

線虫 *C.エレガンス* の遺伝子と遺伝子の虫

香川 弘昭

元岡山大学大学院自然科学研究科 (理学部生物学科)

はじめに

2001年の本研究会で「線虫は、遺伝子から細胞そして動物個体まで観察できる良いモデル生物である」と話しました¹。その後、ノーベル医学生理学賞が02年に線虫モデルと細胞死、06年にRNA干渉について線虫の研究者計5名に、昨年の化学賞がGFPの生体内発現についての研究で1名が加わりました²。現在ではRNA干渉やGFP(蛍光タンパク質)を用いた細胞内局在の技術が他分野でも広く利用されています。そして、細胞死、ガン(細胞増殖異常)、アルツハイマー症、肥満などのヒトの病気についての研究も盛んになってきました³⁻⁶。私が細菌のベン毛形成から、行動不良線虫の原因遺伝子である筋肉の遺伝子クローニングと塩基配列決定、さらに遺伝子発現について研究してきた過程と今後の展望を話します。

線虫研究の歴史とノーベル賞

実験動物として線虫を使った研究から2002年、06年、08年のノーベル賞受賞者が計6人も出たことで、その重要性が再認識されました。60年代にセントラルドグマが確立された後、遺伝子、細胞から個体までを研究する多細胞モデル生物として線虫 *C.エレガンス* *Caenorhabditis elegans* が選ばれ⁷、遺伝学の成果が報告された1974年から今年には35年目になります。線虫はモデル生物として早易安単の条件を満たしています。線虫は20°C、3日間で成虫になる雌雄同体で1匹の個体から子孫が生まれ、稀にいる雄との交配も可能なので細菌と同様な遺伝学が使えます。透明な体を持ち大腸菌を塗布したペトリ皿の寒天培地で生育するので実体顕微鏡で発生過程が、染色や固定することなく、細胞分裂が何時何処で如何に行われるかを容易に観察できます⁶。簡単ですが神経、筋肉、腸、皮膚など高等生物の組織を持っています³⁻⁵。

線虫の全細胞系譜が83年、全神経回路網が86年、全塩基配列が98年に報告されました。ヒトまでを考慮した発生分化と神経系の研究モデル生物として選ばれた線虫は⁷、現在でも、病気から進化まで遺伝子、細胞、行動を通して調べられるトータルバイオロジーのモデル生物でもあります。具体的な解説はすでに幾つかすでにあるので³⁻⁵、ここでは、私見を交えながら、線虫研究が如何に進

められたかなどについて概観します。

線虫研究論文の主題とノーベル賞

線虫の遺伝学	Sydney Brenner	1974
細胞系譜 卵から成虫まで	Sir J. Sulston	1983
全神経回路網	J. White	1986
計画的細胞死	R. Horvitz	1992
GFPの線虫での発現	M. Chalfie	1994
RNAi	A. Fire & C. Mello	1998
ゲノムDNAの全塩基配列	Sir J. Sulston	1998

生理学および医学賞 線虫	3名	2002
生理学および医学賞 RNAi	2名	2006
化学賞; 下村, TsienらとGFP	1名	2008

研究者が実験計画を立て実証する実験をして論文発表するまでには時間がかかります。第一線の研究者が自分の疑問から発した研究論文と、論文を読んで実験した研究論文では、発表までにかかる時間に差があります。発表された成果が広く認知されるまでにしばらくかかるのは、創造性ということで理解できます。ブレナーの論文発表から約30年経過しており、その後の線虫関連の研究から重要性の波及効果が加速しています。

