

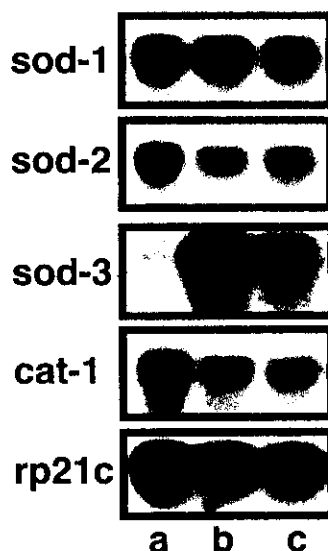
やすパラコート (PQ) で処理し、急性的な酸化ストレスをかけた。高酸素処理は、単独では野生体と変異体に対し 4 日間の観察で致死効果はなかったが、PQ 毒性を高めた (表 1)。

表 1 は 20 °C で高酸化ストレス状態に曝されたときに、様々な変異体が生存する日数を示している。高酸素下で PQ 処理された *spe-26(hc138)* と *clk-1(e2519)* 変異体の生存日数は野生体の生存日数と変わらなかった。これに対し、*daf-2* 変異体のいくつかのアリルは許容温度の 20 °C で長寿命 (Age) の表現型を、非許容温度の 25 °C では恒性的耐性幼虫 (Daf-c) の表現型を示し、どちらも同じ条件において野生体と比べ長い期間生存した。*daf-2(e1370)* 変異体は細胞内で O<sub>2</sub> を生成させるメナジオン 20 mM に対して強い耐性を示した (表 1)。これらの結果は *daf-2* 変異体が許容温度で酸化的ストレス耐性 (Oxr) の表現型を持つことを示している。次に私達は *age-1* 変異体の酸化的ストレス耐性について調べた。*fer-15 ;age-1(hx546)* と *age-1(hx524)* 変異体は、*fer-15* の対照と比べて高酸素下での PQ 処理に対して耐性を示した (表 1)。この結果は *age-1* 変異体が PQ に耐性であ

るとする以前の結果と合致する (22)。Daf-c ではあるが非 Age 変異体の *daf-1*、*daf-7* や *daf-11* は Oxr 表現形質を示さない (表 1)。この結果は Daf-c の中において Age (23, 13) と Oxr の表現形質に相関があることを示すものである。

#### ■二重変異体における Oxr 表現型

インスリンシグナル経路における、その他の遺伝子の Oxr 表現型に及ぼす影響を調べるために *daf-*



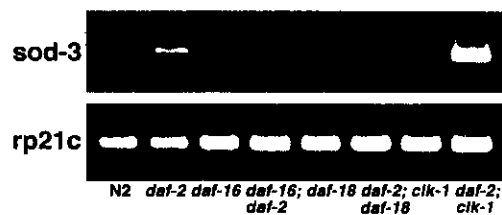
*2(e1370)* 変異体との種々の 2 重変異体を作成し、酸化ストレス耐性を測定した。*daf-16 (m26)* 及び *daf-18(e1375)* 自身は酸化的ストレスで野生体に比べて感受性や耐性を示すことはなかった。表 1 に示すように *daf-2* と *daf-16 (m26)* の 2 重変

異体と *daf-2* と *daf-18(e1375)* の 2 重変異体は野生体と同様の酸化ストレス感受性を示し、*daf-16 (m26)* は *daf-18(e1375)* と共に *daf-2* を完全に抑圧した。この結果は *daf-16* と *daf-18* は酸化ストレス耐性の表現形質に関して *daf-2* の下流にあることを示している。一方、長寿命変異体 *clk-1* はそれ自身では Oxr を示さないが、*clk-1* と *daf-2(e1370)* の 2 重変異体では *daf-2(e1370)* に比べてより強い酸化ストレスに耐性を示す (表 1)。 *clk-1* による *daf-2* の表現形質への促進効果は長寿命形質でも観察されている (24)。この結果も *daf-2* 遺伝子ネットワークにおいて Age と Oxr の両表現形質に相関があることの証拠である。

### ■ *daf-2* 変異体における *sod-3* mRNA レベル

インスリンシグナル伝達経路が許容温度において抗酸化防御酵素の遺伝子発現を調節するか否かを調べるために、*daf-2* 変異体において SOD やカタラーゼの mRNA 転写量を測定した。*daf-2(e1370)* と *daf-2(sal189)* 変異体では野生体に比べて著しく高レベルは野生体と同様であった (図 1)。*daf-2(e1370)* 変異体の *sod-3* mRNA の増大は *daf-16 (m26)* の変異や *daf-18 (e1375)* の変異

