

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510196

研究課題名（和文） 機能ゲノミクスによる線虫 *C. elegans* の感覚受容機構の解明研究課題名（英文） Functional genomics of the chemosensory neurons of *C. elegans*.

研究代表者

國友 博文 (KUNITOMO HIROFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：20302812

研究成果の概要：

神経系は多様な細胞種から構成されている。本研究は、土壌線虫 *C. elegans* を用いて、感覚神経の多様性が生じる仕組みをゲノム機能解析の手法を用いて明らかにすることを目標とした。まず、我々が開発した細胞特異的な遺伝子発現解析法を用いて、味覚神経のみに発現している遺伝子を多数見出した。次に、感覚神経で発現している新規遺伝子 *dyf-11* の機能解析を行い、感覚繊毛の形成に必須な細胞内の物質輸送に関わっていることを明らかにした。この遺伝子は哺乳類にも相同遺伝子があり、腎上皮細胞の繊毛に局在することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：化学感覚、線虫、繊毛、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

動物は環境からのさまざまな情報、たとえば、機械刺激、光、低分子化合物、イオン、温度などを刺激選択的な感覚神経によって感受する。種類の異なる感覚神経は、それぞれ特徴的な形態と刺激受容機構、組織・神経回路内での役割を持っている。この多様性は発生の過程におけるゲノム上の遺伝子の動的な発現制御によってもたらされるが、その仕組みは十分に解明されていない。我々はこれまで、線虫 *C. elegans* の特定の細胞群

から mRNA を濃縮精製する方法、mRNA tagging を開発し、感覚神経の遺伝子発現プロファイリングを行った (Kunitomo et al. 2005)。また、おもに遺伝学の手法を用いて、化学走性行動の可塑性に関与する神経回路とそこで働く遺伝子パスウェイを明らかにしてきた。これらの研究を基盤として、線虫の基本的な刺激受容の仕組み、および感覚受容の多様性が生ずる仕組みを、ゲノムの機能発現という点から明らかにする構想に至った。

一方、感覚神経の多くは、刺激の受容に必要な共通の構造的特徴として感覚繊毛をもつ。繊毛は微小管の軸系に沿って細胞膜が突起した毛様のオルガネラであり、脊椎動物の体を構成するほとんどの細胞は一次繊毛と呼ばれる非運動性の繊毛を有することが知られている。たとえば、血管内皮や腎臓の尿細管の細胞では、繊毛は血液や尿などの流れを感知している。近年、受容体のみならず、Hedgehogのような細胞間シグナル伝達経路が働く場として繊毛が重要なことが示唆されている。このような経緯から、繊毛は細胞感覚一般に働くオルガネラと考えられるようになった。ところで、繊毛の形成および維持には、その構成タンパク質を繊毛内の適切な場所に輸送するシステム、鞭毛内輸送(IFT)が必要である。IFTでは、微小管の成分や繊毛の先端に発現される受容体などが、15以上の構成因子からなるIFT複合体とともにキネシンII(順行性)およびダイニン(逆行性)によって軸系上を輸送される。最近になって、IFTは繊毛の形成だけではなく、シグナル伝達そのものにも関与していることが示された。IFT複合体の構成因子の同定やIFTの分子メカニズムの解明は、強力な遺伝学が使えるクラミドモナスや線虫などのモデル生物を用いて急速に進展しているが、十分ではない。我々は、上述の感覚神経で特異的に発現している遺伝子の機能解析を進める過程で、繊毛を持つ生物に保存されたチューブリン結合タンパク質をコードしている新規遺伝子、*dyf-11*を見出した。この遺伝子の欠損株は感覚繊毛の形態が異常で、水溶性化学物質の受容に欠損を示した。遺伝子の構造上の特徴や発現の制御様式から、DYF-11タンパク質は繊毛の構成因子であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

神経細胞の個性は、その多くの部分が発生過程における遺伝子発現の違いによって作り出される。従って個々の神経細胞について網羅的な遺伝子発現解析を行い、細胞特異的な遺伝子の機能を明らかにすることによって、神経細胞の多様性の分子基盤が明らかにできると考えられる。

個体を構成するごく一部の細胞について網羅的な遺伝子発現解析を行った研究は少ない。この理由として、複雑に入り組んだ器官・組織の少数の細胞のみから、任意の条件で、選択的にmRNAを精製することが技術的に難しい点が挙げられる。我々は線虫の特定の組織で発現しているmRNAを選択的に精製する方法、mRNA taggingを開発した。これは、組織・細胞特異的のプロモーターを用いて発現させたエピトープタグ付きのポリ

