

氏名	ひし だ りゅう いち 菱 田 竜 一
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1849 号
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	線虫 <i>C. elegans</i> の hch-1 遺伝子の解析

論文調査委員 (主査) 教授 藤吉好則 教授 竹市雅俊 教授 高橋 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

線虫 *C. elegans* の hch-1 変異株は孵化と細胞移動に異常がある。hch-1 変異株の胚は、その卵殻のタンパク質成分を分解できずに孵化が遅れるという Hch (hatching abnormality) 表現型を示す。また、野生株での QL 神経芽細胞とその子孫細胞 (QL 子孫細胞) は孵化後の L1 幼虫時に後方へと移動するが、hch-1 変異株では QL 子孫細胞の移動方向が逆転して前方へと移動するという Mig (migration of cells abnormal) 表現型も示す。本研究は、孵化と細胞移動という一見かけ離れた発生過程において、hch-1 遺伝子が如何に働くかを解析した。

トランスポゾン Tc1 の挿入変異である hch-1(ut110) 変異株を利用して、トランスポゾン・タギング法と形質導入による表現型レスキュー法により hch-1 遺伝子をクローニングした。さらに全長と思われる cDNA を単離し、その全塩基配列を決定したところ、予想される hch-1 遺伝子産物 HCH-1 は tolloid/BMP-1 ファミリーに属する Zn プロテアーゼであることがわかった。このファミリーに属するタンパク質は、TGF- $\beta$  様因子の活性化あるいは細胞マトリクスのプロセシングに機能していると考えられているが、HCH-1 がこのように機能しているか否かは明らかにできておらず、今後の課題とした。

2 つの hch-1 変異がプロテアーゼドメイン内に変異部位が存在するミスセンス変異であることを明らかにして、HCH-1 がプロテアーゼとして機能していることを示唆できた。機能を有する HCH-1 を産生しないと考えられる hch-1(rh134) 変異株から調整した hatching fluid には、卵殻を *in vitro* で分解する孵化酵素の活性が欠如していることや、HCH-1 と同等の機能を持つ HCH-1A-FLAG が過剰に発現していると思われる株では、その卵殻消化活性が野生株よりも高いことを明らかにした。例えば、HCH-1 が孵化酵素であるならば、この結果を説明できる。

hch-1 遺伝子は胚発生中頃の時期に背側と側面の上皮細胞で発現しており、QL 子孫細胞が移動する時期には発現していないことを明らかにした。従って QL 子孫細胞の移動には、HCH-1 の胚での機能、または胚で発現した HCH-1 の孵化後の機能が必要であると考えられる。細胞移動における HCH-1 の機能

は不明であるが、HCH-1が *tolloid* / *BMP-1* ファミリーに属していることを念頭に入れると、QL 子孫細胞が移動する際の足場である基底膜が、HCH-1のプロテアーゼ活性によりプロセッシングされている可能性や、QL 子孫細胞の分化または QL 子孫細胞の移動に影響を与える細胞の分化に HCH-1 が機能している可能性が考えられる。

*hch-1* 変異株の Hch 表現型と Mig 表現型の関係については、*hch-1* 遺伝子は孵化だけに機能しているものであり、孵化異常の効果が細胞移動の異常の原因であるとの考えもある。確かに、孵化異常の二次的な効果だけで QL 子孫細胞の移動方向に異常が起こり、強制的に孵化させた *hch-1* 変異株では Mig 表現型の浸透度が低下するという結果を得た。しかし、ほとんどの *hch-1* 変異株の Hch 表現型はほぼ同じ表現度を示すのに対して、各 *hch-1* 変異株の Mig 表現型の浸透度には大きな差異が見られ、Hch 表現型と Mig 表現型とで表現型の強さの対応がつかないことや、Hch 表現型に関しては劣性変異である *hch-1(e1907)* 変異が、Mig 表現型に関しては優性変異であることなどを明らかにし、*hch-1* 変異株では孵化異常の効果のみで細胞移動の異常が起こるのではないことが明らかになった。以上より、細胞移動における *hch-1* 遺伝子の機能には、孵化を経由して細胞移動に働く機能と、孵化を経由しないで直接細胞移動に働く機能があることが解明された。

#### 論文審査の結果の要旨

申請論文「線虫 *C. elegans* の *hch-1* 遺伝子の解析」において、申請者はモデル生物である線虫 *C. elegans* の *hch-1* 変異株が持つ2つの異常、孵化の異常 (Hch 表現型) と Q 神経芽細胞の子孫細胞の移動の異常 (Mig 表現型) について詳しく観察、解析をおこない、変異の原因遺伝子である *hch-1* 遺伝子を単離し、遺伝子構造とこの遺伝子にコードされたタンパク質分子 HCH-1 の構造と機能について解析し、さらにその遺伝子の発現時期と部位について解析した。本研究は、モデル生物・線虫 *C. elegans* を用いた孵化と細胞移動に関する分子生物学研究の分野への意義深い貢献の一つと位置づけることが出来る。

申請者は、各 *hch-1* 変異株の Hch 表現型と Mig 表現型を詳しく調べている。*ut110* 変異株以外の各 *hch-1* 変異株がほぼ同じ強さの Hch 表現型を示すのに対して、Mig 表現型に関しては各 *hch-1* 変異株ごとに大きく浸透度が異なることを示し、幾つかの *hch-1* 変異株では QR 神経芽細胞の子孫細胞の移動にも異常があることを発見し、*e1907* 変異が Mig 表現型に関しては優性変異であることを見いだした。さらに申請者は、*hch-1* 遺伝子の単離をおこなった。トランスポゾン・タギング法により *hch-1* 遺伝子付近の DNA 断片を単離し、この DNA 断片を含むクローンを *hch-1* 変異株に導入して形質転換体を作製した。この形質転換体の孵化と細胞移動は正常であることから、単離したクローンに *hch-1* 遺伝子が含まれていることを確認した。全長と思われる cDNA を単離して遺伝子構造を調べ、*hch-1* 遺伝子産物の HCH-1 が *tolloid* / *BMP-1* ファミリーに属する Zn プロテアーゼであることを明らかにした。各 *hch-1* 変異の変異部位を決定して、プロテアーゼドメインや C 末端付近のシステインに富んだ領域が、HCH-1 の機能にとって重要であることを示した。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法や *hch-1*-GFP 融合遺伝子の使用などによる発現解析で、*hch-1* 遺伝子は胚発生中頃の時期に背側と側面の上皮細胞で発現しており、Q 神経芽細胞の子孫細胞が移動する時期には発現していないことが示された。この結果から、Q

神経芽細胞の子孫細胞の移動には、HCH-1の胚での機能、または胚で発現したHCH-1の孵化後の機能が必要であると結論した。孵化に関しては、機能を有するHCH-1を産生しないと考えられるhch-1(rh134)変異株から調整したhatching fluidには、卵殻をin vitroで分解する孵化酵素の活性が欠如していることを示し、またhch-1と同等の機能を持つHCH-1 A-FLAGが過剰に発現していると思われる株から調整したhatching fluidでは、その卵殻消化活性が野生株のhatching fluidよりも高いことを明らかにした。この結果からHCH-1は、卵殻を消化する孵化酵素であるか、または活性のある孵化酵素の産生に機能する制限因子であると予想した。

以上のように、申請者の研究は、モデル生物・線虫*C. elegans*の分子生物的研究として高い水準を有しており、優れた研究であると評価できる。従って、提出された論文は、博士論文としてふさわしい内容を持っていると判断された。