

大脳神経回路網形成に關与する遺伝子群の検索： Poly(A)⁺ mRNA fingerprinting by arbitrary primers (PRAP) 法による試み

檀 一平太

東京大学大学院総合文化研究科生命環境系（楠見明弘 研究室所属）
学振特別研究員

E-mail: dang@kusumib.c.u-tokyo.ac.jp

要旨

哺乳類の大脳神経回路網形成で最も重要な過程は「1 余剰な神経細胞, シナプスの産生」, 「2 高感受性期における活動依存的神経回路の選抜」, 「3 低感受性期への移行」である. この過程を支える分子機構を明らかにする第一歩として, 生後マウスの大脳において時期特異的に発現する遺伝子の検出を試みた. まず新しい遺伝子発現比較法の開発に着手し, この結果, Poly(A)⁺ mRNA fingerprinting by arbitrary primers (PRAP) 法という新しい Differential display (DD) 型遺伝子発現比較法を開発した. PRAP 法で得られる遺伝子断片は, mRNA の 3' 末端非翻訳領域を選択的には増幅せず, 翻訳領域の配列情報を高確率で入手することができるようになった. さらに, 従来の DD 型遺伝子発現比較法全てに対して適応可能な遺伝子検索の確率論的基盤を整備した. 次に PRAP 法を用いて生後 0, 1, 2, 4, 6 週齢のマウス大脳における遺伝子発現を比較し, 発現に差の見られたいくつかの遺伝子断片についてノーザンブロット解析と塩基配列決定を試みた. パイロット研究の結果, 相同性をもった複数種の G タンパクが, 生後のマウス大脳において, 時期特異的に発現していることが示された.

1. はじめに

1-1 大脳神経回路網形成における発生学上の特殊性

大脳神経回路網の形成は個体の組織形成において極めて特異な位置を占めている. 通常の組織形成においては, その最終的な機能と形態はおおむね先天的に決まっている. すなわち, 遺伝的プログラムが, 安定な胚の内部環境において遂行されることにより, 一定の形態と機能をもった組織が形成される [11]. しかし, 大脳神経回路網形成においては, 外部からの入力刺激によって, 内部環境 (回路網の活動) は変化をとげ, それにともなって遺伝プログラムの発現状況もまた変化する. すなわち, 大脳神経回路網の形態と機能は, 先天的には定まっておらず, 外部環境からの刺激と, それによって異なってくる神経回路網自身の活動に依存して, 様々な形をとりうるのである.

しかしながら, 大脳神経回路網の形成が遺伝的プログラムの支配を免れているわけではない.むしろ, 様々な外部入力に応じて, 活動依存的に神経回路網の機能と形態を変化させうる, 柔軟な分子機構を創出する遺伝プログラム, およびその具現である分子機構が存在すると考えるべきである.

1-2 大脳神経回路網形成の本質

それでは, 大脳神経回路網形成における柔軟な分子機構の本質とはなんなのだろうか? わたしは, 哺乳類の大脳神経回路網形成においてもっとも重要な過程は, 余剰な神経回路網形成と活動依存的な神経回路網選抜に対する感受性の変化であると考え. この観点から, 哺乳類の大脳神経回路網形成を次の 3 つの過程に分類する. すなわち「1 余剰な神経細胞, シナプスの産生」, 「2 高感受性

期における活動依存的神経回路の選抜」,「3 低感受性期への移行」である。

まず生後の哺乳類脳において、神経細胞は多数の側枝を伸ばし、多数の標的神経細胞と余剰なシナプスを形成する(マウスでは生後0~2週齢)。つぎに、神経回路網は高感受性期を迎え、この時期に活動依存的な神経細胞とシナプスの削除が大規模に展開する(1~4週齢)。最後に神経回路網は徐々に低感受性期へと移行し、小規模で定常的な可塑的变化が大規模な回路網選抜にとってかわる(~6週齢) [3, 30, 31, 38]。

1-3 神経回路網形成の研究状況

現状では、大脳神経回路網の形成過程を余剰な神経回路網形成と神経回路網選抜に対する感受性の変化という面から探ろうという研究はあまりおこなわれていない。特に分子レベルでの研究はまだ全くなされていないといってよい。

一方、神経回路網形成の分子機構の研究全般に関して、重要な知見が蓄積されつつある。まず第1に例として挙げられるのは、神経回路の配線に関わる研究である。これには、成長円錐の誘導、軸索経路の選択、標的細胞の認識等が含まれる。Tessier-Lavigneらのグループは成長円錐の誘導を制御する物質としてNetrinを同定した [9, 18, 37]。また、GoodmanらのグループとChibaらのグループは、ショウジョウバエの神経配線突然変異体の解析によって、Fasciclin III 等、神経配線に関与する多数の分子の同定とその機能解析に成功している [6, 7, 19, 24-29, 32, 39, 42]。さらに、Bonhoefferらのグループはニワトリ視覚中枢神経系の神経配線が、Ephファミリーのリセプターチロシンキナーゼの濃度勾配によって調節されていることを見出した [1, 10, 40, 49]。

第2の方向性は、神経配線の多様性を裏付ける分子的多様性の研究である。Axelらのグループは哺乳類嗅覚中枢神経系において、数千の嗅覚受容体がゲノムにコードされていることを明らかにした [4, 5, 34, 35, 43, 44]。また、SüdhofらのグループはNeurexin (神経細胞認識分子の候補) がオルターナティブスプライシングにより、数百から数千のアイソフォームとして存在しうことを示した [17, 45-48]。

第3の方向性は、大まかな神経回路網が形成された後の活動依存的な神経回路網の微調整の研究である。TonegawaらのグループはNMDA受容体欠失ノックアウトマウスの解析により、中枢神経回路網のパターン形成が神経細胞の活動に依存していることを示した [20]。

これらの研究によって、神経回路網における神経細胞の配線の大まかな枠組みの決定機構、その配線の多様性、および活動依存的な神経回路網の微調整といった現象の分子的背景が解明されていくだろう。しかし、これらの研究を進めていくだけでは、大脳神経回路網の形成過程において、外界からの入力に応じて、様々な形態(神経回路網のパターン)と機能(神経回路網の活動)を創出させる柔軟な分子機構の本質を解明することは不可能である。

1-4 研究戦略

そこで、わたしは、大脳神経回路網形成のエッセンスである3つの過程、「1 余剰な神経細胞、シナプスの産生」、「2 高感受性期における活動依存的神経回路の選抜」、「3 低感受性期への移行」に関与する分子機構解明の第一歩として、これらの仮定に関与する分子群の系統的・網羅的な分子検索をおこなうことにした。

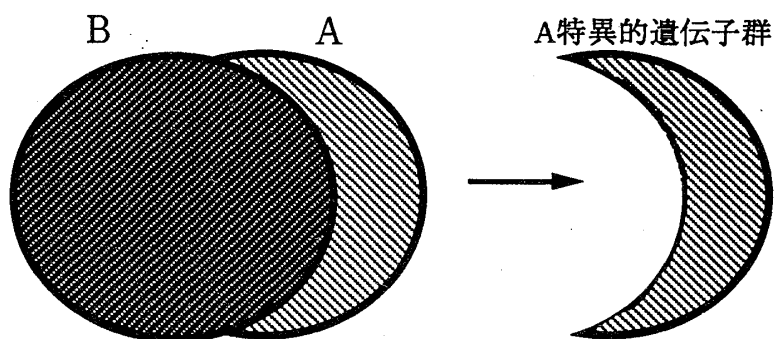
この遺伝子検索は次の2つの仮定に基づいている。まず第1は、「大脳神経回路網形成の3つの過程に関与する分子は、生後の哺乳類の発達段階に伴い、発現量を変化させる」という仮定である。哺

