

氏 名 大 蔵 清 貴

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第680号

学位授与の日付 平成15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 線虫*C. elegans*の*sdf-9*遺伝子は蛋白質チロシンホスファ  
ターゼ様分子をコードしておりL3/dauer幼虫の発生の  
決定を調節している

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 小原 雄治  
教授 廣海 健  
助教授 平田 たつみ  
助教授 飯野 雄一（東京大学）  
グループ 林 茂生（理化学研究所）  
ディレク  
ター

Environmental stimuli regulate various aspects of animal development, but how developmental decisions are influenced by external environmental stimuli remains to be studied. The dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans* serves as a good model system to study this issue. Under favorable conditions, *C. elegans* develops successively through four larval stages (L1-L4) to the reproductive adult in three days. However, under unfavorable conditions, it forms an alternative third-stage larva called dauer larva and arrest development. The dauer larva can survive for several weeks to months without aging, while the adult animal can live only for about two weeks. When favorable conditions are encountered, the dauer larva begins to feed and resumes development to the adult stage. It is known that the decision to enter the dauer stage is regulated by three environmental signals: food, temperature, and a dauer-inducing pheromone that reflects population density. At least two of them, food and dauer pheromone, are thought to be sensed by chemosensory neurons with ciliated endings directly exposed to the external environment. The sensory neurons that participate in dauer formation have been identified by laser microsurgery. When sensory neurons ADF, ASG, ASI, and ASJ are killed at the L1 stage, wild type animals become dauer larvae and arrest development regardless of environmental conditions.

To identify genes involved in dauer signaling, many mutants that show abnormality in dauer decision have been isolated in other laboratories. Such mutants, named *daf* (dauer larva formation abnormal), consist of two groups: dauer formation-constitutive (Daf-c) mutants, which enter the dauer stage even under conditions appropriate for reproductive growth, and dauer formation-defective (Daf-d) mutants, which develop as non-dauers even under harsh conditions. By epistasis analyses, these *daf* genes have been ordered into three pathways, which act in parallel to regulate dauer formation. Molecular analyses revealed that these pathways correspond to cell-signaling pathways conserved among many animals, namely, cGMP, TGF-beta, and insulin/IGF-I pathways. The signals through the three pathways are integrated by a nuclear hormone receptor DAF-12, suggesting that the developmental decision is regulated by a lipophilic hormone(s). Recently it was reported that one of the Daf-c genes, *daf-9*, encodes a cytochrome P450 and acts upstream of *daf-12*. The results indicate that DAF-9 is probably involved in the biosynthetic pathway for a ligand(s) of DAF-12. *daf-9* mutants as well as special *daf-12* mutants that show a Daf-c phenotype form dauer-like larvae, which differ from normal dauer larvae in the shape and movement of pharynx.

Conventional Daf-c genes contain mutations that exhibit highly penetrant Daf-c phenotypes. Besides, there are many other genes in which mutations display only low-penetrance Daf-c, synthetic Daf-c (syn-Daf) and/or Hid (high temperature-induced dauer formation) phenotypes, where syn-Daf mutants and Hid mutants form dauer larvae only in a certain mutant background and at 27°C (a temperature too high for the reproduction of *C. elegans*),

respectively. The presence of such genes suggests that the *daf* pathways may be bifurcated further or modified by other pathways. Analysis of these genes will help elucidating the complicated regulatory network of dauer decision and provide a new insight into the environmental regulation of development.

Here I analyzed a new syn-Daf gene, *sdf-9*, in which five mutants have been isolated in our laboratory. These mutants exhibited a strong Daf-c phenotype in the *unc-31(e169)* background and a weak Daf-c phenotype in the wild type background at 25°C. The dauer larvae of the *unc-31; sdf-9* double mutants were normal in morphology. However, the dauer larvae of the *sdf-9* single mutants had a pharynx that pumps and that does not show the radial constriction of the normal dauer pharynx. In these aspects they resembled the dauer-like larvae of *daf-9* or *daf-12* Daf-c mutants. Genetic epistasis experiments indicated that *sdf-9* acts downstream of or parallel to *daf-3*, but upstream of *daf-16* and *daf-12*. Positional cloning revealed that *sdf-9* encodes a non-transmembrane protein tyrosine phosphatase(PTP)-like molecule that has only one PTP-like domain and no other known domains. The PTP domain normally contains the active site motif HCxxxxxR (where x represents any amino acid), but the corresponding sequence of SDF-9 is QSARGSSR. SDF-9, therefore, may not have the activity of protein tyrosine phosphatase. SDF-9 was expressed in the same cells as those expressing DAF-9 in the head. By genetic mosaic experiments with cell-specific GFP markers, I identified these cells as XXXL and XXXR cells, which were known as embryonic hypodermal cells but whose function at later stages was unknown. Killing of these cells in wild type L1 larvae induced the formation of dauer-like larvae that resemble those of *sdf-9* and *daf-9* mutants. Like the weak Daf-c alleles of *daf-9* and *daf-12*, the Daf-c phenotype of the *sdf-9* mutants was enhanced by cholesterol deprivation. Overproduction of the wild type *daf-9* gene strongly suppressed the Daf-c phenotypes of *sdf-9* and *unc-31; sdf-9*, but not those of *daf-7* (TGF-beta pathway) or *daf-2* (insulin/IGF-1 pathway). These results suggest that *sdf-9* acts with *daf-9* in the same pathway and that XXXL/R cells may produce a steroid hormone(s) for DAF-12 that regulates dauer larva formation.

