

氏 名 武 内 昌 哉

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第329号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Analysis of genes that affect defecation rhythm,  
fluoride ion sensitivity and growth rate of  
*Caenorhabditis elegans*.

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 中 辻 憲 夫

教 授 廣 海 健

教 授 小 原 雄 治

助 教 授 林 茂 生

山元 大輔（（株）三菱化学生命科学研究所  
）

## 論文内容の要旨

線虫の脱糞行動は、体壁筋、脱糞筋の収縮 (pBoc, aBoc, Exp) を伴い、餌のあるところでは約 4 5 秒で繰り返し行われる。餌の無いところでは脱糞行動は観察されないが、再び餌のあるところに戻ると以前の周期と同じ位相で再開される。接触刺激を与えると周期の位相はリセットされ約 4 0 秒後から脱糞行動が繰り返される。飼育温度を変化させてもこの周期は保たれる。これらのことから、生体リズムの存在が考えられている。

フッ素イオン耐性として単離された *flr-1*, *flr-3*, *flr-4* 変異株 (class 1 *flr* 変異株) は成長が遅く子の数が少ないという異常があり、最近、脱糞周期が短く脱糞行動にともなう筋収縮が弱いという異常が発見された。弱いフッ素イオン耐性を指標として単離された *flr-2*, *flr-5* 変異株 (class 2 *flr* 変異株) は、class 1 *flr* 変異株が示す成長が遅く子の数が少ないという表現型を抑圧するという遺伝学的相互作用がある事がわかっている。

この論文には *flr* 遺伝子群に関して、大きく 3 つの報告が含まれる。1 つは、class 1 *flr* 変異株の表現型に関する解析である。すなわち (1) class 1 *flr* 変異株がこれまで知られていなかった生殖腺の形態に異常があるという発見、(2) class 1 *flr* 変異株が示す脱糞行動に関する異常は class 2 *flr* 変異によって抑圧されないという事、(3) フッ素イオンが脱糞周期を長くする効果をもち、この効果は class 1 *flr* 変異株では見られないこと、神経伝達物質セロトニンが脱糞周期を短くする効果をもつこと、接触刺激受容神経細胞が機能していないような突然変異株では脱糞周期が短くなることなど、脱糞周期に影響を及ぼしているものが何であるのかについて調べた。残る 2 つは、class 1 *flr* 変異である *flr-4* と *flr-1* の遺伝子クローニングと分子遺伝学的解析である。

今回ポジショナルクローニングにより単離した *flr-4* 遺伝子は、ストレス応答に関わる SOK1 と弱い相同性を示す S/T 型のプロテインキナーゼをコードしている。*flr-4* 変異 6 アレルについて突然変異部位を同定したところ、*ut7* 変異株は C 端側の疎水性領域にアミノ酸置換を持ち、低塩濃度条件下では脱糞行動の異常が一部回復する。*ut3* はキナーゼ領域でスプライスジャンクションの変異をもち機能的な遺伝子産物は作られないと思われる。*sa201*, *n2259* 変異株は成長速度に関して温度感受性でありいずれもキナーゼ領域にミスセンス変異が起きていた。*flr-4* 遺伝子の全長を含み 3' 末に GFP 遺伝子を融合した *flr-4::GFP* 融合遺伝子を作製したところ、この融合遺伝子は *flr-4* 変異株の表現型回復活性を持ち、胚発生の形態形成期から成体に至るまで腸細胞で発現がみられた。一齢幼虫期以降で一对の AUA 神経細胞でも発現が見られた。コンフォーカル顕微鏡による観察から、融合蛋白質は腸細胞膜近傍に局在することがわかった。*flr-4::GFP* 融合遺伝子を *flr-3* 変異株に導入し局在などに変化が見られるか調べたところ、発現には変化が見られなかったが、この *flr-4* 遺伝子の過剰発現により、*flr-3* 変異株の表現型が回復することがわかった。このことから、*flr-3* は *flr-4* の活性化などに関与していると考えられた。