乳類脳において大脳神経回路網形成が起こるのは生後であることから考えれば、これは妥当である。第2の仮定は、「哺乳類の脳においては、神経回路網の形成の時期依存性が高く、領域依存性は低い」というものである。この根拠となっているのはRackicらの観察である。彼らは、サルの大脳の様々な領域について、発達時期ごとのシナプス密度の変化を測定した結果、「大脳は、部位ごとに機能が分化しているが、部位が異なっても、発達時期が同じであれば、発達段階もほぼ同じという特徴を持っている」という結論に達した [33]。

これら2つの仮定に基づき、これまでにわたしは、生後のマウス脳において、遺伝子発現量が時期依存的に大きく変動する遺伝子群の系統的・網羅的検索を開始した。現在までに、本研究に適した遺伝子検索法として

poly (A)+ mRNA Subtractive Cloning型遺伝子発現比較法

fingerprinting by arbitrary primers 法 (PRAP 法) を開発した。また、その確率論的基盤の整備と小規模な検索によるパイロット研究を終了している。本稿ではこれまでのパイロット研究での成果を報告する。



Differential display 型遺伝子発現比較法

2. PRAP 法の開発

2-1 遺伝子発現比較法の選択

本研究で極めて重要なのは、遺伝子発現の比較方法の選択である。現在広く用いられている遺伝子発現比較法は大きく分けて2種類の系統がある。ひとつはSubtractive cloning(SC)型の方法、もうひとつはDifferential display (DD) 型の方法である。

これらの方法の概念を説明するため、いま仮に、2つの遺伝子発現状態、A、Bを想定する。SC型遺伝子検索法では、Aに特異的に発現している遺

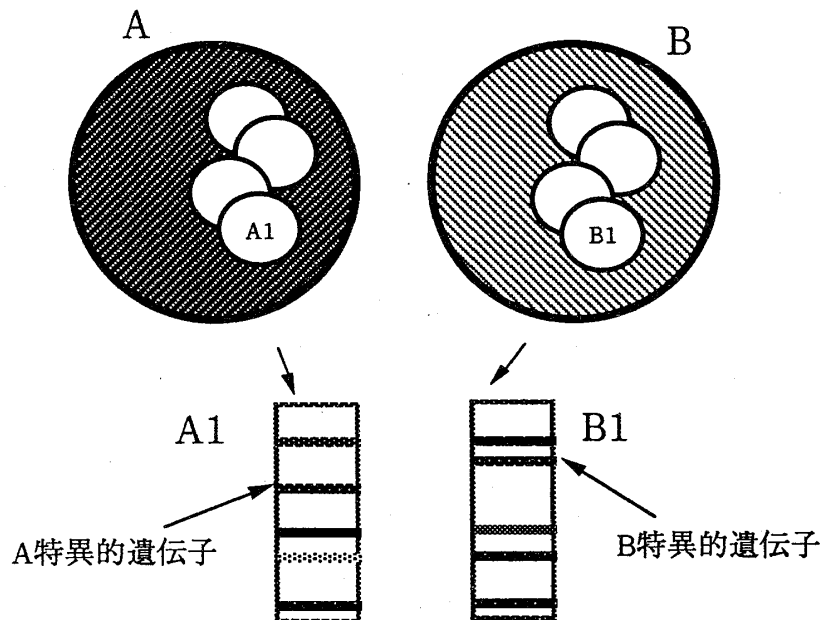


図1 Subtractive cloning型遺伝子発現比較法とDifferential display型遺伝子発現比較法。

遺伝子発現状態AとBを比較するにあたって、subtractive cloning型遺伝子発現比較法では発現遺伝子群AからBを差し引いて、両者に共通に発現する遺伝子群を取り除き、Aに特異的に発現する遺伝子群を検出する。Differential display型遺伝子発現比較法では、発現遺伝子群をPCRによっていくつかのサブグループに分割する。各サブグループの電気泳動パターンを比較し、発現に差のある遺伝子を検出する。

伝子を見つけるため、A から B の引き算をおこなう (図 1, 2)。原法では、B の cDNA ライブラリーを作成し、A の mRNA とハイブリダイゼーションをおこない、ハイブリダイゼーションから漏れた 1 本鎖の mRNA を A に特異的に発現する遺伝子として検出していた [14]。その後、differential hybridization 法との組み合わせ [41] や PCR の利用 [16] 等の改良が進んでいる。

SC 型の遺伝子発現比較法は有用な遺伝子発現比較法ではあるが、本研究には適していない。まず第 1 の問題は、複数の遺伝子発現比較点を比較することが困難であるという点である。

例えば、5 つの発達段階における遺伝子発現を比較する場合、20 回の引き算を行わなくてはならない。しかし、このような手間のかかる実験は通常の研究室では実現不可能である。さらに第 2 の問題は、SC 型の遺伝子発現比較法では遺伝子発現状態 A と B に対して、つねに全体同士の引き算しかできないという点である。このため、発現に差のある遺伝子群は全発現遺伝子中どれくらいの割合を占めているのかは全くわからず、遺伝子検索の過程を確率的に把握できなくなってしまう。

一方、DD 型遺伝子検索法では、まず発現遺伝子集団 (mRNA) A および B から、3' 末端 poly(A) 配列に結合する $T_{12}AG$ (原法の場合 [21]) のようなアンカープライマーによって cDNA 合成をおこなう。このとき、AG の部分を系統的に変化させ、全発現遺伝子を、いくつかのサブクラスに分割する。次に、このアンカープライマーと任意の配列を持つプライマーを用いて PCR をおこない、数十から百数十種類の PCR 増幅産物を得る。これによって、発現遺伝子集団 A および B は、アンカープライマー n とおよび任意プライマー m によって増幅可能なサブグループ A_{nm} , B_{nm} に分割される。これら一つ一つのサブグループについて、電気泳動のバンドパターン (バンド数は通常 50 ~ 100) を比較し、これによって、発現に差のある遺伝子断片を検出する [21-23] (図 3)。

2-2 DD 型遺伝子発現比較法の問題

DD 型遺伝子発現比較法は、きわめて有望な可能性をはらんでいる方法ではあるが、それらが有効に生かされているとはいえない。まず問題としてあげられるのは、遺伝子検索効率の確率論的基盤が脆弱である点である。DD 型遺伝子発現比較法においては、原理的には発現に差のある遺伝子が全体の全発現遺伝子中どの程度割合を占めているか、また、どのくらいの効率で遺伝子検索をおこなっているかを系統的に把握できるという利点がある。しかし、実際には DD 型遺伝子

