

RNAインターフェランス法による神経形成遺伝子の研究 二本鎖RNAをショウジョウバエ胚に微量注入する方法の確立

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4525

RNA インターフェランス法による神経形成遺伝子の研究

：二本鎖RNAをショウジョウバエ胚に微量注入する方法の確立

金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻細胞遺伝子学
(旧講座名：細胞遺伝子学)
(主任：東田陽博教授)

張 家 生

この研究の目的は、ショウジョウバエ神経系発達に関与する遺伝子を探索する方法の確立と、それにより新しい遺伝子を同定することにある。すでにある2つの研究成果がこのことを容易にすることが出来るようになった。1つは、ショウジョウバエ全ゲノムの塩基配列が決められたことであり、第2に二本鎖RNA (double-stranded RNA (dsRNA)) を初期胚に注入すると、対象のmRNAの発現を抑えるという事実である。従ってRNA干渉 (RNA interference, RNAi) と呼ばれる方法ですばやく遺伝子の機能同定が出来そうである。今回、ショウジョウバエcDNAクローンからdsRNAを合成し、そのdsRNAをショウジョウバエ胚に注入しその後の発達をみた。すべての実験過程の最適条件を決めた上で、注入された胚は14-16ステージで固定し、神経系を22C10神経特異的モノクローン抗体で染めた。一例として、96個の遺伝子の中から*fau* 遺伝子のdsRNAが変異を起こす事を見出した。以上の結果から、ここで用いたRNAiの方法で今後全ゲノムを用い網羅的に神経形成に関与する遺伝子を探索してゆくことが可能であることがわかった。

Key words double-stranded RNA, RNA interference, Drosophila embryos, nerve development, 22C10 monoclonal antibody

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の全遺伝子塩基配列が2000年3月に解読され、約13,600個の遺伝子から成ることがわかった¹⁾。そのうち約半数についてはすでに同定されていたり、他の動物種でわかっている遺伝子とのホモロジー等から、それらの機能が推測できた。しかし、残りの数多くの遺伝子について、それらの機能は不明である。ポストゲノムシーケンス時代の今、それらの機能未知遺伝子の機能を同定(アノテーション)することが最大の課題となっている。

全ゲノムのシーケンスを終えた動物種では、ゲノムワイドの網羅的研究がされるようになった。ショウジョウバエではHelix-Loop-Helix構造を持つ全遺伝子の機能解析や、老化(Aging)により変化する全遺伝子のスクリーニングなどがカリフォルニア大学のJanら²⁾によりなされている。線虫 (*C. elegans*) ではRNA インターフェランス法 (RNA interference, RNAi)^{3,4)} を使って、細胞の分裂に作用するゲノムワイドの研究がされ、その成果が染色体ごとに報告された⁵⁾。

一方、ショウジョウバエで、神経発生に関わる遺伝子が、主にエンハンサートラップ法を用いて同定されている⁶⁾。しかし、このエンハンサートラップ法では、Pエレメント挿入が、染色体上一律でないため、入りやすい部位での変異型ばかりが得られる等の限界を持っていることが知られるようになり、新規遺伝子の発見につながらなくなりつつある。

外来遺伝子による内在性RNAの発現抑制は、転写後遺伝子

サイレンシング (post-transcriptional gene silencing) と呼ばれている^{3,4)}。この特定遺伝子の発現阻害 (RNAi) に二本鎖RNA (double stranded RNA, dsRNA) が有効であることが、植物、線虫、トリパノゾーマ、ショウジョウバエ、マウス等で報告されだし、RNAiが生物の持つ普遍的な機構であることがわかってきた⁷⁾。しかも、使用するdsRNAは低濃度で長時間作用し、ターゲット遺伝子に対し特異性も高いことが示され、新しい有効な手段となりつつある。従って今回このRNAi法を使う逆遺伝学的手段で、遺伝子一個一個をつぶして、その効果をみてゆくという戦略で、神経ネットワーク (シナプス回路) 形成に関与する遺伝子を抽出し、機能未知遺伝子の機能の同定を行うことを計画した。

具体的実験は、ESTでラベルされたDNA断片約9,000個の遺伝子をPCR法により増幅し、そのDNAからdsRNAを合成し、ショウジョウバエ受精初期胚に注入することにした。24℃で約14時間インキュベーションし胚を充分発育させた後、神経の発生分化に異常があるかないかを、神経系を染めるモノクローナル抗体22C10⁸⁾で染色し、末梢及び中枢神経の構造を観察することにした。RNAiはこの2~3年の間に盛んに行われるようになってきたが、dsRNAを微量注入し、神経系発生に必須な遺伝子の探索を網羅的にみてゆく方法論そのものが全く新しく過去にないものなので、ここではそれら諸条件の確立をめざす基礎的実験を行った。

平成14年9月26日受付, 平成14年11月21日受理

Abbreviations : RNAi, RNA interference; dsRNA, double-stranded RNA

対象および方法

I. 2本鎖RNAの作成

Berkley Drosophila Genome Project の Drosophila Unigene Collection (<http://www.fruitfly.org/>) からショウジョウバエの EST ラベル DNA 6,000 個を購入した (約 1,000 塩基対の長さをもつ)。それらを鋳型として PCR にて増幅し、精製後、1-3 μg の cDNA を得た。購入した PCR テンプレートのシーケンスをゲノム操作システムで確認の後使った。Ambion Megascript T7 と SP6 の Kit (Ambion, Austin, USA) を使用し、RNA 転写産物を合成した。SP6 RNA と T7 RNA を鋳型 DNA から分離し、400 μl の緩衝液中に混ぜ、90 $^{\circ}\text{C}$ でアニールした後、40 $^{\circ}\text{C}$ で冷却後、一夜置いた。アニールした dsRNA をイソプロピルアルコールで処理し、70 % エタノールで洗い、40 μl の注入用緩衝液に溶解した。