(A)結合タンパク質(PABP)をタグを手がかりとして精製することにより、標的とした細胞で発現しているmRNAのみを精製する方法である(図1)。本研究の開始以前に全感覚神経(個体あたり約50細胞)の遺伝子発現解析には成功していた。本研究課題では、mRNA tagging法を改良して個々の感覚神経の遺伝子発現解析を行い、その結果を相互に比較して感覚神経の多様性がいかにゲノムの動的な機能発現によって作り出されているか明らかにすることを目的とした。

- 1) 組織特異的のプロモーターでFLAGタグ付きPABPを目的の細胞に発現させる



- 2) 細胞のpoly(A) RNAとFLAG-PABPをin vivo クロスリンクする

- 3) poly(A) RNA/FLAG-PABP複合体を精製する



- 4) クロスリンクをはずし複合体からpoly(A) RNAを回収する



- 5) マイクロアレイのプロープ作製に用いる

図1 mRNA taggingの概要

また背景欄に既述したように、繊毛は細胞感覚に中心的な役割を持つオルガネラであり、その構成因子の同定や形成の分子機構の解明はここ数年進展が著しい。*dyf-11*遺伝子の機能解析を進め分子機能を明らかにすることにより感覚繊毛形成の分子機構の解明に貢献できると考えられた。

## 3. 研究の方法

- (1) 線虫の個々の感覚神経の網羅的遺伝子発現プロファイリング

線虫の頭部にはアンフィドと呼ばれる感覚器があり、左右一対からなる12種類、計24個の感覚神経で種々の化学物質、浸透圧、温度、物理的刺激などを感知している。線虫の主要な味覚神経であるASEと嗅覚神経AWCは、受容する物質や発現している遺伝子など左右の細胞で性質が異なることが知られている。まず、これらをモデルとして単一ニューロンの遺伝子発現解析系を確立することを目指した。具体的には、次の手順で実験を進めた。1. ASEの左右それぞれのニューロンでタグ付きPABPを発現させた形質転換株を作製した。2. 個体あたり一個の細胞から選択的に転写産物を精製できるように、mRNA tagging法のプロトコルを最適化した。その方法を用いて左右のASE細胞からmRNAを精製した。3. 線虫のほぼ全遺伝子のプローブがスポットされたゲノムオリゴマイクロアレイを用いて発現解析を行い、細

胞特異的に発現している遺伝子の候補を得た。4. 細胞特異的遺伝子の候補について、レポーターを作製して実際の発現細胞を同定した。5. バイオインフォマティクスにより細胞特異的遺伝子群の特徴付けを行った。また、転写調節領域の解析を行って細胞特異性を決めるシスエレメントの特徴を抽出した。6. 細胞特異的遺伝子群の機能解析を進めた。いくつかの遺伝子について遺伝子欠損株を得て表現型を観察した。さらに、研究開始当初は発生の時期ごとに発現解析を行い細胞の分化を遺伝子発現の差異から説明することを計画していたが、上述の過程に予想以上の期間を要したため至らなかった。

#### (2) *dyf-11* 遺伝子の分子機能の解明

感覚神経特異的遺伝子として得られた C02H7.1 は、他生物で高度に保存されていることや転写調節領域の塩基配列の特徴、遺伝子欠損株の性質などから、繊毛の形成に必須な遺伝子であると予想された。相補性検定やレスキュー実験により、この遺伝子が化学感覚に異常を示す *dyf-11* 変異の原因遺伝子であることを突き止めた。変異株を取得して表現型を観察したところ、感覚繊毛の形成不全を示唆する *Dyf* 表現型を示した。本研究課題では、おもに分子遺伝学の手法を用いて、*dyf-11* 遺伝子の発現制御機構と遺伝子産物の分子機能の解明を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 線虫の主要な味覚神経、ASE 神経の網羅的遺伝子発現プロファイリング

ASE 神経の左右の細胞それぞれでタグ付きの PABP を発現する線虫株を作製した。PABP を発現させるプロモーターとして、左の ASE 細胞(ASEL)には *gcy-7* プロモーター、右の ASE 細胞(ASER)には *gcy-5* プロモーターを用いた。作製した株について NaCl など水溶性物質への応答性を観察し、PABP の強制発現により細胞の性質が変化していないことを確認した。