で抑圧された (図 2)。



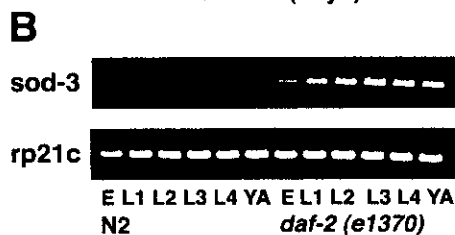
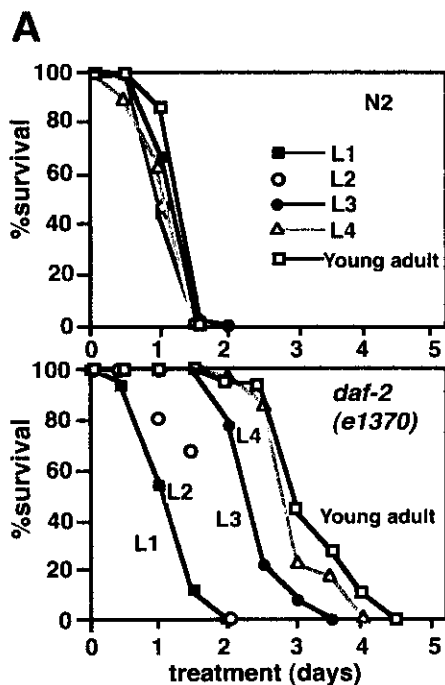
*age-1(hx542)*; *fer-1* の *sod-3* mRNA のレベルが観察された。これに対し *sod-1* と *sod-2*、カタラーゼ (*Cat-1*) の mRNA *15(b26)* 変異体と *age-1(hx546)*; *fer-15(b26)* 変異体は対照の *fer-15(b26)* 変異体に比べて *sod-3* mRNA の増大がみられた (未発表データ)。これらの結果は実際に *daf-2* 遺伝経路が *sod-3* 遺伝子の発現を調節していることを示している。

*clk-1(e2519)* 変異体では *sod-3* mRNA の増大はみられない。しかし *daf-2* との 2 重変異体 *daf-2; clk-1* では *daf-2* 変異体よりさらに *sod-3* mRNA の増大がみられる (図 2)。この結果は *clk-1* が *daf-2* の表す長寿命表現形質を促進すること (24) と考えあわせると興味深い。

### ■ Oxr と *sod* mRNA レベルに及ぼす成長時期の影響

酸化ストレスに曝された時の Oxr 表現型が成長の時期によって異なるかどうかを調べた。野生体では

成長の時期に関わらず、Oxr 表現型を示すことはなかった (図 3A)。しかし *daf-2(e1370)* の Oxr 表現型は L1 期にはみられず、L2 期以降で認められた (図 3A)。*daf-2* 変異体の Oxr 表現型が野生体における耐性幼虫形成時期と一致することは興味深い (25)。次に *daf-2(e1370)* 変異体と野生体の種々の成長時期で *sod-3* 遺伝子の発現量を調べた。野生体では胚から成虫まで低いままだった (図 3B)。

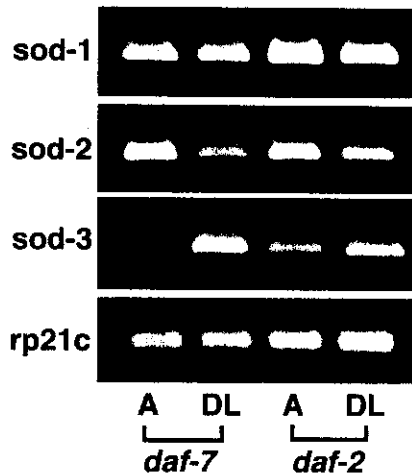


それに対して *daf-2* 変異体では胚か

ら L2 期まで上昇し、その後、高いレベルが続いた (図 3B)。

### ■耐性幼虫における *sod-3* mRNA レベル

*sod-3* 発現の耐性幼虫化における



意義を知るため、Daf-c 変異体であって Age 変異体であるものと Age 変異体でないものについて *sod3* mRNA のレベルを比較した。*daf-7(e1372)* 変異体では Oxr 表現型と Age 表現型は認められず (表 1)、*sod-3* mRNA の増大もみられなかった。従って *sod-3* mRNA レベルが高いという表現型は Daf-c に共通にみられるものではなく、インスリンシグナル経路の特徴であることを示している。しかし *daf-7* 変異体を非許容温度で生育して耐性幼虫にした場合、*daf-2* 変異体と同様に高い *sod-3* mRNA レベルを示した

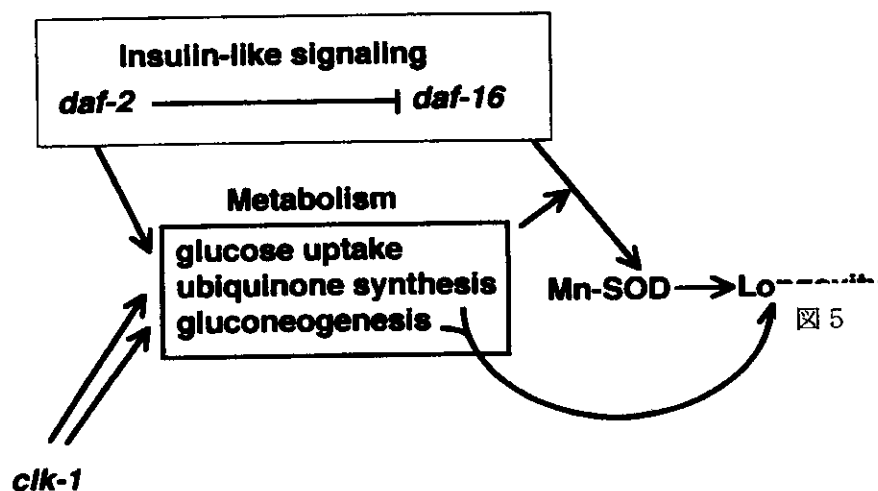
(図4)。これらの結果は耐性幼虫においては、いかなる遺伝背景でも高い *sod-3* mRNA レベルを示し、*daf-2* 経路は成虫でも *sod-3* 遺伝子発現を増大できることを示している。

