

国立遺伝学研究所 教授

小原 雄治

「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

開始時の基本構想

線虫は多細胞生物の優れたモデル系である。全細胞系譜、全神経回路が記述され、膨大な遺伝解析の蓄積があり、さらに全ゲノムの塩基配列決定が 3 年後に予定されていた。これらのリソースを基盤に、本研究は、線虫の全発生過程における個々の遺伝子の発現プロファイルを細胞レベルで体系的に解析し、これを通じて生命活動の遺伝プログラムの全体像解読をめざすものである。具体的には、ランダム cDNA クローンを部分塩基配列解析により遺伝子に分類し、これをプローブに発生各期の *in situ* ハイブリダイゼーションを系統的におこない、mRNA の発現パターンを調べあげる。各細胞系譜で特異的に転写される遺伝子について、遺伝子破壊実験などから発現カスケードや遺伝子機能を解析し、さらにゲノム塩基配列から、情報学的手法も用いて発現調節領域の解析をおこなう。多数見いだされている高等生物遺伝子のホモログの機能解明の進展も大きな副産物として期待した。

研究成果

本研究の目的は「ゲノムから個体」がいかにしてできるか、その全貌を遺伝子ネットワークを中心とする遺伝子システムとして理解することである。このために線虫 *C.elegans* の初期発生に焦点をあて、ゲノムの構造、発現、機能、進化研究をいわば四位一体で進め（図 1）、これらの結果を統合して発生の遺伝子システムの解明をめざすとともに、初期発生過程について計算機モデル化を試みてきた。

構造： EST/完全長 cDNA プロジェクトを進め、83,000 クローンの解析から、総数約 2 万遺伝子のうち 10,126 遺伝子の構造を確定するとともに、遺伝子あたり平均 2 弱の alternative splicing パターンを検出した。この結果、ゲノム配列からのコンピュータ予測に基づく線虫タンパクデータベース（WormPep）はその半数に修正が必要となった。また、完全長 cDNA ライブラリーの解析から、新たなトランススクリプスリーダーを 8 種見だし、発生時期での使い分けの傾向を明らかにした。

発現： whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションにより 7,700 遺伝子の全発生ステージにおける mRNA の挙動を明らかにした。*in situ* シグナルのアノテーションとして、胚発生で 10 ステージ、後胚発生で 4 ステージを選び、それぞれについて 10 種程度の発現部位（細胞、組織、領域など）と 3 段階の相対的なシグナル強度を設定し、入力した。結果的におよそ $(10+4) \times 10 \times 3 = 420$ 次元の情報となった。この情報をもとに発現パターンのクラスタリング解析をおこない、各細胞系譜の発生時系列における転写開始時期で分類した。同一クラスタ遺伝子の転写調節領域の検討を進めている。

機能： *in situ* パターンにもとづいて分類した母性発現遺伝子のサブクラスタ（411 遺伝子）について RNAi をおこない、うち強い胚致死表現型が出た 61 遺伝子について

4D 顕微鏡で詳細な解析をおこなった。その結果、受精 / 減数分裂過程の最も早い時期に働くものとしてプロテオソームの関与が明らかになった。

また、分類済みの cDNA を用いる random RNAi を 2600 遺伝子おこなった。

進化： 近縁種のゲノム比較が上記の発現調節領域の推定に有用であることがわかった。さらに、計算機モデル化との関連で、発生パターン、細胞分裂パターン、細胞接触パターンが様々に違っている近縁種についての比較ゲノム解析の計画を進めている。

計算機モデル化：初期卵割の力学モデルを構築した。卵殻と細胞をそれぞれの強度をもった質点のメッシュで表現し、細胞内部に質点をつめた。卵割の時期だけを与え、あとは分裂の様々な力のパラメータを変えることにより卵割のシミュレーションをおこなった。このモデルでは内部の化学反応、遺伝子機能は考慮していないが、これとは別に野生型の卵割を前提に、細胞内、細胞間の遺伝子カスケードのシミュレーションを進めており、これらを将来合体することで、意味のあるシミュレーションに持ち込む計画である。

