期の 4D コンピュータグラフィックスの作成を進めているが、これに遺伝子発現パターンを重ねていき、時間軸も含めた4次元での発現パターンデータベースを構築する。

(4) 各細胞系譜での遺伝子発現カスケードの解析：

線虫の受精卵は4段階の不等卵割をおこなって6個の創始細胞（AB, MS, E, C, D,

P4)を生ずる。このうち E からは腸のみ（逆に腸は E のみに由来する）、P4 からは生殖細胞のみ（逆も真）ができ、比較的シンプルな系譜を示す。発現パターン解析でも E 系譜、P4 系譜でのみ時期特異的に発現が見られる遺伝子が多数同定されてきているので、まず胚発生のこの 2 系譜に焦点をあてる。その他の系譜としては、体壁筋、上皮、咽頭などをターゲットにする予定である。

接合体型遺伝子について、発現開始時期で分類し、レポーター遺伝子コンストラクトの卵への導入およびゲノム塩基配列の情報学的手法による比較などから発現調節領域を決定する。塩基配列から代謝酵素などの最終分化産物と、転写因子などの調節因子に分類し、後者について強制発現や遺伝子機能破壊実験をおこない下流遺伝子の検索をおこなう。このためにメンブレン/ガラススライドの cDNA microarray を用いる。これらの結果を総合して、この系譜の中での遺伝子発現カスケードの解明を試みる。関与遺伝子数が多くなっていくので、情報学の新しい手法の開発が必要になってくるが、従来の突然変異体から出発する遺伝解析ではかからなかった遺伝子の同定が期待できる。

生殖系列については母性遺伝子の関わりが大きい。2 細胞期での局在を示す母性遺伝子として *pos-1* を同定したので、最近酵母 two-hybrid 解析で相互作用遺伝子 (*pip*) を同定した。これについて RNAi による機能解析が進行中である。

(5) 情報のデータベース化：

発現パターン画像情報については、ゲノムマップと統合した形で国立遺伝学研究所の WWW 上で最新の情報を公開している。発生過程と統合した形では、上述の 4D コンピュータグラフィックスの上に発現情報をのせていく。塩基配列、マップ、ホモロジー情報ともリンクさせ、時間軸、空間軸、ゲノム軸など縦横に検索できるようにする。これらもできしだい、WWW 上で公開する。

(6) 生物情報学的解析：

まず、遺伝子発現パターンのクラスタリング解析をおこなっている。現在は 80 次元のクラスタリングであるが、その結果をもとに発現パターンのアノテーションの見直し、追加などのフィードバックをおこない、意味のある情報の抽出をおこなう。さらに 4D 発現情報が整備されるにつれ、遺伝子発現と発生過程を再現する計算機モデル化/コンピューターシミュレーションを試みる。その結果から遺伝子機能についての種々の予測をおこない、遺伝子改変の手法を応用して、実験的な検証を試みる。また、染色体構造と遺伝子発現制御の関係を抽出する。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○Kawahara, M., Ishibashi, K., Gu, Y., Terada, Y., Kohara, Y., Marumo, F and Sasaki, S.:

- A water channel of the nematode *Caenorhabditis elegans* and its implications for channel selectivity of MIP proteins.
The Am. J. Physiol.: Cell Physiol. C1459-C1464 (1998).
- The *C.elegans* Sequencing Consortium:
Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology.
Science 282, 2012-2018 (1998).
- Tabara, H., Hill, R.J., Mello, C., Priess, J. and Kohara, Y.: *Pos-1* encodes a cytoplasmic zinc-finger protein essential for germline specification in *C. elegans*.
Development 126, 1-11 (1999).
- Fields, S., Kohara, Y. and Lockhart, D.J.: Functional Genomics.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8825-8826 (1999).