

**「時」と「場所」を指定してピンポイントに遺伝子の働きを抑制  
— 遺伝子の働きを知るための新規手法を開発！ —**

**概要**

遺伝子の働きを知るためには、その機能を停止させたときに細胞や生体にどのような影響が現れるのかを観察する必要があります。そのため、遺伝子の働きを自由自在に制御する技術の開発が求められています。九州大学大学院理学研究院／味覚・嗅覚センサ研究開発センターの広津崇亮助教と、同研究室のシステム生命科学府博士課程2年の濱川昌之らの研究グループは、東京大学大学院理学系研究科の飯野雄一教授との共同研究で、指定した時期に狙った細胞だけで遺伝子の働きを抑える新規の手法を開発しました。

本研究成果は2015年2月11日に英国オンラインジャーナル『BMC Biology』に掲載されました。

**背景**

生物は限られた数の遺伝子を駆使して、生体内で起こる複雑な生命現象を巧緻に制御しています。そのため、同一の遺伝子が(1)様々な時期に、(2)様々な細胞で異なる働きをしていることも少なくありません。遺伝子の働きを知るためには、その働きを阻害した際に現れる影響を観察する必要がありますが、遺伝子の多面的な働き<sup>(※注1)</sup>から、狙った時期に、狙った細胞でだけ遺伝子の働きを抑制することが重要です。

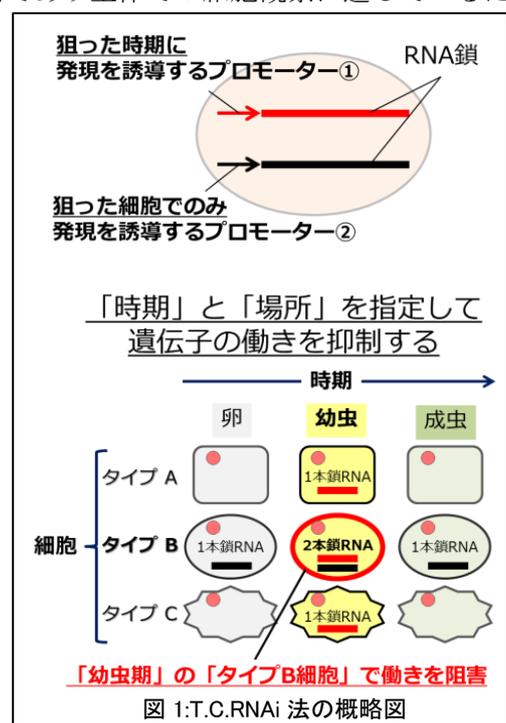
遺伝子の働きを抑える手法の1つにRNA干渉法(RNAi法)<sup>(※注2)</sup>があります。遺伝子の発現<sup>(※注3)</sup>は、DNAの遺伝暗号に対応したmRNA(1本鎖)が作られることで行われます。RNAi法では、標的遺伝子と相同の遺伝暗号を持つ短い2本鎖RNAを働かせることでmRNAを分解し、遺伝子の発現を阻害する方法です。RNAi法は、多くの生物種で効果があり広く導入されています。しかし、RNAiの効果が発揮される(1)時期と、その効果が及ぶ(2)場所の両方を同時に制御する手法は確立されていませんでした。そこで本研究では、狙った時期に狙った細胞でのみRNAiを行う新手法の開発を目指しました。

**内容**

研究グループは、線虫*C. elegans*を用いて新しいRNAi法の開発を試みることにしました。RNAiは線虫において初めて見出された現象です。また、線虫は体が透明であり生体での細胞観察に適しているため、RNAiによる遺伝子の発現阻害の効果を観察しやすい生物です。