これらのためには細胞配置情報が重要である。このため膜を蛍光標識したデータから細胞形状を自動的に取得するシステムを構築した。

データベース：ここでの全データは NEXTDB (Nematode Expression Pattern Database) に統合化されており、<http://helix.genes.nig.ac.jp/db/> で公開している。この段階で五條堀教授グループの全面的な支援を受けた。AceDB, WormBase とのリンクも進めた。

初期胚に関する研究

初期胚においては母性 mRNA の翻訳制御が重要であるが、glp-1 mRNA の翻訳制御に pos-1/pip-1 遺伝子が 3'-UTR の特定配列を介して働いていることを明らかにし、複数因子の組み合わせによる翻訳制御の fine tuning の可能性を示した。

mRNA の polyA の長さを測定する方法を開発し、glp-1 mRNA の polyA が翻訳される前側のみ長い成分があることを見出した。

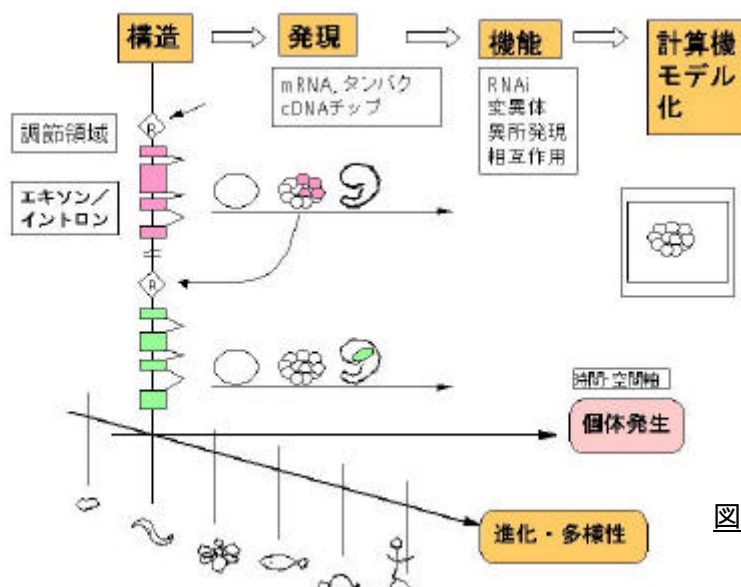


図 1 全体構想の模式図

2 . 主な研究成果

(1)論文発表 (国内 0 件、海外 16件)