## 論文の審査結果の要旨

生物の発生や行動は様々な場面で環境条件によって調節されている。生物が外界のシグナルを受容・処理・出力するメカニズムは興味深い重要な課題である。線虫 *C. elegans* は環境が悪くなると通常の発生経路からはずれ、幼虫第3期の特別な状態（耐性幼虫）に移行する。この環境シグナルには餌である細菌、温度、フェロモンが知られている。耐性幼虫移行 (*daf*) のための情報処理・出力には3つの並行の遺伝子経路、*daf-11* (cGMP) 経路、*daf-7* (TGF- $\beta$ ) 経路及び *daf-2* (insulin/IGF-1) 経路が知られており、さらに最近 *daf-9* (チトクローム P450) による別経路が示唆された。これらの経路は最終的に核内ホルモン受容体 (NHR) *daf-12* に統合される。耐性幼虫移行に関わる遺伝子の中には、2重変異にして初めて *daf* になるもの（合成 *daf* = *sdf*）が知られており、経路のさらなる分岐や、経路間の調節メカニズムなどの解明の手助けになることが期待されていた。

大蔵君は所属する研究室で分離された新たな遺伝子 *sdf-9* を研究した。まず *sdf-9* による耐性幼虫の形態が *daf-9* と酷似していたことから、*daf-9* との関連が示唆された。*sdf-9* 遺伝子を SNP マッピング、ゲノム断片でのレスキュー実験及び複数アレルの DNA シーケンシングにより同定した結果、この遺伝子はタンパク質チロシン脱リン酸化酵素に相同であった。*sdf-9* の発現は頭部神経環の前方に位置する2個の細胞の細胞質に見られ、興味深いことに同じ細胞で *daf-9* 遺伝子の発現が見られた。*daf-9* 発現細胞は他の研究室で IL1VL/R あるいは UR AVL/R と同定されていたが、大蔵君は注意深い観察やいくつかの傍証をもとに異なる細胞であると考へ、再同定を試みた。モザイク実験と細胞系譜の遠近を組み合わせた全く新しい方法を考案し、XXXL/R という機能未知の細胞であると同定した。そして XXX 細胞をレーザー破壊すると *sdf-9* 同様の表現型を示すことを明らかにし、この細胞同定を確定した。さらに *sdf-9* の表現型には培地のコレステロールが関与することを示し、さらにこれも *sdf* 表現型を示すコレステロール輸送に機能する *npc* 遺伝子が XXX 細胞でも発現していることを明らかにした。以上の結果を総合して、XXX 細胞において *sdf-9* が *daf-9* (P450) などと共に未知のステロイドホルモンの合成・分泌やその調節に関わり、このステロイドホルモンが耐性幼虫移行経路統合の *daf-12* (NHR) のリガンドとして重要な機能をしているというモデルを提案した。

このように論理的な思考と緻密な実験を積み重ね、また発現細胞同定のための斬新な方法を考案し、第4の経路における *sdf-9* 遺伝子の働きやこれまで機能未知であった XXX 細胞の役割解明に糸口をつけたことは見事である。耐性幼虫移行経路解明だけでなく、情報伝達経路の遺伝子機能解明研究の分野へのユニークかつ大きな貢献であり、審査員全員一致して学位授与に相応しいと判断した。

公開発表に続き、5名の審査委員が大蔵君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。特に実験系の問題点、推論の検証法、さらには今後の課題についても十分な理解がなされていることを確認し、学位にふさわしい学力を有していると判定した。英語力については、英文の要旨と現在国際誌に投稿中の論文原稿から十分な実力があると判定した。

以上総合して学位授与に相応しいと判定した。