RNAi法の1つに、プロモーター<sup>(※注4)</sup>を用いて2本鎖RNAを発現させる方法があります。本研究では異なる性質を持つ2つのプロモーターに着目することにしました。1つは「熱刺激によって狙った時期のみに発現を誘導するプロモーター①」、もう1つは「狙った細胞においてのみ発現を誘導するプロモーター②」です(図1、上)。それぞれのプロモーターにより1本鎖RNAを発現させます。すると、①が指定する時期、②が指定する細胞でのみ、2本鎖RNAが発現することになります。例えば図1の下図では、①により「幼虫期」に、②により「タイプBの細胞」にのみ1本鎖RNAを発現させることで、両者が合わさった「幼虫期のタイプB細胞」でのみRNAiを引き起こすことができます。この時期特異的かつ細胞特異的にRNAiを行う手法をT.C.RNAi法(Time- and Cell-specific RNAi)と名付けました。

T.C.RNAi法の効果を確認するため、まず初めに蛍光タンパク質GFP<sup>(※注5)</sup>を用いた解析を行いました。フォトブリーチング<sup>(※注6)</sup>によりGFPの蛍光を一時的に消失させ、その後にGFPの明るさがどのくらい回復するかを観察することで、



GFPの発現レベルを測定することが可能となります。実験では、細胞A、B両方の細胞にGFPを発現させ、細胞BのみにGFPの発現を抑えるT.C.RNAi法を施しました。

細胞Aでは、GFPはフォトブリーチングにより一時的に蛍光が消失しても、一定時間が経つとその明るさは回復しました（図2、細胞A）。一方、T.C.RNAi法のターゲットとした細胞Bでは、熱刺激を与えるとGFPの明るさは回復しませんでした（図2、細胞B）。熱刺激を与えなかった場合は、細胞BでのGFPの明るさは正常に回復しました。以上の結果から、T.C.RNAi法により熱刺激を与えた時のみ、指定した細胞だけで遺伝子の発現を抑制できることがわかりました。

T.C.RNAi法は、様々な時期に、様々な細胞で異なる働きをする多面的な遺伝子の機能解析に効果を発揮すると考えられます。そこで研究グループは、Ras遺伝子に注目することにしました。Rasはがん遺伝子として見出されたものですが、受精卵での細胞分裂から成体での記憶・学習に至るまで幅広い機能をもっています。研究グループは、Rasの異常が線虫の餌探索行動に影響を与えることを新たに見出しました（図3）。線虫のRas遺伝子の働きを時期、細胞を問わず阻害すると、致死などの重大な影響を及ぼすことから、餌探索行動におけるRasの働きを解析するにはT.C.RNAi法が必須だと考えられました。そこでT.C.RNAi法を用いた解析を行った結果、Rasは成虫期の頭部神経において、グルタミン酸受容体<sup>(※注1)</sup>の局在を制御することにより、餌探索行動を調節していることがわかりました。以上のように餌探索行動においてRasの働く時期、場所、機構がT.C.RNAi法により明らかとなりました。

さらに、線虫の嗅覚に関与する遺伝子についてもT.C.RNAi法が適用できるか確認実験を行い、その効果を実証することができました。本研究で開発したT.C.RNAi法は、幅広い遺伝子に対してその働きを時期・細胞特異的に抑える手段として、活用が期待できます。