II. ショウジョウバエの培養

ショウジョウバエは温度 24 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50 % にした密閉チャンパー内で飼育した。チャンパー内の照明は、午前 11 時に消灯、午後 11 時に点灯する昼夜逆転サイクルで行った。ショウジョウバエは 6 オンスの底四角形のプラスチックフラスコ (Applied Scientific Drosophila Product, Burlington, ノースカロライナ) 内で培養した。フラスコ内には培養用粉末 (Formula) 4-24 Blue (Carolina Biological Supply Company, Burlington, USA, 和光純薬工業) 30 ml 容量に蒸留水 30 ml を加えて作成した培地を入れ、口にはウレタンの栓 (相互理化学硝子製作所 5166-06, 直径 45 mm, 長さ 65 mm) をし、通気もできるようにした。約 3 週間後、孵化したハエを新しいフラスコに分注し、更に培養を重ねた。ハエの採取は 2-4 回は行えた。増えたハエは CO₂ ガスで麻酔し、採卵用のプラスチック管 (外径 8.9 cm, 長さ 20 cm) に集めた。プラスチック管の一方の口は空気を通る金属のメッシュで蓋をし、もう一方の口は、直径 10 cm の寒天を張ったシャーレ (Falcon) で蓋をした。寒天層は寒天 55 g と蒸留水 1000 ml, ぶどう果汁 1000 ml に 20 ml のパラヒドロキシ安息香酸 (エタノールに溶かし 10 % 容量とした) と 20 ml の酢酸を加えて作成した。

III. 採卵

採卵管は通常チャンパー内で 16.5 $^{\circ}\text{C}$ に保ち、ハエの産卵、卵から幼虫の孵化を極力避けた。産卵をうながすため照明を切った 24 $^{\circ}\text{C}$ のチャンパーに移した。最初の約 1 時間に産み付けた卵は捨て、次の 30 分間に新しい寒天の上に産みつけた卵を実体顕微鏡下で観察しながら、小さい絵筆を水に浸け、ホタル狩りやホウキで掃く要領で卵を集め、表面を黒く塗った 100 mm 径のプラスチック皿に、氷 (ないしドライアイス) をつめ、その上に載せたスライドガラス上に卵を移した。スライドガラスにはセロファンテープを貼り、図 1 に示すように、約 30 個の卵を、テープ側を頭 (respiratory element や micropyle をたよりに) にして並べた。並べる時は水を加えると共に、冷やすことにより露滴が付く事で乾燥を防いだ。又、水が多すぎると浮いて動くので適度に濾紙にて水分を減しながら並べた。並べるには、電気泳動時にゲルにタンパクをのせる時に使うプラスチックのヘラをカットして鋭角にしたナイフをつくり、以後それで卵を移動したりするすべての操作に用いた。卵を並べた後濾紙にて水分を完全に吸い取り、約 20-40 秒間乾燥の後、Halocarbon オイル 27 (Sigma, St. Louis, USA) をかけた。以後の胚に対する操

作はこのオイルをかけた状態で行った。

IV. 2本鎖RNAの微量注入

dsRNA 液 1 μl (0.6-1.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) に対し 0.3 μl の食用緑色素 (McCormick, Huntvalley, USA) を加えた。この RNA 液をマイクロローダーチップ (5242956.003, Eppendorf Hamburg Germany) でごく少量吸い取った。ポロシリカ性の外径 1 mm のガラス管を成茂社製のパッチピペット作成用 2 段引きプラーの第 1 段目のみを利用し、微小ガラス管を作成した。その先端の鋭った有芯のガラスピペットにマイクロローター中の dsRNA 液を後側より入れた。先端まで RNA 液が行き渡ったことを確認の後、FemtoJet インジェクター (5247 Eppendorf AG 22331 Hamburg Germany) のホルダーに装着した。注入は通常 2 馬力/cm² (=12 馬力/平方インチ) の風圧にて 0.3 秒間注入した。注入は緑色色素で毎回確認した。

V. 胚のインキュベーション

注入を終えた胚はそのまま 16.5 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内に静置し、22 時間後に固定操作を行った。

VI. 固定

表 1 に示すような手順で行った。Millipore 社製の Multiscreen (MADVN-6510) プレートを用いた。胚洗浄液 (0.7 % NaCl 液, 0.05% トリトン-X100 を含む) で前処理した上で胚洗浄液を含む 96 穴のマルチプレートの一つの穴に、集めた胚を濾紙に載せて移した。以後の操作 (固定染色液の添加, 吸引) は、水流式の吸引機 (ヤマト社製 WP-15) に結合したマニフールド (MAVMO960R Millipore Multiscreen Resist Vacuum Manifold, Bedford, USA) で行った。胚は漂白剤により Vitelline 膜を破壊