- 1) Tabara, H., Motohashi, T. and Kohara, Y.: A multi-well version of *in situ* hybridization on whole mount embryos of *C. elegans*. Nucl. Acids Res. 24, 2119-2124 (1996).
- 2) Kuwahara, 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).
- 3) The *C.elegans* Sequencing Consortium: Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. Science 282, 2012-2018 (1998).
- 4) 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).
- 5) Fields, S., Kohara, Y. and Lockhart, D.J.: Functional Genomics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8825-8826 (1999).
- 6) Motii, M., Yoshida, S., Morita, K., Kohara, Y. and Ueno, N.: Identification of TGF- β -regulated genes in *Caenorhabditis elegans* by differential hybridization of arrayed cDNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 15020-15025 (1999).
- 7) Cassata, C., Kagoshima, H., Andachi, Y., Kohara, Y., Durenberger, M.B., Hall, D.H., and Burglin, T.R.: The Lim Homeobox Gene *ceh-14* Confers Thermosensory Function to the AFD Neurons in *Caenorhabditis elegans*. Neuron 25, 587-597 (2000)
- 8) Asahiha, M., Ishihara, T., Jindra, M., Kohara, Y., Katsura, I. and Hirose, S.: A member of the ancient nuclear receptor class Ftz-F1 is required for embryogenesis, molting and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. Genes to Cells 5, 711-723 (2000).
- 9) Nathalie Pujol, Claire Bonnerot, Jonathan Ewbank, Yuji Kohara and Danielle Thierry-Mieg: The *C. elegans unc-32* gene encodes alternative forms of the 100-kDa α subunit of Vacuolar-ATPases. J. Biol. Chem. (2001 in press)
- 10) Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., and Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. Current Biology, 11 No.3, 171-176.
- 11) Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-I, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Lee, H., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Hartley, J., Temple, G., Brasch, M., Vandenhaute, J., Lamesch, P., Hill, D. & Vidal, M.: Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C.elegans*. Nature Genetics, 27, 332-336 (2001)
- 12) Rosa E. Navarro, Eun Yong Shim, Yuji Kohara, Andrew Singson and T. Keith Blackwell: *cgh-1*, a Conserved Predicted RNA Helicase Required for Gametogenesis and Protection from Physiological Germline Apoptosis in *C. elegans*. Development (in press)
- 13) Momoyo Hanazawa, Makoto Motii, Naoto Ueno, Yuji Kohara and Yuichi Iino: Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 8686-8691 (2001).
- 14) Zeynep Altun-Gultekin, Yoshiki Andachi, Ephraim L. Tsalik, David Pilgrim, Yuji Kohara and Oliver Hobert: A regulatory cascade of three homeobox genes, *ceh-10*, *ttx-3* and *ceh-23*, controls cell fate specification of a defined interneuron class in *C.elegans*. Development 128, 1951-1969 (2001)
- 15) Ken-ichi Ogura^{1,3}, Shohei Mitani², Keiko Gengyo-Ando² and Yuji Kohara¹: Translational control of maternal *glp-1* mRNA by POS-1 and its interacting protein PIP-1 in *Caenorhabditis elegans*. (Submitted)
- 16) Anahita Amiri, Brett D. Keiper, Ichiro Kawasaki, Yuan Fan, Yuji Kohara, Robert E. Rhoads and Susan Strome: An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. Development 128, 3899-3912 (2001)

(2)口頭発表 (内容が重複しているものは除く。国際学会発表を優先。)
招待、口頭講演 (国内 27 件、海外 17 件)

Kohara, Y.: Expression map of the C.elegans genome. The Second France-Japan Bilateral Genome Workshop, Paris, France, March (1996).

Kohara, Y.: International Symposium "Network and Evolution of Molecular Information", Tokyo, April (1996).

Kohara, Y., Motohashi, T., Tabara, H., Watanabe, H., Sano, M., Miyata, A., Mitani, Y., Ohba, T., Iida, K. & Uesugi, H.: Expression pattern map of the C. elegans genome. HGM'97 Tronto, Canada, March (1997)

Kohara, Y.: Expression pattern map of the C.elegans genome. HUGO Pacific Meeting, Pusan, Korea, August (1997)

Kohara, Y.: Embryonic specification of germ line in C.elegans. International Symposium "Gene Functions and Cell Differentiation", Mishima, September (1997)

Yuji Kohara, Tomoko Motohashi, Hiroaki Tabara, Hisako Watanabe, Masako Sano, Akiko Miyata, Yuko Mitani, Tokie Ohba, Kouitchi Iida, Hiroko Uesugi, Keiko Hirono, Tadasu Shin-I, Masumi Obara: Expression Pattern Map of the C.elegans Genome 11th International C.elegans Meeting, May28~June3 1997, Madison,WI, USA.

Yuji Kohara: Expression Pattern map of the C.elegans Genome : 7th International workshop on the Identification of Transcribed Sequences November16-18 1997, Montrey, CA, USA

Kohara, Y. : The Genome as the Blueprint of Life. 1st Annual Symposium on Japanese-American Frontiers of Science, Aug.21-23, 1998 Irvine, CA, USA

Kohara, Y. : Post genomics strategies to understand the molecular mechanisms of C.elegans development. 2nd HUGO Pacific Meeting, 24-26 March 1999, Bali Indonesia.

