

「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

(財団法人国際高等研究所 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

昨年度まで、マウス小脳皮質の生後発生過程における発現量の変動を約2000個の遺伝子について詳細に記録した。この研究をとおして独自開発技術であるアダプター付加競合PCR法(ATAC-PCR)をマイクロアレイに匹敵する遺伝子発現プロファイル技術として完成させた。本年度は、この組織全体のRNAによる観察を延長し、顕微鏡下で小脳皮質の各層を単離し、それぞれの層での遺伝子発現量の動態を測定した。また、小脳皮質と構造や発生過程の類似している海馬歯状回の生後発生過程の遺伝子発現量の動態を測定した。小脳皮質でみられたような遺伝子の発現パターンと機能の間の連関は認められず、2つの過程はまったく異なるものであることがわかった。

2. 研究実施内容

マウスの小脳は胎生10日目頃に中脳と後脳の間が生じた小突起から発生して来るが、組織の形成は出生後に活発に起こり、そのさい経時的に反応が同調して起こるのが特徴である。すなわち、生後4日目頃は顆粒細胞のさかんな増殖が特徴的で、12日目頃になると、顆粒細胞の増殖は完了し、かわって、いわゆる分子層における神経細胞のさかんな樹状突起の伸長と、シナプス形成が主となる。これらの反応は生後3週には終了し、成熟した小脳となる。これら一連の反応はゲノム情報の逐次的な発現によって整然と進められるものと考えられている。本年度は顕微鏡下で各層を分離し、それぞれの層での遺伝子発現量の動態を測定した。

1) laser capture microdissectionによる顕微鏡レベルでの発現プロファイル解析

小脳皮質の各層はlaser capture microdissection(LCM)という技術で採取した。この技術は、組織に薄いフィルムの上からレーザー光を当て、組織のその箇所をフィルムに吸着させ、フィルムとともに組織切片の必要部分を採取する技術である。小脳皮質の各層をLCMで別々に採取して、発現量を約500個の遺伝子についてアダプター付加競合PCR法(ATAC-PCR)で測定した。発生期の小脳は、外顆粒層、分子層、プルキンエ細胞層、内顆粒細胞層からなる。細胞分裂能がある顆粒細胞は外顆粒細胞層に、分化して分裂増殖能もたないものは内顆粒細胞

層に局在する。遺伝子の発現パターンは、だいたい解剖学的な所見と小脳全体の発現データからの推定と一致する。神経細胞の機能に関する遺伝子など、後期に高発現している遺伝子の発現パターンは特徴的で、約70%は図で示した3つの発現パターンのどれかになった。

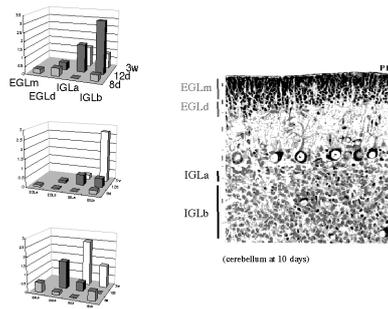
2) 海馬歯状回の生後発生過程の発現プロファイル解析

齧歯類の海馬歯状回は、小脳皮質と同様顆粒細胞で構成されており、また形成する時期もほぼ同じである。また、小脳の顆粒細胞を歯状回に移植すると、歯状回の顆粒細胞に分化する。2つの組織の類似性を想定し、小脳と同一のタイムポイントについて発現量を測定した。約2000個の遺伝子について、マウス海馬歯状回の生後発生過程の発現プロファイル解析を行った。歯状回の場合は発生の初期にproteasomeとリボソーム蛋白が高発現する傾向がみられた以外、小脳皮質のような顕著な機能と発現パターンの連関は認められなかった。従って、この2つの組織の形成過程はまったく異なることがわかった。

3) 分画ハイブリダイゼーション

1995年頃から米国を中心としてDNAマイクロアレイが発現プロファイル解析の代表的な技術として登場してきた。ただ、検出に使っている技術は、いわゆる differential hybridizationであり、特に複雑度が高いmRNAの場合(高等動物の組織など)の場合は、発現量の高いものしか安定した検出ができない。発現頻度の低いmRNAは、標識された核酸中の含量が非常に少なくなるために検出が困難になる。この問題を解決するためには、発現遺伝子を10以上のグループに分画すればよい。それぞれの分画をhybridizationのターゲットにすれば発現量の少ない遺伝子に対応する標識核酸の量が増加し、検出が可能になる。

ただ分画方法はmRNAの大きさや含量と全く無関係でなければならない。分子インデックス法は、この条件を満たす数少ない方法である。cDNAをクラスIIS制限酵素で切断すると配列の一定しない突出末端をつくる。すべての突出末端に対応するように64種類のアダプターを作成する。この中の一つを使って大腸菌リガーゼで結合させると、合致する配列とだけ結合する。アダプタープライマーと oligo-dT プライマーで増幅する。64種類のアダプターについて繰り返すことにより発現遺伝子を64のグループに分けることができる。実際には、64グループでは実験量が大きくなりすぎるため、4つずつあわせて16グループで実験を行った。この方法を使ってマウス大脳と小脳で発現の異なる遺伝子の同定を試みた。約2500個の小脳由来の遺伝子のcDNAマイクロアレイを作成し、通常のターゲットと分画したターゲットを用いて differential hybridizationを行った。有意な発現変化の閾値を2倍とすれば、通常の標識cDNAでは7遺伝子なのに対し、80遺伝子発現に差のある遺伝子が同定できた。



図の説明 .(左)グループB遺伝子の発現パターン。それぞれのグループの平均値を示した。X軸：小脳皮質の層、Y軸：発生後の時間、Z軸：発現量。(右)生後10日の小脳皮質。略語、EGLm：外顆粒細胞層、分裂細胞群。EGLd：外顆粒細胞層、分化細胞群。IGL：内顆粒細胞層。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Matoba, R., Kato, K., Saito, S., Kurooka, C., Maruyama, C., Sakakibara, Y. and Matsubara, K. Gene expression in mouse cerebellum during its development. *Gene*, 241 (2000) 125-131.

Matoba, R., Kato, K., Sakakibara, Y., Maruyama, C., and Matsubara, K. Expression profiling of active genes. in *Compromisos con el futuro del Proyecto Genoma Humano/Current Options for the Human Genome Project*, edited by Fundaci, O BBV. Documenta, Fundaci, O BBV, Bilbao, Spain. pp.113-124,(2000)

Matoba, R., Kato, K., Kurooka, C., Maruyama, C., Sakakibara, Y. and Matsubara, K. Correlation between gene functions and developmental expression patterns in the mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 1357-1371.

Sawada, Ki, Doyu, M., Tanaka, F., Sobue, G. and Kato, K. Detection of triplet repeat expansion in the human genome by use of hybridization intensity. *Anal Biochem.* 286 (2000) 59-66.

Sakai, K., Higuchi, H., Matsubara, K. and Kato, K. Microarray hybridization with fractionated cDNA: enhanced identification of differentially expressed genes. *Anal Biochem.* 287 (2000) 32-37.

Matoba, R., Saito, S., Kurooka, C., Ueno, N., Maruyama, C., Matsubara, K. and Kato, K. Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development. *Physiological Genomics* 4 (2000) 155-164.

Doyu, M., Sawada, Ki, Mitsuma, N., Niwa, Ji., 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.