従来の mRNA tagging 法を用いて左右の ASE 細胞から mRNA の精製を行ったところ、収率が低く非特異的な核酸の混入が見られた。これは、標的とした細胞が少なくなったため全体の量に占める目的の mRNA の割合が低くなり、精製過程で生じる非特異的な mRNA の吸着が無視できない量になってしまった結果と考えられた。マイクロアレイを用いた発現解析に不都合であるため、mRNA tagging 法のプロトコルを改良し、少ない細胞からでも選択的に mRNA を精製できるようにした。これにより、既知の ASEL 特異的転写産物の濃縮率は 10-90 倍、ASER の転写産物の濃縮率は 5 倍となった。この mRNA

tagging 法の改良によって、個体あたり一個の細胞から転写産物を濃縮精製できるようになり、各神経の発現解析が可能となった。

線虫のゲノム上に予想されている全遺伝子の 90%程度に相当する 20,966 遺伝子を検出できるゲノムオリゴヌクレオチドアレイ(ワシントン大学より購入)を用いて左右の ASE から精製した mRNA の発現解析を行い、ASEL で有意に高く発現していると予想される遺伝子 16 個、ASER で高く発現していると予想される遺伝子 102 個を同定した。その中には、既知の細胞特異的遺伝子 13 個のうち 8 個(62%)が含まれた(図 2)。

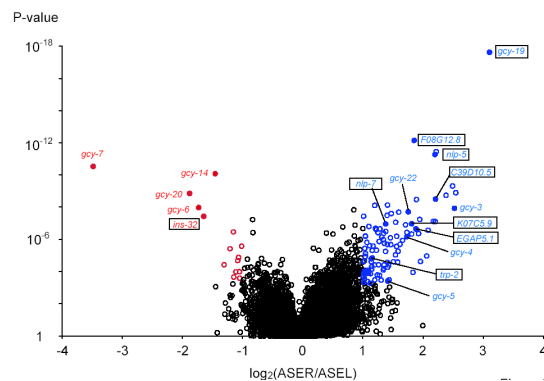


図2 マイクロアレイを用いた左右の ASE 細胞の発現解析 ASEL または ASER で有意に強く発現している遺伝子を、それぞれ、赤または青で示す。枠で囲った遺伝子は本研究で細胞特異的な発現を確認した遺伝子。

上で同定した細胞特異低遺伝子の候補が実際に ASE の左右いずれで発現しているか確認するため、レポーターを作製して発現パターンを観察した。その結果、ASEL 特異的遺伝子としてインスリン様ペプチドをコードする *ins-32*、ASER 特異的遺伝子として受容体型グアニル酸シクラーゼ *gcy-19*、神経ペプチド *nlp-5* および *nlp-7*、TRPC カチオンチャンネル *trp-2*、および複数の線虫特異的な機能未知の遺伝子を見出した(図 3)。

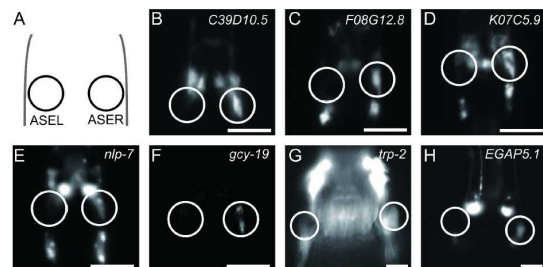


図3 新規に同定した細胞特異的遺伝子の発現パターン

ASE 細胞の左右いずれかで発現する既知の遺伝子については、miRNA や複数の転写因子が関与するフィードバックループによって転写調節されていることが知られている(Johnston et al., 2005, Johnston and

Hobert, 2003)。新たに見出した細胞特異的遺伝子について転写調節機構の解析を行った結果、いずれの遺伝子も既知のものと同じ機構によって転写調節されていることが示唆された。また、ASEで発現する遺伝子の多くは、C2H2型 Zn-finger モチーフを持つ転写因子 CHE-1 の結合配列をその転写調節領域に持つ。今回新たに見出した遺伝子を含めて転写調節領域の解析を行った結果、ASEL 特異的遺伝子の CHE-1 結合配列では、ASE の左右どちらにも発現する遺伝子や ASER のみで発現する遺伝子に見られる結合配列とは異なる特徴を持つ可能性が示唆された。

これら一連の結果から、味覚神経 ASE の左右の細胞は、これまで考えられていた以上に実質的に違いがあることが示唆された(高山ら、論文投稿中)。本研究は線虫の個々の神経について網羅的な遺伝子発現解析を行える可能性を初めて示すものであり、今後他の感覚神経、介在神経に発展させる予定である。

## (2) *dyf-11* 遺伝子の分子機能の解明

前述のように、感覚神経で特異的に発現する遺伝子の解析を進める過程で、繊毛の形成と維持に必須な役割を持つ *dyf-11* 遺伝子を同定した。変異株を取得して表現型を観察したところ、感覚繊毛の形成不全を示唆する *Dyf* 表現型を示した。本研究課題では、発現解析で得た変異体や cDNA クローンを用いて、*dyf-11* の分子機能の解明を進めた。

