

氏 名 藤 原 学

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第402号

学位授与の日付 平成11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 che-2, a gene that is essential for formation of sensory cilia in C.elegans*

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 小原 雄治
教 授 中辻 憲夫
助 教 授 林 茂生
助 教 授 森 郁恵（名古屋大学）
森 憲作（理化学研究所）

論文内容の要旨

Many sensory neurons such as vertebrate olfactory receptor neurons have cilia at the tip. These sensory cilia have a special arrangement of microtubules, like motile cilia. Because the cilia contain transduction components including various chemo-, mechano-, photo-receptors, G proteins, adenylate cyclase, ion channels, etc., it is generally assumed that they are the primary sites of transduction where environmental stimuli are converted into neuronal signals known as receptor potentials. While signal transduction in sensory neurons has been studied to some extent, the way sensory cilia are formed during development and the spatial organization of signal components in the cilia remain to be studied.

C. elegans is a good model organism for studying the structure, function, and development of the nervous system. Of the 118 classes of neurons in *C. elegans* hermaphrodites, 24 classes (60 neurons) have sensory cilia. Mutants that are defective in the morphology of cilia have been isolated and mapped to 29 genes. The results of cloning of some of these genes suggested that transport on microtubules and signal transduction involving an appropriate level of some G α proteins are necessary for correct cilium formation. However, how they act in cilium morphogenesis remains to be studied.

Mutants that map in *che-2* gene of *C. elegans* have defects in sensory cilia. Almost all the sensory cilia in *che-2* mutants are much shorter than those of wild type animals and lack their middle and distal segment. Microtubules assemble ectopically in an abnormal posterior projection adjacent to the defective cilium. It was speculated that the abnormal posterior projection is formed either by the degeneration of a cilium once extended correctly or by the accumulation of the components of a cilium that cannot extend correctly. In either case, the *che-2* product may be required for the stability or assembly of microtubules in the middle and distal segment. *che-2* mutants also show defects in various functions mediated by ciliated sensory neurons, such as chemotaxis, osmotic avoidance, dauer formation and male mating.

In this study, I first characterized four alleles of *che-2*, since only the reference allele, *e1033*, had been analyzed in detail. I found that the allele *mn395* shows weaker defects in various phenotypes than the other alleles.

Second, I visualized cilia using a GFP fusion gene under a promoter specific to a few sensory neurons. This technique enabled me to trace the development of cilia. The results showed that the abnormality of cilia in *che-2* mutants is due to a defect in extension and not due to degeneration.

Third, *che-2* gene was cloned by the cosmid rescue method. It encodes a novel protein of 760 amino acids with four WD40 repeats in the N-terminal region. WD40 repeat is known to be involved in protein-protein interaction and formation of multiprotein complexes. Three alleles of *che-2* seem to produce truncated forms of CHE-2 protein lacking about 160 amino acids in the C-terminal region. As they show relatively severe phenotypes, the C-terminal region, which has no similarity to any known protein, must be essential for the CHE-2 function. On the other hand, the weaker allele, *mn395*, has a missense mutation in the first WD40 repeat. It may mean that

the protein-protein interaction through WD40 motif is also necessary for the CHE-2 function.

Fourth, I determined the expression pattern of CHE-2 using GFP reporter gene. CHE-2 is expressed in almost all the ciliated sensory neurons of *C. elegans*. The expression starts at the late embryonic stage when cilia are formed and continues to the adult stage. Detailed analysis of CHE-2 expression revealed its localization at cilia, suggesting CHE-2 as a component of cilia.

Fifth, rescue of functions by expressing *che-2* in a subset of sensory neurons demonstrated that *che-2* acts cell-autonomously. Furthermore, this experiment provides the basis of a method for determining the functional identity of sensory neurons, provided that the function is impaired in *che-2* mutants.

Sixth, I expressed *che-2* cDNA under the control of a *C. elegans* heat shock promoter, to know the developmental stage of *che-2* expression sufficient for cilium formation. Surprisingly, the animals could extend cilia, even if they were heat-shocked at adults, although cilia are normally formed at the embryonic stage in normal development. The cilia that extended at the adult stage by heat-shock induction were often bent. Thus, there may be a mechanism that enables cilia to extend straight in embryos, and such a mechanism may be lost at the adult stage. Moreover, the data indicates that the cilium which once extend by heat-shock induction seems to degenerate again, implying that CHE-2 is necessary for both the formation and the maintenance of sensory cilia.

