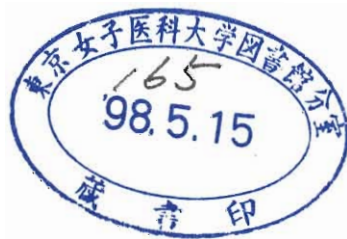


転写因子 UNC-86 によるニューロンの  
多様性の獲得機構の解析

課題番号：08680847

平成 8 年度～平成 9 年度科学研究費補助金  
基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書



平成 10 年 3 月

研究代表者：三谷昌平  
(東京女子医科大学医学部助教授)



転写因子 UNC-86 によるニューロンの  
多様性の獲得機構の解析

課題番号：08680847

平成 8 年度～平成 9 年度科学研究費補助金  
基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書

平成 10 年 3 月

研究代表者：三谷昌平  
(東京女子医科大学医学部助教授)

## はしがき

脳の働きを理解するためには、第一に、複雑な神経回路網が形成される発生機構を解明することが必要である。第二に、できた神経回路網がどのように生理的な機能を達成しているのかを解明することが必要である。第三に、これらの異常により起こると思われる精神疾患などのメカニズムを解明することが必要である。究極的には、異常な状態の理解を通してヒトの脳の正常な機能を理解するというようなアプローチが必要である。この中で、我々は、基礎的研究として脳の発生過程をいかに理解するかを本研究の主要テーマとして解析を進めてきた。一口に神経回路網の形成機構と言っても、その過程には多くの複雑な反応の連続があると考えるべきであるが、本研究ではその課題名にあるように、ニューロン種特異的に発現・機能する線虫 *C. elegans* の転写因子 UNC-86 の作用に着目して、その神経発生に関する作用から、この問題にアプローチしてきた。線虫の神経系をこのような目的の研究に使用するには以下のような理由が存在する。

第一に、*C. elegans* の生活環が 25 °C でわずか 2 日と短いことから、遺伝学的解析に適していることであろう。変異体などを凍結保存できることや、飼育が極めて容易であることなどもあり、線虫の変異体は全遺伝子（15,000 個）の約 10 分の 1 程度が種々の表現型によって記載され、染色体上にマップされている。

第二に、個々の細胞の発生に於ける細胞系譜が全て記載されていることである。どのニューロンがどのように細胞分裂を起こして最終的に分化するかとか、どのニューロンと細胞系譜的に相同な位置に存在するかとかがチャートに書かれている。

第三に、電子顕微鏡連続切片の観察により、雌雄同体で 302 個あるニューロ

ンの全ての細胞体の位置と神経突起の構造が詳細に記載されている。これにより、抗体染色やレポーター遺伝子発現により特定のニューロンを標識した場合、そのニューロンがどの細胞であるかが同定可能である。

第四に、ゲノム解析が非常に進んでいることである。線虫のゲノムは既に 4 分の 3 についての塩基配列決定が終了しており、本年には完成することが予想されている。また、cDNA の配列決定も全遺伝子の約半数について終了しており、線虫でどのような遺伝子が存在するかについては、ほぼ答えが得られていると言っても過言ではない。この事実は、神経系を持つ最も単純な生物である線虫を形成できる遺伝子の全てを網羅できることを意味している。これらの情報はデータベース化されており、インターネットを通して検索やダウンロードが可能であるし、CD-ROM 化されている情報を用いることもできる。

第五に、遺伝子導入法が確立していることである。そのメリットとしては、変異体をゲノム DNA や cDNA を用いて野性型に機能回復する実験が行えることが挙げられる。また、上述のゲノム塩基配列情報を用いることにより、任意の遺伝子のレポーター遺伝子コンストラクトを作成することが可能である。GFP (green fluorescent protein) や *lacZ* などのレポーター遺伝子導入によって特定の遺伝子の発現パターンが解析可能である。これは、本研究でも用いられているように、遺伝子の発現制御に於けるシス・エレメントの解析には極めて有用である。

第六に、ゲノム解析のデータを利用して逆遺伝学的なアプローチが可能になりつつあることである。既知の線虫遺伝子の塩基配列を利用してオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、これを使って PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によりトランスポゾンの挿入とその後の脱落による欠失変異をスクリーニングする方法や化学物質と紫外線によりランダムな欠失変異を導入しておき、やは

り PCR 法でスクリーニングする方法である。しかしながら、これらの方法は効率が低く、スクリーニングに膨大な労力を必要として、しばしば欠失変異体が得られないこともあった。この点については、後述するように、我々の研究室で大幅な改良を加えることにより、桁違いに効率化することに成功し、線虫の逆遺伝学的手法に決定的な貢献が期待される。

