

*ptr-18/Patched-related*によるHedgehog関連タンパク質を介した  
神経前駆細胞の静止期制御機構の解明

千代田 大尚

# 博士論文

*ptr-18/Patched-related* による Hedgehog 関連タンパク質  
を介した神経前駆細胞の静止期制御機構の解明

東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学専攻

平成 29 年度進学

氏 名 千代田 大尚

指導教員 北川 大樹



## 目次

1. 序論	P3
2. 実験方法	P7
3. 実験結果	P28
4. 考察	P40
5. 参考文献	P44
6. 図表	P51

# 1. 序論

多細胞動物では、幹細胞や前駆細胞の静止期状態と活性化状態の往来が適切に制御されることで、組織や器官などの恒常性維持に貢献すると考えられている。このような静止期状態と活性化状態の頻度は、食餌や運動、損傷などの生理現象に応答して変化し (Li and Clevers, 2010)、その制御機構の破綻は細胞の癌化や老化などと密接に関連することが示唆されている (Cheung and Rando, 2013)。例えばマウスにおいて、腫瘍抑制因子の *PTEN* を機能阻害すると、脾臓や肝臓といった組織の肥大化が認められる (Zhang et al., 2006)。また腫瘍抑制因子の cyclin-dependent kinase (CDK) の抑制因子である *p57* は、造血幹細胞の静止期状態の維持に重要であることが報告されている (Matsumoto et al., 2011)。さらに、老化したマウスの筋肉幹細胞は、静止期状態から活性化する頻度が著しく低下する (Rodgers et al., 2014)。このように、様々な生理現象に幹・前駆細胞の静止期制御は大きく寄与するにも関わらず、生体内における幹・前駆細胞の運命や挙動を追跡観察することは非常に困難であるため、そのメカニズムに関しては不明な点が多く残っている。

我々は、細胞系譜が明らかになっており (Sulston, 1976; Sulston and Horvitz, 1977)、体が透明で生きてまま観察することができる線虫 *C. elegans* (以下「線虫」) を用いて、幹・前駆細胞の静止期制御に関与する遺伝子の研究をおこなってきた。孵化直後の1齢幼虫期の線虫は、飢餓条件下におかれると発生を一時停止したまま数日生存することができる (Johnson et al., 1984)。その際に、神経前駆細胞 (P細胞やQR/QL細胞) や中胚葉性前駆細胞 (M細胞)、始原生殖細胞 (Z2/Z3) といった、あらゆる組織の幹細胞や前駆細胞は静止期状態で数日間維持される (Baugh and Sternberg, 2006; Fukuyama et al., 2006; Hong et al., 1998; Zheng et al., 2018)。このような発生停止に、インスリン/IGF シグナリング (IIS) 経路は重要な役割をもつ。IIS 経路を抑制する *daf-18/PTEN* や、IIS 経路の活性化によって抑制される転写因子をコードする *daf-16/FoxO* は、飢餓条件下における P細胞や M細胞といった様々な前駆細胞の静止期維持に必須であることが報告されている (Baugh and Sternberg, 2006; Fukuyama et al., 2015; Kaplan et al., 2015)。また、microRNA miR-235 は、*daf-16/FoxO* の下流で機能し、飢餓条件下における P細胞や M細胞などの前駆細胞の静止期維持に必須であることが報告されている (Kasuga et al., 2013)。

我々はこれまでに、miR-235 の標的因子として、*hedgehog(hh)-related(hh-r)* 遺伝子群の *grl-5* や *grl-7* を同定し、miR-235 がこれらの *grl* 遺伝子の発現を抑制することで P細胞の静止期を維持することを報告してきた (Kume et al., 2019)。線虫の *hh-r* 遺伝子群は、他の動物種の Hh と同じ進化的起源を

もつことが、一次配列比較により提唱されており、一次構造の違いから *grd* や *grl*、*wrt*、*qua* といったサブグループに分類される (Aspöck *et al.* 1999; Hao *et al.* 2006b; 図.1)。

また、PTR (Patched related)/PTCHD (Patched domain containing)タンパク質は、コレステロール輸送に関与するニーマン・ピック病 C 型 (NPC)1 タンパク質や、Hh タンパク質の分泌に関与する Dispatched タンパク質と同様に、ヘッジホッグの受容体である Patched と類似した複数回膜貫通領域をもつ (Burke *et al.*, 1999; Carstea *et al.*, 1997; D'Angelo *et al.*, 2015; Kuwabara *et al.*, 2000; Loftus *et al.*, 1997)。この複数回膜貫通領域には、コレステロールの結合やセンシングに関与するステロールセンシングドメイン(SSD)が存在する(Kuwabara *et al.*, 2000)。これらのタンパク質群は、グラム陰性細菌の排出トランスポーターである resistance, nodulation, and division (RND) トランスポーターを含む RND スーパーファミリーに属し、RND トランスポーターのトランスポーター活性に重要である GXXDD モチーフや GXXXD/E モチーフが、Patched や Dispatched、NPC1、PTR/PTCHD の複数回膜貫通領域にも存在する (Tseng *et al.*, 1999)。PTR/PTCHD タンパク質は、線虫からヒトに至るまでの動物種で見出されるものの、その生理機能には未知の点が多い。ヒト *ptchd1* 遺伝子の変異や欠損は、自閉症スペクトラム症候群や学習障害、多動性・注意欠如障害の患者で見出されている (Chaudhry *et al.*, 2015; Filges *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2008; Noor *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2010; Torrico *et al.*, 2015)。また、*ptchd1* 欠損マウスでは多動性・注意欠如障害様の表現型を呈することから、マウスでも神経発生発達障害の原因になり得ることが提唱されている (Wells *et al.*, 2016)。一方、ショウジョウバエの *ptr* の null 変異体は、胚性致死を示す (Bolatto *et al.*, 2015)。線虫では PTR をコードする *daf-6* が頭部の感覚神経の形成に関与することが知られている (Perens and Shaham, 2005)。培養細胞を用いた実験より、PTCHD が Hh シグナリング経路に関与する可能性が示唆されており、Patched ノックアウトマウスの胎仔に由来する線維芽細胞 (MEFs)において、Patched の代わりに PTCHD1 を過剰発現しても Gli の転写活性を抑制しない (Ung *et al.*, 2018)。しかしながら、Hh 感受性細胞である 10T1/2 細胞において、PTCHD1 や PTCHD4 の過剰発現が Gli の転写活性を抑制することが報告されている (Chung *et al.*, 2014; Noor *et al.*, 2010)。つまり、PTCHD1 は Patched の機能を代替できないものの、Patched と同様に Hh シグナル伝達経路を抑制する可能性が示唆される。

線虫は、Hh や Smoothened といった Hh シグナリング経路を構成する複数の遺伝子をもたない (Bürglin and Kuwabara, 2006)。しかしながら、線虫は、PATCHED や PTR/PTCHD をそれぞれコード

する *ptc* や *ptr* 遺伝子に加え、他の動物の Hh と進化的に起源が同じであると考えられているヘッジホッグ関連遺伝子群 *hh-related* をもつ (Aspöck et al., 1999)。これらの *ptc* や *ptr*、*hh-r* の欠失変異体や Feeding RNAi における機能阻害において、脱皮を完了できない表現型を示すことが報告されている (Hao et al., 2006b; Zugasti et al., 2005)。また、PTR をコードする *ptr-24* 遺伝子は、餌である大腸菌の代謝環境に応じた脂質の蓄積を抑制するのに対して、*hh-r* である *grl-21* は脂質の蓄積を促進する (Lin and Wang, 2017)。よって、哺乳動物の PTCHD と類似して、線虫における *ptr* と *hh-r* の相互作用が推測されるが、そのメカニズムの詳細に関しては不明な点が多い。

今回私は、PTR /PTCHD タンパク質をコードする *ptr-18* 遺伝子が、P 細胞や M 細胞といった前駆細胞の貧栄養条件下における静止期維持に必須であることを見出した。また、*ptr-18* 変異体でみられる P 細胞の活性化に、上述した先行研究にて、miR-235 標的遺伝子で P 細胞の活性化の促進に関与する *hh-r* である *grl-5* や *grl-7* の活性が必須であることから、*ptr-18* は、これらの *grl* 遺伝子群を抑制することが示唆された。*grl-5* や *grl-7* に加えて、*grl-2* や *grl-4*、*grl-10*、*grl-14*、*grl-15*、*grl-21*、*grl-27* といった複数の *grl* 遺伝子群が、表皮細胞で発現することが、レポーター遺伝子をもちいた先行研究で示唆されているが (Hao et al., 2006a)、その中でも *grl-27* が、*grl-5* や *grl-7* と同様に、*ptr-18* 変異体における P 細胞の活性化に寄与することを見出した。また、PTR-18 と GRL-7 のレポータータンパク質をもちいた解析により、これらのタンパク質は、孵化直前の胚で、最初に表皮細胞の頂端膜近傍に局在し、その後エンドサイトーシスを介して内在化し、リソソームで分解される可能性が示唆された。さらに、*ptr-18* 変異体では、孵化後にも表皮細胞の頂端側に分泌された GRL-7 レポータータンパク質の蓄積が認められることから、PTR-18 は GRL-7、そしておそらく GRL-5 や GRL-27 といった特定の GRL タンパク質群を、孵化する前にエンドサイトーシスを介して細胞外から取り除くことによって、不必要な P 細胞の活性化を未然に防いでいる可能性が示唆された。また、上述した結果に加え、GRL とは一次構造が異なる Hh-r タンパク質をコードする *grd-5* と *grd-10* も *ptr-18* 変異体における P 細胞の活性化に寄与すること、さらに、*grl* や *grd* といった *hh-r* 遺伝子群に加え、インスリン様ペプチドをコード *ins-4* 遺伝子や sorting nexin をコードする *snx-1* なども、*ptr-18* による P 細胞の静止期制御に関与することを示唆する知見を見出したので、本論文の後半で議論する。

## 2. 実験方法

## 2-1. 線虫の培養

線虫の培養・維持は定法(Brenner, 1974)、に従い以下の方法で行った。NGM 培地 (NaCl 3 g, Bacto Peptone 2.5 g, Ager Powder 20 g, 1 M KPO<sub>4</sub> 25 mL, 1 M MgSO<sub>4</sub> 1 mL, 1 M CaCl<sub>2</sub> 1 mL, 5 mg/mL cholesterol 1 mL, double distilled water (DDW) 1 L)を注いだ 35 mm と 60 mm のプレートと 4 倍量の Bacto peptone を加えた NGM 培地を注いだ 100 mm プレート (4x peptone)に、大腸菌 (OP50)を塗布したものを用いて 15 や 20、25°C で培養及び維持をおこなった。線虫の継代飼育は、抱卵した雌雄同体成虫を 10 匹 60 mm プレートに移し、4~5 日後に植え継ぎをおこなった。使用した株は以下の表に記す。

### -使用した株

CF1038	<i>daf-16(mu86) I</i>
MT17997	<i>mir-235(n4504) I</i>
MY1	<i>ptr-8(WBVar01902623) II</i>
NC300	<i>wdIs5</i>
PK172	<i>ptc-1(ok122) unc-4(e120)/mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444) II</i>
RB1693	<i>ptr-10(ok2106) I</i>
RB2223	<i>grd-10(ok3008) IV</i>
RB2393	<i>ptr-20(ok3263) II</i>
RB2542	<i>ptr-18(ok3532) II</i>
VC1067	<i>ptr-5(gk472) X</i>
VC1110	<i>+/szT1[lon-2(e678)] I; ptr-4(ok1576)/szT1 X</i>
VC20409	<i>ptr-11(gk100342) I</i>
VC20514	<i>ptr-3(gk333566) II</i>
VC3219	<i>ptr-23(ok3663) I</i>
VC40042	<i>ptr-12(gk105502) I</i>
VC851	<i>ptr-2(ok1338)/szT1 [lon-2(e678)] I; +/szT1 X</i>
YB1812	<i>ayIs6 X</i>

YB2891	<i>ptr-18(ok3532) II</i>
YB3028	<i>ptr-18(ok3532) II; ayIs6 X</i>
YB3092	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2021[pMF826.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) +pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3093	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2022[pMF826.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50ng/μl) +pRF4 (50ng/μl)]</i>
YB3094	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2023[pMF826.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) +pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3127	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2046[pCH1.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3128	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2047[pCH1.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3129	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2048[pCH1.1(100ng/μl) + pMF435.1(50ng/μl) + pRF4 (50ng/μl)]</i>
YB3131	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2051[pCH15.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3132	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2052[pCH15.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3133	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2053[pCH15.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3149	<i>tdEx2064[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH31.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3150	<i>tdEx2065[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH31.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3151	<i>tdEx2066[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH31.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3154	<i>tdEx2069[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH32.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3155	<i>tdEx2070[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH32.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3156	<i>tdEx2071[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH32.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3216	<i>tdEx2096[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH30.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3217	<i>tdEx2097[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH30.1 (10 ng/μl)]</i>



YB3218	<i>tdEx2098[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH30.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3219	<i>tdEx2099[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH33.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3220	<i>tdEx2100[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH33.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3221	<i>tdEx2101[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH33.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3228	<i>tdEx2108[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH48.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3229	<i>tdEx2109[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH48.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3230	<i>tdEx2110[pRF4 (50 ng/μl) + pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH48.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3231	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2111[pCH29.1(1 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3232	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2112[pCH29.1(1 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3233	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2113[pCH29.1(1 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>
YB3287	<i>ptr-18(ok3532) II</i>
YB3287	<i>ptr-18(ok3532) II</i>
YB3289	<i>grl-7(ok2644) V</i>
YB3291	<i>grd-10(ok3008) IV</i>
YB3293	<i>ptr-18(ok3532) II;grd-10(ok3008) IV</i>
YB3295	<i>ptr-18(ok3532) II;grl-7(ok2644) V</i>
YB3304	<i>grd-5(td98[Pgrd-5::gfp::loxp-sec-loxp::grd-5]) V</i>
YB3317	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2172[pHK497.1(1 ng/μL) + pHK497.1(10 ng/μL) + pCH51.1(1 ng/μL) + pKM66.1(25 ng/μL) + pRF4(50 ng/μL)]</i>
YB3318	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2173[pHK497.1(1 ng/μL) + pHK497.1(10 ng/μL) + pCH51.1(1 ng/μL) + pKM66.1(25 ng/μL) + pRF4(50 ng/μL)]</i>
YB3319	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2174[pHK497.1(1 ng/μL) + pHK497.1(10 ng/μL) + pCH51.1(1 ng/μL) + pKM66.1(25 ng/μL) + pRF4(50 ng/μL)]</i>
YB3349	<i>tdEx2198[pMF435.1 (50 ng/μl) + pCH54.1 (50 ng/μl)]</i>
YB3398	<i>grd-5(td101) V</i>
YB3581	<i>ptr-18(ok3532) II;grd-5(td101) V</i>

YB3582	<i>tdEx2258[pRF4 (10 ng/μl) + pMF449.1 (1 ng/μl) + pCH82.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3587	<i>tdEx2260[pRF4 (10 ng/μl) + pMF449.1 (1 ng/μl) + pCH85.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3603	<i>tdEx2261[pRF4 (50 ng/μl) + pMF846.2 (10 ng/μl) + pCH82.1 (10 ng/μl) + Pstr-1::gfp (10 ng/μl)]</i>
YB3608	<i>tdEx2263[pRF4 (50 ng/μl) + pMF846.2 (10 ng/μl) + pCH85.1 (10 ng/μl) + Pstr-1::gfp (10 ng/μl)]</i>
YB3644	<i>ptr-18(ok3532) II;tdEx2258[pRF4 (10 ng/μl) + pMF449.1 (1 ng/μl) + pCH82.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3645	<i>ptr-18(ok3532) II;tdEx2260[pRF4 (10 ng/μl) + pMF449.1 (1 ng/μl) + pCH85.1 (10 ng/μl)]</i>
YB3753	<i>mir-235(n4504) I;tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3754	<i>daf-16(mu86) III;tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3786	<i>grl-2(ok2721) V</i>
YB3788	<i>grl-4(ok1076) IV</i>
YB3790	<i>grl-5(ok2671) V</i>
YB3793	<i>grl-21(ok2791) IV</i>
YB3793	<i>grl-21(ok2791) IV</i>
YB3795	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2269[pCH27.1(5 ng/μl) + pMF435.1(5 ng/μl) + pRF4(25 ng/μl)]</i>
YB3806	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2269[pCH27.1(5 ng/μl) + pMF435.1(5 ng/μl) + pRF4(25 ng/μl)]</i>
YB3807	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2269[pCH27.1(5 ng/μl) + pMF435.1(5 ng/μl) + pRF4(25 ng/μl)]</i>
YB3808	<i>tdEx2303[pMF846.2(10 ng/μl) + pCH98.1(1 ng/μl) + pRF4(50 ng/μl)]</i>
YB3809	<i>tdIs54[pMF846.2(10 ng/μl) + pDP#MM51(50 ng/μl)]; tdEx2274[pCH83.1(1 ng/μl) + pRF4(100 ng/μl)]</i>
YB3820	<i>tdEx2314[pMF846.2(5 ng/μl) + pCH93.1(0.5 ng/μl) + pRF4(50 ng/μl)]</i>
YB3842	<i>ptr-18(ok3532) II; snx-1(tm847) X; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3843	<i>snx-1(tm847) X; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3844	<i>ptr-18(ok3532) II; snx-3(tm1595) I; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) +</i>

	<i>pRF4(10 ng/μl)</i>
YB3847	<i>grl-15(ok3455) III</i>
YB3892	<i>ptr-18(ok3532) II; snx-9(tm2423) IV; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3893	<i>snx-9(tm2423) IV; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3894	<i>ptr-18(ok3532) II; snx-17(tm3779) X; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3895	<i>snx-17(tm3779) X; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3896	<i>tdEx2347[pMF846.2(10 ng/μl) + pCH101.1(1 ng/μl) + pRF4(50 ng/μl)]</i>
YB3897	<i>tdEx2347[pMF846.2(10 ng/μl) + pMF875.1(1 ng/μl) + pRF4(50 ng/μl)]</i>
YB3921	<i>ptr-18(ok3532) II; snx-13(tm2404) V; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3922	<i>snx-13(tm2404) V; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3923	<i>ptr-18(ok3532) II; snx-27(tm5356) I; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3924	<i>snx-27(tm5356) I; tdEx2259[pMF449.1(1 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3949	<i>tdEx2388[pMF826.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3954	<i>tdEx2394[pCH106.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3957	<i>tedEx2397[pCH107.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB3967	<i>tdEx2406[pCH110.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4026	<i>tdIs56[pCH83.1(1 ng/μl) + pRF4(100 ng/μl)]</i>
YB4050	<i>tdEx2438[pCH115.1(100 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(50 ng/μl)]</i>
YB4053	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2441[pMF826.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4057	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2445[pCH106.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>

YB4058	<i>ptr-18(ok3532) II; tedEx2446[pCH107.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4122	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2438[pCH115.1(100 ng/μl) + pCH83.1(10 ng/μl) + pRF4(50 ng/μl)]</i>
YB4143	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2393[pCH106.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4144	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2394[pCH106.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4145	<i>ptr-18(ok3532) II; tedEx2396[pCH107.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4146	<i>ptr-18(ok3532) II; tedEx2397[pCH107.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4147	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2405[pCH110.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4148	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2406[pCH110.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4149	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2407[pCH110.1(20 ng/μl) + pMF435.1(20 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4313	<i>tdEx2561[pCH121.1(10 ng/μl) + pMF450.1(1 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4339	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEx2561[pCH121.1(10 ng/μl) + pMF450.1(1 ng/μl) + pRF4(10 ng/μl)]</i>
YB4359	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2046[pCH1.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]; tdIs56[pCH83.1(1 ng/μl) + pRF4(100 ng/μl)]</i>
YB4360	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2047[pCH1.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]; tdIs56[pCH83.1(1 ng/μl) + pRF4(100 ng/μl)]</i>
YB4361	<i>ptr-18(ok3532) II; tdEX2048[pCH1.1(100 ng/μl) + pMF435.1(50 ng/μl) + pRF4 (50 ng/μl)]</i>

*ng/μl)]; tdIs56[pCH83.1(1 ng/μl) + pRF4(100 ng/μl)]*

## 2-2. 線虫の遺伝子型の同定

Nested PCR 法をもちいて、線虫の遺伝子型を同定した。変異体の線虫を Worm lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 % NP-40, 0.45 % Tween 20, 0.001 % gelatin, 50 μg/ml Proteinase K :100 μl; (Wicks et al., 2001)) を使用し、8 連 PCR チューブに回収し、60 °C , 60 分→95 °C, 15 分にて線虫を溶解することで鋳型になるゲノム DNA を抽出した。この鋳型となるゲノム DNA を out primer を用いて Sapphire Amp Fast PCR Master Mix (TAKARA)をもちいて PCR をおこなった。この PCR 溶液を鋳型に、in primer を用いて同様にさらに PCR をおこなった。また、delta primer でも同様に PCR をおこなった。最後にアガロース電気泳動で in primer と delta primer での産物の長さを解析することで変異体を同定した。各遺伝子の解析に使用したプライマーは以下の表に示す。

### -使用した primer

<i>ptr-18(ok3532) II</i>	KM328	out primer	ATTTGCCGAAGTTGCATAGG
	KM329	out primer	TTCACAAAATGCGACCATCT
	KM330	in primer	AAATCACATTTTTTCGGAGCTT
	KM331	in primer	TGAAGAATTCTGGCAAATATCG
	KM391	delta primer	CAGGCACTCAGTGCGCGACC
	KM394	delta primer	AGTGGGAGAAGTGGCGAGTCG
<i>grl-7(ok2644) V</i>	KM267	out primer	CTTTGAATGGCAGTGTGACG
	KM268	out primer	AGACCCTCCGTACCTGGTTT
	KM269	in primer	CTATTGCATAACCGCCCATC
	KM270	in primer	AAGCTCGGAAGCGTGCTG
	KM273	delta primer	TGCTCAAACCACATCAGCAT
	KM274	delta primer	GAACTTGAGCTGGAGCAACC
<i>grl-2(ok2721) V</i>	CH312	out primer	GGCTCCTCCACCTCTTATCC
	CH313	out primer	ATTTTCTATCGCCTGGCCTT

	CH314	in primer	GCTCCAGTATCTGCTCCATCA
	CH315	in primer	CTTTTTTACAACCGGGAATC
	CH316	delta primer	CCACCAATGCCAATTGTGAC
	CH317	delta primer	GGTGCCATTTCCTCCAGACT
<i>grl-4(ok1076) IV</i>	MF1802	out primer	AGTGATCAGAGATGGGCTGG
	MF1803	out primer	AAGCCACGTAACAAAATCCG
	MF1804	in primer	GGCAATGTCGAGAAGGAAAC
	MF1805	in primer	TACTGTCCAGGGGAGATTTCG
	MF1815	delta primer	GAGGTAATGGAGGCGGTGCC
	MF1816	delta primer	GGGCTTCCACATCTGCAGCA
<i>grl-5(ok2671) V</i>	CH318	out primer	TGTAAATGTTGTTCCACCGC
	CH319	out primer	TTTTTCCCTCTTTATCCCGC
	CH320	in primer	AAACTTTCTGCAAAATGCTCTACA
	CH321	in primer	CCAGCCCAACCTAAGCCTAA
	CH322	delta primer	CAGCACAGCAATCATCCTTC
	CH323	delta primer	TGTTTGAAAGCGAAGCACGTGG
<i>grl-10(td193) V</i>	CH416	out primer	CCAACATCCATCCCTCATTC
	CH417	out primer	ACAATGCCAAGAGACGCCAC
	CH418	in primer	GAGGAGAGAAACACGACCCA
	CH419	in primer	TCTAAGCTGCTGATCGGTCA
	CH420	delta primer	AGAGCTGCTGCATTTGGAGT
	CH421	delta primer	ACCCTCAGCTGCTAGGTTGA
<i>grl-15(ok3455) III</i>	CH324	out primer	AGCGAAAGTCTCGAGAAACG
	CH325	out primer	AAGCCGTCAAAGTGGTGAAA
	CH326	in primer	CCACAAAGAGGCGGAGTCTA
	CH327	in primer	CACCTTTTTTCATGATTGCCA

	CH328	delta primer	AGGTGCCTTGGATTCTTGGA
	CH329	delta primer	GTGCTACAGTGTCACACAG
<i>grl-17(ok3017) V</i>	CH330	out primer	CTACGTTCAAAGCGGAGGAG
	CH331	out primer	TGATTGGCACATAGTCGGAA
	CH332	in primer	GAAAAACATGGCAACCTTCC
	CH333	in primer	AAATGACAGATTGAAGCGGG
	CH334	delta primer	GGAGGTGGAGGTAAGGCTTC
	CH335	delta primer	TTGTGCTGCGATGTCTTCTC
<i>grl-21(ok2791) IV</i>	MF1798	out primer	TCTGAAGGTTCTAGGGGGTC
	MF1799	out primer	CTGAATCGGAAGAAGCGAGG
	MF1800	in primer	TCCTGCGCAATGACGCGACG
	MF1801	in primer	CGAATGGCTGCTTTGTGCAG
	MF1809	delta primer	GTTACAGCACTGGCGGTCAC
	MF1810	delta primer	GACTTGGCTCTGTATGGTCC
<i>grl-27(tm10640) V</i>	CH336	out primer	TATAGCCCTCCGATTTGTTC
	CH337	out primer	AATGGTTCCGCCAAGCGCT
	CH338	in primer	AACGCCCTTCAGAACATCAC
	CH339	in primer	TGCACATCACATCCTGGTCT
	CH340	delta primer	ATGAGAAGGGAGGATTGCA
	CH341	delta primer	CGTGGTGAGACCATTTCGCA
<i>grd-10(tm3008) IV</i>	MF1846	out primer	TATAGCCCTCCGATTTGTTC
	MF1847	out primer	AATGGTTCCGCCAAGCGCT
	MF1848	in primer	AACGCCCTTCAGAACATCAC
	MF1849	in primer	TGCACATCACATCCTGGTCT
	MF1850	delta primer	ATGAGAAGGGAGGATTGCA
	MF1851	delta primer	CGTGGTGAGACCATTTCGCA

<i>grd-5(td101) V</i>	MF2009	out primer	CTCCACCACTCTCTCAGACTGTCCG
	MF2010	out primer	ATGTGCTTAGATCTCCAGTCGCTGC
	MF2011	in primer	CCTTGTGTTCTTCTCTTACCCGGATCG
	MF2012	in primer	GCTCCAGGATATGCTCAAGGATACGC
	MF2013	delta primer	TGCTACATCAATGACAGCGG
	MF2014	delta primer	GTCATCGAGAGCGACGACAG
<i>mir-235(n4504) I</i>	hk314	out primer	GGTTCCATAGCCACCATCAC
	hk315	out primer	CCACGTCTGATTATCGATGC
	hk316	in primer	CAAGAACCGGACCTAATTTGT
	hk317	in primer	CAGGAATGCACATTCTTCTGAG
	hk318	delta primer	GAAAAACCTACCGTAGCACGA
	hk319	delta primer	TTCGTTTGCTGAAAATCGTC
<i>daf-16(mu86) I</i>	MF396	out primer	TGTCTCTCTATCGGCCACCA
	MF425	out primer	TCGAAGAAGTGGATTCTGAGCA
	MF397	in primer	ACGCAACACACTAATAGTGA
	MF424	in primer	TGGTATGATGGTGGTGGAGCA
	MF445	delta primer	TCACTCGTTCTTCTACCAACCT
	MF446	delta primer	TGGGACTCGAGTTGAGTGGT
	MF447	delta primer	TCCTCCAATCGCAACTTGTTCT
	MF448	delta primer	TTGGCCACGTATTGCACCG
<i>snx-1(tm874) X</i>	CH352	out primer	TTGTTTCAGCGACGACTGCGA
	CH353	out primer	CATACACAGCAGAGACGTTC
	CH354	in primer	ACTGCGATGAGATCAACTTG
	CH355	in primer	TCTCAGTGACGTCGGTCAGT
	CH356	delta primer	GAACTAGCGGGAACACTCCA
	CH357	delta primer	TTGAACTCCGAAGCTCACCT



<i>snx-3(tm1595) I</i>	CH358	out primer	CGTTCGTCCTGAATATCCTA
	CH359	out primer	ACCCATTCTCGTTCGCCGGT
	CH360	in primer	TAGACCCGTAGGGGTGCAAG
	CH361	in primer	GTACTTTGTCCCATCACCA
	CH362	delta primer	AGTCGAATCTCCCCGTTTTTC
	CH363	delta primer	GCCAGGCACGTAGTTTTTGT
<i>snx-9(tm2423) IV</i>	CH370	out primer	TGACCTCAGCCGTAGCCACT
	CH371	out primer	GCACTGGTTCCATGTCATTC
	CH372	in primer	GTAGCCACTCGGAACACGGT
	CH373	in primer	TTCGTGTGCGCATCGAATA
	CH374	delta primer	CAAAGCTGAAAGGGCTGAAG
	CH375	delta primer	CCGTTGGAATCGTTCAACTT
<i>snx-13(tm2404) IV</i>	CH376	out primer	ACGTTCCCTTGTCCTCCGAGA
	CH377	out primer	GAGTATACTCGTGGCTCGCA
	CH378	in primer	ACATTCGGTTCAACCGGTCT
	CH379	in primer	CTCGTGGCTCGCAAATCTAC
	CH380	delta primer	GAGGCTCTGCTGAAAAATGG
	CH381	delta primer	CTCCGACACTGACCAACAA
<i>snx-17(tm3779) X</i>	CH382	out primer	CCAGCGGATAAGACAACGTT
	CH383	out primer	CGTAGGAGTATGTCGAGAGT
	CH384	in primer	CCGGATACGAAGACACTAGT
	CH385	in primer	TGCGGAGGAACTGTAATAA
	CH386	delta primer	TTTCAGGCTTACAATATTCAC
	CH387	delta primer	GTTGTTTTCTCGCCATTC
<i>snx-27(tm5356) I</i>	CH388	out primer	TATTCCTCCCATATCCAGTC
	CH389	out primer	TCGTAGACTTACCGTATACC

	CH390	in primer	GCCGTTTCGATGATTTATGTG
	CH391	in primer	CCATATGCCATTGAACTCTC
	CH392	delta primer	CATCTCGATCAGACACAGCC
	CH393	delta primer	TCGTCAAACATCACCACCA

### 2-3. 胚の調整

抱卵した雌雄同体の成虫 (P0)を 100 mm プレート (4x peptone)に 30~80 匹移し、20 °C の恒温機で 4~5 日間培養をおこなった。培養後、M9 緩衝液で成虫になった F1 線虫を 15 ml のポリプロピレンチューブに回収し、静置することで成虫を沈殿させ、その上清をパスツールピペットで捨てた。沈殿した線虫に 5 ml の bleach 溶液 (10 % 次亜塩素酸, 0.5 M KOH)を加え、線虫が約半数ほど溶けたのを顕微鏡で確認した後、M9 を 5ml 加え強く振り胚を無菌的に取り出した。さらに、3,000 rpm、4 °C、1 分の条件で遠心機にかけて、胚を沈殿させてデカテーションにて上清を捨て、M9 を 10 ml 加えて強く振る洗浄を 3 回繰り返した。最後の洗浄の時に M9 を 10 ml 加えて懸濁し、ピペットで 2 µl を取り出し顕微鏡で胚の数を測定して 10 embryo/µl になるようにピペットで調節した。

### 2-4. 胚発生期の経過観察

胚の経過観察をするために、2-3.の方法で胚を調製し、M9 緩衝液を 10 ml のコレステロール/エタノールフリーの Complete S 溶液 (100 mM NaCl, 50 mM potassium phosphate pH 6.0, 10 mM potassium citrate pH 6.0, 0.5 mM EDTA, 0.25 mM FeSO<sub>4</sub>, 0.1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.01 mM CuSO<sub>4</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgSO<sub>4</sub>; Lewis and Fleming, 1995)に置換し、20 °C、ROTAMIX (ATR)で 30~40 rpm の条件で培養した。培養開始から 9 時間後から 17 時間後までの 1 時間ごとに 1 ml を回収し、5 ml サンプルチューブに移し、2,000 rpm、4 °C、1 分、の条件で遠心して胚を沈殿させて、それを観察に用いた。

### 2-5. 飢餓条件下における 1 齢幼虫の観察

飢餓条件下の実験では、2-3.の方法で胚を調整し、Complete S 溶液に置換して 100,000 embryo、20 °C、ROTAMIX (ATR)で 30~40 rpm で回転させる条件で、1~5 日間飢餓させたサンプルを観察に用い

た。孵化直後の幼虫の観察には、ブリーチ後 24 時間時点の 1 齢幼虫を観察に用いた。

## 2-6. 摂食条件下における 1 齢幼虫の観察

摂食条件下の場合、2-3.の方法で胚を調整し、コレステロール/エタノールフリーの Complete S で ROTAMIX (ATR)で 30~40 rpm で回転させる条件で 24 時間培養し、3,000 rpm、4 °、1 分、の条件で遠心機にかけて沈殿をパスツールピペット回収し、100 mm プレート (4x peptone)に 100,000 匹入れて 20 °C の恒温機で培養し、適当な時間にピックで回収したサンプルを観察に用いた。

## 2-7. 胚の観察

抱卵した 30 匹の成虫を、100 mm プレート (4x peptone)に移し、20 °C で 4~5 日間培養し、M9 緩衝液を用いて、幼虫と成虫を洗い流し、プレートに残った F1 の胚を大腸菌と共に、スパーテルを用いて回収し、M9 緩衝液が入った 15 ml ポリプロピレンチューブの中に移した。大腸菌を取り除くために、2,000~3,000 rpm、4 °C、1 分、の条件で遠心機にかけて、上清をデカテーションで除き、M9 緩衝液を注ぐ洗浄操作を 5 回おこなった。5 回洗浄後、上清をデカテーションで除き、数分間静置して、沈殿してきた胚を観察に用いた。

## 2-8. Feeding RNAi

*rab-5* と *rab-7* 遺伝子の Feeding RNAi の実験は、ORFeome-RNAi v1.1 library (Reboul et al., 2003)をもちいて定法 (Kamath et al., 2000)に従った。標的遺伝子に対応した大腸菌を導入し形質転換した大腸菌を Feeding RNAi 用の NGM plate に塗布し、室温で 4 日間培養させたものを Feeding RNAi に用いた。

孵化直後におけるレポータータンパク質の解析では、PTR-18::GFP や GRL-7::mCherry、GRL-7::VENUSなどを発現する 4 齢幼虫を、Feeding RNAi 用の NGM plate に移し、20 °C で 1 日培養した。2-3.の方法で胚を調節し、コレステロール/エタノールフリーの Complete S 溶液で ROTAMIX (ATR)をもちいて 30~40 rpm で 24 時間培養し、孵化後におけるレポータータンパク質の局在を解析した。

## 2-9. サンプルの観察方法

煮沸して溶かしたアガーパット (4 % bacto agar in DDW)を薄く敷いたスライドガラスに線虫を乗せて、微分干渉顕微鏡 Zeiss Axio Imager M1 microscope system (Zeiss)を用いて観察した。また胚や幼虫の撮影の際には、麻酔薬として 0.05 % (w/v)のアジ化ナトリウムを用いた。

## 2-10. 生存率測定

2-3.の用途で調製した胚を、コレステロール/エタノールフリーの Complete S 溶液中で ROTAMIX (ATR)で 30-40 rpm の条件で 10 日間培養し、数十  $\mu\text{l}$  を 60 mm プレートに移して 1 齢幼虫の総数を計測した。数日後に回復し動いている幼虫の数を生存している個体として計測し、生存している個体の割合を求めた。

