

## 論文内容の要旨

### 題目

プログラム細胞死の進行と形態形成に關与する  
線虫 *cdl-1* 遺伝子の機能解析

氏名 児玉有希

本研究では *C. elegans cdl-1* (cell death lethal)変異体について解析をおこなった。*cdl-1* 変異体はそもそもプログラム細胞死（アポトーシス）関連変異体として単離されたものである。

*cdl-1* 変異体は胚性致死で、その最終表現型において特徴的な形態異常と過剰に蓄積した死細胞が観察される（図1）。

プログラム細胞死は多細胞生物における組織形成や器官形成、また恒常性の維持等に必須の生理的な過程である。線虫 *C. elegans* はプログラム細胞死の解析に

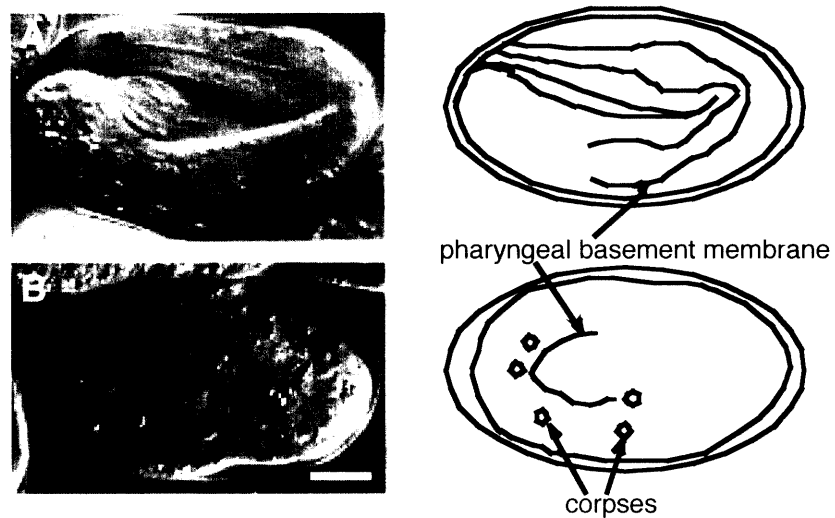


図1 *cdl-1* 変異体の最終表現型

A 孵化直前の野生型胚および B *cdl-1* 変異体最終表現型を示した。*cdl-1* 胚では多数の死細胞のほか体の伸長不全および咽頭(pharynx)の形態形成不全が観察された。scale bar=10mm

において重要な役割を果たしてきた。線虫 *C. elegans* では胚発生中に多くの細胞がプログラム細胞死を行う。胚発生中に生じた 671 個の細胞のうち 113 個がプログラム細胞死で失われる。プログラム細胞死による死細胞はノマルスキ顕微鏡下で平らな円盤状に観察され、隣接する細胞により速やかに取り込まれ分解される。線虫 *C. elegans* においてプログラム細胞死は細胞死の決定、実行、死細胞の貪食、分解の 4 つの段階に分けて考えられている。細胞死の実行過程では caspase のホモログである *ced-3* 等の因子が機能しており、哺乳類まで保存された遺伝学的経路が存在している。

*cdl-1* 変異体の胚発生の経時的な観察を行った結果、野生型に比べ、プログラム細胞死による死細胞が胚発生初期には少なく、胚発生後期には過剰に観察されることが分かった。

胚発生中のそれぞれの死細胞の挙動を追ったところ、*cdl-1* 変異体では全体的に死細胞の出現が遅れ、さらに死細胞が長時間にわたって分解されず残存するという表現型が観察された（図 2）。また、咽頭原基の開口部への移動不全、胚発生時の前後軸方向への伸長不全等の特徴的な形態形成不全が観察された。このように死細胞の出現と除去の双方に異常を示し、さらに組織特異的な形態形成不全の表現型を示すようなプログラム細胞死関連変異体はこれまで報告されておらず、*cdl-1* 変異体の解析によりプログラム細胞死の遺伝学的経路に新たな知見を与えることが期待された。

*cdl-1* 変異について、まず遺伝学的な解析をおこなった。プログラム細胞死がおこらなくなる変異と *cdl-1* 変異の二重変異体を作製したところ、死細胞は観察されなくなるが咽頭や体の伸長に関する形態形成不全