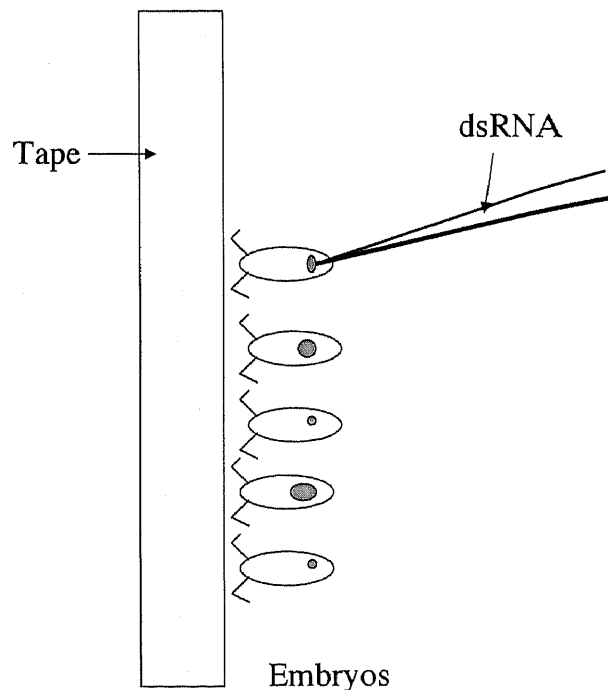


Fig. 1. Schematic drawing of dsDNA injection into Drosophila embryos. Embryos were aligned along a long tape on a slide glass. A micropipette filled with dsRNA and green dye (1: 0.3) was set near the embryo's posterior end. Embryos were moved toward the pipette and then were pepertrated, and dsRNA was injected. Injection was confirmed by spreading of green dye in embryos.

した後、ホルマリンで固定し、最後にメタノール中に保存した。

Ⅵ. 染色

ショウジョウバエ全体 (ホールマウント) の中枢神経、末梢神経を共に特異的に染める 22C10 モノクローナル抗体を一次抗体とし、アビジンビオチン染色法 (PK-0102, Vectastain, Burlingame, USA) にて茶色に染め出した。すべての操作は 24℃ の室温にて、表 2 に示す手順で行った。

Ⅶ. 観察

胚は 1.5 ml のマイクロチューブ内で 50% グリセロール液 (50% グリセロール, 50% リン酸緩衝液保存液) にも観察出来るようにした。デプレションスライドガラス上に胚をとり、実体顕微鏡下で、神経組織の異常がある胚の数とない胚の数を数えた。さらに透過顕微鏡にて変異の有無の再確認とその表現型の詳細な観察を行った。

Ⅷ. マウスハイブリドーマ 22C10

22C10 細胞は、Iowa 大学, Developmental Studies Hybridoma Bank (<http://www.uiowa.edu/~dshbwww/>) より購入し、ヒポキサンチン (hypoxanthine), アミノプテリン (aminopterin) とチミジン (thymidine) 液を含む, DMEM 培地に 20% 牛胎児血清 (熱非働化済) を加え 10% 炭酸ガス下に培養した。培養上澄に含まれる 22C10 モノクローナル抗体は、そのまま分注後、-30℃ 凍結保存し使用時解凍した。

成 績

I. RNAi のための dsRNA 注入条件の検討

1. 採卵条件の検討

ショウジョウバエは、暗くなると産卵するので、人が作業する日中を暗くして採卵できるように昼夜サイクルを逆にした。常時 16.5℃ で飼育し、産卵時 24℃ に移して、寒天上に産み付

けた卵を捨てるわけであるが、産卵は温度を上げ暗くした 30 分以後に多くなった。胚発達のステージは初期は揃っていたが、3~5 時間経つと、ステージの進んだ卵の混入する度合いが上がってきた。卵を産む条件にしてから、3 時間以内に実験をする方がよいことがわかった。

2. 注入量

ショウジョウバエで RNAi が生じることは知られているが⁹⁾, Unigene Collection の DNA より合成した dsRNA を網羅的に使い、結果として神経系の異常発育が生じるか否かを研究した報告は、今まで見られないので、まず有効な dsRNA 注入条件の検討を行った。RNAi は dsRNA の 0.01 nl の注入でも生じることが知られている⁹⁾¹⁰⁾。胚はおおよそ体長 0.527 mm、胴が 0.18 mm ほどであった。10 nl は 0.01 mm のスポットと考えられた。しかし、実際の注入では 0.05 ~ 0.1 mm に広がるスポットとして注入することが多かったので本当の注入量を、³²P ATP をピペットにつめ、図 1 に示すように通常行っている注入を行い計算した。コントロールされた圧条件下 (2 馬力/cm² × 0.3 s) では 0.035 ± 0.092 nl (n=7) であった。また、ピペットに全圧を加えて注入する (クリーン圧) 条件下では、0.092 ± 0.030 nl (n=5) であった。

3. 注入の用量依存性

今回用いる RNAi と、その結果に用量依存性があるか否かを調べ、今回行う手技方法の全体の評価を試みた。用いた遺伝子は、遺伝子ノックアウトで神経系の異常発達がある事がわかっている *daughterless*¹¹⁾ を用いた。*daughterless* の dsRNA を 2 μg/μl から 1, 0.2, 0.02 μg/μl へと希釈し、できるだけ同一量をどの胚にも注入するようにした上で、染色し末梢神経のない中枢神経のみの胚と中枢末梢神経ともによく発達している正常胚とに分類した。結果は図 2 に示した。今回用いた dsRNA の液の濃度付近で、変異表現型が生じることがわかった。仮に注入量が 0.05