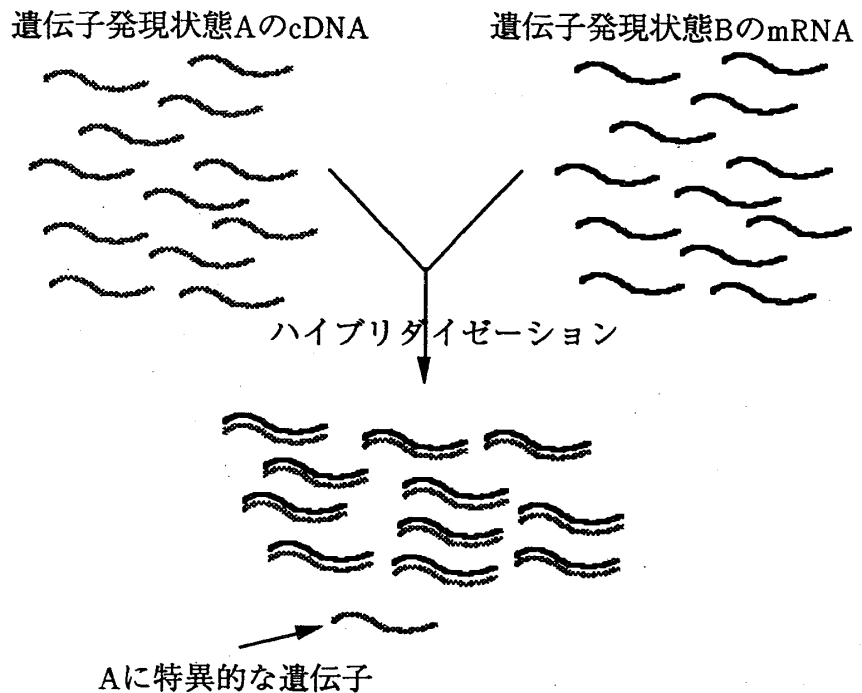
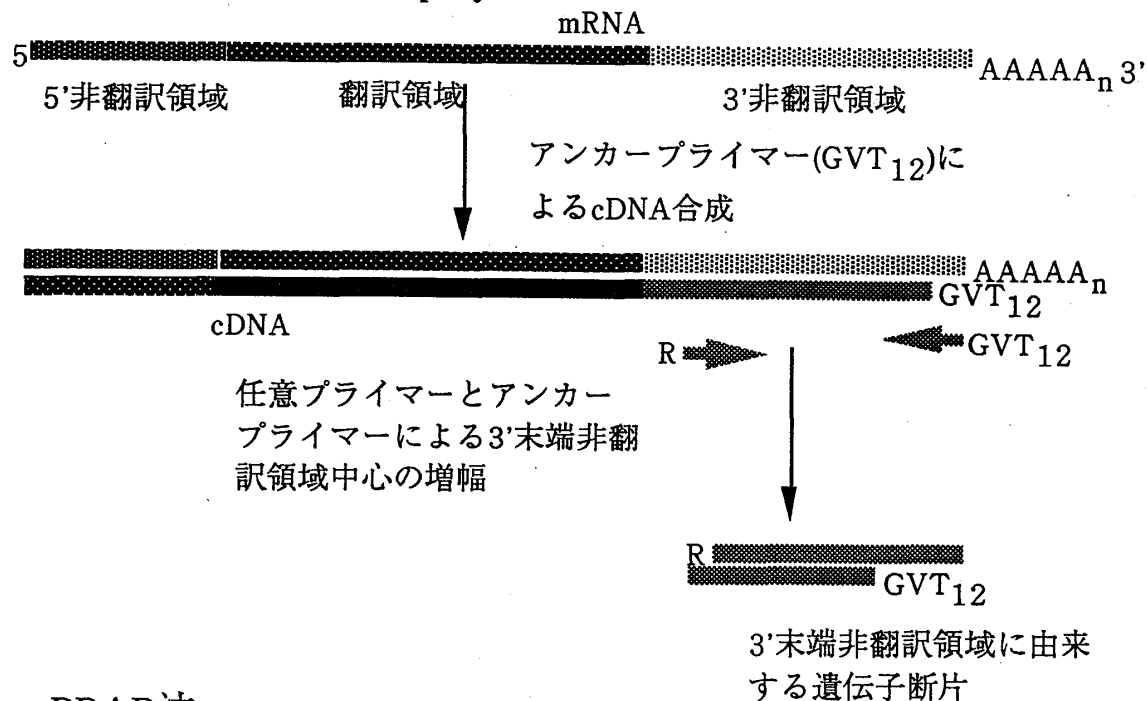


図 2 Subtractive cloning型遺伝子発現比較法。

Subtractive cloning法では、遺伝子発現状態A由来のcDNAをB由来のmRNAとハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの起こらなかった 1 本鎖のcDNAをAに特異的な遺伝子として検出する。

通常のdifferential display法



PRAR法

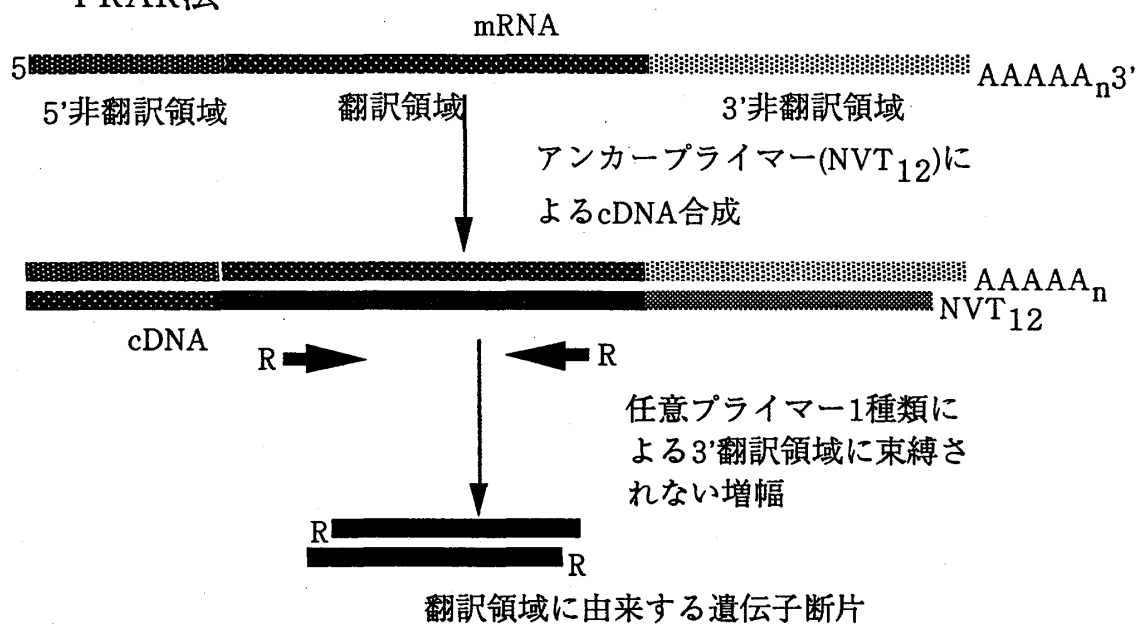


図3 PRAR法と通常のdifferential display法の相違.

通常のdifferential display法では、PCR時にアンカープライマーを使用するため、mRNAの3'末端非翻訳領域に由来する遺伝子断片が増幅されてしまう。これに対して、PRAR法では、任意プライマー1種類によってPCR増幅をおこなうため、mRNAの3'末端非翻訳領域中心の増幅は起こらない。このため、PRAR法では翻訳領域由来の遺伝子断片が得られる確率が高くなる。

発現比較法における遺伝子検索の効率は十分には定式化されておらず、確率論的基盤を確立する必要がある。

さらに、Liang らによる原法では PCR 時に mRNA 3' 末端の poly (A) 配列を認識するアンカープライマーを用いるため、mRNA 3' 末端の非翻訳領域が選択的に増幅されてしまうという問題があった。3' 末端の非翻訳領域は配列多型が大きいので、Liang らの DD 法で得られた遺伝子断片の塩基配列は、配列情報としては、あまり価値が高いものではない。

しかし、DD 型遺伝子発現比較法の中でも 3' 末端 poly(A) 配列を認識するアンカープライマーを用いないものも存在する。Welsh らによって開発された RNA fingerprinting by arbitrary primers (RAP) 法は 3' 末端 poly(A) 配列に対応したアンカープライマーによるサブクラス分けをおこなわない。この方法では、アンカープライマーとして 20 塩基前後の任意プライマーを用いて cDNA 合成をおこない、さらにもう 1 種類の別の任意プライマーを加えて PCR をおこなう [50]。Sokolov と Prockop の改良法では、6 mer のランダムプライマーによって mRNA から cDNA を合成した後、1 から 3 種類の任意プライマー (20 mer 程度) によって、PCR をおこなう [36]。したがって、RAP 法は、これら 2 つの技術的問題からは免れていた。ところが、RAP 法では、サブグループすなわち PCR で増幅される遺伝子断片の数が、20 種類程度と少ないという欠点があった。