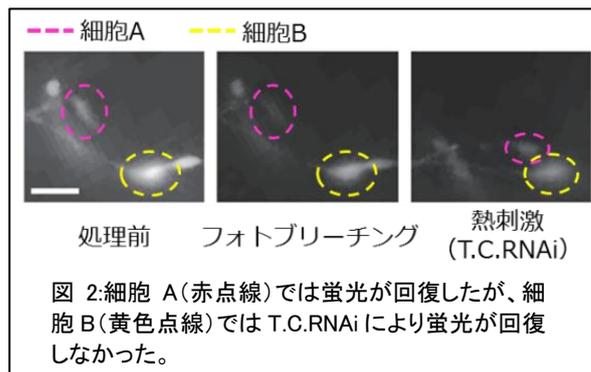


図 2:細胞 A(赤点線)では蛍光が回復したが、細胞 B(黄色点線)では T.C.RNAiにより蛍光が回復しなかった。

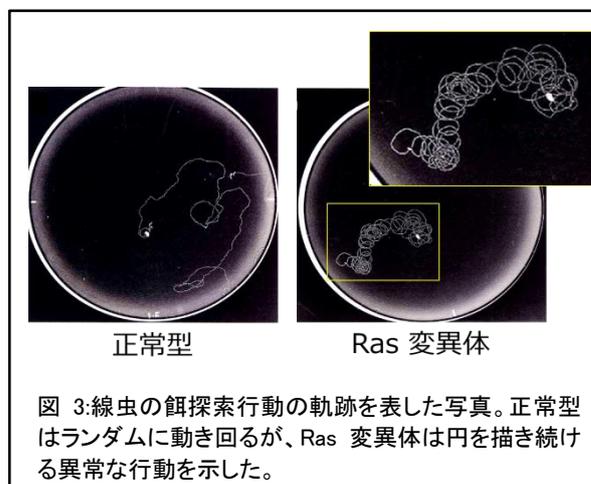


図 3:線虫の餌探索行動の軌跡を表した写真。正常型はランダムに動き回るが、Ras 変異体は円を描き続ける異常な行動を示した。

## ■効果・今後の展開

RNAi法は簡便に遺伝子の機能を阻害することが可能な手法です。近年では哺乳動物やヒト培養細胞などへの応用も進んでいます。医療面においても、遺伝子治療の研究への応用が期待されています。本研究では時間的かつ空間的にRNAiの効果制御する手法T.C.RNAi法を確立しました。T.C.RNAi法を用いれば、副次的な影響を極力抑え、正しい時期・場所で遺伝子の発現阻害を誘導することが可能となります。そのためT.C.RNAi法は、高等生物の複雑な系における遺伝子の機能解析や、遺伝子治療のための新たなRNA医薬品の開発への貢献が期待できます。

## ■研究について

本研究は、文部科学省科学研究費補助金「22680028」「26430019」、千里ライフサイエンス振興財団 岸本基金、稲盛財団、倉田記念日立科学技術財団、ひと・健康・未来研究財団、三島海雲記念財団、九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プログラム (P&P) の支援を受けて行いました。

## ■用語説明

※注1. 遺伝子の多面的な働き：

例えば、胚発生期に必須の働きをするとともに、成虫期の神経でも働くような遺伝子の場合、遺伝子の働きを時期を問わず阻害してしまうと致死になるため、成虫期の神経での働きを解析することができない。

※注2. RNAi：

DNAと相補的な配列を持つ2本鎖RNAを導入することにより、遺伝子の発現を阻害する手法。線虫を用いてRNAiを見出したA. FireとC. Melloは2006年ノーベル生理学医学賞を受賞。

※注3. 発現：

DNAに記された遺伝子情報をもとにRNAやタンパク質といった構造物が生成されたり、その機能が引き出されたりする現象のこと。

※注4. プロモーター：

遺伝子領域の上流に位置し、下流の遺伝子の発現を促すDNA領域。

※注5. GFP：

ある特定の波長の光を照射することで、緑色光を発するタンパク質。

※注6. フォトブリーチング：

強い光を照射し続けることで蛍光タンパク質の構造が変化し、蛍光が消失する手法のこと。

※注7. グルタミン酸受容体：

グルタミン酸（神経伝達物質の1つ）を受容する受容体。可塑性や記憶・学習に関与している。

## ■論文

Masayuki Hamakawa, Takayuki Uozumi, Naoko Ueda, Yuichi Iino, Takaaki Hirotsu

A role for Ras in inhibiting circular foraging behavior as revealed by a new method for time and cell-specific RNAi

*BMC Biology*, 13, 6 (2015)

### 【お問い合わせ】

大学院理学研究院 生物科学部門

味覚・嗅覚センサ研究開発センター

助教 広津 崇亮（ひろつ たかあき）

電話：092-802-3707

092-642-4402

FAX：092-642-2645

Mail：hirotsu.takaaki.056@m.kyushu-u.ac.jp