Table 1. Fixation of whole mount embryos

Steps	Procedures
1.	Set a MADV No65 multi-plate (96 wells) in a manifold of the vacuum system.
2.	Add PBS (about 0.2 ml) into each well with an Eppendorph multi-pipetter.
3.	Filter out PBS
4.	Add Embryo wash solution (EW) and filter out several times (0.2, 0.07, 0.07 and 0.07 ml).
5.	Add EW 0.4 ml.
6.	Collect embryos on a piece of filter papers with Halocarbon oil 27.
7.	Transfer embryos into EW.
8.	Wash embryos with EW (0.2, 0.07, 0.07, 0.07, 0.2, 0.07, 0.07 and 0.07 ml each time) to cut off oil.
9.	Add 50% bleach solution (Clorox : water=1:1) to remove vitelline membrane
10.	Shake vigorously for 3.5-5 min.
11.	Wash with EW (0.2, 0.07, 0.07, 0.07, 0.2, 0.07, 0.07 and 0.07 ml).
12.	Add EW and shake for 2 min.
13.	Filter EW and add 0.1 ml mixed Fixation solution (n-Heptane, 0.2 ml: 10% Formalline, 0.08 ml: EW)
14.	Incubate for 10-30 min in a rotation shaker (20 rpm).
15.	Discard fixation solution by filtration.
16.	Add methanol (0.2ml) and wash (repeat this process 3 times).
17.	Shake vigorously for 1 min in a methanol solution (0.1-0.2 ml) to remove vitelline membranes.
18.	Observe embryos, if left behind on the surface of rubber or container.
19.	Add and filter with methanol (0.2, 0.07, 0.07 and 0.07).
20.	Add 0.4 ml methanol to store in a freezer.
21.	Check methanol (prevent form drying up) eath morning before staining.

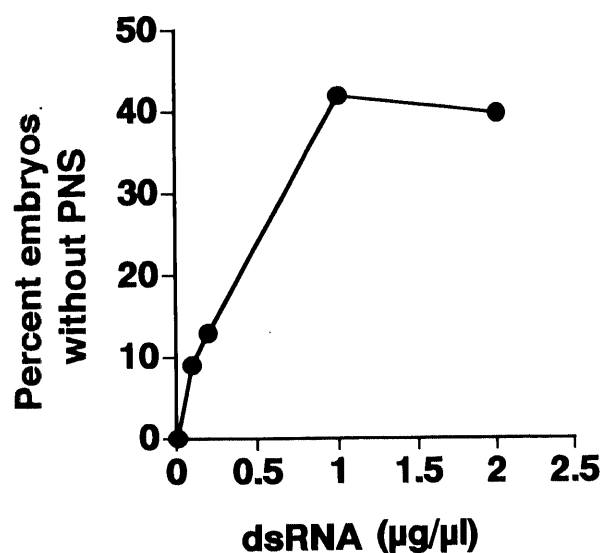


Fig. 2. Effect of daughterless dsRNA on nerve development. Different concentrations of daughterless dsRNA were injected, and the number of embryos that had no peripheral nervous system (PNS) were counted. Each point indicates values calculated from 15-20 embryos in one of two independent experiments.

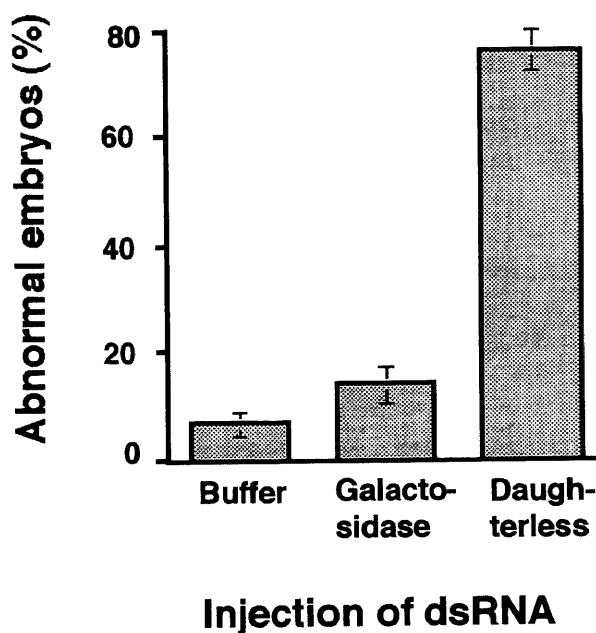


Fig. 3. Specific effect of RNAi with three different solutions. More than 30 embryos were injected with solutions of buffer alone, dsRNA of β -galactosidase ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) or dsRNA of daughterless ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). The percentages of appearance of abnormal embryos in CNS or PNS were calculated.

Table 2. Antibody staining of whole mount embryos

Steps	Procedures
1.	Fixed and devitellinized embryos are stored in methanol at -20°C .
2.	Methanol is removed by vacuum filtration.
3.	Wash embryos 3 times (200, 200 and 200 μl) with PT (0.1% Triton X in PBS (+)).
4.	Incubate for 10 (~20) min in 200 μl of (PT+NGS+BSA), shake and remove. (PT+NGS+BSA: Mix 18 ml of PT, 0.4 ml of Normal Goat Serum and 2 ml of 1% bovine serum albumin)
5.	Incubate for 30 min in 200 μl of 22C10 (primary) antibody (PT+NGS+BSA+22C10: MIX 1.5 ml of P+N+B and 30 μl of 22C10)
6.	Remove and wash 3 times and incubate for 1 min with 200 μl of PT.
7.	Remove and immediately add 200 μl of the second antibody and incubate for 30 (~60) min. Mouse IgG 1 drop (Vector Lab. PK-6200 Universal ABC Kit) in 10 ml of P+N+B. (PT+NGS+BSA+Mouse IgG: Mix 10ml of P+N+B and 1 drop of mouse IgG)
8.	During second antibody incubation, make and shake (A+B) solution. (P+N+B+ (A+B): Mix 5 ml of P+N+B, 2 drops of A and B)
9.	Remove and wash 3 times and incubate for 1 min with 200 μl of PT.
10.	Remove and incubate with (A+B) solution for 15 (~10) min.
11.	Remove and wash 3 times and incubate for 1 min with 200 μl of PT.
12.	Incubate with DAB solution (Vector SK-4100 Peroxidase Substrate Kit) for 5 min (3-10 min).
13.	Determine incubation time by observing with binocular microscope.
14.	Remove and wash 3 times and incubate for 1 min with 200 μl of PT.
15.	Remove and wash 2-3 times and incubate for 1 min with 200 μl of PBS (+).
16.	Add 300 of 50% glycerol solution in PBS (+). Observe embryos and find normal or abnormal development with binocular (50-fold magnification) and ordinal transparent (100-fold) microscopes.