2-3 PRAP 法の開発

このように、本研究に適した遺伝子検索法は存在しておらず、新しい方法を開発する必要があった。ここで目指すべき方法は、Liang らの DD 法のように 1 回の PCR で増幅されてくる遺伝子断片の数が多く、Welsh らの RAP 法のように mRNA 3' 末端の非翻訳領域に依存しないという特徴を兼ね備えた DD 型遺伝子発現比較法であると考え、このような方法の開発に着手した。その結果、両者の利点を兼ね備えた poly(A)⁺ mRNA fingerprinting by arbitrary primers (PRAP 法) という新しい DD 型遺伝子検索法を開発した。この方法では、 T_{12} VN (V: A, C and G; N: A, C, G and T) という 1 種類のアンカープライマーにより cDNA を合成した後、10 塩基の任意プライマー 1 種類 (複数でも可能) によって PCR 増幅をおこなう。使用する任意プライマーの種類は実験規模により異なるが、効率の良い検索をおこなうためには数十種類は必要である。この方法は PCR にアンカープライマーを使用しないので、3' 末端の非翻訳領域が選択的に増幅されてくることはない。さらに、PRAP 法では 50 から 100 種類の遺伝子断片が PCR で増幅されてくるので、RAP 法のようにサブグループのサイズが小さすぎるという問題もない。

3. DD 型の遺伝子発現比較法による遺伝子検索の確率的基盤

3-1 遺伝子検索効率の定式化

PRAP 法も含めて、DD 型の遺伝子発現比較法では、1 回の PCR でせいぜい 100 種類の遺伝子断片を増幅してくるにすぎない。これは、哺乳類の脳で発現しているといわれる 5 万種類以上の遺伝子群のほんの一部分にすぎない。このように多様な遺伝子群を対象とする以上、確率論に基づいた系統的な検索は必要不可欠である。しかし、確率論的基盤に関しては、Bauer らが原法について確率論的な考察を試みたのみで [2]、広義の differential display 法全てを包括する議論はまだなされていない。このような状況を鑑みて、われわれは広義の differential display 法について確率論的基盤の整備を試みた。

まず、遺伝子検索の効率 P を定式化にあたって、4 種類のパラメーターを考慮する必要がある。以下に各パラメーターについて説明する。

発現している遺伝子の総数、すなわち mRNA の種類を T とする。この T は、遺伝子検索の対

象, すなわち mRNA 抽出のサンプルに固有の値であり, 人為的には調節できない. この T の値を実験的に求めるのは極めて困難である. 最善の見積もりとしては, mRNA と cDNA のハイブリダイゼーション速度の測定することによって, 遺伝子発現数を推定する試みが 70 年代に広くおこなわれており, これが, 現在最も信頼できる遺伝子発現数の推定である. 哺乳類の場合, 遺伝子発現数 T は, 培養細胞で約 1 万 5 千種類, 通常組織で約 2 万種類, 脳で約 3-10 万種類と推定されている [12, 13, 51]. 大脳の遺伝子発現数は測定されていないが, われわれは脳全体の遺伝子発現数を約 5 万種と推定し, 大脳ではそれよりやや少ない約 4 万種程度が発現しているの見積もっている.

T 種類からなる発現遺伝子群 (mRNA) の全体は, cDNA 合成の際に, アンカープライマーの種類に応じて, サブクラスに分割される. このとき用いるアンカープライマーの種類を A とする. すなわち, 発現遺伝子群は A 種類のサブクラスに分割される. この A は, 使用する differential display 法に応じて自動的に決まる. Liang らの改良法では, $A=4$ であり [22], one-base-anchored differential display 法では, $A=3$ である [23]. また, RAP 法や [50], われわれの開発した PRAP 法ではサブクラス分けをしないため, $A=1$ となる.

次に, 各サブクラスを構成する cDNA について, 任意プライマーとアンカープライマー, あるいは, 任意プライマーのみを用いた PCR がおこなわれる. このとき用いる任意プライマーの種類を n とする. なお, RAP 法のように複数種の任意プライマーを同時に使用する場合は, n は任意プライマーの組み合わせ数を意味する (ただし, この場合, 任意プライマーは a と b , c と d というように独立に用い, a と b , b と c というように重複して用いない). したがって, 実際の遺伝子検索では, P は n に最も依存することになる.

この PCR で増幅された遺伝子断片の種類の平均値を B とする. ある任意プライマーとアンカープライマーの組み合わせによって PCR 増幅される遺伝子の部分集団をサブグループと表現すれば, B はサブグループのサイズを意味する. Bauer らは PCR で増幅される遺伝子断片の数と, 電気泳動で分離されるバンドの数を別のものとして考えた. これは, 電気泳動の分解能の限界のために, 同じ移動度を持つ遺伝子断片が多数存在すると考慮したためである. しかし, 実際には, 1 レーンに展開されるバンド数が 100 程度の場合にはバンドの重複はほとんど起こらないことが Bauer によって確認されている [2]. したがって, 事実上, PCR で増幅される遺伝子断片の数と, 電気泳動で分離されるバンドの数を同一に考えても問題はない. この B の値は, PCR 条件を変化させるなどの工夫により, 実験的に調節することも原理的には可能であるが, 実際には, 使用する differential display 法と遺伝子比較対象に応じて自動的に決まる値と考えたほうがよい. RAP 法では, B は 20 程度と少ないが [50], Liang らの DD 法 [21-23] と PRAP 法では, 50 から 100 程度である.

これらの 4 種類のパラメーターによって, 遺伝子検索効率 P を表すと式 (1) が得られる.

$$P = 1 - \left(1 - \frac{AB}{T}\right)^n \quad (1)$$

P : 検索効率

A : アンカープライマーの種類 (サブクラスの種類)

n : 任意プライマーの種類 (サブグループの種類)

B : PCR で増幅される遺伝子断片数 (サブグループのサイズ)

T : 全遺伝子発現数

本研究では PRAP 法を用いて, マウス大脳の遺伝子発現パターンを比較しているが, この場合, 各パラメーターの値は, $A=1$; $B=80$ となる. この値を用いて, $T=20,000, 40,000, 50,000$ とした場合の P と n の関係を表すと, 図 5 のようになる. この図から, $n=200$ 付近までは, T の値がい

ずれであっても、ほぼ直線的に遺伝子検索効率が上昇していることがわかる。研究室規模の実験系では、 $n=200$ 程度までは取り扱い可能であることも考慮すれば、この程度の遺伝子検索をおこなうことが妥当である。 $T=40,000$ と見積もった場合、 $n=200$ の検索では $P=33\%$ となり、全発現遺伝子の約 $1/3$ を網羅する検索がおこなえる。

以上の確率論的考察から、われわれは、最終的に、200 種類の任意プライマーを用いて全発現遺伝子の約 $1/3$ を網羅する検索がおこなう計画である。

3.2 任意プライマーの アニーリング効率

これまでの議論では、PCR 産物の数から、遺伝子検索効率を推定する方法について説明したが、発現遺伝子の配列と任意プライマーのアニーリング効率について考慮することもまた必要である。