## 2-11. 免疫染色

生殖幹細胞 (Z2/Z3) は、メタノール/アセトン法により線虫を固定し (Duerr, 2006)、anti-PGL-1 抗体をもちいて同定した (Kawasaki et al., 1998)。まずスライドガラスに 0.1 % ポリ-L-リシン溶液 (Sigma-Aldrich) を落とし、10 分ほど静置した後、加熱して乾燥させた。その上へ線虫の懸濁液を落とし、カバーガラスを被せた後、ペーパータオルを用いてカバーガラスとスライドガラスの間の余分な水分を除き、ポリ-L-リシンに幼虫を接着させた。即座に液体窒素で凍結し、カバーガラスをカッターの刃を用いて外した。この操作により、接着した 1 齢幼虫からキュティクル構造が部分的に剥がされる。次にスライドガラスを  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  のメタノールに 5 分、次いで  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  のアセトンに 5 分浸し、最後に自然乾燥することによって固定を行った。固定された線虫に anti-PGL-1 抗体を 4 % BSA を含む PBS 溶液に 40,000 倍希釈したものを適量加え、カバーガラスを置き、humid chamber 中にて  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  で一晩静置した。一次抗体反応を終えたサンプルを PBS 内に浸してカバーガラスを落とし、5 分おきに PBS を入れ替え、3 回洗浄した。2次抗体には Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) \*highly cross-adsorbed\* (invitrogen) を 4 % BSA を含む PBS 溶液に 2,000 倍希釈したものを加えて再度カバーガラスをのせ、humid chamber 中にて  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 30 分静置した。その後、PBS で洗浄操作を 3 度行い、最後に DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  となるように添加した Mountant Permafluor (Thermo) にてマウントして、1 時間以上室温で遮光静置して硬化させたサンプル

ルを観察した。

## 2-12. 線虫の形質転換

(Mello et al., 1991)の方法に従い、線虫の形質転換をおこなった。

## 2-13. qRT-PCR

total RNA を回収するために、2-3.の後方で胚を調製し、飢餓条件下 (2-4.)や摂食条件下 (2-5.)で培養し、100  $\mu$ l の Acid washed beads (SIGMA; diameters 425-600  $\mu$ m)の入った 1.5 ml チューブに移した。15,000 rpm、4  $^{\circ}$ C、5 分の条件で遠心にかけて後に上清を取り除いた。そして、900  $\mu$ l の QIAzol (Quiagen)を加えて懸濁したものを液体窒素で凍らせ、使用するまで-80  $^{\circ}$ C で保存した。溶解後、15 分間室温でボルテックスにかけて線虫を破碎し、200  $\mu$ l のクロロホルムを添加し、さらに室温で 10 秒間程度ボルテックスにかけ、2~3 分室温で静置させた。以下、RNeasy<sup>®</sup> Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen)のプロトコルに従った。次に 12,000 xg で 4  $^{\circ}$ C の条件で 15 分間遠心した後に、上清を 1.5 ml チューブに回収した。600  $\mu$ l の 70 % EtOH を加え、10 秒間程室温でボルテックスにかけて懸濁させた。RNA を精製するために、溶液を RNeasy mini spin Column に 700  $\mu$ l 入れて 8,000 xg、室温の条件で 15 秒間遠心し、collection tube に溜まった廃液を捨てる作業を溶液の全量分をおこなった。そして、ゲノム DNA を取り除くために 700  $\mu$ l の Buffer RW1 を加えて、8,000 xg、室温の条件で 15 秒間遠心にかけて廃液を捨て、500  $\mu$ l の RPE を加えて、同様の作業を 2 回おこなった。最後に 1.5 ml チューブに先ほど使用していた RNeasy mini spin Column をセットして 50  $\mu$ l の超純水を加えて、8,000 xg で室温の条件で 3 分間遠心することで溶出した。

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて RNA の逆転写をおこなった。回収した RNA を氷上で、1  $\mu$ g/12  $\mu$ l になるように DDW で調節し、65  $^{\circ}$ C、5 分で温めた後にすぐに氷上で冷やした。4  $\mu$ l の 4x DN Master Mix を加え、37  $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。最後に氷上で、4  $\mu$ l の 5x RT Master Mix II を加えて、逆転写反応(37  $^{\circ}$ C、15 分 $\rightarrow$  50  $^{\circ}$ C、5 分 $\rightarrow$  98  $^{\circ}$ C、5 分)をおこない、使用するまで-20  $^{\circ}$ C で保存した。qRT-PCR に使用した primer は以下の表に記す。

- qRT-PCR に使用した primer

<i>grd-5</i>	CH174	CCGCTTTGGCTGTTACTGTC
	CH175	GCGACGACAGTCTCGAATTT

<i>grd-10</i>	CH85	ATGAGGGAGGCTTCACATGCT
	CH86	GACCCTTCTGCTCCCTTTTG
<i>grd-3</i>	CH133	GGCACCAGTCTCTGCAAGTT
	CH134	AGGTGCTTGGAAACTGATGG
<i>grd-13</i>	CH87	CGAAAACCGAATCGACATGC
	CH88	CTGGTTGGTGAACCTGATGCTG
<i>wrt-10</i>	CH99	GAACTGAACAAGGAGGAGTTCG
	CH100	TTCCTCTGCTTCTTCCTCCA
<i>ins-3</i>	CH455	GTTCTGAAAATGGTGATGGTAATG
	CH456	GCGATGTTCTCATTCGTTGA
<i>ins-4</i>	CH457	TCTGGTCAACCTGTGGAGAAC
	CH458	CTGTGTTGTGCAGCAAACCTGT
<i>ins-6</i>	CH459	CGAGCAAGACGTGTTCCAG
	CH460	TCGCAA TGTCCTTTCCTTC
<i>daf-28</i>	CH461	CTCGTTCCGTATGTGTGGAGT
	CH462	GTGTTGCGATGTCAATTCCTT

#### 2-14. クローニングおよびコンストラクトの構築

PCR には Prime Star GXL DNA polymerase (Takara)を用いて、DNA 断片を増幅させた。PCR 産物のゲル精製には Wizard SVgel and PCR clean up system (Promega)を使用した。ライゲーション反応には、Ligation high Ver. 2 (TOYOBO)や NEBuilder® HiFi DNA (New England Biolabs inc.)を用いた。また、*grd-5*や *grl-7*、*grd-10*、*grl-5*、*ptr-18*などのレポーター遺伝子の解析には pCH82.1 や pCH83.1、pCH85.1、pCH111.1、pMF846.2 はフォスミドベクター (WRM0632dE03、WRM0615cE01、WRM064cH11、WRM0631aE09、WRM0613dH03.1)をリコンビニアリング法 (Tursun et al., 2009)によって改変した。使用した plasmid と primer は以下表に記す。

-使用した plasmid

pCH1.1	<i>Phlh-3::ptr-18 cDNA::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH15.1	<i>Plin-48::ptr-18 cDNA::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH27.1	<i>Pdct-5::ptr-18 cDNA::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH29.1	<i>Pdpy-7::ptr-18 cDNA::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH30.1	<i>Pdpy-7::grd-3(cDNA)::unc-54 3'UTR</i>
pCH31.1	<i>Pdpy-7::grd-10(cDNA)::unc-54 3'UTR</i>
pCH32.1	<i>Pdpy-7::grd-13(cDNA)::unc-54 3'UTR</i>
pCH33.1	<i>Pdpy-7::wrt-10(cDNA)::unc-54 3'UTR</i>
pCH48.1	<i>Pdpy-7::grd-5(cDNA)::unc-54 3'UTR</i>
pCH51.1	<i>5×QUAS::ptr-18(cDNA)::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH54.1	<i>Pgrd-10::GFP::unc-54 3'UTR</i>
pCH82.1	<i>grd-5::mCherry::3xFlag</i>
pCH83.1	<i>grl-7::mCherry::3xFlag</i>
pCH85.1	<i>grd-10::mCherry::3xFlag</i>
pCH93.1	<i>Pdpy-7::mCherry::rab-5 cDNA::unc-54 3UTR</i>
pCH98.1	<i>Pdpy-7::mCherry::rab-7 cDNA::unc-54 3UTR</i>
pCH101.1	<i>Pdpy-7::lmp-1 cDNA::mCherry::unc-54 3UTR</i>
pCH102.1	<i>grl-10 sgRNA (N terminal)</i>
pCH103.1	<i>grl-10 sgRNA2 (C terminal)</i>
pCH104.1	<i>grl-10 Knock out repair template</i>
pCH106.1	<i>Pptr-18::ptr-18 cDNA(D337A, D338A)::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH107.1	<i>Pptr-18::ptr-18 cDNA(G746A, D750A)::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH110.1	<i>Pptr-18::ptr-18 cDNA(Δ837-895)::venus::unc-54 3UTR</i>
pCH111.1	<i>grl-5::mCherry::3xFlag</i>
pCH121.1	<i>Pgrl-7::grl-7::venus::grl-7 3UTR</i>

pKM189.1	<i>Pptr-18::mCherry::unc-54 3UTR</i>
pMF435.1	<i>Ppgp-1::mCherry::unc-54 3UTR</i>
pMF449.1	<i>Pdpy-7::GFP::unc-54 3UTR</i>
pMF450.1	<i>Pdpy-7::mCherry::unc-54 3UTR</i>
pMF674.1	<i>Phlh-3::enhancer::gfp::unc-54 3UTR</i>
pMF826.1	<i>Pptr-18::ptr-18 cDNA::venus::unc-54 3UTR</i>
pMF846.2	<i>ptr-18::GFP</i>
pMF848.1	<i>grd-5 sgRNA (N terminal)</i>
pMF861.1	<i>grd-5 sgRNA (C terminal)</i>
pMF867.1	<i>grd-5 Knock out repair template</i>
pMF875.1	<i>Pdpy-7::mCherry::rab-11 cDNA ::unc-54 3UTR</i>

-コンストラクトの構築に使用した primer

<i>lin-48 promoter</i>	CH50	ATCCTGCAGCCTGCATTTTTTTCAGAGTC
	CH51	ATCCCCGGGCTGAAATTGAGCAGAGCTGAA
<i>dct-5 promoter</i>	CH83	ATCCTGCAGTTTCAACGGGAATTGAACTTTTG
	CH84	ATCCCCGGGTATATATGGGTCCCAACTTTCAA
<i>grl-7::mCherry recombineering</i>	CH264	ACTGCCAAGAGACCAAAGGGGATATCTCATGCTACACCTACC GTCAATTGATGGTCTCAAAGGGTGAAGAAGATAAC
	CH265	TTTCTATATTGCACTTGGAACACTGTTTTTGAAATCTTTGATTT CTATAT TTA CT TGTCATCGTCATCCTTG
<i>grl-5::mCherry recombineering</i>	CH422	GTGAGACTGAGAAGGACGGAACCACGTGCTTCGCTTTCAAAC AATCTTCT-ATGGTCTCAAAGGGTGAAGAAGATA
	CH423	TAAAGGTATTTGAATAAGAAATTATTAGTTCAAAAAGTACAC CAGTCTTC-TTACTTGTCATCGTCATCCTTGTA
<i>Pptr-18::ptr-18</i>	CH400	GCAGCTGTGTTTCATTTTTTATTACG



<i>cDNA(D337A, D338A)::venus::unc-54 3UTR</i>	CH401	TACCCCGATCGACAAAATTAAGAAGGGA
<i>Pptr-18::ptr-18 cDNA(G746A, D750A)::venus::unc-54 3UTR</i>	CH402	GCATTCTCTGTAGCTTTTGTAGCACATATTACGT
	CH403	GATGGCCATGAGAAGTGTGG
<i>Pptr-18::ptr-18 cDNA(A837-895)::venus::unc-54 3UTR</i>	CH408	GCTAGTATGGTGAGCAAGGG
	CH409	TGTGAATGGGAGGGCTGAGA
<i>rab-5 cDNA</i>	CH300	ATCACTAGTATGGCCGCCCGAAACGCAGGAACCGC
	CH301	ATCGCTAGCTTTACAGCATGAACCCTTTTGTTGCT
<i>rab-7 cDNA</i>	CH348	ATCACTAGTATGTCGGGAACCAGAAAGAAGGCGCT
	CH349	ATCACTAGTACAATTGCATCCCGAATTCTGCTGGT
<i>rab-11 cDNA</i>	MF1995	ACGT ACTAGT ATGGGCTCTCGTGACGATGAATACG
	MF1996	GCAT GCTAGC TGGGATGCAACACTGCTTCTTTGGT
<i>lmp-1 cDNA</i>	CH350	ATCCCGGGATGTTGAAATCGTTTGTCTCTTTGTT
	CH351	ATCACCGGTGACGCTGGCATATCCTTGTCTCTTTG
<i>Venus cDNA</i>	MF1432	GC ACTAGT ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
	MF1433	GAC GCTAGC CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
<i>ptr-18 promoter</i>	KM342	GGGGAAGTGTGAATGGGTGATTG
	KM339	ACCCCGGGGTCAAGGCTCAGGCTCAATCAACTGC
<i>ptr-18 cDNA</i>	KM340	TCCCCCGGGATGAAATCAATATCACAATGTCTTGGCAAC
	KM341	ACCCCGGGGCTAGCAGCCCGCTCAGCGCTCCGAACGGAT
<i>ptr-18</i>	MF1813	CAACAAAAGAGGAACCAGTTGAAAAATCCGTTCCGAGCGCT

<i>recombineering</i>		GAGCGGGCT ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA
	MF1814	GGAAAAAATTTAAAAAATAAATAAAAAATTACGGAAAACA AAAAAGTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
<i>grd-10 cDNA</i>	CH131	ATCCCCGGGATGCGCTCTCTCGTCGTGCTA
	CH135	ACTACTAGTTTATGGCTGCCAGGCAAGTGCA
<i>grd-13 cDNA</i>	CH120	ATCCCCGGGATGAGCCGTTTTCTCCTTCTCAC
	CH136	ACTACTAGTTCAAACGTTGCGTGGATCCTT
<i>grd-3 cDNA</i>	CH138	ATCCCCGGGATGAAGTTTCTACTCCTTCTT
	CH139	ACTACTAGTTTAGCGTCCGAAGAATCCTC
<i>wrt-10 cDNA</i>	CH118	ATCCCCGGGATGCTCCTTGTTTCTGTTATTTT
	CH137	ACTACTAGTTTAAGCTCTACGGATTCCAG
<i>grd-5 cDNA</i>	CH170	ATCCCCGGGATGCGTTCATCATCGTGCTCG
	CH171	ACTACTAGTTTATGGCTGCCATGCAAGAG
<i>grd-10 recombineering</i>	CH266	AATCGTGCAAAGTCGAGAAGGACGGACAGTATGCACTTGCCT GGCAGCCAATGGTCTCAAAGGGTGAAGAAGATAAC
	CH267	AGAAGATCGTCAAAAAGTCGCTGAAACCAGTAAAAACAAAA TACAAGAAC TTACTTGTCATCGTCATCCTTG
<i>grd-5 recombineering</i>	CH268	AATCTTGCAAGATCGAGAAGAACGGACAATACGCTCTTGCAT GGCAGCCAATGGTCTCAAAGGGTGAAGAAGATAAC
	CH269	TGAAAGTCGCTGGAACCAGTAAAGAAAACGAAAGGATATAA GCCAACTGC TTACTTGTCATCGTCATCCTTG

## 2-15. CRISPR-cas9 法による欠失変異体の作成

*grd-5* や *grl-10* 遺伝子の ORF を欠失させたヌル変異体は、(Dickinson et al., 2015)の方法に従っておこなった。

### 3. 実験結果

### 3-1. *ptr-18* は P 細胞の静止期維持に重要である

我々のこれまでの研究で、飢餓条件下の *mir-235* 欠失変異体における神経前駆細胞 (P 細胞)の活性化に、*hh-r* 遺伝子である *grl-5* や *grl-7* が寄与することを報告してきた (Kume et al., 2019)。腹側外側上に 6 対ある P 細胞は、孵化直後や飢餓条件下では静止期状態で維持されており、摂食により活性化することによって、腹側正中線上にある運動神経近傍に移動する (図. 3)。他の動物種において、Hh はその受容体である Patched を抑制することで、下流にシグナルを伝えることがよく知られている (D.M. et al., 1996; Forbes et al., 1993; Marigo et al., 1996)。しかしながら線虫では、*hh-r* 遺伝子群と、Patched をコードする *ptc* 遺伝子との遺伝学的あるいは生化学的相互作用の有無は不明である (Kuwabara et al., 2000; Soloviev et al., 2011)。そこで、我々は線虫の *ptc* が P 細胞の静止期状態からの活性化を制御する可能性を検討した。線虫において、Patched タンパク質をコードする遺伝子は 2 つ存在し、それぞれ *ptc-1* と *ptc-3* とよばれる (Kuwabara et al., 2000)。もし、*grl-5* や *grl-7* が、*ptc-1* あるいは *ptc-3* 遺伝子を抑制することで P 細胞を活性化するのであれば、*ptc-1* あるいは *ptc-3* を機能阻害すると、*grl-5* や *grl-7* を過剰発現させた場合と同様に、飢餓条件下において P 細胞が活性化状態すると予測できる。しかしながら、*ptc-1* 欠失変異体や *ptc-3* 欠失変異体をそれぞれ飢餓条件下においても、P 細胞の活性化は検出されなかった (図.4A)。*ptc-1* ホモ変異体は不妊の成虫となる (Kuwabara et al., 2000)。よって、*ptc-1* ヘテロ変異体に由来するホモ変異体の 1 齢幼虫は、母親由来の *ptc-1* 遺伝子産物を引き継いでいる可能性がある。さらに、*ptc-3* ホモ変異体は、孵化前後に致死となる (Soloviev et al., 2011)。以上のような理由が、1 齢幼虫において *ptc-1* や *ptc-3* 活性を完全に失った際の表現型の評価を困難にしている。よって、両 *ptc* 遺伝子が P 細胞の静止期制御に寄与する可能性は排除できない。

また、ステロールセンシングドメイン (SSD)をもつ 12 回膜貫通型タンパク質という点で Patched に類似している PTR/PTCHD 蛋白質にも着目した。昆虫や線虫の *patched-related (ptr)*遺伝子や哺乳動物の *ptchd* 遺伝子は、進化的に保存された PTR/PTCHD 蛋白質をコードする (Zhong et al., 2014)。線虫では、複数の *ptr* 遺伝子や *hh-r* 遺伝子の機能阻害が、脱皮不全の表現型を示すことから、両遺伝子は何らかの過程に協調的に機能する可能性が議論されている (Bürglin and Kuwabara, 2006)。それに対して、*hh-r* 遺伝子である *grl-21* は、腸における脂質の蓄積を促進するのに対して、*patched-related (ptr)*をコードする *ptr-24* はそれとは反対の機能をもつことが示唆されている (Lin and Wang, 2017)。

そのため、*ptr* 遺伝子と *hh-r* 遺伝子の相互作用に関しては確立されていないのが現状である。

そこで我々は、*ptr* 遺伝子群の機能阻害の、飢餓条件下における P 細胞の静止期への影響を検討した。*ptr-18* 欠失変異体では、飢餓条件下にも関わらず P 細胞の活性化を示す個体が高頻度で認められた (図.4)。よって、飢餓条件下における *ptr-18* 欠失変異体では、活性化した P 細胞は摂食条件下と同様の細胞運命をたどることが示唆された (Winnier et al., 1999)。つまり *ptr-18* は、飢餓条件下において、摂食時に活性化する P 細胞の発生プログラムを抑制する機能をもつことが示唆される。また、飢餓条件下における *ptr-18* 欠失変異体では P 細胞に加えて、中胚葉性前駆細胞 (M 細胞) が活性化し分裂することが認められた (図.5)。それに対して、生殖幹細胞 (Z2/Z3 細胞) は、飢餓条件下において、野生型と同様に *ptr-18* 欠失変異体においても分裂せずに、静止期状態で維持されることが、前任者の実験で明らかにされていた (図.6)。以上より、*ptr-18* 欠失変異体は、インスリン経路で機能する *daf-16* や *mir-235* 欠失変異体と非常に類似した表現型を呈することが示された (Baugh and Sternberg, 2006; Fukuyama et al., 2015; Kasuga et al., 2013)。また、*daf-16* 欠失変異体では、飢餓条件下における生存率の低下が見られるのに対して、*ptr-18* 欠失変異体では認められなかった (図.7)。よって、*ptr-18* は、*daf-16/FoxO* とは異なり、飢餓条件下における生存維持には寄与しないが、P 細胞の静止期維持に重要な役割をもつことが考えられる。

### 3-2. 孵化前に発現する PTR-18 が P 細胞の静止期維持に寄与する

PTR-18 タンパク質の発現パターンを解析するために、*ptr-18* 遺伝子座を含む約 35 kbp のゲノム DNA 断片を擁するフォスミドベクター (WRM0613dH03.1) の *ptr-18* 遺伝子座の停止コドン直前に、*gfp* 遺伝子をリコンビニアリング法 (Tursun et al., 2009) を用いて挿入したレポーター遺伝子を作成した。このレポーター遺伝子から発現する PTR-18 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質 (PTR-18::GFP) の発現パターンを解析した。

PTR-18::GFP の発現は、胚発生期後半の 3-fold 期の胚において、全身の P 細胞を含む表皮細胞群で初めて認められた (図.8)。また、レポーター遺伝子をもつ 3-fold 期の胚には、表皮細胞頂端側の細胞膜近傍で一様に PTR-18::GFP が分布する個体や、細胞内で小胞状に PTR-18::GFP の局在を示す個体、PTR-18::GFP の発現が検出できない個体の 3 つのタイプが認められた (図.9)。これらの異なる発現パターンが発生ステージと連動している可能性を検証するために、PTR-18::GFP 発現株の成

虫の体内にある産卵前の初期胚を取り出し、初期胚が胚発生後期に差し掛かる培養開始後 9 時間から 16 時間における、2-fold 期および 3-fold 期の胚と 1 齢幼虫の割合 (図.10)、及び 3-fold 期の胚が示す PTR-18::GFP の発現様式の割合を 1 時間ごとに計測した (図.11)。培養を開始してから 9 時間後では、2-fold 期と 3-fold 期の胚、1 齢幼虫が混在しており、10 時間後以降では 2-fold 期の胚の割合が減少し、3-fold 期の胚が増加する傾向が認められる。培養 14 時間後を境に、3-fold 期の胚の割合が減少し、1 齢幼虫の割合が顕著に上昇する。16 時間後では、1 齢幼虫しか検出されなくなった。すなわち、胚は時間経過とともに、同調的に発生進行することが認められた (図.10)。

さらに培養を開始して 9 時間後から 16 時間後のそれぞれの時点での 3-fold 期の胚のうち、PTR-18::GFP が頂端側細胞膜に局在するもの、あるいは小胞状に局在するもの、PTR-18::GFP の発現が検出できないものの割合を解析した (図.11)。培養 9 時間後では PTR-18::GFP の局在が頂端側細胞膜あるいは小胞状に検出される胚と、発現が検出できない胚が混在する。培養 10 時間後では 9 時間後よりも頂端側細胞膜で局在を示す胚の割合が上昇するとともに、発現が検出できない胚の割合が減少する。さらに、培養 12 時間後を境に頂端側細胞膜で局在を示す胚の割合が減少し始め、培養 14 時間後では、小胞状に示す胚の割合が一過的に上昇し、培養 16 時間後には検出できない胚が全てを占めた (図.11)。以上のことから、PTR-18::GFP は 3-fold 期の初期で発現し、頂端側から小胞状に局在をダイナミックに変化させて、孵化前には分解することが示唆された。

さらに、飢餓条件下で孵化させ培養を続けた場合、発生停止した 1 齢幼虫では、5 日間培養しても PTR-18::GFP の発現は認められなかった (図.12)。孵化後に摂食させた 1 齢幼虫では、摂食後 1 時間から 10 時間まで PTR-18::GFP の発現が検出されなかったが、摂食後 11 時間において検出され (図.13)、seam 細胞 (図.14B: 矢尻)や、表皮細胞群 (図.14B: 矢印)、P 細胞群の子孫細胞(図.14C: 矢印)、直腸の UKF 細胞などの頂端側細胞膜で PTR-18::GFP が検出された(図.14C: 矢尻)。また、P 細胞や表皮細胞、seam 細胞に以外にも、PTR-18::GFP は、早期 1 齢幼虫期において、排泄能をもつ excretory duct 細胞 (図.14A: 矢尻)と G1 pore 細胞 (図.14A: 矢印) において微弱に検出された。

### 3-3. *ptr-18* は P 細胞とその近傍の表皮細胞で機能する

*ptr-18* がどの細胞で機能するかを検証するために、*ptr-18* 遺伝子自身のプロモーターや、PTR-18::GFP が検出された表皮細胞や P 細胞、excretory duct 細胞、UKF 細胞、G1 pore 細胞でそれ

それぞれ発現するプロモーターを、*ptr-18::venus* 遺伝子に融合させたコンストラクトを、*ptr-18* 欠失変異体にそれぞれ導入し (図.15A)、どの組織で発現する *ptr-18* 遺伝子が貧栄養条件下における P 細胞の静止期維持に寄与するか検討した。*ptr-18* 遺伝子や P 細胞と表皮細胞で発現する *dpy-7* 遺伝子 (Gilleard et al., 1997) のプロモーターを用いて、PTR-18::VENUS を発現させると、*ptr-18* 欠失変異体の表現型が抑制された。その一方で、G1 pore 細胞で発現する *dct-5* 遺伝子 (Parry and Sundaram, 2014) や excretory duct や UKF 細胞で発現する *lin-48* 遺伝子 (Wang and Chamberlin, 2002) のプロモーターで PTR-18::VENUS を発現させても、*ptr-18* 欠失変異体の表現型への影響が認められなかった (図.15B)。さらに、*hlh-3* 遺伝子 (Doonan et al., 2008) のプロモーターをもちいて P 細胞だけで (図.16A)、あるいは Q system (Wei et al., 2012) を用いて表皮細胞群で (図.16B)、それぞれ特異的に PTR-18::VENUS を発現させると、それぞれで *ptr-18* 欠失変異体の表現型が抑制された (図.16C)。つまり、*ptr-18* は P 細胞で細胞自律的に、あるいは、表皮細胞群で細胞非自律的に機能することを示す。以上より、*ptr-18* は *grl-5* や *grl-7* などが発現する表皮細胞や P 細胞で発現することから、これらの遺伝子産物は近傍で機能する可能性が示唆された。

また、*ptr-18* 遺伝子を含む PTCHD をコードする膜貫通型蛋白質は、Patched や Dispatched などのように、4 個目と 10 個目の膜貫通ドメインに GXXXDD あるいは GXXXD/E モチーフの一部が保存され、*daf-6* では正常な機能や局在に重要である可能性が示唆されている (Perens and Shaham, 2005)。また、Patched の C 末端側の細胞内ドメインの欠如により、その機能や細胞内への内在化に異常が生じることが示唆されている (Lu et al., 2006)。我々は、これらの Patched や Dispatched の機能に重要なドメインが、PTR/PTCHD の正常な機能にも必須かを検証した。GXXXDD あるいは GXXXD/E モチーフの保存されているグリシンとアスパラギン酸をアラニンに置換し、PTR-18 の機能に GXXXD/E モチーフが重要か否かを検討した (図.17)。さらに、TMHMM より (Krogh et al., 2001)、*ptr-18* の C 末端側の細胞内ドメインを同定し (図.18)、それを欠如した場合、Patched と同様に機能や局在に異常が生じるのかを検討した。まず我々は、これらのタンパク質領域の変異が、PTR-18::VENUS の局在にどのように影響が出るのかを評価した。3-fold 期や 1 齢幼虫後期において、PTR-18::VENUS は P 細胞や表皮細胞の頂端側細胞膜で検出されるが、それに対して N 末端側の GXXXDD モチーフに変異を導入した PTR-18 (D337A,D338A)::VENUS は細胞質全体に局在が変化することが認められた。一方で、C 末端側の GXXXD/E モチーフに変異を導入した PTR-18

(G746A,D750A)::VENUS と、C 末端側の細胞内ドメインを欠失させた PTR-18 ( $\Delta$ 837-895)::VENUS は、PTR-18::VENUS と同様に頂端側細胞膜で検出された (図.19)。また、PTR-18::VENUS を発現させることで、*ptr-18* 欠失変異体の飢餓条件下における P 細胞が活性化してしまう表現型は抑制されるのに対して、PTR-18 (D337A,D338A)::VENUS や PTR-18 (G746A,D750A)::VENUS、PTR-18 ( $\Delta$ 837-895)::VENUS などを発現させても、その表現型の抑制は認められなかった (図.20)。すなわち、*ptr-18* の正常な局在や機能に GXXXDD あるいは GXXXD/E モチーフや C 末端側の細胞内ドメインは重要である可能性が示唆される。また、PTR-18::GFP は 3-fold 期の後期から孵化直前にかけて内在化し検出できなくなる傾向を示すように (図.9-11)、PTR-18::VENUS は孵化直後では頂端側細胞膜で検出することはできない。一方で、3-fold 期において頂端側細胞膜で検出された PTR-18 (G746A,D750A)::VENUS と PTR-18 ( $\Delta$ 837-895)::VENUS は孵化直後において、頂端側細胞膜で検出される(図.21)。

以上の結果より、PTR-18のGXXXDDあるいはGXXXD/EモチーフやC末端側の細胞内ドメインは正常な局在や内在化に必要なであるとともに、PTR-18は適切な時期に頂端側細胞膜から内在化することが機能に重要である可能性が示唆される。

#### 3-4. *ptr-18* は *grl-5* や *grl-7*、*grl-27* を抑制する

P 細胞の活性化を促進する機能をもつ *grl-5* 遺伝子や *grl-7* 遺伝子の欠失変異体は、摂食条件下において野生型と同様に発生することから、他の *grl* 遺伝子群と協調的に機能する可能性を考えている。そこで、*grl-5* や *grl-7* らと同様に表皮細胞群や P 細胞群でレポーター遺伝子の発現が報告されている *grl* 遺伝子群 (Hao et al., 2006a) と *ptr-18* の遺伝学的相互作用を検討した。飢餓条件下において *ptr-18* 欠失変異体は P 細胞が活性化してしまうのに対して、*grl-5* や *grl-7*、*grl-27* の欠失変異を導入することで、*ptr-18* 欠失変異体の表現型が顕著に抑制されることが認められた (図.22)。その一方で、*grl-2* や *grl-4*、*grl-10*、*grl-14*、*grl-15*、*grl-21* の欠失変異は、*ptr-18* 変異体の P 細胞の活性化の表現型を抑制することはなかった (図.22)。つまり、*ptr-18* は *grl-5* や *grl-7*、*grl-27* などの特定の *grl* 遺伝子群を抑制する可能性が考えられる。



### 3-5. GRL-7 は PTR-18 と類似した発現パターンを示す

*hh-r* 遺伝子のプロモーターに *gfp* 遺伝子を融合させたレポーター遺伝子の解析から、*gri-5* や *gri-7* などは、表皮細胞や seam 細胞、P 細胞で発現していることが報告されているが (Hao et al., 2006a)、GRL-5 や GRL-7 タンパク質の発現時期や局在分布は明らかでない。PTR-18::GFP のレポーター遺伝子と同様に、*gri-5* 遺伝子座や *gri-7* 遺伝子座をそれぞれ擁するフォスミドベクターである WRM0631aE09 と WRM0615cE01 を改変し、それら遺伝子の停止コドン直前に mCherry を挿入したコンストラクトを用いた。まずは GRL-7 の局在や、機能する発生ステージを検討するために、原腸胚期から 3-fold 期までの胚発生期における GRL-7::mCherry の発現解析をした。原腸胚期から 2-fold 期にかけて GRL-7::mCherry の発現は検出されないが、3-fold 期の胚で発現が検出され、全身の表皮組織の頂端側細胞膜近傍に局在した (図.23)。また 3-fold 期の胚では、GRL-7::mCherry は、表皮組織の頂端側細胞膜近傍 (図.24; 頂端側細胞膜)に加え、細胞内で小胞状 (図.24; 小胞)に分布することが検出された。そこで、GRL-7::mCherry の局在変化が発生ステージと連動するのかが検討するために、図.10-11 と同様の実験を行った (図.25-26)。培養 12 時間後では、GRL-7::mCherry が小胞状に局在を示す個体の割合よりも頂端側細胞膜に局在を示す個体の割合が多いのに対して、培養 16 時間では双方の割合が逆転した (図.26)。よって、GRL-7::mCherry の局在は孵化が近づくにつれ、頂端側細胞膜から小胞状へ変化する傾向が認められる (図.24-26)。

次に、1 齢幼虫期での GRL-7::mCherry の局在変化について解析をした結果、摂食後 1 時間から 10 時間までの時期では、GRL-7::mCherry は表皮細胞内小胞状に検出された (図.27A)。しかし摂食後 11 時間になると、GRL-7::mCherry の局在は細胞内で小胞状に検出されたのに加え (図.27B; 矢尻)、それらの組織の頂端側での局在も認められた (図.27B; 矢印)。また、GRL-5::mCherry と GRL-7::mCherry は 3-fold 期において一過的に表皮細胞や P 細胞の頂端側細胞膜で検出される点や、摂食後 11 時間において P 細胞の頂端側細胞膜で検出される点で、類似した発現パターンを示す (図.28-29)。

よって、GRL-7 や GRL-5 は胚発生期や孵化後発生期において PTR-18 と類似した発現時期や局在変化を示す。

### 3-7. PTR-18 と GRL-7 は細胞内の小胞で共局在する

そこで、PTR-18::GFP と GRL-7::mCherry の共発現株を作成し、3-fold 期の胚における局在変化に着目して解析をおこなった。早期 3-fold 期の胚では、PTR-18::GFP と GRL-7::mCherry の両者は頂端側細胞膜に局在を示し、この時、PTR-18::GFP の外側に GRL-7::mCherry が検出された (図.30A)。また、PTR-18::GFP と GRL-7::mCherry は同時期に小胞状の局在パターンを示し、それらは局所的に共局在することが認められた (図.30B)。さらに Anne Spang 博士らとの共同研究により、3D-SIM 顕微鏡 (DeltaVision OMX Optical Microscope (version 4)) を用いて観察したところ、PTR-18::GFP と GRL-7::mCherry は同一の小胞に局在することが認められた (図.31)。そこで次に、PTR-18::GFP がどの細胞内小胞に局在するか検討するためにエンドソームやリソソームマーカールとの共局在を検討した (Chen et al., 2006; Hermann et al., 2005; Treusch et al., 2004)。

### 3-8. PTR-18 や GRL-7 はエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれる

PTR-18::GFP を、初期エンドソームに局在する mCherry::RAB-5 や (図.32A)、後期エンドソームマーカールに局在する mCherry::RAB-7 (図.32B)、リソソームに局在する LMP-1::mCherry (図.32C) とそれぞれ共発現させると、PTR-18::GFP はそれぞれのマーカールと共局在することが認められた。また、一部の細胞で、リサイクルエンドソームマーカールに局在する mCherry::RAB-11 と共局在も示した (図.32D)。よって、PTR-18::GFP はエンドサイトーシスを介して内在化する可能性が示唆された。そこで、初期エンドソームの形成に重要な *rab-5* (Grant and Hirsh, 1999) を Feeding RNAi でノックダウンし、孵化直後における GRL-7::mCherry と PTR-18::GFP の局在を解析した。野生型ではそれらのレポータータンパク質は孵化直前に内在化する傾向があるのに対し、*rab-5* 遺伝子をノックダウンすることによって、PTR-18::GFP は孵化後も分解されず頂端側細胞膜近傍に局在し (図.33)、GRL-7::mCherry も同様に頂端側で検出された (図.34)。よって、PTR-18 と GRL-7 は孵化前においてエンドサイトーシスされ、エンドソームやリソソーム上で共局在することが示唆された。

### 3-9. *ptr-18* は GRL-7 の内在化と分解を促進する

さらに、*ptr-18* が GRL-7 の局在変化に寄与するか否かを検証するために、孵化直後における GRL-7::mCherry の局在に着目して解析をおこなった。野生型における GRL-7::mCherry の局在は、

孵化直前に頂端側細胞膜近傍から細胞内小胞へ内在化する傾向を示し (図.24-26)、孵化直後では GRL-7::mCherry が小胞状のみで検出される個体の割合が多くを占めた (図.35)。それに対して、孵化直後の大部分の *ptr-18* 欠失変異体では、GRL-7::mCherry は、内在化されておらず、頂端側細胞膜近傍で検出された (図.35)。また、*grl-7* を抑制するインスリン経路の *daf-16* やその下流因子である *mir-235* の欠失変異体では、野生型と同様に GRL-7::mCherry の内在化が認められた (図.36)。また、孵化直後の *ptr-18* 欠失変異体では、GRL-7::mCherry の頂端側に局在を示し、野生型よりも内在化が遅延するが、飢餓条件下 (図.37A)や摂食条件下 (図.37B)の双方で、時間経過とともに、すべての個体で小胞状に局在が検出されるようになった。このことから、GRL-7 の内在化に関して *ptr-18* 以外の因子も寄与する可能性が考えられる。