生化学から遺伝学へタンパク質からDNAへ

線虫研究の歴史は生物学の展開とも大いに関わっております。微生物遺伝学の研究で遺伝子産物が生化学反応の実体である事が分かり、より複雑な生き物を研究対象に出来るようになってきたからです。多くの生物学者が種を特定した生物に興味を持ったのに比べて、ブレナー博士は線虫をヒトの研究をゴールにして初歩的な研究; 遺伝学、解剖学、形態学から成果を積み重ねました³⁻⁷。複雑な現象も突然変異体を網羅的に単離して、多数の遺伝子の性質を調べて少しずつ明らかにしてきました。決定的な役割を果たしたのは、全細胞系譜、全神経の回路網に続いて全ゲノム解析です。

私の履歴を簡単に紹介して線虫に至ったかの理由を理解していただきます。大学では、農学部農芸化学科醗酵化学講座で硫黄細菌の代謝生理を明らかにする為に末端電子伝達系のシトクロームCの精製をしました。大学院では、細菌ベン毛の形

体形成と運動との関係が課題でした。タンパク質の物理化学を調べるための微量成分の単離精製は量を増やすだけでは解決しないことを知りました。免疫電顕の手法などを駆使して学位はなんとかかまとめたものの、将来の研究展開を考慮して遺伝学

的手法を学ぶ為に流動研究員になりました。遺伝学は単離困難な産物の機能を推定出来るし、制御遺伝子の欠失で産物が多量に出来る突然変異体を用いると同じ量の培養からより多くの産物を得る事が出来ます。

Short life cycle

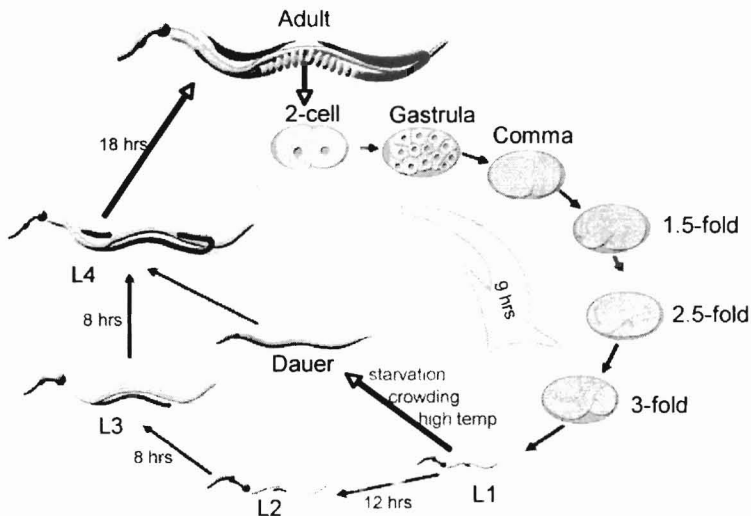


図1 線虫の生活環

線虫の生涯を模式的に表した。虫の体内で受精卵から細胞分裂、形体形成を経てふ化した幼虫が4回の脱皮を重ねて成虫になる。環境条件により耐性幼虫に変わる機構も備えている。(文献3-5より改変)

一つがわかれば後は一隅三端で、順次芋ずる式に解けるのが遺伝学の強みです。そして、遺伝子をクローニングして、塩基配列決定から産物の機能を探る手法は飛躍的に発展しました。名人が単離精製したタンパク質も使えなくなるに比べて、学部学生がクローン化した遺伝子は増幅することで何度でも産物を得る為に使えます。

線虫の生活環と研究課題との関連

線虫は寒天培地の上に塗布した大腸菌を餌にして、20度で培養すれば3日で成虫になります。一匹の雌雄同体から約200個の卵が作られ、孵化、脱皮を経て成虫になります⁶。1970年代は各人の課題の為にいろいろな変異体が単離されました。研究者人口が少なく、誰が何を研究しているかが分かっていたので、見つかった変異体をお互いに融通しあうことで研究が加速されました。線虫仲間の仲の良い交流関係は試料を交換して、自身の研究にも役立ったのです。その後、初代の研究者が各自の研究室を持ち、多くのポストドク、学生と研究するようになり研究者人口の増加で、他の分野同様の競合関係が生まれてきました。情報交換するという主張はサルストン博士の強い信念でしたが、研究費獲得などの為にやむを得ない競争も