まず、任意の遺伝子における塩基配列には、その配列と完全に相補性のある任意プライマーだけが結合すると仮定する。このとき、 l 残基からなる任意プライマーが結合する確率 Q_l は

$$Q_l = \frac{1}{4^l} \quad (2)$$

と表せる。

いまこの遺伝子の長さを m とすると、任意プライマーがこの遺伝子と結合する確率 R_m は、任意プライマーが 1 種類の場合、

$$R_m = Q_l m \quad (3)$$

と表せる。

通常の DD 法では、アンカープライマーによって、3' 末端が固定されているため、1 種類の PCR 増幅遺伝子断片では 1 種類の任意プライマーの認識部位は 1 カ所である。しかし、アンカープライマーを用いない differential display 法では、任意プライマーの結合様式は異なっている。1 種類の任意プライマーによる PRAP 法では、1 種類の任意プライマーは 1 種類の PCR 増幅遺伝子断片において 5' 末端と 3' 末端の 2 カ所で結合している。また、PRAP 法や RAP 法で、複数の任意プライマーを用いた場合、例えば、 a と b という 2 種類の用いたとすると、PCR 増幅遺伝子断片の構造は aa, ab, ba, bb の 4 種類存在することになる。したがって、複数の任意プライマーを用いた場合についても、議論を拡大する必要がある。

まず、PRAP 法について考える。この場合、任意プライマーは 1 種類であり、これが PCR 増幅断片の 5' 末端と 3' 末端の 2 カ所に結合する（実際には、PCR 増幅断片の各相補鎖の 5' 末端）。任

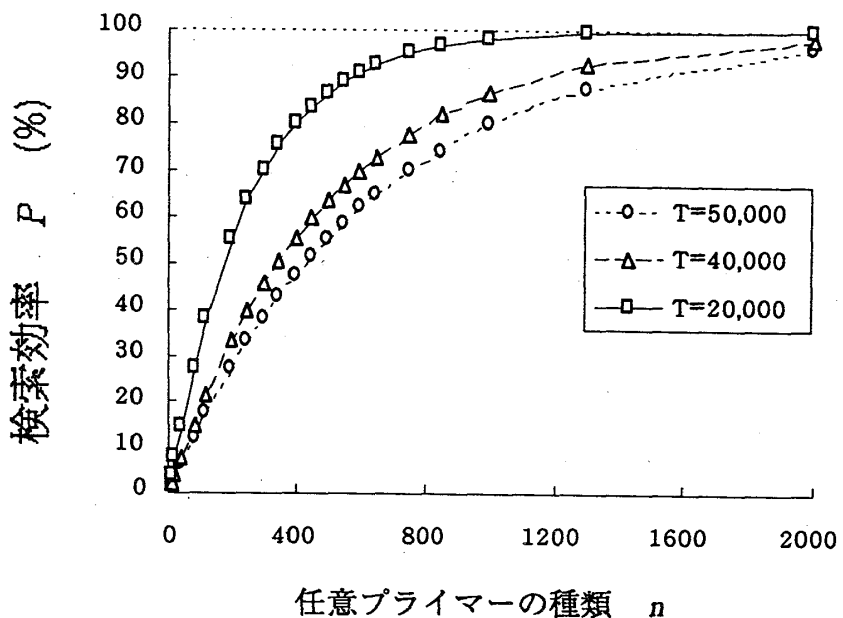


図4 任意プライマーの種類 n と検索効率 P の関係。

PRAP法における任意プライマーの種類 n と検索効率 P の関係を、全遺伝子発現数 $T=50,000, 40,000, 20,000$ の場合について示してある。その他のパラメーターの値は、アンカープライマーの種類 $A=1$, PCRで増幅される遺伝子断片数 $B=80$ と設定してある。

任意プライマーの結合確率 R_m は,

$$R_m = (Q_m)^2 \quad (4)$$

として表せる.

次に, R_m を, 1 回の PCR 増幅に複数の任意プライマーを用いた方法について議論を拡張する. 任意プライマーの種類を k とすると, たとえば, $k=2$ として, a と b の 2 種類の任意プライマーを用いた場合, PCR 増幅断片の各末端の構造の種類は aa, ab, ba, bb の 4 種類である. 一般的には PCR 増幅断片の各末端の構造の種類は, k^2 となる. したがって, 任意プライマーの結合確率 R_m は,

$$R_m = (kQ_m)^2 \quad (5)$$

となる.

このようにして求めた 1 遺伝子に対する任意プライマーの結合確率 R_m と, 前述の議論に用いた各パラメーター, すなわち, A : アンカープライマーの種類 (サブクラスの種類), B : PCR で増幅される遺伝子断片数 (サブグループのサイズ), T : 全遺伝子発現数との関係を求めると,

$$B = \frac{TR_m}{A} \quad (6)$$

となる.

しかしながら, この式は, (1) 任意プライマーと対象配列が完全に一致する, そして, (2) 発現遺伝子群が任意プライマーによって認識され, PCR 増幅される標的配列を持っている場合は, 必ず PCR 増幅がおこる, という仮定の上でしか成立しない. 実際の実験では, 当然このような仮定は成り立たない.

われわれの PRAP 法では 10 mer の任意プライマーを用いているが, この任意プライマーが認識する対象配列は 10 mer の完全一致とはならず, 実際には, 多少のミスマッチを許容した配列認識が起こっていた (図 6). ミスマッチの許容に関して, 便宜的に「仮想プライマー長」という概念を導入する. これは物理的な任意プライマーの長さとは関係なく, 実験上での任意プライマーの性質から求めた見かけ上の任意プライマーの長さである. 例えば, 物理的には 10 mer のプライマーが, 見かけ上 6.7 mer のプライマーと同様な確率的振る舞いをするような場合, この見かけ上のプライマーの長さを仮想プライマー長と考える. 実際の実験上は, プライマーと標的配列の完全一致のみを許すような条件設定は不可能であるため, 上式における任意プライマーの長さ l を, 仮想プライマー長として認識し, 概念上の変更を加える必要がある.

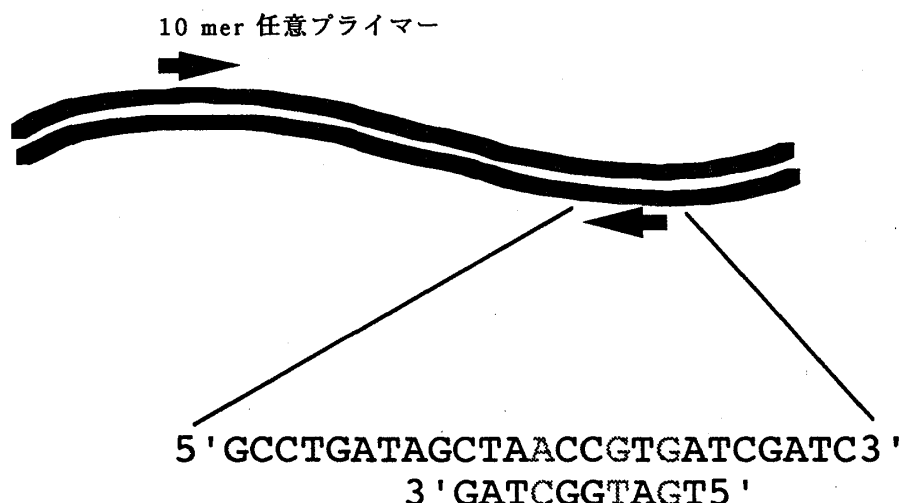


図 5 PRAP法における任意プライマーのアニーリング.

PRAP法において, 任意プライマーが標的配列を認識する際, 多少のミスマッチを許容する.

