

合成dauer構成性表現型を指標とした
*C.elegans*の神経系変異の分離と解析

総合研究大学院大学
生命科学研究科遺伝学専攻
鈴木教郎

目次

第Ⅰ部 序論	1
1 神経機能解析のモデル生物としての線虫 <i>C. elegans</i>	1
2 古典遺伝学と逆向き遺伝学	1
3 <i>C.elegans</i> の感覚の受容・信号伝達・情報処理に関する既知の変異	3
4 dauer 幼虫形成制御とフェロモンの受容・信号伝達・情報処理系	4
5 既知の合成 dauer 構成性変異 (<i>sdf-c</i> 変異)	7
6 合成表現型の基盤	10
7 dauer 形成制御経路の並列部分と合成 dauer 構成性変異の関係	11
8 本研究の目的	11
第Ⅱ部 実験方法	12
9 <i>C.elegans</i> の飼育	12
9.1 <i>C.elegans</i> の飼育方法	12
9.2 餌の大腸菌	12
9.3 線虫の冷凍保存	12
10 バッファー	13
10.1 1M リン酸バッファー (pH6.0)	13
10.2 M9 バッファー	13
10.3 S バッファー	13
10.4 凍結保存液	13
11 プレート	13
11.1 NGM プレート	13
11.2 化学走性測定プレート	14

11.3 実験に使った線虫株	14
12 <i>sdf-c</i> 変異体の分離	15
12.1 変異体分離に用いた線虫株	15
12.2 変異の導入	15
12.3 スクリーニング	15
13 dauer 幼虫形成の割合 (<i>Sdf-c</i> 表現型の浸透度)	16
14 蛍光色素の浸透	16
15 変異体のマッピング	17
15.1 STS マッピング	17
15.2 相補性試験	18
15.2.1 耐性幼虫形成を指標とした相補性試験	19
15.2.2 蛍光色素の浸透を指標とした相補性試験	19
15.2.3 脱糞行動を指標とした相補性試験	19
15.3 三因子交雑	20
16 化学受容に関係する行動の異常	21
16.1 高浸透圧忌避	21
16.2 揮発性物質に対する走化性	22
 第 III 部 実験結果	 23
17 <i>Sdf-c</i> 変異体の分離	23
18 変異体のマッピング	23
18.1 STS マーカーを使ったマッピング	23
18.2 dauer 幼虫形成の割合	28
18.3 蛍光色素の取り込み (<i>Dyf</i> 表現型)	31
18.4 dauer 幼虫形成を指標とした相補性試験と既知の変異との 三因子交雑によるマッピング	31
18.4.1 連鎖群 I	34
18.4.2 連鎖群 II	37
18.4.3 連鎖群 III	37
18.4.4 連鎖群 IV	38

18.4.5 連鎖群 V	40
18.4.6 連鎖群 X	42
18.5 脱糞行動を指標とした相補性試験	42
19 高浸透圧忌避	43
20 揮発性物質に対する化学走性	45
 第 IV 部 討論	 51
21 <i>unc-31</i> 変異と組み合わせると <i>Sdf-c</i> 表現型を示す変異には多数の 遺伝子が関与する	51
22 得られらた変異には、ASI 神経の異常が多いと予想される	52
23 <i>sdf-1(ut161)</i> は、AWC 感覚神経で感じる揮発性物質に対して負の 走化性を示す	53
24 本研究で分離された変異体は、神経機能の解析に有用と思われる	54
 第 V 部 謝辞	 56

概要

The nematode *Caenorhabditis elegans* (abbreviated as *C.elegans* below) has several advantages as a model organism for studying the nervous system. First, its nervous system is very simple. *C.elegans* has 959 cells, of which 302 are neurons that constitute the nervous system. Second, the complete structure of the nervous system, the identity of each neuron and the connections by chemical synapses and gap junctions, has been determined by electron microscopic analysis of the serial sections of worm body. Third, genetic methods are available. Mutants can be isolated easily after mutagenesis of self-fertilizing hermaphrodites. Furthermore, males are produced spontaneously among the progeny of hermaphrodites at a low frequency by X chromosome non-disjunction. Males can mate with hermaphrodites and therefore can be used for mapping mutations. Fourth, it is possible to kill specific neurons by laser ablation under a light microscope. This technique is useful in determining the role of each type of neuron.

The functions of the nervous system can be studied genetically by isolating and characterizing mutants that are abnormal in various behaviors. Mutants of *C.elegans* that are abnormal in locomotion, egg-laying, pharyngeal pumping, chemotaxis, defecation *etc.* have been isolated and characterized in the past over 20 years. However, in *C.elegans*, functions of the nervous system can be studied also by a specific aspect of post-embryonic development, i. e., regulation of dauer larva formation.

The dauer larva is a special third-stage larva produced under harsh conditions. The life cycle of *C.elegans* takes three and a half days at 20 °C. After hatching, *C.elegans* usually passes through 4 larval stages called L1, L2, L3 and L4, before becoming an adult worm. However, if there are little food and much pheromone (due to overcrowding) around the worm, it becomes a dauer larva instead of an L3 larva. Temperature is another factor that modifies the decision between dauer and L3. At a high temperature more dauer larvae tend to be formed than at a low temperature. The dauer larva has a characteristic dark, thin body. It does not feed, because its mouth is closed. It can survive up to three months, and when it encounters food, it molts and goes into the L4 larval stage.

The two main environmental cues for the dauer/L3 decision, namely food and pheromone, seem to be sensed by the nervous system. *C.elegans* has a pair of sensory organs called amphids in the head. It is known that if we kill

two types of sensory neurons (ADF and ASI) in the amphids of wild type worms, they become dauer larvae at a certain probability even under non-dauer-forming conditions. The probability increases to nearly 100%, if we also kill another type of amphid sensory neurons (ASG).

Many mutants that are abnormal in the dauer larva formation have been isolated and named *daf* mutants. They are classified into two groups. One is called dauer-constitutive (*daf-c*) mutants, which form dauer larvae even under non-dauer-forming conditions, i. e., much food and low pheromone concentration. The other is called dauer-defective (*daf-d*) mutants, which do not form dauer larvae even under dauer-forming conditions, i. e., little food and high pheromone concentration. Some of the *daf-d* mutants have defects in the structure of amphids. According to the electron microscopic structure and the absence of uptake of some fluorescent dyes by amphids and phasmids, those defects seem to prevent the outer cues from getting access to the amphid chemosensory neurons. This is another piece of evidence showing that dauer formation is controlled by the nervous system.

Although about 30 *daf* genes and about 20 other genes are known to affect dauer formation, the number is still much less than the expected number of genes that affect neurons. Part of the reasons may be related to the results of the cell-killing experiments mentioned above. Since at least three types of sensory neurons act in parallel in the regulation of dauer formation, the number of neural mutations that cause defects in all of them may be limited. This implies that there may be many neural mutations that show the synthetic Daf phenotype, namely, exhibit abnormality in dauer formation only if two or more of them are combined to form double- or multiple-mutants. Two examples of the synthetic dauer-constitutive (Sdf-c) phenotype were known when I started this study: *unc-31;unc-3* and *unc-31;aex-3*. In these cases the Sdf-c phenotype was found somewhat accidentally, while each of the mutations was isolated by abnormalities in locomotion (in the cases of *unc-3* and *unc-31*) or in defecation (in the case of *aex-3*).

I thought it would be possible to identify many new neural genes by isolating new *sdf-c* mutants on the *unc-31* background. I planned to use *unc-31* as the first mutation mainly for two reasons. First, both of the two known Sdf-c pairs had *unc-31* as one of the mutations. Hence, it was expected that I would obtain *unc-3* and *aex-3* among the new mutations, if I used *unc-31* as the first

mutation. This would serve as a positive control showing that the procedure of the mutant isolation was correct. Second, it was known that the *unc-31* mutant forms dauer larvae under non-dauer-forming conditions, if only the ASI sensory neurons are killed, while killing of both ASI and ADF was necessary to make wild-type worms dauer-constitutive. This means that many, if not all, of the *sdf-c* mutants isolated on the *unc-31* background have defects in the ASI neuron. Mutants that have defects in a specific type of neurons will be useful in the future analysis of the nervous system by genetic means.

Thus, I isolated mutants that exhibit the Sdf-c phenotype on *unc-31* background. For this purpose I used *unc-31(e169);utEx[unc-31(+)]*, an *unc-31* strain in which a clone of the wild-type *unc-31* gene exists as an extrachromosomal array. Since the extrachromosomal array is lost at a low frequency, this strain segregates both Unc+ and Unc worms. The former have the parental genotype, *unc-31(e169);utEx[unc-31(+)]*, and the latter, *unc-31(e169)*. I mutagenized *unc-31(e169);Ex[unc-31(+)]* with ethyl methanesulfonate and screened 5539 of F1 Unc+ progeny for those which segregate Unc dauer larvae but not Unc+ dauer larvae under non-dauer-forming conditions. Those which segregate both Unc and Unc+ dauer larvae were discarded, because they were *daf-c* rather than *sdf-c* mutants. In this way I obtained 44 mutants that showed the Sdf-c phenotype on the *unc-31* background.

I mapped 42 of the 44 mutants by using STS (Sequence-Tagged Site) markers and known mutations, while two of them had too low penetrance to be mapped. Eight of the mapped mutations were found to be alleles of four known genes by complementation tests (one allele of *tax-2*, two alleles of *che-11*, two alleles of *osm-6* and three alleles of *aex-3*). The rest 34 mutations, which were most probably alleles of new genes, were classified into 18 complementation groups.

In the meantime, it was found in our laboratory that known *daf-d* mutations that are abnormal in dye-filling (Dyf phenotype) into amphids and phasmids have the Sdf-c phenotype if they were combined with the *unc-31(e169)* mutation. Therefore, I tested the 44 new mutations for the Dyf phenotype. Besides the each two alleles of *che-11* and *osm-6*, two mutations in two new genes (*sdf-3(ut160)* and *sdf-13(ut182)*) had the Dyf phenotype. In these mutants, environmental cues cannot reach the ASI neurons due to the structural abnormalities of amphids. In other mutants they probably can reach ASI but cannot

be sensed by ASI, or the transmission of the signal may be blocked in ASI or downstream neurons.

Since the new mutations may cause abnormalities in neurons other than ASI, I checked some behaviors to detect such abnormalities. Some of the mutants were abnormal in osmotic avoidance (defect in ASH), while others were abnormal in chemotaxis to benzaldehyde (defect in AWC) or to diacetyl (defect in AWA) Especially interesting was *sdf-1(ut161)*, which avoids benzaldehyde at a concentration that attracts wild-type worms.

In conclusion, this study shows that by isolating synthetic dauer-constitutive mutations, we can identify many new neural genes that probably control reception, signal transmission, and signal processing of the environmental cues (pheromone and food) for dauer formation. The mutants obtained in this study will be useful for analyzing functions of ASI neurons in the future.

第I部

序論

1 神経機能解析のモデル生物としての 線虫 *C. elegans*

環境から来る種々の感覚情報を神経系で受容し、その信号を伝達するとともに情報処理する過程には、いまだに不明なことが多い。ここで働く遺伝子を発見し、感覚情報の受容・信号伝達・情報処理の機構を解明するには、関連する変異体を分離し解析するのが、有効な方法である。線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下、*C. elegans* と略す) は、そのような遺伝解析のために選ばれた実験生物である (Brenner 1974; Wood 1988; Chalfie and White 1988)。

C. elegans は、体長約 1.2mm の自活性線虫であり、世代時間は約 3 日と短い。自家受精をして子孫を増やす雌雄同体と、精子のみを作る雄がいる。この雄と雌雄同体を掛け合わせるにより、遺伝学的な解析ができる (Brenner 1974)。線虫の成虫 (雌雄同体) は、わずか 959 個の体細胞からなり、そのすべての細胞系譜が決定されている (Sulston et al. 1983)。体細胞のうちの約 3 分の 1 (302 個) が神経細胞であり、電子顕微鏡の連続切片から形態的な全神経回路が解明されている (White et al. 1986)。このように線虫は、神経系の機能を遺伝学的手法により明らかにするのに非常に適した実験生物であると考えられる。

2 古典遺伝学と逆向き遺伝学

本研究では、古典遺伝学の方法論を用いた。この方法が、今でも重要であることは教科書にも述べられているが (Watson et al. 1988)、ここで改めてその特徴を論じたい。変異体を分離して遺伝子と生体機能の関連を解明するには、主に 2 つの方法がある。1 つは、塩基配列を見て特定の遺伝子を選び、その遺伝子に変異を導入した後に変異体の表現型を調べる逆遺伝学の方法 (*C. elegans* の逆遺伝学の方法は、Plasterk (1995) を参照) である。もう 1 つは、ランダムに変異を誘起して生じた変異体の中から特定の表現型のものを選択する古典遺伝学の方法 (*C. elegans* の古典遺

伝学の方法は、Brenner (1974) を参照) である。

逆遺伝学の方法は、*C.elegans* のゲノムプロジェクト (Sulston et al. 1992) の進展により、ますます有用になってきている。この方法の長所は、特定の遺伝子ファミリーに興味がある場合、効率よくその遺伝子ファミリーの変異体を得られることである。短所は、遺伝子破壊を行っても表現型の見つからない遺伝子が、かなり多いことである。また、塩基配列を見て研究する遺伝子を選ぶので、全く新しい塩基配列の遺伝子が興味のある遺伝子かどうかの判断をするのは実際上不可能であり、ある程度わかっている遺伝子の研究しかできない。また、非常によくわかった遺伝子以外は、機能増大・優性の機能異常・部分的な機能低下などの微妙な表現型を持つ変異を作ることも困難である。

これに対し、古典遺伝学の方法では、表現型により変異を選択するので、特定の機能に関わる全く未知あるいは予想外の遺伝子を発見することができる。また、特定の表現型を持つ遺伝子を網羅することが可能であり、ほぼ網羅できたかどうか判断できる。一方この方法は、マッピングや既知の遺伝子の変異との相補性試験などに時間と手間がかかることが多く、既知の遺伝子の変異体が必要ない場合でも通常は分離後に除かなければならない。最後に、長所とも短所ともなる特徴として、しばしば当初の目的とは異なる変異が分離されることがある。これは、例えば選択に用いた表現型が予期せぬ機能と関係する等の理由で起こり、無駄な手間を増やすこともあるが、新発見につながることもある。

この2つとは異なる第3の方法として、まずランダムに多数の遺伝子の発現部位を調べ、特定の部位で発現する遺伝子を見つけてから、その変異体を作成して表現型を調べるという方法もある。*Drosophila* では、エンハンサートラップ法 (O'Kane and Gehring 1987) が効率よく働くのでこの方法が使えるが、*C.elegans* の場合、これに対応するプロモータートラップ法 (Hope 1991) はかなり効率が悪いので、実際的ではない。

本研究では、神経機能に関わる新しい遺伝子の発見を目指したので、古典遺伝学の方法を用いた。また、時間と手間がかかるという短所を補うために、表現型を調べる時に効率のよい方法を選んだ (第12節参照)。

3 *C.elegans* の感覚の受容・信号伝達・情報処理に関する既知の変異

C. elegans では、感覚の受容・信号伝達・情報処理の変異として、水溶性物質に対する走化性 (*che, tax*) (Ward 1973; Dusenbery 1976; Lewis and Hodgkin 1977)、揮発性物質に対する走化性 (*odr*) (Bargmann et al. 1993)、高浸透圧忌避 (*osm*) (Culotti and Russell 1978)、温度走性 (*ttx*) (Hedgecock and Russell 1975; Mori and Ohshima 1995)、dauer 幼虫形成 (*daf*) (Riddle et al. 1981)、胴体の触覚 (*mec*) (Chalfie and Au 1989)、頭部への触覚 (*not*) (Hart et al. 1995)、感覚器官への色素浸透 (*dyf*) (Starich et al. 1995) 等が異常になる変異 (ただし、() 内は各変異により発見された遺伝子 の名前) が分離され研究されている (総説 Bargmann (1993))。これらの変異の中で *daf* 変異と *dyf* 変異以外は行動表現型により選択されたもので、その測定にかなり手間がかかる。そのため、*mec* 変異を除き、関連する遺伝子が大部分、枚挙されているとは言い難い。また、これらの変異体は体の運動には大きな異常がないので、運動神経も含めた神経一般の変異というよりは、感覚神経または介在神経の一部が特異的に異常になる変異と考えられている。逆にいうと、運動異常 (*unc*) (Brenner 1974) として分離された変異の中に、感覚の受容・信号伝達・情報処理にかかわる神経と運動にかかわる神経の両方が異常なものが存在する可能性がある。

これらの変異をもつ遺伝子の一部はクローニングされ、感覚の受容・信号伝達・情報処理に必要な遺伝子産物をコードすることが知られている。特に、*mec* 遺伝子については、(1) イオンチャネル (*mec-4, mec-6, mec-10*)、(2) それを細胞外から支える特殊なコラーゲン (*mec-5*) や新規の巨大蛋白質 (*mec-9*; Kunitz domain と EGF repeat を複数持つ)、(3) チャネルを細胞内から支える微小管 (*mec-7, mec-12*) やストマチン様蛋白質 (*mec-2*) などから成る超分子構造が触覚を引き起こす実体であることがわかっている (Hamill and McBride Jr 1996)。また、間接的に触覚を制御する遺伝子として、上記の遺伝子の転写活性化因子を生産する *mec-3* 遺伝子 (Way and Chalfie 1988) と選択的 RNA スプライシングの制御を行なう *mec-8* 遺伝子 (Lundquist et al. 1996) が知られている。他の表現型の遺伝子については、ジアセチルに対する嗅覚受容体 (*odr-10*) (Sengupta et al. 1996)、その転写活性化因子 (*odr-7*) (Sengupta et al. 1994)、信号伝達にかかわる環状ヌクレオチド作動性イオンチャネル (*tax-2, tax-4*) (Coburn and Bargmann 1996; Komatsu et al. 1996)、化学受容の感覚子の形成に働くキネシン (*osm-*

3)(Tabish et al. 1995)、介在神経へのシナプス伝達に働くグルタミン酸受容体 (*glr-1=not-3*) (Maricq et al. 1995; Hart et al. 1995) 等が知られているが、断片的な知識を与えるにとどまっている。