### 1) 考察

私達は *daf-2* 変異体が *Daf-c* と *Age* の表現型のみならず *Oxr* の表現型も持つことを示した。*daf-2* 変異体における *Oxr* の表現型には正常な *daf-16* 遺伝子の機能が必要であり、これは *daf-2* 変異体の他の表現型と同じである。*daf-2* 遺伝子は一連のシグナル伝達経路の中のインスリン/インスリン様成長因子の受容体蛋白質をコードしており (26)、この遺伝子の異常は *daf-16* 遺伝子を活性化を通して酸化ストレス耐性を調節していると考えられる。*daf-16* 遺伝子は HNF-3/フォークヘッドファミリー転写因子の蛋白質をコードしているため

(27、28)、*daf-2* 変異は既存の酵素活性を変化させるというよりも、酸化ストレス耐性の獲得に関与した一連の遺伝子を活性化させるのではないかと考察される。これらの遺伝子のいくつかは抗酸化防御系の構成因子であるはずである。私達は *daf-2* 変異体において、スーパーオキシドの発生源であるミトコンドリアに局在する Mn-SOD をコードする *sod-3* 遺伝子の mRNA レベルが高くなっていることを見つけた。また *daf-16* と *daf-18* 遺伝子の変異がそれぞれ *daf-2* 変異体の *Oxr* 表現型と *sod-3* mRNA レベルの上昇を抑制することも明らかにした。これらの結果はインスリン様シグナル伝達の経路が Mn-SOD 遺伝子発現を介して酸化ストレス耐性を獲得していることを示唆している。

線虫には他の真核生物では一つしか報告されていない Mn-SOD 遺伝子が、*sod-2* と *sod-3* の二つ存



在する (16)。これらは アミノ酸レベルで 85%以上の相同性を持つ。しかし *sod-2* は成虫でも耐性幼虫でもほとんど同じレベルで発現しているが、*sod-3* は老化しない耐性幼虫において得に発現レベルが高い (図4)。このことは *sod-3* が耐性幼虫という生命維持のための有効なサブプログラムへのスイッチの切り替えに関与している可能性を示唆している。一方 *sod-2* は、おそらく野生体の成虫の寿命を維持するための通常の抗酸化ストレス防御のために機能しているのではないかと考えられる。

長寿命の変異体がすべて酸化ストレス耐性を獲得しているわけではない。たとえば *clk-1(e2519)* は *Oxr* の表現型を示さなかった (表1)。興味深いことに *clk-1* 変異は *daf-2(e1370)* 変異体において *sod-3* mRNA レベルだけでなく、*Oxr* 表現型も著しく亢進している (図2)。*clk-1* と *daf-2* 遺伝子の二重変異体における著しい寿命延長が報告されている (24) ことから、*clk-1* 遺伝子の変異が *daf-2* 変異体において *Oxr* 表現型と *sod-3* mRNA レベルの両方を介して寿命延長に関与していることが示唆される。*clk-1* 遺伝子は酵母の糖新生とミトコンドリアにおけるユビキノン合成とに

関与している *CAT5/COQ7* (29、30) の相同遺伝子をコードしている(31)。従って *clk-1* 遺伝子の機能はおそらく細胞のエネルギー代謝を調節するものであろう。

図5のモデルにおいて、*daf-2* 変異によるインスリン様シグナルの欠如は Mn-SOD 遺伝子の発現調節系を活性化させる。この系は例えばブドウ糖濃度やミトコンドリアの酸化還元レベルなどのような細胞のエネルギー代謝のレベルによって調節されている。これは哺乳類において血糖値がインスリンによって発現が調節される種々の遺伝子の発現に影響を与えているようなことを示している。*clk-1* と *daf-2* 遺伝子変異の寿命延長に与える相乗効果は、*clk-1* 変異がミトコンドリアにおけるエネルギー代謝を低下させ、それがインスリン様シグナルによる Mn-SOD 遺伝子の発現調節系をさらに活性化させることによってもたらされるものかも知れない。

Table 1. Survival period of *C. elegans* mutants under oxidative stress

Type of Oxidative Stress	Mutant	Survival (mean $\pm$ S.D., days), No. of animals	Age <sup>1</sup>
Paraquat + 98% O <sub>2</sub>	N2	1.4 $\pm$ 0.4, 90 <sup>b</sup>	-
	<i>daf-2 (e1370)</i>	3.3 $\pm$ 0.5, 92 <sup>c</sup>	+
	<i>daf-2 (sa189)</i>	2.4 $\pm$ 0.4, 85 <sup>c</sup>	+
	<i>daf-2 (sa193)</i>	2.4 $\pm$ 0.6, 98 <sup>c</sup>	+
	<i>clk-1(e2519)</i>	1.5 $\pm$ 0.1, 60	+
	<i>spe-26 (hc138)</i>	1.4 $\pm$ 0.3, 70	+
	<i>daf-1 (m40)</i>	1.3 $\pm$ 0.3, 76	-
	<i>daf-7 (e1372)</i>	1.4 $\pm$ 0.3, 72	-
	<i>daf-11 (m47)</i>	1.3 $\pm$ 0.3, 95	-
	<i>fer-15 (b26)</i>	1.3 $\pm$ 0.4, 81 <sup>d</sup>	-
	<i>age-1 (hx542); fer-15 (b26)</i>	1.8 $\pm$ 0.5, 67 <sup>c</sup>	+
	<i>age-1 (hx546); fer-15 (b26)</i>	1.9 $\pm$ 0.6, 85 <sup>c</sup>	+
	<i>daf-16 (m26)</i>	1.3 $\pm$ 0.3, 95	-
	<i>daf-16 (m26); daf-2 (e1370)</i>	1.5 $\pm$ 0.2, 73	-
	<i>daf-18 (e1375)</i>	1.3 $\pm$ 0.3, 90	-
	<i>daf-2 (e1370); daf-18 (e1375)</i>	1.4 $\pm$ 0.3, 72	-
	<i>daf-2 (e1370); clk-1 (e2519)</i>	4.6 $\pm$ 1.0, 81 <sup>d</sup>	+
Paraquat under air	N2	3.7 $\pm$ 1.4, 68 <sup>e</sup>	-
	<i>daf-2 (e1370)</i>	5.9 $\pm$ 1.9, 96 <sup>f</sup>	+
Menadione + 98% O <sub>2</sub>	N2	2.0 $\pm$ 0.4, 85 <sup>g</sup>	-
	<i>daf-2 (e1370)</i>	3.2 $\pm$ 1.0, 87 <sup>h</sup>	+