また、mCherry タンパク質はリソソームで分解されにくく、融合タンパク質の分解の観察には不適切である (Katayama et al., 2008)。そこで、リソソームに移行することで、蛍光が消失することが知られている GFP に由来する VENUS タンパク質に置換した GRL-7::VENUS の局在解析をおこなった (図.38)。3-fold 期において GRL-7::VENUS は表皮細胞や P 細胞の頂端側細胞膜で検出されるのに対して、孵化直後の野生型では大きな割合でそれが検出することができなくなった。一方で孵化直後の *ptr-18* 欠失変異体では、GRL-7::VENUS が頂端側細胞膜近傍で検出される個体の割合が多く占めた (図.38B)。また、後期エンドソームの成熟に重要な *rab-7* 遺伝子を (Poteryaev et al., 2007)、Feeding RNAi によってノックダウンすることで、GRL-7::VENUS の内在化が遅延し、頂端側細胞膜や、消失せずに小胞状で検出される個体の割合が増加した (図.39)。つまり、GRL-7 は孵化にかけてエンドサイトーシスされ、リソソームに蓄積する可能性が示唆される。

*ptr-18* 欠失変異体における、細胞外に残留した GRL-7 と P 細胞の不必要な活性化との相関関係を検討するために、*ptr-18* 欠失変異体の P 細胞に、P 細胞の表現型を救助する PTR-18::VENUS を発現させ、GRL-7::mCherry の局在を解析した。その結果、P 細胞だけで PTR-18::VENUS を発現させることで、*ptr-18* 欠失変異体と比較して、GRL-7::mCherry が頂端側細胞膜で検出される個体の割合が顕著に減少した (図.40)。以上より *ptr-18* は、孵化前に表皮細胞外に蓄積した GRL-7 タンパク質を、エンドサイトーシスを介して取り除き、孵化した一齢幼虫が飢餓条件に暴露されても P 細胞が活性化しないようにする機能をもつことが示唆された (図.41)。

### 3-10. 飢餓条件下における *grd-5* や *grd-10* の過剰発現は P 細胞を活性化する

これまでの解析では、飢餓条件下での *ptr-18* 欠失変異体では、*grl-5* や *grl-7*、*grl-27* の活性化を介して不必要な P 細胞の活性化が生じることが示された。しかしながら、摂食条件下では、*grl-5;grl-7;grl-27* 三重変異体は、P 細胞の活性化タイミングが、野生型と比較して差が認められないことから (図.42)、これらの遺伝子は、摂食条件下における P 細胞の静止期からの活性化に必須でないことが明らかとなった。よって、*grl-5* や *grl-7*、*grl-27* は、他の *hh-r* 遺伝子らと協調的に機能する可能性が考えられる。あるいは、上に示した GRL-5 や GRL-7 のレポータータンパク質の発現パターンから考えると、*grl-5* や *grl-7*、*grl-27* は摂食時における P 細胞の活性化には直接的に寄与しない可能性も考えられる。表皮細胞や seam 細胞、P 細胞などでレポーター遺伝子が発現する *hh-r* 遺伝子群のうち (Hao et al., 2006a)、*grd-3* や *grd-10*、*grd-13*、*wrt-10* は、孵化後から P 細胞が活性化するまでに発現が増加することが DNA マイクロアレイを用いた解析で明らかとなっている (Baugh et al., 2009)。それらの発現量の継時変化を qRT-PCR で解析した結果、P 細胞が活性化する摂食 8 時間後までに常に発現上昇が認められた (図.43)。

そこで、*grd-3* や *grd-10*、*grd-13*、*wrt-10* を表皮細胞や P 細胞で過剰発現し、飢餓条件下において P 細胞を不必要に活性化させる *hh-r* 遺伝子を探索した。野生型は飢餓条件下において、P 細胞は静止期状態で維持されるのに対して、*grd-10* を発現させることで飢餓条件下にも関わらず、P 細胞が活性化することが認められた (図.43A)。その一方で、*grd-3* や *grd-13*、*wrt-10* などを過剰発現させても、P 細胞の活性化が認められなかった (図.43)。また *grd-10* のパラログに *grd-5* がある (図.45A)。それらのプロモーターの下流に GFP を融合したレポーター遺伝子を持ちいて発現を調べると、*grd-10* は seam 細胞のみで、*grd-5* は seam 細胞と表皮細胞でプロモーター活性が認められた (図.45B)。*grd-5* mRNA は、P 細胞が活性化する前に、顕著な増加を示すわけではないもの (図.46)、表皮細胞で過剰発現させると、*grd-10* と同様に飢餓条件下における P 細胞の活性化が認められた (図.43)。そこで、*grd-10* や *grd-5* が摂食に応答した P 細胞の活性化に寄与するか、*grd-5;grd-10* 二重変異体を作成し、P 細胞の活性化タイミングを検討してみたが、野生型との顕著な差は見られなかった (図.47)。よって、*grd-5* や *grd-10* 以外の異なるサブファミリーの *hh-r* 遺伝子も P 細胞の活性化に寄与することが考えられる。

### 3-11. GRD-5 や GRD-10 は GRL-7 とは異なる発現パターンを示す

GRD-5 や GRD-10 がどの時期に分泌されるのかを検証するために、PTR-18 や GRL 遺伝子のレポーター解析と同様に、*grd-5* や *grd-10* の遺伝子座を擁するフォスミドベクター (WRM0632dE03、WRM064cH11)を用いて、それらの遺伝子の停止コドンの直前に、mCherry を挿入したコンストラクトを作成した。まず、胚発生期における GRD-5::mCherry と GRD-10::mCherry の発現時期を解析した結果、GRD-5::mCherry は 3-fold 期において、表皮細胞や P 細胞、seam 細胞の細胞質で検出された (図.48)。その一方で GRD-10::mCherry は胚発生 3-fold 期の表皮細胞や P 細胞、seam 細胞などの頂端側細胞膜で検出された (図.49)。また孵化前では細胞質で検出された GRD-5::mCherry は孵化後の摂食条件下において、細胞内で小胞状に検出されるとともに頂端側細胞膜で検出された (図.50)。*grd-5* は孵化後から P 細胞が活性化する摂食後 8 時間までで、mRNA の発現振動の上昇が顕著ではなかったが (図.46)、発現が検出された。それに対して、GRD-10::mCherry は常に表皮細胞や seam 細胞、P 細胞の頂端側細胞膜で検出された (図.51)。つまり、GRD-5 や GRD-10 は孵化前に頂端側細胞膜に分泌され、孵化後に内在化する傾向がない点で、GRL-7::mCherry とは異なった発現パターンを示す。

### 3-12. *grd-5* や *grd-10* は *ptr-18* の下流で機能する

また *grl-7* とは発現パターンが異なる *grd-5* や *grd-10* は、飢餓条件下での *ptr-18* 欠失変異体の P 細胞の活性化に寄与するのかを検討するために、多重変異体の解析をおこなった。*ptr-18* 欠失変異体は飢餓条件下において、P 細胞が活性化してしまうのに対して、*grd-5* や *grd-10* の欠失変異を導入することで、*grl-7* の欠失変異を導入した時と同等に、*ptr-18* 欠失変異体の表現型が抑制された (図.52)。つまり、*grd-5* や *grd-10* は *ptr-18* によって抑制される可能性が示唆される。しかしながら 3-fold 期で PTR-18::GFP が頂端側細胞膜で検出される時、GRD-5::mCherry や GRD-10::mCherry は頂端側細胞膜近傍で共局在することはなかった (図.53)。また、孵化後の野生型と *ptr-18* 欠失変異体における GRD-5::mCherry や GRD-10::mCherry の局在に変化があるか否か精査したが、変化は認められなかった(図.54)。つまり、*grd-5* や *grd-10* は *grl-7* のように *ptr-18* によって制御を受けないが、飢餓条件下の *ptr-18* 欠失変異体における P 細胞の活性化に寄与していることが示唆される。

### 3-13. *ptr-18* 欠失変異体ではインスリンの発現が上昇する

*ptr-18* と IIS 経路の遺伝学的関係を検証するために、孵化直後の野生型と *ptr-18* 欠失変異体、*ptr-18* と *gri-7* の二重変異体におけるインスリン遺伝子群をコードする *ins-3* や *ins-4*、*ins-6*、*daf-28* の mRNA 発現量を比較した。*ins-3* や *ins-4*、*ins-6*、*daf-28* は、過剰発現させることで、飢餓条件下における QR/QL 細胞や M 細胞の静止期状態を解除することが報告されている (Chen and Baugh, 2014; Zheng et al., 2018)。*ins-4* の mRNA 発現量は、*ptr-18* 欠失変異体の方が、野生型や *ptr-18* と *gri-7* の二重変異体よりも常に 2 倍以上高いことが認められた (図.55)。その一方で、*ins-3* や *ins-6*、*daf-28* は野生型と *ptr-18* 欠失変異体で変化が認められなかった。また、インスリン遺伝子群は主に頭部の神経細胞や腸細胞で発現することが認められており、*ins-4* のみ表皮細胞で発現する (Chen and Baugh, 2014)。以上より、*ptr-18* は *gri-7* を介して、表皮細胞から分泌される *ins-4* の制御をする可能性が考えられる。

### 3-14. *ptr* 遺伝子がレトロマーを抑制する

線虫の *ptr* 遺伝子をコードする *daf-6* は、頭部の感覚神経組織の形態形成に重要で (Perens and Shaham, 2005)、その抑圧指標遺伝子としてレトロマーの構成因子で sorting nexin (*snx*) をコードする *snx-1* や *snx-3* が同定されている (Oikonomou et al., 2012)。*ptr-18* と *daf-6* が同様の遺伝学経路で機能すると仮定し、*ptr-18* 遺伝子と *snx* 遺伝子群の遺伝学的相互作用を検討した。*ptr-18* 欠失変異体は飢餓条件下において P 細胞は活性化するのに対して、*snx-1* の欠失変異を導入することで、*ptr-18* 欠失変異体の表現型は抑制された (図.55)。それに対して、*snx-9* や *snx-13*、*snx-17*、*snx-27* の欠失変異を *ptr-18* 欠失変異体に導入しても、その表現型は抑制されることはなかった (図.56)。一方で、*ptr-18* 欠失変異体に *snx-3* の欠失変異を加えると、ホモ 2 重で維持することはできず、致死の表現型を呈する可能性が考えられ、*ptr-18* と *snx-3* の遺伝学的相互作用は明らかにできていない。よって、*ptr-18* は *daf-6* と同様の遺伝子を下流にもつことから、*ptr* 遺伝子同士は類似した機能をもつ可能性が示唆される。

## 4. 考察

#### 4-1. *ptr-18* と IIS 経路/*mir-235* は異なるメカニズムで *grl-5* や *grl-7* を抑制する

本研究によって、*ptr-18* は表皮細胞や P 細胞で機能し、P 細胞の静止期を維持することが示唆された。*ptr-18* 欠失変異体では、P 細胞の活性化の後に M 細胞の活性化が、そして M 細胞の活性化の後に脱皮が起こる。同様の表現型は表皮細胞と P 細胞で恒常活性化型の *akt-1* を過剰発現した際や、*ptr-18* と同様に表皮細胞で機能する *mir-235* の欠失変異体でも認められる (Fukuyama et al., 2015; Kasuga et al., 2013)。よって、IIS 経路-*mir-235* シグナル軸と *ptr-18* は、表皮細胞や P 細胞で発現する共通した下流遺伝子を介して P 細胞の静止期を制御する可能性が考えられる。我々は、そのような下流遺伝子として、*mir-235* の標的遺伝子である *grl-5* や *grl-7* を提唱してきた (Kume et al., 2019)。本研究は、飢餓条件下における P 細胞の静止期を制御する因子として *ptr-18* 欠失変異体を同定し、*ptr-18* の下流で *grl-5* や *grl-7* が機能することを示した。よって、本研究は、表皮細胞から分泌された GRL-5 や GRL-7 タンパク質が、表皮細胞における IIS 経路や *ptr-18* による非細胞自律的な P 細胞の静止期制御を介在する因子であることをさらに裏付けることとなった。では、*ptr-18* と IIS 経路や *mir-235* は同じ遺伝学的経路で機能するのであろうか？本研究では、*ptr-18* 欠失変異体において GRL-7 レポータータンパク質の内在化の遅延が認められたのに対し、*daf-16* や *mir-235* 欠失変異体ではそのような表現型は観察されなかった。よって、*daf-16* や *mir-235* 欠失変異体において、*ptr-18* の活性が減弱している可能性は低いと考えられる。一方で、飢餓条件下での生存率に着目すると、*daf-16* 欠失変異体は顕著に減少するのに対して、*ptr-18* 欠失変異体では野生型のようにその傾向が認められない。よって、*ptr-18* 欠失変異体では、*daf-16* 欠失変異体のように IIS 経路が異常亢進している可能性は低いと考えられる。以上より、IIS 経路は *mir-235* を介して *grl-5* や *grl-7* の発現を抑制することで、一方 *ptr-18* は細胞外に分泌された GRL-5 や GRL-7 タンパク質の適切なタイミングでの内在化を促進することで、P 細胞静止期と、それに連動した M 細胞の静止期や脱皮を制御する可能性が示唆される。

#### 4-2. PTR 遺伝子同士が類似した機能をもつ可能性

我々の研究では、*ptr-18* 以外の *ptr* 遺伝子群の欠失変異体でも、飢餓条件下で P 細胞が低頻度ではあるものの活性化することを見出している。先行知見で、*ptr-1* と *ptr-16* の Feeding RNAi による二重阻害は、それぞれ単独で阻害するよりも、脱皮不全や致死の表現型を示す個体の割合が増加す



ることや、*ptr-4* や *ptr-18*、*ptr-23* の機能阻害では、母体の腸細胞から卵母細胞へ供給される卵黄タンパク質の取り込みができなくなるといったことから(Zugasti et al., 2005)、特定の *ptr* 遺伝子群が同一の遺伝学的経路で協調的に機能する可能性が示唆されている。また現在、線虫の *ptr* 遺伝子群のうち、*ptr-18* 以外にも *daf-6* や *ptr-6*、*ptr-23* の発現組織が明らかになっている(Choi et al., 2016; Perens and Shaham, 2005; Rohlfing et al., 2011)。その中でも *ptr-23* 遺伝子は、*ptr-18* と同様に表皮細胞や P 細胞で発現が検出されており(Rohlfing et al., 2011)、*ptr-23* 欠失変異体は、飢餓条件下において P 細胞の活性化が低頻度であるが検出された(図4)。さらに、*ptr-23* は、*ptr-18* と同様に胚発生後期において mRNA の発現量が増加することが、DNA マイクロアレイをもちいた解析より報告されている(Baugh et al., 2009)。以上のことから発現組織や発現時期が類似した複数の *ptr* 遺伝子同士が、寄与の程度は異なるものの、協調的に特定の *hh-r* の活性化を制御する可能性が考えられる。

#### 4-3.特定の *ptr* 遺伝子は特定の *hh-r* 遺伝子群を制御する可能性

複数の *hh-r* 遺伝子群や *ptr* 遺伝子群を機能阻害すると、脱皮を完了できない表現型を呈する(Hao et al., 2006b; Zugasti et al., 2005)。一方、*grl-21* と *ptr-24* 遺伝子は、ミトコンドリアの断片化を介した脂質の蓄積に関してお互いに拮抗的に機能することが報告されている(Lin and Wang, 2017)。よって、線虫では、*hh-r* 遺伝子と *ptr* 遺伝子が同じ遺伝学的経路で機能することが推測される。ショウジョウバエやマウスといった他の動物種は、一個ないしは数個の Hh 遺伝子を有する。それに対して線虫は 61 の *hh-r* 遺伝子をもつ(Bürglin and Kuwabara, 2006)。また、ショウジョウバエやマウスは一個、ないしは数個の *ptr* や *ptchd* 遺伝子しかもたないのに対し、線虫は 24 個もの *ptr* 遺伝子をもつ(Bürglin and Kuwabara, 2006)。表皮細胞で発現が示唆される *grl* や *grd* 遺伝子のうち、*grl-5* や *grl-7*、*grl-27*、*grd-5*、*grd-10* の機能を阻害すると、*ptr-18* 欠失変異体の表現型は顕著に抑制され。その一方では、同じように表皮細胞で発現する *grl-2* や *grl-4*、*grl-10*、*grl-15*、*grl-17*、*grl-21* といった遺伝子の機能阻害は、*ptr-18* 欠失変異体の表現型に影響を与えない。このことは、類似した時期や同じ組織で発現する *grd* や *grl* が、特定の *ptr* と共に機能することを反映しているのかもしれない。

#### 4-4. *grd* 遺伝子や *grl* 遺伝子が下流にシグナルを伝達する可能性

我々の研究により、*grd-5* や *grd-10*、*grl-5*、*grl-7* は、P 細胞の活性化を促進することが示された。では、これらの *grd* 遺伝子や *grl* 遺伝子は、どのような遺伝学的経路を介して P 細胞を活性化するのであろうか。線虫は、Hh 受容体である PATCHED をコードする遺伝子 *ptc-1* と *ptc-3* をもつ。その中でも *ptc-3* の機能阻害は、*hh-r* 遺伝子や *ptr* 遺伝子と同様に、脱皮不全の表現型を呈することから、これらの遺伝子群は同じ遺伝学的経路で機能する可能性が議論されている (Hao et al., 2006b; Zugasti et al., 2005)。よって、PTC-1 や PTC-3 タンパク質が、GRD タンパク質や GRL タンパク質の受容体として機能する可能性が考えられる。しかしながら、*ptc-1* や *ptc-3* の機能阻害は、それぞれ不妊や胚性致死の表現型に至るため、飢餓条件下の L1 幼虫における P 細胞の静止期維持における両 *ptc* 遺伝子の関与を検討するのは技術的に非常に困難である。哺乳動物培養細胞において、PTCHD1 や PTCHD4 (PTCH53 ともよばれる) の過剰発現が Hh シグナル伝達経路を抑制することが報告されている (Chung et al., 2014; Noor et al., 2010)。哺乳動物の PTCHD も、線虫の PTR-18 のように Hh のエンドサイトーシスを促進することで、その活性を抑制するのかもしれない。

## 5. 参考文献

Aspöck, G., Kagoshima, H., Niklaus, G., and Bürglin, T.R. (1999). *Caenorhabditis elegans* has scores of hedgehog-related genes: sequence and expression analysis. *Genome Res.* *9*, 909–923.

Baugh, L.R., and Sternberg, P.W. (2006). DAF-16/FOXO Regulates Transcription of *cki-1/Cip/Kip* and Repression of *lin-4* during *C. elegans* L1 Arrest. *Curr. Biol.* *16*, 780–785.

Baugh, L.R., DeModena, J., and Sternberg, P.W. (2009). RNA Pol II accumulates at promoters of growth genes during developmental arrest. *Science* (80-. ). *324*, 92–94.

Bolatto, C., Parada, C., Revello, F., Zuñiga, A., Cabrera, P., and Cambiazo, V. (2015). Spatial and temporal distribution of Patched-related protein in the *Drosophila* embryo. *Gene Expr. Patterns* *19*, 120–128.

Brenner, S. (1974). THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* *77*, 71–94.

Bürglin, T.R., and Kuwabara, P.E. (2006). Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. *WormBook* 1–14.

Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., and Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified Hedgehog from signaling cells. *Cell* *99*, 803–815.

Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., et al. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: Homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* (80-. ). *277*, 228–231.

Chaudhry, A., Noor, A., Degagne, B., Baker, K., Bok, L.A., Brady, A.F., Chitayat, D., Chung, B.H., Cytrynbaum, C., Dymont, D., et al. (2015). Phenotypic spectrum associated with PTCHD1 deletions and truncating mutations includes intellectual disability and autism spectrum disorder. *Clin. Genet.* *88*, 224–233.

Chen, Y., and Baugh, L.R. (2014). *Ins-4* and *daf-28* function redundantly to regulate *C. elegans* L1 arrest. *Dev. Biol.* *394*, 314–326.

Chen, C.C.-H., Schweinsberg, P.J., Vashist, S., Mareiniss, D.P., Lambie, E.J., and Grant, and B.D. (2006). RAB-10 Is Required for Endocytic Recycling in the *Caenorhabditis elegans* Intestine. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1286–1297.

Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 329–340.

Choi, M.K., Son, S., Hong, M., Choi, M.S., Kwon, J.Y., and Lee, J. (2016). Maintenance of membrane integrity and permeability depends on a patched-related protein in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *202*, 1411–1420.

- Chung, J.H., Larsen, A.R., Chen, E., and Bunz, F. (2014). A PTCH1 homolog transcriptionally activated by p53 suppresses hedgehog signaling. *J. Biol. Chem.* *289*, 33020–33031.
- D.M., S., M., H., M., A., T.A., S., Q., G., R.L., J., M.P., S., D., P., A., G., H., P., et al. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* *384*, 129–134.
- D’Angelo, G., Matussek, T., Pizette, S., and Théron, P.P. (2015). Endocytosis of hedgehog through dispatched regulates long-range signaling. *Dev. Cell* *32*, 290–303.
- Dickinson, D.J., Pani, A.M., Heppert, J.K., Higgins, C.D., and Goldstein, B. (2015). Streamlined genome engineering with a self-excising drug selection cassette. *Genetics* *200*, 1035–1049.
- Doonan, R., Hatzold, J., Raut, S., Conradt, B., and Alfonso, A. (2008). HLH-3 is a *C. elegans* Achaete/Scute protein required for differentiation of the hermaphrodite-specific motor neurons. *Mech. Dev.* *125*, 883–893.
- Duerr, J. (2006). Immunohistochemistry. *WormBook* 1–61.
- Filges, I., Röthlisberger, B., Blattner, A., Boesch, N., Demougin, P., Wenzel, F., Huber, A.R., Heinemann, K., Weber, P., and Miny, P. (2011). Deletion in Xp22.11: PTCHD1 is a candidate gene for X-linked intellectual disability with or without autism. *Clin. Genet.* *79*, 79–85.
- Forbes, A.J., Nakano, Y., Taylor, A.M., and Ingham, P.W. (1993). Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. *Development* *119*, 115–124.
- Fukuyama, M., Rougvie, A.E., and Rothman, J.H. (2006). *C. elegans* DAF-18/PTEN Mediates Nutrient-Dependent Arrest of Cell Cycle and Growth in the Germline. *Curr. Biol.* *16*, 773–779.
- Fukuyama, M., Kontani, K., Katada, T., and Rougvie, A.E. (2015). The *C. Elegans* hypodermis couples progenitor cell quiescence to the dietary state. *Curr. Biol.* *25*, 1241–1248.
- Gilleard, J.S., Barry, J.D., and Johnstone, I.L. (1997). cis regulatory requirements for hypodermal cell-specific expression of the *Caenorhabditis elegans* cuticle collagen gene *dpy-7*. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 2301–2311.
- Grant, B., and Hirsh, D. (1999). Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol. Biol. Cell* *10*, 4311–4326.
- Hao, L., Johnsen, R., Lauter, G., Baillie, D., and Bürglin, T.R. (2006a). Comprehensive analysis of gene expression patterns of hedgehog-related genes. *BMC Genomics* *7*.
- Hao, L., Mukherjee, K., Liegeois, S., Baillie, D., Labouesse, M., and Bürglin, T.R. (2006b). The hedgehog-related gene

qua-1 is required for molting in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Dyn.* 235, 1469–1481.

Hermann, G.J., Schroeder, L.K., Hieb, C.A., Kershner, A.M., Rabbitts, B.M., Grant, P.F.B.D., and Priess, J.R. (2005). Genetic Analysis of Lysosomal Trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 3273–3288.

Hong, Y., Roy, R., and Ambros, V. (1998). Developmental regulation of a cyclin-dependent kinase inhibitor controls postembryonic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 3585–3597.

Johnson, T.E., Mitchell, D.H., Kline, S., Kemal, R., and Foy, J. (1984). Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 28, 23–40.

Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., and Ahringer, J. (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* Ravi S Kamath , Maruxa Martinez-Campos , Peder Zipperlen , Andrew G Fraser. *Genome Biol.* 2, 1–10.

Kaplan, R.E.W., Chen, Y., Moore, B.T., Jordan, J.M., Maxwell, C.S., Schindler, A.J., and Baugh, L.R. (2015). *dbl-1/TGF- $\beta$*  and *daf-12/NHR* Signaling Mediate Cell-Nonautonomous Effects of *daf-16/FOXO* on Starvation-Induced Developmental Arrest. *PLoS Genet.* 11, 1–23.

Kasuga, H., Fukuyama, M., Kitazawa, A., Kontani, K., and Katada, T. (2013). The microRNA miR-235 couples blast-cell quiescence to the nutritional state. *Nature* 497, 503–506.

Katayama, H., Yamamoto, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Miyawaki, A. (2008). GFP-like Proteins Stably Accumulate in Lysosomes. *Cell Struct. Funct.* 33, 1–12.

Kawasaki, I., Shim, Y.H., Kirchner, J., Kaminker, J., Wood, W.B., and Strome, S. (1998). PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*. *Cell* 94, 635–645.

Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580.

Kume, M., Chiyoda, H., Kontani, K., Katada, T., and Fukuyama, M. (2019). Hedgehog-related genes regulate reactivation of quiescent neural progenitors in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 520, 532–537.

Kuwabara, P.E., Lee, M.H., Schedl, T., and Jefferis, G.S. (2000). A *C. elegans* patched gene, *ptc-1*, functions in germ-line cytokinesis. *Genes Dev.* 14, 1933–1944.

Li, N., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* (80- ). 327,

542–545.

Lin, C.C.J., and Wang, M.C. (2017). Microbial metabolites regulate host lipid metabolism through NR5A-Hedgehog signalling. *Nat. Cell Biol.* *19*, 550–557.

Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M.A., Tagle, D.A., et al. (1997). Murine model of Niemann-Pick C disease: Mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* (80-. ). *277*, 232–235.

Lu, X., Liu, S., and Kornberg, T.B. (2006). The C-terminal tail of the Hedgehog receptor Patched regulates both localization and turnover. *Genes Dev.* *20*, 2539–2551.

Marigo, V., Davey, R.A., Zuo, Y., Cunningham, J.M., and Tabin, C.J. (1996). Biochemical evidence that patched is the hedgehog receptor. *Nature* *384*, 176–179.

Marshall, C.R., Noor, A., Vincent, J.B., Lionel, A.C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., et al. (2008). Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 477–488.

Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). P57 Is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *9*, 262–271.

Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* *10*, 3959–3970.

Noor, A., Whibley, A., Marshall, C.R., Gianakopoulos, P.J., Piton, A., Carson, A.R., Orlic-Milacic, M., Lionel, A.C., Sato, D., Pinto, D., et al. (2010). Disruption at the PTCHD1 locus on Xp22.11 in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Sci. Transl. Med.* *2*, 49ra68-49ra68.

Oikonomou, G., Perens, E.A., Lu, Y., and Shaham, S. (2012). Some, but not all, retromer components promote morphogenesis of *C. elegans* sensory compartments. *Dev. Biol.* *362*, 42–49.

Parry, J.M., and Sundaram, M. V. (2014). A non-cell-autonomous role for Ras signaling in *C. elegans* neuroblast delamination. *Development* *141*, 4279–4284.

PE, K., and M, L. (2002). The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.* *18*, 193–201.

Perens, E.A., and Shaham, S. (2005). *C. elegans* *daf-6* encodes a patched-related protein required for lumen formation. *Dev. Cell* *8*, 893–906.

Pinto, D., Pagnamenta, A.T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C.,

- Abrahams, B.S., et al. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466, 368–372.
- Poteryaev, D., Fares, H., Bowerman, B., and Spang, A. (2007). *Caenorhabditis elegans* SAND-1 is essential for RAB-7 function in endosomal traffic. *EMBO J.* 26, 301–312.
- Reboul, J., Vaglio, P., Rual, J.-F., Lamesch, P., Martinez, M., Armstrong, C.M., Li, S., Jacotot, L., Bertin, N., Janky, R., et al. (2003). *C. elegans* ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nat. Genet.* 34, 35–41.
- Rodgers, J.T., King, K.Y., Brett, J.O., Cromie, M.J., Charville, G.W., Maguire, K.K., Brunson, C., Mastey, N., Liu, L., Tsai, C.R., et al. (2014). MTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G 0 to G Alert. *Nature* 510, 393–396.
- Rohlfing, A.K., Miteva, Y., Moronetti, L., He, L., and Lamitina, T. (2011). The *Caenorhabditis elegans* mucin-like protein OSM-8 negatively regulates osmosensitive physiology via the transmembrane protein PTR-23. *PLoS Genet.* 7.
- Soloviev, A., Gallagher, J., Mamef, A., and Kuwabara, P.E. (2011). *C. elegans* patched-3 is an essential gene implicated in osmoregulation and requiring an intact permease transporter domain. *Dev. Biol.* 351, 242–253.
- Sulston, J.E. (1976). Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 275, 287–297.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic Cell Lineages of the Nematode, *Caenorhabditis elegans*.
- Torrico, B., Fernández-Castillo, N., Hervás, A., Milà, M., Salgado, M., Rueda, I., Buitelaar, J.K., Rommelse, N., Oerlemans, A.M., Bralten, J., et al. (2015). Contribution of common and rare variants of the *PTCHD1* gene to autism spectrum disorders and intellectual disability. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 1694–1701.
- Treusch, S., Knuth, S., Slaugenhaupt, S.A., Goldin, E., Grant, B.D., and Fares, H. (2004). *Caenorhabditis elegans* functional orthologue of human protein h-mucolipin-1 is required for lysosome biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4483–4488.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., and Saier, M.H. (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 107–125.
- Tursun, B., Cochella, L., Carrera, I., and Hobert, O. (2009). A Toolkit and Robust Pipeline for the Generation of



Fosmid-Based Reporter Genes in *C. elegans*. *PLoS One* 4, e4625.

Ung, D.C., Iacono, G., Méziane, H., Blanchard, E., Papon, M.-A., Selten, M., van Rhijn, J.-R., Montjean, R., Rucci, J., Martin, S., et al. (2018). *Ptchd1* deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse. *Mol. Psychiatry* 23, 1356–1367.

Wang, X., and Chamberlin, H.M. (2002). Multiple regulatory changes contribute to the evolution of the *Caenorhabditis* *lin-48* ovo gene. *Genes Dev.* 16, 2345–2349.

Wei, X., Potter, C.J., Luo, L., and Shen, K. (2012). Controlling gene expression with the Q repressible binary expression system in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Methods* 9, 391–395.

Wells, M.F., Wimmer, R.D., Schmitt, L.I., Feng, G., and Halassa, M.M. (2016). Thalamic reticular impairment underlies attention deficit in *Ptchd1* Y<sup>0</sup> mice. *Nature* 532, 58–63.

Wicks, S.R., Yeh, R.T., Gish, W.R., Waterston, R.H., and Plasterk, R.H.A. (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat. Genet.* 28, 160–164.

Winnier, A.R., Meir, J.Y., Ross, J.M., Tavernarakis, N., Driscoll, M., Ishihara, T., Katsura, I., and Iii, D.M.M. (1999). UNC-4/UNC-37-dependent repression of motor neuron-specific genes controls synaptic choice in *Caenorhabditis elegans*. 2774–2786.

Zhang, J., Grindley, J.C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X.C., Ross, J.T., Haug, J.S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K.S., Wiedemann, L.M., et al. (2006). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 441, 518–522.

Zheng, S., Qu, Z., Zanetti, M., Lam, B., and Chin-Sang, I. (2018). *C. elegans* PTEN and AMPK block neuroblast divisions by inhibiting a BMP-insulin-PP2A-MAPK pathway. *Development* 145, dev166876.

Zhong, Y., Gu, L.J., Sun, X.G., Yang, S.H., and Zhang, X.H. (2014). Comprehensive analysis of patched domain-containing genes reveals a unique evolutionary pattern. *Genet. Mol. Res.* 13, 7318–7331.

Zugasti, O., Rajan, J., and Kuwabara, P.E. (2005). The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in *C. elegans*. *Genome Res.* 15, 1402–1410.