さらなる問題は、発現遺伝子群が任意プライマーによって認識され、PCR増幅されうる標的配列を持っているのにも関わらず、増幅が起らない場合である。この原因には大きく分けて2種類である。

まず、PCR増幅の失敗が任意プライマーの標的部位の塩基配列自体に内因する場合がある。任意プライマーが、ミスマッチが多い標的配列を認識の際には、この任意プライマーと対象配列の結合は、起こりにくくなると考えられる。さらに、2次構造をとりやすい遺伝子配列についても、任意プライマーの結合が起らない場合がある。

さらに、PCR増幅の失敗が実験的な限界に起因する場合も考えられる。たとえば、増幅対象となる遺伝子の発現が極めて少なく、PCRの検出能以下という場合には、この微量遺伝子のPCR増幅は起らない。また、任意プライマー同士、あるいはアンカープライマーと任意プライマーの標的配列が長い場合、PCR増幅は起こりにくくなる。さらには、RNA抽出の際に、RNAの分解が起り、微量遺伝子が失われるという場合も起こりうる。

このようなPCR増幅の失敗について、上式に補正項を加える必要がある。理論的には、内因性の問題については Q_i に補正項 C_{int} を掛け合わせるべきであり、実験上の限界については、 R_m に補正項 C_{ext} を掛け合わせるべきである。これにより、式(5)、(6)はそれぞれ

$$Q_m = (C_{int} k Q_i m)^2 \quad (7)$$

$$B = \frac{C_{ext} T R_m}{A} \quad (8)$$

と修正されるが、 C_{ext} と C_{int} を厳密に分割することは不可能である。したがって、より一般的な選択として、 R_m に C_{ext} と C_{int} を合わせた補正項 C を掛け合わせるのが妥当である。これにより、式(8)は

$$B = \frac{CTR_m}{A} \quad (9)$$

と修正される。

現状では、この補正項がどの程度の値を持つのかは予想がつかない。しかし、将来、differential display法により、多数の遺伝子がクローン化され、物理的プライマー長と仮想プライマー長の関係が明らかになっていけば、ある程度補正項の推定は可能である。この補正項の推定は、とりもなおさず、differential display法の実験的限界を明らかにすることでもある。したがって、このような補正項の設定には意義があるといえる。

次に、実際の数値を当ては

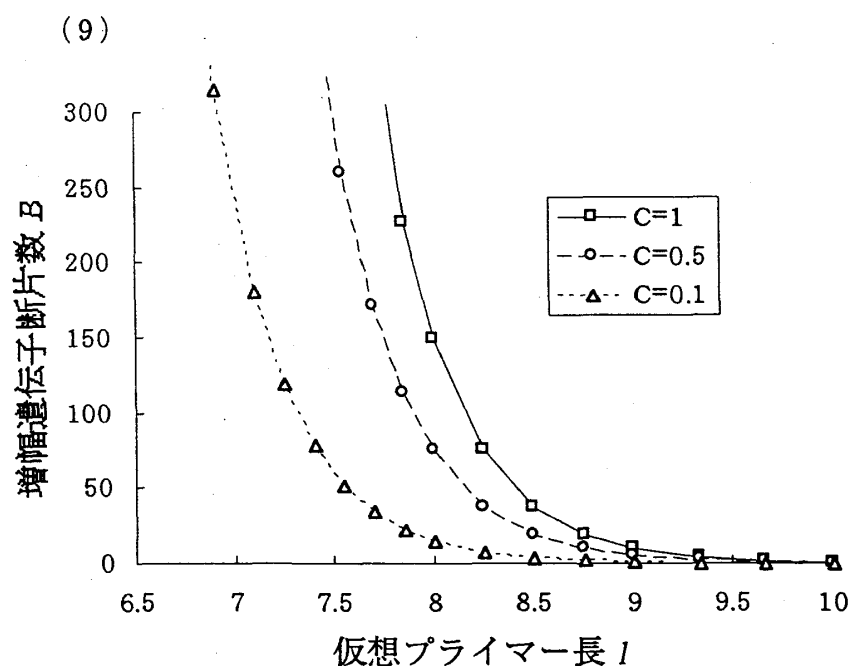


図6 仮想プライマー長 l とPCR増幅遺伝子断片数 B の関係。

PRAP法における仮想プライマー長 l とPCR増幅遺伝子断片数 B の関係を、補正項 $C=1, 0.5, 0.1$ の場合について示してある。その他のパラメーターの値は、アンカープライマーの種類 $A=1$ 、遺伝子の平均長 $m=4,000$ 、全遺伝子発現数 $T=40,000$ と設定してある。

めて、PRAP 法における、任意プライマーの仮想プライマー長と PCR 増幅バンド数、すなわちサブグループのサイズの関係性を調べる。発現遺伝指数については前述のように $T=40,000$ と想定する。また、遺伝子の平均長 m については、哺乳類の場合、通常 mRNA の平均的長さは 2 kb であるが、脳の場合は mRNA はそれよりも長くなっている [8, 51]。したがって、 $m=4000$ と想定する。補正項 C については $C=1, 0.5, 0.1$ と 3 つの場合を考える。式 (10) に基づいて任意プライマーの仮想プライマー長 l と PCR 増幅バンド数 B の関係をグラフにすると図 7 のようになる。われわれの実験系では $B=80$ 程度であるので、仮想プライマー長は 7 ないし 8 になると考えられる。物理的プライマー長 10 mer の任意プライマーが 2 つか 3 つのミスマッチを許容すると考えれば、この値は妥当である。

このように、われわれは任意プライマーの遺伝子配列認識について、広義の DD 法全てに適応可能な確率的基盤を整備した。今後、DD 法による遺伝子のクローン化が進むにつれ、任意プライマーの標的配列認識の性質が次第に明らかになっていくはずである。このような知見が十分に蓄積すれば、コンピューターシミュレーションにより、任意プライマーの標的配列認識と増幅遺伝子数の関係をより詳細に関連づけることが可能となってくるだろう。

4. PRAP 法による生後マウス大脳における遺伝子発現の比較

4-1 遺伝子発現比較の実際

つぎに、実際の遺伝子検索の経過について報告する。

まず、PRAP 法を用いて、生後 0, 1, 2, 4, 6 週齢のマウス大脳における遺伝子発現の変化を比較した。生後 0, 1, 2, 4, 6 週齢のマウスから、大脳を摘出し、AGPC 法を用いて RNA を抽出した。次に、 T_{12} VN (V: A, C and G; N: A, C, G and T) アンカープライマーを用いて、cDNA 合成をおこなった。このようにして得られた cDNA をテンプレートとして、10 mer の任意プライマーを用いて、PRAP 法のプロトコルに従い、PCR をおこなった。増幅遺伝子断片は ^{35}S dATP により内部標識されている。この PCR 産物を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、その泳動パターンのオートラジオグラムを X 線フィルム上に得た。

図 8 に 10 mer の任意プライマー R2 (5' TGGATTGGTC) による PRAP 法の遺伝子発現パターンを示してある。マウスの発達段階に応じて、発現に差のあるバンドがいくつか見られる。

まず注目すべき点は、通常の DD 法では 500 bp 以下の短いバンドが増幅される傾向があるのに反して、PRAP 法では 500 bp 以上の長いバンドが増幅される傾向があるという点である。増幅されてくるバンドが長ければ長いほど、増幅断片が翻訳領域に由来する確率は高くなり、有用な塩基配列情報が得られることになる。増幅断片が mRNA 3' 末端の非翻訳領域に束縛されないという特長とともに、これは PRAP 法の重要な利点である。

また、増幅されたバンドの塩基配列を決定した結果、増幅遺伝子断片は確かに任意プライマーにより増幅され、そのうちの何割かは翻訳領域に由来するものであることを確認した。

4-2 時期特異的発現遺伝子：R2-600 の場合

上記のようにして得られた遺伝子発現のフィンガープリントをもとにして、いくつかのバンドを切り出し、クローン化をおこなった。これらについて順次ノーザンプロット解析と塩基配列決定をおこなっている。本稿では具体例としてこのうちの 2 例について取り上げる。

まず、図 8 の R2-300 に着目する。これは R2 任意プライマーによって増幅された 300 bp の遺伝子断片である。R2-600 は PRAP 法のフィンガープリントでは 1 週齢以降に発現が見られた。ノーザンプロット解析の結果、約 3 kb の単一バンドが得られ、やはり 1 週齢以降に発現が見られた (図 9)。次に塩基配列を決定したところ、ひとつの問題に直面した。本来 PRAP 法では翻訳領

