

「ゲノムの構造と機能」

平成 10 年度採択研究代表者

松原 謙一

((財)国際高等研究所 学術参与)

「器官形成に関するゲノム情報の解読」

1. 研究実施の概要

研究代表者は BodyMap という各組織で発現している遺伝子のデータベースの作成に携わってきた。これは、形成の終わった器官の発現の比較であり、遺伝子発現の静的な状態といえる。次の段階として、これらの器官の形成過程でダイナミックに変化する遺伝子発現の解析を行いたいと考えた。そのため、BodyMap と同様先ず対象とするマウス脳の各部位で発現している遺伝子の詳細なリストを作った。次にマウス小脳皮質を主な対象として、この遺伝子発現の動態の解析を行ってきた。遺伝子発現プロファイル解析システムの確立を行い、小脳皮質をはじめとしていくつかの実験系の解析を終了した。また、遺伝子発現プロファイルから個々の遺伝子の機能解析にどの程度迫ることができるのか、培養細胞を用いた実験系で試みた。これらの実験の結果、現時点でリソースの収集という点では他に見られない高精度の遺伝子発現情報が収集できたが、当初の目的である“ゲノム情報の解読”の達成はかなり困難であることがわかった。このため、今後はリソースの整備に焦点を絞り、できるだけ成果を将来の機能解析に使いやすい形で提供するつもりである。

2. 研究実施内容

1) 3'EST の収集

マウス小脳皮質の発生過程

平成12年度に引き続き、収集を続けた。本年度は小脳皮質にかぎらず脳の各部位の EST を収集した。収集及び構造決定した EST は以下のとおりである。

視床下部睡眠時1468、視床下部睡眠妨害1673、視床下部覚醒時1489、

橋部睡眠時1559、橋部睡眠妨害1310、橋部覚醒時1391、

12日胚1917、12日胚脳5493、14日胚脳2113、嗅脳820

これらの結果は、BED (brain EST database)として公開している。

2) ATAC-PCR 法による高精度発現データの収集。

マウス小脳皮質形成過程の遺伝子変化を解析するひとつの手立てとして、小脳変異体マウス (tambaleante と reeler) の遺伝子発現プロファイルの解析から以下の傾向が認められた。

1) 小脳特異的遺伝子は、だいたい減少傾向。プルキンエ細胞特異的遺伝子は、tbl でほぼ完全に消失している。2) 受容体の中で GABAA alpha6 サブユニット等小脳で重要なサブユニットは

減少している。3) ATPase を除くイオンチャンネル、トランスポーターは変異マウスで増加しているものが多い。4) シナプス関連及びグリア関連の遺伝子は変化しない。従って、グリアと神経細胞の比率に大きな変化はない。5) tbl で ribosomal protein が増加傾向。thyroid hormone receptor が顕著に上昇。6) tbl, reeler で tumor necrosis factor が増加。特に3) 5) 6) は予想されなかった知見であり、これらの変異体の小脳変性過程のメカニズムの解析に役立つ。

そのほか、この確立した実験系を使って、脳神経系の生理病理にかかわる以下の基本的現象について高精度の発現データを収集した。測定した遺伝子の個数はそれぞれ約2000個である。

海馬小脳それぞれの細胞の比較、マウス海馬脳虚血時の経時変化、向精神薬投与時の変化、睡眠覚醒時の変化、老齢による変化

3) 培養細胞系を用いた機能解析方法の開発

遺伝子発現プロファイルから遺伝子の機能解析に至る方法論はまったく開発されていない。そのため、いくつかの実験を行い可能性を探ることにした。

a. 培養細胞系を使ったモデル実験 - 神経細胞のアポトーシスの解析

小脳皮質形成過程で起こる現象の代表的なものは、顆粒細胞の増殖、神経軸索の伸長、アポトーシスである。本実験では遺伝子発現プロファイルからアポトーシスに機能的関与する遺伝子を選択することができるかどうか調べた。アポトーシスを神経細胞で誘導する実験系にはいくつかあるが、我々は代表的な神経変性疾患であるトリプレットリピート病の原因遺伝子を導入した PC12 を使った。導入株および対照株それぞれ2株ずつ計4株における誘導後の遺伝子発現の経時的変化(4点)を約1800個の遺伝子について ATAC-PCR で測定した。統計処理を施すことにより、導入株では発現が変化するが、対照株では変化しない遺伝子を69個同定した。うち11個について強制発現によってアポトーシスのプロセスがどのように変わるか、を遺伝子導入実験でしらべたところ、5個の遺伝子に抑制効果、3個の遺伝子に促進効果が認められた。この結果は、バックグラウンドより有意に発現量が変化している遺伝子は活性を持つことを示唆している。換言すれば、遺伝子発現プロファイルから上記のプロセスで活性遺伝子を選択することができる、ということになる。

b. 小脳皮質形成過程に関与している遺伝子の機能解析方法の確立

先程述べたように準備段階である。これまでに以下の点を達成した。

- ・顆粒細胞の初期培養系の確立。

増殖期の顆粒細胞を培養し、in vitro で軸索伸長を行う系を確立した。

- ・レトロウィルスベクターで初期培養細胞へ遺伝子を導入する予定。その増幅維持を行うシステムを確立した。

3. 研究実施体制

(1) 統括グループ

- ① 松原謙一 (国際高等研究所、学術参与)
- ② 全体の統括

(2) 遺伝子発現プロフィール収集グループ

- ① 松原謙一（奈良先端科学技術大学院大学ゲノム機能解析講座 客員教授）
- ② 試料の調製、解析実施、システム向上、データ処理解析、ソフト開発、知識化

(3) 新規遺伝子の機能探索グループ

- ① 北村一泰（大正製薬株式会社創薬企画室 室長）
- ② 本年度は業務なし

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Doyu, M., Sawada, K., Mitsuma, N., Niwa, J., Fujii, Y., Yoshimoto, M., Sobue, G. and Kato, K. Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. *Mol. Brain Res.* 87 (2001) 1-11.
- Yamashita, R., Matsubara, K. and Kato, K. A comprehensive collection of C₂H₂ -type zinc finger motifs compiled by molecular indexing. *Gene*, 274 (2001) 101-110.
- Wyttenbach, A., Swartz, J., Kita, H., Thykjaer, T., Carmichael, J., Bradley, J., Brown, R., Maxwell, M., Schapira, A., Orntoft, T.F., Kato, K. and Rubinsztein, D.C. Polyglutamine expansions cause decreased CRE mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10 (2001) 1829-1845.
- Saito, S., Matoba, R., Kato, K. and Matsubara, K. Expression of a novel member of the ATP1G1/PLM/MAT8 family, phospholemman-like protein (PLP) in the developmental process of mouse cerebellum. *GENE* 279 (2001) 149-155.
- Saito, S., Matoba, R., Ueno, N., Matsubara, K. and Kato, K. Comparison of gene expression profiling during postnatal development of mouse dentate gyrus and cerebellum. *Physiological Genomics*, 8, (2002) 131-137.

(2) 特許出願

なし