*flr-1* 遺伝子については、所属する研究室で進行していたクローニングを引き継ぎ、マイクロインジェクションによって *flr-1* 変異株の表現型を回復するゲノム 8.5 kb の領域を同定した。この領域には、16 エキソンからなる 1984 bp の mRNA がコードされ、

638アミノ酸のORFには、機械受容や浸透圧調節などに関わるDEG/ENaC族のイオンチャンネルがコードされている。*flr-1*変異5アレルについて突然変異部位を同定したところ、DEG/ENaC族のイオンチャンネルで保存されているアミノ酸に置換が起きていることが分かった。*flr-1*遺伝子の全長を含み3'末にGFP遺伝子を融合した*flr-1::GFP*融合遺伝子を作製したところ、この融合遺伝子は*flr-1*変異株の表現型回復活性を持ち、腸細胞で発現がみられた。発現は胚発生の形態形成期から始まり、成体での発現も維持された。*flr-4::GFP*融合遺伝子の場合と違って、腸以外での発現は見られなかった。

*flr-1*, *flr-3*, *flr-4*変異株は互いに似た表現型を示し、遺伝学的相互作用における位置関係や、*flr-4*過剰発現による*flr-3*変異株の表現型の抑圧などから、*flr-1*, *flr-3*, *flr-4*は同じ遺伝学的経路で機能していると思われる。*flr-4*と*flr-1*の共通の発現部位が腸細胞であることから、*flr-1*, *flr-3*, *flr-4*は腸細胞で機能し、脱糞のリズム制御機構、フッ素イオン感受性の機構、*flr-2*, *flr-5*遺伝子群の活性に依存する成長速度に関する機構の3つのシグナル伝達系に関与していると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

武内昌哉君の博士論文は土壤自活性線虫 (*C. elegans*) の脱糞周期リズムなどに影響を及ぼす複数の突然変異体について、その行動特性などの表現形質を解析したのちに、変異系統の遺伝学的解析を行うとともに、原因遺伝子を同定して遺伝子機能解析を行ったものである。

これらの突然変異系統は当初フッ素イオン耐性系統として分離されたもので、今回武内君が主として解析したクラス1に属する *flr-1*, *flr-3*, *flr-4* と、クラス2に属する *flr-2*, *flr-5* が武内君の所属する研究室で研究されてきた。武内君は最初にこれら突然変異系統が示す表現形質について、行動パターンの他に成長速度や生殖巣の形態異常などについて調べ、その中でも脱糞周期リズムの異常について詳細な解析を行った。そしてこれらの表現形質について、突然変異系統間の遺伝学的関係を明かにした。

次に *flr-4* 遺伝子についてポジショナルクローニングによって遺伝子を同定してそれが新規なプロテインキナーゼであることを明かにした。この *flr-4* 遺伝子と GFP 遺伝子との融合遺伝子を導入することによるレスキュー実験によって原因遺伝子であることを確認するとともに、GFP 蛍光の局在から *flr-4* 遺伝子の主要な発現部位が腸細胞であること、他の数種類の細胞でも発現が見られることを明かにした。また *flr-1* 遺伝子のクローニングを完成させてレスキュー実験によって *flr-1* の発現部位は腸細胞のみであることを明かにした。

動物行動に関わる機構解明は現在始まったばかりであり、今後の発展が期待される分野である。解析の対象とするものが極めて複雑な現象であり、多数の遺伝子群と細胞群の機能関わっている。武内君はこのような困難な分野に敢えて挑戦し、線虫の行動の中でも特徴的な脱糞周期リズムに焦点を当てて、線虫の実験系の有利さを生かした遺伝学的解析を行った。さらにふたつの突然変異遺伝子のクローニングに成功してその機能解析を行ったものである。先駆的で開拓期の分野であることと、動物行動現象の複雑さに加えて分野がまだ開拓期であることに起因して、武内君の行った遺伝子機能の解析にはさらに研究を進めるべき点が多く残されている。しかしながら、このような魅力的ではあるが困難な問題に取り組んで、線虫という実験系の特色を駆使しながら、遺伝学的解析と遺伝子機能解明に成果を挙げたことから、武内君の論文は博士号授与に十分値する内容をもつものと審査員全員一致で判断した。