このような利点を用いて線虫の種々のニューロンが分化するメカニズムを明らかにするために、これまで主に機械刺激受容ニューロンの分化に関与する遺伝子の同定および機能解析を行ってきた。その結果、線虫の実験系で判明した転写因子のカスケードは関与する分子の構造において哺乳類のそれと共通の部分が多いことが知られていたが、ニューロン種決定機構においても一般性が認められることを明らかにした。その中でも、POU ドメイン転写因子 *unc-86* が中心的な役割を担っていることが明らかになった (Mitani *et al.*, 1993、Mitani, 1995)。しかしながら、*unc-86* 遺伝子産物 UNC-86 を発現しているニューロン群は機械刺激受容ニューロンのみならず、59 個のニューロン（およびそのニューロブラスト）で発現している (Finney & Ruvkun, 1990) ことが知られている。これらは、細胞系譜や機能から見て何ら関係が見い出されない複数のニューロングループから構成されている。この理由は、恐らく多くの転写制御では転写因子間の協調的結合による会合分子間相互作用の安定化を行っているため、同一の転写因子も異なる細胞や異なる環境下では他の転写因子が異なる組合せで発現することによって異なる作用（異なる標的遺伝子の活性化を行うこと）を遂行することが出来るという性質に依るためであろうと思われる。この考え方は広く受け入れられていると思われるが、個体レベルで系統立った解析は実験の膨大さのために、ショウジョウバエ体節形成などの限られた例でしか成されていない。これらの線虫 *C. elegans* に関する基本的な情報の蓄積や実験的な手技

を組合せることにより、恐らく高等生物にも共通のメカニズムが多数存在する線虫の神経系の発生という課題が近い将来解明されることが期待される。

本研究では、これらの事実を踏まえ、線虫の神経系解析に有用な新しい技術の開発を行いつつ、それによって得られた解析力の向上により新しいデータの蓄積を行いつつある。既に解決してしまった問題や現在他のグループによって精力的に解析が進められており、恐らく近い将来解決するであろう問題には触れず、今後の神経系解析の進展に有効であろうと思われる方法論に限定して開発を行っている。主に3つのレベルの解析法に焦点を絞っているので以下に簡単に列挙する。

神経系の発生を理解する上で、神経系を持つ最も単純なモデル生物である線虫 *C. elegans* の神経発生を理解すること目的にし、(1) 遺伝学的アプローチ、(2) 生化学・分子生物学的アプローチ、(3) 逆遺伝学的アプローチを用いて、分子レベルからニューロンの機能発現までの関連付けを行って来た。

(1) の遺伝学的アプローチとしては、線虫で既に記載されている発生に関する変異体の表現型を触覚受容ニューロンの細胞系譜に関連するニューロン群の分化への影響で理解することを目的とした。遺伝学的なアプローチの特色は、既知の様々な単一または少数の遺伝子の機能異常により起こる表現型を解析することにより、個々の遺伝子の実際の機能を検定できる点にある。一方、遺伝学的な解析の問題点としては、遺伝子の効果が解析している表現型に対して直接的に作用しているのか、間接的に作用しているのかが判定できないことが多いことや、遺伝学に適切な材料と言われている線虫においても染色体上にマップされている変異体の数は、実在の遺伝子の約10分の1程度に過ぎないことが示すように、表現型が容易には認められない遺伝子の変異が存在することにある。

我々は、遺伝学的なアプローチとして、まず線虫の whole mount *in situ* hybridization 法の確立からスタートした。これは、それまで硬いクチクラのために困難であった方法であったが、三谷はそれを選択的に消化する手法を開発して、個々のニューロンでの mRNA の発現の有無を検定できることを可能にした (Mitani *et al.*, 1993)。その後、線虫で whole mount *in situ* hybridization が幾つかの研究室でルーチンに使えるようになってきている。この手法により、細胞の同定が可能になったので、特定の遺伝子の発現を指標にして細胞分化の遺伝子的メカニズムの解析に用いることができるようになった。遺伝学的解析の方法は、変異体の表現型がどの程度確実に観察できるかに依存しており、多くの遺伝子の作用が多面発現性と冗長発現性を有することを考慮すると、単一遺伝子の変異によって見いだされる新規遺伝子機能は今後ますます難易度が上昇することと思われる。従って、今後の遺伝学的アプローチとしては、GFP 標識を付けたニューロンの細胞体と神経突起の位置・走行異常をマクロ蛍光顕微鏡によって直接的に観察して変異体をスクリーニング・分離するなどの新しい方法が重要であろうと思われる。

(2) の生化学的・分子生物学的アプローチとしては、第一に、遺伝子のシスエレメントの作用をレポーター遺伝子を用いて解析する方法である。制御領域全域を含む DNA を単離し、GFP などのレポーターを繋いで線虫に遺伝子導入し、トランスジェニック動物にて正常の発現パターンを調べる。さらに、部分的に *in vitro* で色々な欠失などの変異を加えてさらにトランスジェニック動物を作成し、発現パターンの変化を検定することにより、シスエレメントと発現制御との関係を解析する方法であり、多くの研究者が用いている。現在、上述のように、線虫のゲノム情報が充実していることから、ほぼ任意の遺伝子についてこの解析を行うことが可能であり、線虫の細胞系譜と遺伝子制御との関係を明らかに