表1 b と c、c と d は ANOVA 及び Scheffe F 検定により  
有為差あり (P<0.0001)

e と f、g と h は Student's T test により有為差あり (P<  
0.0001)

## 文献

- 1 McCord JM, Fridovich I, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969 Nov 25;244(22):6049-55
- 2 Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al , Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 362: 59-62 (1993)
- 3 Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Scott RW, Snider WD, Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*. 13(1):43-47 (1996)
- 4 Hari R, Burde V and Arking R, Immunological confirmation of elevated levels of CuZn superoxide dismutase protein in an artificially selected long-life strain of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 33(3):227-237(1998)
- 5 Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP and Boulianne GL, Extention of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nature Genet* 19(2):171-174 (1998)
- 6 Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y and Epstein CJ, Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55(1):B5-9 (2000)
- 7 Gallagher IM, Jenner P, Glover V and Clow A, CuZn-superoxide dismutase transgenic mice: no effect on longevity, locomotor activity and 3H-mazindol and 3H-spiperone binding over 19 months. *Neurosci Lett* 289(3):221-223 (2000)
- 8 Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 11(4):376-381 (1995)
- 9 Wispe JR, Warner BB, Clark JC,

- Dey CR, Neuman J, Glasser SW, Crapo JD, Chang LY, Whitsett JA. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem.* 267(33):23937-23941 (1992)
- 10 Mockett RJ, Orr WC, Rahmandar JJ, Benes JJ, Radyuk SN, Klichko VI, Sohal RS. Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch Biochem Biophys.* 371(2):260-269 (1999)
- 11 Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(14): 6264-6268 (1995)
- 12 Honda Y, Honda S. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 13 (11): 1385-93 (1999)
- 13 Larsen PL. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8905-8909 (1993)
- 14 Suzuki N, Inokuma K, Yasuda K, Ishii N. Cloning, sequencing and mapping of a manganese superoxide dismutase gene of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *DNA Res.* 3: 171-174(1996)
- 15 Giglio MP, Hunter T, Bannister JV, Bannister WH, Hunter G J. The manganese superoxide dismutase gene of *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33: 37-40(1994)
- 16 Hunter T, Bannister WH, Hunter GJ. Cloning, expression, and characterization of two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 272: 28652-28659(1997)
- 17 Fujii M, shii N, Joguchi A, Yasuda K, Ayusawa D. A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. *DNA Res.* 5(1) : 25-30 (1998)
- 18 Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94(1974)



- 19 Lewis JA and Fleming J T  
*Caenorhabditis elegans*: Modern biological analysis of an organism. Basic culture methods. *Methods Cell Biol.* 48: 3-29 (1995)
- 20 Honda S, Ishii N, Suzuki K, Matsuo M. Oxygen-dependent perturbation of life span and aging rate in the nematode. *J. Gerontol.* 48: B57-B61(1993)
- 21 Chomczynski P, and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159(1987)
- 22 Vanfleteren JR. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 292: 605-608 (1993)
- 23 Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-464 (1993)
- 24 Lakowski B and Hekimi S. Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 275: 980-983 (1996)
- 25 Riddle DL and Albert PS. Genetic and environmental regulation of dauer larva development. In *C. elegans II* (Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., and Priess, J. R., eds), pp. 739-768, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y. (1997)
- 26 Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942-946 (1997)
- 27 Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389: 994-999 (1997)
- 28 Lin, K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278: 1319-1322 (1997)
- 29 Randez-Gil F, Bojunga N, Proft M, Entian KD. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in

*Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. Mol. Cell. Biol. 17: 2502-2510 (1997)

30 Jonassen T, Proft M, Randez-Gil F, Jeffery R, Schultz JR, Marbois BN, Entian KD, Clarke CF. Yeast *clk-1* homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. J. Biol. Chem. 273: 3351-

3357 (1998)

31 Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, Lussier M, Bussey H, Hekimi S. Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. Science 275: 980-983(1997)