以上のように、種々の化学受容とその信号伝達・情報処理の分子機構については、ようやく断片的な情報が得られ始めたところである。ところが変異体の選択に手間がかかるため、まだ変異体が分離されていない遺伝子が多数存在することが、この分野の1つの弱点になっている。筆者の所属する研究室では、dauer 幼虫形成制御系(フェロモンの受容・信号伝達・情報処理系)を使って、新しい変異体を簡単に分離する方法を開発している。本研究はその開発の一環であるとともに、実際にその方法を用いて新しい神経系変異を分離・解析したものである。以下にその方法を背景から説明する。

4 dauer 幼虫形成制御とフェロモンの受容・信号伝達・情報処理系

C.elegans は、通常は孵化後に4回の脱皮を行ない、一齢(L1)、二齢(L2)、三齢(L3)、四齢(L4)の幼虫を経て成虫になる。しかし、孵化後に個体密度が高いと、線虫の出すフェロモンの濃度が高い環境になる。虫はこれを感じて、L2d と呼ばれる特殊な二齢幼虫を経て、三齢幼虫のかわりに dauer 幼虫と呼ばれる特殊な形態の幼虫となって成長を停止する(Riddle 1988; Cassada and Russell 1975; Golden and Riddle 1982; Golden and Riddle 1984)。このフェロモン (Golden and Riddle 1982) は全てのステージの *C.elegans* が出しており、同属の *C.briggsae* は *C.elegans* に効くフェロモンを出す。より離れた *Panagrellus redivivus*, *Turbatrix aceti*, *Rhabditis oxycerca* は *C.elegans* に効くフェロモンを出さない。*C.elegans* が出すフェロモンの量はわずかで、その性質から水酸化された短鎖の脂肪酸または類似の物質の混合物と考えられるが、未だに精製されていない。dauer 幼虫になるか三齢幼虫になるかは、フェロモンの濃度の他に、餌の量や温度の影響も受け、同じフェロモン濃度でも、餌が少なく温度が高いほど dauer 幼虫を形成しやすい (Golden and Riddle 1984)。なお dauer 幼虫は、フェロモンの濃度が低く餌が豊富になると、脱皮して四齢幼虫を経て成虫になる。

dauer 幼虫形成制御に異常を生じる変異(単一の変異で異常になるもの)

は、現在までにほぼ飽和するまで分離され、27 の *daf* 遺伝子と合計 18 の *che*, *osm* および *dyf* 遺伝子 (*che-2*, *che-3*, *che-11*, *che-13*, *osm-1*, *osm-3*, *osm-5*, *osm-6*, *dyf-1*~*dyf-9*, *dyf-11*; 各遺伝子の最初の変異が走化性異常、高浸透圧忌避異常、あるいは色素浸透異常で発見されたため *che*, *osm*, *dyf* という名がついている)にあることが知られている (Riddle 1988; Malone and Thomas 1994; Albert et al. 1981; Perkins et al. 1986; Starich et al. 1995)。これらの変異は表現型により、dauer 構成性 (Daf-c) 変異と dauer 欠損性 (Daf-d) 変異という二種類のグループに分類されている。前者は、フェロモンが少なく餌が豊富にある条件下 (dauer 幼虫非形成条件下) でも dauer 幼虫を形成し、後者は、フェロモンの濃度が高く餌が少ない条件下 (dauer 幼虫形成条件下) でも dauer 幼虫を形成しないという表現型をもつ。この二種類の変異のエピスタシスにより dauer 幼虫形成制御の「経路」が図 1 のように決定されている (Riddle et al. 1981; Thomas et al. 1993; Gottlieb and Ruvkun 1994)。

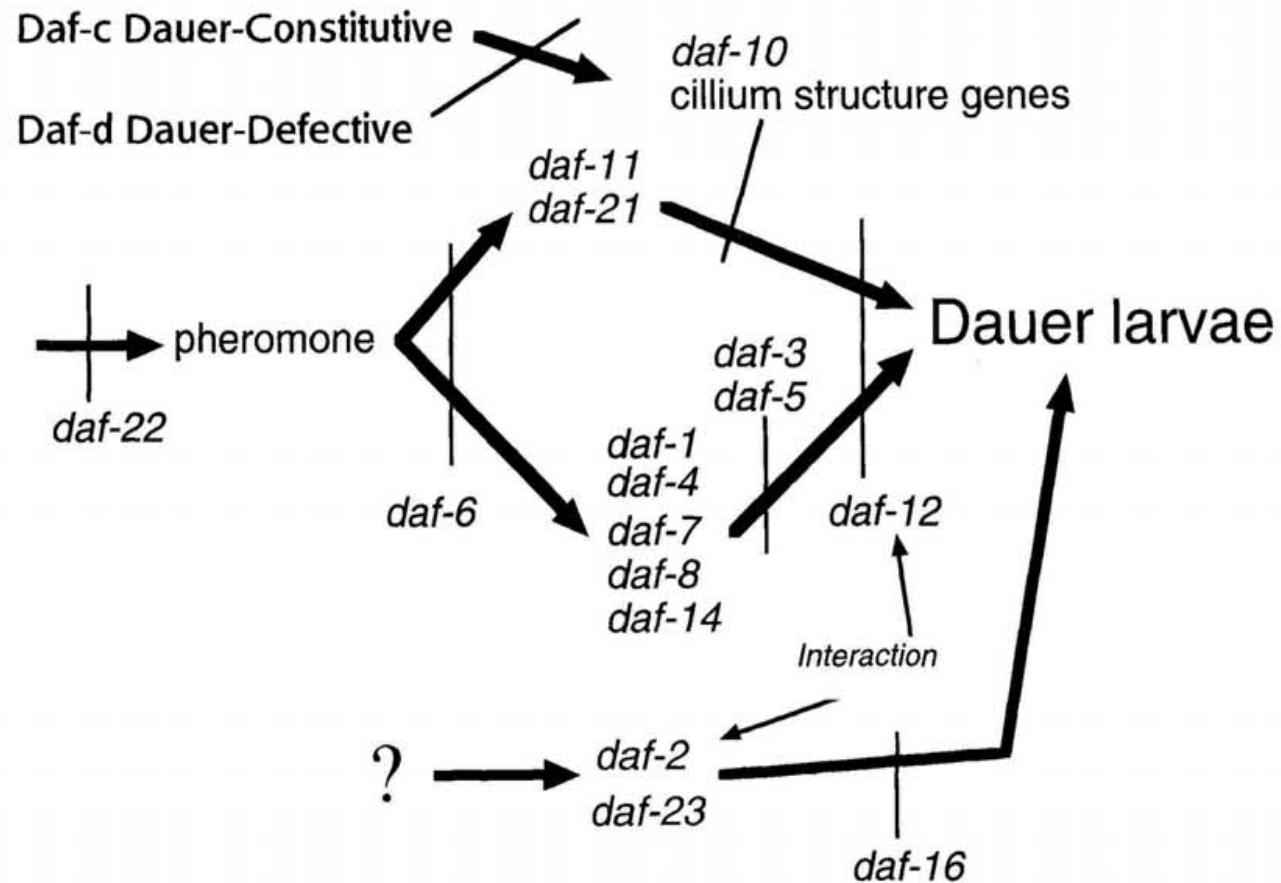


図 1: dauer 幼虫形成制御の経路

daf-c 変異と *daf-d* 変異のエピスタシスより決定された dauer 幼虫形成制御の回路。
 矢印の線上に乗っている遺伝子は、その遺伝子に変異が起きると Daf-c 表現型を示す。
 矢印線を横切る線の遺伝子は、変異が起きると Daf-d 表現型を示す。

線虫の化学物質と温度を感じる感覚器官には、頭部の amphid と inner labial、そして尾部の phasmid の 3 種類ある。この内頭部の amphid と呼ばれる感覚器官は、12 種類の感覚神経と 6 種類の介在神経を含む (White et al. 1986)。dauer 幼虫形成制御の少なくとも上流の部分は、以下の証拠よりこの amphid で行なわれていると考えられる。

1. Daf-d 変異のうち、*daf-6*, *daf-10* および上述の合計 18 遺伝子の *che*, *osm*, *dyf* の変異は、amphid 感覚神経先端の感覚子 (外界からの信号を受容する部分) に形態異常がある (Perkins et al. 1986; Starich et al. 1995)。Daf-d 表現型を示すのは、このためにフェロモンの受容ができないからと考えると説明がつく。
2. 野性型の *C.elegans* で一齢幼虫時に amphid 感覚神経のうち ADF と ASI の 2 種類の神経を破壊すると、dauer 幼虫非形成条件でも一部の虫が dauer 幼虫になり、さらに ASG を破壊すると dauer 幼虫になる割合が増加する (Bargmann and Horvitz 1991b)。したがって、これらの神経はデフォルトで dauer 幼虫形成阻害信号を出しており、フェロモンはこの信号を阻害すると考えられる。また、ASJ を破壊すると dauer 幼虫から四齢幼虫に回復できなくなる。
3. Daf-c 変異のうち *daf-11* と *daf-21* は、amphid が関与する揮発性および非揮発性物質に対する走化性に異常がある (Vowels and Thomas 1994)。
4. *daf-11* の Daf-c 表現型は、ASJ 神経を破壊すると消失する (Schackwitz et al. 1996)。したがって、ASJ は、dauer 幼虫形成促進信号を出すと考えられる。
5. *daf-7*-GFP 融合遺伝子は、ASI 神経でのみ発現する (Schackwitz et al. 1996; Ren et al. 1996)。

なお、*daf-1*, *daf-4*, *daf-7*, *daf-8*, *daf-14* という Daf-c 変異と、それを抑圧する *daf-3*, *daf-5* という Daf-d 変異は、TGF- β 関連の遺伝子であることが判明しつつある (Georgi et al. 1990; Estevez et al. 1993)。この中で *daf-7* は、TGF- β 様の蛋白質を生産する (Ren et al. 1996)。

5 既知の合成 dauer 構成性変異 (*sdf-c* 変異)

感覚の受容・信号伝達・情報処理に関する変異の中で、dauer 幼虫形成制御の変異は、神経機能の異常を見ているにもかかわらず、行動ではなく形態で表現型を調べるという点でユニークである。dauer 幼虫は細く色が

濃く頭が尖っているという形態で簡単に識別でき、必要ならば 1% SDS に耐性という性質を使って確認することができる (Cassada and Russell 1975) ので、変異体の分離は容易である。しかし、この研究を始めた 1993 年 4 月の時点でも、単一の変異により dauer 幼虫形成制御に異常を示す遺伝子は、既に大部分が知られていると思われた。

ここで、1つの疑問があった。もし、ADF と ASI という 2 種類の感覚神経の両方を破壊してはじめて dauer 構成性になるのなら、その中の 1 種類の神経だけに欠陥を生じる変異は、通常の *daf* 変異 (*Daf-c*) には含まれていないはずである。むしろ、二重変異にしてはじめて dauer 構成性表現型を示す変異 (*Sdf-c* 変異) のペアを探せば、その中に各々の神経を異常にする変異が見つかるはずである。文献を探すと、そのような合成 dauer 構成性変異の例が 2 つ見つかった (Bargmann et al. 1990; Avery 1993)。*unc-3*, *unc-31*, *aex-3* という 3 つの遺伝子の変異は、それぞれ単独では dauer 幼虫形成制御に大きな異常はないが、*unc-31;unc-3* と *unc-31; aex-3* の二重変異体はそれぞれ強い dauer 構成性表現型を示す。

unc-31 変異体は運動異常により分離されたもの (Brenner 1974) で、運動がのろい他に、餌のないところでも咽頭の摂食運動を行なう、機械的刺激に反応しない、産卵が異常で子宮に受精卵がたまる、dauer 幼虫が四齢幼虫になれない等の多面的な異常を持つ (Hodgkin et al. 1988)。野生型の *C.elegans* では ADF, ASI, ASG の 3 種類の感覚神経を破壊してはじめてほとんどの虫が dauer 幼虫になるのに対し、*unc-31* 変異体は ASI を破壊しただけでほとんどの虫が dauer 幼虫になる (Avery et al. 1993)。*unc-31* 変異体はシナプス伝達に異常があり (Miller et al. 1996)、*unc-31* 遺伝子産物は分泌にはたらくカルシウム依存性活性化蛋白質 (p145/CAPS) とホモロジーがある (D. Livingstone (1991), PhD thesis, Darwin College, University of Cambridge, Cambridge, UK; Miller et al. (1996) に引用)。

unc-3 変異体も運動異常により分離されたもの (Brenner 1974) で、体の後半部がコイル状に丸まる傾向がある (Hodgkin et al. 1988)。胴体の運動にかかわる腹部神経索の運動神経突起の配列に異常があり (Chalfie and White 1988)、介在神経との位置関係がおかしいので正しい組合せのシナプスができない。線虫では、全ての細胞系譜が決定されている (Sulston et al. 1983)。受精卵は、最初の細胞分裂により AB 細胞と P1 細胞に分裂する。次に AB 細胞は、ABa 細胞と ABp 細胞に分裂する。遺伝モザイク解析により野生型表現型には、この ABp 細胞の子孫である ABp 系譜の細胞において *unc-3(+)* である必要であることが明らかになっている。(Herman

1984; Herman 1987)。ABp 系譜からは多数の神経が生じるので、上述の運動と神経回路構造の異常は、下皮や筋肉の異常ではなく神経細胞自体の異常で生じると考えられる。

aex-3 変異体は、脱糞行動の異常により発見された (Thomas 1990)。野生型の *C.elegans* は約 40 秒に 1 回、(1) 体の後半を縮める、(2) 体の後半をもとに戻すと同時に、体の前半を縮める、(3) 糞を放出する、(4) 体の前半をもとに戻すという動作を 2~3 秒かけて行なう。*aex-3* 変異体はこの内、体の前半を縮める動作と糞を放出する動作を行なわない。野生型 *C.elegans* で、体の前半を縮める動作は AVL 神経、糞を放出する動作は AVL 神経と DVB 神経の両方を破壊すると失われる (McIntire et al. 1993)。*aex-3* 遺伝子もシナプス伝達に働く (Miller et al. 1996)。

なぜ *unc-31;unc-3* と *unc-31;aex-3* という二重変異体が dauer 構成性表現型を示すのか、既知のデータからは、具体的な神経細胞を特定して説明することは出来ない。しかし、*unc-31*, *unc-3*, *aex-3* の各変異単独での表現型は、運動神経またはそれを制御する神経のシナプス伝達 (*unc-31*, *aex-3*) またはシナプス形成 (*unc-3*) に異常があるためと考えられる。おそらく、同様のシナプス伝達・シナプス形成の異常が、フェロモンの受容・信号伝達・情報処理に関わる神経回路にも生じるのだろう。この信号伝達には複数の経路があり、単独の変異ではその一部しかブロックできず、二重変異にしてはじめて全部がブロックでき、dauer 構成性表現型が現れると考えたと説明がつく。

本研究と並行して、筆者の指導教官である桂は、既存の変異で合成 dauer 構成性表現型を示すものを探した (桂、私信)。その結果、50 以上の遺伝子の変異がこのような表現型を持ち、その中で 21 の遺伝子の変異は、dauer 幼虫非形成条件でも 50%以上の虫が dauer 幼虫になるという、強い表現型を示すことがわかった。特に興味あるのは、amphid 構造に異常のある dauer 欠損性変異 (*daf-6*, *daf-10* および 18 遺伝子の *che*, *osm*, *dyf* の変異) のうち、テストした例は全て、*unc-31* 変異と *unc-3* 変異のどちらと二重変異にしたときにも dauer 構成性表現型を示したことである。また、*tax-2* 変異 (Coburn and Bargmann 1996) と *tax-4* 変異 (Komatsu et al. 1996) は ASI 神経に機能欠損を生じるが、いずれも *unc-31* 変異と二重変異にすると、高浸透度の dauer 構成性表現型を示すことがわかった。これは、*unc-31* 変異が ASI 神経を破壊しただけで dauer を生じる (Avery et al. 1993) ことと一致する。

6 合成表現型の基盤

今までの議論では、野生型 *C.elegans* と *unc-31* 変異体の amphid 感覚神経破壊実験の結果から、*unc-31* 変異との組合せで合成 dauer 構成性表現型が生じるのは、フェロモンの受容・信号伝達に複数の経路があるためと考えてきた。確かに、ASI 神経の機能欠損変異 *tax-2*, *tax-4* は *unc-31* 変異 (AFD と ASG を経由する経路が欠損しているらしい) と二重変異にすると dauer 構成性表現型を示す。しかし、*unc-31* 変異と組み合わせると dauer 構成性表現型を示す変異の中には、その他の原因によるものもあるかもしれない。それで、以下に合成表現型の基盤を一般的に議論しておきたい (Guarente 1993; Thomas 1993)。

一般に、2つの機能完全欠損変異 (null 変異、amorph) 間で合成表現型が生じるのは、遺伝子機能に重複 (redundancy) があるためと考えられている。この中には、例えば、(1) 2つの遺伝子が同じ (またはオーバーラップした、以下も同じ) 機能を持つ蛋白質を作る場合、(2) 同じ機能を持つ細胞が2つあり、その生成/分化/機能に別の遺伝子が必要な場合、(3) 同じ役割をする経路やカスケードが並列になっている場合等が、考えられる。null 変異以外の変異まで含めると、もう少し広く、機能協力がかわる場合も考えられる。例えば、機能が部分的に低下した変異については、(1) 2つの蛋白質が複合体を作って働き、その活性が、片方の変異だけでは変異表現型が現れる限界の上にあるが、もう1つ変異があると限界以下に下がる場合、(2) 2つの遺伝子産物が同じ経路やカスケード内で直列に働き、その効率と変異の関係について (1) と同様のことが起こる場合、等が考えられる。

このような機能重複や機能的協力は生物では普通に見られるので、合成表現型は数多くあるはずだが、実際に解析されたものはそれほど多くない。ゲノムプロジェクトで塩基配列として全遺伝子を網羅すると、次には全遺伝子の機能を決定することが課題となる。この時に、機能重複は大きな困難の原因となる (Oliver 1996)。合成表現型の研究はその困難を部分的に解決するものであり、今後、ますます検討されるべき問題となると考えられる。

