

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 *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

氏名 千代田 大尚

#### 【序論】

幹細胞や前駆細胞における静止期状態と活性化状態のバランスは、組織恒常性の維持に重要な役割を担う。幹・前駆細胞の静止期制御の破綻は組織のがん化や老化、不妊などといった病態と密接な関連が示唆されているものの、組織間におけるその分子メカニズムの詳細は不明な点が多い。

私が所属する研究グループでは、インスリン/IGF シグナリング (IIS)経路の下流で機能するマイクロ RNA miR-235 が、その標的遺伝子である Hedgehog (Hh)関連 (Hh-r)タンパク質をコードする *grl-5* や *grl-7* を介して神経前駆細胞 (P 細胞)の静止期状態を制御することを報告してきた。*hh-r* は他の動物種の Hh と同じ進化的起源をもつ。これまでの研究で、複数の Hh-r や Hh 受容体 Patched、さらに Patched と構造が類似した Patched-related (PTR)が、脱皮の制御において同じ遺伝学経路で機能する可能性が示唆されていた。それに対して、ショウジョウバエの PTR や哺乳動物のオルソログである Patched domain containing (PTCHD)は、胚発生や脳の発生発達にそれぞれ関与することが示唆されているものの、Hh シグナル伝達経路との相互関係やその細胞機能は不明である。そこで私は、Hh-r が寄与する P 細胞の静止期維持機構に、PTR が関与する可能性を検討した。

#### 【結果】

##### 1. *ptr-18* は P 細胞の静止期状態の維持に重要である

最初に、*ptc* 遺伝子群や *ptr* 遺伝子群の変異体を網羅的に解析した。飢餓条件下では、野生型は P 細胞が静止期状態で維持され、成長を開始することができない。しかしながら、そのような条件下においても *ptr-18* 変異体では P 細胞が活性化した。また、*ptc* 遺伝子をコードする *ptc-1* や *ptc-3* はホモ変異体で維持することができず、*ptc* 遺伝子群が P 細胞の静止期制御に寄与する可能性は明らかにできなかった。そこで、P 細胞の静止期維持に重要な *ptr-18* 遺伝子に着目し研究を進めた。

##### 2. *ptr-18* は表皮細胞や P 細胞で機能する

*ptr-18* が機能する組織や細胞を明らかにするために、*ptr-18* 遺伝子のレポーター遺伝子を作成した。レポーター遺伝子は、表皮細胞群や P 細胞に加え、excretory duct や G1 pore 細胞、直腸細胞群などで発現が検出された。そこで、これらの組織や細胞に特異的な遺伝子のプロモーターをもちいて PTR-18::VENUS 融合タンパク質を *ptr-18* 変異体で発現させ、どの組織で PTR-18 が機能するかを検証した。その結果、表皮細胞群や P 細胞で融合タンパク質を発現させると、*ptr-18* プロモーターをもちいた際と同様に、飢餓条件下での *ptr-18* 変異体における P 細胞の活性化が顕著に抑制された。その一方で、直腸細胞群や excretory duct、G1 pore など融合タンパク質を発現させても、その表現型が抑制されることはなかった。以上より、*ptr-18* は *grl-5* や *grl-7* が発現する表皮細胞や P 細胞で細胞自律的かつ非自律的に機能する可能性が示唆された。

##### 3. *ptr-18* は *grl* 遺伝子群の *grl-5* や *grl-7*、*grl-27* を抑制する

*grl-5;grl-7* 二重変異体は野生型と同様のタイミングで P 細胞が活性化することから、これら以外の *grl* 遺伝子群と協調的に機能する可能性を考えた。そこで miR-235 の標的遺伝子である *grl-5* や *grl-7* に加え、表皮細胞や P 細胞で発現する *grl* 遺伝子群と、*ptr-18* の二重変異体の解析をした。*ptr-18* 欠失変異体に *grl-5* や *grl-7*、*grl-27* の欠失変異を加えることで、*ptr-18* 欠失変異体が呈する飢餓条件下で P 細胞が活性化してしまう表現型を抑制した。一方で、それ以外の *grl-2* や *grl-4*、*grl-10*、*grl-14*、*grl-15*、*grl-21* などの欠失変異を加えても *ptr-18* 欠失変異体の表現型は抑制されない。この結果は、*ptr-18* 変異体では *grl-5* や *grl-7*、*grl-27* といった特定の *grl* 遺伝子の活性化が亢進し、神経前駆細胞が活性化する可能性、*ptr-18/ptchd* は、Hh の下流で機能する *patched* とは異なり、*hh-r* の上流で機能する可能性が示唆された。次に、*ptr-18* と *grl-7* の詳細な発現パターンを解析し、それらが機能する時期を検証した。