していくために有効かつ確実な方法と思われる。

第二には、主に分子間相互作用を検出して、相互作用分子を精製・単離する方法を試みている。この方法は、我々の研究室で新しく開発したものであり、オリジナリティーが高い。今回は転写因子とその結合 DNA について解析を行っている。方法の概略は、線虫の既知遺伝子ゲノムのコード領域に in frame になるように GFP cDNA を融合して translational fusion を作成し、線虫の変異体に遺伝子導入を行ってトランスジェニック動物を作出する。この導入遺伝子を三谷の方法によって、線虫染色体への挿入を行う。この導入遺伝子により変異体の表現型を野性型に回復することおよび、GFP 蛍光によって正常な発現パターンを確認し、線虫を大量培養する。この線虫より核を抽出し、可逆的な架橋剤を用いて融合蛋白質と in vivo で結合している染色体 DNA を共有結合させる。核を micrococcal nuclease で消化してヌクレオソームを溶出し、これを抗 GFP モノクローナル抗体で免疫精製する。得られた抗原複合体（GFP 融合転写因子とその結合 DNA を含む）の架橋をはずし、蛋白分解酵素によって蛋白質を取り除き、得られた DNA 断片をクローン化する。個々に塩基配列決定を行い、得られた配列を用いて Blast 検索により線虫のゲノム DNA の該当領域を検索する。この中で、プロモータやエンハンサーなどの候補となる領域を選別し、各々の被制御遺伝子（転写因子の下流遺伝子）候補を特定する。各々について発現解析等を行い、本当に制御を受けているか否か、どのような制御を受けているかを特定する。発現パターンや遺伝子の構造などから、個々の遺伝子の機能を推定する。

（3）の逆遺伝学的アプローチとしては、遺伝学的アプローチで検出できない遺伝子の変異を、特定の遺伝子に着目して機能を破壊し、関連し得る機能を集中的に検索することにより明らかにする。線虫では、ゲノム DNA の塩基配列情報が十分に使用できることから、遺伝子破壊個体の分離が効率良くできれば



あらゆる遺伝子についてこのような実験を行うことが可能であると思われる。実際には、線虫で標的遺伝子の破壊実験の標準的なプロトコールでは、数十万ゲノムに1回程度の効率でしかこのような個体を分離することができず、多くの困難が生じている。我々は、この点を克服するために、変異体の効率良い分離方法を開発しつつある。現時点で、既存の方法の10倍程度の効率上昇が得られており、さらに10倍程度の効率上昇も有望である。この方法論の開発により、任意の遺伝子の破壊を行った個体を得ることが可能になると考えられ、生化学・分子生物学的なアプローチによって得られた特定のニューロンでの機能分子についての変異体やそれらの間の二重変異体などを作出することにより、これまで冗長性発現のために容易に見出だせなかった表現型の解析を行うことができることが期待される。

このようなアプローチは、線虫を用いた神経発生機構の解明に重要な位置を占める技術を提供し、かつ本研究そのものが線虫神経発生において貴重な所見を産み出しつつあると思われる。上述のように、分子機構としては線虫とヒトなどの哺乳類の間に多くの共通性が知られつつあり、本研究成果報告書に記載する技術を活用し、様々な生命現象を解明して行くことができると考えている。

## 研究組織

研究代表者：三谷昌平（東京女子医科大学医学部助教授）

## 研究経費

平成8年度	1,400千円
平成9年度	1,100千円
計	2,500千円

## 謝辞

本実験を行うにあたって、安藤恵子氏（東京女子医科大学、医学部、第二生理学教室、助手）および、米積亜紀氏（東京女子医科大学、医学部、学生）との共同研究を行った。また、野口幸子氏には実験補助をして頂いた。ここに感謝の意を表したい。

## 研究発表

### (1) 学会誌等

MITANI, S. (1996).

Role of *cis*-regulatory elements for cell-type specific expression of the *unc-86* gene. *Neurosci. Res. Suppl.* **20**, S119.

Gengyo-Ando, K., Mitani, S. (1997).