ありました。

虫の見やすい表現型に関して long, small, dumpy, uncoordinated 等の変異体がとられました。また lethal という致死変異体もたくさん単離されました。数は有限であると信じて集めた変異体が後になって役に立ちました。Uncoordinated というのは一見分かりにくいのですが百以上の変異体が集められ、神経系、筋肉、転写因子、エネルギー等沢山の関連遺伝子がとられて、やがて整理されました。

性決定遺伝子、陰形形成遺伝子など外形から判断しやすい変異体も詳細な解析が進みました。初期発生に関わる母性遺伝子も解析されています^{3,4}。

図1で分かるように外界の条件が悪くなると耐性幼虫期を経て成虫になることから、Daf 変異体として、インシュリン受容体やリン酸化の情報伝達関連遺伝子が沢山芋ずる式にとられ、栄養関連遺伝子も解析されています。生活環が短いことから Aging に関わる変異体の解析も可能でした。

当初は虫の発生過程の詳細な研究に留まっていたのが90年以降のゲノム解析の進歩で、生物を問わず、塩基配列の比較から遺伝子機能の類推が可能になり、ヒトやマウスなどの研究課題の比較検討が容易になりました。線虫研究者は研究成果の汎用性が、ヒトやマウスの研究者にとっては研究推進の幅と深さが飛躍的に増しました。これらの

結果はデータベースにまとめられています³。

運動不良を起こす筋肉遺伝子の解析と筋肉遺伝子の発現調節

幾つかの研究課題がある中で、私が選んだのは「分裂と増殖」ではなく「運動」です。分裂増殖の研究は大腸菌や単細胞真核生物である酵母を用いた方が容易です。線虫には咽頭筋と体壁筋があり脊椎動物の心筋と骨格筋に類似しています。線虫のUnc変異体のうち、ミオシン重鎖と共に太い繊維を構成するパラミオシンの遺伝子 *unc-15* を同定して⁸、分子集合異常が運動不良をもたらす原因であることを明らかにしました。続いてルシウム信号伝達に関わるトロポニン C の遺伝子 *pat-10*⁹ やリアノジン受容体の遺伝子 *unc-68* を解析しました¹⁰。線虫を用いると遺伝子から筋肉とし

て個体までをどうして解析することが出来ます。筋肉は多数の分子が時期と場所を決めて正しく作られます。線虫の筋肉は胚発生後期のコンマ期から咽頭筋に続いて体壁筋が形成され、発生段階に従って機能します。ミオシン重鎖、トロポニンなどは2つの組織特異的なタンパク質をコードする遺伝子が知られています。多くの場合、one gene one product ですが、トロポミオシンは一つの遺伝子が2つの組織でそれぞれ2つずつ計4個アイソフォームを作ります。咽頭筋型トロポミオシン遺伝子の発現を制御する領域の配列解析と発生初期で働く転写因子の結合領域やこれらの変異体でのトロポミオシン遺伝子発現から、形体形成期における筋肉遺伝子の発現調節の流れを示しました¹¹。体壁筋遺伝子の発現調節については複雑ですが、図3に示したように順次解析されています。一つの遺伝子の詳しい解析を進めるよりも幾つかの筋

