

氏名	菊地 哲宏
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第158号(文部科学省への報告番号甲第542号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2015年2月18日
学位論文題目	<b>線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> 生殖巣形成 リーダー細胞の移動停止機構の研究</b>
論文審査委員	(主査) 教授 矢倉 達夫 (副査) 教授 鈴木 信太郎 教授 西脇 清二

## 論文内容の要旨

チューブ状上皮の伸長と分枝による形態形成は、発生過程で器官原基の上皮細胞がその表面積を増大し、器官を形成するプロセスであり、無脊椎、脊椎動物を問わず、動物の発生過程で広く見られる現象である。上皮チューブの移動過程には先端に存在する単一もしくは一群の先端リーダー細胞が、移動の方向や距離を制御しており、分枝や伸長の機構については現在までに多くの研究がなされてきた。しかしながら、先端細胞の移動がどのような仕組で適切に停止するのかについてはほとんど未解明のままである。

*C. elegans* の雌雄同体は前後一対の生殖巣をもつ。生殖巣は基底膜に包まれた、チューブ状上皮の構造をしている。このU字型の生殖巣は、幼虫期に腹側の中心部に存在する生殖巣原基両端のリーダー細胞である2つの distal tip cell (DTC) が、体壁にそってU字型の移動をすることによって形成される。DTCの移動は次の3つのステージに分けられる。第1フェーズでは、体の中心部腹側にある生殖巣原基が、両端にあるDTCの先導によって腹側体壁筋上をそれぞれ前後軸方向に伸長する。第2フェーズでは90°向きを変え、体側下皮に沿って背側体壁筋まで伸長する。第3フェーズでは再び90°向きを変え、背側体壁筋上を両DTCは前後軸方向に向かい合うように移動し、陰門上部付近で停止することで、正常な大きさのU字型生殖巣を形成する。

停止のメカニズムを明らかにするために、エチルメタンスルホン酸を用いて突然変異を誘発し、DTCが正常位置で停止せずに行き過ぎる移動異常(DTC overshoot)を示す変異体 *tk102* 及び *tk107* を得た。これらの変異体では約70%の個体でDTC overshootが見られ、この表現型は後方の生殖巣DTCでより顕著であった。DTC overshootの原因を検討するため、体長やDTCの移動速度を計測した。体長を計測したところ野生型株と *tk102*、*tk107* 両変異体株間で有意な差はなかった。またDTCの移動速度に関しても *tk102* 及び *tk107* では2回目の方向転換までの移動速度は野生型と差がなかった。しかしながら、DTCの2回目の方向転換の後、すなわち第3フェーズでのDTC移動速度の減少の割合が野生型に比べて変異体では小さいことが分かった。以上のことから、これらの変異体の原因遺伝子は第3フェーズにおいてDTCを適切に減速させる機能をもつと考えられた。

遺伝的マッピングによって、*tk102* 及び *tk107* の変異の原因遺伝子はIII番染色体に存在することが分かった。さらに *tk102* および *tk107* はそれぞれIII番染色体上の853kb、328kbの領域に限定することができた。次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行ったところ、これらの領域内に *tk102* では3箇所、*tk107* では

2箇所の変異が同定された。これら候補遺伝子のうち *tk102* と *tk107* に共通するものは *F42H10.5* のみであり、RNAiを行ったところ、DTC overshoot 表現型が見られた。野生型 *F42H10.5* を含むフォスミドクローンの導入により、*tk102*、*tk107* 両変異体で DTC overshoot が回復したことから、*F42H10.5* が原因遺伝子であると結論し、本遺伝子を *mig-39* (*mig*: migration of cells abnormal) と命名した。*mig-39* は BED (BEAF and DREF; boundary element-associated factor and DNA replication-related element binding factor)-finger domain を持つタンパク質をコードしていた。BED-finger は進化的に保存された DNA 結合能を持つ Zinc-finger domain である。MIG-39タンパク質は哺乳類の ZBED4と相同性があることがわかった。BED-finger domain タンパク質は DNA の複製や細胞増殖・分化を制御する核タンパク質であることが知られているが、細胞移動の停止に機能することは、本研究により初めて明らかとなった。MIG-39の特異的抗体を作製し、免疫染色を行ったところ、DTC の核内と生殖細胞の細胞質で発現していることが分かった。DTC 特異的および生殖細胞特異的プロモーターにより、組織特異的に *mig-39* cDNA を発現させたところ、DTC で発現させた場合にのみ DTC 停止異常がレスキューされた。このことから、MIG-39の機能は DTC において細胞自律的であると考えられる。