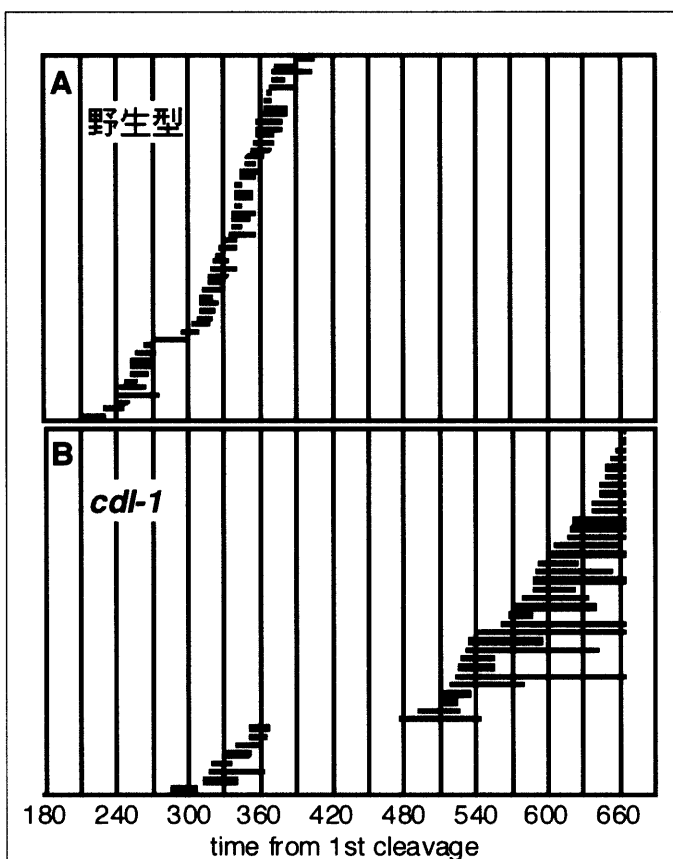


図 2 死細胞の残存時間

A 野生型、B *cdl-1(e2510)*。それぞれ 1 つの胚の中に観察された死細胞について残存時間を示した。横棒それぞれが 1 つの死細胞に対応し、出現してから見られなくなるまでの時間が示されている。A の野生型胚では胚が動き出す時点まで観察をおこなった。B の変異体胚では録画が終了した時点まで観察した。

また致死性については影響が見られなかった。したがって、*cdl-1* 変異体で観察された死細胞

胞が通常のプログラム細胞死の経路を介して生成されていること、さらに形態形成不全あるいは致死性の表現型については異常なプログラム細胞死過程の進行に依存しないことが確認された。

続いて *cdl-1* 変異の原因遺伝子をクローニングし、それが stem-loop binding protein (SLBP) ホモログをコードしていることを見いだした。*cdl-1* 遺伝子は 367 アミノ酸からなるペプチドをコードしており、他生物由来の SLBP と、ヒストン mRNA 3' UTR の stem-loop 構造と特異的に結合するのに必要な領域について特に高い相同性を示した。

ヒストンの生合成は、細胞周期にしたがって転写および転写後の 2 つのレベルで厳密に制御されている。転写量の増加および mRNA の安定化により、ヒストン mRNA は G1 期から S 期にかけて 25-30 倍に増加する。哺乳類の培養細胞の系でヒストン遺伝子の転写活性は G1 期と S 期の境界で 10 倍増加する。この転写活性の変化は cyclin E/CDK2 のシグナル伝達系を介して引き起こされる。転写後レベルでの発現制御に重要な役割を担っている