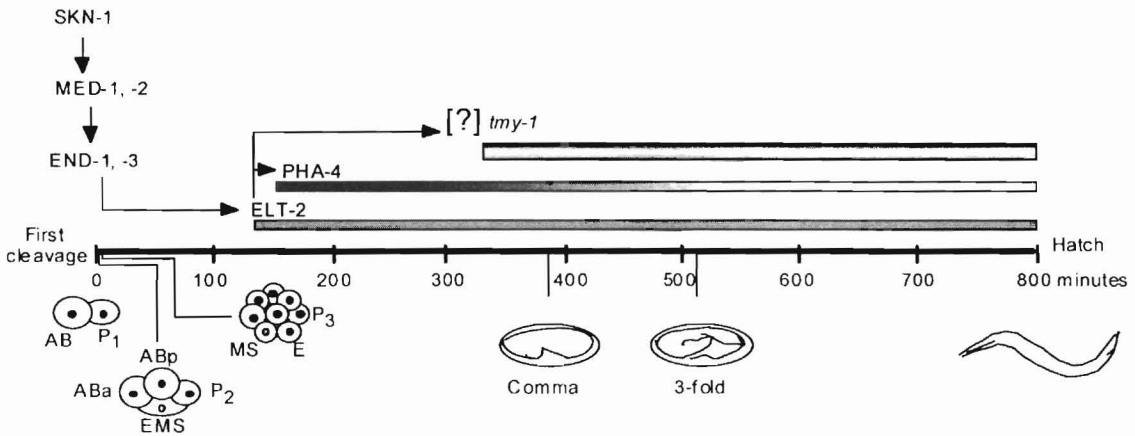


図2 線虫の発生過程とトロポミオシン遺伝子の発現時期
細胞分裂期に働く転写因子に続いて ELT-2/GATA, PHA-4/Forkhead/HFN-3 の制御下に咽頭筋、腸でのトロポミオシン遺伝子が発現する機構が明らかになった。(文献 11 より改変)

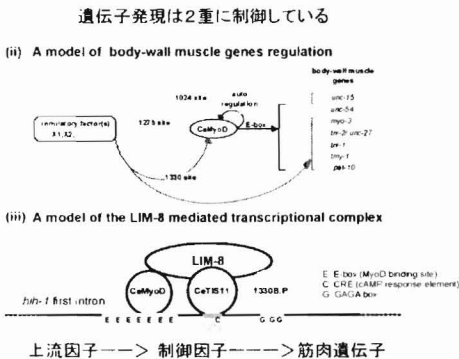


図3 体壁筋の遺伝子発現の制御モデル (未発表)
体壁筋のタンパク質遺伝子は転写因子 CeMyoD 及び上流の転写因子の制御を受けて発現する。

肉遺伝子の発現を比べることで答えが浮かび上がってきました。

線虫の遺伝子の多くは数個のエクソンに続いて比較的長いイントロンがあり、この中に転写制御因子や核ホルモン受容体の結合配列があることが分かりました (未発表)。これは遺伝子上流のプロモーターの制御に引き続き多数の環境因子の制御を受けることを可能にします。

ゲノム構造の解析

木原均博士は「地球の歴史は地層に、生物の歴史は染色体に記されている」という格言を残しており、ゲノム解析は生物を理解する上で重要です。何年かに渡る遺伝子の研究から、如何にして幾つかの遺伝子をまとめて発現調節するのたろう

という疑問が湧いてきました。得られた答えは双方向性プロモーターが線虫ゲノムの遺伝子の 1/4 も存在することです^{12,13}。反対方向に対位した遺伝子上流は共有しており、正と負の因子及び共通の因子の作用で制御していることが推定されました。この転写機構は合目的でファージからヒトまで広く保存されています。

最近 miRNA の役割が注目されており、ゲノムの大部分を占めるイントロン領域の生物学的機能についても解析の余地が沢山残っています¹³。

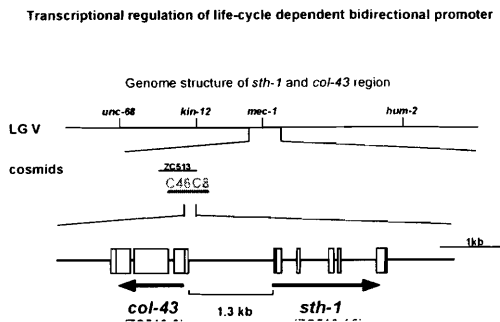


図4 双方向転写因子の制御例(文献12より改変)