## 6. 図表

## Hedgehog

Hedgehog (*H. sapiens* :shh, Dhh, Ihh., *D. melanogaster*: Hh)

Hedge
Hog

## Hedgehog in *C. elegans*

Hedgehog-related

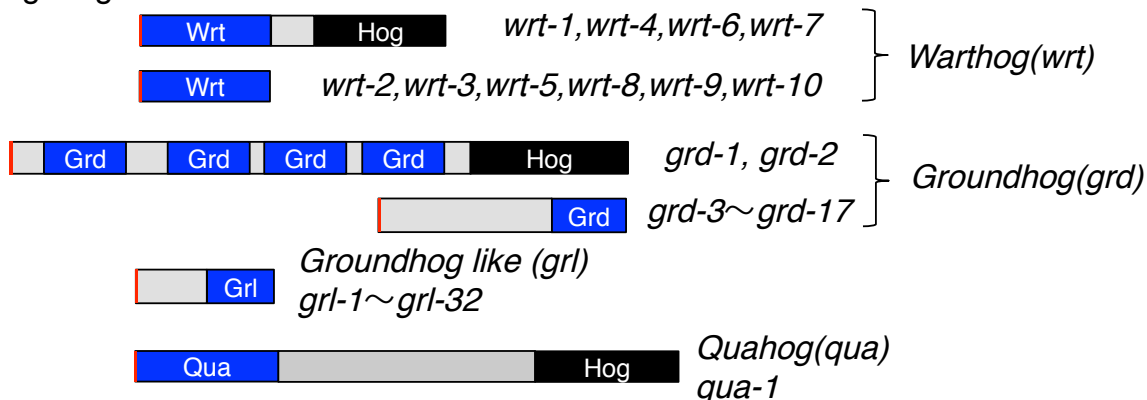
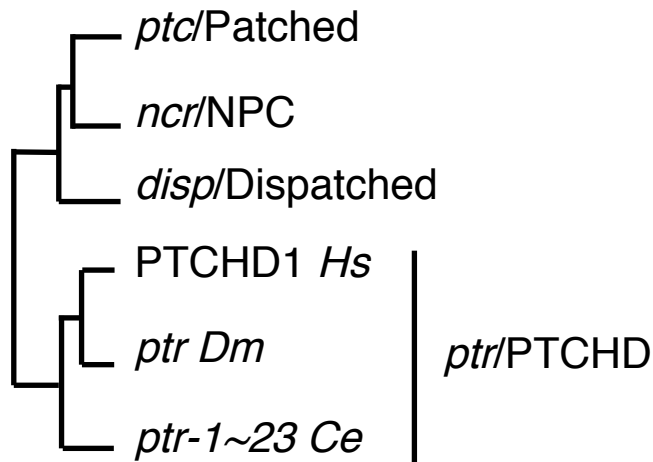


図.1 多様化した線虫の *hedgehog-related* (*hh-r*) 遺伝子群

線虫の *hh-r* は他の動物種の Hedgehog より多様化し、*Warthog* (*wrt*) や *Groundhog* (*grd*), *Ground like* (*grl*), *Quahog* (*qua*), *Hog* (*hog*) など、60種類以上存在する (Bürglin *et al.*, 2008 の図を改変)。赤: シグナルドメイン、青: Hedge ドメイン、黒: Hog ドメインを示す。



**図.2 PTCHDのオルソログである線虫の*ptr*遺伝子群**  
 コレステロールを認識するステロールセンシングドメイン(SSD)をもつ複数回膜貫通型タンパク質の系統樹 (Zhong *et al.*, 2014, Fig. S1 modified)。

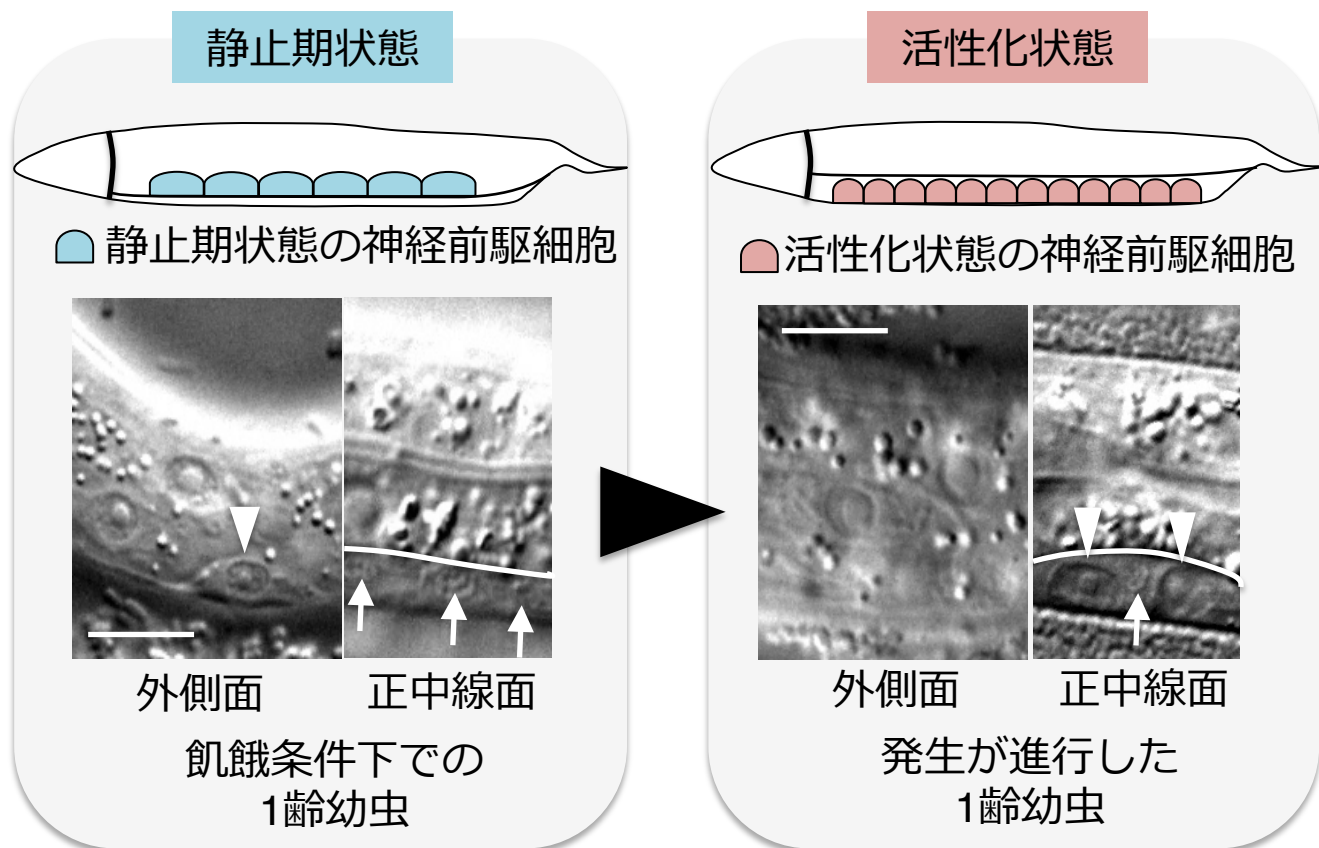
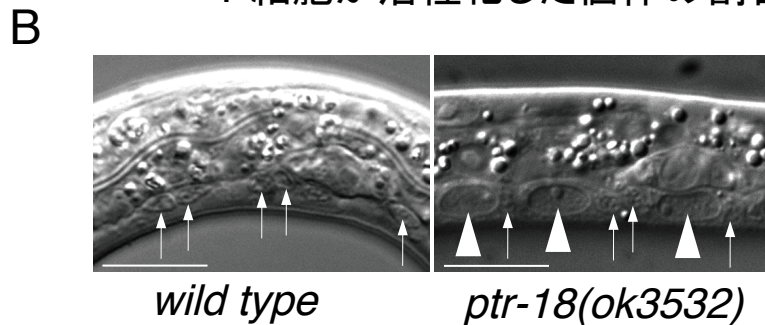
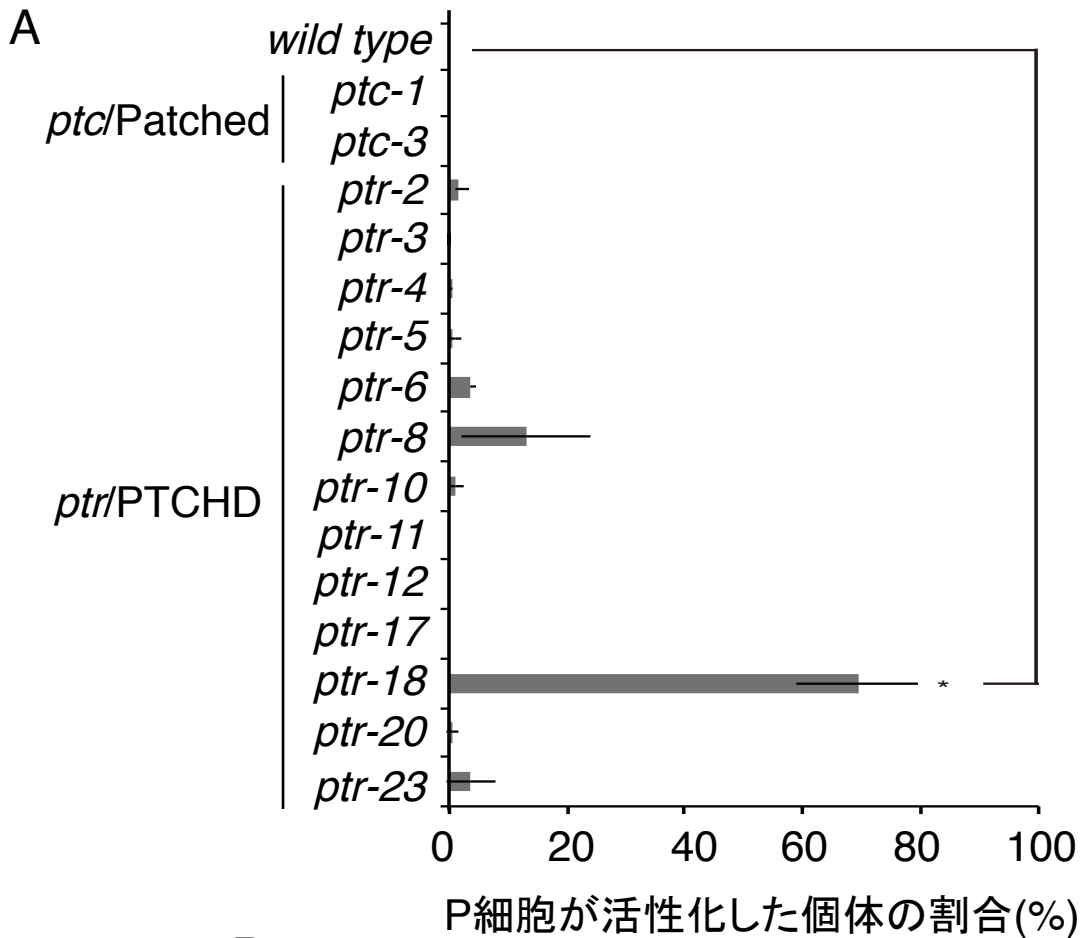


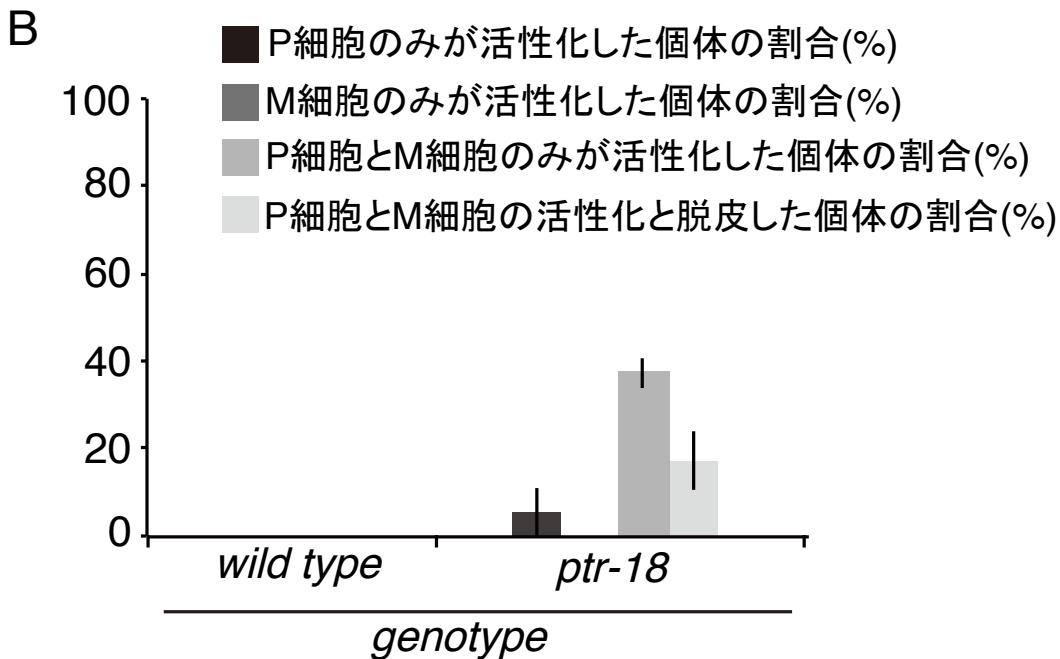
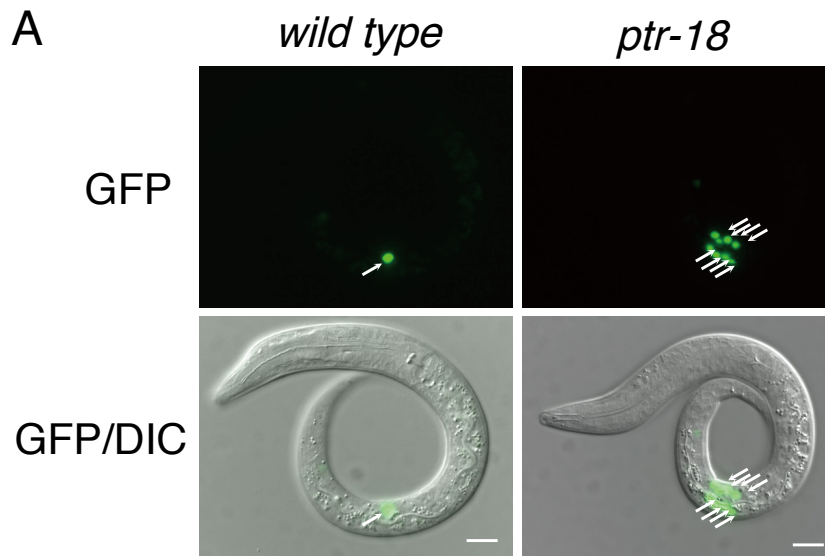
図.3 静止期状態と活性化状態のP細胞

静止期状態のP細胞(矢尻)は腹側外側面に6対並んでおり、腹側正中線面では運動神経(矢印)しか観察することができない。P細胞(矢尻)が活性化状態になることで、腹側正中線面にある運動神経近傍(矢印)に移動し一列に並び、腹側外側面では観察できなくなる。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。



**図.4 *ptr-18*は飢餓条件下でのP細胞の静止期状態の維持に必須である**

- A. 5日間飢餓培養した野生型と*ptc*遺伝子群や*ptr*遺伝子群の欠失変異体におけるP細胞が活性化した個体の割合。1回の計測で計35匹以上数えた、 $n=3$ , \*: $P < 0.01$  (unpaired two-sided t-test)、グラフは $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ を示す。
- B. 5日間飢餓培養した野生型と*ptr-18*欠失変異体の微分干渉像。矢尻:P細胞、矢印:運動神経、スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。



**図.5 *ptr-18*はM細胞の静止期維持に必須である**

A. 5日間飢餓培養した野生型と*ptr-18*欠失変異体の蛍光画像と、微分干渉像と蛍光画像の合成画像。矢印:M細胞、スケールバーは20  $\mu$ mを示す。

B. 5日間飢餓培養した野生型と*ptr-18*欠失変異体におけるP細胞のみが活性化した個体とM細胞のみが活性化した個体、P細胞とM細胞が活性化した個体、P細胞とM細胞が活性化して脱皮した個体のそれぞれの割合を示す。1回の計測で計35匹以上数えた。n=3、糸 優彦 2015 修士論文より

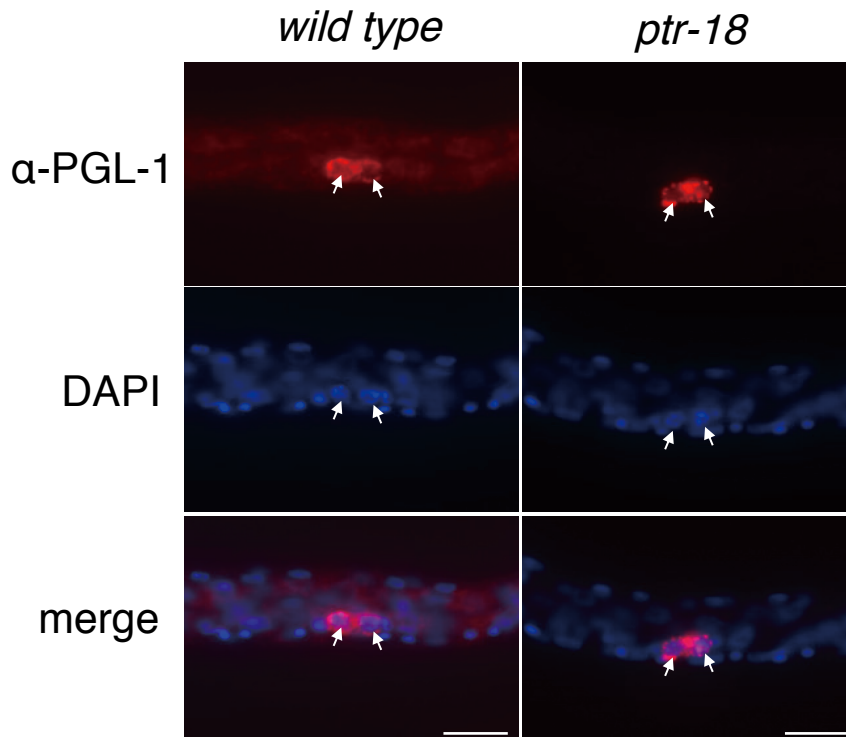


図.6 *ptr-18*は生殖幹細胞(Z2/Z3 細胞)の静止期制御に寄与しない  
 5日間飢餓培養した野生型と*ptr-18*欠失変異体における、 $\alpha$ -PGL-1抗体で免疫染色した蛍光画像と、DAPI染色の蛍光画像と、それぞれの合成画像を示す。スケールバーは10  $\mu$ mを示す。糸 優彦 2015 修士論文より



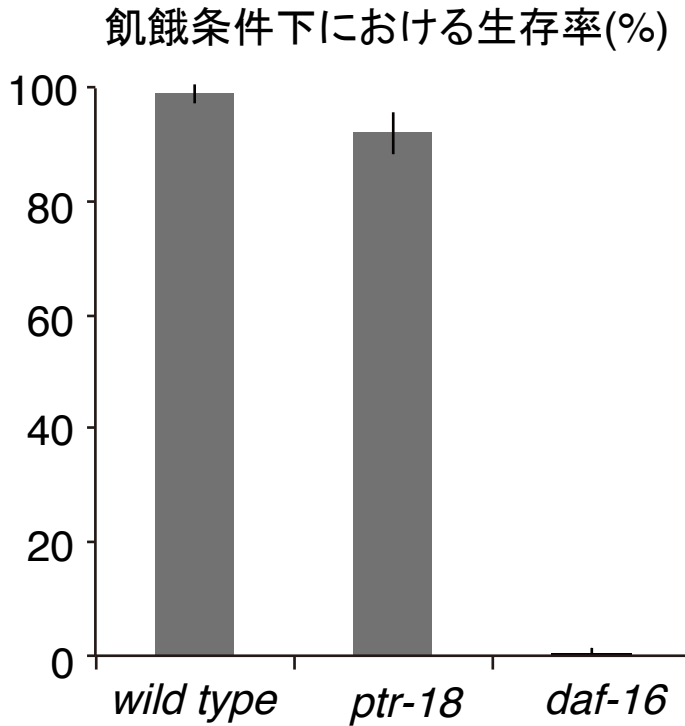
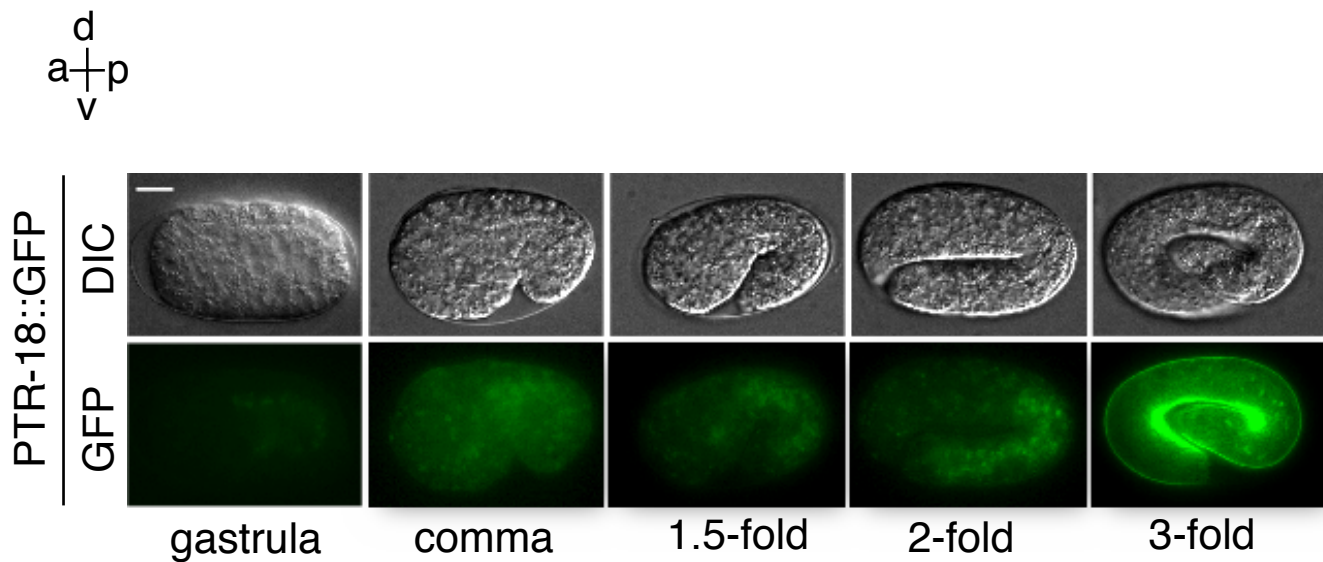


図.7 *ptr-18*は飢餓条件下における生存に寄与しない  
10日間飢餓培養した野生型と、*ptr-18*欠失変異体、*daf-16*欠失変異体における生存率を示す。1回の計測で計50匹以上数えた、n=3、グラフはmean±S.D.を示す。



**図.8 胚発生期においてPTR-18::GFPは3-fold期で発現する**

原腸胚期から胚発生後期までにおける微分干渉像とPTR-18::GFPの蛍光画像を示す。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。gastrula期から2.5-fold期まで検出されたGFP蛍光は自家蛍光である。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

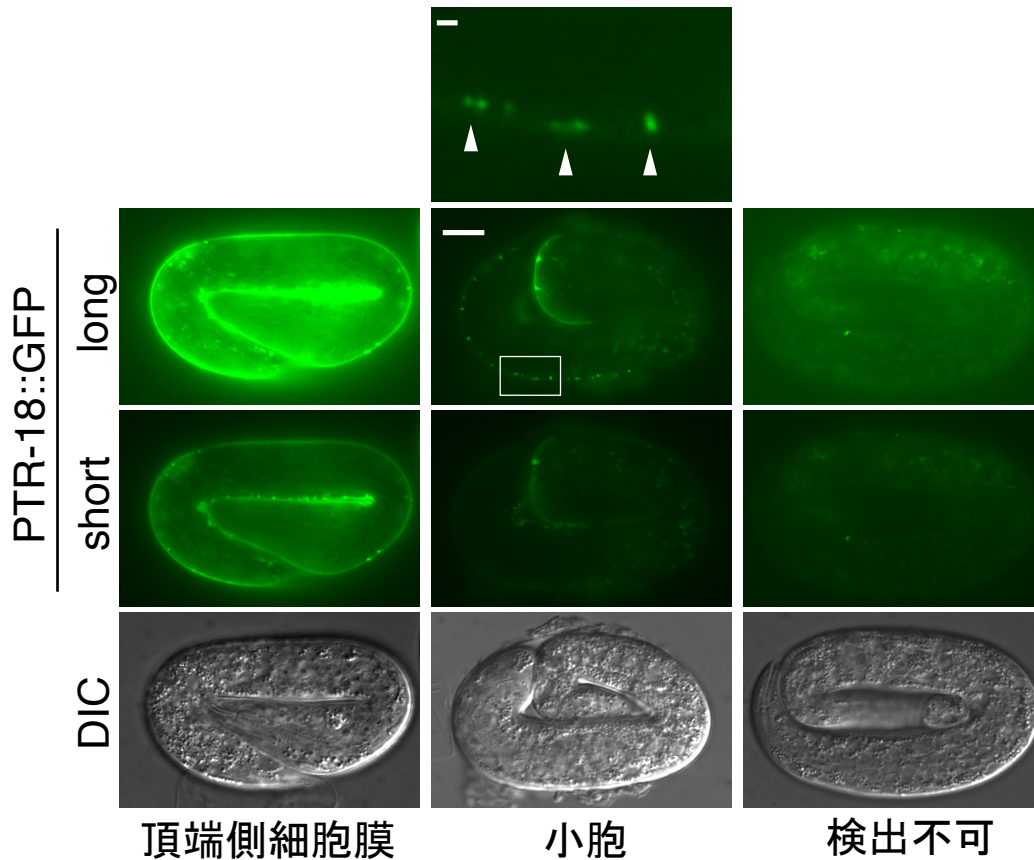


図.9 3-fold期においてPTR-18::GFPは局在が変化する

3-fold期の微分干渉像と、長短それぞれ同じ露光時間で撮影したPTR-18::GFPの蛍光画像、PTR-18::GFPが小胞で検出された時の拡大図を示す。long: 長い露光時間、short: 短い露光時間、矢尻: 小胞状で検出されたPTR-18::GFP、スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。ただし拡大図のスケールバーは1  $\mu\text{m}$ を示す。

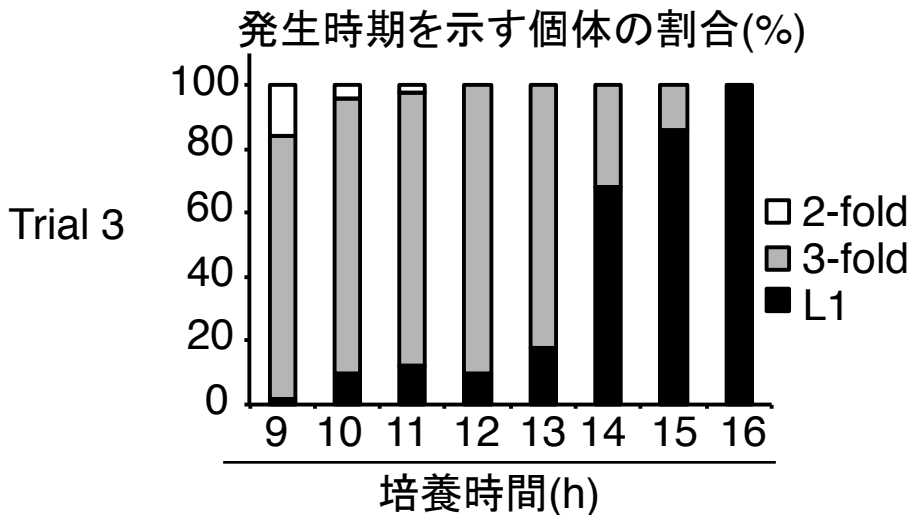
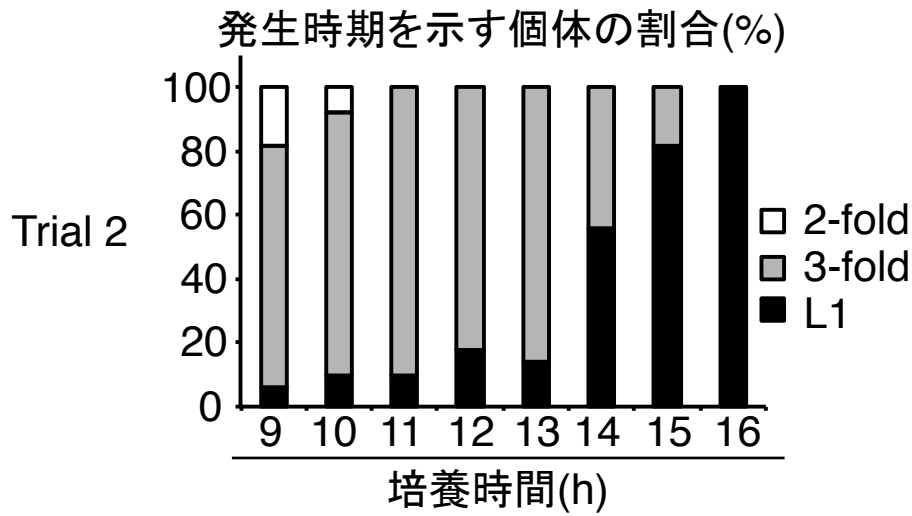
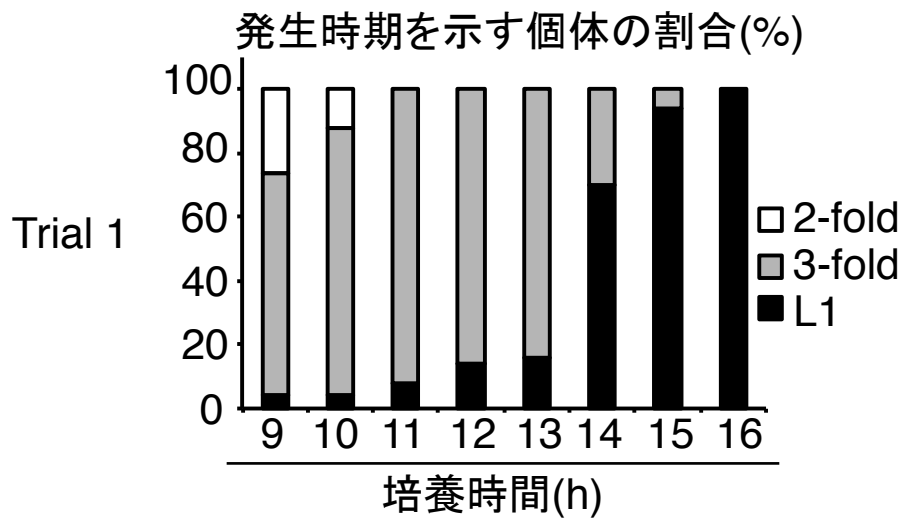
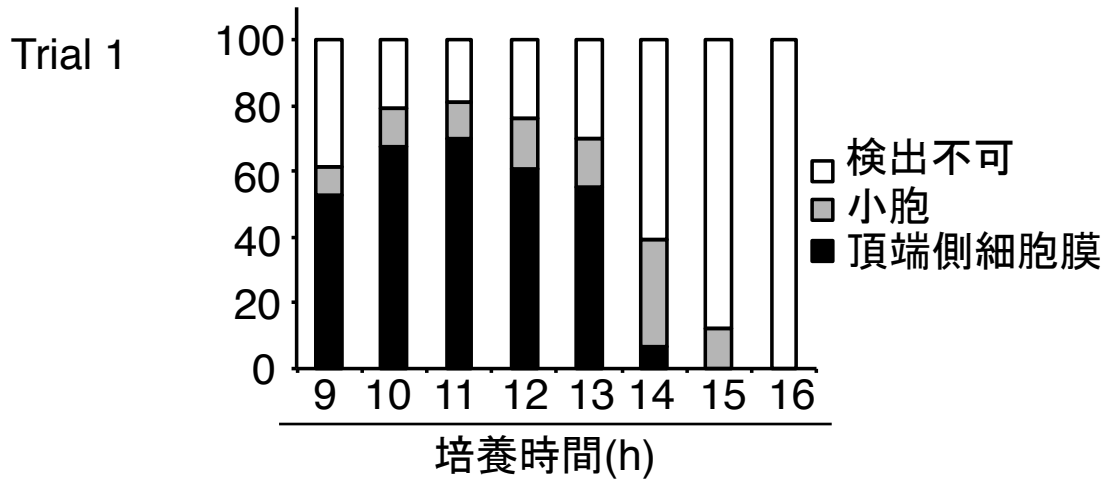


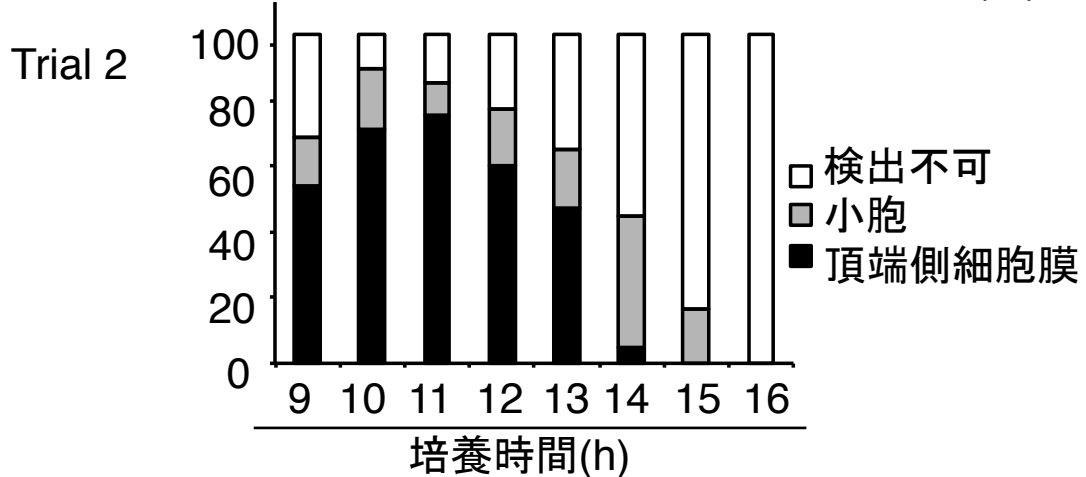
図.10 胚発生ステージの継時的変化

胚の培養開始から9時間から16時間における、2-fold期の胚(白)と3-fold期の胚(灰)、孵化した1齢幼虫(黒)のそれぞれの割合を示す。

### 3-fold期におけるPTR-18::GFPの局在分布の割合(%)



### 3-fold期におけるPTR-18::GFPの局在分布の割合(%)



### 3-fold期におけるPTR-18::GFPの局在分布の割合(%)

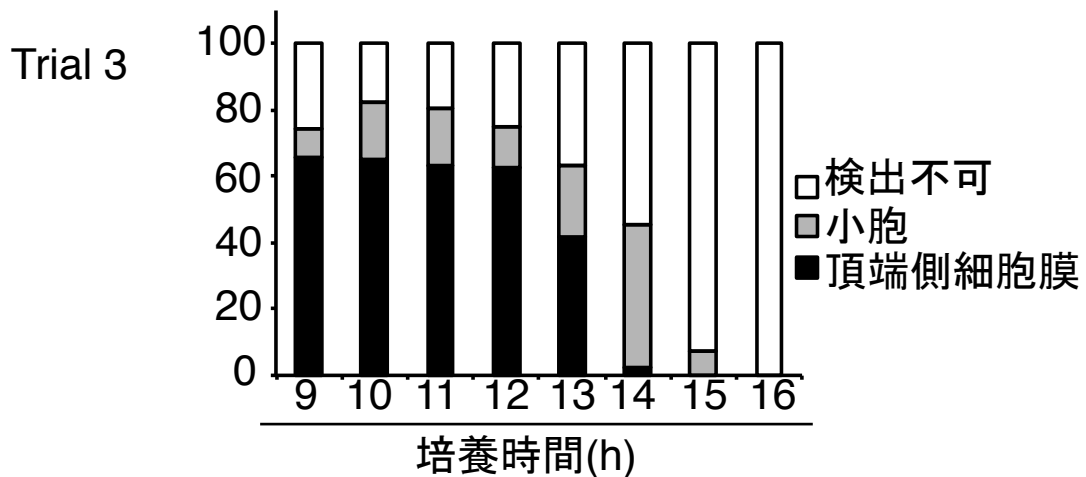
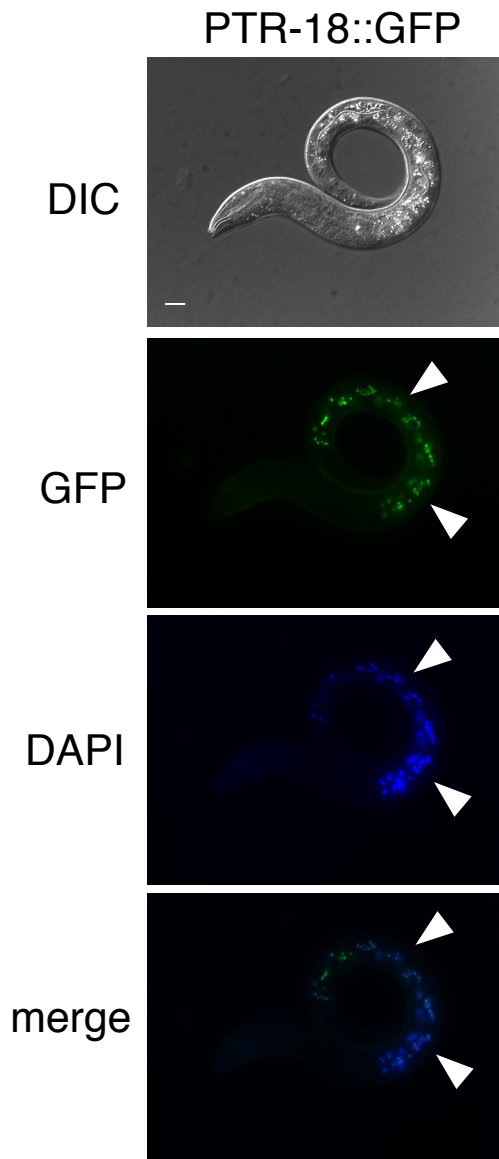


図.11 3-fold期の胚におけるPTR-18::GFPの局在分布の継時変化  
 胚の培養開始から9時から16時間での3-fold期の胚における、PTR-18::GFPが頂端側細胞膜で検出された個体(黒)と小胞状で検出された個体(灰)、検出ができなくなった個体(白)のそれぞれの割合を示す。



**図.12 飢餓時においてPTR-18::GFPは検出できない**

5日間飢餓培養した際の、微分干渉像とPTR-18::GFPの蛍光画像、DAPI染色の蛍光画像、PTR-18::GFPとDAPI染色の合成画像。GFPフィルターでも観察される蛍光（矢尻）は、gut granuleに由来する自家蛍光である。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