Production and characterization of a monoclonal antibody against the green fluorescent protein (GFP). *Neurosci. Res. Suppl.* **21**, S122

### (2) 口頭発表

三谷昌平

*unc-86* 遺伝子の細胞種特異的発現における *cis* 制御領域の役割、  
第 19 回日本神経科学学会大会、1996 年 7 月、神戸。

Keiko Gengyo-Ando, Aki Yonezumi, Shohei Mitani. Production and characterization of a monoclonal antibody against the green fluorescent protein. 11th International *C. elegans* meeting. Wisconsin, 1997 年 6 月。

安藤恵子、三谷昌平

Green Fluorescent Protein (GFP) に対する単クローン抗体の作成と応用。第 20 回日本神経科学学会大会、1997 年 7 月、仙台。

### (3) 出版物その他

Mitani, S. (1996)

A genetic pathway for neuronal cell type diversification in *Caenorhabditis elegans*. in "Basic neuroscience in Invertebrates" pp83-95. H. Koike *et al.* ed. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

三谷昌平 (1997)

「転写因子によるニューロン種決定機構の解析」ブレインサイエンス最前線'98、佐藤昌康編、講談社

三谷昌平 (1996)

「紫外線による extrachromosomal array の integration の方法」平成8年度 *C. elegans* 講習会テキスト (於：国立遺伝学研究所)

三谷昌平 (1996)

「遺伝子発現解析法 (*lacZ*、GFP)」平成8年度 *C. elegans* 講習会テキスト (於：国立遺伝学研究所)

三谷昌平 (1997)

「紫外線による extrachromosomal array の染色体への挿入方法」平成9年度 *C. elegans* 講習会テキスト (於：九州大学理学部)

三谷昌平 (1996)

「*lacZ* と GFP による遺伝子発現解析」平成9年度 *C. elegans* 講習会テキスト (於：九州大学理学部)

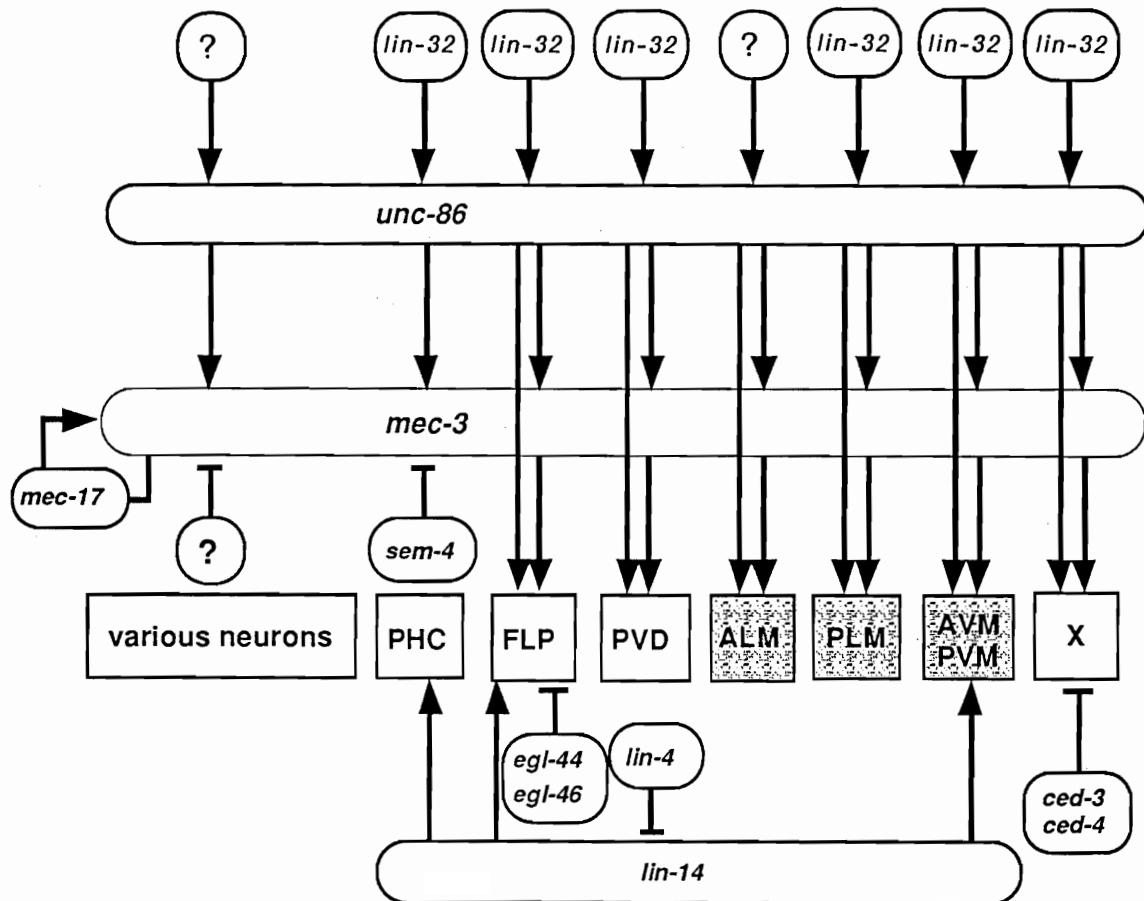
## 研究成果

(1) 線虫 *C. elegans* の神経発生の遺伝学的アプローチ (線虫触覚受容ニューロンの分化決定機構の分子遺伝学的解析)