7 dauer 形成制御経路の並列部分と合成 dauer 構成性変異の関係

上に述べた合成表現型は、注目する表現型が単独の変異では現れず、二重変異にしてはじめて現れるものだった。これに準ずる場合として、単独の変異でも浸透度の低い表現型が現れるが、二重変異にすると浸透度が目立って高くなるという場合がある。dauer 幼虫形成制御でも、このような例が見つかっている (Thomas et al. 1993)。dauer 構成性変異の一部に、グループ I 遺伝子群 (*daf-11*, *daf-21*) とグループ II 遺伝子群 (*daf-1*, *daf-4*, *daf-7*, *daf-8*, *daf-14*) の変異がある。この同グループ内の二重変異を構築しても、dauer 幼虫になる割合は基本的に増えないが、異なるグループ間の二重変異では、dauer 幼虫の割合が大きく増える。この結果と Daf-d 変異による抑圧の結果をもとに、dauer 幼虫形成制御経路の一部を、グループ I の経路とグループ II の経路の 2 つに分け、並列にしたモデルが提出されている (図 1, Thomas et al. 1993)。グループ I 遺伝子群は ASJ 神経で働き、グループ II 遺伝子群は ADF, ASI, ASG で働くと報告されている (Schackwitz et al. 1996)。したがって、第 5 節で述べた *tax-2;unc-31* や *tax-4;unc-31* の合成 dauer 構成性表現型は、グループ II の経路の中がさらに並列になっていることで説明できる。ただし、*unc-31* 変異と組み合わせると dauer 構成性表現型を示す変異の中には、これと異なる機構で合成 dauer 構成性になるものが、あるかもしれない。

8 本研究の目的

以上のような背景をふまえて、本研究では、単独では dauer 合成性表現型を示さないが、*unc-31* 変異と組み合わせると dauer 構成性表現型を示す変異を、分離・解析する。これにより、フェロモンの受容・信号伝達・情報処理、特に ASI 神経細胞の働きに関する新しい遺伝子が多数、発見できると考えられる。特定の機能に関して、今まで見過ごされていた多数の遺伝子群の存在を示し、新しい研究分野を開くことが本研究の目的である。

第II部

実験方法

9 *C.elegans* の飼育

線虫の飼育方法と、NGMプレート、M9バッファーそしてSバッファーの組成は、Brenner (1974) にしたがった。

9.1 *C.elegans* の飼育方法

C.elegans は、餌となる大腸菌を生やした NGM プレート上で飼育した。飼育温度は、20℃または 24℃で飼育した。線虫が飢餓状態にならないように、20℃で飼育したものは 4 日、24℃で飼育したものは 3 日毎に成虫になりたてくらいの個体を数匹ずつ新しいプレートに移した。

9.2 餌の大腸菌

餌の大腸菌には、ウラシル要求性の大腸菌 OP50 株を使用した。餌にウラシル要求性の株を用いたのは、線虫を飼育している間に大腸菌が増えてしまい過ぎることを防ぐためである。餌が増えてしまい過ぎると、線虫が大腸菌の中に潜ってしまい、線虫を観察しづらくなってしまう。

9.3 線虫の冷凍保存

線虫を NGM プレート上ですべての餌を食べつくすまで培養した。この時に一齢幼虫が多く含まれないプレートは保存には適さないで捨てた。線虫を M9 バッファーまたは S バッファーで洗い集めた。一度軽く遠心して上清を 750 μ l と線虫のペレットを残した。ここに 750 μ l の冷凍保存液を加えて良く混ぜた後、250 μ l ずつ 6 本の冷凍保存容器に分注した。液体窒素中で保存するものには、液体窒素中で浮かんでこないように、冷凍保存液と M9 バッファーまたは S バッファーを 600 μ l ずつ冷凍保存容器にさらに加えた。溶液全体を良く混ぜて均一にした後、発砲スチロールに埋めて-80℃までゆっくり冷やした。24 時間以上たった後に 1 本取り

出し冷凍した線虫が回復することを確認した。回復することを確認したら、2本を-80℃に残し、残りの3本は液体窒素中に移した。

10 バッファー

10.1 1M リン酸バッファー (pH6.0)

54.15g の KH_2PO_4 と 17.8g の K_2HPO_4 を混ぜ、 H_2O を全量が 500ml になるまで加えた。これをオートクレーブして使用した。

10.2 M9 バッファー

7.56g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ と 1.5g の KH_2PO_4 と 2.5g の NaCl を混ぜ、 H_2O を全体が 500ml になるまで加えた。これをオートクレーブした後、別にオートクレーブしておいた 1M MgCl_2 を 500 μl 加えた。

10.3 S バッファー

2.92g の NaCl に 25ml の 1M リン酸バッファー (pH6.0) を加えた。さらに H_2O を全体が 500ml になるまで加えてオートクレーブして使った。

10.4 凍結保存液

0.58g の NaCl を少量の H_2O に溶解しておき、5ml の 1M リン酸バッファー (pH6.0) と 30ml のグリセロールを加え、 H_2O を全体が 500ml になるまで加えてオートクレーブして使った。

11 プレート

11.1 NGMプレート

NGMプレートは、次のように調製した。9g の NaCl と 7.5g の Bactopeptone(Difco) そして 51g の Agar(和光純薬) を混合し、3l の H_2O を加えてオートクレーブした。培地の温度が 60℃ 以下になったところで、別に滅菌

しておいた 3ml の 1M CaCl_2 、3ml の 1M MgSO_4 、75ml の 1M リン酸バッファー (pH6.0) を培地に加えた。さらにエタノールに溶解したコレステロール (5mg/ml) と DMSO に溶解した 2% ナイスタチンをそれぞれ 1.5ml ずつ加えた。培地全体を良く混合して、6cm のプラスチックプレートに分注した。一日または二日間室温に放置した後に、LB 培地で培養した大腸菌 OP50 株を塗布した。このプレートに塗布した大腸菌を 30℃ で 24 時間培養した後、実験に用いた。

掛け合わせに使うプレートは、大腸菌を塗布するのでなく培養した大腸菌を一滴プレートの中心に垂らし、上と同様に培養した後に掛け合わせに使用した。大腸菌が増えて、大腸菌の層が厚くなり過ぎると掛け合わせの効率が下がる。そこですぐに使用しないプレートは、大腸菌が増え過ぎないように 4℃ で保存して、できるだけ早めに使用するよう注意した。

11.2 化学走性測定プレート

高浸透圧忌避と化学走性の測定に使ったプレートの組成は、Bargmann et al. (1993) の組成にしたがった。

寒天 8g に 500ml の H_2O を加えてオートクレーブした。温度が下がったところで、別に滅菌しておいた 1M リン酸バッファー (pH6.0) を 2.5ml と 1M CaCl_2 と 1M MgCl_2 をそれぞれ 0.5ml ずつ加えた。培地を良く攪拌して、6cm (高浸透圧忌避) と 9cm (化学走性) のプレートに分注した。

11.3 実験に使った線虫株

野生株として Bristol N2 株を使った。STS (Sequence-Tagged Site) マーカーを使ったマッピングには、Bergerac RW7000 株を使った。

変異体の分離、相補性試験、そしてマッピングには、次の変異体を使った。変異体は、*Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota, U.S.A. より手に入れた。

I: *dpy-24(s71)unc-75(e950), tax-2(p671), che-13(e1805), dpy-5(e61)*

II: *rol-6(e187)unc-4(e120)*

III: *dpy-17(e164)unc-32(e189), dpy-17(e164)*

IV: *unc-31(e169)*

V: *rol-3(e754)lon-3(e2175), unc-46(e177)dpy-11(e224), osm-6(p811), che-11(e1810), dpy-11(e224)*

X: *aex-3(sa5), daf-6(e1377), dyf-8(m539), osm-1(p811)*

12 *sdf-c* 変異体の分離

12.1 変異体分離に用いた線虫株

unc-31(e169) 変異体に、野生型 *unc-31* 遺伝子を持つコスミド・クローン C14G10 を当研究室でマイクロインジェクションし、*unc-31(e169);Ex[unc-31(+)]* を得た。この線虫株では、導入した *unc-31* 遺伝子のクローンは多数、縦列につながって染色体外に存在する。そのため、ある確率で失われ、子孫には、野生型表現型を持つ *unc-31(e169);Ex[unc-31(+)]* の虫と運動異常表現型を持つ *unc-31(e169)* の虫が存在する。この線虫株をもらって、*sdf-c* 変異体の分離に用いた。

12.2 変異の導入

新しい変異の導入には、Brenner (1974) による EMS を使った方法にしたがった。

unc-31(e169);Ex[unc-31(+)] を NGM プレート上で飼育した。四齢幼虫または成虫になりたての個体が多くいるプレートを選び、M9 バッファーで洗って線虫を集めた。集めた線虫は、M9 バッファーで3回洗った後2ml の M9 バッファーに懸濁させた。ここに EMS(メタンスルホン酸エチル) を最終濃度 50mM となるように加えて、20℃で4時間放置した。線虫を M9 バッファーで洗い、NGM プレートに移した。この中から *Unc-31* 表現型を示さない四齢幼虫または成虫を選び、NGM プレートで1匹ずつ25℃で飼育した。

12.3 スクリーニング

一匹ずつ飼育した線虫の子ども (F1) から *Unc-31* 表現型を示さない個体で、さらに卵を持つものを1枚のプレートから5匹ずつ選び出した。選び出した個体は、1匹ずつ別々の NGM プレートに入れ、25℃で飼育した。

ほとんどの F2 個体が成虫となる 3 日目に dauer 幼虫がいるか調べた。dauer 幼虫がいたら、その dauer 幼虫が Unc-31 表現性を示すか調べた。すべての dauer 幼虫が Unc-31 表現型を示したプレートから Unc-31 表現型を示さない成虫を数匹、一匹ずつ分けて植え継いだ。植え継ぎを繰り返すうちに、子どもに dauer 幼虫がいないようなプレートがなくなったら、変異がホモ接合体になったと判断した。合計 5539 匹の F1 をスクリーニングして、Sdf-c 表現型を示すものが 44 株得られた。

ホモ接合体になった変異体は、凍結保存した。

13 dauer 幼虫形成の割合 (Sdf-c 表現型の浸透度)

変異体を飼育しているプレートの中から、Unc-31 表現型を示す個体を選び、子孫に Unc+表現型を示す個体のいないことを確認した。これを 25℃と 20℃で少なくとも二世代飼育し、それぞれの dauer 幼虫の現れる割合を測定した。

14 蛍光色素の浸透

野生株の線虫を蛍光色素 DiO を含む溶液につけると、頭部にある amphid と尾部にある phamid と呼ばれる感覚器官中の外界に露出している一群の感覚神経 (ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB, PHA そして PHB) に蛍光色素が染み込む (Hedgecock et al. 1985; Perkins et al. 1986; Starich et al. 1995)。しかし、*osm-1* や *che-11* のように、これらの感覚神経の構造に異常が生じ、感覚神経の先端が外界に露出しなくなるような変異では、蛍光色素が浸み込まなくなる (Perkins et al. 1986)。そこで、蛍光色素が浸み込むか調べることで、感覚神経の構造に異常が生じているかを、大まかに調べるができる。

NGM プレート上で増やした線虫を M9 バッファーで洗って集めた。軽く遠心して線虫を沈澱させた後、上清を 100 μ l 残して余分な上清を除いた。ジメチルホルムアミドに溶解した 2mg/ml の DiO を 0.5 μ l 加えて良く混ぜた。これを 25℃に 2 時間置いて蛍光色素を取り込ませた。1ml の M9 バッファーで 3 回洗って、蛍光顕微鏡下で蛍光色素の取り込みを観察した。

15 変異体のマッピング

分離した変異体は、Sequence-Tagged Sites(STS) マーカーの示す多型性を使って、連鎖群と連鎖群上での大まかな位置をまず決定した。近くに Sdf-c 表現型を持つ既存の変異がある場合は、相補性試験を行ない、それと同じ遺伝子の変異であるか調べた。

15.1 STS マッピング

C.elegans には、一般に野生株として使用される Bristol N2 株の他に、独立に自然界から採取された Bergerac 株が存在する。N2 株のゲノム上には、Tc1 と呼ばれるトランスポゾンが約 30 コピー存在するのに対して、Bergerac 株には約 500 コピー存在する。Bergerac 株の 1 つ RW7000 には存在するが Bristol 株には存在しない Tc1 のいくつかについて、挿入部位付近の塩基配列が決定されている。Williams et al. (1992) により、この Tc1 の有無による多型を一匹の線虫毎に Polymerase Chain Reaction(PCR) により検出し、遺伝子のマッピングを行なう方法が確立されている。

第 12 節で得られた変異体のマッピングは、この Williams et al. (1992) の方法を一部改変して行なった。Bergerac 株 RW7000 の雄には、雌雄同体と交尾する活性が無い。そこで RW7000 の雌雄同体に N2 株の雄を交配して、RW7000 と N2 のヘテロ接合体の雄を作成した。このヘテロ接合体の雄は交尾する活性があるので、第 12 節で得られた変異体の雌雄同体に交配した。この交配で F2 に現れる dauer 幼虫から、以下のように STS マーカーを検出してマッピングした。

dauer 幼虫一匹を 3 μ l の 10mM Tris-HCl(pH8.0) + 0.05% ゼラチン + 0.5% Tween20 + 100 μ g/ml Proteinase K に入れ -80 $^{\circ}$ C で 15 分以上凍結させた。次に 1 時間 60 $^{\circ}$ C に加温して、線虫を分解させた。Proteinase K を失活させるために 15 分間 95 $^{\circ}$ C に加熱した。PCR のための試薬を入れる時間を短くするために、あらかじめ PCR buffer, MgCl₂, dNTP, primer, Taq polymerase を混ぜた PCR mix を調製しておいた。PCR mix にはサンプル 1 本あたり次のものを混合した。10 \times PCR buffer 1 μ l, 25mM MgCl₂ 0.6 μ l, 10mM dGTP 0.2 μ l, 10mM dATP 0.2 μ l, 10mM dTTP 0.2 μ l, 10mM dCTP 0.2 μ l, 100pmol/ μ l primer 0.1 μ l(一種類あたり), 5U/ μ l Taq polymerase そしてサンプル一本あたりの容量が 7 μ l になるまで H₂O を加えた。80 $^{\circ}$ C まで温度を下げてこの PCR mix を 7 μ l 加えて PCR を行なった。PCR は、94

℃ 30 秒—58℃ 1 分—72℃ 1 分 (72℃ の反応時間は、1 サイクル毎に 1 秒ずつ長くする) というサイクルを 40 回という条件で行なった。このサンプルを非変性条件下の 6% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、STS マーカーに由来する DNA 断片の存在を確認した。

この STS マーカーは、優性である。このため STS マーカーを持つ染色体と持たない染色体のヘテロ接合体の子孫の 75% は、STS マーカをホモまたはヘテロに持つ。よって変異と STS マーカーが連鎖していない場合は、75% の確率でマーカーが検出される。逆に連鎖しているならばマーカーの検出される割合は、マーカーと変異の距離が近くなるにしたがって低下する。変異とマーカーが連鎖しているかは、連鎖していないと仮定した時に期待されるマーカーの検出される割合である 75% より有意に低下しているか統計学的検定により明らかにした。この時の検定方法には、 χ^2 適合度検定を使用した。

15.2 相補性試験

得られた変異と既知の変異、または得られた変異どうしが同じ遺伝子の変異であるかどうかを、合成 dauer 幼虫形成異常を指標として相補性試験により調べた。ただし、得られた変異体のうち、蛍光色素の取り込みに異常がある変異体と、脱糞行動の異常を示す変異体については、それぞれの表現型を指標として相補性試験を行なった。

既知の変異のうち、*unc-31(e169)* 変異と二重変異にしたときに dauer 幼虫非形成条件で 20% 以上の個体が dauer 幼虫になるような変異は、以下の 19 遺伝子の変異である (桂、私信): *che-2*, *che-3*, *che-10*, *che-11*, *che-13*, *che-14*, *osm-1*, *osm-5*, *osm-6*, *daf-6*, *unc-3*, *unc-41*, *unc-64*, *unc-101*, *aex-3*, *tax-2*, *tax-4*, *cat-1*, *flr-5*。このうち、*che-2* から *daf-6* までの変異は、単独で感覚器官への色素浸透異常を示すので、そのような変異が近傍にあった時のみ、色素浸透異常を指標として相補性試験を行なった。*unc-3* から *unc-101* までの変異は、単独で運動異常表現型を示すが、得られた変異のうちにそのような変異はなかった。*aex-3* は脱糞行動異常を示すので、そのような変異が近傍にあった時のみ、脱糞行動異常を指標として相補性試験を行なった。

15.2.1 耐性幼虫形成を指標とした相補性試験

C.elegans では、交配実験で得られる F1 の雌雄同体の中に、交配で生じた子の他に、自家受精により生じた子が混ざっている可能性がある。自家受精では雌雄同体しか生じないので、F1 の雄は全て交配により生じたものであるが、dauer 幼虫では雄と雌雄同体の区別が非常に困難である。そこで、相補性試験に使う変異体のうち、雌雄同体の方に劣性の遺伝マーカーとして *dpy* 変異 (体が太く短くなる変異) をあらかじめ入れておき、交配により生じた子 (*Dpy*+表現型を示す) と自家受精により生じた子 (*Dpy* 表現型を示す) を区別した。すなわち、相補性試験で、もし 2 つの変異が同じ遺伝子内での変異であれば、この掛け合わせにより得られる F1 に non-*Dpy* の dauer 幼虫がいるはずである。

15.2.2 蛍光色素の浸透を指標とした相補性試験

蛍光色素の浸透異常を示す個体については、この表現型を指標として相補性試験を行なった。上述のように、相補性試験に使う変異体のうち雌雄同体の方にあらかじめ *dpy* 変異を入れておいた。雄に使う方の変異体は、雌雄同体に野生株の雄を掛け合わせてヘテロ接合体 (変異が X 染色体にある場合はヘミ接合体) の雄を作り、これを *dpy* 変異を持つ雌雄同体に掛け合わせた。この掛け合わせにより得られる F1 の non-*Dpy* の雌雄同体を数匹とって、蛍光色素の浸透を調べた。常染色体上の変異を調べる時には、ヘテロ接合体の雄を使うので、2 つの変異が同じ遺伝子にある場合は、F1 の non-*Dpy* の雌雄同体に蛍光色素浸透の正常な個体と異常な個体が 1:1 の割合でいることになる。異なる遺伝子にある場合は、F1 の non-*Dpy* の雌雄同体は、全て蛍光色素浸透が正常な個体になる。