Kohara, Y. : Post genomics strategies to understand the molecular mechanisms of C.elegans development. Human Genome Meeting 1999, 27-30 March Brisbane, Australia

Yuji Kohara , the Kohara Lab and collaborators: Post genomics strategies in C.elegans. 12th International C.elegans Meeting, June2-6,1999, Madison, WI, USA

Ogura, K. and Kohara, Y.: Studies on POS-1 interacting proteins. 12th International C.elegans Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Kohara, Y.: Post-genomics strategies in C.elegans toward understanding of the molecular mechanisms of development. 6th IUBMB Conference, Oct. 10-13, 1999, Seoul, Korea.

Kohara, Y.: POST-GENOMICS STRATEGIES IN C.ELEGANS TOWARD UNDERSTANDING OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF DEVELOPMENT. 9th Beyond the Identification of Transcribed Sequences Workshop, Oct. 28-31, 1999, Washington DC, USA.

Kohara, Y., Itoh, M., Motohashi, T., Minakuchi, Y., Shin-i, T., Onami, S., Nagaoka, T., Ogura, K. and Hirono, K.: A 4-dimentional database of gene expression and function in C.elegans - Towards "C.elegans as a test tube in silico" The 2nd International Workshop on Advanced Genomics " Genomics and Drug Discovery", 27-28 April, 1999, Chiba, Japan

Kohara, Y.: Genome Biology of C.elegans Development. 3rd HUGO Pacific Meeting, Oct. 18-21, 2000, Shanghai.

Kohara, Y.: Gene Expression Patterns in Caenorhabditis elegans. The 8th International Conference: Peace through Mind/Brain Science, Feb. 3, 2000, Hamamatsu.

Kohara, Y.: Genome Biology of C.elegans Development. The 14th International Mouse Genome Conference, Nov. 8, 2000, Narita.

Kohara, Y.: Comprehensive measurement of C.elegans gene expression. The 1st International Conference on Systems Biology, Nov. 16, 2000, Tokyo.

Kohara, Y. : Functional genomics of C.elegans development. 14th International Congress of Developmental Biology, July 9, 2001, Kyoto.

Yuji Kohara, Ikuko Sugiura, Tokie Oba, Masumi Obara, Takami Suzuki, Tadasu Shin-i, Yumiko Ueta, Mina Iwata, Keiko Hirono, Kyoko Nakata, Masahiro Ito, Yohei Minakuchi, Michiko Serizawa: Developmental expression map of C.elegans genome. 13th International C.elegans Meeting, June 22-26 (2001), Los Angeles, USA.

Danielle et Jean Thierry-Mieg・Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kazuko Oishi, Masako Sano, Hisayo Nomoto, Shinobu Haga, Satoko Nishizaka, Hiroko Hayashi, Fumiko Ohta, Sachiko Miura, Hiroko Uesugi, Yann Thierry-Mieg, Vahan Simonyan, Adam Lowe, Tadasu Shin-I and Yuji Kohara: The worm transcriptome project. 13th International C.elegans Meeting, June 22-26 (2001), Los Angeles, USA.

Ken-ichi Ogura, Shohei Mitani, Keiko Gengyo-Ando and Yuji Kohara: Translational control of maternal glp-1 mRNA by POS-1 and its interacting protein PIP-1. 13th International C.elegans Meeting, June 22-26 (2001), Los Angeles, USA.