Table 3. cDNA clones, dsRNAs and staining results. Experiment number in **bold** indicates mutant phenotypes

Pool	Clone ID	Predicted gene	Insert Size	dsRNA yield ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Annotation/function	Known phenotype	Sample stock number (Bold shows mutation)
235	GH23865	CG7655	1111	2.46	Transmembrane receptor		
235	GH25884	CG4764	1136	2.02	Phosphatase		113 164
235	GH26685	CG8057	1030	3.18	Protein kinase		
236	GH26786	fln	1101	3.61	Cytoskeletal protein	muscle	
236	GH27120	CG17765	1085	4.28	Calcium binding protei		114 170
236	GH27226		1094	3.21	Zn ⁺⁺ finger	no mutants	
237	GH27752	CG8813	1154	3.17	Transcription factor		
237	GH28342	CG1773	1273	3.15	Transmembrane receptor/kinase		115 171
237	GM13686	Hsp27	1352	0.32	Heat shock protein, nuclear	no mutants	
238	LD25605	AnnX	1338	3.15	Actin binding/annexin	no mutants	
238	LD25880	BcDNA: GH04929	1348	4.05	Zn ⁺⁺ finger	no mutants	116 172
238	LD26105	CG10591	1222	1.71	Collagen repeats_PRO rich		
239	LD26511	e (y) 1	1177	2.51	Transcription factor	ovary, oocyte, sterile	
239	LD27090	CG7843	1272	2.51	Signal transducer		117 173
239	LD28068		1005	2.12	Pre-mRNA splicing factor		
240	LD29185	BcDNA:GH04929	1087	4.23	Small GTPase, ras superfamily	no mutants	118
240	LD29476	Rab14	1321	3.14	Small GTPase, rab suerfamily		66 126
240	LD29822	CG9107	1133	1.88	Transcription factor		
241	LD31204	CG7197	1386	2.18	Small GTPase, ras superfamily		
241	LD31448	BcDNA: GH04929	1296	3.37	Cytoskeletal protein		127 174
241	LD31988		1233	2.52	RNA binding protein		
242	LD35248	cyp33	1117	2.35	RNA binding	no mutants	
242	GH23965	CG2555	1026	2.27	Cuticle structural protein		128 175
242	GH24985	EG: 9D2.4	1275	2.38	Serine type endopeptidase		
243	GH26248	CG10882	1010	2.58	Serine type endopeptidase		
243	GH26351	CG4108	937	2.05	NLS-BP		129 176
243	GH26392	CG12032	957	3.05	NLS-BP, SAM binding		
245	GH27547	CG4644	1092	3.45	RNA polymerase III	no mutants	
245	GH28013	CG15096	1219	2.99	Phosphate/Na ⁺ transporter		70 130 177
245	GH28366	CG8248	1184	2.47	NLS-BP		
246	LD25830	CG11836	1301	2.96	Ser-endopeptidase		
246	LD27322	CG6005	1398	3.25	NLS-BP		71 131 178
246	LD29276	CG8461	1064	2.59	NLS-BP		
247	LD29377	CG7375	1096	3.4	Ubiquitin conjugating enzyme		
247	LD29816	CG6238	1244	3.25	Phosphatase	no mutants	72 180
247	LD30731	CG14222	1365	6.61	N-acetyltransferase		
248	LD30746	CG10733	1222	3.14	Intacellular protein carrier		
248	LD33652	CG12276	1381	2.58	Ubiquitin activating enzyme	no mutants	73 134 181
248	LD34139	D1	1239	2.9	Chromosomal protein, DNA binding	no alleles	
249	LD34179	EG: 84H4.1	1374	3.28	Chaperone		
249	LD34461	CG7654	877	2.79	Transporter		74 135 182
249	LD35209	CG8142	1338	0.45	DNA replication factor		
250	GH23730	CG10611	1300	2.24	Fructose-b-phosphatase		
250	GH23780	CG11455	797	3.43	Unknown		75 136 183
250	GH25089		1348	2.71	Unknown		
251	GH25188		944	1.93	Unknown		
251	GH25284	CG17210	1044	3.25	Unknown		137 184
251	GH25379	CG1274	1227	4.23	Peroxidase	no mutants	
252	GH26094	CG17470	1075	3.37	Unknown		
252	GH26112		1266	3.51	Unknown		138 185
252	GH26265		1117	2.58	Unknown		
253	GH26280	CG12136	1399	2.16	AA-tRNA ligase		
253	GH26851	CG7675	1186	1.28	Oxidoreductase		78 140 186
253	GH26991	CG10965	1149	3.75	Unknown		
254	GH26994	CG15084	1196	3.03	Unknown		
254	GH27933	CG8825	806	3.54	Tyrosil-Dna phosphodiesterase		141 187
254	GH28095		1029	3.75	Unknown		
255	GH28656	CG8588	1227	3.92	Unknown		
255	GH28833	CG2640	996	3.43	Unknown		81 142 188
255	GH28859	CG6877	1353	3.18	Unknown		
256	GM14611	CG5325	1373	2.33	Peroxisomal protein		
256	HL07933	CG6544	1114	3.1	Faw (anoxia tolerance?)		82 143 189 106
256	HL08104	CG2716	1270	2.32	Unknown		
257	LD25271	CG6617	1075	3.62	Unknown		
257	LD25561	CG12079	1074	2.17	Ubiquinone		144 190
257	LD25803	CG9509	1245	3.2	Choline dehydrogenase		147
258	LD25963	CG8525	1372	3.84	Deoxyribophosphate aldolase		
258	LD26422	CG7049	1307	3.31	Unknown		84 154
258	LD26447	CG4365	1218	2.91	Hydroxyacylglutathione hydrolase		
259	LD27185	CG6673	1048	2.15	Glutathion transfrase		
259	LD27256	CG8237	1294	2.85	Unknown		88 155
259	LD28404	CG7168	1081	2.54	Unknown		
260	LD28985	CG8386	839	4.31	Unknown		
260	LD29166	CG7407	1215	4.53	Unknown		92 156
260	LD29590	CG6459	1355	2.76	Mitochondrial glycoprotein		
261	LD30049	CG5704	1387	3.12	Triacylglycerol lipase		
261	LD30683	CG4968	1185	3.701	Unknown		93 157
261	LD30889		1181	3.45	Unknown		
262	LD31238	EG: 22E5.6	1217	3.76	Unknown		
262	LD31278	CG5181	1353	2.87	Unknown		95 158
262	LD31474	CG9172	1016	3.7	Ubiquinone		
263	LD32106	RpS9	1050	3.1	Structural protein of ribosome		
263	LD32260	CG9288	1320	2.7	Pyruvate kinase		146 160
263	LD32974	CG12253	1390	3.83	Unknown		
264	LD33318	ProsMA5	1109	4.13	Proteosome alpha subunit		
264	LD33385	CG5768	1033	0	Unknown		108 161
264	LD33485	1 (2) 35Fe	1186	1.66	Structural protein of ribosome	recessive lethal	
265	LD33828	CG3887	1141	4.56	Unknown		
265	LD34154	CG3476	1314	2.88	Mitochondrial carrier		109 162
265	LD34214		1031	3.32	Unknown		
266	LD34436	BcDNA: GH04929	1121	3.17	Structural protein of ribosome		110 163