15.2.3 脱糞行動を指標とした相補性試験

連鎖群 X の左側にマップされる既知の変異の *aex-3* が *unc-31* との二重変異により *Sdf-c* 表現型を示すことが知られている (Bargmann et al. 1990; Avery 1993)。

野生株の線虫の脱糞行動は、次の三段階からなっている (Thomas 1990)。

1. 体の後ろ側が縮む (pBoc)。
2. 後ろ側が伸びると同時に、体の前側が縮む (aBoc)。

3. 体の前側が伸びて、糞をする (Exp)。

aex-3 変異体ではこの行動が pBoc のみになり、aBoc と Exp が無くなってしまう (Thomas 1990)。

そこで、得られた変異体のうち、連鎖群 X の左側にマップされる株について脱糞行動に異常が見られないか調べた。この測定では、餌が常に豊富にある条件で線虫を育て、線虫が四齢幼虫または成虫になったところで、pBoc に対する Exp の割合を測定した。野生株との間に統計学的に有意な差 ($p < 0.05$) があるかは、Mann-Whitney 検定により検定した。

この測定で脱糞行動に異常を示した変異体について、この脱糞行動の異常を指標として相補性試験を行なった。相補性試験では、自家受精による F1 と交配による F1 を区別するために雌雄同体にあらかじめ *dpy* 変異を入れておき、交配後に Dpy+ 表現型を示す F1 について、pBoc に対する Exp の割合を測定した。相補したかどうかは、野生株との間に統計学的に有意な差 ($p < 0.05$) があるか Mann-Whitney 検定により検定し、有意な差が認められない時に相補したとした。

15.3 三因子交雑

STS マーカーにより連鎖群上での大まかな位置の決まったものについては、既知の変異との三因子交雑 (Sulston and Hodgkin 1988) により、さらに詳しい位置を決定した。

マッピングしようとする *sdf-c* 変異と同じ染色体上にあり、互いに近接した位置にある 2 つの既知の変異の二重変異体 (仮に *ab* とする) を選んだ。これに野生株の雄を掛けて、ヘテロ接合体の雄を作成した。この雄を *sdf-c* 変異体に掛け、得られた F1 を 1 匹ずつ別のプレートに入れた。育った F2 の表現型を見て F1 が *sdf-c/ab;unc-31/+* という遺伝子型を持つプレートを選んだ。F2 の中から組換え型表現型 A または B を示す個体を探し、1 匹ずつ新しいプレートに入れた。子ども (F3) に Unc-31 表現型を示す個体がないものは捨てた。F3 に Unc-31 表現型を示す個体がいる場合は、Unc の dauer 幼虫がいるかないかを調べ、それぞれのプレートの数を数えてマッピングした。

16 化学受容に関係する行動の異常

amphid では種々の化学物質の受容が行われるので、種々の化学物質に対する行動を調べた。行動の測定のためには運動異常である *unc-31* 変異が邪魔になるので、*unc-31* 変異との二重変異体となっている株から *unc-31* 変異を除き、第 12.2 節で導入された新しい変異のみを持つ、プレート上を活発に動ける株を作成した。

行動の異常の有無は、Mann-Whitney 検定により野生株との間に有意な差 ($p < 0.05$) が認められるかどうかで判断した。

16.1 高浸透圧忌避

野生株の *C.elegans* は、浸透圧の高いところを避ける性質がある。この性質は、amphid の ASH 感覚神経を破壊すると失われる (Bargmann et al. 1990)。また、amphid の構造異常などにより浸透圧が高いことを感じる事ができない変異が存在する (Culotti and Russell 1978)。そこで高浸透圧忌避に異常があるかを Culotti and Russell (1978) の方法により調べた。

第 12.2 節で導入された変異のみを持つ株の個体を 3 匹選び、20 °C の NGM プレート上でその子どものほとんどが四齢幼虫または成虫になるまで飼育した。この時、餌のあまり残っていなかったプレートは捨てた。線虫を M9 バッファーまたは S バッファーで洗って集め、軽く遠心して餌の大腸菌を含む上清を捨てた。この線虫のペレットを 1ml の M9 バッファーまたは S バッファーで 2 回、さらに 1ml の H₂O で 2 回洗った。この線虫は、洗い終わった後 5 分以内に高浸透圧忌避の測定に使った。

6cm の化学走性測定プレートの底に半径 1cm の円を書いた。この円に沿って 60 μ l の 5M NaCl または H₂O (コントロール実験の場合) をプレート上に置いた。この溶液が全てプレートに吸収されたところで、円の中心に洗った線虫約 100 匹をピペットで吸って乗せた。線虫をプレートに乗せた後、余分な H₂O をキムワイプで吸い取り、線虫がすぐに這い回れるようにした。このプレートを室温に 30 分間置いた後に、円の内側にいる線虫と、外側にいる線虫の数を測定した。

16.2 揮発性物質に対する走化性

揮発性の物質に対する走化性の測定は、Bargmann et al. (1993) の方法により行なった。

高浸透圧忌避の測定と同じように線虫を 20℃ で増やし、M9 バッファーまたは S バッファーと H₂O で洗った線虫を用意した。この線虫も、洗い終わった後 5 分以内に走化性の測定に使った。

9cm の化学走性測定プレートの縁から約 5mm のところにマークを付けた。この点と最も離れた反対の縁から約 5mm のところにも同様にマークをつけた。この二点の片方には 1M NaN₃ とエタノールで希釈した揮発性の誘引物質を 1μl ずつ、他方には 1M NaN₃ とコントロールのエタノールのみを 1μl ずつたらした。揮発性の有引物質には、1000 倍に希釈したジアセチルと 200 倍に希釈したベンズアルデヒドを使った。また、ベンズアルデヒドにたいする走化性の異常が見られた株については、10 倍に希釈したイソアミルアルコールと 2000 倍と 20000 倍に希釈したベンズアルデヒドについても同様に調べた。

このプレートの中心に、洗った線虫をピペットで吸って乗せ、余分な水分をキムワイプで吸い取った。このプレートを室温に置き、60 分後に誘引物質側の半分とコントロール側の半分にいる線虫の数を調べた。この時に、始めに線虫を置いたところから半径 1cm 以上動いていない線虫の数は、動かなかったとして、どちらの数にも入れないことにした。この測定から、次の式により Chemotaxis Index を求めた。

$$\text{Chemotaxis Index} = \frac{\text{誘引物質側にいた線虫の数} - \text{コントロール側にいた線虫の数}}{\text{プレート上の線虫の総数}}$$

第III部

実験結果

17 Sdf-c変異体の分離

unc-31(e169);Ex[unc-31(+)] を最終濃度 50mM の EMS(メタンスルホン酸エチル) で処理して、その F1 を 5539 匹調べたところ F2 に dauer 幼虫がいて、その dauer 幼虫全てがほとんど動かないという Unc-31 表現型を示すものが、44 株得られた。

unc-31(e169);Ex[unc-31(+)] では、染色体外に導入された野生型 *unc-31* 遺伝子 (*Ex[unc-31(+)]*) により、Unc-31 表現型は抑圧されている。しかし、この導入 DNA はある確率で失われるので、子孫には Unc-31 表現型を示すもの (*unc-31(e169)*) と示さないもの (*unc-31(e169);Ex[unc-31(+)]*) がいる。Unc-31 表現型を示さない dauer 幼虫がかなりの数いるものは、*unc-31* 変異が有っても無くても dauer 幼虫を生じる変異 (*daf-c* 変異) と考えられるので捨てた。また大部分の dauer 幼虫が、Unc-31 表現型を示しているも、非常に少数の dauer 幼虫が Unc-31 表現型を示さないものがある。これは、Unc-31 表現型をレスキューする断片がモザイクになっている可能性がある。そこで、Unc-31 表現型を示す dauer 幼虫の数に比べて Unc-31 表現型を示さない dauer 幼虫がごく小数のものは、*sdf-c* 変異体とした。

さらに *sdf-c* 変異であることを確認するために、STS マーカーにより遺伝子地図上の位置の明らかになった株について、*unc-31* 変異を除いた新しい変異のみにして、Daf-c 表現型を示さないことを確認した。

18 変異体のマッピング

18.1 STS マーカーを使ったマッピング

得られた *sdf-c* 変異体は、Williams et al. (1992) の Bristol 株と Bergerac 株の間でゲノム上に存在するトランスポゾン Tc1 の数が違うことによる多型性を使った STS(Sequence-Tagged Site) マッピング法によりマッピングを行なった。表1のように、分離された 44 株中の 42 株は、連鎖群 I に 4 株、連鎖群 II に 5 株、連鎖群 III に 3 株、連鎖群 IV に 5 株、連鎖群 V に 11 株そして連鎖群 X に 14 株マップされた。残りの 2 株 (*sdf(ut184)*, *sdf(188)*)

は、得られる dauer 幼虫が少なく、この STS マーカーを使った方法ではマッピングすることができなかった。

表 1: 本研究により得られた *unc-31* との組合せで Sdf-c 表
現型を示す変異体のマッピング

連鎖群	遺伝子名†	STS マーカーの検出された割合 (マーカーの検出されたサンプル数)						サンプル数
		hp4	maP1	mgP21	sP4	bP1	stP33	
I	<i>sdf-1(ut161)</i>	57%(16)‡	64%(18)	82%(23)	7.1%(2)‡	82%(23)	86%(24)	28
	<i>sdf-2(ut158)</i>	52%(14)‡	67%(18)	74%(20)	0%(0)‡	74%(20)	67%(18)	27
	<i>sdf-2(ut167)</i>	44%(11)‡	76%(19)	84%(21)	4.0%(1)‡	80%(20)	64%(16)	25
	<i>tax-2(ut173)</i>	33%(9)‡	74%(20)	82%(22)	0%(0)‡	82%(22)	63%(17)	27
II	<i>sdf-3(ut160)</i>	69%(18)	54%(14)‡	69%(18)	0%(0)‡	81%(21)	85%(22)	26
	<i>sdf(ut162)</i>	79%(19)	50%(12)‡	88%(21)	4.2%(1)‡	75%(18)	67%(16)	24
	<i>sdf(ut166)</i>	82%(23)	39%(11)‡	64%(18)	0%(0)‡	89%(25)	64%(18)	28
	<i>sdf(ut179)</i>	84%(21)	44%(11)‡	68%(17)	4.0%(1)‡	64%(16)	64%(16)	25
	<i>sdf(ut181)</i>	76%(19)	40%(10)‡	76%(19)	0%(0)‡	72%(18)	60%(15)	25
III	<i>sdf(ut180)</i>	75%(18)	79%(19)	17%(4)‡	0%(0)‡	71%(17)	83%(20)	24
	<i>sdf(ut185)</i>	93%(25)	63%(17)	22%(6)‡	0%(0)‡	78%(21)	63%(17)	27
	<i>sdf(ut192)</i>	68%(17)	76%(19)	16%(4)‡	0%(0)‡	72%(18)	68%(17)	25
IV	<i>sdf-4(ut172)</i>	69%(36)	67%(35)	83%(43)	1.9%(1)‡	69%(36)	75%(39)	52
	<i>sdf-5(ut175)</i>	85%(22)	77%(20)	89%(23)	3.8%(1)‡	65%(17)	69%(18)	26
	<i>sdf-6(ut178)</i>	85%(23)	59%(16)	59%(16)	0%(0)‡	59%(16)	59%(16)	27
	<i>sdf-7(ut186)</i>	85%(23)	82%(22)	59%(16)	3.7%(1)‡	67%(18)	67%(18)	27
次ページに続く								

前ページより続く

連鎖群	遺伝子名†	STS マーカーの検出された割合 (マーカーの検出されたサンプル数)						サンプル数
		hp4	maP1	mgP21	sP4	bP1	stP33	
IV	<i>sdf-8(ut193)</i>	92%(23)	68%(17)	72%(18)	8%(2)‡	72%(18)	76%(19)	25
V	<i>sdf-9(ut157)</i>	78%(21)	67%(18)	82%(22)	3.7%(1)‡	52%(14)‡	63%(17)	27
	<i>sdf-9(ut163)</i>	76%(19)	64%(16)	84%(21)	0%(0)‡	52%(13)‡	68%(17)	25
	<i>sdf-9(ut169)</i>	69%(18)	77%(20)	89%(23)	3.8%(1)‡	54%(9)‡	89%(23)	26
	<i>sdf-9(ut174)</i>	89%(25)	82%(23)	79%(22)	3.6%(1)‡	57%(16)‡	68%(19)	28
	<i>sdf-9(ut187)</i>	79%(23)	62%(18)	69%(20)	3.4%(1)‡	41%(12)‡	79%(23)	29
	<i>che-11(ut154)</i>	80%(20)	76%(19)	84%(21)	0%(0)‡	36%(9)‡	64%(16)	25
	<i>che-11(ut176)</i>	77%(20)	73%(19)	62%(16)	3.8%(1)‡	12%(3)‡	77%(20)	26
	<i>osm-6(ut183)</i>	92%(23)	56%(14)	76%(19)	4.0%(1)‡	7%(4)‡	68%(17)	25
	<i>osm-6(ut191)</i>	62%(16)	81%(21)	77%(20)	0%(0)‡	7.7%(2)‡	58%(15)	26
	<i>sdf-10(ut189)</i>	93%(26)	64%(18)	79%(22)	7.1%(2)‡	29%(8)‡	71%(20)	28
	<i>sdf(ut194)</i>	78%(21)	78%(21)	85%(23)	0%(0)‡	41%(11)‡	67%(18)	27
X	<i>sdf(ut156)</i>	84%(31)	62%(23)	87%(32)	0%(0)‡	76%(28)	49%(18)‡	37
	<i>sdf(ut165)</i>	74%(20)	82%(22)	67%(18)	3.7%(1)‡	100%(27)	33%(9)‡	27
	<i>aex-3(ut159)</i>	77%(20)	81%(21)	77%(20)	3.8%(1)‡	85%(22)	27%(7)‡	26
	<i>aex-3(ut171)</i>	72%(18)	68%(17)	64%(16)	0%(0)‡	80%(20)	44%(11)‡	25
	<i>aex-3(ut177)</i>	61%(20)	76%(25)	85%(28)	3.0%(1)‡	85%(28)	42%(14)‡	33
	<i>sdf(ut151)</i>	79%(26)	61%(20)	82%(27)	6.1%(2)‡	79%(26)	39%(13)‡	33

次ページに続く

前ページより続く

連鎖群	遺伝子名†	STS マーカーの検出された割合 (マーカーの検出されたサンプル数)						サンプル数
		hp4	maP1	mgP21	sP4	bP1	stP33	
X	<i>sdf(ut153)</i>	88%(21)	67%(16)	88%(21)	0%(0)‡	75%(18)	33%(8)‡	24
	<i>sdf(ut155)</i>	82%(23)	75%(21)	89%(25)	0%(0)‡	79%(22)	46%(13)‡	28
	<i>sdf(ut168)</i>	72%(18)	72%(18)	72%(18)	0%(0)‡	92%(23)	40%(10)‡	25
	<i>sdf(ut190)</i>	83%(29)	69%(24)	80%(28)	2.9%(1)‡	71%(25)	46%(16)‡	35
	<i>sdf(ut152)</i>	74%(20)	63%(17)	74%(20)	0%(0)‡	78%(21)	7.4%(2)‡	27
	<i>sdf(ut170)</i>	72%(33)	65%(30)	80%(37)	0%(0)‡	74%(34)	15%(7)‡	46
	<i>sdf-11(ut164)</i>	63%(17)	82%(22)	78%(21)	7.4%(2)‡	85%(23)	33%(9)‡	27
	<i>sdf-12(ut182)</i>	72%(18)	72%(18)	76%(19)	0%(0)‡	84%(21)	56%(14)‡	25

† 得られた変異と *unc-31* との二重変異体を使ってマッピングしたために、全て連鎖群 IV のマーカーである sP4 との連鎖を示す。

‡ χ^2 検定により、有意な差のあることを示す。

18.2 dauer 幼虫形成の割合

得られた *sdf-c* 変異体の中から、*unc-31* 変異をレスキューする断片 (*Ex[unc-31(+)]*) が落ち *Unc-31* 表現型を示す個体を選び、dauer 幼虫の現れる割合を 20℃と 25℃で調べた (表 2)。ほとんどの株はスクリーニングを行なった 25℃の方が、20℃で測定した時よりも dauer 幼虫の現れる割合が高かった。しかし、*sdf(ut168)*, *aex-3(ut171)* そして *osm-6(ut191)* のように 25℃よりも 20℃の方が dauer 幼虫の現れる割合の高い株があった。

また、*sdf(ut162)*, *sdf(ut166)*, *sdf-4(ut172)*, *sdf-5(ut175)*, *sdf-6(ut178)*, *sdf-9(ut157)*, *sdf-9(ut163)*, *sdf-9(ut174)*, *sdf-9(ut187)*, *sdf(ut151)*, *sdf(ut190)* そして *sdf-12(ut182)* のように 20℃では dauer 幼虫の現れる割合が 10%以下とほとんど現れないのに対して、25℃にすると dauer 幼虫の現れる割合が非常に高くなる温度感受性の株が多く得られた。特に *sdf-9* の変異は、5 株得られた内の *sdf-9(ut169)* を除く 4 株が、強い温度感受性変異であった。この *sdf-9(ut169)* も dauer 幼虫の現れる割合が、20℃では 32.3%であるものが 25℃にすると 83.5%に上昇するように温度感受性の傾向がある。