Robert Barstead, Anil Dsouza, Mark Edgley, Keiko Gengyo-Ando, Erin Gilchrist, Jeff Holmes, Steven Jones, Yuji Kohara, Martin Lansdale, Sheldon McKay, Etsuko Machiyama, Shohei Mitani, Don Moerman, Gary Moulder, Sachiko Noguchi, Jamie Osborn, Bin Shen, Miwa Tamura, Malini Viswanathan: The C. elegans Knockout Consortium: Interim Report. 13th International C.elegans Meeting, June 22-26 (2001), Los Angeles, USA

小原 雄治:「生物学者から見た分子生物情報学: 生命プログラムと 2000 年問題」
第 7 回分子生物情報(SIGMBI)研究会(人工知能学会第 2 種研究会)1999 年 5 月 26 日、三島

小原雄治: 線虫を用いた発生生物学にゲノムサイエンスが与えたインパクト。
第 32 回日本発生生物学会ワークショップ招待講演、1999 年 5 月 29 日、神戸

小原雄治: 線虫初期胚における創始細胞、特に生殖系列の運命決定の遺伝子機構。
第 22 回東北大学加齢医学研究所シンポジウム、1999 年 6 月 18-19 日、仙台

小原雄治: これからのゲノム研究。微生物ゲノムワークショップ、1999 年 11 月 25 日、瀬戸。

小原雄治: cDNA 解析を軸とする線虫ゲノム研究の総合戦略。第 16 回資源生物科学シンポジウム、1999 年 12 月 17 日、倉敷。

小原雄治: ゲノム発生学ー発生のコンピュータモデル化に向けて。公開シンポジウム「プロテオーム時代の計算情報生物学」2000 年 1 月 18 日、東京。

小原雄治: ゲノム生物学-生命システム解明のための総合研究戦略。日本学術会議公開講演会、「ゲノム科学」の課題と統合的研究推進のための共同体制を考える、2000 年 2 月 4 日、東京。

小原雄治: 線虫ゲノムの遺伝子発現パターン解析。科研費特定領域 A「多元的情報伝達」公開シンポジウム、2000 年 2 月 7 日、東京。

小原雄治: cDNA 解析に基づく線虫ゲノムの読み方。科研費特定領域研究 C 合同公開シンポジウム。2000 年 7 月 19 日、東京。

小原雄治:「遺伝子はいつ、どの細胞で、どの程度発現するか——線虫全遺伝子発現パターンの包括的コンピュータ解析」第 71 回日本動物学会大会シンポジウム、2000 年 9 月 22 日、東京。

小原雄治:「比較ゲノム発現学をめざして: 線虫発生の遺伝子発現マップ」日本進化学会第 2 回大会シンポジウム、2000 年 10 月 9 日、東京。

小原雄治: ゲノムから見た生命: 第 7 回国際生命倫理福井セミナー、2000 年 11 月 2 日、福井。

小原雄治:「これからのゲノム解析と生命科学技術」第 5 回関西科学技術セミナー分科会、2000 年 11 月 15 日、奈良。

小原雄治: これからのゲノム科学 Evo, Devo の楽しみ、特定領域 (B)「メダカに学ぶ脊椎動物ゲノム再編の分子基盤」公開シンポジウム、2001 年 1 月 23 日、東京。

小原雄治: ゲノムから個体へ-機能ゲノム科学の進展、特定領域 A「ゲノムサイエンス」公開シンポジウム、2001 年 1 月 26 日、東京。

小原雄治: 生物進化多様性とゲノム科学の総合、総合研究大学院大学国際シンポジウム一般講演会「21 世紀の総合ゲノム科学」、2001 年 3 月 17 日、横浜。

小原雄治: 生命システムの理解と in silico 再現をめざして。第 28 回知能システムシンポジウム、特別講演。2001 年 3 月 28 日、東京。

小原雄治: ヒトゲノム理解に向けてー線虫ゲノムの網羅的発現機能解析。第 90 回日本病理学会春期総会シンポジウム「疾患モデル研究の戦術・戦略ーポストゲノム時代への視座」2001 年 4 月 5 日、東京。