知的所有権の取得状況  
該当する知的所有権なし。

分担研究者 三谷昌平 東京女子医科大学医学部・第二生理学助教授

#### 研究要旨

線虫 *Caenorhabditis elegans* はショウジョウバエとならんで多細胞生物の遺伝学的解析のための重要なモデル生物としての位置付けがなされてきた。その特徴としては、躯が透明で微分干渉顕微鏡による細胞系譜が網羅的に記載されていること、躯が小さいことから電子顕微鏡の連続切片像の再構築により、全神経等の形態が記載されていること、生活環が短く、かつ、飼育が容易で、凍結保存が可能であることから多種類のストレインを用いた遺伝学的解析のために都合が良いことなどが挙げられる。1998 年末に発表された、多細胞生物として初めての全ゲノム塩基配列決定は、ゲノムシーケンスの技術的な進歩を示し、今日のヒトゲノムプロジェクト等のゲノム構造解析の急速な進行を決定的に印象付けた [1]。同時に、その時に提示された「Sequence to Biology」という言葉は、ポストゲノムシーケンス時代の重要な研究目標の設定でもあったと思われる。さらに、線虫の遺伝子が約 2 万であり、哺乳類の遺伝子数がその 2 倍の 4 万に満たないという最新のヒトゲノム構造解析の結果 [2, 3] や、線虫遺伝子中に多くのヒト疾患遺伝子ホモログが存在することが明らかになった [4] ことなどから、線虫を用いた遺伝子機能解析はさらに進展して行くことが予想される。

ゲノム解析とは別に、線虫 *C. elegans* は老化研究のモデル生物としても重要な位置付けを獲得して来た。線虫は哺乳動物に比べて、寿命も短く、1 ヶ月程度の実験で解析可能である。従って、寿命に与える遺伝的素因の解析という目的に対して、上記のゲノム塩基配列情報と併せれば、線虫は非常に有効なモデル生物であると考えられる。少なくとも、線虫の寿命決定に関わる遺伝的要因となり得る遺伝子群は、既に、塩基配列解析によりデータベース化されている。我々にとって必要なのは、いかにしてその中のより重要な候補遺伝子を見出し、各々の働き方を詳細に検討し、ヒトの老化メカニズムの理解に役立つ情報を抽出し、ヒトの健康な生活に役立つ知識に変換することであると考えられる。そのための基礎とも言える線虫ゲノムの構造と機能の解析について紹介する。

## 【1】線虫ゲノムの構造解析の流れ

### (1) 物理地図の作成

Coulson らは線虫ゲノム DNA をランダムに有するコスミドクローンを集めた。お互いの位置関係は、フィンガープリント法で隣同士を繋ぎ合わせたり、染色体の場所が特定できた YAC (yeast artificial chromosome) をはりつけたメンブレンへのハイブリダイゼーションを行うことにより決定された。既存の変異体遺伝子との位置関係などを考慮して、ゲノム物理地図が作成された [5]。

### (2) 線虫ゲノム塩基配列決定

コスミドだけではクローニングの難しい領域が多数残り、そのような場所は、YAC を用いてギャップを埋めている。各々のつなぎ合わされたコスミド（場合によっては YAC や PCR 産物）の塩基配列決定を行い、1998 年末には遺伝子の密度の高い部分のほぼ全領域の塩基配列決定が終了した [1]。

### (3) 遺伝子の注釈付け

線虫の遺伝子の ORF は GENEFINDER と呼ばれるソフトウェアで推定された [6]。線虫ではトランススプライシングと呼ばれる共通の RNA と個々の転写産物がスプライシングにより 1 個の mRNA になる

現象が知られている。また、遺伝子密度の高い部分では、隣との遺伝子の距離が近い。そのため、各々の遺伝子の同定は、このプログラムによって推定された ORF が実際の EST と合致するか否かを調べられ、情報の得られるものに関しては、高い確率 (92%) で正しいことが確かめられた。

その他にも、他の生物の蛋白質との相同性や、近縁の線虫 *C. briggsae* のゲノム塩基配列情報を加味して、個々の遺伝子の推定が進められた。これらを総合して、19,000 強の蛋白質が作られると推定されている。しかし、実際には、これらの情報は、個々の遺伝子の解析により、修正される場合もあり、alternative splicing が新たに見つかることも多いので、今後もバージョンアップされて行くことが予想される。

*C. elegans* には、蛋白質に翻訳されない RNA もたくさん存在する。tRNA 遺伝子が 659 個あるし、スプライソーム RNA 遺伝子も多数存在する。その他にも、リボソーム RNA 遺伝子などの多くの生物で見られるような非翻訳 RNA 遺伝子群が存在する。これらの多くは、コンピュータプログラムで推定された。

## 【2】単細胞生物から保存されている遺伝子群

既に原核生物や酵母などの単細胞系でのゲノム構造解析が進んでいるので、線虫の推定蛋白質とこのような生物のそれとを比較することにより、線虫にどのような遺伝子が存在するかの情報が得られる [7]。その中で、酵母と線虫に共通に存在する蛋白質群は、おそらく、真核生物にとって最も基本的かつ重要な機能を担う分子であることが予想される。比較的甘い基準での ( $P < 10^{-10}$ ) では、相同遺伝子は酵母の 2,497 個 (約 40%) に対して線虫で 3,653 個 (約 19%) が対応する。従って、線虫では、基本的な遺伝子群は、酵母に比べ少なく、逆に言えば、多細胞生物としてのより高等な機能に用いられている遺伝子群の比率が高いことを意味する。

このような必須遺伝子の構成としては、細胞骨格 (5%)、リボソーム蛋白質 (6%)、信号伝達系蛋白質 (11%)、蛋白質のフォールディングや分解に関与する蛋白質 (13%)、膜を介する輸送や分泌 (11%)、核酸代謝 (18%)、細胞内代謝 (28%)、機能未知 (8%) などに分類される。これらの遺伝子数の線虫と酵母の間での比は比較的 1 に近い値を取っており、必要度も近いと考えられる。こ