表 2: 本研究により得られた *unc-31* との組合せで Sdf-c 表現型を示す変異体

連鎖群	遺伝子名	dauer 幼虫の割合 ^a		備考 ^b
		20 °C	25 °C	
I	<i>sdf-1(ut161)</i>	29.1%(592)	80.0%(205)	
	<i>sdf-2(ut158)</i>	74.9%(446)	84.1%(320)	
	<i>sdf-2(ut167)</i>	22.3%(184)	48.1%(285)	
	<i>tax-2(ut173)</i>	100%(150)	100%(277)	
II	<i>sdf-3(ut160)</i>	18.0%(566)	83.9%(238)	Dyf
	<i>sdf(ut162)</i>	8.8%(240)	0.6%(169)	
	<i>sdf(ut166)</i>	4.3%(280)	100%(171)	
	<i>sdf(ut179)</i>	64.4%(219)	81.1%(143)	
	<i>sdf(ut181)</i>	25.8%(330)	37.1%(167)	
III	<i>sdf(ut180)</i>	90.5%(147)	100%(152)	
	<i>sdf(ut185)</i>	13.0%(353)	30.5%(266)	
	<i>sdf(ut192)</i>	47.5%(240)	n.d. ^c	
IV	<i>sdf-4(ut172)</i>	10.3%(329)	n.d. ^c	
	<i>sdf-5(ut175)</i>	0.7%(1264)	77.6%(147)	
	<i>sdf-6(ut178)</i>	0.4%(512)	35.5%(498)	
	<i>sdf-7(ut186)</i>	18.1%(281)	81.7%(224)	
	<i>sdf-8(ut193)</i>	18.4%(576)	40.0%(195)	
V	<i>sdf-9(ut157)</i>	8.5%(317)	85.6%(292)	
	<i>sdf-9(ut163)</i>	0.6%(536)	86.8%(273)	
	<i>sdf-9(ut169)</i>	32.3%(378)	83.5%(692)	
	<i>sdf-9(ut174)</i>	7.1%(672)	72.9%(339)	
	<i>sdf-9(ut187)</i>	8.7%(161)	88.8%(330)	
	<i>che-11(ut154)</i>	20.3%(261)	33.8%(414)	Dyf
	<i>che-11(ut176)</i>	29.0%(545)	79.7%(133)	Dyf
	<i>osm-6(ut183)</i>	21.6%(264)	32.3%(180)	Dyf
	<i>osm-6(ut191)</i>	35.9%(237)	18.2%(165)	Dyf
	<i>sdf-10(ut189)</i>	20.5%(215)	20.4%(245)	
	<i>sdf(ut194)</i>	0%(540)	7.1%(268)	
X	<i>sdf(ut156)</i>	48.9%(525)	58.7%(552)	Aex
次ページに続く				

前ページより続く

連鎖群	遺伝子名	dauer 幼虫の割合 ^a		備考 ^b
		20 °C	25 °C	
X	<i>sdf(ut165)</i>	13.7%(473)	23.7%(118)	Aex
	<i>aex-3(ut159)</i>	53.7%(149)	96.0%(251)	Aex
	<i>aex-3(ut171)</i>	75.6%(447)	47.3%(429)	Aex
	<i>aex-3(ut177)</i>	55.8%(215)	65.7%(445)	Aex
	<i>sdf(ut151)</i>	5.9%(615)	63.2%(291)	
	<i>sdf(ut153)</i>	42.8%(418)	67.1%(468)	
	<i>sdf(ut155)</i>	40.0%(567)	76.2%(454)	
	<i>sdf(ut168)</i>	82.3%(772)	35.8%(402)	
	<i>sdf(ut190)</i>	1.4%(417)	61.1%(198)	
	<i>sdf(ut152)</i>	44.8%(181)	85.5%(228)	
	<i>sdf(ut170)</i>	51.8%(369)	80.4%(326)	
	<i>sdf-11(ut164)</i>	38.6%(285)	96.5%(230)	
	<i>sdf-12(ut182)</i>	6.4%(282)	46.0%(163)	Dyf
unkown	<i>sdf(ut184)</i>	0%(622)	10.5%(325)	
	<i>sdf(ut188)</i>	8.2%(256)	39.3%(196)	
control	<i>unc-31(e169)</i>	0%(694)	0%(158)	

^a dauer 幼虫の割合は、測定する前に少なくとも二世代測定する温度で飼育し、その子どもに現れる dauer 幼虫の割合を測定した。() は、測定した線虫の数を表す。

^b Aex は、脱糞行動の aBoc と Exp のなくなる変異を示す。Dyf は、蛍光色素 DiO が染み込まない変異を示す。

^c dauer 幼虫の割合を測定する前に、少なくとも二世代測定する温度で飼育した個体の子どもに生じる dauer 幼虫の割合を測定した。しかしこの変異体では、全ての個体が dauer 幼虫になってしまいその子どもの dauer 幼虫の割合を測定することができなかった。

18.3 蛍光色素の取り込み (Dyf 表現型)

野生株を蛍光色素 DiO を含む溶液につけると図 2 のように頭部感覚器官 amphid の 6 組 (ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK そして AWB) と尾部感覚器官 phasmid の 2 組 (PHA と PHB) の合計八組の感覚神経の軸索と細胞体が染まる。得られた *sdf-c* 変異体を蛍光色素 DiO を含む溶液につけて amphid と phasmid への蛍光色素の取り込みを調べたところ、表 2 のように蛍光色素の取り込みに異常を生じることの知られていた既知の変異の *che-11(ut154)*, *che-11(ut176)*, *osm-6(ut183)* そして *osm-6(ut191)* の他に蛍光色素の取り込みに異常を生じる株が *sdf-3(ut160)* と *sdf-12(ut182)* の二株含まれていた。これらの合計 6 株の変異では、amphid の ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB 神経そして phasmid の PHA, PHB 神経のすべてについて、全く蛍光色素の取り込みが見られなかった。

sdf-3(ut160) のマップされる連鎖群 II の左端付近には、蛍光色素の取り込みの異常を示す既知の変異はない。よってこの得られた変異は、新規の変異であると考えられる。

sdf-12(ut182) のマップされた連鎖群 X の右には、蛍光色素の取り込みの異常を示す既知の変異として、dauer 幼虫形成の異常を指標に分離された *daf-6*、高浸透圧忌避の異常により分離された *osm-1*、そして蛍光色素の取り込みの異常を指標として分離された *dyf-8* が知られている。これらの変異との相補性試験を行なったところ全ての変異を相補することができた。このことから、この *sdf-12(ut182)* は、新規の変異であると考えられる。

この実験からは、蛍光色素の取り込みの有無だけでなく、蛍光色素を取り込む神経の位置や軸索形態に関する情報も得られる。今回のスクリーニングにより分離された *sdf-c* 変異体のうち、蛍光色素の取り込みが正常のものは、全て野生株と同じく八組の神経が染まり、染まった神経の軸索の伸びている位置に異常は見られなかった。

18.4 dauer 幼虫形成を指標とした相補性試験と既知の変異との三因子交雑によるマッピング

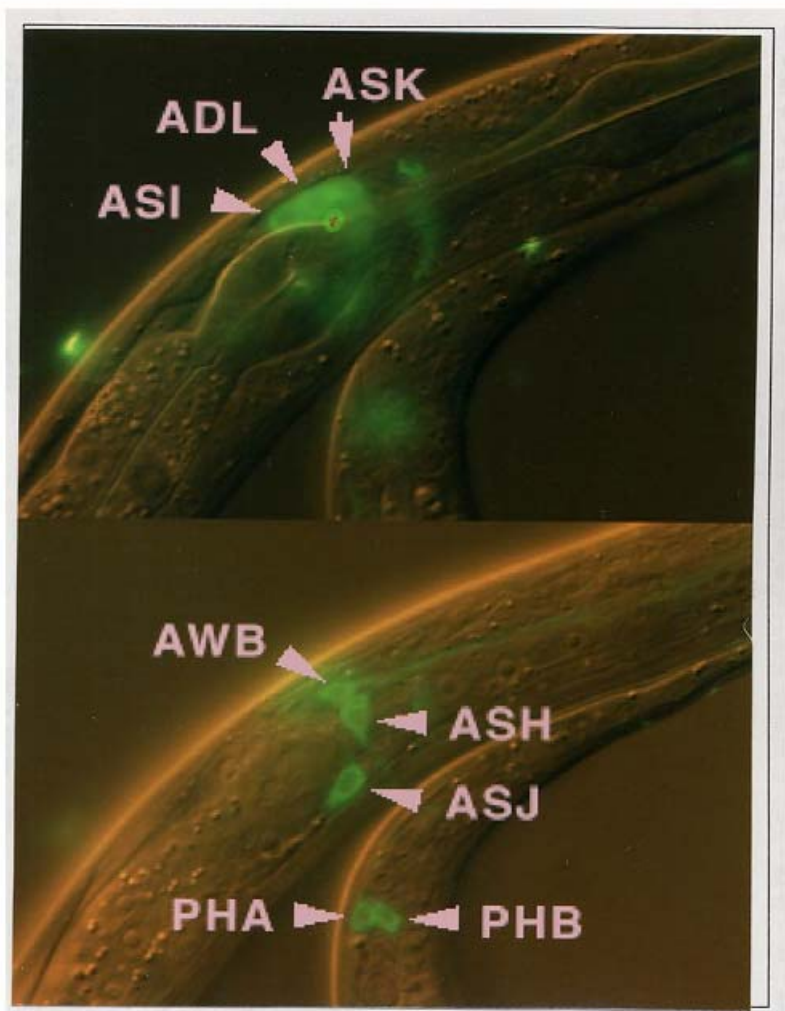


図 2: 蛍光色素 DiO の Amphid と Phasmid への取り込み

遺伝子	親の遺伝子型 ^a	分離した表現型	Unc-31 表現型の 現れた数 ^b	Sdf-c 表現型の 現れた数
<i>sdf-1(ut161)</i>	<i>sdf-1(ut161)/dpy-24(s71)unc-75(e950);unc-31(e169)/+</i>	Dpy non-Unc	6	0
<i>sdf-2(ut158)</i>	<i>sdf-2(ut158)/dpy-24(s71)unc-75(e950);unc-31(e169)/+</i>	Dpy non-Unc	7	0
<i>sdf(ut162)</i>	<i>sdf(ut162)/rol-6(e187)unc-4(e120);unc-31(e169)/+</i>	Rol non-Unc	15	6
		Unc non-Dpy	11	6
<i>sdf(ut166)</i>	<i>sdf(ut166)/rol-6(e187)unc-4(e120)/+;unc-31(e169)/+</i>	Rol non-Dpy	8	3
		Unc non-Rol	9	5
<i>sdf(ut179)</i>	<i>sdf(ut179)/rol-6(e187)unc-4(e120);unc-31(e169)/+</i>	Rol non-Unc	17	9
		Unc non-Dpy	17	10
<i>sdf(ut181)</i>	<i>sdf(ut181)/rol-6(e187)unc-4(e120)/+;unc-31(e169)/+</i>	Rol non-Dpy	11	7
		Unc non-Rol	11	9
<i>sdf(ut180)</i>	<i>sdf(ut180)/dpy-17(e164)unc-32(e189);unc-31(e169)/+</i>	Dpy non-Unc	11	1
		Unc non-Dpy	25	24
<i>sdf(ut192)</i>	<i>sdf(ut192)/dpy-17(e164)unc-32(e189);unc-31(e169)/+</i>	Dpy non-Unc	19	0
		Unc non-Dpy	30	15
<i>sdf-10(ut189)</i>	<i>unc-31(e169)/+;sdf-10(ut189)/rol-3(e754)lon-3(e2175)</i>	Lon non-Rol	11	1

表 3: 三因子交雑

^aすでに遺伝子地図上での位置の明らかな遺伝子の二重変異体に野生株の雄を掛け、その子ども雄をマップしようとする *sdf-c* 遺伝子と *unc-31(e169)* をそれぞれホモに持つ個体に掛けた。そのために実際にはマップしようとする *sdf-c* 遺伝子と野生株のヘテロ接合体が 1/2 の割合で生じる。そこでヘテロ接合体を一匹ずつ飼育して、野生株とのヘテロであったもの、すなわち二重変異体のホモの個体の現れないものは捨てた。

^b組換え体は、Unc-31 表現型を示さない個体も拾った。そのため 1/4 の確率で *unc-31* を含まない個体を得られ、その子どもからは dauer 幼虫は生じない。そこで子どもに Unc-31 表現型を示す個体のいないものは捨てて、Unc-31 表現型を示す個体のいる内で dauer 幼虫の現れるものの数を調べた。

18.4.1 連鎖群 I

連鎖群 I にある *unc-31* との二重変異により Sdf-c 表現型を示すことの知られている変異には、*che-13* と *tax-2* の 2 つがある。

STS マーカーを使ったマッピングにより連鎖群 I にマップされた *ut158*, *ut161*, *ut167* そして *ut173* の *unc-31(e169)* との二重変異体に、野生株の雄を掛けてヘテロ接合体の雄を作成した。これを *che-13(e1805);dpy-17(e164);unc-31(e169)* に掛けたところ、表 4 のように non-Dpy の dauer 幼虫はほとんど形成されなかった。このことから、今回分離された変異には、*che-13* の変異は含まれていないといえる。このことは、今回分離された変異体 (*ut158*, *ut161*, *ut167*, *ut173*) がみな Dyf 表現型を示さないのに対し、*che-13* が Dyf 表現型を示すことと一致する。

雌雄同位体の 遺伝子型	雄の遺伝子型			
	<i>ut158/+;</i> <i>unc-31(e169)/+</i>	<i>ut161/+;</i> <i>unc-31(e169)/+</i>	<i>ut167/+;</i> <i>unc-31(e169)/+</i>	<i>ut173/+;</i> <i>unc-31(e169)/+</i>
<i>che-13(e1805);</i> <i>dpy-17(e164);</i> <i>unc-31(e164)</i>	3/979	2/636	10/1101	0/674
<i>tax-2(p671);</i> <i>dpy-17(e164);</i> <i>unc-31(e164)</i>	0/597	0/618	2/484	119/456

表 4: 連鎖群 I の既知の変異との相補性試験

数字は、non-Dpy non-dauer に対する non-Dpy dauer の割合を示す。

同様に *tax-2(p671);dpy-17(e164);unc-31(e169)* に今回得られた変異と野生株とのヘテロの雄を掛けたところ、表 4 のように *ut173* 以外では non-Dpy の dauer 幼虫は形成されなかったが、*ut173* を掛けた時には non-Dpy の dauer がたくさん生じた。このことから *ut173* は、*tax-2* の変異といえる。

次に連鎖群 I にマップされた遺伝子同士で相補性試験を行なったところ、表 5 のように *ut158* と *ut167* が、同じ遺伝子の変異であることが明らかになった。よって連鎖群 I には、*sdf-1(ut161)* と *sdf-2(ut158,ut167)* の二つの新しい遺伝子がマップされた。

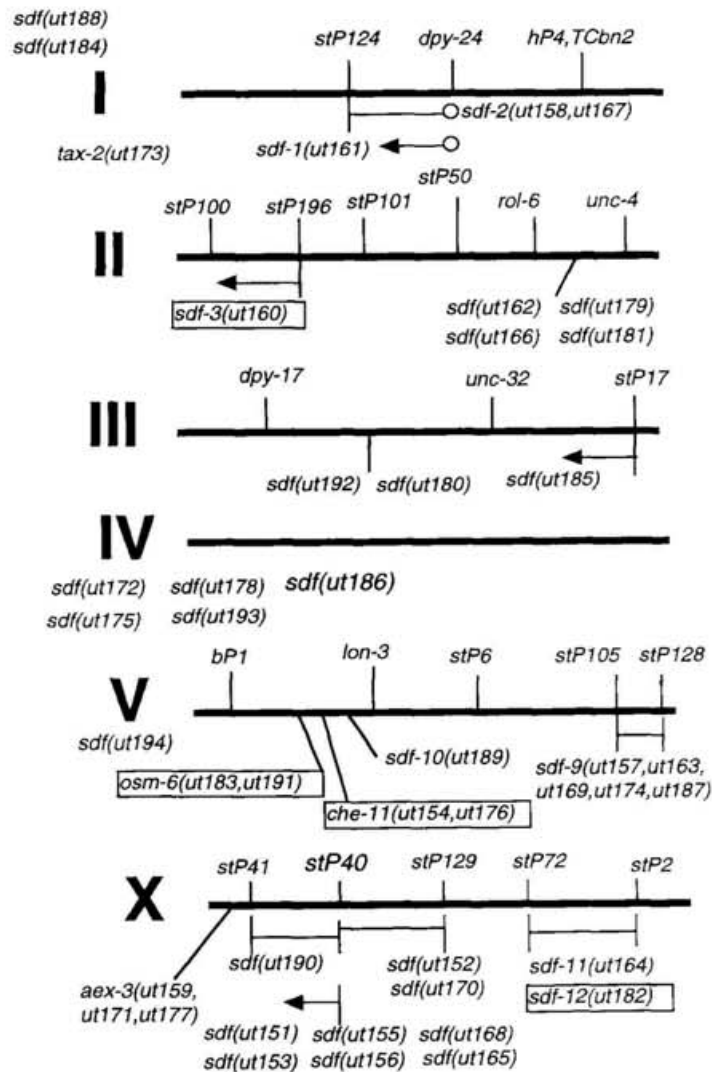


図 3: *unc-31* と組み合わせると Sdf-c 表現型を示す変異の遺伝子地図

中抜きの丸は、そのマーカの近い反対側である可能性を示す。

四角で囲まれているのは、Dyf 変異を示す。

この図は、遺伝子間の順序のみを示し、その正確な距離は表していない。

雌雄同位体の 遺伝子型	雄の遺伝子型		
	<i>ut158/+;</i> <i>unc-31(e169)/+</i>	<i>ut161/+;</i> <i>unc-31(e169)/+</i>	<i>ut167/+;</i> <i>unc-31(e169)/+</i>
<i>ut167;dpy-17(e164);unc-31(e169)</i>	148/563	12/800	24/132

表 5: 連鎖群 I にマップされた変異内での相補性試験

数字は、non-Dpy dauer の non-Dpy non-dauer に対する数を示す。

この *sdf-1(ut161)* と *sdf-2(e158)* の遺伝子地図上でのさらに詳しい位置を決めるために、*dpy-24(s71)unc-75(e950)* との三因子交雑を行なった。すると表3のように *sdf-1(ut161)* と *sdf-2(ut158)* のどちらも *dpy-24* の近くまたは左側にマップされた。

