

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：63801
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22241047
 研究課題名（和文） 発現パターンに基づく線虫遺伝子制御ネットワーク研究
 研究課題名（英文） Expression-pattern based studies on gene regulation network in the nemetode *C. elegans*

研究代表者
 小原 雄治（KOHARA YUJI）
 国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任教員
 研究者番号：70135292

研究成果の概要（和文）：

1) 初期胚における mRNA 局在機構について、線虫 *C.elegans* 2細胞期にそれぞれ後極側、前極側に局在する *pos-1* mRNA、*mex-3* mRNA の局在に必要なシス配列とトランス因子を見出し、局在機構とその意義の手掛かりを得た。2) 線虫初期胚において、 β -catenin HMP-2 が Src の下流で Wnt パスウェイと並行して内胚葉誘導と ABar 紡錘体方向決定にシグナル伝達で機能していることを見出した。3) 細胞特異的転写制御ネットワークについて、温度感受性神経細胞 AFD の分化に必須である *gcy-8* と *gcy-18* 遺伝子のプロモータ活性領域を同定し、この発現に必要な転写因子 CEH-11 と TTX-1 が協調的に働いていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

1) We have found the cis- and trans-elements for the localization of *pos-1* mRNA to the posterior side and *mex-3* mRNA to the anterior side in the 2 cell stage embryo of *C.elegans*, and have obtained the clue to understand the mechanisms of mRNA localization. 2) Based on the analysis of β -catenin HMP-2 in *C.elegans* early embryos, we have proposed that HMP-2 functioned downstream of the Src signaling pathway and contributed to endoderm induction and ABar spindle orientation, in parallel with the Wnt signaling pathway. 3) We identified the regions of promoter activity for *gcy-8* and *gcy-18*, essential genes for the thermosensory neuron AFD, and found that the transcription factors CEH-11 and TTX-1 functioned in the regulation of the gene expression coordinately.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2011年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2012年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
年度			
年度			
総計	29,700,000	8,910,000	38,610,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：遺伝子 発現調節 ゲノム 発生分化 mRNA 3'-UTR 局在化

1. 研究開始当初の背景

線虫 *C.elegans* は体細胞数が約 1000 個と非常にシンプルな体制でありながら、筋肉系、

神経系、消化管、上皮、生殖腺など動物として基本的な体制を備えている。受精卵から成虫にいたる全細胞系譜や全神経回路網が明

らかにされており、個別細胞レベルの遺伝子機能研究が可能である。受精から次の世代の受精まで3日程度と世代時間が短く、多数の子孫(1匹あたり通常300)を残すので遺伝解析にも適している。100Mbという多細胞生物としては最小のゲノムをもち、1998年に多細胞生物として最初に全ゲノム塩基配列が決定され、約2万個の遺伝子が見出された。これらについては突然変異体の分離に加え、RNAiにより体系的な機能解析も多数行われてきた。このように線虫 *C.elegans* は「すべて」を明らかにする方向で世界中の研究が進み、コンピュータ上での発生再現やシミュレーションをめざすシステム生物学へ向かっている。

このような中で我々は従来から cDNA プロジェクトを進め、完全長法など数種類の cDNA ライブラリ作成法を用いて、全遺伝子2万中、7割の14,000遺伝子の cDNA を獲得し、その遺伝子構造を明らかにしてきた。この cDNA を用いたシステムティックな whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション法を開発し、11,309遺伝子について受精卵から成虫の全生涯にわたる発現パターンを22万枚の *in situ* イメージとともに NEXTDB (<http://nematode.lab.nig.ac.jp/>) として公開してきた。この結果をもとにした様々な発生時期における遺伝子機能研究について多くの共同研究の成果をあげてきたが、我々の研究室で従来より進めてきた初期胚等における mRNA 局在機構、転写制御機構の研究をさらに進め、遺伝子ネットワーク理解につなげることを目指した。

2. 研究の目的

線虫 *C.elegans* の発現パターンデータベースを活用して初期胚における mRNA 局在、転写制御に関わるシス因子とトランス因子を同定し、制御遺伝子ネットワークを明らかにする。このために、

1) mRNA 局在機構については、後極に局在する *pos-1* mRNA についてシス因子、トランス因子の解析を進め、局在制御機構のモデルとして明らかにする。*mex-3* 及びその他の時期に局在を示す遺伝子についても同様の解析で因子を明らかにし、それぞれの共通点や相違点から初期胚での制御機構の全体像を推察する。

2) 転写制御の遺伝子ネットワークについては、腸系譜での制御ネットワークを明らかにする。NEXTDB から明らかになった多様な遺伝子クラスタについて解析を広げ、初期胚での制御遺伝子ネットワークの大枠を記述する。

3. 研究の方法

1) 初期胚における mRNA 局在機構につい

て

・モデル系として、2細胞期の前極側、後極側にそれぞれ局在を示す *mex-3*、*pos-1* mRNA について、局在のためのシス配列とトランス因子の同定を行う。