のようなものではしばしば酵母と線虫でオルソログが 1 対 1 対応しており、遺伝子ファミリーを構成している場合でも、各々の生物のパラログより、他生物のオルソログにより相同性が認められている。このようなものに合致しない遺伝子については、それぞれの生物に特徴的な働きに使用されていると想像されている。

## 【3】多細胞生物で特徴的な遺伝子群

前項とは逆に、酵母には少なく (或いは見つからない)、線虫で多く見出される遺伝子群が存在する [7]。これらは、おそらく、多細胞生物への進化の中で、重要な位置付けを占めると考えられる (線虫特有の遺伝子も存在するが、これについては割愛する)。これらの遺伝子については、最新のヒトやマウスのゲノム・EST 構造解析などの成果と比較し [2, 3, 8]、線虫のどのような遺伝子が近い形で使われているかも知ることができ、今後の機能解析の対象としての重要性を占うものでもある。

このカテゴリーに含まれる代表的なものとしては、細胞内での蛋白質間相互作用に関連するものとして、MATH ドメイン蛋白質、POZ ドメイン蛋白質、PDZ ドメイン蛋白質、LIM ドメイン蛋白質などが挙げられる。

チロシンリン酸化シグナリングに関連するものとして、PTB (リン酸化蛋白質結合ドメイン蛋白質)、SH2ドメイン蛋白質、PTPase (チロシン脱リン酸化酵素)、などが挙げられる。cyclic nucleotide monophosphate によるシグナリングに関連するものとして、cNMP cyclase、PDE、cNMP 結合ドメイン蛋白質などが挙げられる。転写因子としては、ホメオドメイン蛋白質、核ホルモン受容体、T-box 転写因子、Paired box 転写因子、SMAD 転写因子などが挙げられる。細胞接着因子などとしては、EGF ドメイン蛋白質、Cadherin、FN III ドメイン蛋白質、LRR ドメイン蛋白質、ラミニン様蛋白質、その他にも、カルモジュリン様 EF ハンドを有する蛋白質、イオンチャネル、7回膜貫通受容体、インスリン様ペプチドや FMR/Famides などの細胞間信号伝達分子も線虫では酵母に比べて多く存在する遺伝子群である。これらの遺伝子の機能は、細胞種の分化やそれら間でのコミュニケーションや集合に重要なものであらうと想像される。

#### 【4】線虫ゲノム構造解析を土台とした遺伝子機能解析

##### (1) 線虫での RNA 干渉法

線虫でのゲノムおよび EST 構造解

析の成果は、それらによって同定された遺伝子の機能解析へと進展しつつある。これらは、当然、老化メカニズムの解明へと応用されるべきものと考えられる。手法としては、大きく2種類ある。

第一には、RNA 干渉法 (通称 RNAi 法) と呼ばれる方法が大きな成功を収めている。すなわち、機能を阻害したい遺伝子の cDNA を鋳型として、その両方の鎖に相当する RNA を合成して二本鎖にし、これを線虫の体腔にマイクロインジェクションすることにより遺伝子ノックアウト実験を簡単に行うことができる方法である。Fire らは、アンチセンス RNA の効果がしばしば対照群として用いたはずのセンス RNA と大差が無いことを詳細に解析する過程で、*in vitro* で合成する過程で少量の夾雑物としてできてしまう反対側の RNA 鎖との間に生じた少量の二本鎖 RNA が強力な遺伝子機能阻害効果があることを見出した [9]。しかも、この作用は、マイクロインジェクションを行う組織に対してだけでなく、神経系を除く多種類の線虫の細胞種に作用するケースが多いことが知られている。効果は、基本的には一過性であるが、処理した個体 (P0) のみでなく、多くの場合には、その子供 (F1) 世代で著効を示す。RNAi 法には、さらに

便利な性質があることも分かってきた。例えば、二本鎖 RNA の投与の仕方として処理したい線虫個体を RNA 溶液に浸すだけで効果が見られる [10] とか、線虫の餌として与える大腸菌の中に予め二本鎖 RNA を合成するプラスミドを入れておくことにより効果を発揮できる [11] などである。

これらの方法は簡便であり、多数の遺伝子についての解析が可能である。特に、初期発生や生殖系列細胞の機能分化に関与する遺伝子群のスクリーニングには著効を示している [12-14]。すなわち、ゲノムおよび EST 構造解析によって得られた PCR 法により多数（原理的には全て）の遺伝子産物に対する RNA 干渉法の効果を検定できる現状にある。効果が一過性であることから、研究者が見落とすことにより記載されない表現型もあるが、おそらく、胚性致死や不妊のような表現型を呈する遺伝子の数は近い将来ほぼ全て見出されると予想される。しかし、残念ながら、老化研究については、今のところ RNA 干渉法は決定的な位置を占めていないと考えられる。寿命の解析は、各々の個体を死ぬまで培養して経時的に観察する必要があるが、一過性の効果では、本当に死ぬ時期が近くなってから作用しているのかどうか

