REGULAR PAPER

線虫 *C. elegans* の発生プロテオーム解析Developmental Proteome Analysis of *Caenorhabditis elegans*鍋谷卓司^{*a)}・田伏 洋^{b)}・次田 皓^{a), b)}

Takuji NABETANI, Yo TABUSE, and Akira TSUGITA

(Received May 24, 2003; Accepted July, 2003)

Animal development proceeds through harmonized expression of many genes. A small free-living soil nematode, *Caenorhabditis elegans*, has many advantages as a model organism and has been used to study the genetic program, operating in animal development. In recent years, exhaustive measurement of mRNA level using DNA microarray have been carried out in various biological systems, including *C. elegans* and have provided valuable information about gene expression during development. On the other hand, it is often pointed out that analyses of protein level might be rather critical, since the function of a gene is accomplished by the expressed protein. To identify proteins which are expressed differentially during development and to delineate the correlation of mRNA and protein expression in *C. elegans*, we have conducted differential two-dimensional electrophoresis of protein samples from the embryo to adult animal. Differential image analysis of gel patterns revealed that many proteins were expressed stage-specifically and they were analyzed with MALDI-TOF mass-spectrometry. In this report, we show the result of ten proteins which expressed mainly either in the embryo or in other developmental stages besides the embryo. Although expression patterns of most of them were found to be correlated with those of mRNA level, the expression pattern of DIM-1 protein is inconsistent with that of mRNA. The discrepancy between protein and mRNA levels found in our limited scale of experiment further strengthen the notion that gene expression does not always parallel with the expression of the corresponding protein.

1. 緒 言

今日、ヒトをはじめとしたさまざまな生物でゲノムが解読され、今後はゲノム情報の医療分野や医薬産業分野などへの応用が期待されている。その実現のためには、遺伝子発現の結果として産生され生命活動を直接支えているタンパク質の挙動や機能を網羅的に解析するプロテオミクスが大きな課題になっている。

線虫 *Caenorhabditis elegans* は 1970 年代の半ば以降モデル生物として用いられるようになり、発生や行動などさまざまな生命現象解明に関する知見の獲得に寄与してきている^{1), 2)}。2002 年ノーベル生理学医学賞が線虫研究のパイオニアである S. Brenner, J. Sulston, および R. Horvitz の 3 博士に授与されたことも記憶に新しい。線虫は全細胞の系譜が解明されている唯一の生物であり、発生に関する知見が豊富に蓄積されている。またゲノム解読も 1998 年に完了している³⁾ことから、筆者らは動物の発生過程における

プロテオームの変動を解析するためのモデルとして線虫に注目した。

C. elegans は体長約 1 mm の土壌線虫の一種で、通常は雌雄同体が自家受精することで増殖する。*C. elegans* は孵化後、4 回の脱皮で区切られる L1, L2, L3, および L4 の

Fig. 1. Life cycle of *C. elegans*. Embryogenesis takes about ten hours and newly hatched animals grow to adulthood through four larval stages, L1, L2, L3, and L4. The period of each larval stage, which is separated by molting, is indicated.

*a) 東京理化器械(株)プロテオミクス研究所 (☎305-0005 つくば市天久保 1-16-1)

TOKYO RIKI KIKAI Corporation, Proteomics Research Laboratory (1-16-1 Amakubo, Tsukuba 305-0005, Japan)

b) 日本電気(株)基礎研究所プロテオミクス研究センター (☎305-8501 つくば市御幸が丘 34 番地)

NEC Corporation, Fundamental Research Laboratories, Proteomics Research Center (34 Miyukigaoka, Tsukuba 305-8501, Japan)

各幼虫期を経て成虫となる (Fig. 1). 筆者らは胚および同調化した各幼虫期および成虫からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動 (2-DE) で分離後、それぞれの 2-DE パターンを比較した。さらに発生過程で変動を示すタンパク質スポットについて、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 解析を行い、タンパク質の同定を行った。本報では、これまでに得られている線虫の発生プロテオーム解析の結果について紹介する。