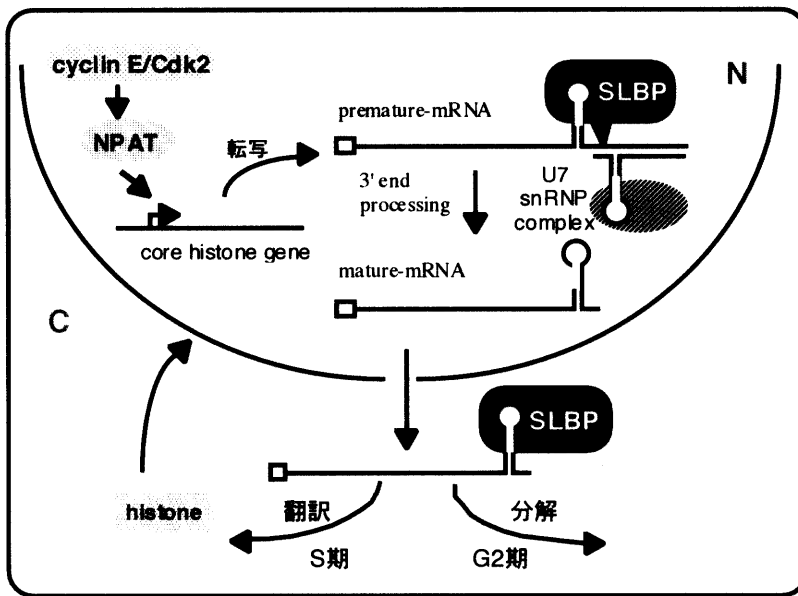


図3 SLBPとヒストン発現制御

のがヒストン mRNA の 3' UTR に保存されている stem-loop 構造である。ヒストン mRNA は後生動物の一般的な mRNA と違って poly (A)構造を持たず、かわりに 3' UTR に共通の stem-loop 構造を持っている。この stem-loop 構造が pre-mRNA の 3'端のプロセッシング、核外移行、翻訳さらには mRNA の安定性

の制御といった転写後の発現制御に必要であると考えられている。stem-loop binding protein (SLBP)/hairpin-binding protein (HBP)はもともとヒストン mRNA の 3' UTR の stem-loop 構造に結合するタンパク質としてクローニングされたものである。生化学的な解析あるいは遺伝学的な解析から SLBP が前述したヒストンの転写後レベルの発現制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

*cdl-1* 遺伝子が SLBP ホモログをコードすることから、ヒストンの転写後の発現制御に関与している可能性が考えられた。*C. elegans* の大部分のコアヒストン遺伝子の 3' UTR 領域には 34bp の stem-loop 構造を形成する保存された領域が存在する。そこで CDL-1 タンパク

質がコアヒストン mRNA に結合してその転写後の発現制御に関わっている可能性を検討するため、yeast three-hybrid system を用いて解析をおこなったところ、CDL-1 タンパク質とコアヒストン mRNA の 3' UTR に存在する stem-loop 構造が相互作用することが確認された。さらに変異体型の CDL-1 タンパク質は stem-loop 構造への結合活性が低下していることを見いだした。そこで、コアヒストン遺伝子の発現を RNA 干渉法(RNA interference, RNAi) を用いて減少させたところ、*cdl-1* 変異体によく似た表現型が再現された。以上の結果より、CDL-1 はコアヒストン mRNA に直接結合することでコアヒストンタンパク質の発現制御に寄与していると考えられた。

*cdl-1* 遺伝子あるいはコアヒストン遺伝子の機能を RNAi 法を用いて破壊した場合、変異体で観察された表現型に加え、初期胚で発生を停止する表現型を示す個体が得られた。これらの初期胚発生停止個体における初期卵割を観察したところ、核分裂時のクロマチン凝縮および分離に異常が確認された。それらでは核分裂の際にクロマチンが十分凝縮せず、分裂した核の間に DNA が橋状に存在していた。*cdl-1* の機能破壊によりコアヒストンの発現量が減少し、ヌクレオソーム構造が正常に形成されないために、核分裂時のクロマチン構造の制御に異常が生じたものと考えられる。

クロマチン構造を形成するヌクレオソームは、四種類のコアヒストンタンパク質(H2A, H2B, H3, H4)それぞれ二分子ずつからなるヒストン八量体に、およそ 200 bp の DNA 鎖が会合して形成される。以上の結果から、*cdl-1* 変異体ではコアヒストンの発現が不十分であるためにクロマチン構造が異常となっていると想像される。染色体のクロマチン構造は細胞周期やアポトーシスの進行、あるいは細胞の分化等に応じて大きく変化することが知られている。細胞分裂時にはクロマチンの十分な凝縮が必須である。アポトーシス細胞においてはクロマチン凝縮とヌクレオソームレベルへの DNA 断片化が起こる。さらにクロマチン構造は遺伝子の発現制御にも重要な役割を果たしている。最近の研究からクロマチン構造の変化はヒストンタンパク質のリン酸化やアセチル化等の化学修飾により引き起こされているということが分かってきた。プログラム細胞死の際の死細胞の変性過程、特にクロマチン凝縮や DNA 分解過程、および形態形成時の遺伝子発現制御等にはクロマチン構造が重要な役割を果たしていると考えられる。*cdl-1* 変異体ではクロマチン構造が異常なためにその構造変換の制御が正常におこなわれず、ゆえにプログラム細胞死や形態形成に異常が観察されたものと考えられる。