域を中心とした増幅がおこるはずである。増幅断片が翻訳領域に由来する場合、塩基配列を決定すれば、表と裏の6つの読み枠のうち、1つの読み枠に数百塩基にわたって終止コドンが存在しないオープンリーディングフレーム (ORF) が見つかる。3 kb の mRNA に由来する 600 bp という比較的長い遺伝子断片が ORF を全く含んでいないということは不自然ではある。たまたま R2-600 が mRNA 3' 末端の非翻訳領域由来のものであったとも考えられるが、実はこのように比較的長い遺伝子断片で ORF を含まない遺伝子断片が割合多く見られるのである。脳の mRNA は他の組織の mRNA に比較して、数倍の長さを持つということを考慮すると、脳の mRNA は長い 3' 末端非翻訳領域を持つ傾向があるという可能性も考えられる [8,51]。

この場合、なぜ脳の mRNA は長い 3' 末端非翻訳領域を持つのかという新たな疑問も生じてくる。mRNA 5' 末端の非翻訳領域はプロモーター領域等を含み、遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしているが、3' 末端非翻訳領域の生物学的役割はほとんどわかっていない。しかし、脳の mRNA のみが長い 3' 末端非翻訳領域を持つとなると、3' 末端非翻訳領域にはなにか未知の機能を持っており、それが脳の機能となんらかの関わりを持っているのではないかと考えたくもなる。しかし、残念ながら、現段階では厳密な議論をすることは不可能である。

4-3 時期特異的発現遺伝子：R2-640 の場合

次に、図 8 の R2-640 に着目する。これは R2 任意プライマーによって増幅された 640 bp の遺伝子断片である。R2-640 は PRAP 法のフィンガープリントでは 1 週齢以降に発現が見られた。この遺伝子断片について塩基配列決定をおこなったところ、6つの読み枠の1つに全く終止コドンの存在しない、ORF が見つかった。この塩基配列をアミノ酸配列に変換し、ホモロジー検索をおこなった。ちなみに、このような作業は 3' 末端非翻訳領域を選択的に増幅する従来の DD 法ではほとんどおこなえなかったものである。ホモロジー検索の結果、R2-640 はヒトの G タンパクの一種、HSGST1 と高いホモロジーを持つことがわかった [15]。ホモロジーの度合いは、塩基配列で 97 %、アミノ酸配列で 99.5 % であった。ホモロジー領域は、HSGST1 タンパクの全長 2192 残基のうち、943-1559 残基であり、HSGST1 タンパクの翻訳領域中部に相当している。

HSGST タンパクは、細胞周期の制御に関与するタンパクであり、G 期から S 期の転換を調節していると考えられている。したがって、この遺伝子は細胞分裂の盛んな細胞で多く発現しているはずである。しかるに、1 週齢以降の脳においては、神経細胞の分裂は既に終わっているため、R2-640 が HSGST1 由来のものであるとすれば、神経細胞由来ではなく、グリア細胞由来のものであると推定する。

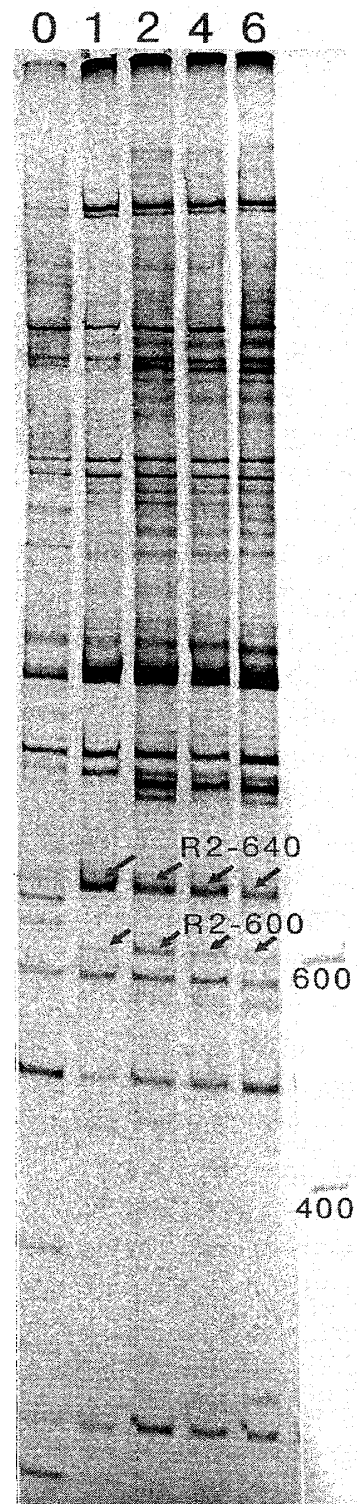


図 7 PRAP法のフィンガープリント。

PRAP法で得られる典型的なフィンガープリントを示してある。R2プライマーを用いて、0, 1, 2, 4, 6 週齢のマウス大脳の遺伝子発現パターンを比較してある。

次にR2-640について、ノーザンブロット解析をおこなった結果、図9に示すように、5種類のバンドが検出された。このうち4.5 kbのバンド発現パターンは1週齢以降特異的な発現パターンを示し、PRAP法フィンガープリンティングにおけるR2-640の発現パターンと対応していた。したがって、R2-640はこの4.5 kb mRNAに由来するものである可能性が高い。

他のバンドに着目すると、7.3 kbと2.5 kbのバンドはR2-640とは逆に初期中心型の発現パターンを示していた。また、5.5 kbと3.3 kbのバンドは発現量が高く、構成的な発現を示していた。

このように多様なバンドが検出された原因としては、まず第1に考えられるのは、オルターナティブスプライシングによる複数のアイソフォーム mRNAの創出である。あるいは、第2の可能性として、R2-640とホモロジーの高いmRNAが

数種類存在し、それらが検出された場合も考えられる。

HSGST1 mRNAの翻訳領域の全長が2192残基とすると、mRNAの全長は3 kb程度であると予想される。しかし、ノーザンブロット解析で検出されたmRNAのうち少なくとも3つはそれよりも長いものである。オルターナティブスプライシングにより長いmRNAを発現しているのか、あるいはゲノムにHSGST1と高い相同性をもつ長い遺伝子が複数存在するのか、いずれの場合にしても、ある種の相同性をもったGタンパクが複数種存在し、神経回路網形成過程の脳において発現量を変化させているということがこの結果から示唆される。

しかしながら、実際にR2-640がこれらのmRNAの中のどれに由来するものなのかを同定し、そのmRNAをクローン化することは困難である。cDNAライブラリーを作成し、そこから各mRNA種のクローン化を試みた場合、ほとんどのクローンが発現量の高い5.5 kbと3.3 kbのmRNAに由来すると予想される。このため、百種類程度のクローンを解析しなければならないが、これはきわめて効率が悪い。したがって、R2-640の内部配列からプライマーを作成し、ポリA領域に対応するとプライマーと共にRT-PCRをおこない、ノーザンブロット解析で検出された5種類のmRNAをそれぞれクローン化する予定である。その後、ゲノムDNAとサザンブロットをおこない、ノーザンブロットで検出された5種類のmRNAがはたしてゲノムレベルの多様性由来するのか、あるいはオルターナティブスプライシングに由来するものなのかを検証していく予定である。

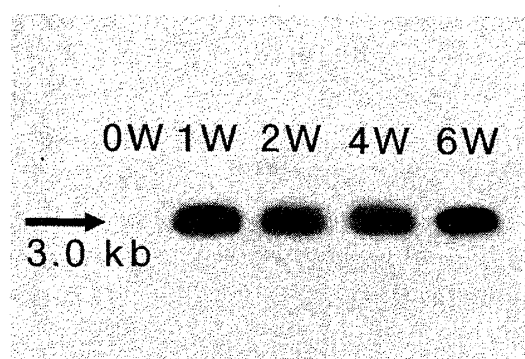


図8 R2-600のノーザンブロット解析。
R2-600遺伝子断片をプローブとして0, 1, 2, 4, 6週齢のマウス大脳のPoly (A)⁺ mRNAとノーザンブロット解析をおこなった。

