

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32680

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14693

研究課題名(和文) TRIM-NHL蛋白質による栄養応答制御機構の解析

研究課題名(英文) Nutrient response mediated by a TRIM-NHL protein

研究代表者

堅田 利明 (KATADA, Toshiaki)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：10088859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物において、脳を含む神経は、神経幹細胞や神経前駆細胞から産生される。神経幹細胞や神経前駆細胞は活発に分裂や分化をおこない新しい神経細胞を産生する活性化状態と、そのような活動をおこなわない静止期状態を行き来することが知られており、その制御を理解することは再生医療の実現化や老化の解明に重要だと考えられている。今回、線虫を用いてnos-1とnhl-2という2つの遺伝子が協調的に感覚神経や介在神経で機能し、遠隔的に神経前駆細胞の静止期を制御する知見を得た。匂いや味といった知覚が、神経系の発達に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In animals, the nervous system is derived from neural stem and progenitor cells. These cells dynamically shuttle between the activated and quiescent states. During the former state, neural stem and progenitor cells actively divide and differentiate to produce neurons. On the other hand, these cells stay dormant during the latter. Better understanding the mechanism that regulates the balance between these two states is believed to contribute to development of regenerative medicine and elucidation of aging process. Using the nematode worm, *C. elegans* as an experiment system, this study found that nhl-2 and nos-1 act in the sensory and interneurons to remotely maintain the quiescent state of neural progenitor cells. These findings raise the possibility that sensing odors and tastes may affect neurogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：栄養応答 TRIM-NHL NANOS 線虫

1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトの進展により、多くの動物が、RRMやKHといったRNA結合モチーフを含む数百もの蛋白質群を有することが明らかになったが、大半のRNA結合蛋白質の生理機能や遺伝子発現制御メカニズムは依然として不明である。我々はこれまでに、線虫の幹・前駆細胞が飢餓条件下では静止期で維持され、摂食条件下では活発に分裂や分化を行う点に着目し、幹・前駆細胞の栄養応答にインスリン経路や、その下流でヒト miR-92 オルソログである miR-235 が機能することを報告してきた (Kasuga et al., *Nature* 2013; Fukuyama et al., *Curr Biol* 2015)。インスリン経路により抑制される転写因子 *foxo* (線虫では *daf-16*) の変異体では、飢餓条件下にもかかわらず摂食条件下と同様に神経前駆細胞 (P 細胞) が分裂や分化をおこなう。我々は TRIM-NHL タンパク質をコードする *nhl-2* の欠失変異体が、とても低い頻度であるものの、飢餓条件下で神経前駆細胞の活性化を示すことを見出した。そこで、*nhl-2* の相互作用因子を酵母 2 ハイブリッド法で探索したところ、RNA 結合タンパク質の NANOS をコード *nos-1* が同定された。そこで *nhl-2* と *nos-1* がどのようなメカニズムを介して、神経前駆細胞の維持を制御するか、相互作用因子の同定や、遺伝学的相互作用実験などを通じて明らかにしようと試みた。

2. 研究の目的

本研究では、NHL-2 が介在する栄養応答機構を解明する。TRIM-NHL や NANOS に限らず、RNA 結合蛋白質群で栄養状態やインスリン経路に応答するものは前例に乏しく、本研究により新規栄養応答性遺伝子発現調節メカニズムの解明が期待できる。

3. 研究の方法

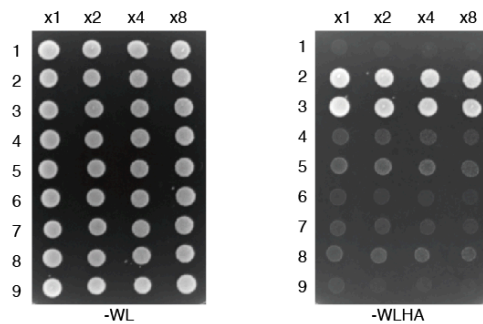
まず、酵母 2 ハイブリッド法にて、*nhl-2* と *nos-1* の部分欠失変異体をもちいて、両者の相互作用に必要な部位を同定した。次に両遺伝子や *foxo* との遺伝学的相互作用を評価した。また、組織特異的なプロモーターをもちいた救助アッセイにて、*nhl-2* と *nos-1* が機能する組織を同定した。

4. 研究成果

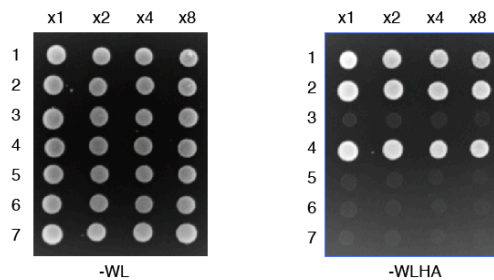
(1) NHL-2 と NOS-1 は、TRIM モチーフと N 末端領域をそれぞれ介して相互作用する