2. 材料と方法

2.1 線虫の可溶性タンパク質の抽出

線虫の培養は基本的には Brenner の報告⁴⁾に従った。線虫を寒天培地 (3 g/L NaCl, 10 g/L ペプトン, 17 g/L 寒天, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 5 μ g/mL コレステロール, 25 mL リン酸カリウム緩衝液 [pH 6.0]) 上, 20°C で培養し、卵が数多く見られる時期に M9 緩衝液 (3 g/L KH₂PO₄, 6 g/L Na₂HPO₄, 5 g/L NaCl, 1 mM MgSO₄) で成虫を洗い流した。培地表面に残った卵を 20°C でさらに 6 時間培養し、孵化した L1 幼虫を M9 で洗い取った。この L1 幼虫を 20°C でさらに、20, 30, 40, および 50 時間培養し、各々同調化された L2, L3, L4 幼虫と成虫を得た。胚は、成虫に次亜塩素酸を含む水酸化ナトリウム溶液を用いて、虫体を溶かして調製した⁵⁾。成長段階をそろえた線虫および胚は M9 緩衝液で数回洗浄後、液体窒素中に滴下し凍結した。凍結した胚および虫体サンプル (250 mg) に対して 3 mL のサンプル溶解液 (9.8 M 尿素, 100 mM ジチオスレイトール (DTT), 2% v/v NP-40, 2% v/v キャリアアンフォライト溶液 pH 3.5–10, 0.5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 1% v/v プロテアーゼ阻害剤カクテル) を添加し液体窒素中、乳鉢を用いてすりつぶした。常温に戻して溶解したサンプルを超音波処理した後、37°C で 1 時間保温しタンパク質を可溶化した。不溶物を遠心 (13,000 rpm, 40 分間) により除去し、上清を 2-DE 解析に用いた。タンパク質の定量はプロテインアッセイ (Bio-Rad) を用いて行った。

2.2 二次元電気泳動とタンパク質スポットの分離、抽出、消化

溶解したサンプルをゲル膨潤緩衝液 (サンプル溶解液のキャリアアンフォライト濃度を 0.5% [v/v] にしたもの) に混和し、タンパク質量 200 μ g で 2-DE を行った。1 次元目には固定化 pH グラジェントゲル (Immobiline DryStrip pH 3–10, 24 cm; Amersham Biosciences) を用いた。乾燥ゲルに試料溶液を加え 20°C で 12 時間膨潤後、500 V で 1 時間, 1,000 V で 1 時間, 8,000 V で 10 時間, 等電点電気泳動を行った。泳動後のゲルを平衡化緩衝液 (50 mM Tris-HCl [pH 8.8], 6 M 尿素, 30% [v/v] グリセリン, 2% [w/v] ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 1% [w/v] DTT, 少量のプロモフェノールブルー) 中、室温で 30 分間振とうし平衡化を行った。2 次元目は 12.5% のポリアクリルアミドゲル (24 cm $\times$ 20 cm) を用い、1 W/ゲルで 1 時間、その後 20 W/ゲルで約 6 時間、電気泳動を行った。電

気泳動は 1 次元目、2 次元目のいずれも 20°C で行った。ゲル染色は銀染色キット (Amersham Biosciences) を用い、グルタルアルデヒドを除いた方法で行った。ゲルイメージはスキャナーで取得し、Phoretix (Ver 5.1.0) で解析した。各タンパク質スポットを切り出し、自動酵素消化装置 (Pro-Gest; Genomic Solutions) でトリプシン消化を行った。

2.3 MALDI-TOF/MS 解析

MALDI-TOF/MS は Voyager-DE STR (PE Biosystems) を使用した。測定は 337 nm の窒素レーザーで正イオンのリフレクタモードで行った。酵素消化で得られたペプチド混合物を 80°C で減圧乾燥し、炭酸水素アンモニウムを除去した。乾燥後のサンプルを 5 μ L の TA 溶液 (0.1% TFA/50% アセトニトリル) で溶解後、0.7 μ L を MALDI サンプルプレートにのせ、この上に 0.7 μ L のマトリックス溶液を加え自然乾燥させた。マトリックス溶液は再結晶で精製した α -cyano-4-hydroxycinnamic acid に 10 mg/mL の濃度になるように TA 溶液を加え、超音波で完全に溶解後、さらに等量の TA 溶液を加えて調製した。

2.4 データベース検索

タンパク質の同定は MS-Fit⁶⁾ を用いて PMF 法により行った。検索条件はデータベースを NCBI nr, 種を All, 消化を trypsin, 切断ミスの最高数を 1, システインの修飾を carbamidemethylation, 可能性のある修飾をメチオニンの酸化, ペプチドの質量を monoisotopic, 質量公差を ± 0.3 Da として行った。同定結果の正否は、(1) 信憑性を表す値である MOWSE score⁷⁾ の高さ、(2) トップに正しい種が選ばれていること、および (3) 等電点と分子量の観測値と理論値との対応を考慮して決めた。