nlとすると、50 pg オーダーの dsRNAが必要と推測された。

4. コントロール実験

今度は逆に、注入操作そのものや無関係の dsRNA の注入の効果をみた。胚を蒸留水に緑色色素を加えた群、 β -ガラクトシダーゼ (galactosidase) dsRNA 群をつくり、daughterless の dsRNA 群のそれと比較した。変異を持つ胚の数の割合は、コントロール群では daughterless 注入群により共に有意に低かった。この結果、注入のみや無関係の RNA 注入では、胚の破壊等による非特異に生じた変異しか示さず、RNAi 法に特異性があることがわかった (図3)。

5. 神経系発達に及ぼすインキュベーション温度と時間

胚の中で、中枢神経はステージ3より (受精直後)、末梢神経はステージ10 (24℃で3.5時間後) より発達する。そしてさらに発達を続けるが、17時間目で表面がキクチル (角質) で覆われると、モノクローナル抗体で染色出来なくなる¹²⁾。従ってそ

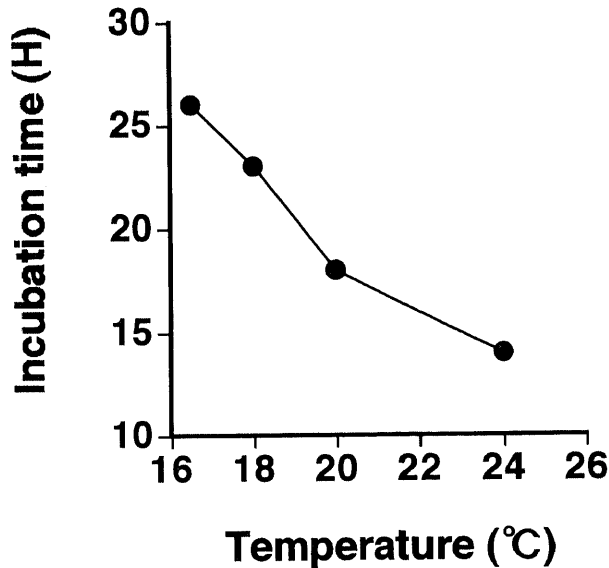


Fig. 4. Relationship between incubation temperature and time. Embryos were cultured at different temperature and period of incubation. The line shows incubation period required for nerve development at indicated temperature. Data points are summary of 6 experiments in 180 embryos.