・同様の他の遺伝子 mRNA について解析を広め、初期胚での mRNA 局在機構を明らかにする。

2) 初期胚における転写制御メカニズムについて

・発生進行に伴い転写開始が順々に起こる遺伝子群についてその上流配列からシス配列を同定し、さらにトランス因子を探索し、制御関係を明らかにする。

・他の細胞系譜で同様の解析を行い、初期胚を中心に転写制御の遺伝子ネットワークを明らかにする。

4. 研究成果

1) 初期胚における mRNA 局在機構について

(1) *pos-1* mRNA について局在に必要なシス配列として2つの CYCACA のタンデムリピートと進化的に保存された30塩基を同定した。さらに、これと相互作用し局在化に関わるトランス因子として RNA 結合タンパク質である MEX-1 を同定した。また、MEX-5 もシス配列に結合することを見出した。これに加え、mRNA 分解に関わる CCR4-NOT 複合体の因子である *let-711* と *ccf-1* がこの局在化に必要なことを見出した。

(2) *pos-1* とは逆に2細胞期前側に局在する *mex-3* mRNA の局在化機構についても新たな知見を得た。シス配列については、3'-UTR 上の179塩基の領域が局在化に必要な十分であり、この中の線虫近縁種で保存されている35塩基部分が重要であることを見出した。MEX-3 タンパク質自体も前側への局在が見られるが、この必要十分部分を欠くと新生 MEX-3 タンパク質の局在化も見られなくなることから、mRNA 局在化がタンパク質局在化に重要な働きをすることを示唆した。トランス因子については少なくとも CCCH タイプ ZINC フィンガーを持つ RNA 結合タンパク質である MEX-5 が受精後の初期胚で働いていることを明らかにした。MEX-5 タンパク質は上記35塩基配列に特異的に結合することも確認でき、*in situ* ハイブリダイゼーションシグナル強度などから mRNA 分解からの保護の方向の働きをしていると考えられた。MEX-5 は *mex-3* mRNA と同じく前側に局在するが、これは極性決定因子 *par-1* の働きによる。また、MEX-3 タンパク質は後極側の細胞運命を決定する転写因子 PAL-1 の発現を抑えることが知られている。さらに、MEX-5 の働きをさらに確実にするために、膜に局在する PH ドメインを結合させた

mCherry::MEX-5 を強制発現させたところ、内在性の mex-3 mRNA の膜局在が見られた。このことから MEX-5 がポジティブに mex-3 mRNA 局在を制御していることを明らかにした。以上のことから、初期胚極性を決める par-1 により MEX-5 が前側に局在し、前側の mex-3 mRNA を保護し前側での MEX-3 タンパク質の局在を推進する。この結果、PAL-1 の前側での働きが抑制され、前後の細胞運命の違いにつながっていくというモデルを構築した。

2) 初期胚における遺伝子制御ネットワーク解明

線虫 *C.elegans* の初期胚において、 β -catenin HMP-2 が Src の下流で Wnt パスウェイと並行してシグナル伝達で機能していることを見出した。Wnt と Src パスウェイは発生におけるシグナル伝達経路として広く使われており、 β -catenin は両方のパスウェイでシグナル伝達とカドヘリン細胞接着複合体の因子として使われているが、線虫 *C.elegans* では β -catenin HMP-2 は細胞接着に関与しているが、シグナル伝達機能については不明であったものである。線虫初期胚では Wnt と Src パスウェイは 4 細胞期の内胚葉誘導に関与し、ABar 細胞の紡錘体の向きに関与する。発現パターンに基づき、初期胚で重要な機能が予想される遺伝子群の RNAi 実験から、HMP-2 が Src パスウェイで機能していることを見出した。HMP-2 は細胞境界と核に局在し、細胞境界の局在は SRC-1 に負に制御されていること、SRC-1 依存的にチロシン酸化が行われることを見出した。これらのことから、HMP-2 は Src 経路の下流で働き、Wnt 経路と並行して、内胚葉誘導と ABar 紡

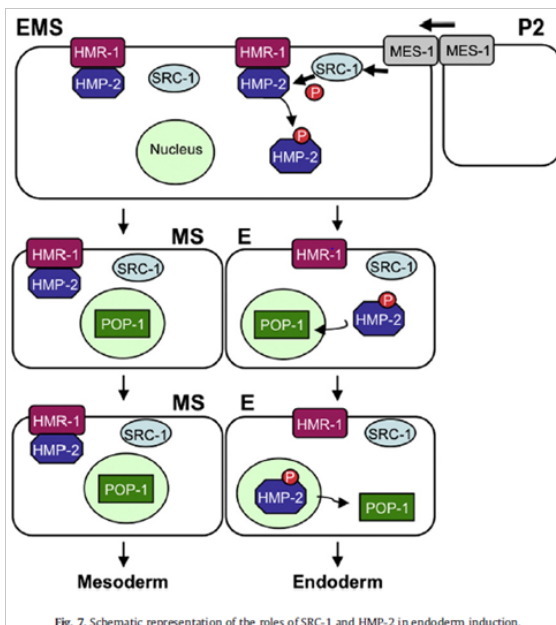


Fig. 7. Schematic representation of the roles of SRC-1 and HMP-2 in endoderm induction.