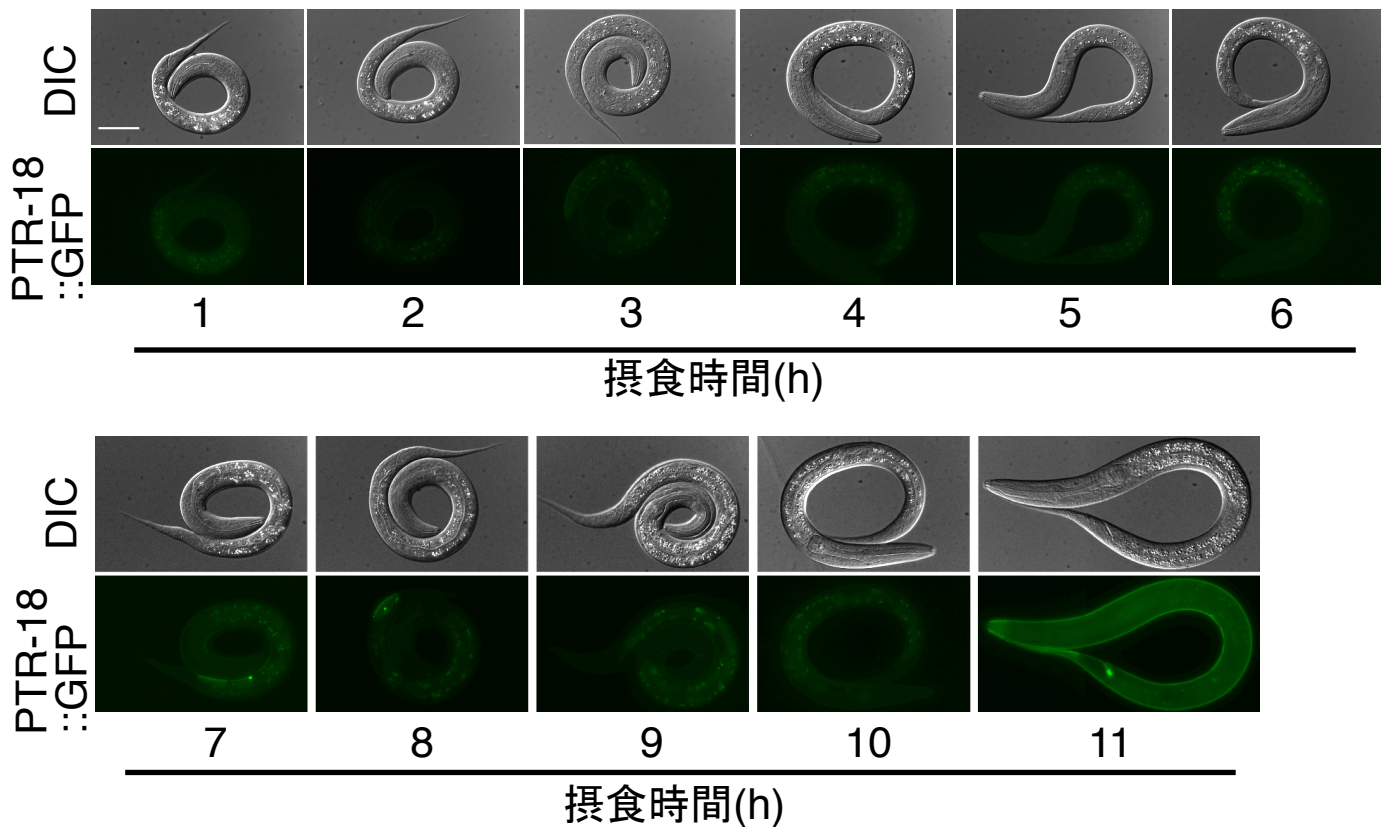
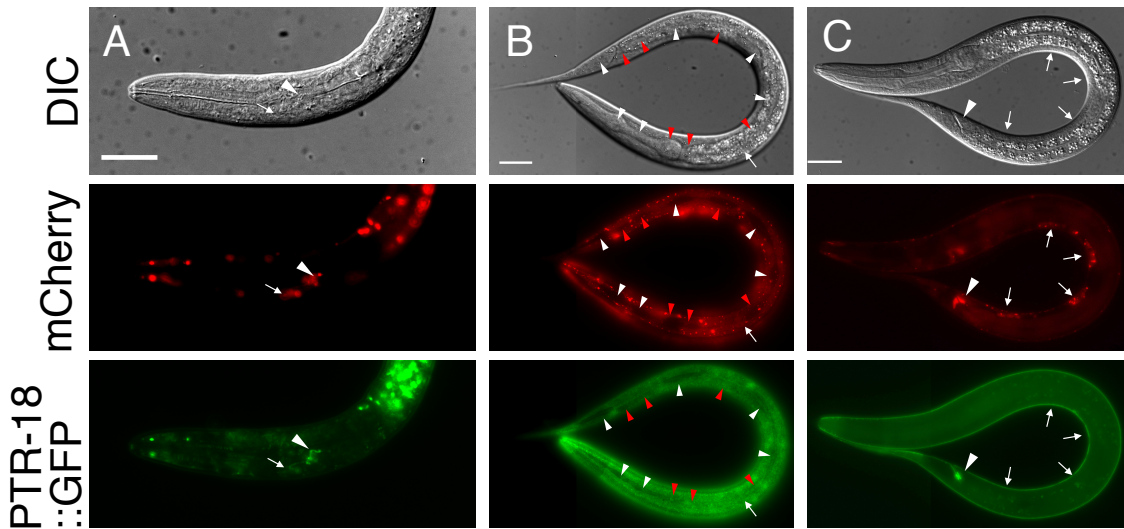


図.13 PTR-18::GFPは1齢幼虫後期で再度検出される

摂食条件下で摂食開始後1時間から11時間培養した際の微分干渉像とPTR-18::GFPの蛍光画像。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ を示す。



#### 図.14 PTR-18::GFPの発現組織

A. 孵化直後における1齢幼虫の微分干渉像と *Pptr-18::mCherry* の蛍光画像、PTR-18::GFPの蛍光画像を示す。矢尻:excretory duct細胞、矢印:G1 pore細胞

B. 摂食後11時間培養した1齢幼虫の微分干渉像と *Pptr-18::mCherry* の蛍光画像、PTR-18::GFPの蛍光画像を示す。

矢印:表皮細胞、白矢尻 : PTR-18::GFPが検出できないseam細胞、赤矢尻:PTR-18::GFPが検出できるseam細胞

C. 摂食後11時間培養した1齢幼虫の微分干渉像と *Pptr-18::mCherry* の蛍光画像、PTR-18::GFPの蛍光画像を示す。

矢尻 : UKF細胞群、矢印:P細胞の子孫細胞群、スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。



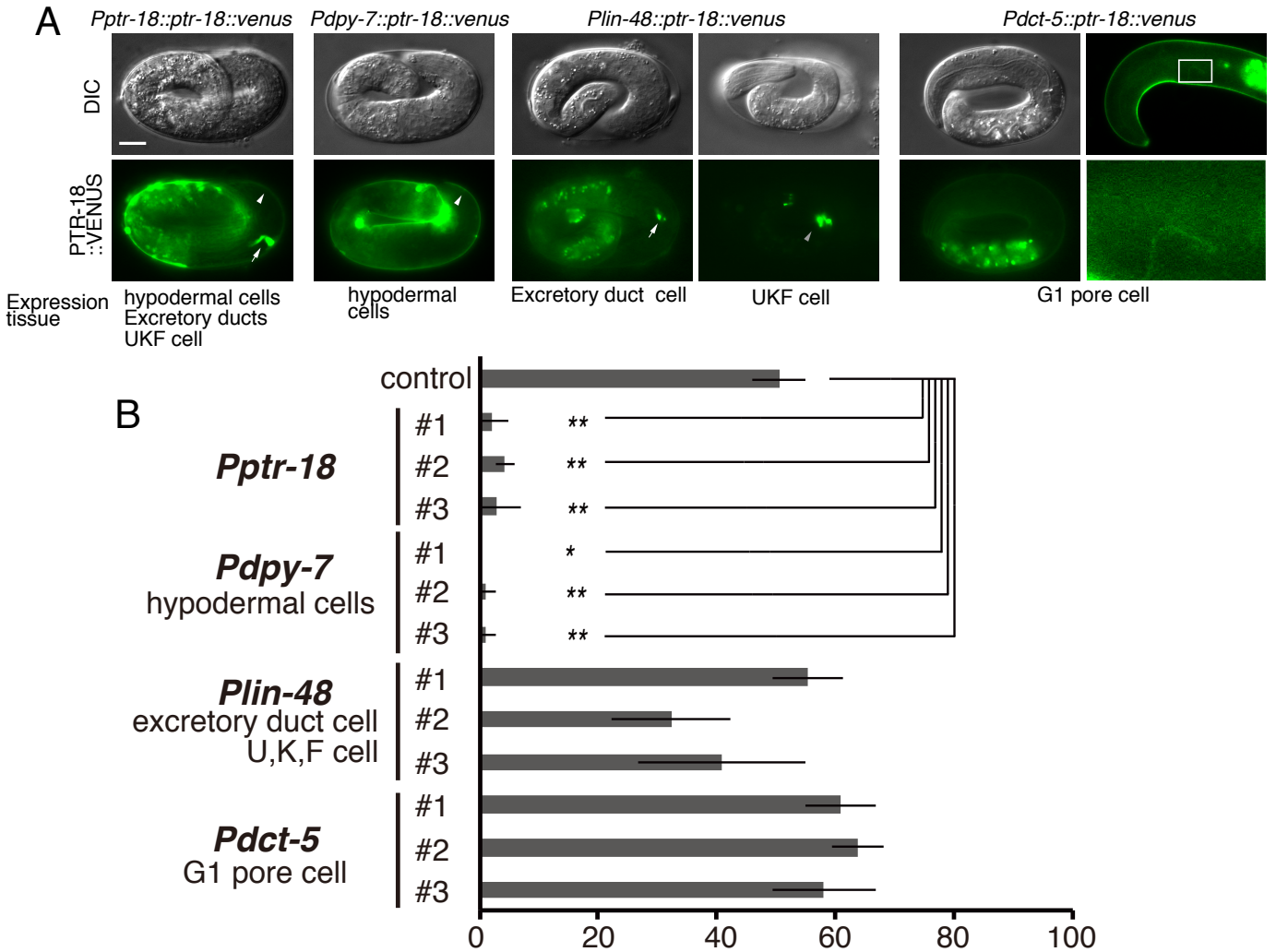


図.15 *ptr-18*はP細胞とその近傍の表皮細胞で機能する

A. *ptr-18*プロモーターや*dpy-7*プロモーター、*lin-48*プロモーター、*dct-5*プロモーターによって、PTR-18::VENUSを発現させた、3-fold期の胚と1齢幼虫の*ptr-18*欠失変異体における、微分干渉像とPTR-18::VENUSの蛍光画像。スケールバーは10  $\mu$ mを示す。

B. 5日間飢餓培養した、野生型と*ptr-18*欠失変異体、*ptr-18*プロモーターや*dpy-7*プロモーター、*lin-48*プロモーター、*dct-5*プロモーターなどによってPTR-18::VENUSを発現させた*ptr-18*欠失変異体のP細胞が活性化した個体の割合。1回の計測で計35匹以上数えた、n=3、\*:P< 0.01、\*\*:P< 0.001 (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean $\pm$  S.D.を示す。

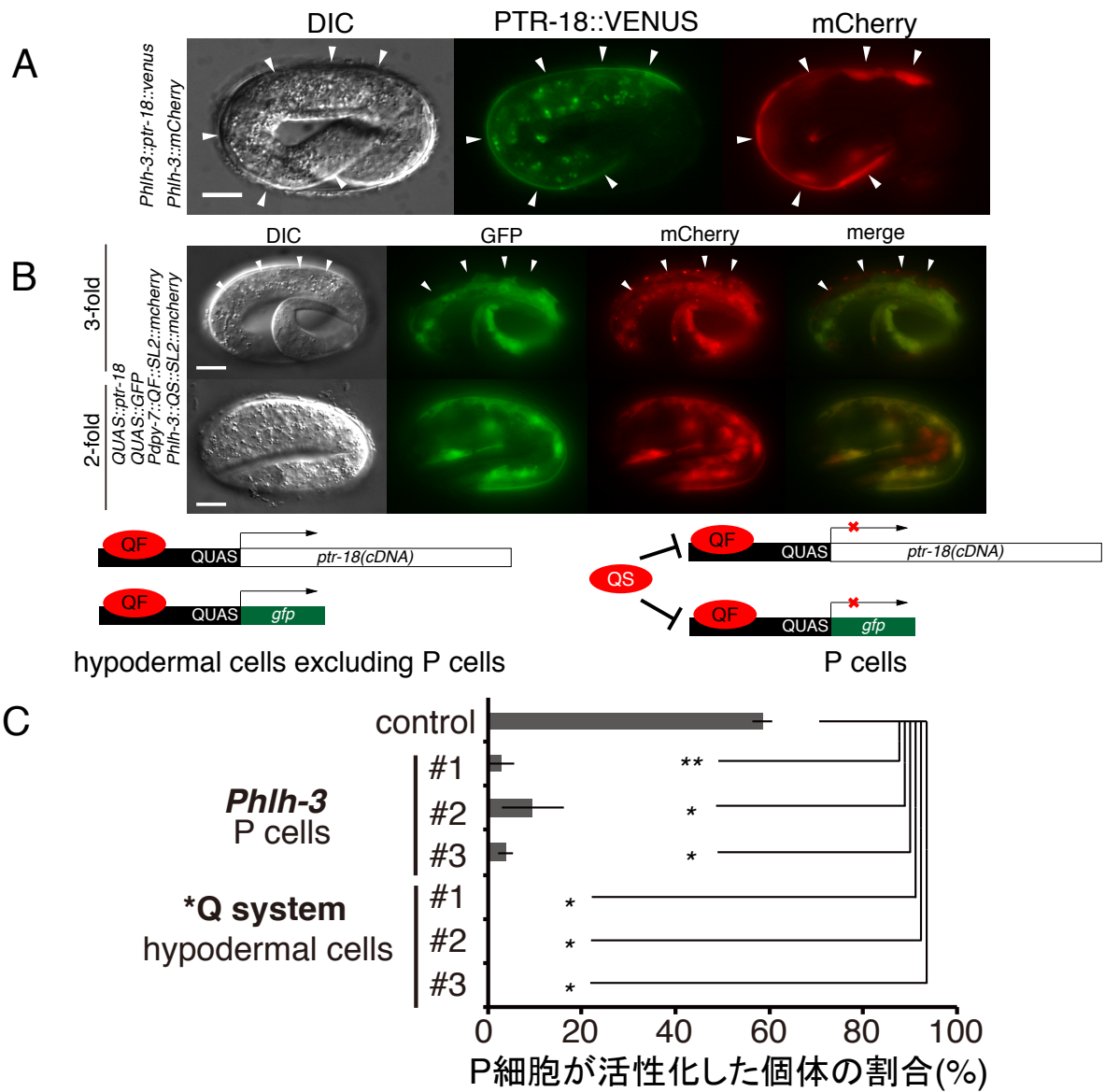


図.16 PTR-18は細胞自律的・非自律的に機能する

A. *hlh-3*プロモーターでPTR-18::VENUSを発現させた3-fold期の胚の、微分干渉像とPTR-18::VENUSの蛍光画像と、*Pptr-18::mCherry*の蛍光画像。矢尻: P細胞、スケールバーは10  $\mu$ mを示す。

B. Q systemによってPTR-18を発現させた2-fold期と3-fold期の胚の、微分干渉像とQUAS::GFPの蛍光画像と、*QF::mCherry*と*QS::mCherry*の蛍光画像、QUAS::GFPと*QF::mCherry*と*QS::mCherry*の合成画像。矢尻:P細胞、スケールバーは10  $\mu$ mを示す。

C. 5日間飢餓培養した*ptr-18*欠失変異体と、*hlh-3*プロモーターによってPTR-18::VENUSを発現させた*ptr-18*欠失変異体、Q systemによってPTR-18を発現させた*ptr-18*欠失変異体のP細胞が活性化した個体の割合。

1回の計測で計35匹以上数えた、n=3、\*:P< 0.01、\*\*:P< 0.001 (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean $\pm$  S.D.を示す。

	G	X	X	X	D	D		G	X	X	X	D
<i>Hs</i> PTCH1	G	V	G	V	D	D	<i>Hs</i> PTCH1	G	I	G	V	E
<i>Hs</i> DISP1	G	I	G	A	D	D	<i>Hs</i> DISP1	G	L	S	V	D
<i>Hs</i> PTCHD1	G	H	G	L	Y	G	<i>Hs</i> PTCHD1	N	Y	T	I	D
<i>Hs</i> PTCHD3	G	V	G	V	D	D	<i>Hs</i> PTCHD3	-	-	-	-	-
<i>Hs</i> PTCHD4	G	H	G	T	K	G	<i>Hs</i> PTCHD4	N	F	A	I	D
<i>Dm</i> PTR	G	I	G	I	D	D	<i>Dm</i> PTR	G	F	S	V	D
<i>Ce</i> DAF-6	A	I	G	I	D	D	<i>Ce</i> DAF-6	G	F	A	V	D
<i>Ce</i> PTR-18	S	I	G	V	D	D	<i>Ce</i> PTR-18	G	F	S	V	D
D337A,D338A	S	I	G	V	A	A	G746A,D750A	A	F	S	V	A

図.17 GXXXDDモチーフとGXXXD/Eモチーフの比較

PTR-18のGXXXDDモチーフのアスパラギン酸 (赤)をアラニンに置換し (黄)、GXXXD/Eモチーフのグルタミン酸 (赤)とアスパラギン酸(赤)をアラニン置換(黄)した。

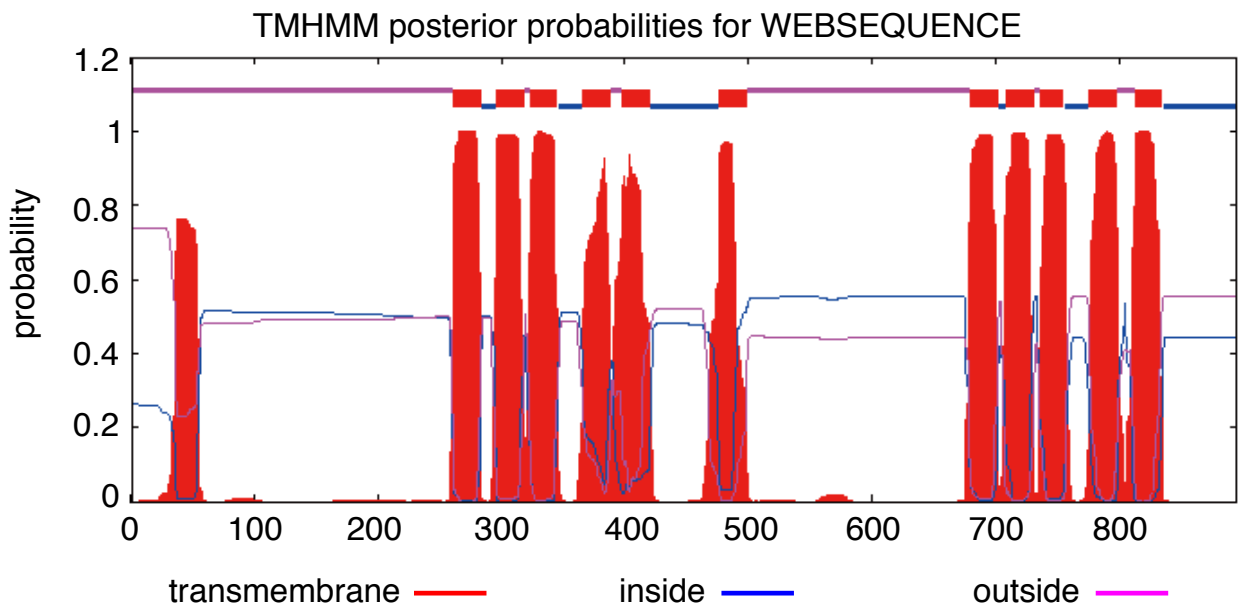


図.18 PTR-18の膜貫通ドメインの推測

PTR-18は11回膜貫通型タンパク質である可能性が考えられる。

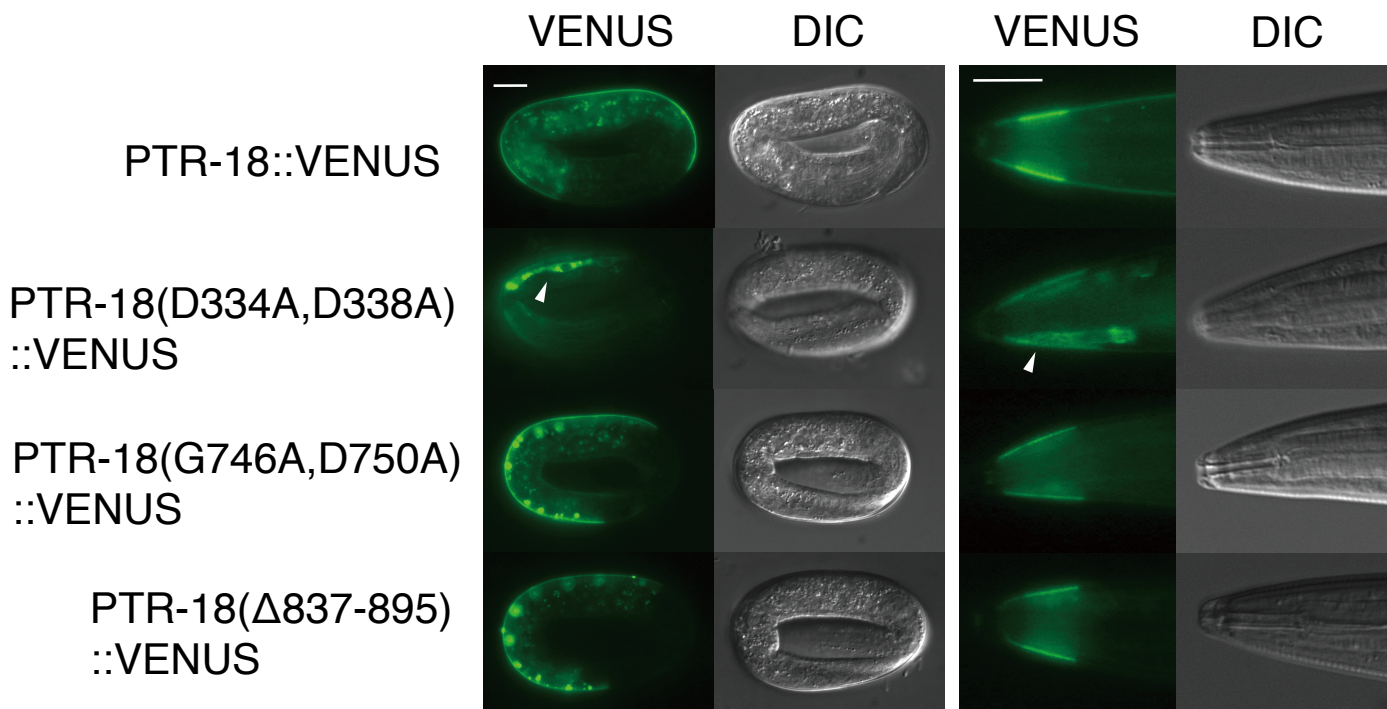


図.19 GXXXDDモチーフはPTR-18の正常な局在に重要である  
 PTR-18::VENUSやPTR-18 (D334A,D338A)::VENUS、PTR-18 (G746A,D750A)::VENUS、PTR-18 (Δ837-895)::VENUSが発現する野生型の3-fold期の胚と1齢幼虫後期の微分干渉画像と蛍光画像。矢尻:細胞質で検出されたPTR-18 (D334A,D338A)::VENUS、スケールバーは10 μmを示す。

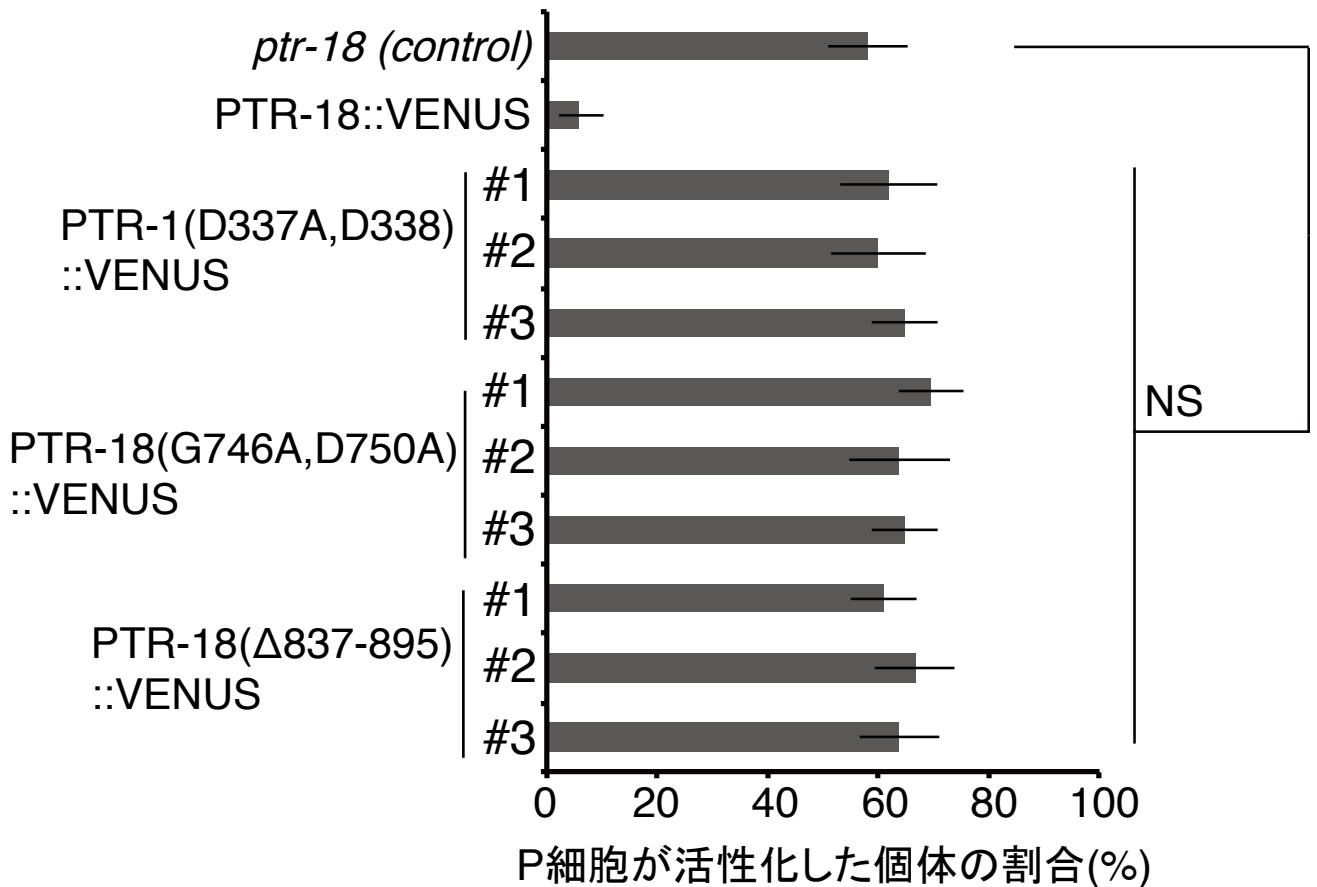


図.20 GXXXDDモチーフやGXXXD/Eモチーフ、C末端細胞内ドメインはPTR-18の正常な機能に重要である  
 5日間飢餓培養した*ptr-18*欠失変異体と、PTR-18::VENUSやPTR-18(D334A,D338A)::VENUS、PTR-18(G746A,D750A)::VENUS、PTR-18(Δ837-895)::VENUSが発現する*ptr-18*欠失変異体において、P細胞が活性化した個体の割合。1回の計測で計35匹以上数えた、n=3、Not Significant (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean± S.D.を示す。

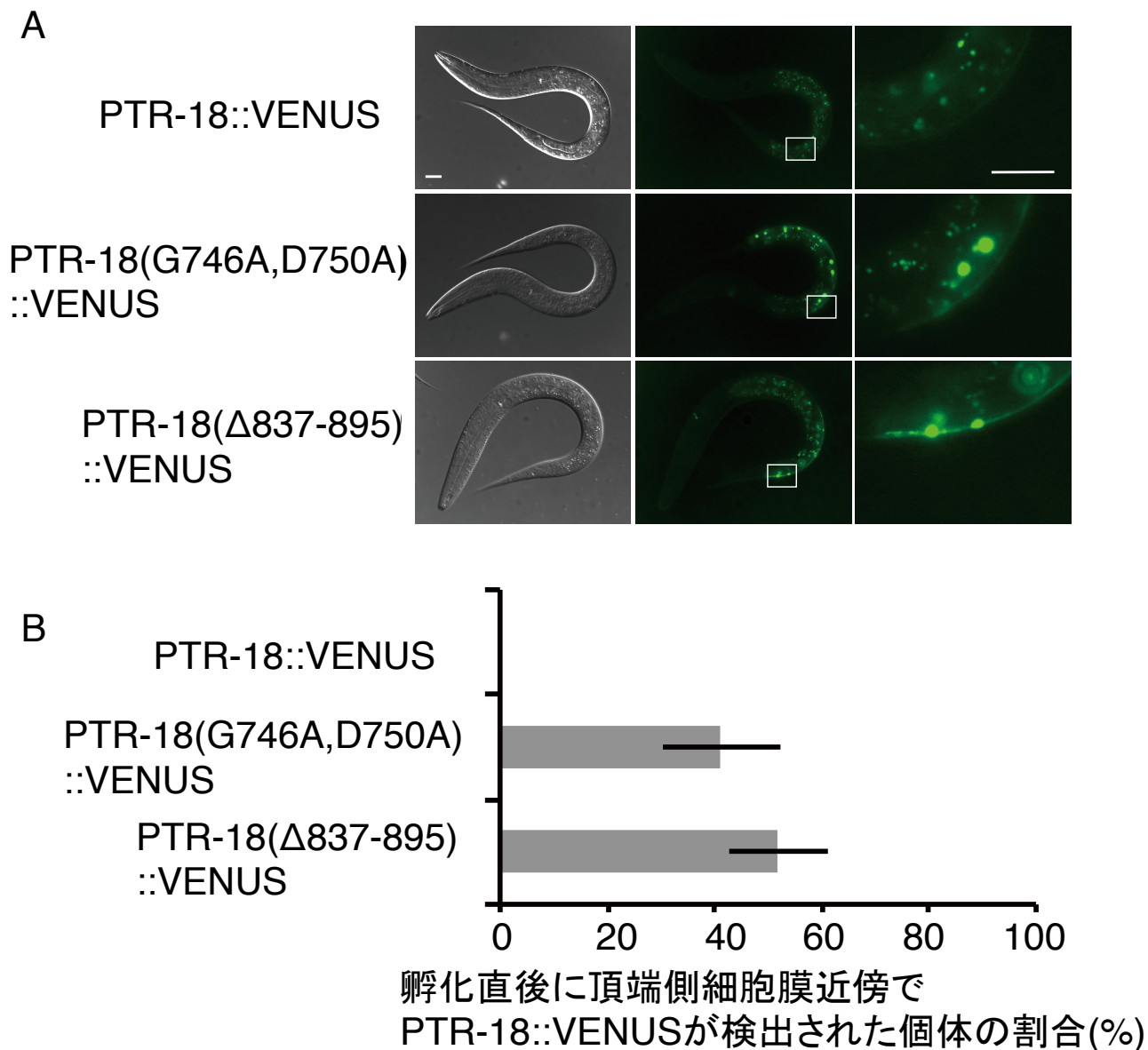


図.21 GXXXD/EモチーフとC末端ドメインはPTR-18の適切な内在化に重要である

A. PTR-18::VENUSやPTR-18 (G746A,D750A)::VENUS、PTR-18 ( $\Delta$ 837-895)::VENUSが発現する孵化直後の野生型の微分干渉画像と蛍光画像、その拡大図を示す。スケールバーは10  $\mu$ mを示す。

B. PTR-18::VENUSやPTR-18 (G746A,D750A)::VENUS、PTR-18 ( $\Delta$ 837-895)::VENUSが発現する孵化直後の野生型において、頂端側細胞膜近傍でPTR-18::VENUSが検出された個体の割合を示す。1回の計測で計50匹以上数えた、n=3、グラフはmean  $\pm$  S.D.を示す。



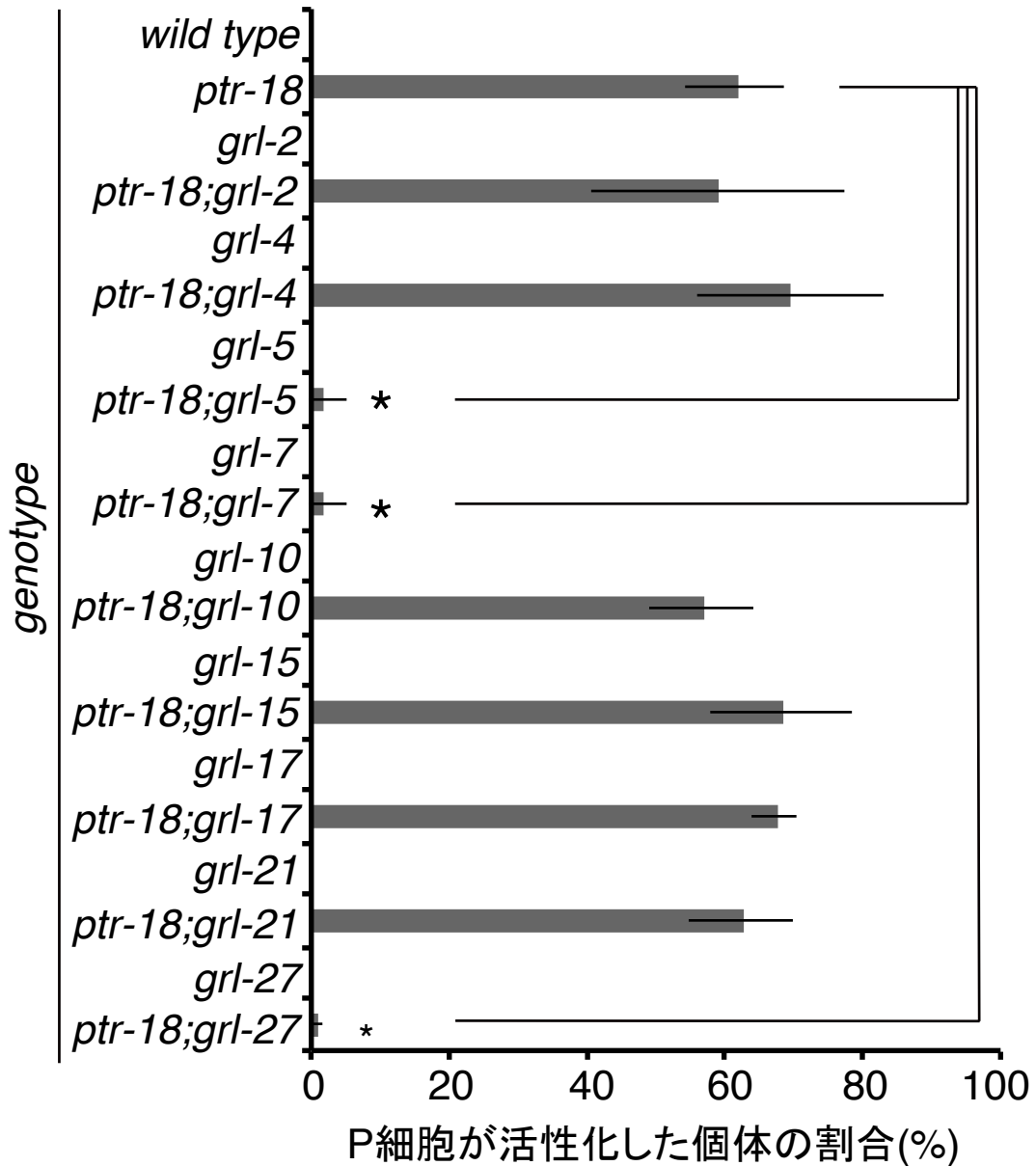
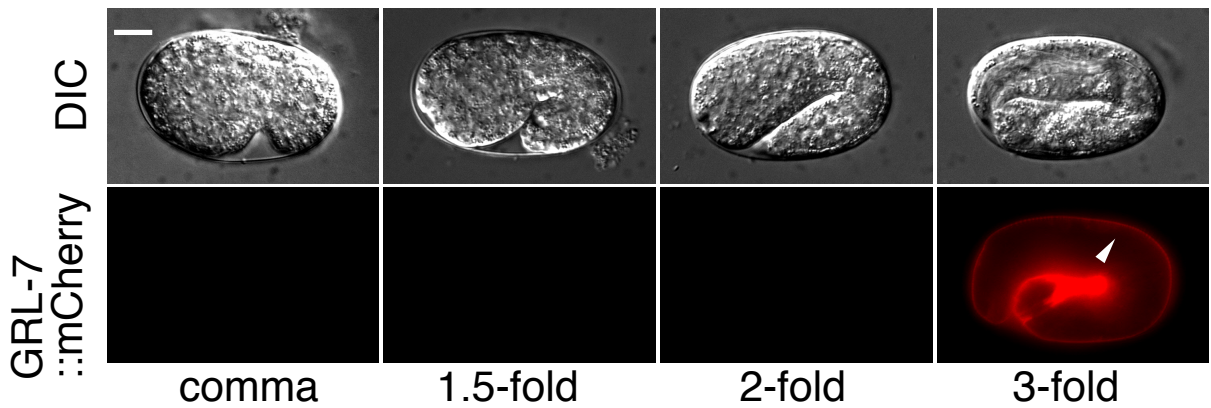


