

論文の内容の要旨

論文題目:線虫 *Caenorhabditis elegans* 味覚神経 ASE における左右非対称性の解析

(Analysis of left/right asymmetry in the ASE gustatory neurons of the nematode *Caenorhabditis elegans*)

氏名 高山 順

動物の行動は、多様な神経細胞が複雑に相互作用する神経系によって引き起こされる。個々の神経細胞が形態的・機能的に多様な個性を有することは、神経系が全体として調和のとれた機能を発揮するために必要である。細胞の個性はそこで発現する遺伝子群により規定されると考えられる。したがって個々の細胞ごとに発現遺伝子群を同定することは、細胞の個性獲得・維持、またその細胞固有の機能発現メカニズムを解明する上で重要である。特に感覚神経系は環境の様々な刺激を感知するために、個々の神経が多様な機能・形態を備えており興味深い解析対象の一つである。

線虫 *Caenorhabditis elegans* は神経系を構成する神経細胞がすべて同定されていることと、全ゲノム塩基配列が解読されていることから、神経細胞の遺伝子発現プロファイリングを行うのに適したモデル生物である。これらに加えて種々の分子遺伝学手法が可能であることと、体が透明であり蛍光レポータータンパク質を発現させた細胞を *in vivo* で観察できることから、個々の細胞の発生・機能解析が容易に行えるという利点がある。

線虫のアンフィド感覚神経は機能および発生メカニズムが詳しく解析されている。アンフィドは線虫の頭部にあり、左右一対の2細胞を一組とした12種24細胞から構成される。このうちの ASE 感覚神

経は塩やアミノ酸等の水溶性物質を受容する味覚神経であり、左側の ASEL 細胞と右側の ASER 細胞からなる。興味深いことに ASEL 細胞と ASER 細胞は形態が同一であるにもかかわらず、発現する遺伝子や機能に差異があることが知られている。例えば膜貫通型グアニル酸シクラーゼをコードする *gcy-5* 遺伝子は ASER 神経に、*gcy-6* および *gcy-7* 遺伝子は ASEL 神経にそれぞれ特異的に発現する。またナトリウムイオンは主に ASEL 神経で、塩化物イオンやカリウムイオンは ASER 神経でそれぞれ受容される。左右非対称な遺伝子発現を制御する機構は詳しく調べられてきたが、どのようなシス制御により実現されるか、またそれぞれの細胞に固有の機能がどのような発現遺伝子群により実現されているかは不明な点が多かった。私は本研究で単一の神経細胞から転写産物を選択的に濃縮する手法を確立し、マイクロアレイと組み合わせることで ASE 神経において左右非対称に発現する遺伝子を複数同定した。また ASE 神経における左右非対称な遺伝子発現を実現するシス制御メカニズムの解析、および左右非対称に発現する遺伝子の機能解析を行った。

単一の神経細胞からの選択的な転写産物の濃縮は、mRNA tagging 法を適用することで実現した。mRNA tagging 法は、mRNA の 3' 末端にあるポリ A 鎖に結合するポリ A 結合タンパク質 (PABP) の性質を利用した抽出法である。エピトープタグを融合した PABP (FLAG::PABP) を細胞特異的プロモーターにより標的細胞に発現させ、標的細胞内で形成された FLAG::PABP/mRNA 複合体を架橋後、エピトープタグを手がかりに免疫沈降する。ここから RNA を溶出することで、標的細胞で発現する転写産物を選択的に濃縮する。本手法はこれまで筋肉や腸など比較的大きな組織に対して適用されてきたが、私は mRNA tagging 法が一個体当たり一個しか存在しない神経細胞に対しても適用可能であることを示した。

ASEL および ASER から選択的に mRNA を濃縮するため、それぞれ *gcy-7* 遺伝子および *gcy-5* 遺伝子のプロモーターの下流に FLAG::PABP をつなげた DNA コンストラクトを作製し、これらを染色体に組み込んだ線虫株を作製した。抗 FLAG 抗体を用いた抗体染色により、これらの株が FLAG::PABP を頭部の細胞で発現していることを確認した。これらの株から mRNA tagging 法により RNA を抽出し、それぞれの細胞特異的に発現する転写産物の量を定量的 RT-PCR 法により比較した結果、確かに細胞特異的な転写産物が濃縮されることがわかった。