の時間までに発育を止め、固定しなければならない。一定条件に置いて発育を見る実験と異なり、温度条件が種々であるため、本実験におけるインキュベーションの最適温度と時間を求めた。種々の試みの中から注入直後から16.5℃のインキュベーターに入れ、図4に示すように採卵より約22時間後に固定するとよいことが確認出来た。

以上のような予備実験をした上で、神経発達に影響を及ぼす未知遺伝子を網羅的に検索する実験を行うことにした。

II. dsRNA 注入による遺伝子探索

合成された dsRNA のスクリーニング速度を上げるため、3つの遺伝子をプールして、第1段目のスクリーニングを行った。プレート18に含まれる混合 dsRNA のうち、2~3回の実験ですべて異常な胚が半数以上みられたのは2つのプールであった。そこで、それらのプールに含まれる個々の遺伝子を調査した。6つのうち、CG5325, CG6544, CG6673がポジティブであり、

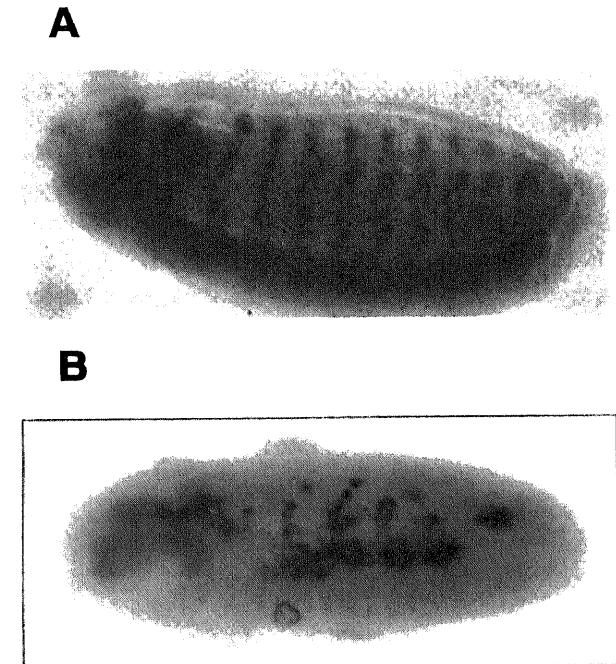


Fig. 5. Lateral views of embryos stained with 22C10 monoclonal antibody. The wild-type embryos show well-developed central and peripheral nervous systems (A). Disrupted nervous system in a fau-dsRNA-injected embryo (B).

Table 4. Staining results of individual gene. Mutant phenotypes found are shown in **bold**.

Pool	Clone ID	Predicted gene	Insert Size	dsRNA yield (μ g/ μ l)	Annotation/function	Sample stock number	
						(bold indicates mutant phenotype)	
256	GM14611	CG5325	1373	2.33	Peroxisomal protein (PxF?)	275	284
256	HL07933	CG6544	1114	3.1	Fau (anoxia tolerance?)	276	285
256	HL08104	CG2716	1270	2.32	Unknown	277	286
259	LD27185	CG6673	1048	2.15	Glutathione transferase	278	287
259	LD27256	CG8237	1294	2.85	Unknown	279	288
259	LD28404	CG7168	1081	2.54	Unknown	280	289
264	LD33318	ProsMA5	1109	4.13	Proteosome alpha subunit	281	290
264	LD33385	CG5768	1033	0	Unknown	282	291
264	LD33485	I (2) 35Fe	1186	1.66	Structural protein of ribosome (L4/L le)	283	292

残り3つは無効果と判定した(表4)。さらに第3者による3次スクリーニングを経てCG6544 (*fau*)は56%の胚にて毎実験において変異を引き起こすことからこの遺伝子の発現は、何らかの機構により神経発達に異常を起こすと判定した。このように31のRNAプール中の93の遺伝子より、1つが確実に神経発達に参与する遺伝子として以後の研究に供された。

Ⅲ. *Fau*による異常

*Fau*はショウジョウバエに炭酸ガスをかけた後に脳内で上昇するmRNAとして、1999年エール大学のMaら¹³⁾により報告された。しかし、この遺伝子の変異は報告されておらず、確実な機能はそれ以上には同定されていない。

図5で示すように*Fau*のdsRNA注入により、注入された部位では中枢、末梢神経共強く発達が抑制されると共に、その他の部分には異常な中枢、末梢神経の発達が見られた。モザイク状の神経系発達異常は、この方法による障害発生の特徴と考えられる。

考 察

今回この実験結果から、RNAiの特徴を記すと、RNAiによる神経発達の抑制は、その遺伝子の完全な欠失による変異発現型と異なり、胚の中に影響を受けた所と、そうでない所の混在するモザイク様の変異を示すことがわかった。変異を示す遺伝子は塩基配列の判ったゲノムを出発材料にしているの、即DNAシーケンスや遺伝子名にたどりつける利点がある。*Fau*もそのようにして同定できた。RNAi法は*C. elegans*で見出された遺伝子機能欠損方法である¹⁴⁾が、これは、非常に低濃度、長時間作用する効率の良い方法であることが確認された。従って、Pエレメント法で得られなかった数々の結果が今後この方法で得られる可能性がある。

今までRNAの実験は、汗やほこりに含まれるRNaseにより容易に分解されるので、DNAを取り扱うより非常な注意を必要とされてきた。dsRNAは細胞内に存在するRNaseタイプⅢに分類されるRNaseによって分解されることがわかっており¹⁵⁾、汗やほこりのような外界には含まれない事から、取り扱いはDNAのそれと同程度の注意でよいことがわかった。

この方法が有効となったので、ショウジョウバエ心血管系発生¹⁶⁾についても同じDNA源dsRNAを使用して研究するが出来ると思われる。心発生と神経発生にそれぞれ共通して変異を起こす遺伝子、逆にそれぞれに特異的に生じる遺伝子を同定し、それらの中から神経発生に特異性の高い遺伝子を見出すことが出来るであろう。

他方、これらの研究を通して、神経発生を阻害する遺伝子の中で、ヒトの病気と密接な関連を持つものを探しだすつもりである。ヒト神経発生障害による神経奇形形成で知られている遺伝子と相同性を持つショウジョウバエの遺伝子により生じるハエの異常を見出すことはもちろん、逆に、異常を生じたショウジョウバエ遺伝子の中から、ヒトやマウスの相同性遺伝子を検索し、ヒトの病気のモデルとなり得ないか検討する予定である。