図.22 *grl-5*や*grl-7*、*grl-27*は*ptr-18*によって抑制される

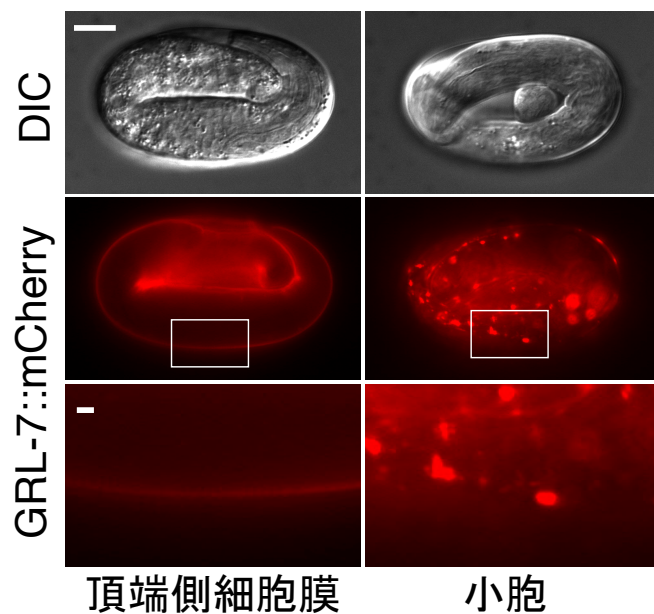
5日間飢餓培養した野生型と、*grl*遺伝子群の欠失変異体、*ptr-18*と*grl*遺伝子群の二重変異体それぞれにおける、P細胞が活性化した個体の割合を示す。1回の計測で計35匹以上数えた、n=3、\*:P< 0.01 (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean± S.D.を示す。





**図.23 GRL-7::mCherryは3-fold期で発現する**

原腸胚期から胚発生後期までにおける微分干渉像とGRL-7::mCherryの蛍光画像を示す。矢尻: 表皮細胞、スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。



**図.24 3-fold期において GRL-7::mCherryは局在が変化する**  
 3-fold期の胚の微分干渉像と、GRL-7::mCherryの蛍光画像、蛍光画像の拡大図を示す。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。ただし拡大図のスケールバーは1  $\mu\text{m}$ を示す。

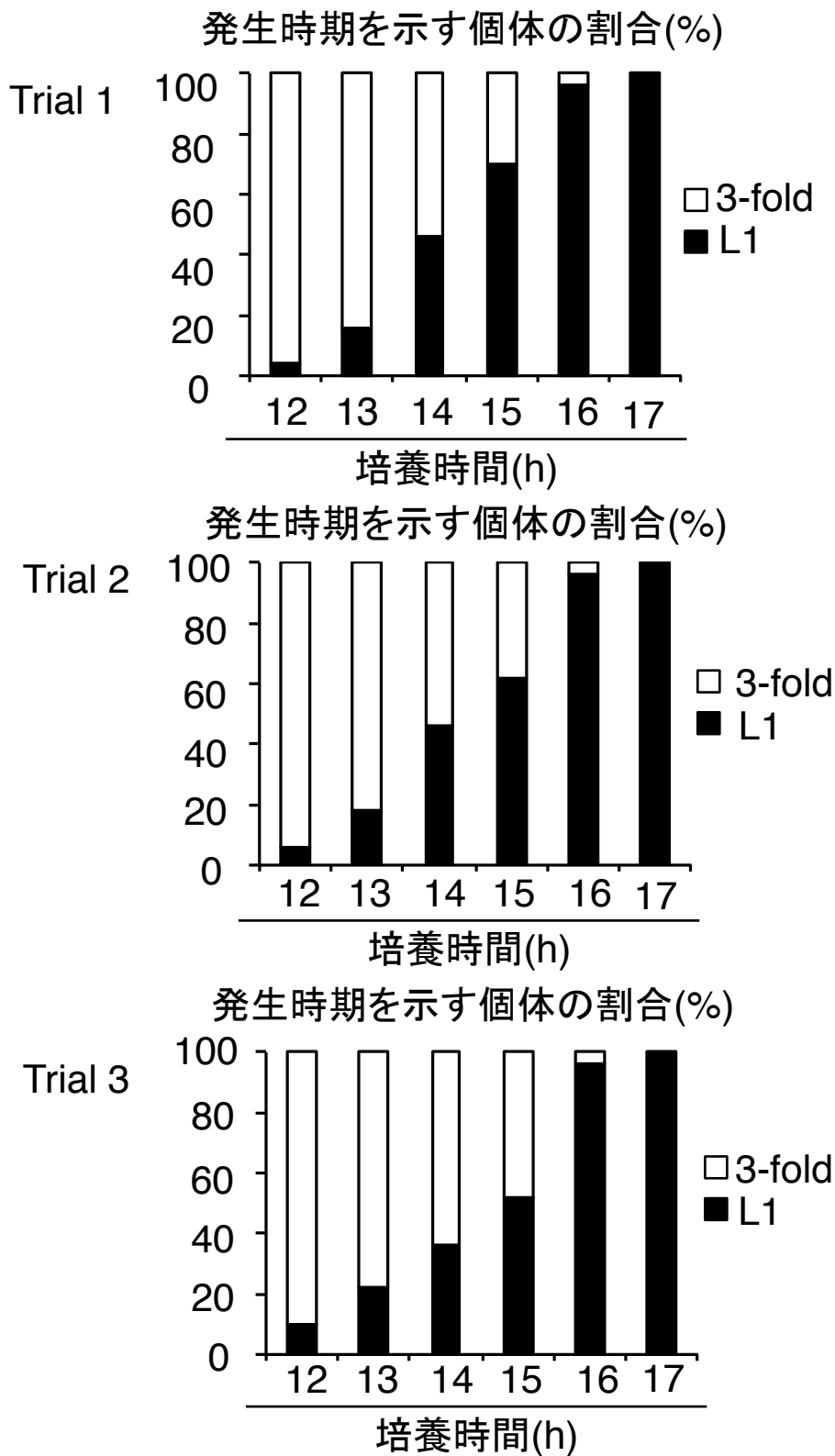
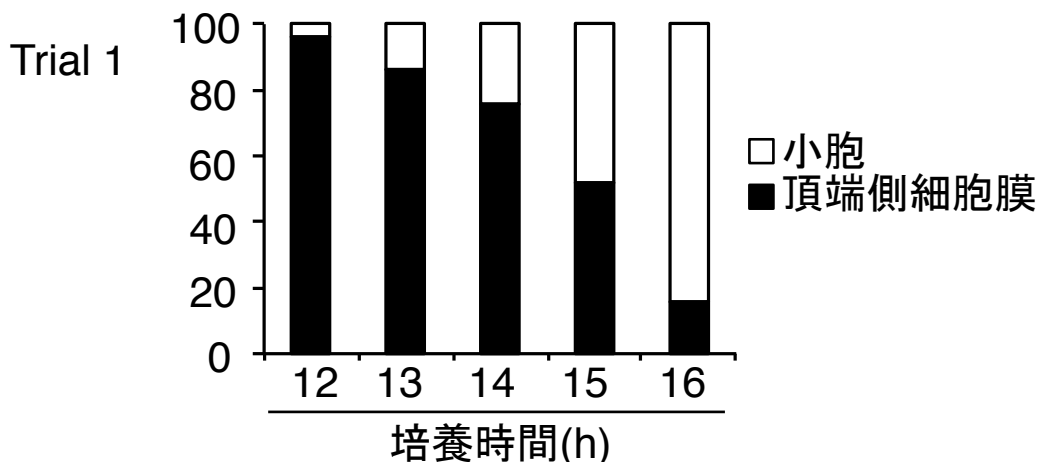


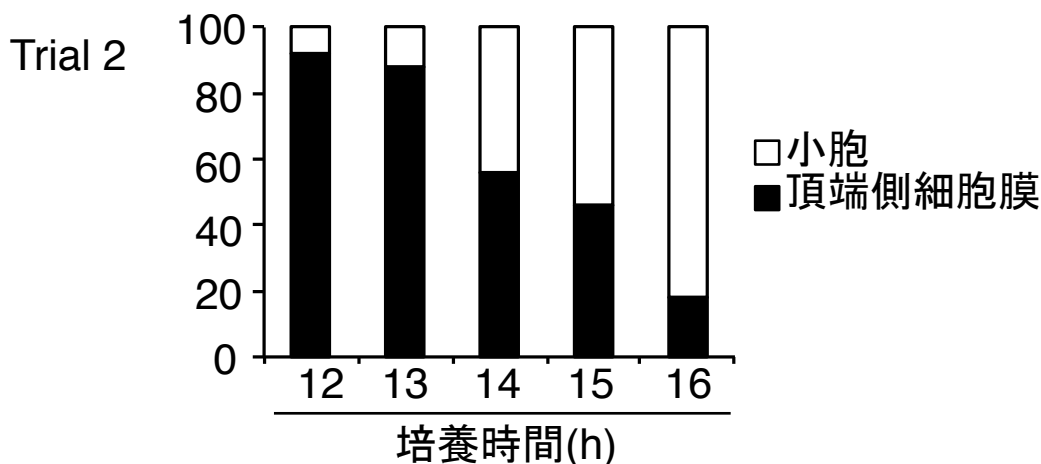
図.25 胚発生ステージの継時的変化

胚の培養開始から12時間から17時間における、3-fold期の胚(白)、孵化した1齢幼虫(黒)のそれぞれの割合を示す。

3-fold期におけるGRL-7::mCherryの局在分布の割合(%)



3-fold期におけるGRL-7::mCherryの局在分布の割合(%)



3-fold期におけるGRL-7::mCherryの局在分布の割合(%)

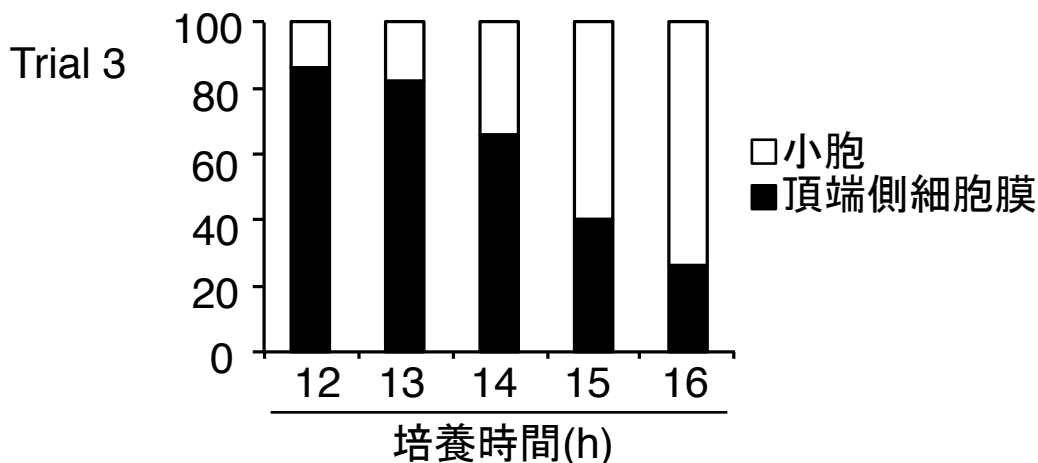


図.26 3-fold期の胚におけるGRL-7::mCherryの局在分布の継時変化

胚の培養開始から12時間から17時間での3-fold期の胚における、GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜近傍で検出された個体(黒)と小胞状で検出された個体(白)のそれぞれの割合を示す。

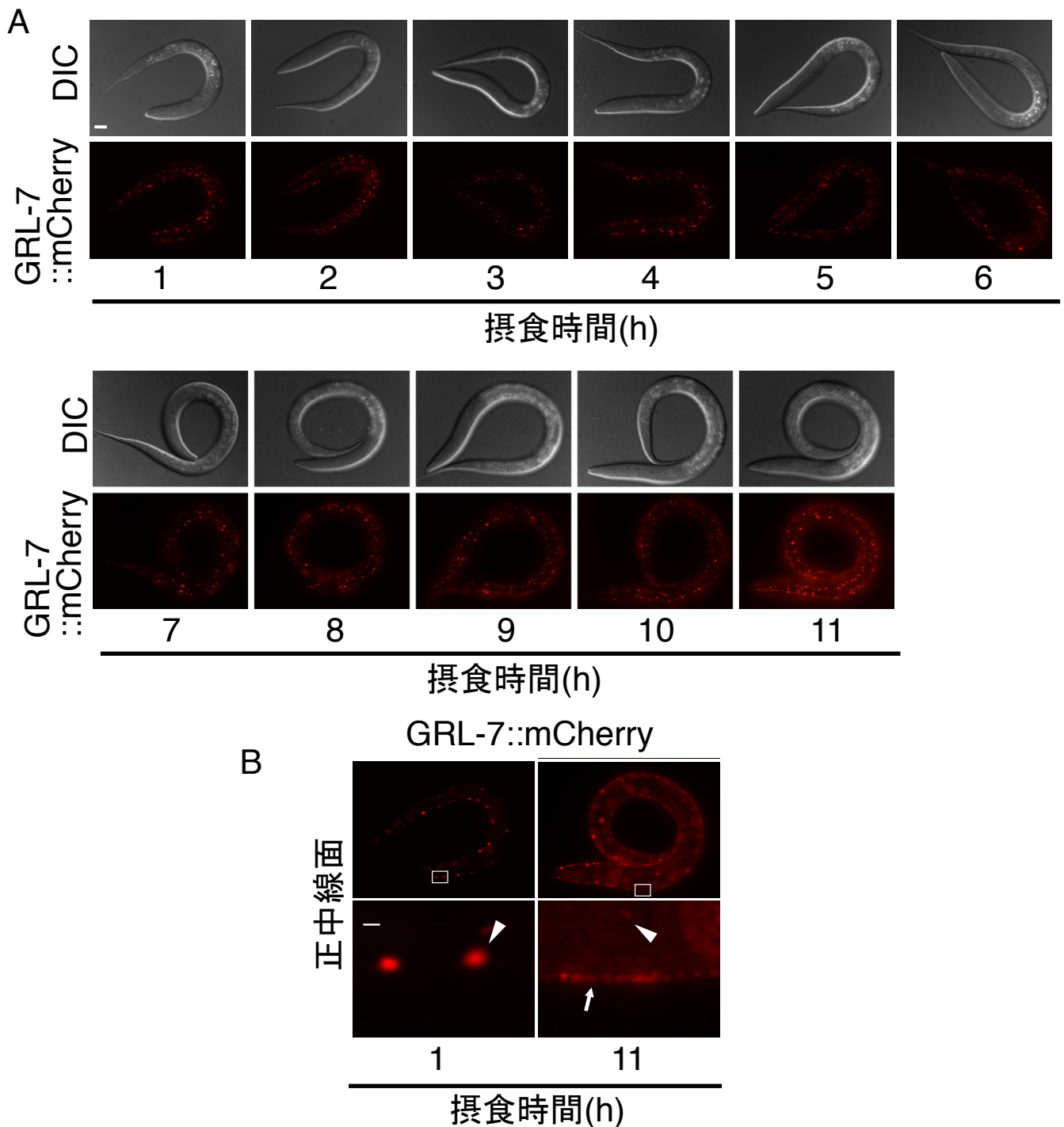
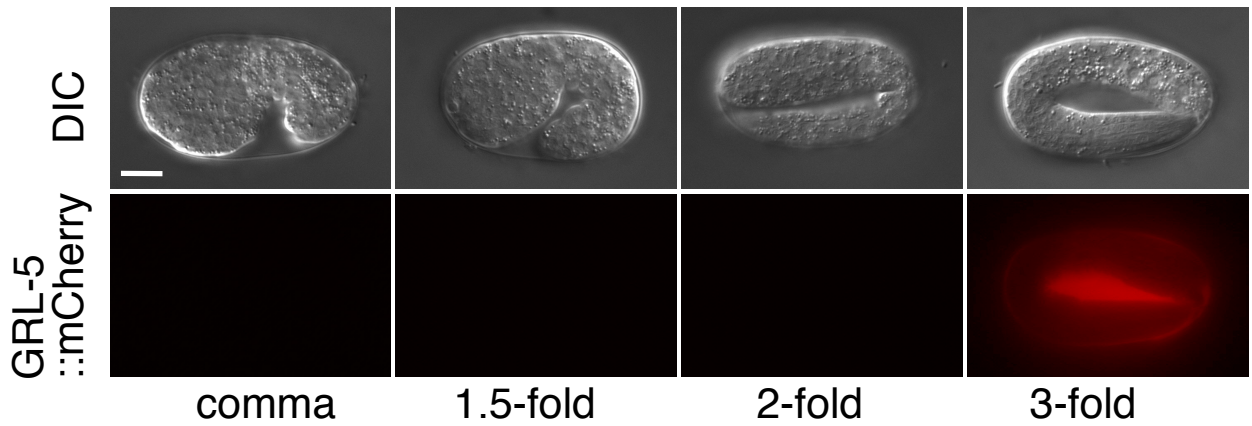


図.27 GRL-7::mCherryは1齢幼虫後期で再度検出される

A. 摂食条件下で1時間から11時間培養した際の微分干渉像とGRL-7::mCherryの蛍光画像。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

B. 摂食後1時間と11時間における正中線面の蛍光画像とその拡大図。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。ただし拡大図のスケールバーは2  $\mu\text{m}$ を示す。



### 図.28 GRL-5::mCherryは3-fold期で発現する

原腸胚期から胚発生後期までにおける微分干渉像とGRL-5::mCherryの蛍光画像を示す。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

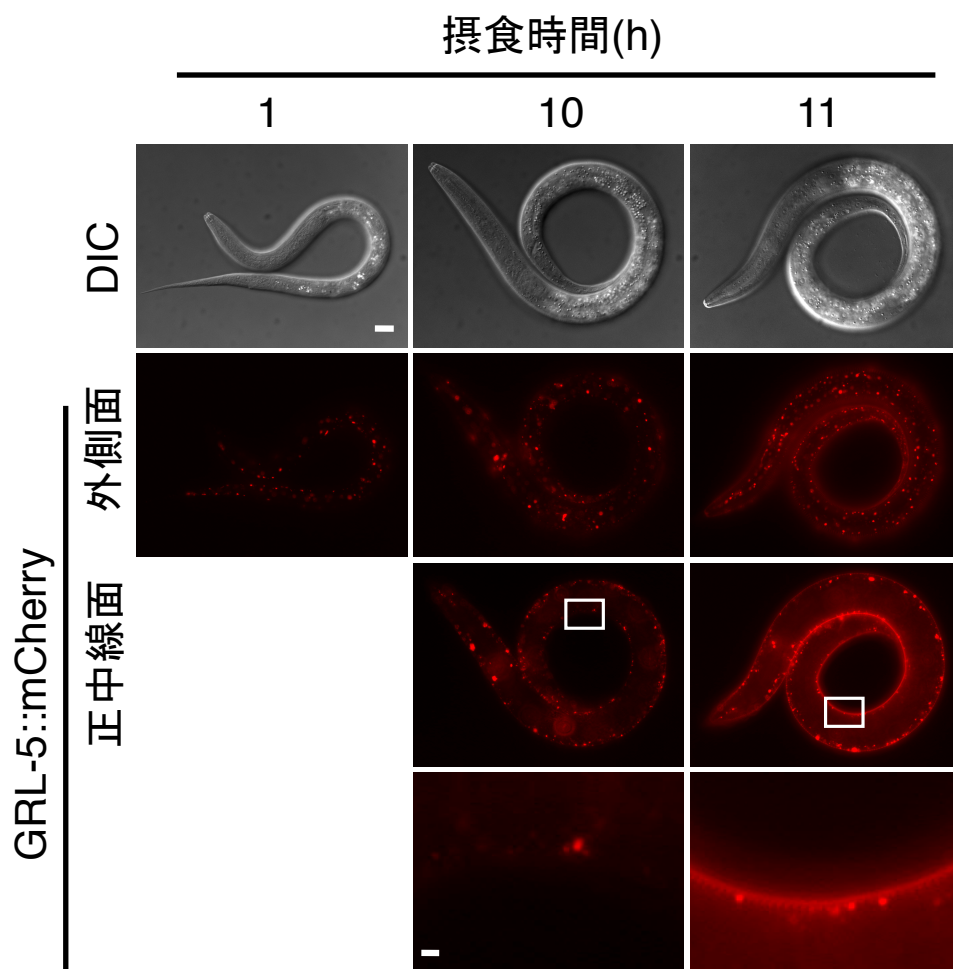


図.29 GRL-5::mCherryは1齢幼虫後期で再度検出される

摂食条件下で1時間と10時間、11時間培養した際の微分干渉像とGRL-5::mCherryの外側面と正中線面の蛍光画像と、正中線面の蛍光画像の拡大図。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。ただし拡大図のスケールバーは1  $\mu\text{m}$ を示す。

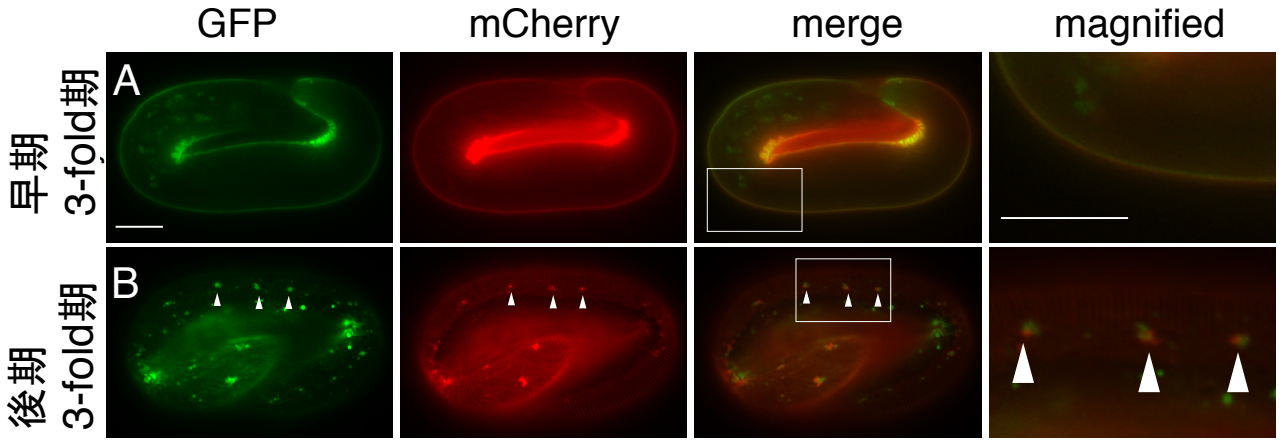
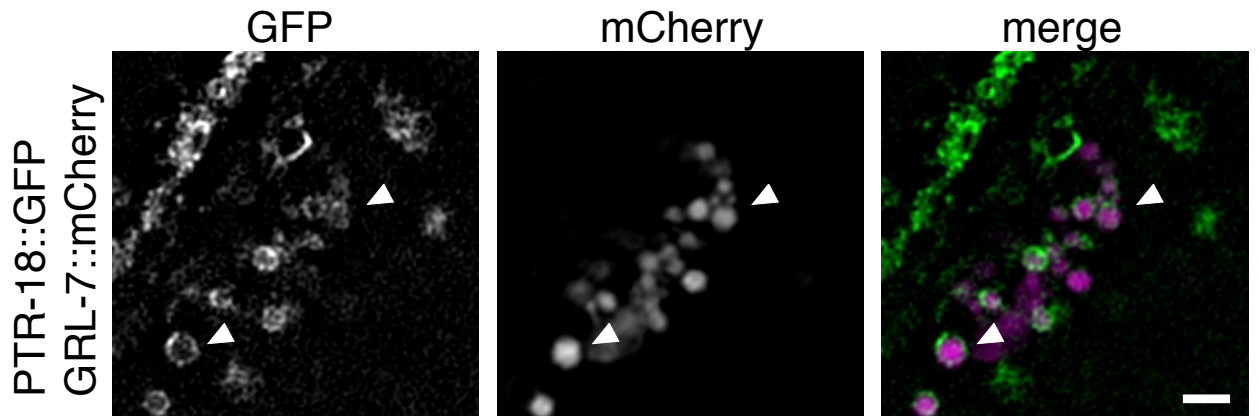


図.30 PTR-18::GFPとGRL-7::mCherryは小胞状で共局在する

早期3-fold期(A)と後期3-fold期(B)の胚のPTR-18::GFPとGRL-7::mCherryの蛍光画像とそれらの合成画像と、その拡大図を示す。矢尻：共局在を示す小胞、スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。





**図.31 PTR-18::GFPとGRL-7::mCherryは同じ小胞で検出される**  
 4齢幼虫期におけるPTR-18GFPとGRL-7::mCherryの蛍光画像と、それらの合成画像。矢尻：同じ小胞で共局在を示す。スケールバーは5  $\mu\text{m}$ を示す。共同研究先であるBiozentrum University of BaselのCarla Cadena del CastilloさんとAnne Spang博士より提供。

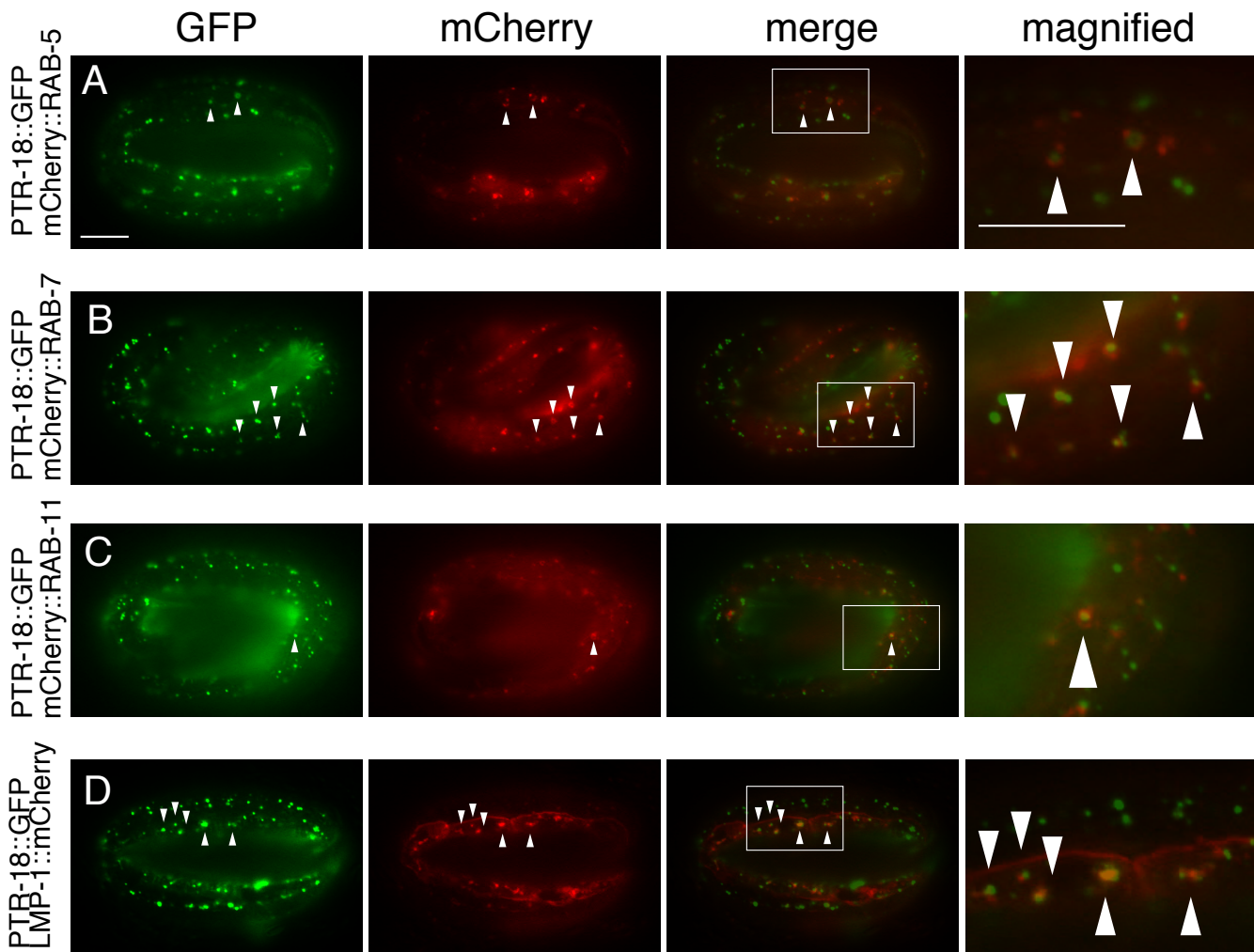
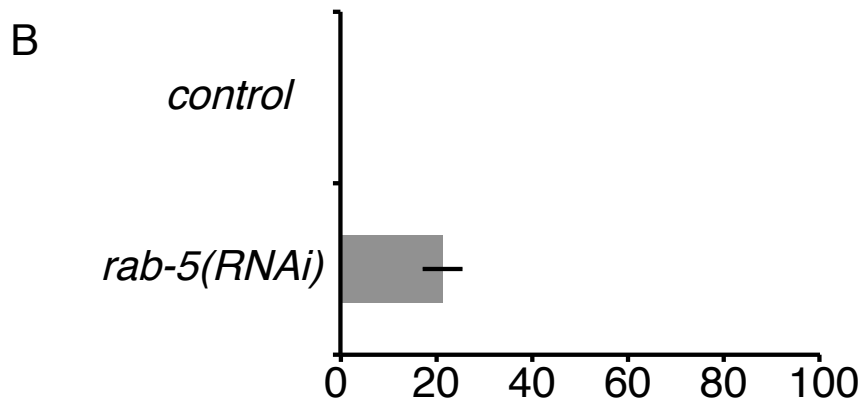
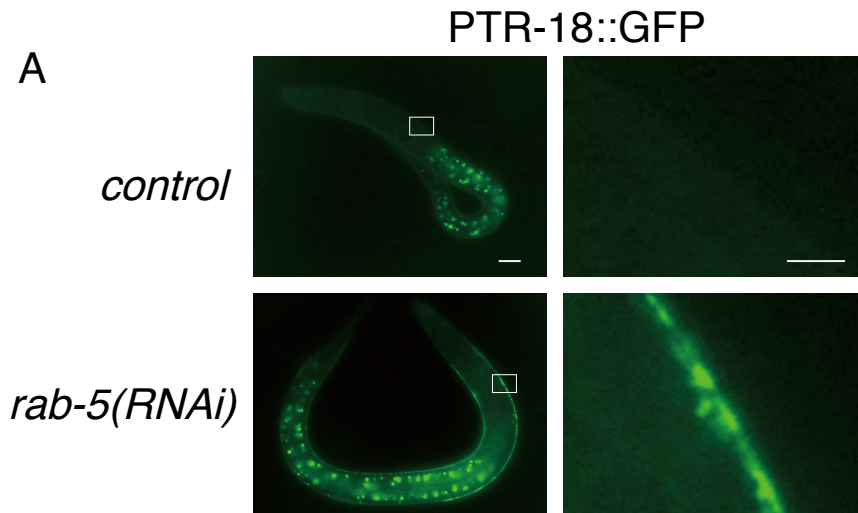


図.32 PTR-18はエンド・リソソーム上に局在する

3-fold後期の胚におけるPTR-18::GFPの蛍光画像と、エンドリソソームマーカーの蛍光画像、それらの合成画像、合成画像の拡大画像を示す。矢尻:共局在を示す、スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。



PTR-18::GFPが頂端側細胞膜近傍で検出された個体の割合(%)

図.33 PTR-18::GFPはエンドサイトーシスによって内在化する

A. 孵化直後におけるPTR-18::GFPの蛍光画像とその拡大図。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。ただし拡大図のスケールバーは2  $\mu\text{m}$ を示す。

B. Feeding RNAiによって*rab-5*遺伝子をノックダウンした際に、孵化直後において、GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜近傍で検出された個体の割合を示す。1回の計測で計50匹以上数えた、 $n=3$ 、グラフは $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ を示す。

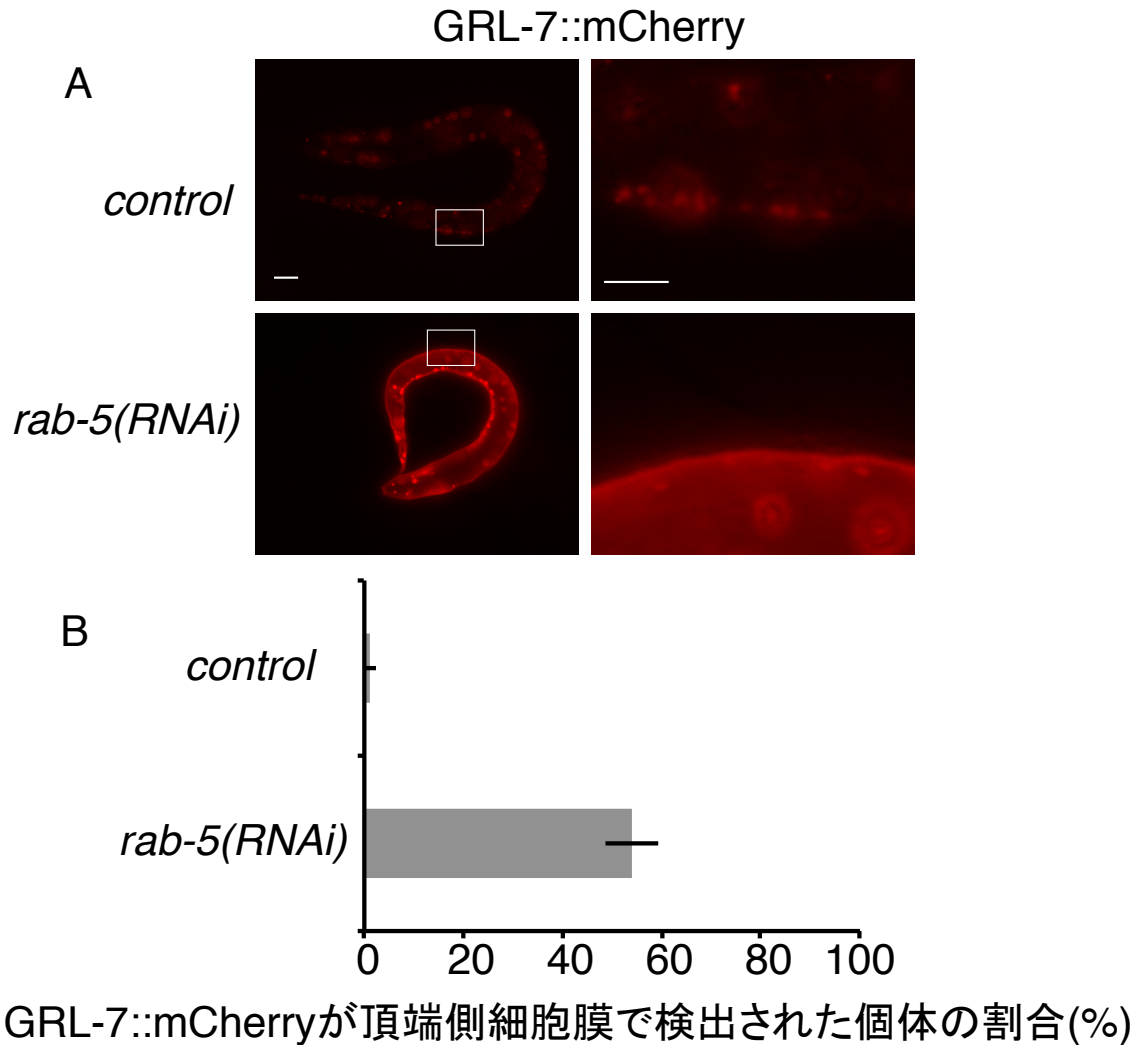
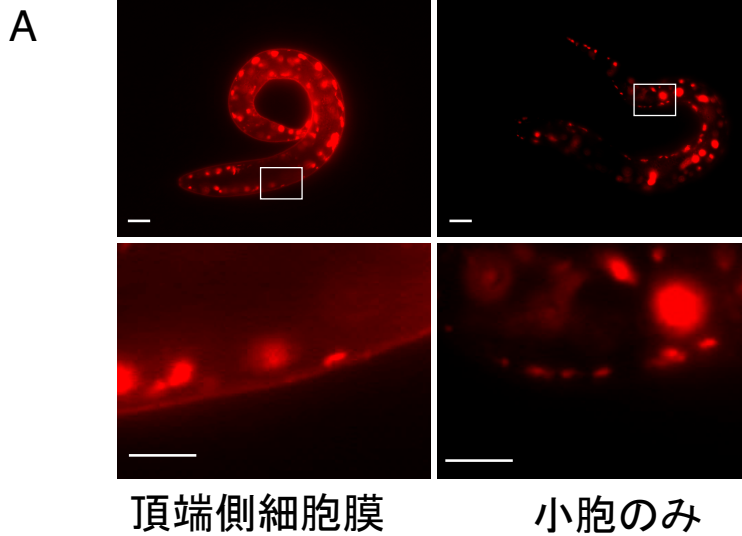