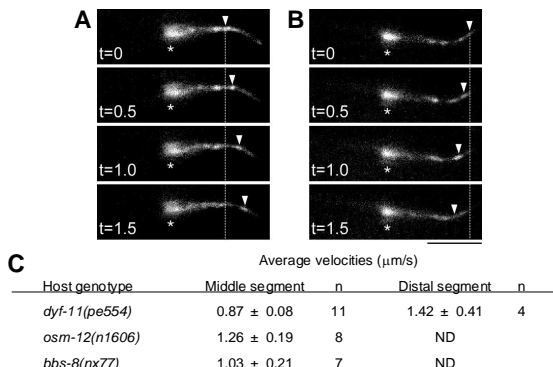


図4 DYF-11 タンパク質の繊毛内移動

DYF-11 タンパク質は繊毛の内部を前方(A)および後方(B)へ移動し、移動速度は既知のIFT構成因子のそれと良く一致する(C)。

*dyf-11* はほぼすべての感覚神経で発現し、その発現は既知の繊毛関連遺伝子と同様にRFX型転写因子 DAF-19 による調節を受けていた。*dyf-11* 変異体は感覚繊毛が短く、化学走性や高浸透圧忌避に異常を示した。細胞特異的なレスキュー実験の結果、*dyf-11* は細胞自律的に機能することがわかった。

DYF-11 遺伝子産物と蛍光タンパク質の融合タンパク質を用いて細胞内局在を観察したところ繊毛に局在し、IFT因子の特徴、すなわち、繊毛に沿った両方向の移動が観察されたことから、DYF-11は新規のIFT因子であると考えられた。(図4)

DYF-11のほ乳類のオルソログTraf3ip1は、サイトカインのシグナル伝達で働くTRAF3に結合し、その細胞内局在を調節することが示唆されている。Traf3ip1はまた、インターロイキン13受容体サブユニットと相互作用してSTAT6の活性を負に調節する因子としても同定されているが、繊毛への関与は知られていなかった。腎上皮由来のMDCK細胞を用いて免疫染色を行ったところ、Traf3ip1は一次繊毛に局在していた(図5)。

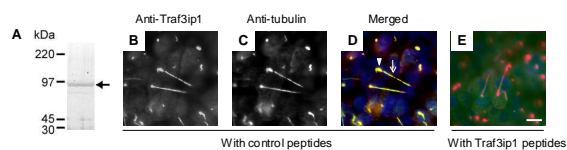


図5 Traf3ip1は繊毛に局在する

(A)抗Traf3ip1抗体は約90kDaのタンパク質を検出する。(B)抗Traf3ip1抗体は腎上皮細胞由来MDCK細胞の繊毛を染色する。染色パターンは抗チューブリン抗体による染色(C)と一致する(D)。

さらに機能ドメイン解析の結果、DYF-11の繊毛形成の機能には、オルソログ間でよく保存された微小管結合領域ではなく、coiled-coilドメインが重要なことが明らかになった。

これら一連の結果は繊毛の形成と機能に必須な役割を持つ新規のIFT関連タンパク質DYF-11/Traf3ip1の同定と機能解析として、学術雑誌に発表した(Kunitomo and Iino 2008)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Ikeda DD, Duan Y, Matsuki M, Kunitomo H, Hutter H, Hedgecock EM, Iino Y. CASY-1, an ortholog of calsyntenins/alcadeins, is essential for learning in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 105 (13): 5260-5 (2008). 査読有り

Kunitomo H, Iino Y. *Caenorhabditis elegans* DYF-11, an orthologue of mammalian Traf3ip1/MIP-3, is required for sensory cilia formation. Genes Cells. 13 (1): 13-25 (2008). 査読

有り

[学会発表](計7件)

國友博文

C.エレガンスの塩化ナトリウムに対する走性行動の餌と塩による調節

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会

2008年12月11日

神戸

Jun Takayama

Gene expression profiling of single chemosensory neurons of the nematode *Caenorhabditis elegans*.

第31回日本神経科学大会

2008年7月10日

東京

Jun Takayama

Identification of genes expressed left/right asymmetrically in ASE neurons of *C. elegans*.

Neuronal development, synaptic function & behavior *C. elegans* topic meeting #2

2008年7月1日

マジソン

高山順

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年12月14日

横浜

國友博文

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年12月13日

横浜

Jun Takayama

Identification of genes expressed asymmetrically in the left/right ASE sensory neurons by the mRNA tagging method.

16th International *C. elegans* Meeting

2007年6月28日

ロサンゼルス

Hirofumi Kunitomo

*dyf-11* encodes a novel component of

intraflagellar transport machinery required for sensory cilia formation.

16th International *C. elegans* Meeting

2007年6月28日

ロサンゼルス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國友 博文 (KUNITOMO HIROFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 20302812

(2) 研究分担者

飯野 雄一 (IINO YUICHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 40192471

(3) 研究協力者

高山 順 (TAKAYAMA JUN)

東京大学・大学院理学系研究科・大学院学生