ASEL および ASER で発現する新規遺伝子を同定するため、それぞれの細胞から濃縮した RNA に含まれる

転写産物量をマイクロアレイにより網羅的に比較した。濃縮した RNA に含まれる標的細胞由来の mRNA 量は比較的少ないと考えられたので、T7 プロモーターを用いた *in vitro* 転写による線形増幅を行った。線虫のほぼすべての遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドがスポットされたマイクロアレイにハイブリダイゼーションを行った。その結果、左右非対称に発現することが報告されている 13 遺伝子のうち 12 遺伝子が期待通りに偏ったシグナル比を示した。またマイクロアレイの結果に基づいて選択した遺伝子のプロモーター領域を蛍光タンパク質に融合して線虫に遺伝子導入することで、ASEL または ASER に偏って発現する9遺伝子を新たに同定した。ASE 神経で左右非対称に発現する遺伝子としては、これまでに膜貫通型グアニル酸シクラーゼをコードする遺伝子 (ASEL: *gcy-6*, *gcy-7*, *gcy-14*, *gcy-20*; ASER: *gcy-1*, *gcy-3*, *gcy-4*, *gcy-5*, *gcy-22*) や分泌性タンパク質をコードする遺伝子 (ASEL: *flp-4*, *flp-20*; ASER: *hen-1*) が報告されていた。本研究で新たな膜貫通型グアニル酸シクラーゼとして *gcy-19* を、分泌性タンパク質として *nlp-5*, *nlp-7* (神経ペプチド様タンパク質) および *ins-32* (インスリン様ペプチド) を同定した。また TRPC チャンネルをコードする *trp-2* 遺伝子が左右非対称に発現することも見出した。さらに線虫 *Caenorhabditis* 属に保存された4遺伝子 *C39D10.5*, *EGAP5.1*, *F08G12.8* および *K07C5.9* も左右非対称な発現を示すことを見出した。

新規に同定された遺伝子の発現制御機構を調べるため、これまでに報告されている制御因子である *lsy-6*/マイクロ RNA および *lim-6*/LIM ホメオドメイン転写因子の左右非対称な発現への寄与を調べた。それぞれの機能喪失変異体で ASE 神経における発現を調べたところ、調べたもののすべてが *lsy-6* に依存し、ほとんどが *lim-6* に依存していることがわかった。また ASE 神経のマスター制御転写因子である CHE-1/C2H2 ジンクフィンガー転写因子の寄与を調べるため、CHE-1 が結合する DNA 配列 (ASE モチーフ) がプロモーター領域に存在するか調べた。その結果、新規に同定した ASER 神経に偏って発現する遺伝子のプロモーター領域に、ASE モチーフが存在することを確認した。

ASE 神経で左右非対称な発現を実現するためのシス制御メカニズムには不明な点が多かった。私は ASE で発現する新規に同定した遺伝子と今まで報告されていた遺伝子について、プロモーター領域に存在する ASE モチーフの数を調べた。その結果 ASER に偏って発現する遺伝子の1プロモーター領域あたりに存在する ASE モチーフの数が、ASEL に偏って発現する遺伝子のそれよりも多いことを見出した。また ASE モチーフを構成す

る12塩基対の4塩基目および7塩基目における各塩基の出現頻度が、ASELに偏って発現する遺伝子とASERに発現するものとで異なっていることが示唆された。以上の結果は CHE-1/ASE モチーフによるプロモーター活性と、ASE における発現の左右非対称性の間に相関があることを示唆している。

左右非対称に発現する膜貫通型グアニル酸シクラーゼが、ASE 神経の左右非対称な機能に関わるか検討した。ASEL 細胞に偏って発現する *gcy-14* 遺伝子および ASER 細胞に偏って発現する *gcy-19* 遺伝子の欠失変異体を作製し、各種イオンに対する化学走性に欠損が生じるか調べた。その結果 *gcy-14* 欠失変異体が、ASEL 細胞で受容されるナトリウムイオン等への化学走性に欠損を示すことがわかった。野生型 *gcy-14* 遺伝子を遺伝子導入することにより、この欠損は ASEL 細胞に *gcy-14* を発現させることで回復することが明らかになった。このことは膜貫通型グアニル酸シクラーゼが細胞自律的に外界の化学物質の受容に関わることを示している。

本研究により単一神経細胞の遺伝子発現を網羅的に調べる手法を確立した。また単一神経細胞の遺伝子発現プロファイリングが、その細胞の発生および機能発現メカニズムの解明につながる有効な手法であることを示した。