錘体方向決定に機能していることを提案した (図参照)。

3) 細胞特異的転写制御ネットワーク
温度感受性神経細胞 AFD の分化決定の転写制御機構を調べた。マーカーとして AFD のみで発現が見られてかつ AFD 分化に必須である gcy-8 と gcy-18 遺伝子発現を用い、両遺伝子のプロモータ活性領域を同定した。転写因子 CEH-11 と TTX-1 は両遺伝子の発現に必要であるが、両遺伝子のプロモータ活性領域への CEH-11 と TTX-1 の結合を確認し、変異導入によってこの結合が両遺伝子発現に必須であることを明らかにした。これらの結合配列は線虫近縁種で保存されていた。さらに通常は両遺伝子を発現しない化学物質受容性の神経細胞 AWB に CEH-11 と TTX-1 の両方を異所発現させると両遺伝子の発現が見られた。これらのことから、CEH-11 と TTX-1 が協調的に両遺伝子の発現制御に働いていると考えられる。

4) 引き続き遺伝子発現データベースを活用した内外の共同研究を推進した。

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 4 件) すべて査読有り。
- ① H. Kagoshima, K. Kito, T. Aizu, T. Shin-i, H. Kanda, S. Kobayashi, A. Toyoda, A. Fujiyama, Y. Kohara, P. Convey and H. Niki: Multi-Decadal Survival of an Antarctic Nematode, *Plectus Murrayi*, in a -20°C Stored Moss Sample. **CryoLetters** Volume 33, No 4 July/August 2012
 - ② Honnen SJ, Büchter C, Schröder V, Hoffmann M, Kohara Y, Kampkötter A, Bossinger O.: *C. elegans* VANG-1 Modulates Life Span via Insulin/IGF-1-Like Signaling. **PLoS One**. 2012;7(2):e32183. [10.1371/journal.pone.0032183](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032183)
 - ③ E. Sumiyoshi, S. Takahashi, H. Obata, A. Sugimoto and Y. Kohara: The beta-catenin HMP-2 functions downstream of Src in parallel with the Wnt pathway in early embryogenesis of *C. elegans*. **Developmental Biology** 355, 302-312 (2011) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.034>
 - ④ M. Mangone, A. P. Manoharan, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, T. Han, S. Mackowiak, E. Mis, C. Zegar, M. R.

Gutwein, V. Khivansara, O. Attie, K. Chen, K. Salehi-Ashtiani, M. Vidal, T. T. Harkins, P. Bouffard, Y. Suzuki, S. Sugano, Y. Kohara, N. Rajewsky, F. Piano, K. C. Gunsalus, J. K. Kim: The Landscape of *C. elegans* 3'UTRs. **Science** 329, 432-435 (2010) DOI: 10.1126/science.1191244

[学会発表] (計 6 件)

- ① 鹿兒島浩、小原雄治 : The homeobox transcription factors, CEH-14 and TTX-1, regulate AFD thermosensory neuron-specific expression of *gcy-8* and *gcy-18* in *C.elegans*. 日本分子生物学会第 35 回年会、2012 年 12 月 12 日、福岡
- ② Y. Andachi, Y. Kohara: In situ hybridization analysis of *let-7* microRNA. 18th International *C.elegans* Meeting, June 25, 2011, UCLA, Los Angeles, USA
- ③ H. Kagoshima, Y. Kohara: The homeobox transcription factors, CEH-14 and TTX-1, regulate expression of *gcy-8* and *gcy-18* in *C. elegans*. 18th International *C.elegans* Meeting, June 24, 2011, UCLA, Los Angeles, USA
- ④ Konno, H., Noguchi, K., & Kohara, Y: Study on localization mechanisms of maternal *mex-3* mRNA. 18th International *C.elegans* Meeting, June 23, 2011, UCLA, Los Angeles, USA
- ⑤ K. Noguchi, Y. Kohara: Studies on localization mechanisms of the maternal *pos-1* mRNA in *C. elegans* embryos. 第 33 回日本分子生物学会年、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ⑥ 鹿兒島浩、小原雄治 : 線虫 *C. elegans* の温度感受神経 AFD での発現を制御する調節配列の解析 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸

[その他]

ホームページ等

NEXTDB : 線虫遺伝子発現データベース

<http://nematode.lab.nig.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 雄治 (KOHARA YUJI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・

特任教員

研究者番号 : 70135292

(2) 研究分担者

なし