線虫の触覚受容ニューロン (タッチセル) をモデルとして、その分化決定に関わる遺伝子群を同定し、作用機序を明らかにした。発生に関与することが予想される既知遺伝子の変異体のバックグラウンドで線虫触覚受容ニューロンの様々な形質発現を解析し、関連する遺伝子がどのようなレベルで作用しているかを明らかにして来た。これらの中には、タッチセル特異的発現を行う遺伝子群、*mec-1*、*mec-4*、*mec-5*、*mec-7*、*mec-12* などの発現制御を表わしている形質およびその産物の直接検出が関係している。既に、タッチセルの分化に必要な転写因子として、*LIN-32*、*UNC-86*、*MEC-3* が作用していることは知られており、我々はさらに、*LIN-4*、*LIN-14*、*EGL-44*、*EGL-46*、*SEM-4* などがタッチセル特異的な分子の発現制御に関わっていることを示していた (Mitani *et al.*, 1993, Mitani, 1996)。これらの遺伝子は従来、他の細胞での機能によって変異体が分離された遺伝子であり、他の細胞で作用していることが明らかであった。さらに、*mec-3::lacZ* の発現を指標にして、これらの発生に関与する遺伝子群がどのレベルで作用するかを明らかにした。*lin-32*、*unc-86* などの変異体においては、発現の消失は共通であり、*egl-44*、*egl-46* 変異体での FLP ニューロンでのタッチセル特異的分子の発現脱抑制は *mec-3* 変異体では変化が無いことから、*EGL-44*、*EGL-46* 分子の機能は *MEC-3* が FLP においてタッチセル特異的分子を転写活性化するのを抑制していることによるものであることが明らかになった (Mitani, 1995)。また、*lin-14* 遺伝子の機能低下型変異体では、FLP の位置が後方にシフトしており、*LIN-14* 遺伝子の作用は FLP の分化にも関与することが明らかにな

った。これは、タッチセル特異的な遺伝子が FLP ニューロンで異所性に発現する際に、LIN-14 の存在が必要であることと関係がありそうである。 *sem-4* 変異体において PHC ニューロンでタッチセル特異的な分子の異所性発現が観察されていたが、 *mec-3::lacZ* の発現も異所性に起こることが確認され、タッチセル特異的発現のメカニズムとしては、先ず MEC-3 の異所性発現が起こり、これがさらに下流の遺伝子群の転写活性化を引き起こしていたことが明らかになった。このような結果は、遺伝子発現制御のレベルにおいて多くの遺伝子が多面的に発現しており、また容易に表現型が検出されないのは、遺伝子発現そのものやニューロンの機能に冗長性がある特定の遺伝子が破壊されている個体において野生型個体と機能的な差が検出困難なためであろうと思われる。また、本研究で明らかになったメカニズムとして遺伝子発現抑制が作用機序と思われるような分子については、破壊された時に機能亢進を検出するのは困難な場合が多く、事実 LIN-4、LIN-14、EGL-44、EGL-46、SEM-4 などの異常では、タッチセルの機能異常は起こらないことから明らかである。これらをまとめて、ニューロンの分化の遺伝学的経路を描いた（図参照）

# A Genetic Pathway for Touch Receptor Neuron-Specific Gene Expression



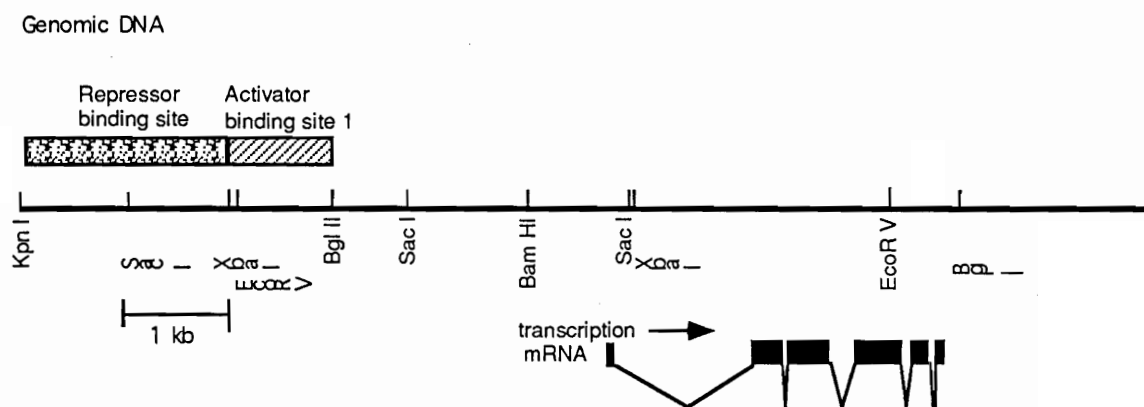
## (2) 生化学・分子生物学的アプローチ

### 線虫トランスジェニック動物解析の効率的手法の開発：

上述のように、線虫で遺伝子発現を解析したり、本来の遺伝子または外来性の遺伝子を導入することにより線虫にDNAを導入した場合、染色体外に存在して一定の確率で脱落し、トランスジェニック解析に不都合なことが多い。我々は、このような個体に紫外線を照射し、染色体に挿入する容易な方法を開発し、現在多くの研究者に利用されている。