18.4.2 連鎖群 II

unc-31 との二重変異により Sdf-c 表現型を示す連鎖群 II 上の変異には、Dyf 表現型を示す *che-10* がある。この変異は、STS マーカーの *stP101* と *stP50* の間にマップされている。今回のスクリーニングにより分離された Dyf 変異の内 STS マーカーを使ったマッピングにより連鎖群 II にマップされた変異には、*sdf-3(ut160)* がある。しかしこの変異は、*stP196* の左側にマップされた。この領域は、*che-10* のマップされている *stP101* と *stP50* よりさらに左側であり、この二つの変異は別の遺伝子の変異であると考えられる。

連鎖群 II にマップされた残りの四つの変異 (*sdf(ut162)*, *sdf(ut166)*, *sdf(ut179)*, *sdf(ut181)*) は、Dyf 表現型を示さないことから、これら四つの遺伝子も *che-10* とは別の遺伝子の変異であると考えられる。

この四つの変異を *rol-6(e187)unc-4(e120)* との三因子交雑によりマップしたところ、表3のように *sdf(ut162)*, *sdf(ut166)*, *sdf(ut179)* そして *sdf(ut181)* の全てが、ほぼ *rol-6* と *unc-4* の中央にマップされた。

18.4.3 連鎖群 III

連鎖群 III 上に存在する *unc-31* との二重変異により Sdf-c 表現型を示す変異には、Dyf 表現型を示す *daf-10* がある。今回のスクリーニングにより分離された連鎖群 III 上の三株の変異 (*sdf(ut180)*, *sdf(ut185)*, *sdf(ut192)*) には、Dyf 表現型を示すものはない。よってこれら三つの変異は、*daf-10* とは別の変異であると考えられる。

この新しい三つの変異の内 *sdf(ut180)* と *sdf(ut192)* の二株について、さらに詳しい遺伝子地図上での位置を決定した。*sdf(ut180)* と *sdf(ut192)* を *dpy-17(e164)unc-32(e189)* と交雑させたところ、二株とも表3のように *dpy-17* のすぐ右側にマップされた。

候補となる既知の遺伝子 *tax-4* は、*unc-32* の右にあるので、*ut180*, *ut192* とは位置が異なる。

しかし *ut185* と *tax-4* 変異の相補性試験をしていないので、*ut185* が *tax-4* の変異であるか明らかでない。

18.4.4 連鎖群 IV

連鎖群 IV の STS マーカーに *sdf-4(ut172)*, *sdf-5(ut175)*, *sdf-6(ut178)*, *sdf-7(ut186)* そして *sdf-8(ut193)* の五つの変異が、連鎖している。これら五つの変異間で dauer 幼虫の形成を指標とした相補性試験を行なったところ、表 6 のようにそれぞれの変異の間に互いに全て相補することができた。このことからこの五つの変異は、全て異なる遺伝子の変異である。

雌雄同位体の 遺伝子型	雄の遺伝子型		
	<i>sdf-4(ut172)unc-31(e169)/++</i>	<i>sdf-5(ut175)unc-31(e169)/++</i>	<i>sdf-6(ut178)unc-31(e169)/++</i>
<i>sdf-4(ut172)unc-31(e169)/++</i>	18/68	0/233	0/30
<i>sdf-6(ut178)unc-31(e169)/++</i>	2/300	2/314	15/60
<i>sdf-7(ut186)unc-31(e169)/++</i>	2/696	1/418	4/584
<i>sdf-8(ut193)unc-31(e169)/++</i>	0/91	1/292	n.d.

雌雄同位体の 遺伝子型	雄の遺伝子型	
	<i>sdf-7(ut186)unc-31(e169)/++</i>	<i>sdf-8(ut193)unc-31(e169)/++</i>
<i>sdf-4(ut172)unc-31(e169)/++</i>	0/340	1/145
<i>sdf-6(ut178)unc-31(e169)/++</i>	1/208	1/198
<i>sdf-7(ut186)unc-31(e169)/++</i>	24/423	0/262
<i>sdf-8(ut193)unc-31(e169)/++</i>	n.d.	40/252

表 6: 連鎖群 IV に連鎖する遺伝子間での相補性試験

non-Dpy dauer の non-Dpy non-dauer に対する数を示す。

18.4.5 連鎖群 V

今回のスクリーニングにより分離された変異体の内 11 株が、STS マーカーを使ったマッピングにより連鎖群 V に連鎖していることが明らかになった。この内の Dyf 表現型を示す 4 株 (*che-11(ut154)*, *che-11(ut176)*, *osm-6(ut183)*, *osm-6(ut191)*) は、すでに述べたように既知の遺伝子の変異であった。

また 5 株 (*ut157*, *ut163*, *ut169*, *ut174*, *ut187*) は、*stP105* と *stP128* の間に STS マーカーを使ってマップされた。これらの変異体の間で dauer 幼虫形成を指標とした相補性試験を行なったところ、表 7 のように全ての変異の間で相補することができなかった。このことから 5 つの変異体は、全て同じ遺伝子 *sdf-9* の変異であることが明らかになった。

雌雄同位体の 遺伝子型	雄の遺伝子型				
	<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf-9(ut157)/+</i>	<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf-9(ut163)/+</i>	<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf-9(ut169)/+</i>	<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf-9(ut174)/+</i>	<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf-9(ut187)/+</i>
<i>dpy-5(e61);unc-31(e169)sdf-9(ut174)</i>	43/302	96/345	49/229	36/152	58/261

表 7: 連鎖群 V にマップされた変異体の相補性試験
non-Dpy dauer の non-Dpy non-dauer に対する数を示す。

また *sdf-10(ut189)* は、*stP23* と *stP18* の間にマップされた。そこで既知の遺伝子 (*rol-3(e754)lon-3(e2175)*) との三因子交雑によりさらに詳しくマップしたところ、この2つの間で、*lon-3* のすぐ左側にマップされた。

残りの *sdf(ut194)* は、dauer 幼虫を形成する割合が少なく、さらに細かいマップをすることができなかった。

18.4.6 連鎖群 X

連鎖群 X に連鎖することの明らかになった変異は、14 株ある。これらの変異は、STS マーカーを使ったさらに詳しいマッピングの結果から3つのグループに大きく分類することができた。

まず第一は、*aex-3* 遺伝子を含む位置、*stP40* より左側にある10株の変異で、第18.5節で詳しく議論する。

第二は、*stP40* と *stP129* の間にある変異である。この間には、*sdf(ut152)* と *sdf(ut170)* の二株が含まれる。

第三は、*stP72* と *stP2* の間にある変異である。この間には、*sdf-11(ut164)* と *sdf-12(ut182)* がある。この内 *sdf-11(ut164)* は、蛍光色素の取り込みに異常が見られなかったが、*sdf-12(ut182)* は、すでに述べたように *Dyf* 表現型を示した。このことから、この二つの変異は、別の遺伝子の変異であると考えられる。*ut182* は、マップされる範囲内にある既知の *sdf-c* 変異で *Dyf* 表現型をもつ *daf-6*, *osm-1* と *unc-31* との組合せで *Sdf-c* 表現型を示すか調べられていないが *Dyf* 表現型を示す *dyf-8* の *Dyf* 表現型に関して相補するので、これらの遺伝子内にはないと思われる。

連鎖群 X には、この研究を始めるきっかけとなった *unc-3* も位置している。*unc-3* は、コイラーと呼ばれてコイル状に丸まった形になる。しかし *unc-3* と同じ表現型を示す変異体はなかった。

18.5 脱糞行動を指標とした相補性試験

連鎖群 X に連鎖することの明らかになった変異体は、14 株ある。この研究を始める発端となった *aex-3* のマップされている領域 (*stP40* の左側) には、10 株がマップされた。

この10株が、脱糞行動の異常である *Aex* 表現型を示すか調べたところ図4のように、5株に異常が見られた。これらは、Mann-Whitney 検定により検定したところ、野生株との間に有意な差 ($p < 0.05$) が見られた。そ

ここで Aex 表現型を指標とした相補性試験をこの 5 株の間で行なったところ、表 8 のように三株 (*ut159*, *ut171*, *ut177*) が *aex-3* 遺伝子の変異であることが明らかになった。

雄の遺伝子型	雌雄同位体の遺伝子型 <i>dpy-5(e61);unc-31(e169);sdf(ut171)</i>
<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf(ut156)/O</i>	94.9%(10.6)
<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf(ut159)/O</i>	38.6%(18.8)*
<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf(ut165)/O</i>	95.8%(8.0)
<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf(ut171)/O</i>	25.5%(14.2)*
<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>sdf(ut177)/O</i>	26.8%(18.0)*
<i>unc-31(e169)/+;</i> <i>aex-3(sa5)/O</i>	37.4%(11.2)*

表 8: Aex 表現型を指標とした相補性試験

四齢幼虫または成虫の脱糞行動を 5 分間観察して、pBoc に対する Exp の割合を測定した。

() 内は標準偏差を示す。

野生株 N2 の pBoc に対する Exp の割合は、96.7%±8.2 であり、

*は、Exp の割合が野生株に比べて統計学的に有意な差

($p < 0.05$) があることを示す。

Aex 表現型を示したが *aex-3* とは別の遺伝子であった二株 (*sdf(ut156)*, *sdf(ut165)*) は、それぞれ同じ遺伝子の変異であるか、既知の遺伝子の変異であるかは、明らかでない。

19 高浸透圧忌避

Sdf-c 表現型を示す変異には、頭部感覚神経の構造異常を示す変異が多く含まれている。このような変異体では、頭部感覚器官の構造異常のた

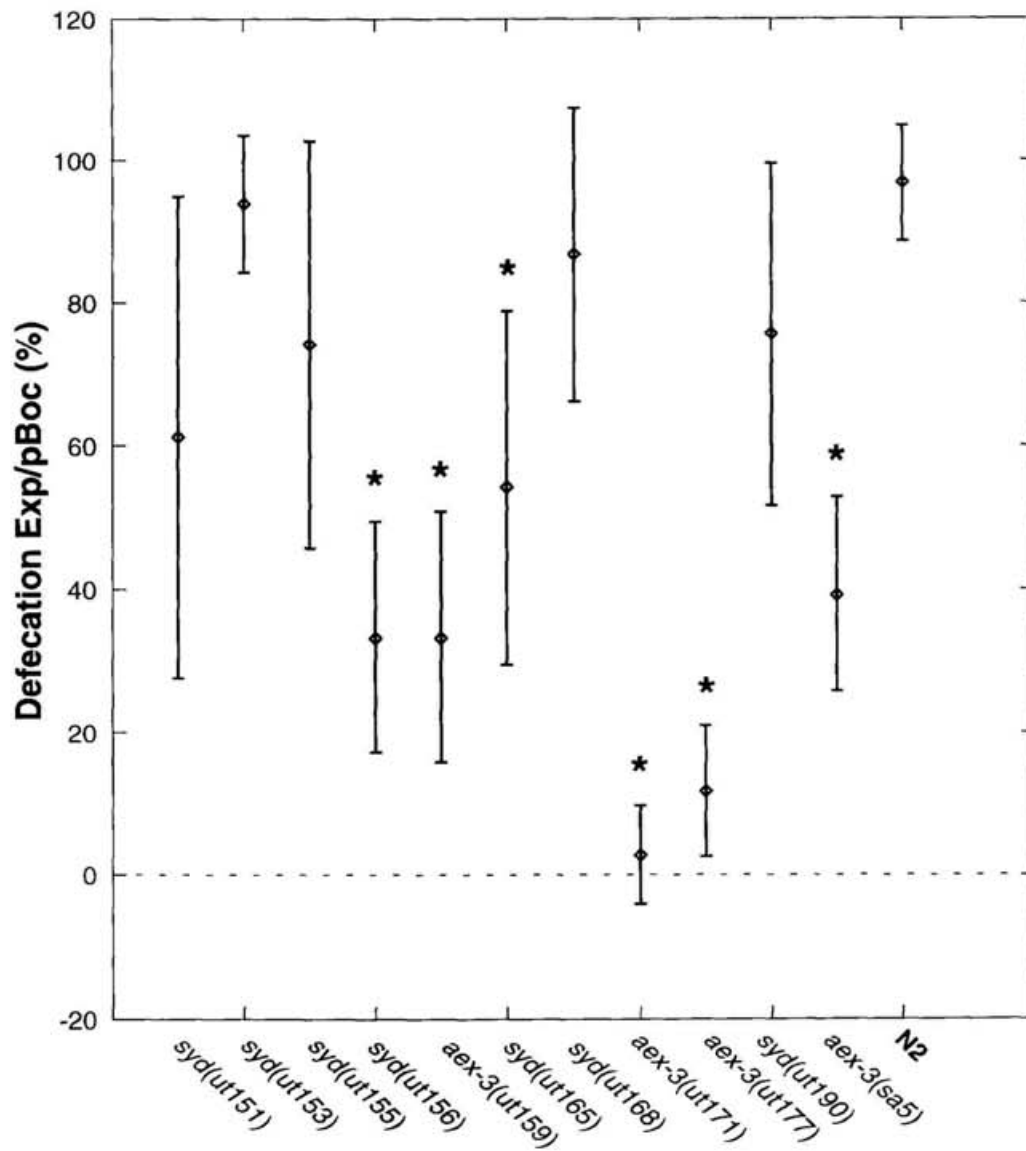


図 4: 脱糞行動の異常 (Aex 表現型)

*は、野生株 N2 との間に統計学的に有意な差 ($p < 0.05$) があることを示す。

errorbar は、標準偏差を表す。

aex-3(sa5) は、Aex 表現型のコントロールとして使った。

めに蛍光色素が染み込まなくなる Dyf 表現型や高浸透圧のところを避けられなくなる Osm 表現型が見られるようになる。

また、amphid の ASH 神経を破壊すると野生型の虫も Osm 表現型を示す (Bargmann et al. 1990; Kaplan 1996) ので、得られた変異の中に ASH の機能異常を起こす変異があれば、Osm 表現型が見られると期待される。

そこで今回のスクリーニングにより分離された変異体中に Osm 表現型を示す変異体がないか調べた。図 5 のようにコントロールの H₂O のバリアーと 5M NaCl のバリアーの間で統計学的に有意な差の見られない ($p > 0.05$) 変異、すなわち高浸透圧を忌避しない Osm 表現型を示すものが多数含まれていた。また、*unc-31* 変異を除いてあるにも関わらずコントロールの H₂O で作ったバリアーを越えられない、すなわち始めに置いた位置からほとんど動かない変異体が多数含まれていた。

20 揮発性物質に対する化学走性

線虫は、水溶性の物質だけでなく揮発性の物質についても走化性を示す。ある揮発性物質で充満している環境下で別の揮発性物質に対して走化性を示すかという Bargmann et al. (1993) の実験の結果から、揮発性物質は、ベンズアルデヒド、2-ブタノン、イソアミルアルコール、ジアセチル、ピラジンそして 2,4,5-トリメチルチアゾールの六つのグループに分類されている。さらに感覚神経の AWC が、ベンズアルデヒド、2-ブタノンそしてイソアミルアルコールを感じており、AWA がジアセチルとピラジンを感じて、2,4,5-トリメチルチアゾールは AWA と AWC の両方で感じていることも明らかになっている (Bargmann et al. 1993)。

そこで AWA と AWC の感じる揮発性物質の代表としてベンズアルデヒドとジアセチルを選び、それぞれに対する走化性を調べた (図 6, 7)。ジアセチルに対する走化性の異常の見られる変異体はなかった。また、ベンズアルデヒドに対しては、*sdf-1(ut161)*, *sdf-9(ut187)*, *sdf(ut182)* が走化性の異常を示し、残りの変異体は野生株との間に統計学的に有意な差 ($p < 0.05$) はなかった。他の変異体は、ベンズアルデヒドに寄っていくのに対して *sdf-1(ut161)* は、全く逆にベンズアルデヒドから遠ざかるような方向に移動した。

Bargmann et al. (1993) の実験でもベンズアルデヒドの濃度が高い時には、負の走化性を示すことが知られている。しかし、ある程度より薄くなると正の走化性を示すので、ベンズアルデヒドの濃度をさらに薄くし