Rac GTPase をコードする *ced-10*、*rac-2*、*mig-2* の欠損変異体あるいは RNAi knockdown では DTC 移動停止に強い影響は見られなかったが、*ced-10* と *rac-2* 変異体は *mig-39* 変異体の頭側 DTC overshoot 異常を増強し、尾側は抑制した。また *mig-2* 変異体は *mig-39* 変異体の頭・尾側両方の異常を抑制した。遺伝学的解析から Rac GTPase は MIG-39とは並列な経路で働くことが示唆された。我々は DTC の停止制御において頭側と尾側の DTC が Rac 活性のレベルに対して逆の応答を行うとのモデルを本研究において提唱した。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、上皮チューブによる器官形成の過程において、先端リーダー細胞の移動停止に機能する分子を初めて明らかにし、停止に関わる分子機構についてモデルを提出した。

筆者は線虫 *C. elegans* を用いて、エチルメタンスルホン酸で突然変異を誘発し、生殖巣形成のリーダー細胞である DTC が正常な位置で停止せず、行き過ぎてしまう変異体 2 株の分離を行った。これらの変異体では体の前後の生殖巣 DTC がともに停止異常を示した。種々の遺伝的解析、マッピング手法を用いることにより、これらが同じ遺伝子 *mig-39* の変異体であり、*mig-39* 遺伝子が III 番染色体の中央付近に位置することを突き止めた。次世代シーケンス解析により全ゲノム配列を解析し、さらにインジェクションレスキュー実験により *mig-39* 遺伝子のクローニングに成功した。*mig-39* は BED-finger domain を有する DNA 結合タンパク質をコードすることを明らかにした。BED-finger domain タンパク質はヒトやショウジョウバエでも知られており、DNA 複製や細胞の増殖・分化に関与することが報告されているが、これまで細胞の移動や停止に関しては全く報告が無く、本研究が最初の報告である。

次に筆者は、MIG-39タンパク質の一部を大腸菌で発現させ、これを抗原として、MIG-39を特異的に認識する抗体を作製した。本抗体を用いて組織染色を行った結果、MIG-39は生殖巣リーダー細胞 DTC の核と生殖細胞の細胞質の両方で発現していることを示した。そこで、それぞれの組織に特異的なプロモーターを用いて *mig-39* cDNA を *mig-39* 変異体において発現させたところ、DTC 特異的に発現させた場合にのみ DTC 停止異常がレスキューされることを見出した。この結果は MIG-39が DTC において細胞自律的に機能することを示している。

細胞の移動や神経軸索の伸長には低分子量 G タンパク質である Rac が機能することが知られている。そこで筆者は線虫の Rac をコードする *ced-10*、*rac-2*、*mig-2* の 3 種類の遺伝子に注目した。これらの遺伝子が DTC の停止にも機能しているかを調べるために、変異体の観察を行った。*ced-10*、*rac-2*、*mig-2* 変異体は単

独では DTC 停止にあまり影響が無かったが、*mig-39* 変異体との二重変異体あるいは三重変異体を作製すると、*mig-39* 変異体における DTC 停止異常を増強する場合と抑制する場合があることが分かった。また、この表現型が前後の DTC で逆になる場合があることも分かった。筆者は一見複雑に見えるこれらの変異体間の遺伝的相互作用に関して考察を行い、DTC の移動停止制御において、前後の DTC が Rac 活性レベルに対して逆の応答性を示すとの新しいモデルを提示するに至った。

本論文の研究成果は発生生物学分野で権威のある国際学術誌 *Developmental Biology* に発表され、他に 1 報の副論文が発表されている。筆者は審査会および公聴会において研究内容を的確に表現する能力を持つとともに、質疑応答を通して研究分野について幅広く深い知識を持つことが確認された。

以上により審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を持つと判定する。