### unc-86 遺伝子のシスエレメントの解析：

*unc-86* 遺伝子全域を含む DNA に translational fusion となるように GFP cDNA を挿入してレポーター遺伝子コンストラクトを作成した。これを線虫に導入してトランスジェニック動物を作成して、発現パターンの解析を行った。シス・エレメント全域を含む場合、正常の発現パターンを示すが上流から欠失を加えると、2.5 kb 程度で約半数のニューロンでの発現が消失し、さらに 1 kb 程度で発現が消失することが明らかになった。この部位に細胞種特異的なエンハンサー構造があると思われる。（図参照）



### 抗 GFP モノクローナル抗体の作成：

大腸菌で作成した GST-GFP 融合蛋白質をグルタチオン・アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。この蛋白質は試験管内で蛍光を発しており、少なくとも一部は機能的な GFP を形成していると思われた。この蛋白質と、人工合成したペプチドを BSA に結合させたものを抗原としてマウスに免疫し、抗 GFP モノクローナル抗体を作成した。

この抗体は、GFP に対する特異性と親和性が極めて高く、例えば免疫組織化学的な検出を行う場合に、抗体の至適濃度が 0.2  $\mu\text{g/ml}$  程度であり、全くバックグラウンドの非特異的染色が見られない。これは、一般の市販抗体での至適濃



度が5~10 µg/ml程度であることを考えると、桁違いに親和性や特異性の高い優れた抗体であると言える。また、免疫組織化学的染色の際には、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドなどの固定に対して全く抵抗性であり、電子顕微鏡での抗原存在部位の同定にも使用できる可能性が期待される。また、メルカプトエタノールなどの還元剤にも抵抗性であり、本来の GFP の蛍光が消失してしまう条件下での検出ができるので、細胞が生きたまま観察する GFP の応用範囲を広げることができると考えられる。

また、抗 GFP 抗体は、無固定の GFP をも極めて良く認識することが明らかになった。ヒートショック・プロモーターに GFP cDNA を繋いで線虫に遺伝子導入し、上述の様に安定なトランスジェニック動物のストレインを作成した。線虫を大量培養しておき、ヒートショックを与えることにより GFP が大量に発現されることを蛍光顕微鏡にて確認した。この動物をホモジナイズし、遠心によって粗可溶画分を回収した。この溶液をビーズに予め結合させておいた抗 GFP 抗体にて免疫沈降するという単純操作にて抗原を回収し、それを SDS-PAGE と Western blot にて解析した。抗原は単一バンドにて精製されることが確認された。また、回収率もかなり高く、全可溶画分の 0.15% が GFP であった。この結果は、抗 GFP 抗体が免疫精製に使用できることを表わしており、以下のエピトープ・タグging法の実験に使用することが可能である。

#### UNC-86 結合部位のエピトープ・タグging法による単離：

我々が開発したエピトープ・タグging法によって *in vivo* で転写制御因子が作用している標的遺伝子制御領域の同定を行った。転写制御因子の結合部位を同定する実験は非常に難しいとされ、報告例があまり多くない。我々は、線虫のゲノム情報を活用することにより、転写因子の標的遺伝子の同定を効率化することができると考え、この困難な課題に取り組んできた。この方法は、困難で

はあるが、遺伝子制御の全体像を捉えるためには非常に重要であること、古典的な遺伝学的手法では遺伝子発現の多面性と冗長性に阻まれて解決できない問題に対してアプローチができる可能性が高いこと、この方法で同定した遺伝子の機能に着目して解析するためには、後述のような逆遺伝学的なアプローチが有効であり、この方法についても我々自身で開発に成功しつつあることなどから、多くの期待を持って解析を進めている。