#### 4. PTR-18 と GRL-7 のレポータータンパク質は共局在する

*ptr-18* や *grl-7* をそれぞれカバーする数十 kb のゲノム断片が組み込まれたフォスミドベクターをもちいて、それぞれの遺伝子の停止コドンの直前に *gfp* や *mcherry* の遺伝子を挿入したコンストラクトを作成した。PTR-18::GFP と GRL-7::mCherry は、共に胚発生後期で初めて発現が検出され、それらは表皮細胞や P 細胞の頂端側細胞膜近傍に局在し、それぞれが類似した発現パターンを示した。また、PTR-18::GFP と GRL-7::mCherry は、孵化が近づくにつれ、ともに細胞膜近傍から細胞内で小胞状に局在が変化し共局在を示し、PTR-18::GFP は孵化直後では検出されなかった。また孵化にかけて、野生型では PTR-18::GFP や GRL-7::mCherry は細胞内に取り込まれるのに対して、*rab-5* 遺伝子を Feeding RNAi によってノックダウンすることで、孵化後も PTR-18::GFP や GRL-7::mCherry が頂端側細胞膜で検出される個体の割合が増加した。以上より、PTR-18 や GRL-7 は孵化直前にエンドサイトーシスによってともに内在化される可能性が考えられた。そこで次に *ptr-18* が、上に示した GRL-7 レポータータンパク質の発現パターン変化に寄与するか検討した。

#### 5. *ptr-18* は *grl-7* の内在化を介した分解を促進する

野生型では、胚発生後期において、頂端側細胞膜近傍に GRL-7::mCherry の局在を示す個体の割合が多いのに対し、孵化直後では、小胞状で検出される個体の割合が多く占める。それに対して、孵化直後の大部分の *ptr-18* 変異体では、GRL-7::mCherry が頂端側細胞膜近傍で検出された。その一方で、飢餓条件下における P 細胞の表現型が *ptr-18* 変異体と類似し、*grl-7* を標的遺伝子とする *mir-235* や、その上流で機能する *daf-16/foxo* の変異体では、GRL-7::mCherry の内在化のタイミングに異常は見られなかった。また、リソソームにおけるタンパク質分解に対して、mCherry より感受性が高いと考えられる VENUS に置換した GRL-7::VENUS タンパク質は、GRL-7::mCherry と同様に、孵化直前に頂端側細胞膜近傍から消失するものの、孵化後には検出されなかった。それに対して、孵化直後の *ptr-18* 変異体では、GRL-7::VENUS が細胞膜頂端側に検出された。以上より、孵化前に細胞外に分泌された GRL-7 を、PTR-18 が内在化を介した分解を促進することで孵化するまでに取り除くことで、孵化後に一齢幼虫が飢餓条件におかれても P 細胞が不必要に活性化しないモデルが考えられた。

#### 6. GRL とは異なるサブファミリーの Hh-r も P 細胞の活性化に関与する

飢餓条件下の *ptr-18* 変異体においては、*grl-5* や *grl-7*、*grl-27* の活性は P 細胞の静止期からの活性化に必須であることが明らかとなった。しかしながら、摂食条件下では、*grl-5* や *grl-7*、*grl-27* の三重変異体は野生型と同様のタイミングで P 細胞が正常に活性化することから、これらの *grl* 遺伝子に加えて、他のサブファミリーに属する *hh-r* 遺伝子も協調的に機能する可能性を考えた。そこで DNA マイクロアレイを用いた先行研究で、

摂食条件下で、P細胞が活性化する前に発現が上昇することが報告されている *hh-r* 遺伝子の *grd-3* や *grd-10*、*grd-13*、*wrt-10* に着目した。これらの遺伝子を表皮細胞やP細胞で過剰発現させ、飢餓条件下でP細胞を活性化させる *hh-r* 遺伝子を探索した結果、*grd-10* のみがP細胞を活性化する活性を示した。*grd-10* のパラログである *grd-5* mRNA の発現量は、P細胞が活性化する前に顕著に増加しない。しかしながら、表皮細胞やP細胞で過剰発現させると、*grd-10* と同様にP細胞が活性化することが認められた。その一方で、*grd-5;grd-10* 二重変異体は、摂食条件下では野生型と同様のタイミングでP細胞が活性化する。よって、先の解析で同定した GRL-5 や GRL-7、GRL-27 に加えて、GRD-5 や GRD-10 といった一次構造が異なる Hh-r タンパク質群が協調的に機能することで、P細胞を静止期から活性化することが考えられる。

#### 【まとめと考察】

本研究を通して、*ptr/ptchd* をコードする *ptr-18* が、適切なタイミングで *grt-7* を不活性化し、前駆細胞の静止期を制御することを見出した。PTR-18 のように PTR/PTCHD が、Hh などの分泌タンパク質のエンドサイトーシスを介した、分解促進に関与する知見はこれまでには報告されていない。近年、*ptr/ptchd* をコードする *ptchd1* の変異が、遺伝性の自閉症スペクトラム症候群や学習障害などの神経発生発達障害の原因であると示唆されている。PTCHD1 などの PTR/PTCHD も、Hh などの分泌タンパク質の内在化を介した分解を促進するし、Hh シグナルの活性化を次空間的に限定する機能をもつ可能性が考えられる。