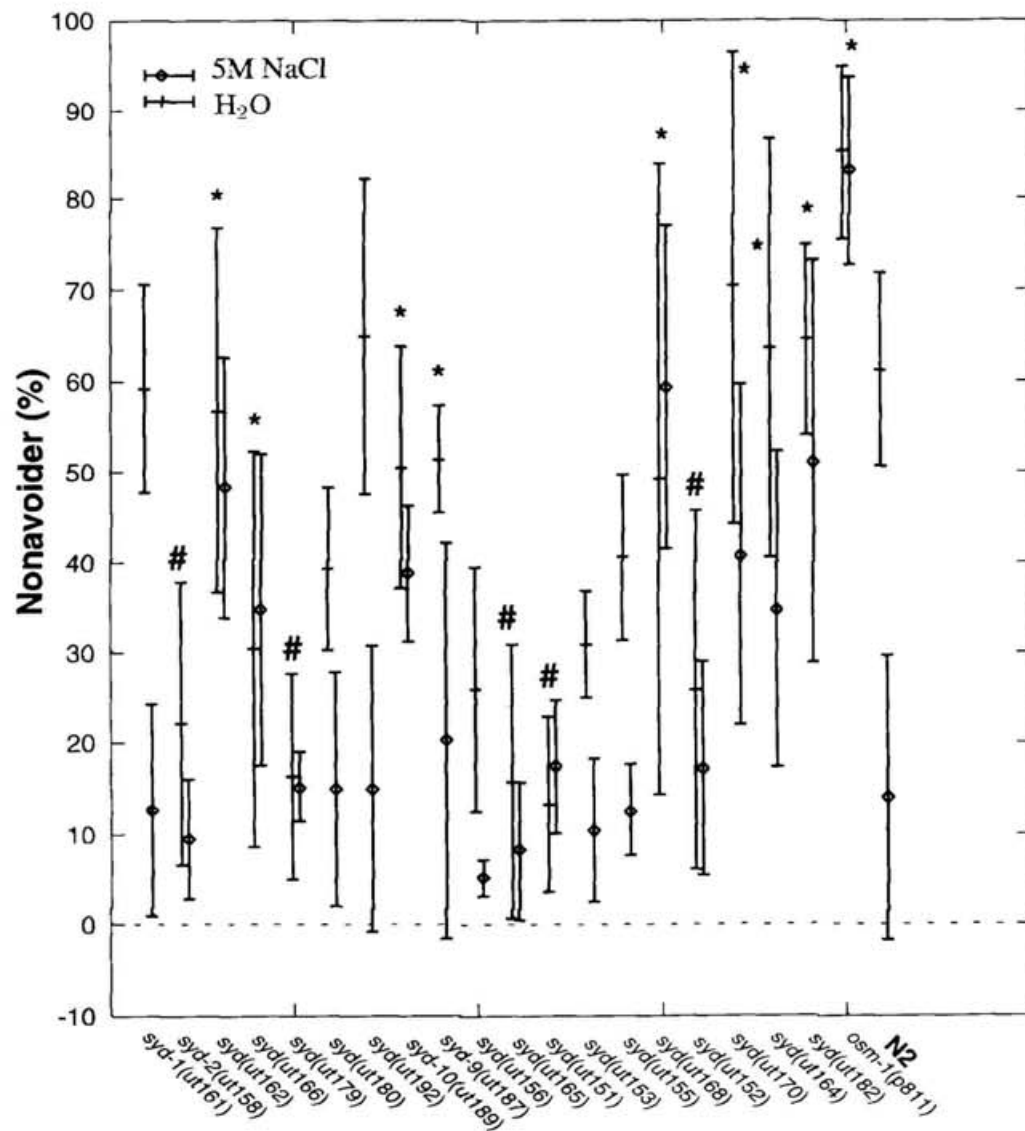


図 5: 高浸透圧忌避

*は、H₂O と 5M NaCl の間に有意な差が見られない ($p > 0.05$)、すなわち Osm 表現型を示すものを表す。

#は、H₂O でバリアーを作った時に野生株 N2 と比べて有意 ($p < 0.05$) に動かないものを表す。

errorbar は、標準偏差を表す。

osm-1(p811) は、Osm 表現型のコントロールとして使った。

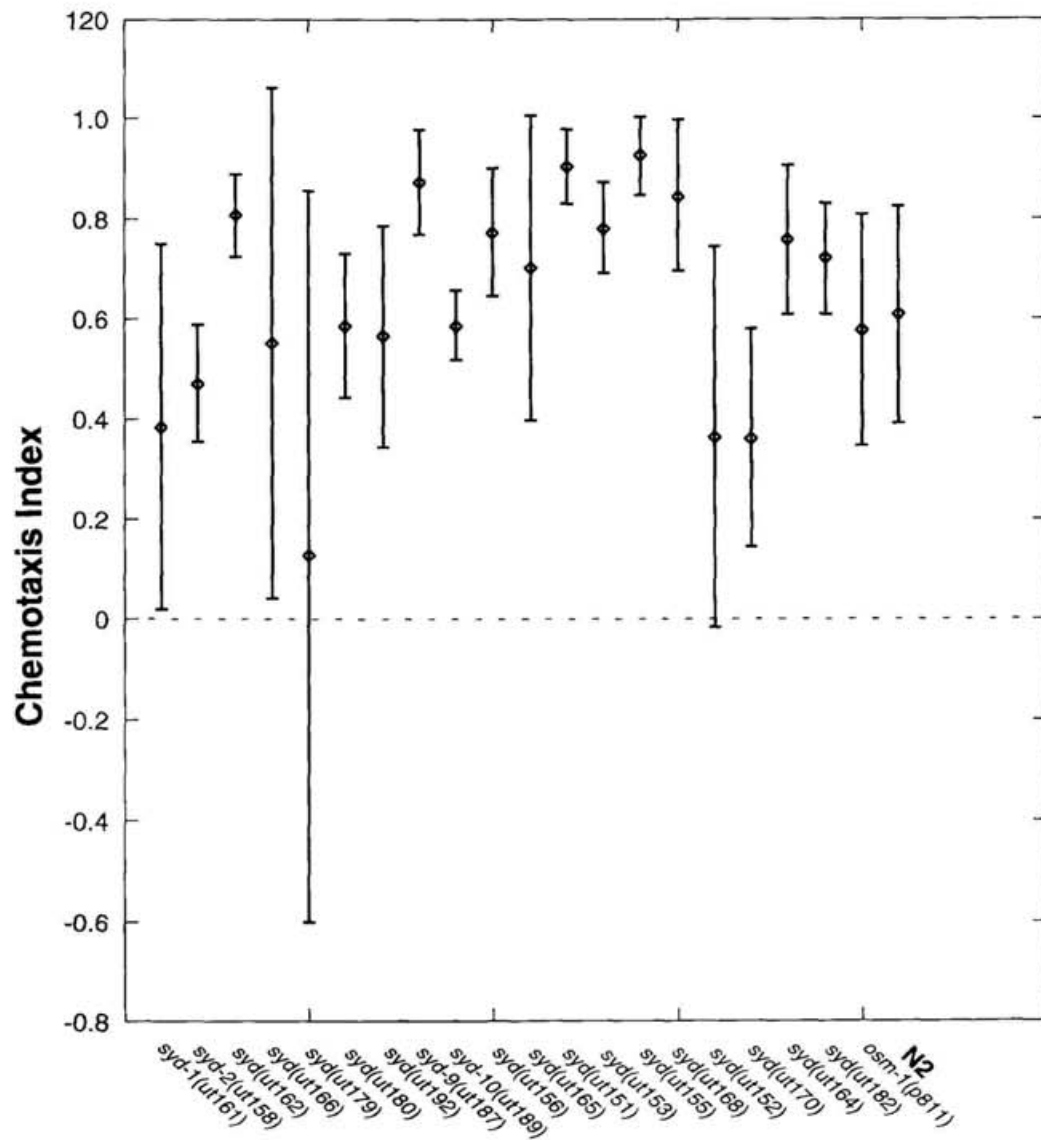


図 6: ジアセチルに対する走化性

Chemotaxis Index の 1 は、全ての個体が、揮発性物質のある側に集まることを示し、-1 は全ての個体が揮発性物質のある側を避けることを示す。

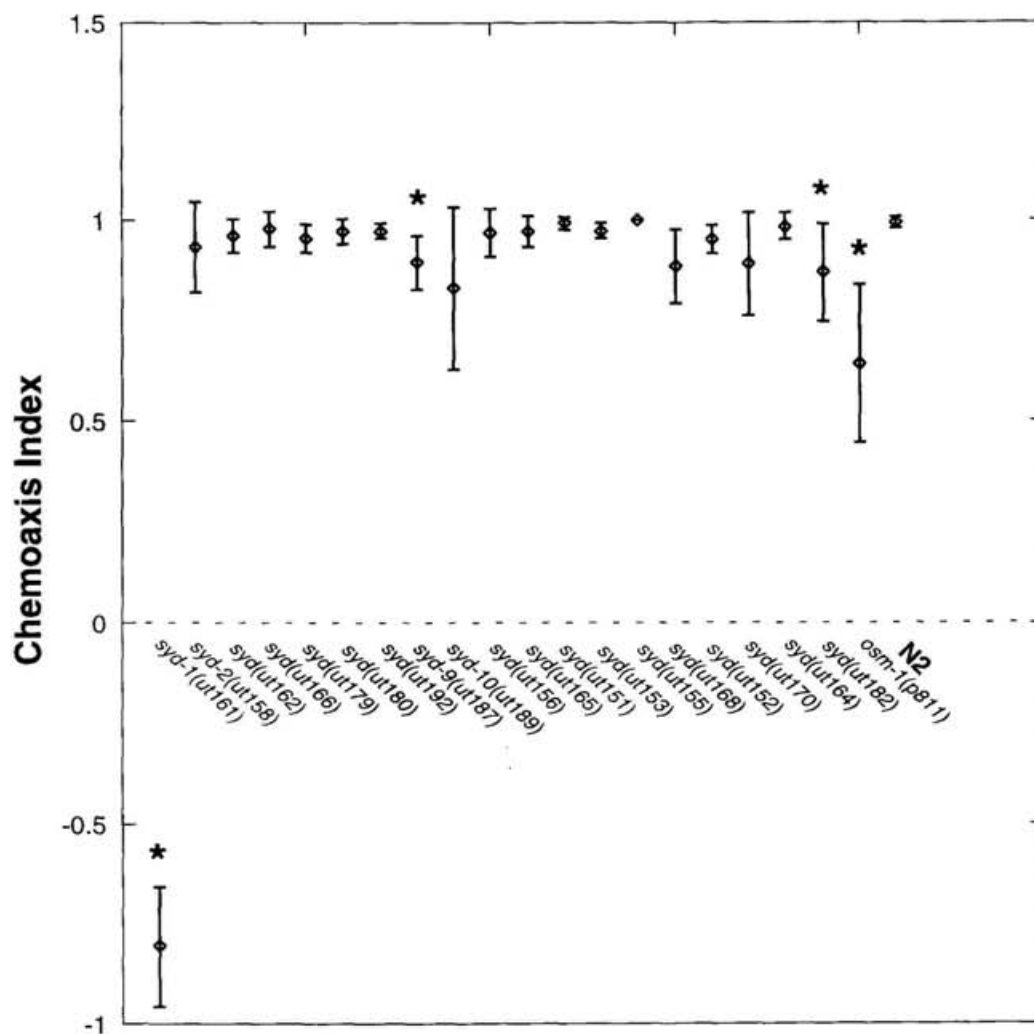


図 7: ペンズアルデヒドに対する走化性

Chemotaxis Index の 1 は、全ての個体が、揮発性物質のある側に集まることを示し、-1 は全ての個体が揮発性物質のある側を避けることを示す。

*は、野生株 *N2* に対して有意な差 ($p < 0.05$) のあることを示す。

osm-1(p811) は、Odr 表現型を示すことが知られているので、コントロールとして使った。

て走化性を調べた。しかし図8のように *sdf-1(ut161)* は、ベンズアルデヒドの濃度を低くしても負の走化性を示す傾向がある。

また AWC で感じる別の揮発性物質であるイソアミルアルコールに対する *sdf-1(ut161)* の走化性を調べると、ベンズアルデヒドと同様に負の走化性を示した。

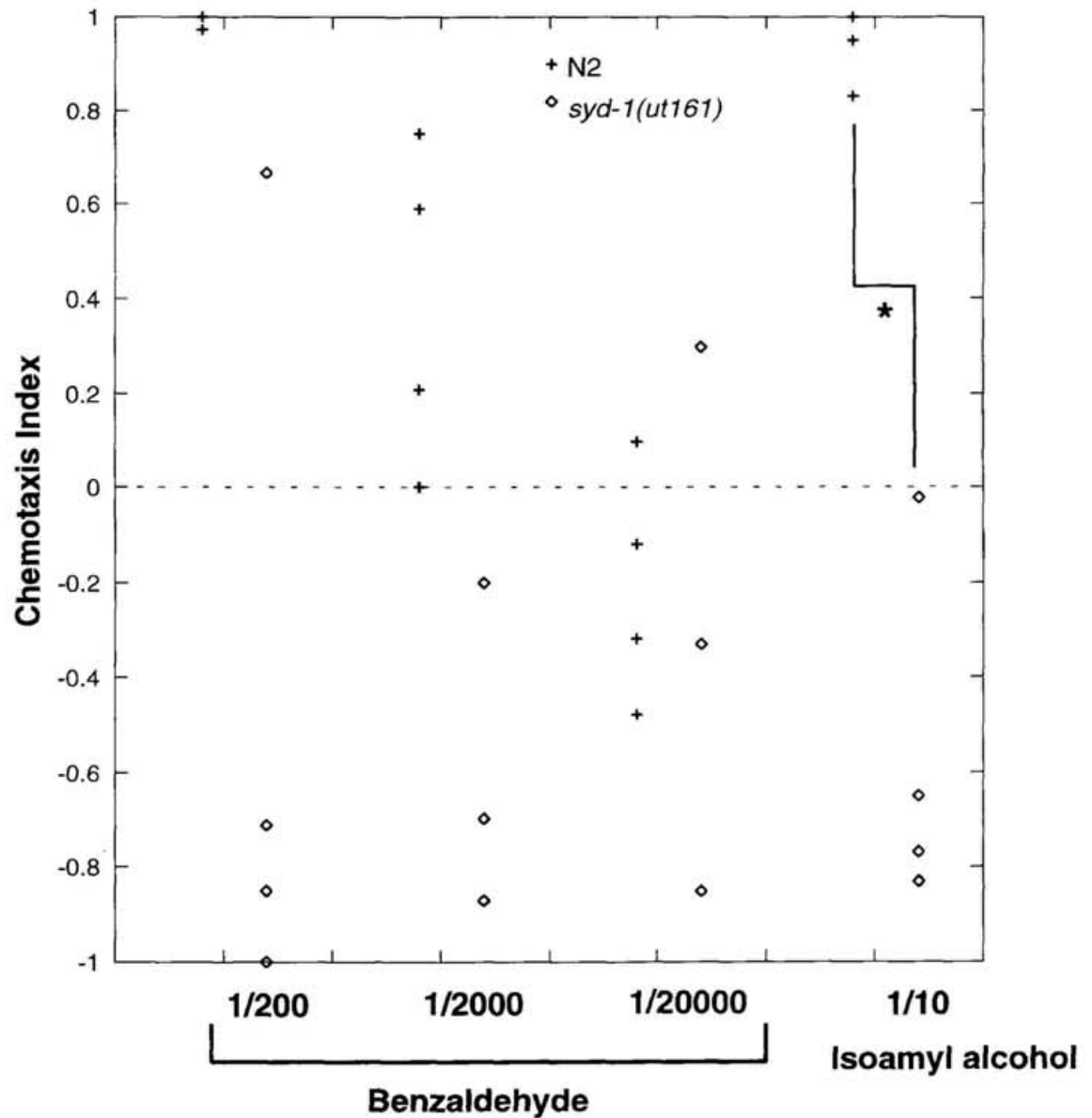


図 8: ベンズアルデヒドとイソアミルアルコールに対する走化性

*は、野生株 N2 との間に有意な差 ($p < 0.05$) のあることを示す。ベンズアルデヒドの方は、サンプル数が少ないために統計学的な検定することができない。

第IV部

討論

21 *unc-31* 変異と組み合わせると Sdf-c 表現型を示す変異には多数の遺伝子が関与する

unc-31(e169);Ex[unc-31(+)] を EMS により突然変異を起こさせた。この子どもの F1 を 5539 匹スクリーニングしたところ、Sdf-c 表現型を示す変異体が 44 株得られた。これらの変異は、4 つの既知の遺伝子と少なくとも 18 の未知の遺伝子にマップされた。多数の未知の遺伝子が発見されたことは、この方法の有効性を示している。

EMS による線虫の突然変異率は、平均的な遺伝子の場合 5×10^{-4} であると推定されている (Brenner 1974)。今回のスクリーニングでは、5539 匹の F1 をスクリーニングしたので、11078 ゲノムを調べたことになる。EMS による突然変異率から考えると、1 つの遺伝子に対して変異体が平均 4.4 個得られるはずである。しかし得られた 44 の変異は、22 の遺伝子 (4 つの既知の遺伝子と 18 の新しい遺伝子) にマップされた。ただし全ての変異の相補性試験が終っていないので、遺伝子の数は増える可能性がある。よって 1 つの遺伝子当たりの変異数は約 2 となる。最も多く変異体の得られた *sdf-9* は、5 株得られているが、1 株しか変異体の得られていない遺伝子が 10 ある。

この不一致の原因として、(1) 今回分離した変異が、Brenner (1974) が分離した変異と比べ、遺伝子当たりで比較すると出現確率が低いこと、あるいは、(2) 変異体分離の過程で一部の変異を見逃していることが、考えられる。具体的には、変異の浸透度の問題がある。F2 の表現型を見て変異体を選択するときに、導入遺伝子 *Ex[unc-31(+)]* を失ったものは約半数であり、その中の 4 分の 1 がホモ接合体として表現型を示す。つまり、浸透度が 100% でも、Unc 表現型の dauer 幼虫は F2 の約 8 分の 1 にしか出現しない。したがって、今回のスクリーニングでは、浸透度の高いものしか高い確率で選択できていない可能性がある。実際、得られた変異の過半数は 25℃ で 80% 以上の浸透度を持つ。

1 株しか変異体の得られていない遺伝子が 10 あることから、*unc-31* と組み合わせると Sdf-c 表現型を示す変異を持つ遺伝子には、未発見のものがまだかなりあると推定できる。今回のスクリーニングにより分離され

た変異には、既知の遺伝子の変異が 8 株 (4 遺伝子) 含まれていた。しかし、既知の遺伝子で *unc-31* と組み合わせると Sdf-c 表現型を示す変異をもつ遺伝子の数は、わかっているだけでもさらに多い (桂、私信)。このことから、全ての遺伝子が枚挙されていないことがわかる。

また *unc-3* のように、今回、当然得られると予想されていたのに得られなかった変異がある。これらがなぜ得られなかったのかは、不明である。

22 得られらた変異には、ASI 神経の異常が多いと予想される

unc-31 変異は ASI 神経を破壊しただけで dauer 幼虫を生じる (Avery et al. 1993) ことから、本研究で得られた変異には、ASI 神経を異常にする (しかし、ASI と ADF の両方を完全には機能欠損にはしない) 変異が多数含まれていると予想される。このことを厳密に証明するには、今後、これらの変異を生じた遺伝子の実体と機能をさらに解析する必要がある。

既知の遺伝子で蛍光色素の取り込みに異常を生じる変異は、多数分離されている。この内の *che-2*, *che-3*, *che-10*, *che-11*, *che-12*, *che-13*, *che-14*, *daf-6*, *daf-10*, *daf-19*, *mec-1*, *mec-8*, *osm-1*, *osm-3*, *osm-5* そして *osm-6* の各遺伝子の変異は、電子顕微鏡による構造解析から感覚神経の構造に異常を生じることが明らかになっている (Perkins et al. 1986)。また、電子顕微鏡による解析が行われていない Dyf 表現型を示すものについても、同様のことが予想される。これらの変異の大部分は Daf-d 表現型を示し (Perkins et al. 1986)、その中の大部分が *unc-31* 変異と組み合わせると Sdf-c 表現型を示す (桂、私信)。実際に、今回のスクリーニングでも、蛍光色素 DiO の取り込みに異常を生じる変異体が、既知の遺伝子の変異体も含めて、6 株 (*sdf-3(ut160)*, *che-11(ut176)*, *che-11(ut154)*, *osm-6(ut183)*, *osm-6(ut191)*, *sdf-12(ut182)*) 得られた。