モデル生物線虫の今後の研究展開

アメリカ遺伝学会主催で「モデル生物からヒトの生物学」www.mohb.org が毎年開催され、ヒト遺伝病との関連研究も盛んで、線虫研究者が大いに貢献しています。培養細胞やノックアウトマウスの研究だけでは限界があり、個体を用いた全生涯の研究には線虫の利点が発揮されます。理、医、歯、薬、農、工学部の研究者も多数現れ、今後はシステムバイオロジーとして展開されます。

研究展開に重要なのはやはり、線虫の研究者がこれまで勠めてきた研究態度でしょう。研究者仲間の情報交流誌 The Worm Breeder's Gazette が、ノーベル賞を受賞したチャルプイー博士の呼びかけで6年ぶりに復活しました。彼は論文発表に先駆けて GFP ベクターの公表と試料の配布をしています。未発表の技術、研究課題などの情報交換は線虫研究者のみならず科学研究に携わる多くの人達に共通して必要なことです。

謝辞

本研究は岡山大学に着任後、英国 MRC 分子生物学研究所で2年間勤務して、帰国後多くの学生達の興味とともに研究を進めて得た研究成果の概略です。研究室の学生、外国の研究者の助言と協力によって研究遂行できた事に感謝します。

参考文献

- 香川弘昭、2001、岡山実験動物研究会会報 18、23-28.
- 香川弘昭、2009、線虫 *C. エレガンス* 7年間で6人とともにノーベル賞を受賞 *実験医学* 27、583-587. 羊土社
- URL <http://www.wormbase.org/>
- C. ELEGANS II* (Riddle, Blumenthal, Meyer, Priess, Edt), CSH Press 1997
- 線虫 究極のモデル生物 2003 (飯野雄一/石井直明 編) シュプリンガー・フェアラーク東京
- 線虫 ラボマニュアル 2003 (三谷昌平編) シュプリンガー・フェアラーク東京
- 丸田 浩/丸山一郎/丸山李沙 共訳 *エレガンスに魅せられて* シドニー・ブレナー自伝 2005 (編集 エロール・フリードバーグ/エレノア・ローレンス) 琉球新報社
- Kagawa, H., Gengyo, K., McLachlan, A. D., Brenner, S., Karn, J. Paramyosin gene (*unc-15*) of *Caenorhabditis elegans*: Molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *J. Mol. Biol.* 207, 311-333 (1989)
- Terami, H., Williams, B., Kitamura, S-I., Sakube, Y., Matsumoto, S., Doi, S., Obinata, T., Kagawa H. Genomic organization, expression, and analysis of the troponin C gene *pat-10* of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 146(1), 193-202 (1999)
- Hamada, T., Sakube, Y., Ahnn, J-h., Kim, D-H., Kagawa, H. Molecular dissection, tissue localization and Ca²⁺ binding of the ryanodine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 324, 123-135 (2002)
- Anokye-Danso, F., Anyanful, A., Sakube, Y., Kagawa, H. Transcription factors GATA/ELT-2 and Forkhead/HNF-3/PHA-4 regulate the tropomyosin gene expression in the pharynx and intestine of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 379, 201-211 (2008)
- Bando, T., Ikeda, T., Kagawa H. The homeoproteins MAB-18 and CEH-14 insulate the dauer collagen gene *col-43* from activation by the adjacent promoter of the spermathecal protein gene *sth-1* in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 348, 101-112 (2005)
- 香川弘昭、板東哲哉、高島康郎、2009 ゲノムの地理と歴史-非コード領域の生物学的機能-*生物物理* 49, 246-248.

Studies and Scientists of the model organism *Caenorhabditis elegans*

Hiroaki Kagawa
Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University
<http://wormbase.org/db/misc/person?name=WBPerson300;class=Person>