現在2,000個の遺伝子についてすでに行った予備実験の中で、ミトコンドリア膜構成タンパクであるMetaxin¹⁷⁾はそのdsRNAにより、ショウジョウバエ神経発生に異常を生じることを見出している。ヒトの脂質代謝病のGaucher病では、それ本来の症状に加えて神経奇形やパーキンソン病様の神経症状があるとさ

れている。原因遺伝子のglucocerebrosidaseのpseudogene領域にMetaxin遺伝子があるためにクロスオーバーが生じ、Gaucher病の神経症状が生じると説明されている¹⁸⁾。従って、ショウジョウバエでの、Metaxinによる神経発達障害の発見が、このようにヒト病気との関連を示しているように考えられる。思いがけなくショウジョウバエ胚が、ヒト病気のモデルとなる可能性は大きいので、この研究課題についても将来追求するつもりである。

結 論

ショウジョウバエ胚の神経発達過程に参与する遺伝子の探索を行うため、ESTでラベルされたDNAを購入し、PCRにより増幅の後、dsRNAを合成した。このdsRNAを受精2時間以内の卵に注入した。胚发育15~17時間後に固定し、神経系を22C10モノクローナル抗体で染めた。RNAi転写後遺伝子発現抑制の有効実験条件を求めた後、中枢、末梢神経の形態異常(ミューテーションフェノタイプ)の有無より、神経発生に参与する遺伝子が同定出来ることがわかった。その一つが*fau*であった。この酸素低抗性にmRNAが上昇する*fau*遺伝子の機能の一つが神経形成である事が明らかになった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました東田陽博教授、NIHのNirenberg博士に感謝致します。

文 献

- 1) Adams MD, et al. The Genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 2185-2197, 2000
- 2) Zou S, Meadows S, Sharp L, Jan LY, Jan YN. Genome-wide study of aging oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 13726-13731, 2000
- 3) Fire A. RNA-triggered gene silencing. Trends Genet 15: 358-363, 2000
- 4) Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nat Rev Genet 2: 110-119, 2001
- 5) Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. Nature 408: 325-330, 2000
- 6) Prokopenko S, He Y, Lu Y, Bellen HJ. Mutations affecting the development of the peripheral nervous system in *Drosophila*: A molecular screen for novel proteins. Genetics 156: 1691-1715, 2000
- 7) Zamore PD. RNA interference: Listening to the sound of silence. Nat Struct Biol 8: 746-750, 2001
- 8) Fujita, SC, Zipursky SL, Benzer S, Ferrus A, Shotwell SL. Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 79: 7929-7933, 1982
- 9) Misquitta L, Paterson BM. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference. Proc Natl Acad Sci USA 96: 1451-1456, 1999
- 10) Yang D, Lu H, Erickson W. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation

- during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 10: 1191-1200, 2000
- 11) Vaessin H, Brand M, Jan LY, JanYN. *daughterless* is essential for neuronal precursor differentiation but not for initiation of neuronal precursor formation in *Drosophila* embryo. *Development* 120: 935-945, 1994
- 12) Patel NH. Imaging neuronal subsets and other cell types in whole-mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. *Methods Cell Biol* 44: 445-487, 1994
- 13) Ma E, Xu T, Haddad GG. Gene regulation by O₂ deprivation: an anoxia-regulated novel gene in *Drosophila melanogaster*. *Brain Res Mol Brain Res* 63: 217-224, 1999
- 14) Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RHA, Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476, 2001
- 15) Knight SW, Bass BL. A role for the Rnase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269-2271, 2001
- 16) Furlong, EEM, Anderson EC, Null B, White KP, Scott MP. Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development. *Science* 293: 1629-1633, 2001
- 17) Armstrong LC, Komiya T, Bergman BE, Mihara K, Bornstein P. Metaxin is a component of a preprotein import complex in the outer membrane of the mammalian mitochondrion. *J Biol Chem* 272: 6510-6518, 1997
- 18) Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D, Fillano JJ, Sidransky E. Gaucher disease and Parkinsonism: A phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab* 73: 313-321, 2001

Genome-wide analysis of *Drosophila* genes involved in nerve development: Mutant phenotype induced by nano-litter-injection with double-stranded RNAs into embryos Jia-Sheng Zhang, Department of Biophysical Genetics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **111**, 282 — 289 (2002) Japan

Key words double-stranded RNA, RNA interference, *Drosophila* embryos, nerve development, 22C10 monoclonal antibody

Abstract

The purpose of this study is to identify new genes involved in the assembly of the nervous system of *Drosophila*. Two breakthroughs significantly simplify the search of new genes in fruit fly. First, the whole genome has been sequenced, and second, injection of double-stranded RNA into early embryos results in the destruction of the corresponding species of mRNA, which induces mutant phenotypes in some embryos. This phenomenon termed RNA interference (RNAi) provides a relatively rapid way to explore gene functions. In this study partially sequenced cDNA clones were used to synthesize double-stranded RNAs. dsRNAs were injected in *Drosophila* embryos at early stages of development. Injected embryos were fixed at the 14-16 stages of embryonic development and the nervous system was stained with the neurospecific antibody 22C10 to visualize the nervous system. Several experimental conditions were examined to determine the best ones. Embryos injected with dsRNAs corresponding to the *fau* gene exhibited mutant phenotypes out of 98 genes tested. Thus, it is proved that this type of genome-wide analysis is useful to identify the genes related to development of the nervous system.