

論文の内容の要旨

論文題目 Cloning of chaperonin CCT γ subunit gene essential for retinotectal development by whole-genome subtraction

全ゲノムサブトラクション法による網膜視蓋分化因子シャペロン CCT γ 遺伝子のクローニング

氏 名 松 田 尚 人

背景

分子遺伝学は未知の機能分子を探索する有効な方法である。ゼブラフィッシュ *Danio rerio* は、突然変異誘発による分子遺伝学の手法が適用可能な脊椎動物であり、胚が透明であるため特に中枢神経系の発生の分子機構の解明に強力な手段となりうる。ドイツと米国のグループにより *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)を用いて大規模な突然変異体作成とスクリーニングが行われ、1996年に初期発生から行動異常まで様々な突然変異体が約 2,400 系統報告されたことは、脊椎動物発生メカニズム研究の大きな進展を予期した。しかしながら、ENU が主に点突然変異を誘発するため、現在のところその原因遺伝子の同定は遅れている。クローニングがより容易な方法として、レトロウイルスを用いた挿入変異誘発法も開発されているが、変異誘発効率が低い欠点がある。従って、より簡便に遺伝子クローニングが可能で高効率な方法論を確立する必要があった。

当研究室は、大腸菌や線虫の突然変異体作製に利用されている DNA 架橋剤 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP)が、紫外線照射により 2 本鎖 DNA に共有結合し、その修復過程で小欠失変異を誘発する作用を持つことに着目し、ゼブラフィッシュ精子に TMP を作用させることにより効率良く突然変異体を作製する方法を開発した。この TMP 変異誘発法の利点は欠失変異を標識としてサブトラクション法により原因遺伝子を直接クローニングしうる可能性を持つことにある。Representational difference analysis (RDA) 法は、6 塩基認識制

制限酵素で消化したゲノムにアダプターを結合し PCR で増幅することにより、ゲノムの一部を代表するサンプル(amplicon)を作製し、脊椎動物の様な複雑なゲノム同士のサブトラクションを可能にする方法である。本論文では、TMP 突然変異法により作製した *no tectal neuron (ntn)* 突然変異体に RDA 法を適用し、原因遺伝子として chaperonin containing TCP-1(CCT) γ サブユニット遺伝子を同定した。

結果および考察

ntn 突然変異は受精後 2 日目に視覚系を構成する網膜と視蓋に神経細胞死が明らかになる劣性変異である。ヘテロ接合体同士の交配により突然変異胚と同腹野生型胚をそれぞれ 40 匹ずつプールし、5 種類の制限酵素 *Bgl*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Spe*I, *Xba*I でゲノム DNA を消化し、それぞれの amplicon を作製した。野生型由来の amplicon を tester、変異体由来の amplicon を driver として、tester から driver をサブトラクションし、24 個の RDA 産物を得た。RDA 法は制限酵素を用いて amplicon を調整するため、欠失だけでなく制限断片長多型 (RFLP) も単離することができる。表現型に基づいてゲノム DNA をプールしているため、*ntn* 遺伝子座に連鎖しない領域は両プールに均等に含まれ、*ntn* 遺伝子座近傍領域の相違のみが単離されることが期待される。実際、クローニングした 24 クローンのうち、19 個の RDA 産物は遺伝的マッピングにより *ntn* 遺伝子座の近傍に位置することが明らかとなった。残念ながらこれらの産物は欠失に由来するものではなく、すべて RFLP に由来した。そこで、遺伝的マッピングにより *ntn* 遺伝子座に最も近いマーカーを決定し、YAC, BAC, PAC ライブラリーをスクリーニングすることにより *ntn* 遺伝子座の物理地図を作成した。*ntn* 領域をカバーする YAC クローンを用いて受精後 36 時間胚の cDNA ライブラリーから約 300 の cDNA を単離し、4 つの候補 cDNA を同定した。そのうち、CCT γ 遺伝子に 143 bp の小欠失を同定した。他の cDNA には変異は見つからなかった。変異 CCT γ mRNA は転写されているが、ATPase 活性モチーフを含む C 末端側 equatorial domain のほとんどを欠失していることから、変異 CCT γ 蛋白質は翻訳されていても機能欠損体であると考えられる。CCT 蛋白質は真核生物の細胞質にある分子シャペロンの一つで、8 つのサブユニットからなり、actin や tubulin など多くの蛋白質の折り畳みを助けることがわかっている。ゼブラフィッシュ CCT γ mRNA の発現を whole mount in situ hybridization により調べたところ、原腸形成終了期 (受精後 12 時間後) から全身ですでに発現していることがわかった。本当に CCT γ 遺伝子の欠失変異は *ntn* 突然変異の原因なのだろうか。

この点を明らかにするために、CCT γ 遺伝子のアンチセンス morpholino を野生型胚に微量注入することにより変異体表現型を再現できるかどうか、あるいは逆に CCT γ 遺伝子 mRNA を変異体に微量注入し形質が野生型に回復するかどうかを調べた。アンチセンス morpholino 微量注入により、網膜神経節細胞が減少し、視蓋神経細胞に細胞死が認められた。アンチセンス配列を逆にしたコントロールを微量注入した胚は野生型と変わらなかった。また、CCT γ 遺伝子 mRNA を微量注入した変異体胚では、視蓋神経細胞死が抑制され、網膜神経節