図.34 GRL-7::mCherryはエンドサイトーシスによって内在化する

A. 孵化直後におけるGRL-7::mCherryの蛍光画像とその拡大図。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。ただし拡大図のスケールバーは2  $\mu\text{m}$ を示す。

B. Feeding RNAiによって*rab-5*遺伝子をノックダウンした際に、孵化直後において、GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜近傍で検出された個体の割合を示す。1回の計測で計50匹以上数えた、 $n=3$ 、グラフは $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ を示す。

## GRL-7::mCherry



B

孵化後の1齢幼虫におけるGRL-7::mCherryの局在分布(%)

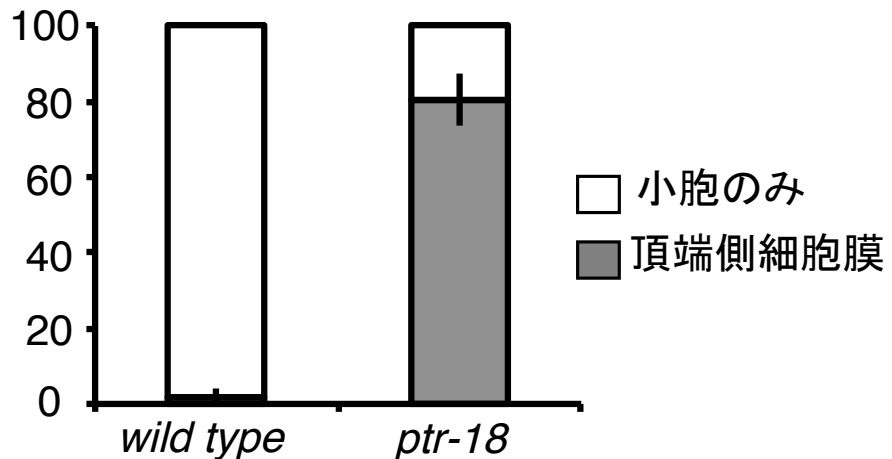


図.35 *ptr-18*はGRL-7の内在化に重要である

A. 孵化直後におけるGRL-7::mCherryの蛍光画像とその拡大図。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。ただし拡大図のスケールバーは2  $\mu\text{m}$ を示す。

B. 孵化直後の野生型と*ptr-18*欠失変異体におけるGRL-7::mCherryが頂端側細胞膜と小胞のみで検出された局在分布の割合を示す。

1回の計測で計50匹以上数えた、 $n=3$ 、グラフは $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ を示す。

孵化後の1齢幼虫におけるGRL-7::mCherryの局在分布(%)

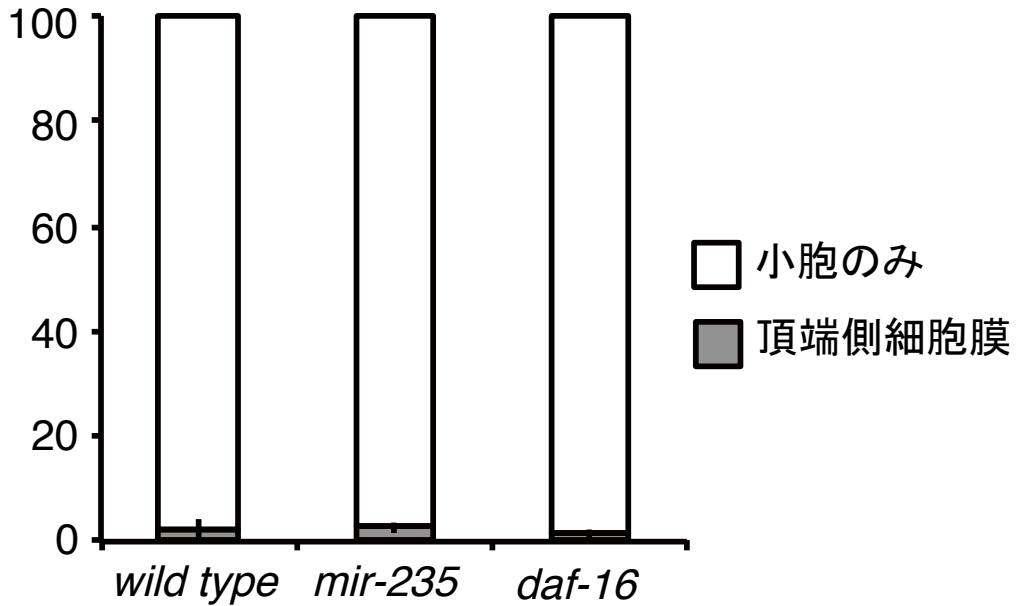
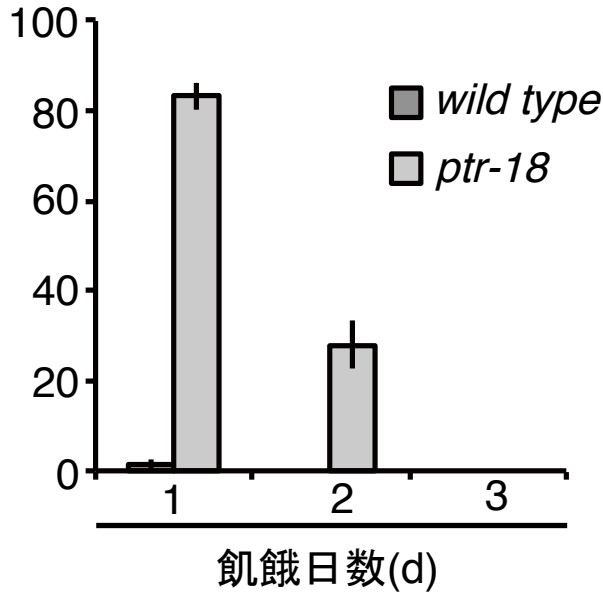


図.36 *mir-235*や*daf-16*はGRL-7の局在変化に寄与しない

孵化直後の野生型と*mir-235*欠失変異体、*daf-16*欠失変異体における、GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜と小胞のみで検出された局在分布の割合を示す。1回の計測で計50匹以上数えた、 $n=3$ 、グラフは $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ を示す。

A GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜近傍で  
検出された個体の割合 (%)



B GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜近傍で  
検出された個体の割合 (%)

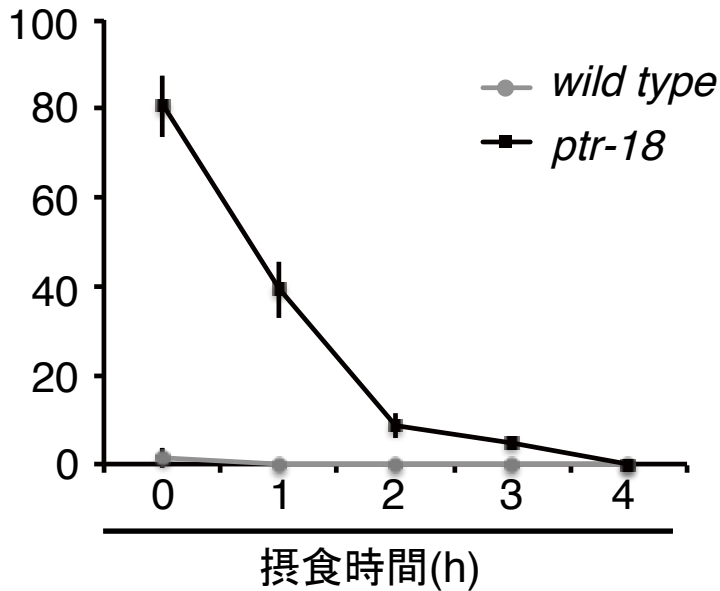


図.37 *ptr-18*変異体ではGRL-7::mCherryの内在化が遅延する  
飢餓条件下(A)や摂食条件下(B)で継時観察した、野生型と*ptr-18*変異体において、GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜で検出された個体に割合  
1回の計測で計50匹以上数えた、n=3、グラフはmean± S.D.を示す。

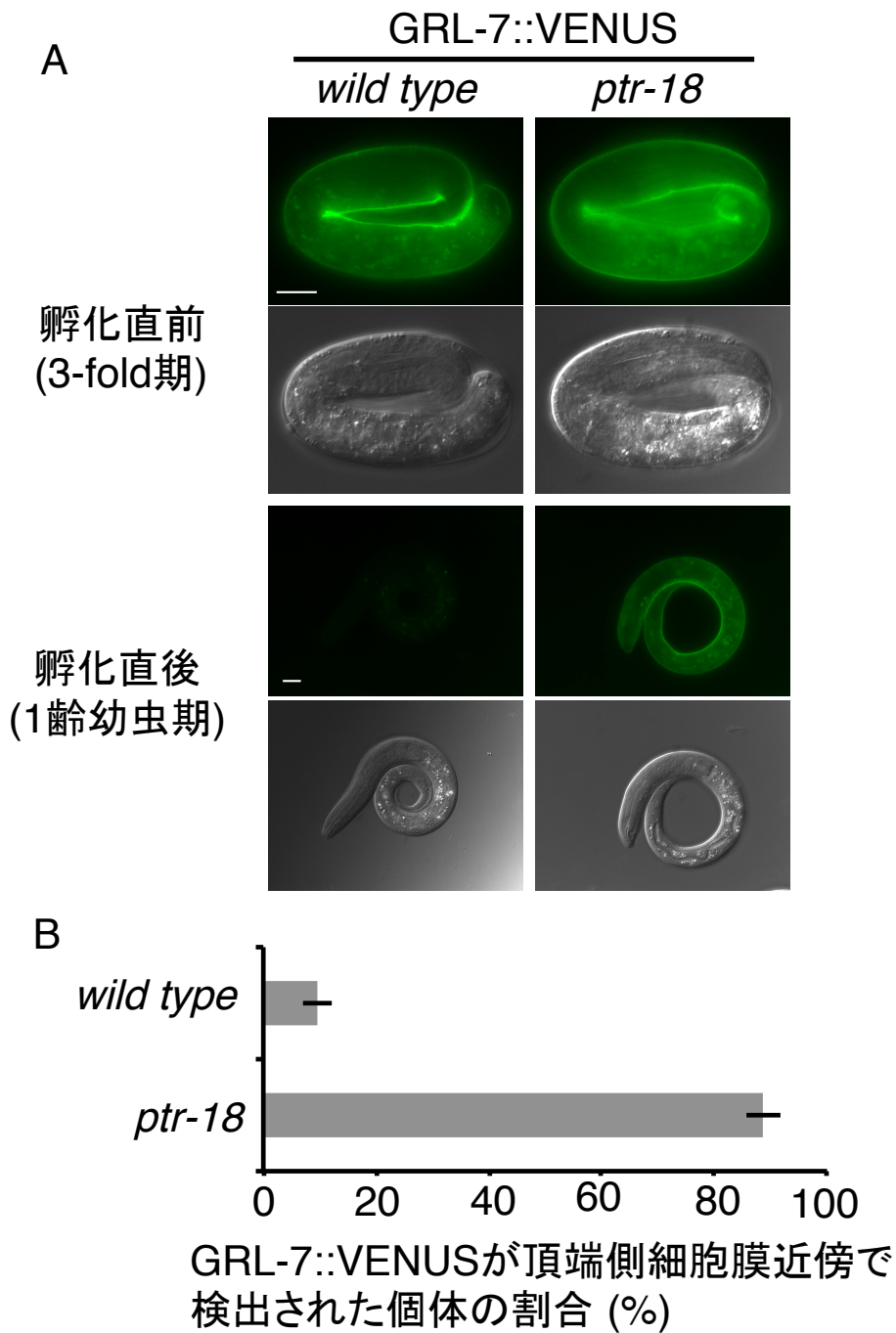


図.38 孵化後ではGRL-7::VENUSは検出できなくなる

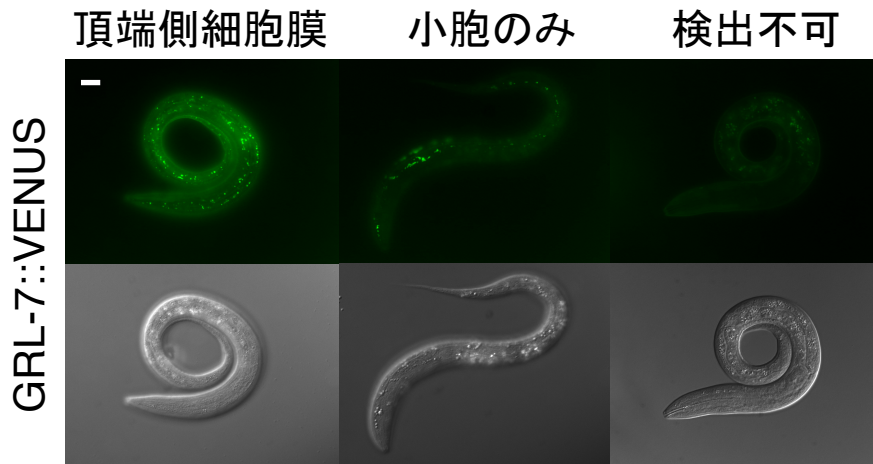
A. 孵化直前や孵化直後の野生型と*ptr-18*欠失変異体の微分干渉像と、GRL-7::VENUSの蛍光画像。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

B. 孵化直後の野生型と*ptr-18*欠失変異体においてGRL-7::VENUSが頂端側細胞膜で検出された個体の割合。

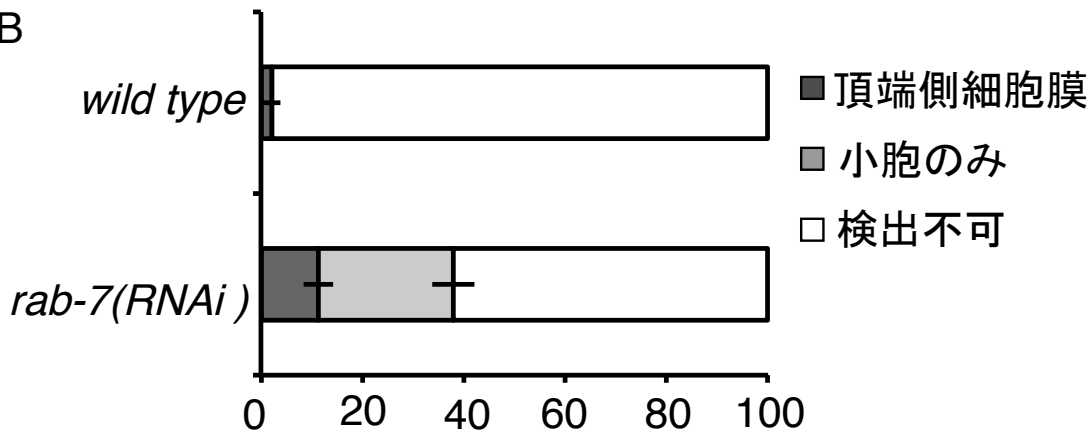
1回の計測で計50匹以上数えた、 $n=3$ 、グラフは $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ を示す。



A



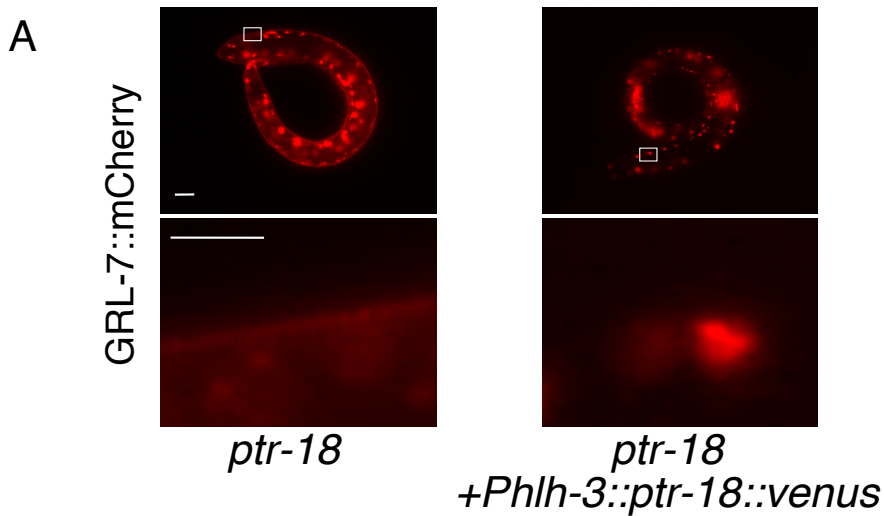
B



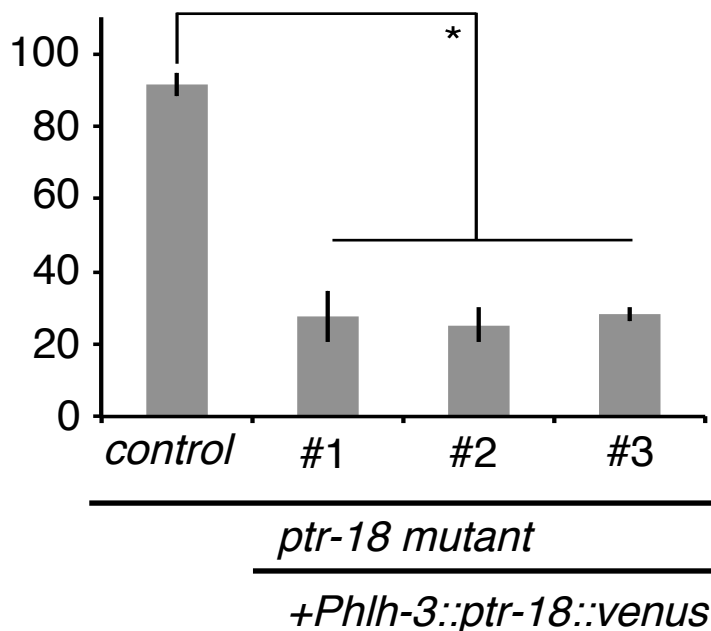
孵化後の1齢幼虫におけるGRL-7::VENUSの局在分布(%)

図.39 GRL-7::VENUSは孵化後にリソソームに蓄積する

A. Feeding RNAiによって*rab-7*遺伝子のノックダウンした孵化直後における微分干渉像と、GRL-7::VENUSの蛍光画像。スケールバーは10  $\mu$ mを示す。  
 B. Feeding RNAiによって*rab-7*遺伝子のノックダウンした孵化直後におけるGRL-7::VENUSが頂端側細胞膜と小胞のみで検出された個体の割合を示す。1回以上の計測で計50匹以上数えた、n=3、グラフはmean  $\pm$  S.D.を示す。



B GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜近傍で  
検出された個体の割合 (%)



### 図.40 PTR-18はGRL-7::mCherryの内在化を促進する

A. 孵化直後における*ptr-18*欠失変異体と、P細胞でPTR-18::VENUSを発現する*ptr-18*欠失変異体における、GRL-7::mCherryの蛍光画像とその拡大画像。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu$ mを示す。ただし拡大図のスケールバーは2  $\mu$ mを示す。

B. 孵化直後における*ptr-18*欠失変異体と、P細胞でPTR-18::VENUSを発現する*ptr-18*欠失変異体における、GRL-7::mCherryが頂端側細胞膜で検出された個体の割合を示す。1回の計測で計50匹以上数えた、n=3、\*:P< 0.001 (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean $\pm$  S.D.を示す。

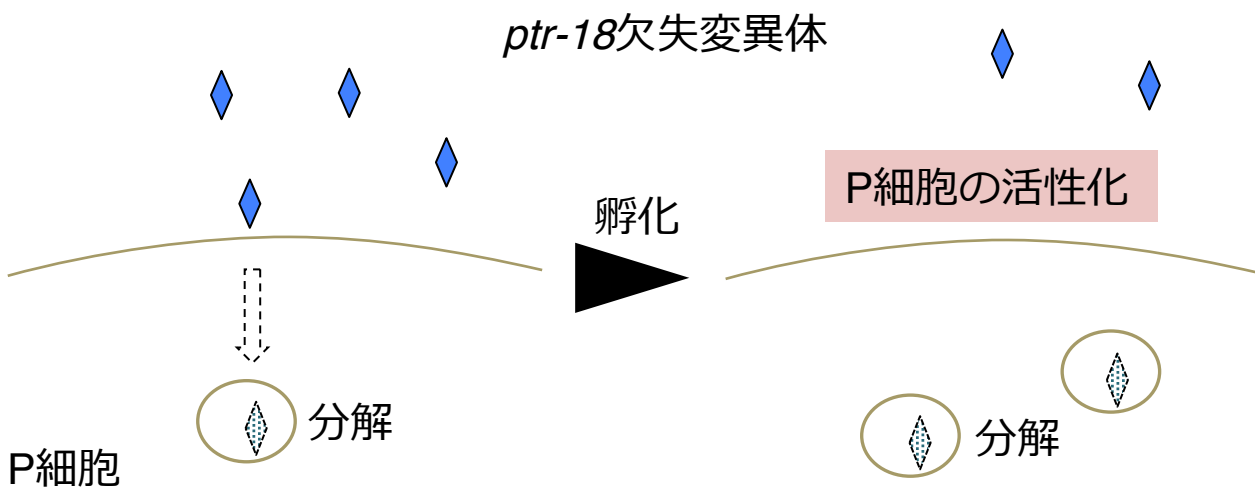
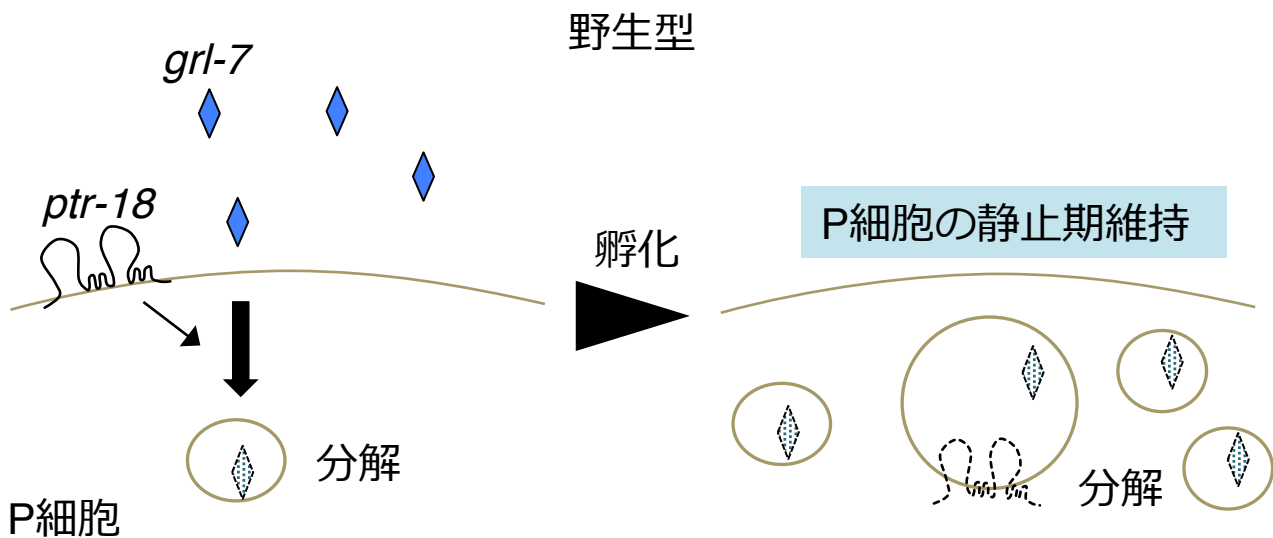


図.41 PTR-18がGRL-7の分解に寄与するモデル

野生型: 孵化前にGRL-7が適切にエンドサイトーシスされ分解されることで、孵化後の飢餓に順応し、P細胞は静止期状態で維持される。

*ptr-18*欠失変異体変異体: GRL-7の内在化が遅延してしまうことで、GRL-7の活性化が孵化後以降にも長期化してしまい、飢餓時でもPatchedのような受容体にシグナルを送り続け、P細胞の活性化を惹起してしまう

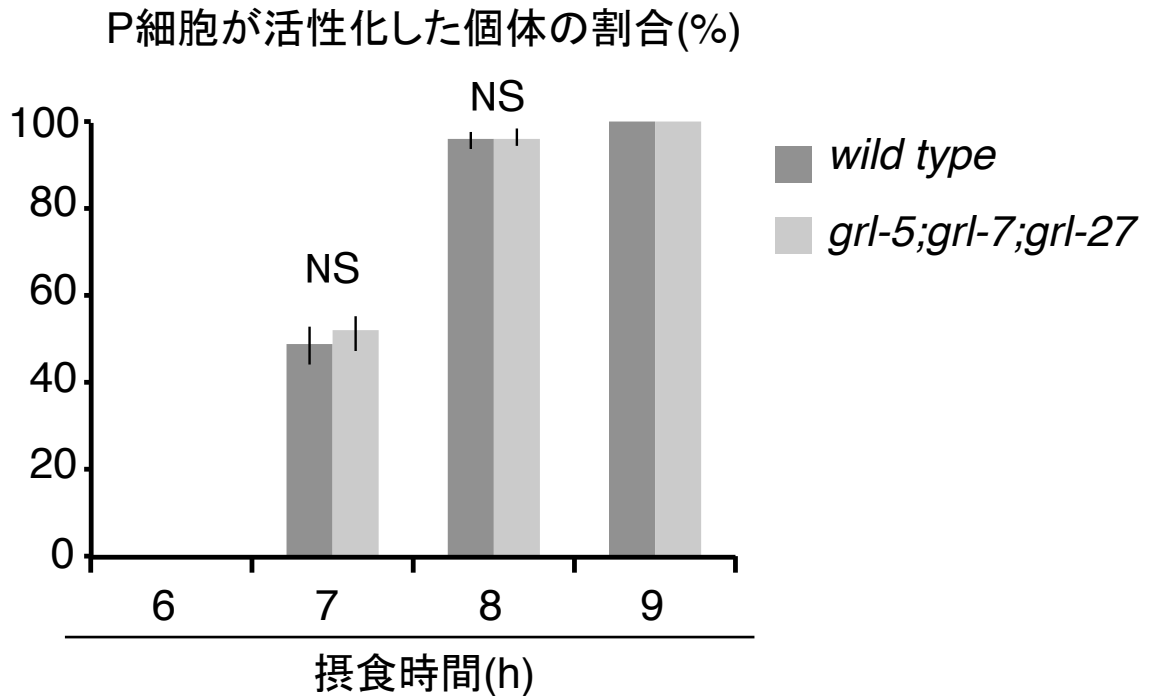


図.42 *grl-5*や*grl-7*、*grl-27*は摂食条件下でのP細胞の活性化に寄与しない  
 摂食条件下で6時間から9時間培養した野生型と、*grl-5*や*grl-7*、*grl-27*の3重  
 変異体におけるP細胞が活性化した個体の割合を示す。1回の計測で計50匹  
 以上数えた、n=3、Not Significant (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean±  
 S.D.を示す。

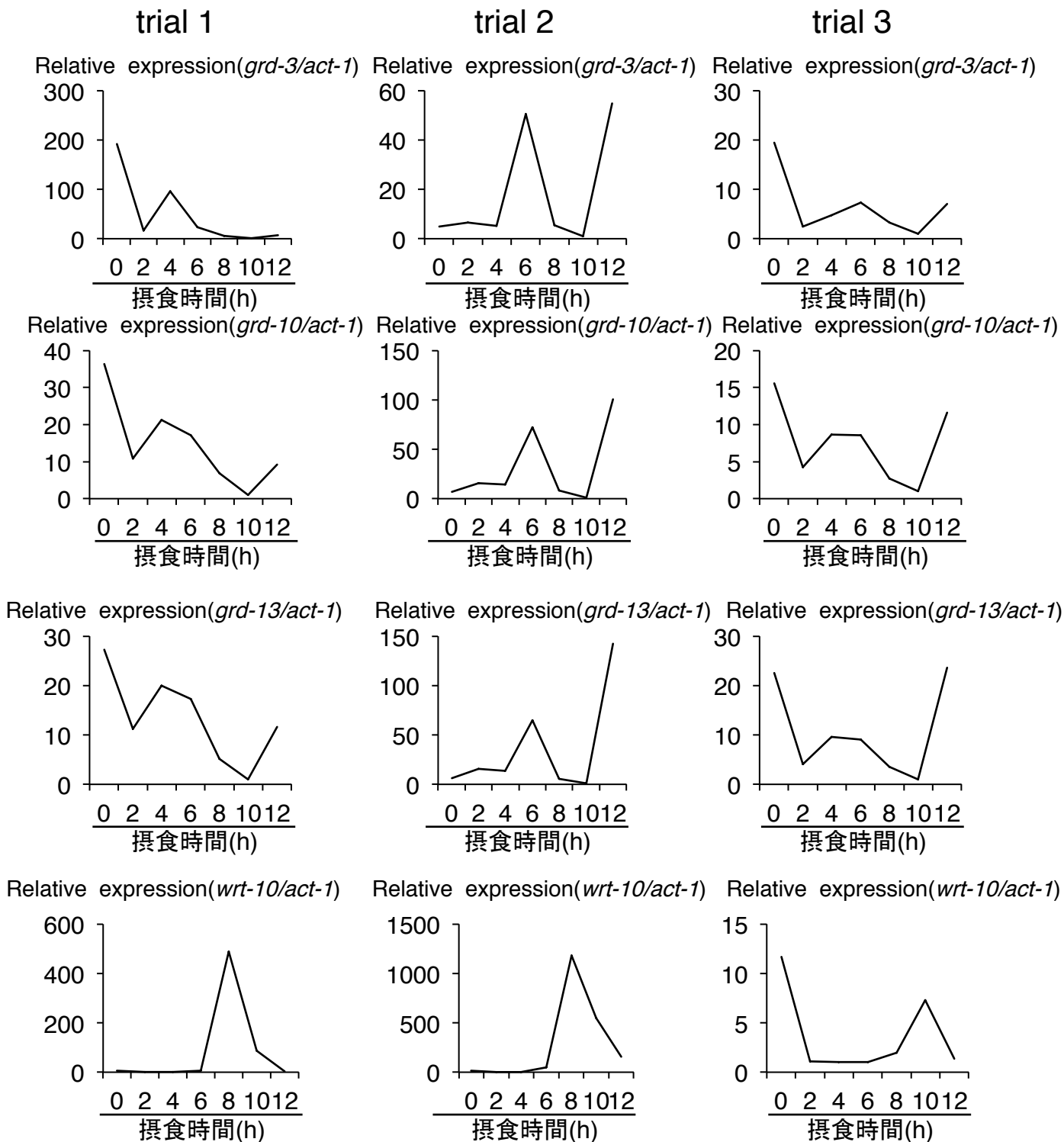


図.43 *grd-3*や*grd-10*、*grd-13*、*wrt-10*はP細胞が活性化する摂食後8時間までにmRNA発現振動が上昇する

野生型の胚をM9緩衝液で24時間培養し、孵化させた1齢幼虫を摂食条件下で培養し、2時間毎に回収したサンプルのmRNAの発現振動をqRT-PCRによって解析した。

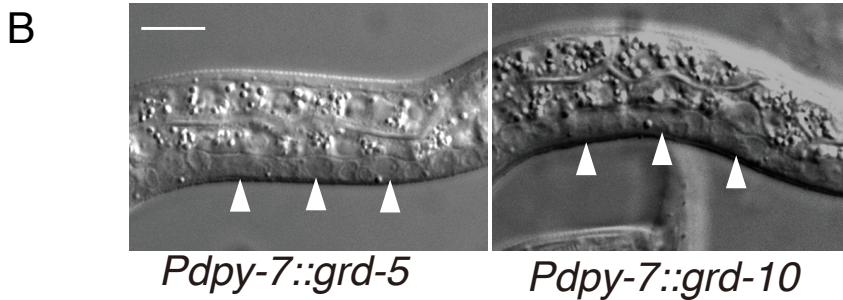
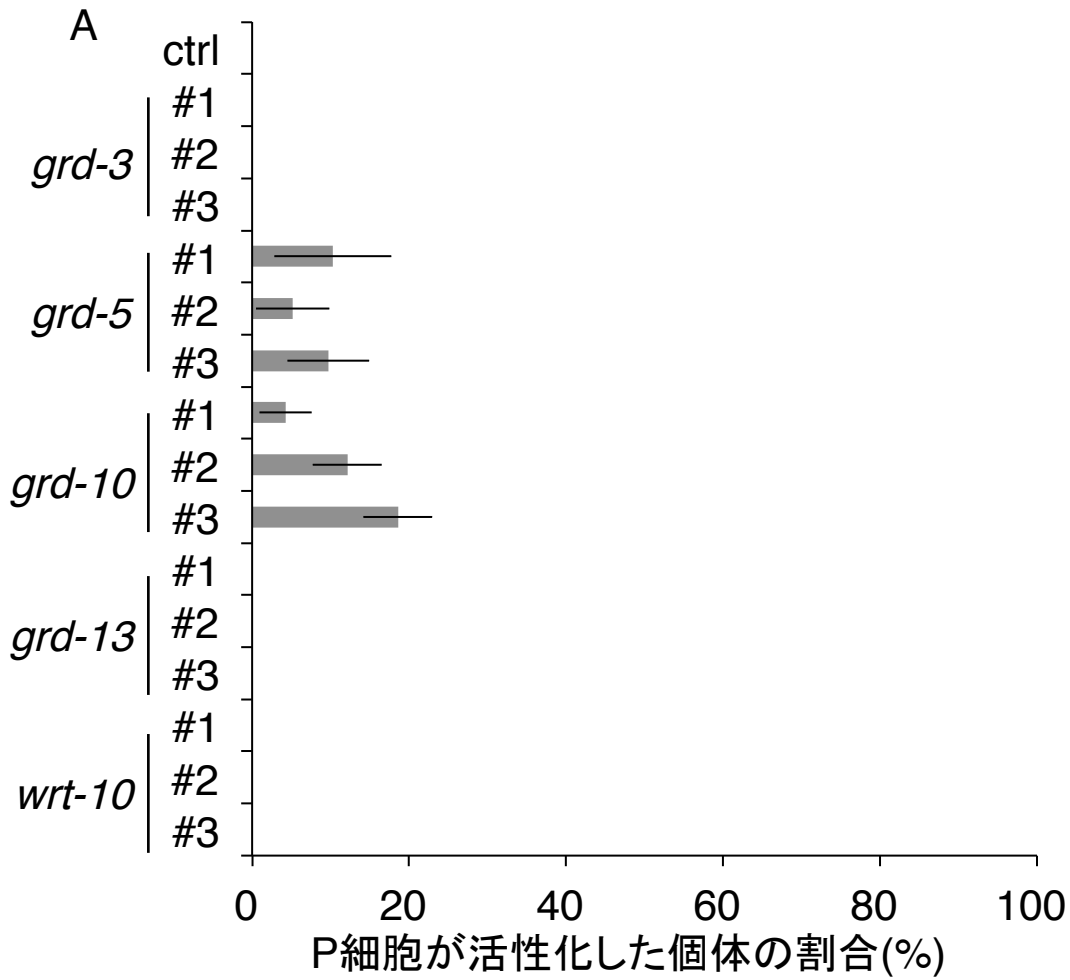