3. 結果と討論

3.1 PMF 法でのタンパク質の同定について

今回、タンパク質の同定は PMF 法を用いて行った。通常、2-DE でタンパク質スポットの同定を行う場合、数百から千個にのぼるタンパク質スポットを分析することになる。MALDI-TOF/MS を用いた PMF 解析では、一つのサンプル測定にかかる時間は約 1 分である。もう一つのタンパク質の同定法としては LC/MS/MS を用いた MS/MS ion search があり、その場合にはサンプルの測定にかかる時間は約 30 分である。LC/MS/MS を用いた方法は情報量が多く、特に PMF 法の苦手とする複数種のタンパク質が一つのスポットに含まれる場合やペプチドが数本しか生じない低分子量タンパク質の同定などには強力な方法である。しかし、30 倍にものぼる所要時間の差はサンプル数が増えるほど莫大になる。したがって、ラージサイズの 2-DE ゲルでタンパク質を分離する本研究では、同定できるタンパク質の数や感度を考慮し、まず網羅的に MALDI-TOF/MS での PMF 解析を行い、決まらなかったサンプルスポットについて LC/MS/MS の測定を行った。

3.2 標準プロテオーム・マップの作成

線虫において発現するタンパク質の概要を知るために、

すべての成長段階にある個体を含むプレートから線虫を集め、2-DE 解析を行った (Fig. 2). 銀染色によって検出されたタンパク質スポットのうち 741 個について PMF 解析した結果、223 個のスポットでは対応するタンパク質が明らかとなり、重複していたものを除き 181 種のタンパク質を同定した。Fig. 3A は、これらのタンパク質を機能別に分類したものである。エネルギー産生、タンパク質合成、アミノ酸や糖の代謝など細胞の生存に必須なタンパク質が大きな割合を占めることがわかる。その他には、ストレス応答やタンパク質フォールディングにかかわるシャペロンタンパク質や細胞の構造にかかわるタンパク質などが見られた。また、細胞内の存在部位で分類すると Fig. 3B のよ

うになり、細胞質に分布するものが 42% を占めている。またミトコンドリア、小胞体 (ER)、核などの細胞内小器官に分布するものが、それぞれ約 18, 5, 4% 見られた。ミトコンドリアについては多くがエネルギー産生、ER についてはストレスにかかわるものが多く見られた。ここで得られた 2-DE パターンを標準として、以下の発生プロテオーム解析を行った。

3.3 発生段階によるプロテオームの変動解析

胚、各幼虫期、および成虫のプロテオーム解析を行い、タンパク質の発現パターンが発生に伴いどのように変動するのかを検討した。発現パターンの変動は特に胚発生に着目し、胚発生で特異的に発現が上昇あるいは低下するタンパク質を検索した (Fig. 4). そのようなタンパク質のうち、ここでは Fig. 5 にクローズ・アップした顕著な発現変動を示す 10 種のタンパク質について報告する (Table 1). これらは発現パターンによって、胚で主に発現するタンパク質 (Fig. 5A) と、胚では見られず幼虫期から成虫にかけて主に発現するタンパク質 (Fig. 5B) に大きく分類され、そのうちのいくつかについて発生との関連について考察した。線虫の遺伝子に関する情報は Worm Base⁸⁾ を参照した。

3.3.1 Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (K 07 A 1.2) Deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP) nucleotidohydrolase はヌクレオチド代謝にかかわっており、その遺伝子は線虫ゲノムでは K07A1.2 にコードされている。今回のプロテオーム解析では dUTP nucleotidohydrolase は胚に特異的に存在し、幼虫期から成虫にかけては検出されなかった (Fig. 5, A-1). 一方、K

Fig. 2. Two-dimensional electrophoresis of *C. elegans* proteins. The protein sample was prepared from exponentially growing culture containing embryos and all of the developing stages.

Fig. 3. Classification of the identified protein. The identified proteins were classified according to their cellular function (A) and subcellular localization (B). For classification, we used databases such as SWISS Prot and Wormbase, and classified a given protein according to the description of the corresponding mammalian ortholog appeared in their database.