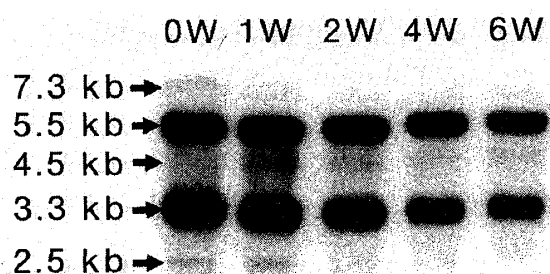


図9 R2-640のノーザンブロット解析。
R2-640遺伝子断片をプローブとして0, 1, 2, 4, 6週齢のマウス大脳のPoly (A)⁺ mRNAとノーザンブロット解析をおこなった。

5. まとめおよび今後の展望

哺乳類の脳神経回路網形成のエッセンスである3つの過程、「1 余剰な神経細胞, シナプスの産生」, 「2 高感受性期における活動依存的神経回路の選抜」, 「3 低感受性期への移行」を支える分子機構を明らかにする第一歩として, 以上に述べたように, 生後マウスの脳において時期特異的に発現する遺伝子の検出を試みた。まずわたしは新しい遺伝子発現比較法の開発に着手した。この結果, PRAP 法という新しい DD 型遺伝子発現比較法を開発した。PRAP 法では, Liang らの DD 法のように mRNA の 3' 末端非翻訳領域を選択的に増幅してしまうという問題は解決され, 翻訳領域の配列情報を高確率で入手することができるようになった。また Welsh らの RAP 法と比較して1回の PCR で得られる遺伝子断片数を増加させることに成功した。本研究の副産物として得られた PRAP 法は様々な遺伝子発現の比較に応用可能である。また, わたしは従来の DD 型遺伝子発現比較法全てに対して適応可能な遺伝子検索の確率論的基盤を整備した。現状では, このような確率論に基づいて DD 型遺伝子発現比較法による遺伝子検索を試みている分子生物学者はほとんどいないが, 将来的にはこのような確率論的基盤が必要になってくると考えている。

次に PRAP 法を用いて生後 0, 1, 2, 4, 6 週齢のマウス脳における遺伝子発現を比較し, 発現に差の見られたいくつかの遺伝子断片についてノーザンブロット解析と塩基配列決定を試みた。本研究ではそのうちの典型的な2例について例示した。まず, R2-600 の例は, 脳の mRNA が長い原因は 3' 末端の非翻訳領域が長いためであるという可能性を示唆するものであった。さらに, R2-640 の例は, 脳における多様な遺伝子発現はオルターナティブスプライシングによるものであるか, あるいはゲノムに高い相同性をもつ複数の遺伝子がコードされているという可能性を示唆するものであった。

本研究は新しい遺伝子発現比較法の開発とその確率論的基盤という2つの有用な副産物を生み出したという点では評価すべきである。しかし, 本来の目的, すなわち, 脳神経回路網形成において, 様々な外部入力に応じて, 活動依存的に神経回路網の機能と形態を変化させる柔軟な分子機構を解明するという点では, まだようやく第一歩を踏み出したばかりである。今後の成果に期待していただきたい。

参考文献

- [1] Baier, H. and Bonhoeffer, F. (1992) *Science* 255: 472-475
- [2] Bauer, D. et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21 (18): 4272-80
- [3] Blue, M. E. et al. (1983) *Quantitative analysis. J. Neurocytol.* 12 (4): 697-712
- [4] Buck, L. and Axel, R. (1991) *Cell* 65: 175-187
- [5] Chess, A. et al. (1994) *Cell* 78: 823-834
- [6] Chiba, A. et al. (1993) *J. Neurosci.* 13: 714-732
- [7] Chiba, A. et al. (1995) *Nature* 374: 166-168
- [8] Chikaraishi, D. M. et al. (1983) *Molecular Neurobiology, Cold Spring Harbor Symp.* 48: 309-18.
- [9] Colamarino, S. A. and Tessier-Lavigne, M. (1994) *Cell* 81: 621-629
- [10] Drescher, U. et al. (1995) *Cell* 82: 359-370
- [11] Edelman, G. M. (1988) *Topobiology*. Basic Books, Inc.
- [12] Grouse, L. et al. (1972) *Biochemistry* 11 (5): 798-805.
- [13] Grouse, L. D. et al. (1980) *Current topics in developmental biology* 16: 381-97.
- [14] Hedrick, S. M. et al. (1984) *Nature* 308: 149-53.
- [15] Hoshino, S. et al. (1989) *EMBO J.* 8 (12): 3807-3814.

- [16] Hubank, M. and Schatz, D. G. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 (25): 5640-8.
- [17] Ichtchenko, K. et al. (1995) *Cell* 81: 435-443
- [18] Kennedy, T. E. et al. (1994) *Cell* 78: 425-435
- [19] Kolodkin, A. L. et al. (1993) *Cell* 75: 1389-1399
- [20] Li, Y. et al. (1994) *Cell* 76: 427-437
- [21] Liang, P. and Pardee, A. B. (1992) *Science* 257: 967-71.
- [22] Liang, P. et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21 (14): 3269-75.
- [23] Liang, P. et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 (25): 5763-4.
- [24] Lin, D. M. and Goodman, C. S. (1994) *Neuron* 13: 507-523
- [25] Lin, D. M. et al. (1994) *Neuron* 13: 1055-1069
- [26] Massersmith, E. K. et al. (1995) *Neuron* 14: 949-959
- [27] Matthes, D. J. et al. (1995) *Cell* 81: 631-639
- [28] Nose, A. et al. (1992) *Cell* 70: 553-567
- [29] Nose et al. (1994) *Neuron* 13: 525-539
- [30] O'Leary, D. D. M. (1989) *Trends in Neuro Science* 12: 400-406.
- [31] Oppenheim, R. W. (1991) *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453-501.
- [32] Patel, N. H. et al. (1987) *Cell* 48: 975-988
- [33] Rakic, P. et al. (1986) *Science* 232: 232-235.
- [34] Ressler, K. J. et al. (1993) *Cell* 7: 597-609
- [35] Ressler, K. J. et al. (1994) *Cell* 79: 1245-1255
- [36] Sakolov, B. P. and Prockop, D. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 (19): 4009-4015.
- [37] Serafini, T. et al. (1994) *Cell* 78: 409-424
- [38] Shepherd, G. M. (1988) *Neurobiology*. New York: Oxford University Press.
- [39] Snow, P. M. et al. (1989) *Cell* 59: 313-323
- [40] Stahl, B. et al. (1990) *Neuron* 5: 733-743
- [41] Tedder, T. F. et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 208-12.
- [42] Van Vactor, D. V. et al. (1993) *Cell* 73: 1137-1153
- [43] Vassar, R. et al. (1993) *Cell* 74: 309-318
- [44] Vassar, R. et al. (1994) *Cell* 79: 981-991
- [45] Ulrich, B. et al. (1995) *Neuron* 14: 497-507
- [46] Ushkaryov, Y. A. et al. (1992) *Science* 257: 50-56
- [47] Ushkaryov, Y. A. and Südhof, T. C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6410-6414
- [48] Ushkaryov, Y. A. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 11987-11992
- [49] Walter, J. et al. (1987) *Development* 101: 685-696
- [50] Welsh, J. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20 (19): 4965-70.
- [51] 高橋康夫 (1991) *生化学* 64 (4): 253-281.