細胞数が野生型レベルまで回復した。以上により、CCT γ 遺伝子が *ntn* 突然変異体の原因遺伝子であることが明らかとなった。これらの結果は、TMP 突然変異誘発法が実際に欠失変異を誘発したこと、仮に欠失変異が小さく RDA 法で欠失変異を直接単離できなかつた場合でも近傍連鎖マーカーを単離することができ、RDA 法が有効なクローニング法であることを示している。今後、TMP 変異原の濃度で欠失変異の大きさを最適化し、RDA 法で欠失変異を直接単離できる方法となる可能性がある。

CCT γ 蛋白の遍在性から、*ntn* 突然変異体は網膜視蓋に特異的な表現型に見えて、実はもっと早い時期から全身に異常があるのかもしれない。そこで、ゼブラフィッシュ発生に重要な遺伝子の whole mount in situ hybridization を、網膜視蓋で最初に表現型が明らかとなる受精後 30 時間の *ntn* 変異体で行うことにより検証した。神経形成に重要な *achaete-scute* 相同遺伝子 *zash1a*, *zash1b* はそれぞれ網膜、中脳・後脳に発現し、野生型と変わらなかった。ホメオボックス遺伝子 *hlx1* (中脳), *dlx2* (終脳・間脳), *krox20* (後脳), *pax1a* (中脳後脳境界部) の発現パターンは正常であった。咽頭弓でも *dlx2* は正常に発現していた。*pax2a* は眼および耳の原基、腎臓原基でも正常であった。*sonic hedgehog* は底板に、*myod* は筋節に、*ntl* (Brachyury) は脊索にそれぞれ正常に発現していた。したがって、受精後 30 時間では *ntn* 突然変異体は網膜視蓋に限局した表現型を示した。

では、網膜や視蓋ではどのような異常がおこり、CCT γ 遺伝子はどのような機能を担っているのだろうか。網膜では受精後 30 時間に神経前駆細胞が転写因子 *atonal5* (*ath5*) 遺伝子を発現し分裂終了細胞となり、POU 転写因子 *brn3b* を発現した細胞が網膜神経節細胞へと commit される。網膜神経節細胞は網膜で最初に分化する細胞種で、分化したゼブラフィッシュ網膜神経節細胞はニコチン性アセチルコリン受容体 β 3 サブユニット(nAChR β 3)、膜蛋白 Neurolin 認識抗体、神経細胞分化マーカーアセチル化チューブリン抗体で標識することができる。*ntn* 突然変異体の網膜神経前駆細胞数は野生型と遜色なく、*ath5* や *brn3b* は正常に発現していることから網膜神経節細胞への commitment までは正常に起きているが、nAChR β 3 遺伝子プロモーター制御下で緑色蛍光蛋白質は発現せず、Neurolin 抗体染色、アセチル化チューブリン抗体染色も減弱していることから、分化した網膜神経節細胞が減少していることが明らかとなった。受精後 48 時間以後の *ntn* 突然変異体網膜の層構造は乱れており、網膜神経節細胞以外の細胞種も影響を受けている可能性があり、これが網膜神経節細胞の分化障害の二次的影響か CCT γ 変異の直接的影響か区別できないが、CCT γ 蛋白は網膜神経節細胞の分化に必須の因子であると言える。次に、*ntn* 変異の中脳視蓋神経細胞への影響を調べた。視蓋神経細胞でも発現している転写因子 *brn3b* mRNA の発現は、*ntn* 突然変異体でも野生型と変わらなかった。抗アセチル化チューブリン抗体染色では、中脳視蓋神経細胞の神経網が欠損し分化障害を認めた。したがって、CCT γ 蛋白は網膜神経節細胞と同様に視蓋神経細胞でも分化に必須の機能を持つことが示唆された。nAChR β 3 遺伝子プロモーターによる緑色蛍光蛋白質の発現は、*ntn* 突然変異体の三叉神経節細胞や感覚神経節細胞では正常に認められた。また、抗アセチル化チューブリン抗体染色でも、網膜神経節細胞および視

蓋神経網以外の部位（前交連線維、三叉神経、後脳神経網、背側縦束）では野生型と同様の染色像を示した。よって、分化マーカーによる解析でも *ntn* 突然変異体が網膜視蓋に特異的な異常を示すことを支持する結果が得られた。

分裂酵母では CCT γ の突然変異体は有糸分裂ができず、細胞分裂に必須であることが知られていた。対して、ゼブラフィッシュ CCT γ 蛋白の変異は網膜視蓋の神経細胞の分化障害という極めて意外な表現型を示し、脊椎動物個体発生における CCT γ 蛋白の新たな機能の発見につながった。この発見は *in vitro* の解析では恐らく明らかにできなかったことであり、分子遺伝学の成果であると言えよう。