確信できないためである。

## （2）線虫での欠失変異体分離法

第二の方法としては、遺伝子欠失変異体の分離が挙げられる。線虫の遺伝子欠失変異体分離は、ノックアウトマウスの作成の時に使用する相同組み換えの原理が線虫で有効に働かないために、方法論的な問題点が大きく、RNA 干渉法より随分前から研究されてきたにも関わらず今では解析されている遺伝子数としては、むしろ遅れつつある。しかし、RNA 干渉法と異なり、該当する遺伝子そのものを欠失することによって、その個体にとって永続的に特異的な遺伝子機能を阻害することが可能であることや、神経系等で発現する遺伝子や発現量の低い遺伝子に対しても有効な方法であることから、老化研究にとってはより重要な方法であると考えられる。さらに、RNA 干渉法では、機能阻害した遺伝子の特異性は保証されないが、欠失変異体では、バッククロスと該当遺伝子による表現型回復によって確認ができるばかりでは無く、トランスジェニック作成時にいろいろな変異を加えた遺伝子や他生物のオルソログを導入し、表現型回復を指標に蛋白質機能を検定するツールとして使用可能であることが大きな利点である。これにより、単に、線虫でどの遺伝子がどの

ように働いているか、という視点から、特定のドメインが生物一般でどのような働きをしているかを線虫をアッセイ系として解析するという実験医学的な応用が期待できるのである。

欠失変異体分離法としては、線虫で見つかったトランスポゾン Tc1 を用いる方法と物理化学的な方法で欠失変異を導入する方法とに別れる。トランスポゾンを用いる方法は元々、変異体から遺伝子クローニングに用いられていたトランスポゾンタギング法の延長線上にある [15]。自然に飼育していてもしばしば目に見える形の変異体が多発する線虫の株が知られておりそのような株では我々が通常野生型と呼んでいる N2 株に比べて桁多いトランスポゾン Tc1 が存在することが知られている。これらの株を分けて飼育し、各々のポピュレーションをプール（凍結保存）して、かつ一部から DNA を抽出し、トランスポゾンの塩基配列と目的の遺伝子の塩基配列との特異的プライマーを合成してスクリーニングを行う。目的の遺伝子内にトランスポゾンの挿入が起こった場合には、野生型では存在しないはずの特異的プライマーとトランスポゾンプライマーとの間での増幅産物が得られることを指標にスクリーニングを行う。陽

性シグナルが得られた場合には、元のプールを細分化して行き、トランスポゾン挿入株を含んでいるプールを解凍し、陽性シグナルを出した個体の姉妹個体にトランスポゾン挿入株が存在するはずであるので、これを同定する。このようにしてトランスポゾン挿入個体を得られる。しかしながら、トランスポゾン挿入の場合、しばしば遺伝子の失活に至らないことが多い。そこで、トランスポゾン挿入株を上述の手技で多数に分けて培養し、稀に発生するトランスポゾン脱落の際に周囲の遺伝子を同時に欠失させる例をスクリーニングする場合は、トランスポゾン挿入位置の両側に遺伝子特異的プライマーを作成し、本来は PCR 法にて増幅しないはずの DNA がトランスポゾンの脱落と欠失変異が生じた事により有意に短くなり、増幅されるものをスクリーニングする。欠失変異体分離法としては、この方法が大勢を占めていたが、二段階のスクリーニングが必要なこと、トランスポゾンの脱落の際に欠失が起こる確率が低く、実際には挿入株しか分離できないケースが多いなどの理由で次に挙げる物理化学的手法に置き換わりつつある。

物理化学的欠失変異の導入法は、Yandell ら [16] の論文により



Trimethylpsoralen (TMP) 処理個体を紫外線照射することにより、小さな欠失変異が導入されることが多いとの報告から盛んになった。この方法は、トランスポゾン法より塩基配列による標的遺伝子の選択性が低いと想像される、あらゆる既知の遺伝子について欠失変異体の分離が原理的には可能である。しかしながら、現実には、多くの問題点があった。多くの研究者は Yandell らの原法に従い変異導入を行ったが、実際には、欠失変異の導入される確率は低く、スクリーニングはしばしば膨大な労力を必要とした (1 遺伝子の変異体分離に半年~1 年くらいはかかり、それでも分離できない場合もある)。我々のグループでは、線虫の逆遺伝学的有用性を考えると、欠失変異体の分離法は極めて重要な位置付けを占めると想定し、方法論の徹底的な見直しを行った。TMP 処理法の改善、紫外線照射法の改善、スクリーニングの際の PCR 法の開発、変異導入した個体群のプールの仕方の最適化などを経て、1 変異体アリの分離に平均 1 日程度という分離システムが作られた [17]。これにより、線虫のゲノム構造解析から遺伝子機能解析への発展は大きく加速すると考えられる。我々は、国際的な線虫遺伝子ネットワークアウトコンソーシアムにも加盟し

[18]、この分野での重要な位置付けを占めつつある。

【5】線虫のゲノム機能学の老化研究応用に向けた展望

ゲノム (遺伝子) の構造情報から、遺伝子の発現情報や機能情報へと展開して行く戦略は、線虫に限らずあらゆる基幹モデル生物で模索されつつある。線虫の場合は、多細胞生物としてもっともゲノム構造解析が先行したことから、この方向性においても一定の成果が蓄積されつつある。国立遺伝学研究所の小原らのグループは、線虫の EST を精力的に集め、シーケンス法による分類の後、これを網羅的遺伝子発現解析へと展開しつつある。彼等は、10,000 種類以上の cDNA を単離しており、発現量の比較的高い遺伝子は全て網羅されたと考えて良い。これらは、全てのクローンについて、線虫の多種類の発生段階に対しての *in situ* hybridization 解析が完成間近である [19]。このような情報により、それぞれの遺伝子の働いている時間空間的情報が蓄積し、生命現象の解析の際に、重要な基礎データとなる。さらに、このような発現パターンを時間空間的にデータベース化することにより、それらがどのような機能を持つかを推定する助けになったり、共通の発現パターンを持つ遺伝子群

