

専攻	材料システム工学	学籍番号	873525	指導教官氏名	Siddiqui, S. S.
申請者氏名	福重 哲也				鈴木 慈郎
					青木 克之

論文要旨

論文題目	Molecular and Genetic study of <i>Alpha Tubulin Gene Family</i> during the Development of <i>Caenorhabditis elegans</i> .
------	---

(要旨 1,200 字以内)

微小管は細胞分裂、べん毛 せん毛運動、神経軸索輸送などの多種多様な生命現象をつかさどることが知られている。しかし、微小管を構成する個々の α -および β -チューブリンアイソタイプが機能の異なる細胞においてどのような役割を持っているのかはほとんど知られていない。著者は特に α -チューブリンアイソタイプに注目し、遺伝学や分子生物学的アプローチが容易であるモデル動物として線虫*C.エレガンス*を用いてその発生過程における機能解析を行った。

5 本論文では、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ および $\alpha 4$ -チューブリン遺伝子をクローニングし、それらの塩基配列及び発現組織を決定した。これらのアイソタイプの中で同一染色体(第1染色体)上に存在し、また高等動物であるヒト、マウス、ショウジョウバエなどの α -チューブリンのアミノ酸配列と高い相同性が示された $\alpha 1$ および $\alpha 2$ -チューブリン遺伝子の詳細な解析を初めに行った。

10 これらの遺伝子の発生過程における転写パターンとメッセンジャーRNAの特異的な成熟過程の解析を行った。結果として、これら2つの α -チューブリン遺伝子の転写量は幼虫期であるL1からL3期と増加していき、L4期、若い成虫、成熟し切った成虫になると発現は基底状態へと減少していくパターンをとった。この転写量のパターンは胚発生後における神経細胞を含む多くの細胞の発生分化過程の挙動と一致しており、それらの発生過程における細胞の働きに重要な役割を担うことが示唆された。また転写時において、これらの2つ遺伝子で、5'非翻訳領域に22塩基のリーダー配列が付加される、トランススプライシング反応を見出すことが出来た。

15 次に、これら α -チューブリン遺伝子において発生分化過程のどのような細胞において実際発現されているかを、これら遺伝子の調節領域とLacZ遺伝子との融合遺伝子を顕微注入法により野生株に導入した形質転換体の観察によって決定した。 $\alpha 2$ -チューブリン遺伝子は腸管細胞、6組の咽頭筋肉細胞および限られた神経細胞(腹側運動神経細胞のDBとVB,腰部神経節のPLMLとPLMR細胞、肛門の前側にある神経節のPVT細胞、そして頭部にある背側神経節のALA細胞など)に発現が認められた。一方、 $\alpha 1$ -チューブリン遺伝子では唯一神経細胞のみでしか発現が観察されなかった。これらの発現様式より興味深いことに、線虫からヒトに至る高等動物の神経系で発現している α -チューブリンアイソタイプにおいてそのカルボキシル末端に
20 共通なアミノ酸配列(EEEGEEY)の存在を見出した。この配列が神経系での特別な機能を担うものではないかと考えられた。LacZ融合遺伝子の強い発現が観察されたのは神経細胞の内の6つの感覚神経細胞(ALML, ALMR, PLML, PLMR, AVM, PVM)と腹側に沿って存在する多くの運動神経細胞群(VA, VB, DA, DB)であった。

また、極く少数の虫においてではあるが化学的刺激に反応する細胞群の内のADF細胞で発現が観察され、その細胞で働く微小管関連蛋白質として先に同定したキネシン蛋白質との関連が示唆された。これら2つのチューブリン遺伝子の発現パターンはかなり異なっていたが、腹側の運動神経細胞のVB, DBと感覚神経細胞のPLML, PLMRのような細胞では共通に発現が観察された。このように、特定のアイソタイプの限定された組織での発現だけでなく、一部の感覚神経細胞や運動神経細胞では少なくともこれらの α -チューブリンが多重に機能していることになり、個々のアイソタイプのもつ多様な機能の組み合わせによってもその細胞特有の微小管を形成することを示した。このことはこれら2つの α -チューブリン遺伝子の発現パターンがFultonとSimpsonにより提唱されたマルチチューブリン仮説に従うことを示した。

$\alpha 3$ -チューブリン遺伝子の全塩基配列を決定したところ、この遺伝子は他の2つの遺伝子配列に比べイントロンサイズが大きいなど構造的にかなり異なっていることが明らかとなった。そして、注目すべき点は α -チューブリンのアセチル化が起こるとされる40番目のアミノ酸、ロイシンをもつことであり、蛋白質翻訳後にそのような修飾作用を受ける可能性があることである。線虫C.エレガンス(野生株)では感覚神経細胞と尾部にある神経節のPVR細胞などの神経系にアセチル化された α -チューブリンの存在がそれらを認識するモノクローナル抗体(6-11B-1)を用いて同定されている。一方、感覚異常を起こしている突然変異体*mec-12(u76)*ではこれらの細胞にはアセチル化された α -チューブリンの発現は観察されてない。よって、この $\alpha 3$ -チューブリン遺伝子がこれらの神経細胞において機能的に関連があるのではないかと示唆された。そこで、 $\alpha 3$ -チューブリン遺伝子を含むSQ#TF1クローンを突然変異体*mec-12(u76)*に顕微注入法により導入した。形質転換体は感覚異常が正常となり、また6-11B-1抗体を用いた観察においても野生株と同様のパターンが得られた。これらの結果より突然変異体*mec-12*の原因遺伝子は $\alpha 3$ -チューブリン遺伝子であることと、その蛋白質は翻訳後にアセチル化されることを明確にした。この遺伝子の時空間的発現を観察するため、 $\alpha 3$ -チューブリン遺伝子の調節領域とLacZ遺伝子との融合遺伝子を用いた発現パターン解析を行なったところ、胚発生後から幼虫L4期において6つの感覚神経細胞、頭部の知覚神経細胞に強い発現を示し、またL3からL4期においていくつかの腹側運動神経細胞に発現が認められた。さらに、突然変異体*mec-12(u76)*の $\alpha 3$ -チューブリン遺伝子の変異部位を決定するため遺伝子多型解析を行い、アミノ酸コード領域の5'側SalI部位に変異が生じていることを明かにした。

最後に顕微注入法の改善すべき点を検討した。現在、C.エレガンスでは主に2種類(*rol-6*, *dpy-20*)の形質転換マーカーが用いられている。しかし、変異体を復帰させる*dpy-20*の系では、 $\alpha 1$ -チューブリン遺伝子とLacZ遺伝子との融合遺伝子による神経系での発現パターンが、*rol-6*やマーカーを用いない系と異なる観察結果が得られた。これによりLacZ融合遺伝子を用いた形質転換法による細胞の同定において、形質転換マーカーの選択の重要性を強く示すものとなった。