Fig. 4. Developmental 2-DE analysis of *C. elegans* proteomes. Proteins mainly expressed in embryo (A-1 to A-5) and in larval and adult stage (B-1 to B-5) are indicated.

Table 1. Differentially Expressed Proteins during Development

#	Protein name	Database	Accession #	pI	MW (kDa)	MOWSE score
A-1	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidehydrolase	REFSEQ	NP_492542	5.00	52.195	1.72E+05
A-2	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	REFSEQ	NP_496237	7.68	36.383	2.91E+06
A-3	PCN-1	REFSEQ	NP_500466	4.41	29.017	4.94E+05
A-4	Thioredoxin	REFSEQ	NP_496200	4.81	17.324	1.36E+04
A-5	Stress Induced Protein SIP-1	REFSEQ	NP_499316	7.89	17.839	2.23E+05
B-1	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	REFSEQ	NP_508534	6.76	36.459	1.92E+03
B-2	DIM-1	REFSEQ	NP_741854	5.18	35.539	1.24E+04
B-3	Aspartic protease ASP-6	REFSEQ	NP_505133	5.63	41.520	3.40E+03
B-4	F15E11.1 protein	REFSEQ	NP_503640	6.04	17.428	4.87E+03
B-5	Major sperm protein	REFSEQ	NP_494891	9.07	21.304	1.77E+03

07A1.2 の mRNA 量は胚、卵母細胞や成虫で高く、幼虫期では低いとの報告がある⁹⁾。また K07A1.2 の RNAi は胚発生致死の表現型を生じる¹⁰⁾。これらの結果を併せて考えると、dUTP nucleotidehydrolase は卵母細胞で転写され、胚でタンパク質として発現し、胚発生に必須の機能を果たしていると考えられる。

3.3.2 PCN-1 タンパク質 (W03D2.4) PCN-1 タンパク質は DNA ポリメラーゼに付随するタンパク質であり、DNA 複製や細胞周期にかかわると考えられる。PCN (proliferating cell nuclear antigen) ファミリーに属するタンパク質はヒトをはじめ広く生物界に分布しており、線虫には PCN-1 だけが存在する。線虫の体細胞は雌雄同体で 959 個であり、胚発生でその約半分 589 個の細胞が生じる。孵化後は特定の細胞系譜で分裂が起こるものの体細胞の分裂は胚発生時に比較して頻度は高くはない。このことは、PCN-1 タンパク質が胚にのみ検出されたこと (Fig. 5, A-3) と矛盾しない。一方、生殖細胞は幼虫期を通して増殖し、L3 幼虫以降は減数分裂が開始され、成虫の生殖巣では約 2,000 個の生殖細胞核が見られるようになる。今回の

解析結果だけから結論することはできないが、PCN-1 タンパク質は生殖細胞の分裂に関与していないのかもしれない。

3.3.3 Thioredoxin (R05H5.3) Thioredoxin はさまざまな還元反応に関与するとされており、広く生物界に存在する。線虫にも複数のアイソフォームが存在するが、個々の機能は明らかではない。今回、R05H5.3 にコードされる Thioredoxin が胚に特異的に発現することを見いだした (Fig. 5, A-4)。各アイソフォームの mRNA 量の変動解析でも、R05H5.3 に対応する mRNA だけが胚発生期に多く存在していた⁹⁾。また、R05H5.3 の RNAi が胚発生致死をもたらすという観察¹¹⁾も、筆者らのプロテオーム解析の結果と一致している。

3.3.4 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [K10B3.7 (GPD-3), T09F3.3 (GPD-1)] 線虫には 4 種の Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPD) のアイソフォームが存在している。このうち、今回の解析では胚と成虫に特異的な GPD-1 (Fig. 5, A-2) と幼虫から成虫にかけて発現される GPD-3 (Fig. 5, B-1) が明らかになっ

Fig. 5. Expression profiles of stage-specific proteins. The expression patterns for the following proteins indicated by arrows in Fig. 4 are shown; A-1: Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (K07A1.2), A-2: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 1 (T09F3.3), A-3: PCN-1 (W03D2.4), A-4: Thioredoxin (R05H5.3), A-5: Stress Induced Protein SIP-1 (F43D9.4), B-1: Glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase 3 (K10B3.7), B-2: DIM-1 (C18A11.7), B-3: Aspartic protease ASP-6 (F21F8.7), B-4: Nematode specific protein (F15E11.1), B-5: Major sperm protein.