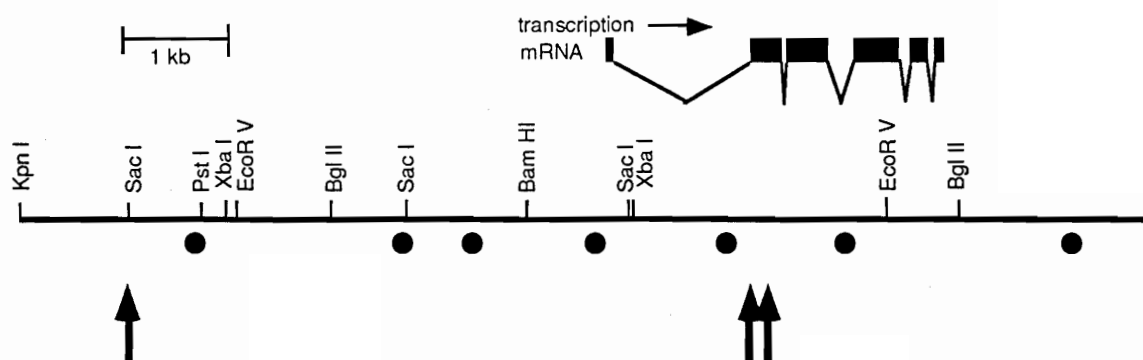
転写因子 UNC-86 は 59 個のニューロンまたはニューロblastで発現しており（線虫の全ニューロンの約 5 分の 1 である）、細胞系譜や機能的になんら関連の見い出されないニューロンが含まれている。UNC-86 は POU 転写因子に属し、上述の遺伝解析でタッチセルの分化に必須の蛋白質である。一部の細胞系譜では、後方の娘細胞が母細胞の細胞系譜を繰り返すことが知られており、細胞の運命決定や細胞分裂の制御を行っているらしい。また、細胞系譜の変化が起らないニューロンも存在し、ニューロンの最終分化に関与していると思われる。UNC-86 が様々なニューロンで転写制御を行っていることから、それぞれの細胞種特異的な転写調節に関わっていると思われるが、表現型を考慮すると、異なる細胞では異なる下流遺伝子群を調節していると思われる。それらは、個々の *unc-86* 変異体の表現型に対応していると思われ、下流遺伝子を同定し、各々について発現パターンや機能解析をすることにより、古典的な遺伝学では理解できなかった分子の機能を理解することが可能になるかと思われる。

我々は、*unc-86* ゲノム DNA 全域を含む DNA 断片を単離し、このコード領域に in frame になるように GFP の cDNA を挿入して UNC-86/GFP 融合蛋白質を発現するプラスミドを作成した。これを使って線虫トランスジェニック動物をつくると、線虫の *unc-86* 変異体の表現型を野性型に回復することが分かった。このストレインを大量培養し、ホモジェナイズして核を単離し、可逆的な架橋剤

によって核蛋白質と DNA を架橋した。これを *micrococcalnuclease* で処理し、個々のヌクレオソームに断片化して上述の抗 GFP 抗体にて抗原複合体を精製した。この手法により抗原複合体精製した DNA の共有結合を解離した後、DNA を PCR にて既知の UNC-86 結合部位と対照部位で比較し、既知の UNC-86 結合部位が圧倒的に効率良く回収されることを確認し、ラムダファージにライブラリを作成した。個々のインサートをシーケンス解析して、Blast 解析を行うことにより、線虫の染色体上のどの部位に相当するかを調べた。

これまでに、線虫ゲノム上に 29 ヶ所のユニークな DNA 断片を同定することができた。また、ライブラリーの他のクローンの塩基配列決定を行うことにより、容易にさらに多くの候補遺伝子と同定することが可能であり、全ゲノム的に転写制御様式を解明する糸口になる可能性がある。