小原雄治:「線虫の網羅的な遺伝子発現機能解析」 発生のコンピュータ上再現を目指して 。遺伝研・理研 G S C 合同公開シンポジウム、2001 年 6 月 7 日、東京。

小原雄治: 遺伝子数のパラドックスゲノムは生命をどのように規定するのか? 総合研究大学院大学講演会、2001 年 6 月 9 日、東京。

ポスター発表 (国内 60 件、海外 16件)

Kohara, Y., Motohashi, T., Tabara, H., Sugimoto, A., Watanabe, H., Sano, M., Miyata, A.: Expression map of the *C.elegans* genome. HGM'96, Heidelberg, Germany, March (1996).

Hiroaki Tabara, Russell Hill, Craig Mello, Tomoko Motohashi, James Priss, Yuji Kohara: A maternal gene, *Pos-1*, encodes a cytoplasmic Zinc-finger protein and is essential for the fate determination of germline in *C.elegans* 11th International *C.elegans* Meeting, May28~June3 1997, Madison,WI, USA.

Tomoko Motohashi, Hiroaki Tabara, and Yuji Kohara: In situ Hybridization on Larvae and Adults of *C.elegans* 11th International *C.elegans* Meeting, May28~June3 1997, Madison,WI, USA.

Therry-Mieg,J, Thierry-Mieg, D, Shin-i.T, and Kohara.Y : Expressed genes in *C.elegans*. 12th International *C.elegans* Meeting June2-6,1999, Madison, WI, USA

Bertrand, S., Lefebvre, S., Kohara, Y., Munnich, A. and Thierry-Mieg, D.: RNA interference of *SMN*, the gene causing Spinal Muscular Atrophy in humans, leads to embryonic lethality and to germ cell apoptosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Hirono, K., Onami, S. and Kohara, Y.: Systematic RNAi experiments with maternal genes. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Ito, M., Motohashi, T., Minakuchi, Y. and Kohara, Y.: Toward four-dimensional database of gene expression in *C.elegans*. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. and Sugimoto, A.: RNAi screening with a non-redundant cDNA set. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Motohashi, T., Ohba, T., Sugiura, I., Obara, M., Kitayama, S., Suzuki, T., Shin-i, T. and Kohara, Y.: Systematic analysis of mRNA distribution by whole mount in situ hybridization. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Onami, S., Nagaoka, T. and Kohara, Y.: Protein expression pattern analysis of maternal mRNAs. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Shin-i, T. and Kohara, Y.: NEXTDB: the nematode expression pattern map database. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Yoshida, S., Mochii, M., Morita, K., Shimizu, M., Kohara, Y. and Ueno, N.: Isolation and characterization of a gene acting downstream of *sma-2* signaling. 12th International *C.elegans* Meeting, June 2-6, 1999, Madison, WI, USA.

Shin-I, T. and Kohara Y.: NEXTDB: The Expression Pattern Map Database for *C.elegans*. 10th Workshop on Genome Informatics, Dec. 14-15, 1999, Tokyo.

Atsushi KAJITA, Masayuki YAMAMURA, Yuji KOHARA: Computer Simulation of Early Cleavage of *C. elegans* Embryo. 13th International *C.elegans* Meeting, June 22-26 (2001), Los Angeles, USA

Keiko Hirono, Kyoko Nakata, Yumiko Ueta, Mina Iwata, Masahiro Ito and Yuji: Systematic RNAi analysis of maternal genes reveals the function of proteasome in oocyte maturation and fertilization. 13th International *C.elegans* Meeting, June 22-26 (2001), Los Angeles, USA

Tadasu Shin-i and Yuji Kohara: NEXTDB : The nematode expression pattern database. 13th International *C.elegans* Meeting, June 22-26 (2001), Los Angeles, USA

(3) 新聞報道等

日経産業新聞1998年10月14日

科学新聞1997年5月30日

読売新聞2000年12月25日夕刊

朝日新聞2000年8月2日夕刊