残りの 38 株は、蛍光色素の浸透異常を示さない。蛍光色素で染色された 8 種類の神経の数・位置・形態は、全て正常であった。したがって、これらの変異の多くは、amphid の大きな構造異常により ASI 神経の機能が異常になる変異というよりは、ASI 神経 (あるいは ASI を活性化する神経や ASI の下流の神経等) の機能に必須の蛋白質の変異と予想される。

unc-31 との二重変異により Sdf-c 表現型を示す原因としては、ASI 関連の変異以外の可能性も否定できない。dauer 幼虫形成の回路は一部分が並

列になっていると提案されており (Thomas et al. 1993)、それが実際に神経細胞レベルで、ASJ と (ADF+ASI) という並行経路になっていることが最近、明らかにされた (Schackwitz et al. 1996)。これらの研究は、二種類の *daf-c* 変異を組み合わせた二重変異にすると、生じる dauer 幼虫の割合が上昇するという観察にもとづいている。*unc-31* は、普通に飼育している条件では Daf-c 表現型を示さないが、餌が少なくなると野生株よりも早く dauer 幼虫を形成する傾向がある。そこで *daf-c* 変異を二重変異にすると生じる dauer 幼虫の割合が上昇したように、*unc-31* の持つごくわずかの Daf-c の傾向が、同様の傾向を持つ変異と二重変異にしたことにより上昇して、Sdf-c 表現型となる可能性もあると考えられる。

23 *sdf-1(ut161)* は、AWC 感覚神経で感じる揮発性物質に対して負の走化性を示す

本研究で得られた *sdf-1(ut161)* 変異は、特に興味ある性質を持つことがわかった。

線虫の揮発性化学物質に対する感覚は、正の走化性を示す物質の場合、頭部感覚神経の AWA と AWC で感じていることが知られている (Bargmann et al. 1993)。今回のスクリーニングに含まれていた *sdf-1(ut161)* 変異体は、野生株では正の走化性を示すベンズアルデヒドとイソアミルアルコールのどちらに対しても負の走化性を示した。この二つの匂いは AWC 神経で感じるので、*sdf-1(ut161)* は、AWC が関与する物質への走化性に異常を生じていると考えられる。ただし AWA で感じるジアセチルに対しては、現在までの測定では野生株と同程度に正の走化性を示すことから、AWA が関与する物質への走化性にはそれほど異常がないと考えられる。

この負の走化性を生じる変異の説明としては、いくつかの可能性が考えられる。その第1は、個々の化学物質に対する感覚神経が二種類あり、それぞれ正の走化性と負の走化性を司っているという考えである。ベンズアルデヒドとイソアミルアルコールの場合、野生型の虫では、通常の濃度では正の走化性が負の走化性よりも強いので、後者は隠れた状態にある。しかし、変異により正の走化性に働く感覚神経の機能が失われると、負の走化性が現れるという説である。しかし、AWA、AWC およびその両方を破壊した線虫はいずれも、ベンズアルデヒドやイソアミルアルコールのどちらに対しても、正の走化性が弱まることがあっても負の走

化性を示すことはない。そこで、今回得られた *sdf-1(ut161)* 変異は、AWC 神経に単純な機能不全を引き起こすのではないと考えられる。

第2に、ベンズアルデヒドやイソアミルアルコールの受容体に二種類があり、それぞれ正の走化性と負の走化性を司っているという考えである。しかし、慣れの実験から、少なくとも正の走化性に関して、ベンズアルデヒドとイソアミルアルコールには異なる受容体があるらしい (Bargmann et al. 1993)。したがって、1つの変異で正の走化性に関する両方の受容体を失活させるには、共通のサブユニットか共通の活性化因子を仮定しなければならない。

第3の可能性は、受容体の下流の信号伝達過程か、感覚神経の下流にある介在神経の異常が考えられる。野生型の *C.elegans* では、もともと正の走化性を示す化学物質の他に負の走化性を示す物質がある。この二つの入力、介在神経で調整され、運動神経に伝わり正または負の走化性を示す (Kaplan 1996)。ところが *sdf-1(ut161)* の変異によりこの調整に異常を生じて、野生株では正の走化性を示す信号が逆転してしまい負の走化性を示す信号となったすると、感覚神経への正の走化性を示す入力に対して負の走化性という出力が生じる。

sdf-1(ut161) 変異体の異常をさらに詳しく調べることにより、これらの説、あるいはそれ以外の説のどれが正しいかを定めることができると考えている。その際に、重要なポイントとして以下のことが考えられる。第1に *sdf-1(ut161)* 変異体の負の走化性にも AWC 神経が必要かどうかという問題がある。これは細胞破壊により実験的に解決がつくはずである。第2に、ベンズアルデヒドを高濃度にすると野生型の線虫も負の走化性を示すという現象 (Bargmann et al. 1993) がある。(イソアミルアルコールでは、まだそのような現象は見つかっていない。) *sdf-1(ut161)* 変異は、この現象と関係がある可能性がある。この負の走化性がどの感覚神経に依存しているかも、細胞破壊実験で調べられるはずである。

24 本研究で分離された変異体は、神経機能の解析に有用と思われる

C.elegans は amphid で様々な化学受容とその信号伝達・情報処理を行っていることが知られている (Perkins et al. 1986; Bargmann et al. 1990; Bargmann and Horvitz 1991b; Bargmann and Horvitz 1991a; Bargmann et al.

1993)。ASI 神経は、その中の dauer 幼虫形成制御と水溶性物質に対する正の走化性に働いていることが明らかになっている (Bargmann et al. 1990; Bargmann and Horvitz 1991b; Bargmann and Horvitz 1991a)。通常の方法で、水溶性物質に対する正の走化性を指標として変異体を選択すると、色素浸透異常の変異が優先的に分離されるので、感覚神経やその下流の神経の機能に直接必要な分子の発見は、非常に難しい状況であった。本研究により、ASI 神経等の異常に関する、色素浸透異常を示さない変異が多数得られたと思われる。これらの変異は、今後のフェロモンや水溶性物質の感覚受容・信号伝達・情報処理の研究において非常に有用であると思われる。

また、本研究で得られた変異は、ASI 等のほかに独立に別の神経も異常にするものが含まれている可能性がある。本研究では、高浸透圧忌避異常や揮発性物質に対する正の走化性を調べて、そのような変異を探した。その結果、*sdf-1(ut161)* 変異体が、AWC 神経が関与する揮発性物質に対する正の走化性に異常があり、野生型とは逆に負の走化性を示すことがわかった。この変異は、将来、走化性のメカニズムの解明に重要な位置を占める可能性があると期待できる。また、本研究で得られた変異体に対して、さらに負の走化性・温度走性・頭部への機械的刺激など、他のアッセイをすることにより、別の興味ある変異が見つかるかも知れない。

第V部

謝辞

この研究及び学位論文作成に当たり指導教官の桂勲先生には、終始適切な助言及び指導を賜りました。ここに心からお礼を申し上げます。

この研究の鍵である *unc-31(e169);Ex[unc-31(+)]* を快く下さり、また実験に関して的確な助言を下さった国立遺伝学研究所構造制御研究室の石原健先生にお礼を申し上げます。

国立遺伝学研究所の各研究室の諸先生方及び総合研究大学院大学の学生の方々には、この研究に関する助言など大変お世話にありました。ここに深くお礼を申し上げます。特に構造制御研究室の方々には、大変お世話になりました。

参考文献

- Albert, P. S., S. J. Brown, and D. L. Riddle (1981). Sensory Control of Dauer Larva Formation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Neurol.* 198, 435–451.
- Avery, L. (1993). The Genetics of Feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 133, 897–917.
- Avery, L., C. I. Bargmann, and H. R. Horvitz (1993). The *Caenorhabditis elegans unc-31* Gene Affects Multiple Nervous System-Controlled Functions. *Genetics* 134, 455–464.
- Bargmann, C. I. (1993). Genetic and Cellular Analysis of Behavior in *C.elegans*. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 47–71.
- Bargmann, C. I., E. Hartwig, and H. R. Horvitz (1993). Odorant-Selective Genes and Neurons Mediate Olfaction in *C.elegans*. *Cell* 74, 515–527.
- Bargmann, C. I. and H. R. Horvitz (1991a). Chemosensory Neurons with Overlapping Functions Direct Chemotaxis to Multiple Chemicals in *C.elegans*. *Neuron* 7, 729–742.
- Bargmann, C. I. and H. R. Horvitz (1991b). Control of Larval Development by Chemosensory Neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 251, 1243–1246.
- Bargmann, C. I., J. H. Thomas, and H. R. Horvitz (1990). Chemosensory Cell Function in the Behavior and Development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55, 529–538.
- Brenner, S. (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Cassada, R. C. and R. L. Russell (1975). The Dauerlarva, a Post-Embryonic Developmental Variant of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 46, 326–342.
- Chalfie, M. and M. Au (1989). Genetic Control of Differentiation of the *Caenorhabditis elegans* Touch Receptor Neurons. *Nature* 243, 1027–1033.
- Chalfie, M. and J. White (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Chapter 11 The Nervous System, pp. 337–391. Cold Spring Harbor,

N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Coburn, C. M. and C. I. Bargmann (1996). A Putative Cyclic Nucleotide-Gated Channel Is Required for Sensory Development and Function in *C.elegans*. *Neuron* 17, 695–706.
- Culotti, J. G. and R. L. Russell (1978). Osmotic Avoidance Defective Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 90, 243–256.
- Dusenbery, D. B. (1976). Chemotactic Behavior of Mutants of the Nematode *C. elegans* That Are Defective in their Attraction to NaCl. *J. Exp. Zool.* 198, 343–352.
- Estevez, M., L. Attisano, J. L. Wrana, P. S. Albert, J. Massague, and D. L. Riddle (1993). The *daf-4* Gene Encodes a Bone Morphogenetic Protein Receptor Controlling *C.elegans* Dauer Larva Development. *Nature* 365, 644–649.
- Georgi, L. L., P. S. Albert, and D. L. Riddle (1990). *daf-1*, a *C.elegans* Gene Controlling Dauer Larva Development, Encodes a Novel Receptor Protein Kinase. *Cell* 61, 635–645.
- Golden, J. W. and D. L. Riddle (1982). A Pheromone Influences Larval Development in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 218, 578–580.
- Golden, J. W. and D. L. Riddle (1984). The *Caenorhabditis elegans* Dauer Larva: Developmental Effects of Pheromone, Food, and Temperature. *Dev. Biol.* 102, 368–378.
- Gottlieb, S. and G. Ruvkun (1994). *daf-2*, *daf-16* and *daf-23*: Genetically Interacting Genes Controlling Dauer Formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 137, 107–120.
- Guarente, L. (1993). Synthetic Enhancement in Gene Interaction: a Genetic Tool Come of Age. *Trends Genet.* 9, 362–366.
- Hamill, O. P. and D. W. McBride Jr (1996). A Supramolecular Complex Underlying Touch Sensitivity. *Trends Neurosci.* 19, 258–261.
- Hart, A. C., S. Sims, and J. M. Kaplan (1995). Synaptic Code for Sensory Modalities Revealed by *C.elegans* GLR-1 Glutamate Receptor. *Nature* 378, 82–85.

- Hedgecock, E. M., J. G. Culotti, J. N. Thomson, and L. A. Perkins (1985). Axonal Guidance Mutants of *Caenorhabditis elegans* Identified by Filling Sensory Neurons with Fluorescein Dyes. *Dev. Biol.* 111, 158–170.
- Hedgecock, E. M. and R. L. Russell (1975). Normal and Mutant Thermo-taxis in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4061–4064.
- Herman, R. K. (1984). Analysis of Genetic Mosaics of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 108, 165–180.
- Herman, R. K. (1987). Mosaic Analysis of Two Genes That Affect Nervous Structure in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 116, 377–388.
- Hodgkin, J., M. Edgley, D. L. Riddle, and D. G. Albertson (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Chapter Appendix4 Genetics, pp. 491–584. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hope, I. A. (1991). 'Promoter Trapping' in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 113, 399–408.
- Kaplan, J. M. (1996). Sensory signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 494–499.
- Komatsu, H., I. Mori, J.-S. Rhee, N. Akaike, and Y. Ohshima (1996). Mutations in a Cyclic Nucleotide-Gated Channel Lead to Abnormal Thermosensation and Chemosensation in *C.elegans*. *Neuron* 17, 707–718.
- Lewis, J. A. and J. A. Hodgkin (1977). Specific Neuroanatomical Changes in Chemosensory Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Compl. Neurol.* 172, 489–510.
- Lundquist, E. A., R. K. Herman, T. M. Rogalski, G. P. Mullen, D. G. Morerman, and J. E. Shaw (1996). The *mec-8* Gene of *C.elegans* encodes a Protein with Two RNA Recognition Motifs and Regulates Alternative Splicing of *unc-52* Transcripts. *Development* 122, 1601–1610.
- Malone, E. A. and J. H. Thomas (1994). A Screen for Nonconditional Dauer-Constitutive Mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 136, 879–886.

- Maricq, A. V., E. Peckol, M. Driscoll, and C. I. Bargmann (1995). Mechanosensory signalling in *C.elegans* Mediated by the GLR-1 Glutamate Receptor. *Nature* 378, 78–81.
- McIntire, S. L., E. Jorgensen, J. Kaplan, and H. R. Horvitz (1993). The GABAergic Nervous System of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364, 337–341.
- Miller, K. G., A. Alfonso, M. Nguyen, J. A. Crowell, C. D. Johnson, and J. B. Rand (1996). A Genetic Selection for *Caenorhabditis elegans* Synaptic Transmission Mutants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 12593–12598.
- Mori, I. and Y. Ohshima (1995). Neural Regulation of Thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 376, 344–348.
- O'Kane, C. and W. J. Gehring (1987). Detection in situ of Genomic Regulatory Elements in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84, 9123–9127.
- Oliver, S. G. (1996). From DNA Sequence to Biological Function. *Nature* 379, 597–600.
- Perkins, L. A., E. M. Hedgecock, J. N. Thomson, and J. G. Culotti (1986). Mutant Sensory Cilia in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 117, 456–487.
- Plasterk, R. H. A. (1995). Reverse Genetics: From Gene Sequence to Mutant Worm. *Methods Cell Biol.* 48, 59–80.
- Ren, P., C.-S. Lim, R. Johnsen, P. S. Albert, D. Pilgrim, and D. L. Riddle (1996). Control of *C.elegans* Larval Development by Neuronal Expression of a TGF- β Homolog. *Science* 274, 1389–1391.
- Riddle, D. L. (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Chapter 12 The Dauer Larva, pp. 393–412. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Riddle, D. L., M. M. Swanson, and P. S. Albert (1981). Interacting Genes in Nematode Dauer Formation. *Nature* 290, 668–671.
- Schackwitz, W. S., T. Inoue, and J. H. Thomas (1996). Chemosensory Neurons Function in Parallel to Mediate a Pheromone Response in *C.elegans*. *Neuron* 17, 719–728.

- Sengupta, P., J. H. Chou, and C. I. Bargmann (1996). *odr-10* Encodes a Seven Transmembrane Domain Olfactory Receptor Required for Responses to the Odorant Diacetyl. *Cell* 84, 899–909.
- Sengupta, P., H. A. Colbert, and C. I. Bargmann (1994). The *C.elegans* Gene *odr-7* Encodes an Olfactory-Specific Member of the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* 79, 971–980.
- Starich, T. A., R. K. Hermann, C. K. Kari, W.-H. Yeh, W. S. Schackwitz, M. W. Schuyler, J. H. Thomas, and D. L. Riddle (1995). Mutations Affecting the Chemosensory Neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139, 171–188.
- Sulston, J., Z. Du, K. Thomas, R. Wilson, L. Hiller, R. Staden, N. Halloran, P. Green, J. Thierry-Mieg, L. Qiu, S. Dear, A. Coulson, M. Craxton, R. Durbin, M. Berks, M. Metzstein, T. Hawkins, R. Ainscough, and R. Waterston (1992). The *C.elegans* Genome Sequencing Project: a Beginning. *Nature* 356, 37–41.
- Sulston, J. and J. Hodgkin (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Chapter Methods, pp. 587–606. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sulston, J., E. Schierenberg, J. G. White, and J. N. Thomson (1983). The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64–119.
- Tabish, M., Z. K. Siddiqui, K. Nishikawa, and S. S. Siddiqui (1995). Exclusive Expression of *C.elegans* *osm-3* Kinesin Gene in Chemosensory Neurons Open to the External Environment. *J. Mol. Biol.* 247, 377–389.
- Thomas, J. H. (1990). Genetic Analysis of Defecation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 124, 855–872.
- Thomas, J. H. (1993). Thinking About Genetic Redundancy. *Trends Genet.* 9, 395–399.
- Thomas, J. H., D. A. Birnby, and J. J. Vowels (1993). Evidence for Parallel Processing of Sensory Information Controlling Dauer Formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 134, 1105–1117.
- Vowels, J. J. and J. H. Thomas (1994). Multiple Chemosensory Defects in *daf-11* and *daf-21* Mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 138,

303–316.

- Ward, S. (1973). Chemotaxis by the Nematode *Caenorhabditis elegans*: Identification of Attractants and Analysis of the Response by Use of Mutants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70(3), 817–821.
- Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, and A. M. Weiner (1988). *Molecular Biology of the Gene* (4th ed. ed.), Chapter 22, pp. 809–810. Menlo Park: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc.
- Way, J. C. and M. Chalfie (1988). *mec-3*, a Homeobox-Containing Gene That Specifies Differentiation of the Touch Receptor Neurons in *C.elegans*. *Cell* 54, 5–16.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson, and S. Brenner (1986). The Structure of the Nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 314, 1–340.
- Williams, B. D., B. Schrank, C. Huynh, R. Schownkeen, and R. H. Waterston (1992). A Genetic Mapping System in *Caenorhabditis elegans* Based on Polymorphic Sequence-Tagged Sites. *Genetics* 131, 609–624.
- Wood, W. B. (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Chapter 1 Introduction to *C.elegans* Biology, pp. 1–16. Number 17 in Cold Spring Harbor monograph. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.