た。mRNA の転写量も、タンパク質の発現パターンとほぼ一致しており、GPD-1 は胚で多く幼虫期と成虫期で減少するのに対して、GPD-3 は胚で低く、幼虫期から成虫期にかけて高レベルで存在している⁹⁾。GPD-1 の RNAi が胚発生致死になること¹⁰⁾も、これらの観察と矛盾しない。両者の発現は相補的な関係にあり、発生が進むに伴い発現が切り替わるものと考えられる。

3.3.5 DIM-1 タンパク質 (C18A11.7) DIM-1 タンパク質は筋線維の形成に何らかの機能を果たすと考えられている。遺伝子の転写については、成虫で若干減少するものの、孵化後から L4 幼虫期にかけて高いレベルにあるとされている⁹⁾。一方、今回の解析では DIM-1 タンパク質は L3 幼虫期以降で観察され (Fig. 5, B-2), mRNA の発現パターンと相違点が見られた。この要因は現在明らかではないが、タンパク質発現と mRNA レベルの相関について注意を促す実験結果である。

3.3.6 主要精子タンパク質 (Major sperm protein,

MSP) 線虫の精子はアメーバ状をしており、MSP は内部に見られる繊維状構造の主要成分とされる²⁾が、その機能は明らかではない。線虫にはアミノ酸配列が極めて類似した数多くの MSP 遺伝子が存在する。今回の 2-DE 解析で分離・同定された MSP のスポットが単一のものか、複数の MSP の混合物かは確認できていない。線虫の精子形成は L4 幼虫期から始まることが知られており、2-DE 解析において MSP の発現が L4 以降に検出されたこと (Fig. 5, B-5) とよく一致している。また、遺伝子の転写量も L4 幼虫期以降に上昇することが明らかになっており、タンパク質発現と mRNA レベルは相関していた。

3.4 タンパク質発現と遺伝子の転写量との相関について

線虫ではゲノム解読によって予測された遺伝子の多くについて、胚から成虫までの各成長段階における mRNA 量が DNA チップを用いて測定されている。上記のように本研究で見いだしたタンパク質のうち、多くについてはタンパク質と mRNA のレベルの変動は相関しているように思われるが、相違が認められるものもあった。遺伝子の機能はコードするタンパク質が作られることで初めて具現化されるものである。今回の結果は、酵母のプロテオーム解析結果からも指摘されている¹²⁾ように、mRNA 量の解析結果だけで遺伝子の機能発現を考察することに注意を促すものと思われる。今後、2-DE をはじめとする分離技術と質量分析などを駆使したプロテオーム解析は、生命現象を理解するうえで重要な情報を提供してくれるものと期待される。

文 献

- 1) W. B. Wood, "The *Caenorhabditis elegans*," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988).
- 2) D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer, and J. R. Priess, "C. *elegans* II," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1997).
- 3) The C. *elegans* Sequencing Consortium, *Science*, **282**, 2012-2018 (1998).
- 4) S. Brenner, *Genetics*, **77**, 71-79 (1974).
- 5) J. A. Lewis and J. T. Fleming, in "Caenorhabditis elegans—Modern Biological Analysis of an Organism," Academic Press, San Diego, California (1995), pp. 3-29.
- 6) <http://jpsl.ludwig.edu.au/ucshtml3.4/msfit.htm>
- 7) D. J. C. Pappin, P. Hojrup, and A. J. Bleasby, *Curr. Biol.*, **3**, 327-332 (1993).
- 8) <http://www.wormbase.org>
- 9) A. A. Hill, C. P. Hunter, B. T. Tsung, G. Tucker-Kellogg, and E. L. Brown, *Science*, **290**, 809-812 (2000).
- 10) F. Piano, A. J. Schetter, D. G. Morton, K. C. Gunsalus, V. Reinke, S. K. Kim, and K. J. Kemphues, *Curr. Biol.*, **12**, 1959-1964 (2002).
- 11) I. Maeda, Y. Kohara, M. Yamamoto, and A. Sugimoto, *Curr. Biol.*, **11**, 171-176 (2001).
- 12) S. P. Gygi, Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1720-1730 (1999).

Keywords: MALDI-TOF/MS, Peptide mass fingerprinting, Two-dimensional electrophoresis, Developmental proteomics, *Caenorhabditis elegans*