図.44 *grd-10*や*grd-5*はP細胞を活性化するポテンシャルをもつ

A. 5日間飢餓培養した野生型(ctrl)と、表皮細胞やP細胞で*grd-3*や*grd-5*、*grd-10*、*grd-13*、*wrt-10*を過剰発現させた野生型におけるP細胞が活性化した個体の割合。グラフはmean± S.D.を示す。

B. 5日間飢餓培養した、表皮細胞やP細胞で*grd-5*や*grd-10*を過剰発現させた野生型の微分干涉画像。矢尻: 分裂したP細胞の子孫細胞群、スケールバーは10 μmを示す。

A

<i>grd-5</i>	1	M	R	S	L	I	V	L	A	A	L	A	V	T	V	C	F	A	Q	D	N	C	Y	I	N	D	S	G	F	T	C	C	N	K	E	L	E	S	A	M	K	G	A	M	G	G	D	D	L	L	G	50						
<i>grd-10</i>	1	M	R	S	L	V	V	L	A	A	L	A	V	T	V	C	F	A	Q	D	N	C	Y	I	N	E	G	G	F	T	C	C	N	K	E	L	E	S	V	M	K	S	S	L	G	G	S	D	L	V	G	50						
<i>grd-5</i>	51	S	A	D	S	I	Q	K	G	A	E	G	S	L	G	G	K	F	E	T	V	V	A	L	D	D	F	A	Y	K	S	H	F	K	E	G	K	S	C	K	I	E	K	N	G	Q	Y	A	L	A	W	100						
<i>grd-10</i>	51	S	A	G	D	I	Q	K	G	A	E	G	S	L	G	G	K	F	E	T	V	V	A	H	D	D	F	A	Y	K	S	H	F	Q	E	G	K	S	C	K	V	E	K	D	G	Q	Y	A	L	A	W	100						
<i>grd-5</i>	101	Q	P																																																				102			
<i>grd-10</i>	101	Q	P																																																							102

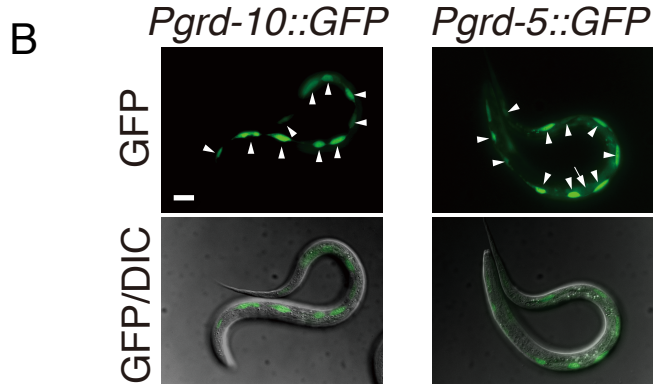


図.45 *grd-10*遺伝子のパラログである*grd-5*遺伝子

A. *grd-5*と*grd-10*のアミノ酸配列の比較。(黒:同じアミノ酸、灰:同じ性質のアミノ酸)

B. 1齢幼虫期における*grd-5*と*grd-10*のプロモーターの下流にGFPを融合したレポーター遺伝子の蛍光画像と、微分干渉像と蛍光画像の合成画像。

矢尻: seam細胞、矢印:表皮細胞、スケールバーは10 μmを示す。

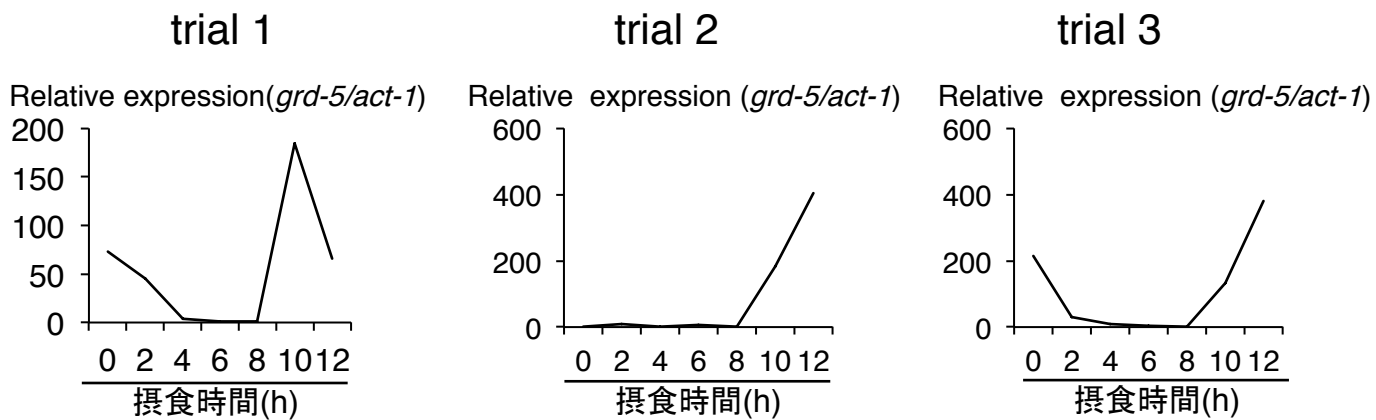


図.46 *grd-5*は孵化直後やP細胞が活性化した後にmRNAが発現上昇する  
 野生型の胚をM9緩衝液で24時間培養し、孵化させた1齢幼虫を摂食条件下で培養し、2時間毎に回収したサンプルのmRNAの発現振動をqRT-PCRによって解析した。



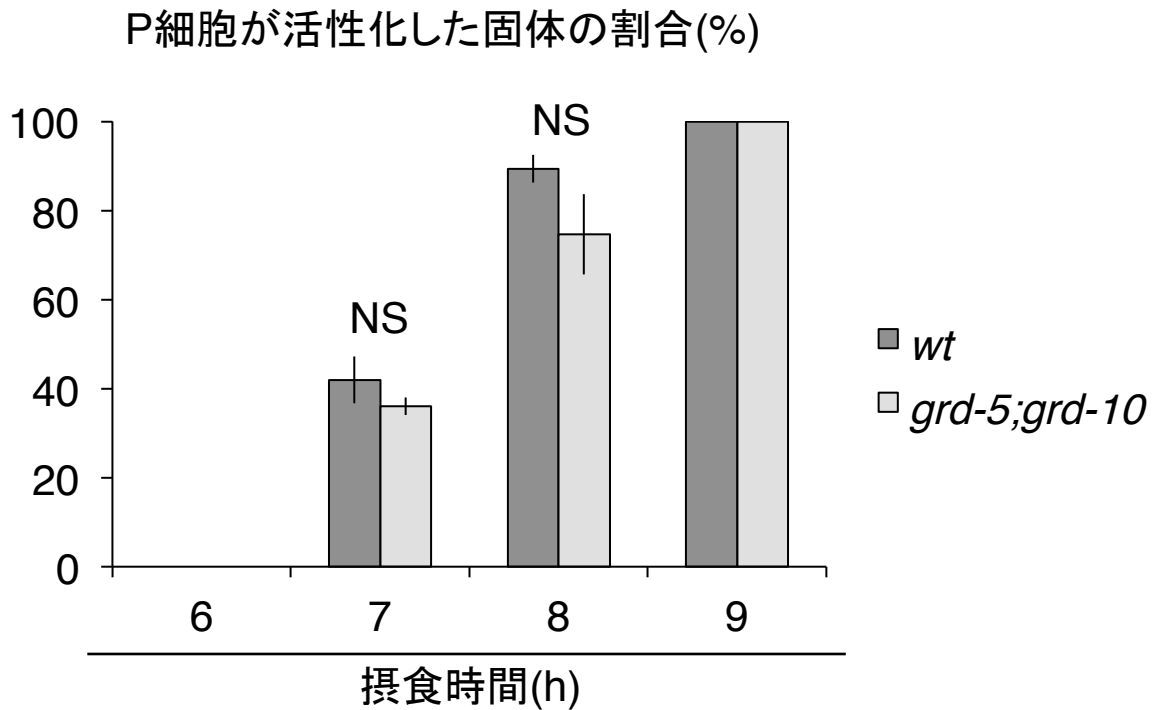


図.47 *grd-5*や*grd-10*は摂食条件下でのP細胞の活性化に寄与しない  
 摂食条件下で6時間から9時間培養した野生型と、*grd-5*や*grd-10*の2重変異体  
 におけるP細胞が活性化した個体の割合を示す。1回の計測で計50匹以上数  
 えた、n=3、Not Significant (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean± S.D.を  
 示す。

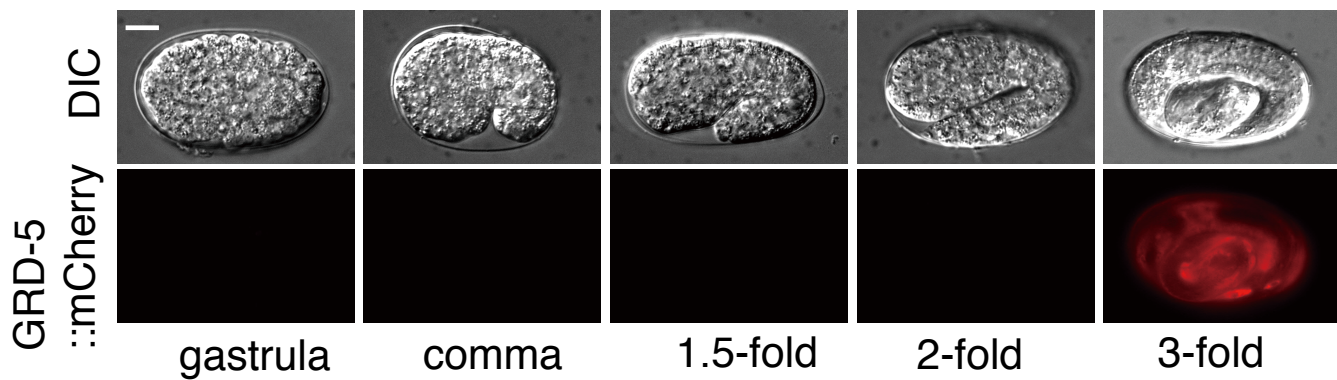


図.48 胚発生期においてGRD-5::mCherryは3-fold期で発現する  
 原腸胚期から胚発生後期までにおける微分干渉像とGRD-5::mCherryの蛍光  
 画像を示す。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  
 $\mu\text{m}$ を示す。

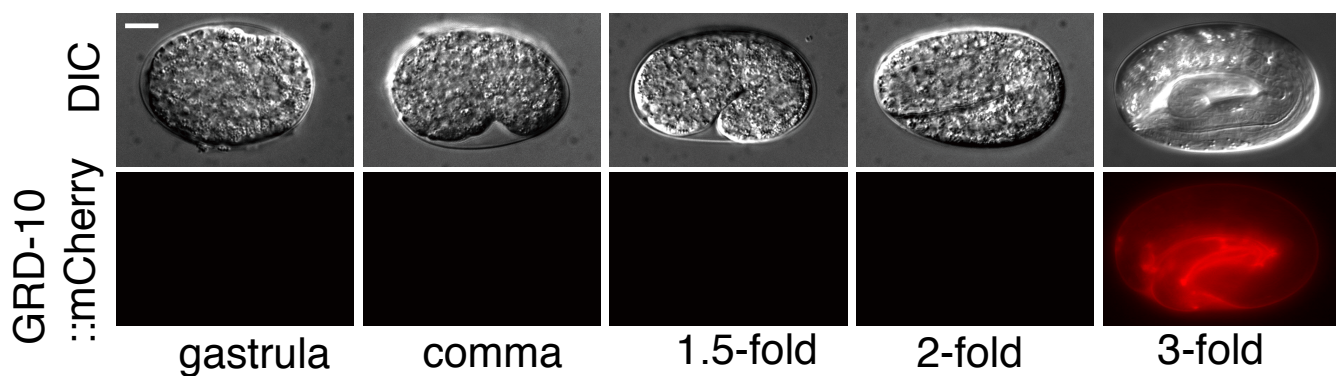


図.49 胚発生期においてGRD-10::mCherryは3-fold期で発現する  
 原腸胚期から胚発生後期までにおける微分干渉像とGRD-10::mCherryの蛍光画像を示す。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

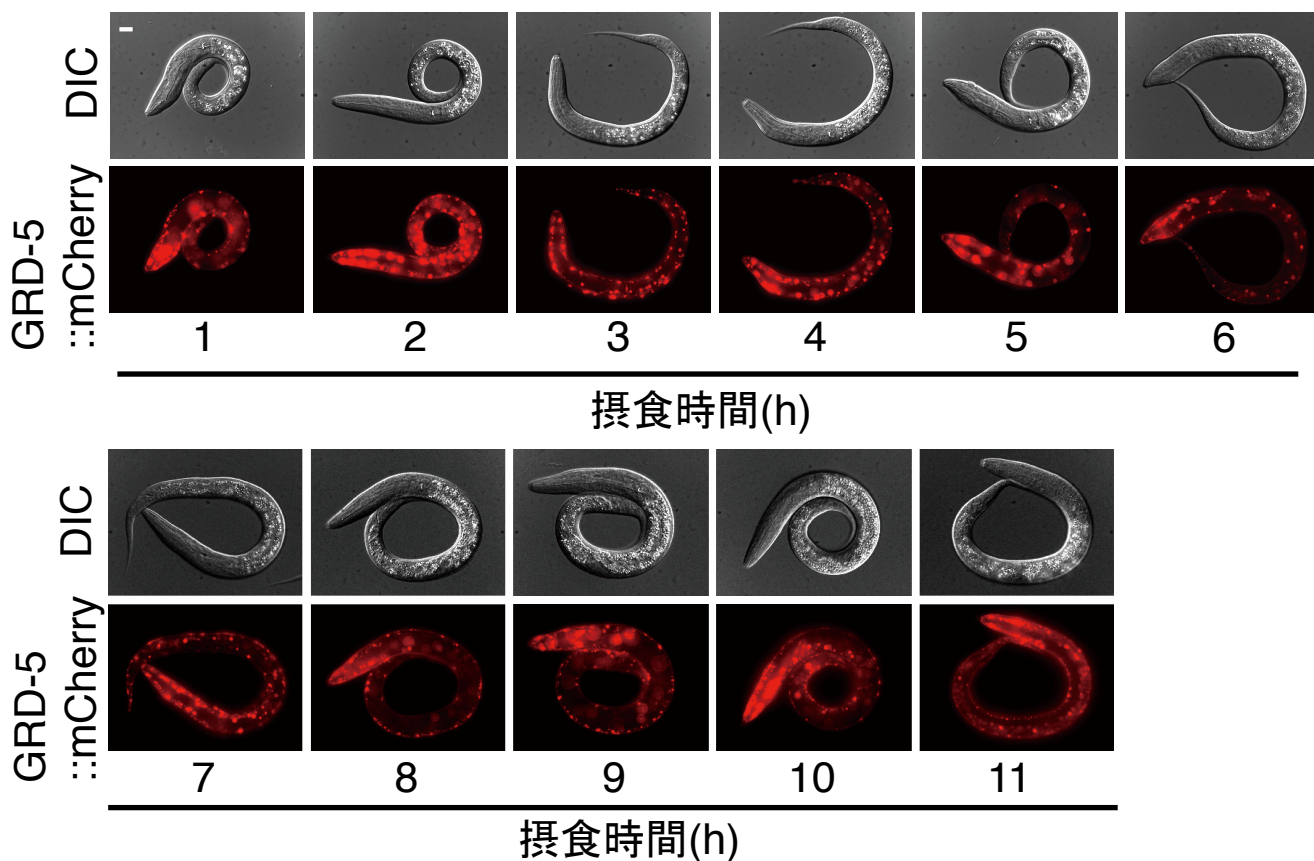


図.50 GRD-5::mCherryは1齢幼虫期で頂端側細胞膜で検出される  
 摂食条件下で1時間から11時間培養した1齢幼虫の微分干渉像と  
 GRD-5::mCherryの蛍光画像。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。ス  
 ケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

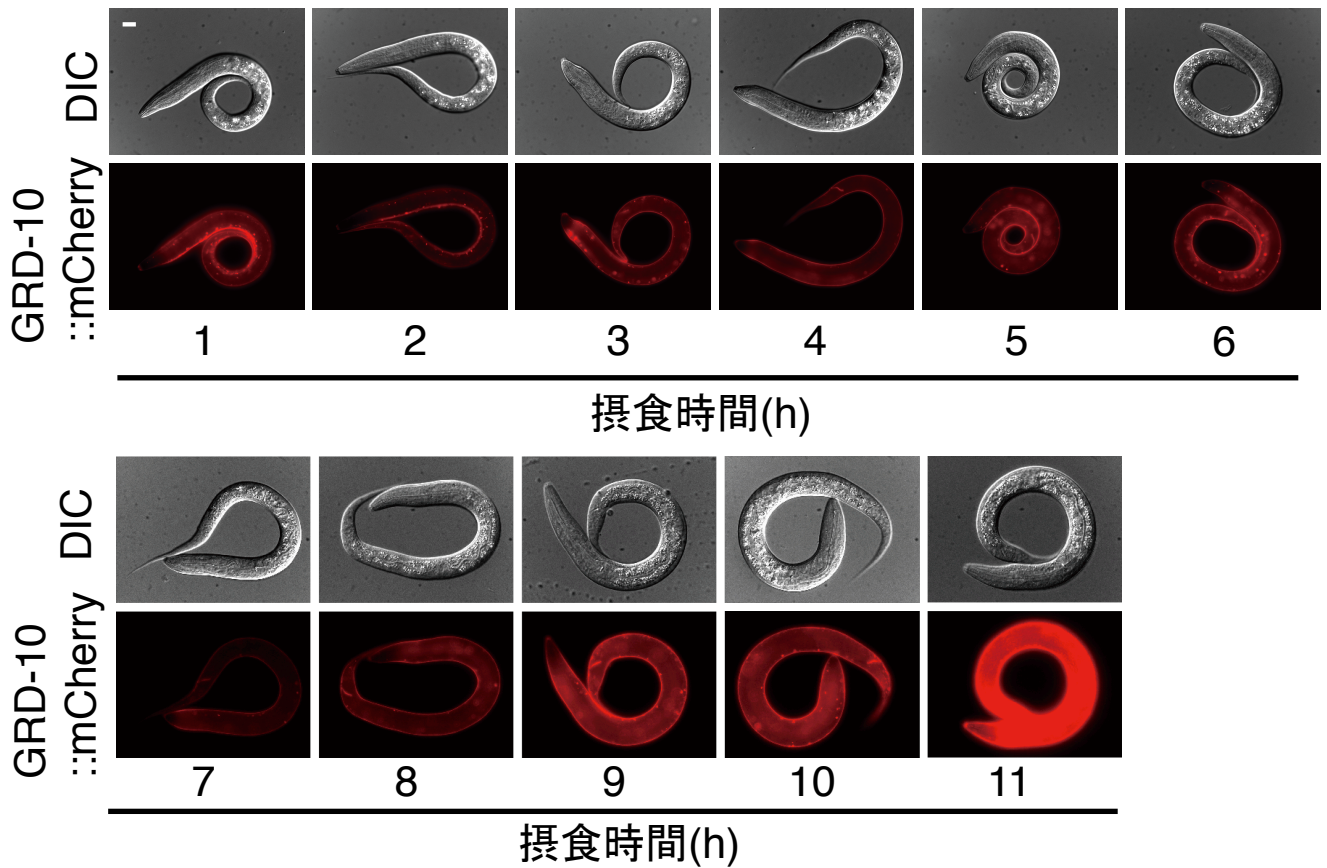


図.51 GRD-10::mCherryは1齢幼虫期で常に頂端側細胞膜で検出される  
 摂食条件下で1時間から11時間培養した1齢幼虫の微分干渉像と  
 GRD-10::mCherryの蛍光画像。蛍光画像は全て同じ露光時間で撮影した。  
 スケールバーは10  $\mu$ mを示す。

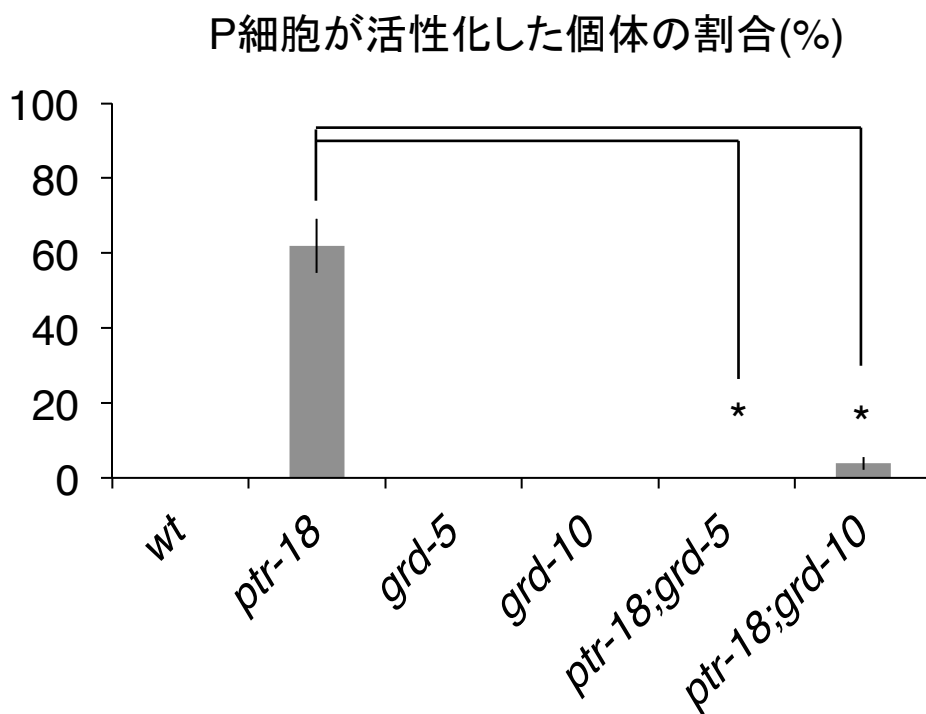


図.52 *grd-5*や*grd-10*は*ptr-18*によって抑制される

5日間飢餓培養した野生型と、*grd-5*遺伝子や*grd-7*遺伝子の欠失変異体、*ptr-18*と*grd-5*や*grd-10*の2重変異体それぞれにおける、P細胞が活性化した個体の割合を示す。1回の計測で計35匹以上数えた、n=3、\*:P< 0.01 (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean± S.D.を示す。

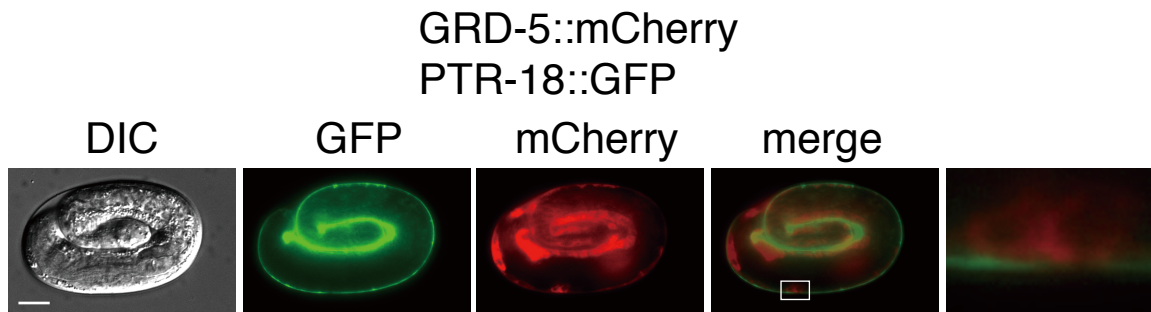
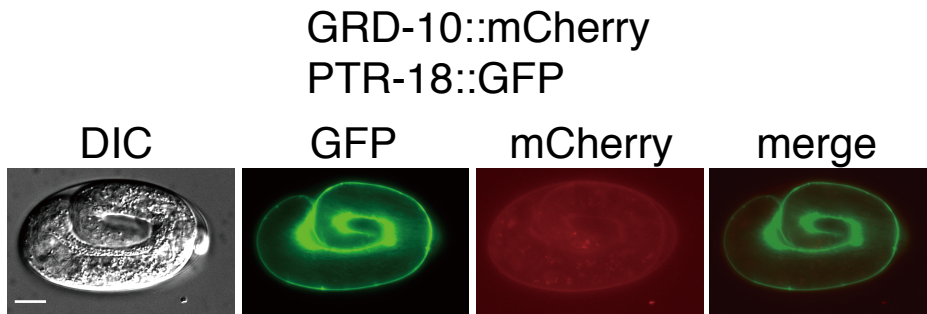


図.53 PTR-18::GFPとGRD-5::mCherryやGRD-10::mCherryは3-fold期の同じ時期に頂端側細胞膜で検出されない  
3-fold期の胚のPTR-18::GFPとGFPとGRD-5::mCherryやGRD-10::mCherryの蛍光画像とそれらの合成画像と拡大図を示す。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ を示す。

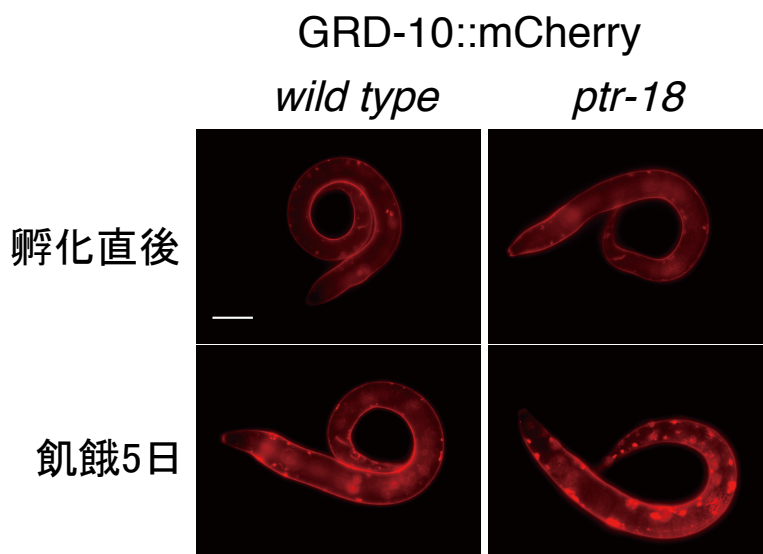
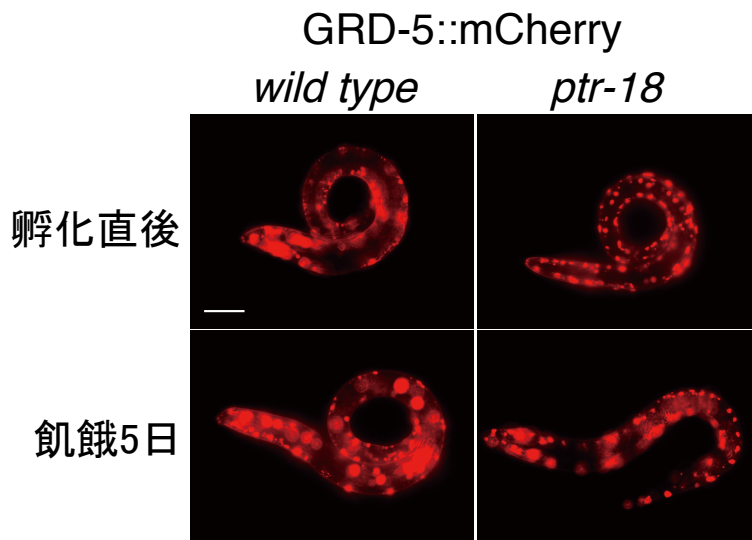


図.54 *ptr-18*はGRD-5やGRD-10の局在に寄与しない  
 孵化直後と5日間飢餓培養した、野生型と*ptr-18*欠失変異体の1齢幼虫における、GRD-5::mCherryとGRD-10::mCherryの蛍光画像。スケールバーは10  $\mu$ mを示す。



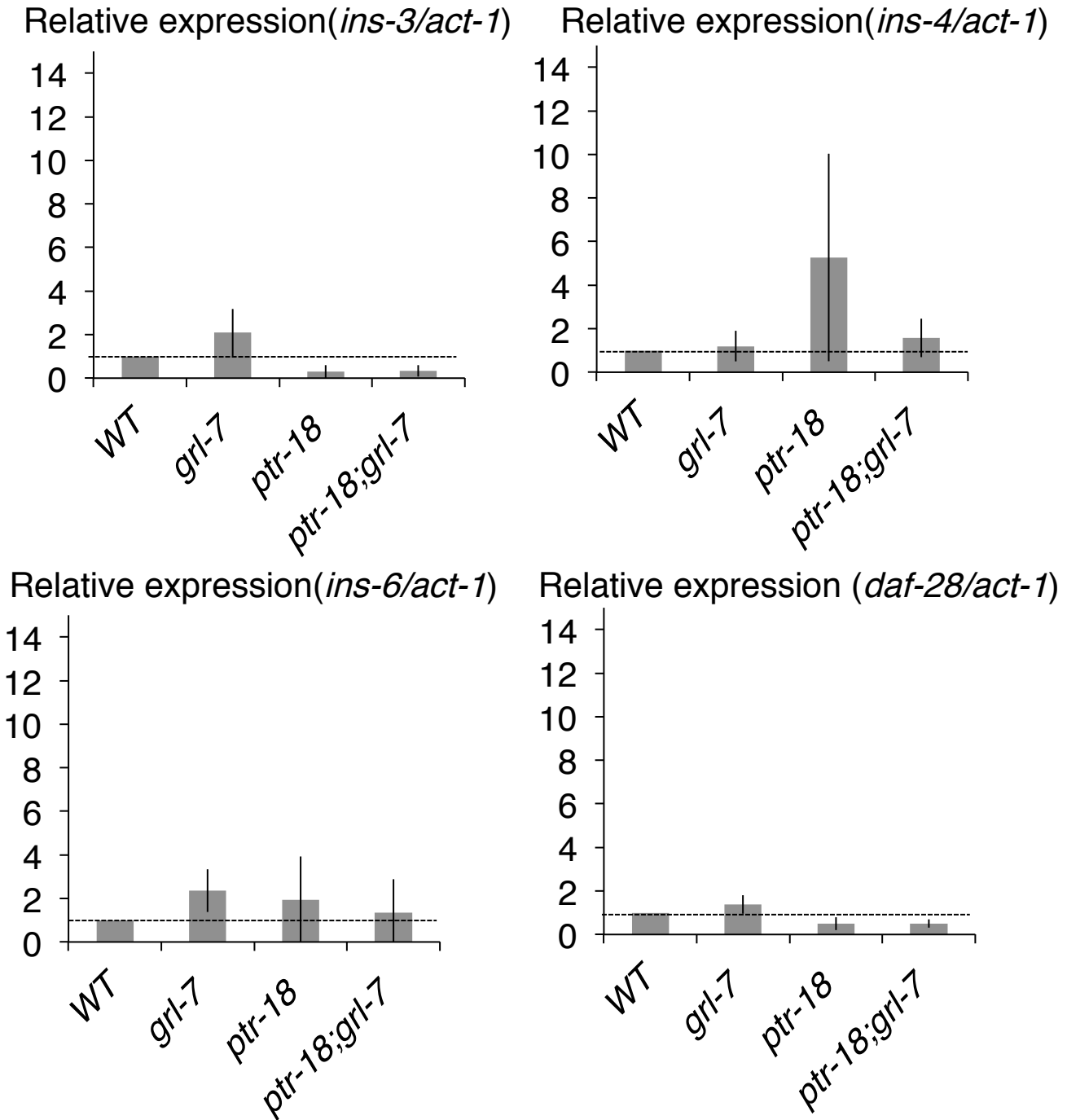


図.55 *ptr-18*欠失変異体では孵化直後に*ins-4*のmRNAの発現量が上昇する。野生型や*grl-7*変異体、*ptr-18*変異体、*ptr-18*と*grl-7*の2重変異体の胚をComplete S緩衝液で24時間培養し、孵化させた1齢幼虫のmRNAの発現量をqRT-PCRによって解析した。n=3、グラフはmean± S.D.を示す。

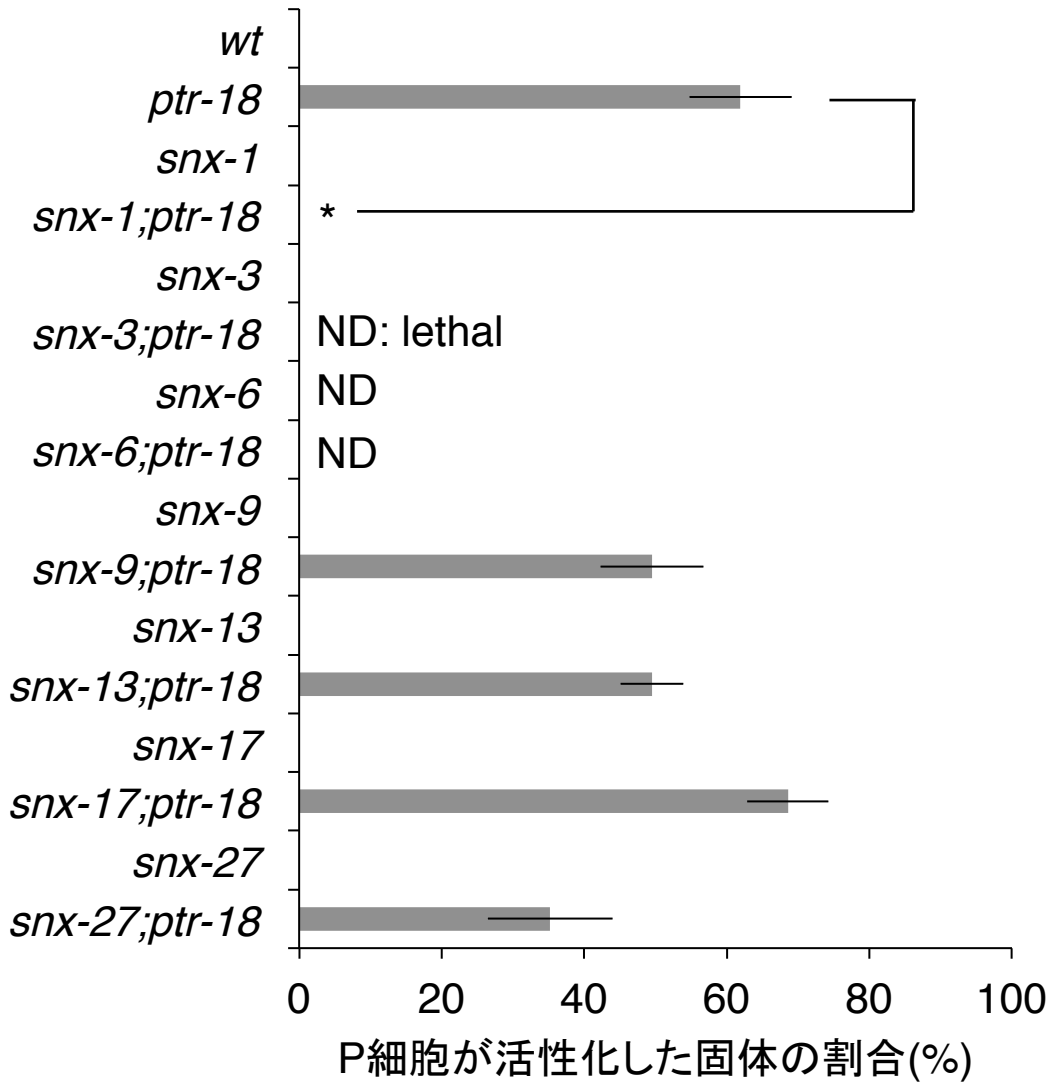


図.56 *sorting nexin 1 (snx-1)*は*ptr-18*によって抑制される

5日間飢餓培養した、野生型と*snx*遺伝子群の欠失変異体、*ptr-18*と*snx*遺伝子群の2重変異体それぞれにおける、P細胞が活性化した個体の割合を示す。1回の計測で計35匹以上数えた、n=3、\*:P< 0.01 (unpaired two-sided t-test)、グラフはmean± S.D.を示す。