のプロモーターの構造解析へと発展可能である（小原、私信）。

分類済みの EST を PCR で増幅してガラス板にスポットするとか、遺伝子の構造から、PCR 法を用いて各々の遺伝子の ORF を多く含むような配列を増幅してスポットするなどの手技により、マイクロアレイ解析を行っているグループもあり、注目に値する [20, 21]。これらにより、既知の遺伝子間の制御関係が見出される可能性が高い。線虫では、老化に関連する遺伝子が多数見出されつつあり、その一例とも言える転写因子 *daf-16* がどのような遺伝子群をどのように制御して寿命に影響を与えているかは興味深い。

我々は、上述の遺伝子欠失変異体分離技術を駆使し、線虫の転写制御因子の変異体の分離を精力的に進めており、既に他の研究室で分離された総数より多数の変異体の分離に成功している。多数の欠失変異体とマイクロアレイ技術とを併用することにより、多くの新しい情報が得られることが期待される。酵母では、マイクロアレイ技術が先行しているが、単に、特定の変異体や環境下で発現の変動する遺伝子を見出すだけにとどまらない。それぞれの変異体での多くの遺伝子の発現変動をプロファイル化し、似たパターンを示す変異

体、似た変動パターンを示す遺伝子というふうにクラスタリングすることにより、それまで得体の知れなかった遺伝子群が、どのような機能グループに属するか推定することが可能である [22]。また、トランスクリプトームは基本的には、転写因子の活性の総体を見ることであるから、全ての転写因子の変異体についてのトランスクリプトームをマイクロアレイ法で記載することにより、全体像が見えてくるはずである。しかも、この場合には、マイクロアレイ法の弱点である、S/N 比の低下による偽陽性や偽陰性シグナルの問題点を克服することができる。将来的には、例えば、*daf-16* 遺伝子が属するクラスターの他のメンバーをリストアップすることにより、寿命決定に直接関わる遺伝子候補が多数見出される可能性がある。

#### 【おわりに】

線虫のゲノム解析は、ヒトなどのゲノム解析の進展とともに、その影響下に微妙な変化を遂げつつ進んで来た。今、ポストゲノムシーケンス時代の到来と言われるようになって来たが、問題は、膨大な構造解析情報をどのように重要な生命現象の解明へ使えるかにかかっていると思われる。線虫は、多細胞生物のゲノム

解析としては、トップを走ってきたが、今後、これをさらに発展させ、医学的な重要な知見を得られるシステムとして行くためには、新しい方法論の開発と旧来の表現型解析とを有効に組み合わせる必要があると考えられる。

【引用文献等】

[1] The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018.

[2] International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.

[3] Venter JC et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*. **291**,1304-1351.

[4] Culetto E & Sattelle DB (2000). A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Human Mol. Genetics* **9**, 869-877.

[5] Coulson A, Waterston R, Kiff J, Sulston J & Kohara Y (1988). Genome linking with yeast artificial chromosomes. *Nature*. **335**, 184-186.

[6] Green P & Hillier L. unpublished.

[7] Chervitz SA et al. (1998). Comparison of the complete protein sets

of worm and yeast: orthology and divergence. *Science* **282**, 2022-2028.

[8] The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium. (2001). Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* **409**, 685-689.

[9] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas, SA, Driever SE & Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

[10] Tabara H, Grishok A, Mello CC (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-431.

[11] Timmons L, Court DL, Fire A (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**, 103-112

[12] Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, & Ahringer J (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-30

[13] Gonczy P et al. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on

chromosome III. *Nature* **408**, 331-336.

[14] Maeda I, Kohara Y., Yamamoto M, & Sugimoto A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr. Biology*, in press.

[15] Zwaal RR, Broeks A, van Meurs J, Groenen JT, Plasterk RH. (1993). Target-selected gene inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a frozen transposon insertion mutant bank. *Proc Nat. Acad. Sci. USA*. **90**, 7431-7435.

[16] Yandell, MD, Edgar, LG & Wood WB (1994). Trimethylpsoralen induces small deletion mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1381-1385.

[17] Gengyo-Ando, K & MITANI, S (2000). Characterization of mutations induced by ethylmethanesulfonate, UV and trimethylpsoralen in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem.*

*Biophys. Res. Comm.* **269**, 64-69..

[ 18 ] *C. elegans* gene Knockout consortium:

<http://elegans.bcgsc.bc.ca/knockout.shtml>

[19] NEXTDB Ver.2.1 (The Nematode Expression Pattern DataBase)

by Yuji Kohara's group:

<http://helix.genes.nig.ac.jp/db/index.html>

[20] Wixon J, Blaxter M, Hope I, Barstead R, Kim S (2000). *Caenorhabditis elegans*. *Yeast* **17**, 37-42

[21] 小原雄治、上杉裕子(2000). 線虫 cDNA マイクロアレイを用いた発現解析. 細胞工学別冊 DNA マイクロアレイと最新 PCR 法 pp55-66.

[22] Hughes TR et al. (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* **102**, 109-126.

知的所有権の取得状況

該当する知的所有権なし。