These experiments suggest that CHE-2 is a novel component of sensory cilia that is necessary for their formation and maintenance. It acts cell-autonomously and probably interacts with other components with the WD40 repeats. The existence of mammalian homologue indicates a general role of CHE-2. However, the exact mode of interaction of CHE-2 with other cilium components such as those in a microtubular transport system and a signal transduction system remains to be elucidated.

論文の審査結果の要旨

感覚神経の多くはその先端が繊毛構造になっており、この感覚繊毛こそが化学物質、機械刺激などの外部刺激を神経シグナルに変換する場である。感覚神経のシグナル伝達経路は最近研究がなされてきたが、入口である感覚繊毛がどのように構築されるかは全く不明であった。申請者藤原学さんはこの問題を解くために、線虫*C.elegans*を用いて、感覚繊毛の形成に関わる遺伝子*che-2*の研究をおこなった。*C.elegans*の神経細胞は302個あり、118のクラスに分類される。このうち24のクラス(60細胞)は感覚繊毛をもつ。これらの繊毛の形態に異常が見られる突然変異体が多数分離され、29の遺伝子に分類されてきた。そのひとつ*che-2*遺伝子の変異体ではほとんどの感覚繊毛の中間部より先端が欠けて、非常に短くなっていることが知られていた。

藤原さんはまず、感覚繊毛の形態解析のために、ASHとASIという感覚神経で特異的に発現する*sra-6*プロモーターとGFPを用いてこの感覚繊毛を可視化し、*che-2*変異体では感覚繊毛が伸長しないことを明かにした。また、*dye-filling*と呼ばれる感覚器からの蛍光色素の取込み、化学走性、浸透圧忌避、雄の交尾行動を指標に表現型を詳細に調べた。

ついで、*che-2*遺伝子を変異レスキュー法でクローニングし塩基配列を決定した結果、760アミノ酸からなる新規タンパクであり、N端に4つのWD40繰返し構造を持つことを明かにした。*che-2*遺伝子の発現パターンをGFPレポーター遺伝子を用いて調べたところ、BAGとAFDを除く総ての感覚繊毛をもつ感覚神経で発現がみられること、感覚繊毛の形成が始まる胚発生後期から始まること、さらに感覚繊毛で発現していることを明かにした。

*che-2*遺伝子の発現と機能の関係を調べるため、特定の感覚神経で発現するプロモーター(*sra-6*: ASI, ASHで発現; *gcy-10*: AWB, AWC; *gpa-9*: ASJ)を用いて、*che-2*変異体において細胞特異的な発現を誘導したところ、すべて相当する感覚神経で感覚繊毛の形態が回復すると共に、*dye-filling*, 浸透圧忌避などの機能も回復することがわかった。このことから、*che-2*の機能は細胞自律的であると結論した。ついで、発現時期と機能の関係を調べるために、ヒートショックプロモーターを用いて、*che-2*変異体での*che-2*遺伝子の異時発現の効果を見た。その結果、感覚繊毛形成期である胚発生から幼虫初期の強制発現は予想通り感覚繊毛の機能回復がみられたが、驚くべきことに、成虫になってからの強制発現でも感覚繊毛の伸長と機能回復が見られた。さらに異時発現を停止すると伸長した繊毛はその後縮退していくことが示唆された。

これらのことから、*che-2*遺伝子は感覚繊毛の伸長とその維持に必

要であり、感覚繊毛は常に伸長と縮退のダイナミックなバランスの上に成り立っているという新しい概念を提出した。たしかに感覚器内で感覚繊毛が絶妙の配置をとるためには、このような機構は合理的である。

che-2 遺伝子の役割については今後の問題であるが、タンパク相互作用に関わるWD40 繰返し構造をもつことから、感覚繊毛形成に関わる他の遺伝子群との関係付けが待たれる。また、che-2 遺伝子の哺乳類ホモログが見つかっており、普遍的な過程に関与する可能性も示された。

以上のように感覚繊毛形成という神経生物学における重要な問題に対して、C.elegans という系の特長や最新技術を最大限利用して新しい概念を導き出したことは見事である。この分野への貢献は極めて大きいものであり、学位授与にふさわしいと審査員一同判断した。

公開発表に続き、5名の審査委員が藤原さんと質疑応答をおこない、実験結果の解釈、博士論文及び関連分野での知識と考察力を質した。いずれの質問に対しても的確な答えが得られ、実験系の問題点や今後やるべき課題についても明確に把握していることを確認した。英語力については、本論文が英語で書かれており、その内容・構成すべて水準以上であることから十分な実力があると判定した。以上総合して、学位にふさわしい学力、英語力を有すると判定した。