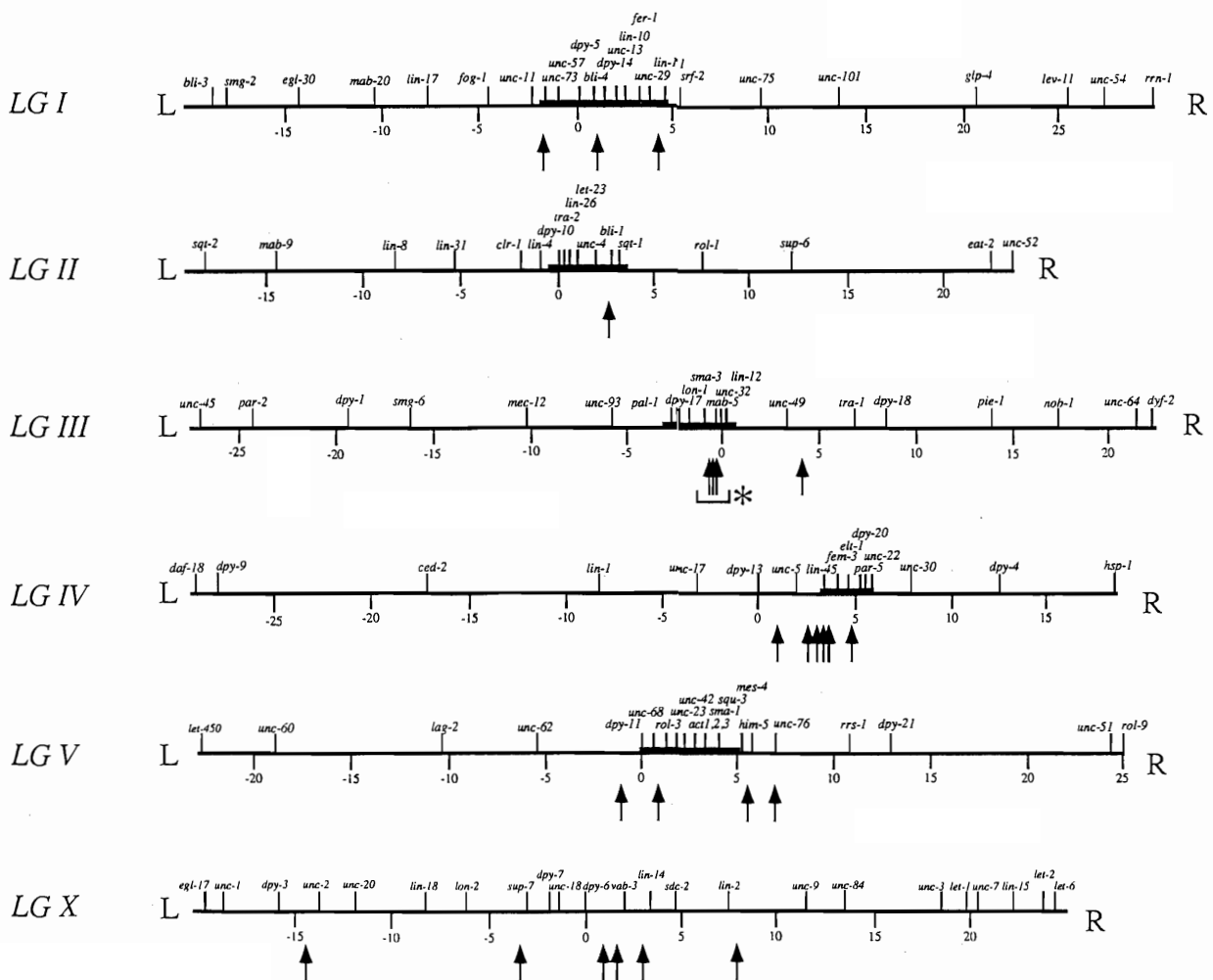
この内で、エンハンサーまたはプロモーターなどの可能性の高い部位であったものは、24 ヶ所であった。これらの DNA 断片が実際の UNC-86 の制御を受けている可能性は、24 個の内 3 個が *unc-86* 自身の自己制御領域 DNA であったことから支持される (transgene のコピー数が本来の 20-30 倍存在することから、他の標的配列に比べ得られる頻度が高いためポジティブコントロールとしても有効であることが明らかになった。 ) 。



残り 21 個の中で変異体が記載されている遺伝子は 1 個 (*unc-76*) で軸索走行に関与しており、UNC-86 発現ニューロンの一部に異常が記載されている。また、

Horvitz らのグループによる HSN ニューロンの分化制御遺伝子の遺伝学的解析によって *unc-76* が *unc-86* 遺伝子の一段階下流で作用していることも知られており、実際の制御を受けている遺伝子である可能性が強く示唆される。

既知遺伝子との相同性から、神経系で機能している可能性が示唆される遺伝子の例を挙げると、G 蛋白質共役受容体 2 個、G 蛋白質 1 個、Ser/Thr キナーゼ 2 個、細胞接着因子様分子 1 個、トランスポータ 1 個、チロシンキナーゼ 1 個、線虫行動異常変異体相同分子 1 個、ヒト神経難病原因遺伝子相同分子 1 個などである。その他、未知の構造を有するものについては、今の所、機能的情報は無く、今後の解析で神経発生や神経機能との関わりの検定および、分子機構などを解析する材料となると思われる。染色体上にマップしたものを下図に示す。



### (3) 逆遺伝学的アプローチ

#### 線虫遺伝子ノックアウトの効率的手法の開発：

線虫の逆遺伝学的解析のためにはノックアウト変異体の分離が鍵となり、多くの研究室で試みられている。基本的にはトランスポゾンの挿入と脱落を利用した目的遺伝子の欠失を PCR スクリーニングにて同定する方法と、psoralen/UV などによる 1-2 kb 程度の欠失を PCR スクリーニングにて同定する方法が用いられているが、いずれも膨大な労力を要し難点が多いとされている。一般に用いられている方法では、数十万ゲノムに 1 の変異効率であるが、我々の方法では PCR スクリーニングのレベルでは、数万ゲノムに 1、表現型スクリーニングのレベルでは 1,000 ないし数千に 1 の効率まで上げることができた。我々の方法を用いることにより、ノックアウト動物の分離は線虫実験において確実な方法になり、今後多くの研究者に利用されることが期待される。1998 年に線虫の全ゲノム塩基配列が決定されると、この方法により任意の遺伝子の欠失変異体を分離することが可能と思われる。