NHL-2 タンパク質を含む TRIM-NHL タンパク質は、N 末端側の TRIM モチーフと C 末端側の NHL モチーフによって特徴付けられる。一方 NOS-1 を含む NANOS タンパク質は、動物間でよく保存された、RNA 結合能を示す CCHC Zn フィンガーを含む C 末端領域をもつ。これまでの研究で、ショウジョウバエの TRIM-NHL タンパク質 Brat は、NANOS と Pumilio、NRE (Nanos Response Element) RNA を含む三者複合体と相互作用することが示されてきた

が、Brat と NANOS が直接相互作用するのか不明であった。そこで、NHL-2 と NOS-1 がどの領域を介して相互作用するか明らかにするために、酵母 2 ハイブリッド法を用いて検討した (図 1)。その結果、NHL-2 の TRIM ドメインと NOS-1 の N 末端領域が、再現性良く相互作用することを見出した (図 1)。近年、TRIM-NHL タンパク質の一つであるショウジョウバエの Brat が、C 末端側の NHL モチーフを介して、特異的な配列を持つ一本鎖 RNA に結合することが報告されている (Loedige et al., *Genes Dev* 2014)。よって、NHL-2 の NHL モチーフも N 末端側の TRIM モチーフを介して NOS-1 などと相互作用し、NHL モチーフを介して特異的な標的 RNA に結合する可能性がある。



| | | |
|---|----------------------------------|-------------------|
| 1 | pGBT9 (empty vector) | pGAD10 |
| 2 | full-length NHL-2 | full-length NOS-1 |
| 3 | NHL-2 N-ter TRIM domain (406 aa) | full-length NOS-1 |
| 4 | NHL-2 middle region (332 aa) | full-length NOS-1 |
| 5 | NHL-2 NHL domain (295 aa) | full-length NOS-1 |
| 6 | full-length NHL-2 | pGAD10 |
| 7 | NHL-2 N-ter TRIM domain (406 aa) | pGAD10 |
| 8 | NHL-2 middle region (332 aa) | pGAD10 |
| 9 | NHL-2 NHL domain (295 aa) | pGAD10 |



| | | |
|---|----------------------------------|-------------------|
| 1 | full-length NHL-2 | full-length NOS-1 |
| 2 | full-length NHL-2 | N-ter NOS-1 |
| 3 | full-length NHL-2 | C-ter NOS-1 |
| 4 | NHL-2 N-ter TRIM domain (406 aa) | N-ter NOS-1 |
| 5 | pGBT9 | full-length NOS-1 |
| 6 | pGBT9 | N-ter NOS-1 |
| 7 | pGBT9 | C-ter NOS-1 |

図 1 NHL-2 と NOS-1 は、TRIM モチーフと N 末端領域をそれぞれ介して相互作用する

(2) *nhl-2* と *nos-1* は協調的に飢餓条件下の神経前駆細胞の静止期を制御する

nhl-2 と *nos-1* がどのようなメカニズムで神経前駆細胞の静止期を制御するか明らかにするべく、まず遺伝学的相互作用を検討した。飢餓条件下では、*nos-1* null 変異体における神経前駆細胞は、野生型と同様に静止期を維

持っていた (図 2A)。そこで、*nos-1* と *nhl-2* が協調的に機能する可能性を検討すべく両者の二重変異体を作成した。飢餓条件において、*nhl-2;nos-1* 変異体は、再現性良く神経前駆細胞の活性化を示した (図 2A)。さらに、この表現型は *nhl-2* 遺伝子座を含む DNA 断片や、*nos-1* 遺伝子座を含む fosmid コンストラクトによって顕著に救助されることを認めた。*nos-1* の fosmid コンストラクトは、*nos-1* 以外の遺伝子も含む (図 2B)。そこで

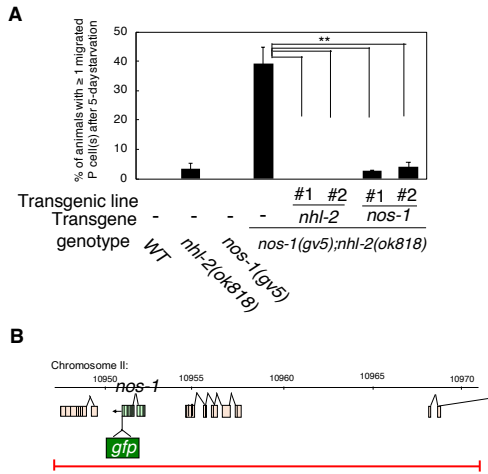


図2. *nos-1*や*nhl-2*は協調的に神経前駆細胞の栄養応答を制御する

(A) 飢餓5日目における、*nhl-2(ok818);nos-1(gv5)* 二重変異体の神経前駆細胞の異常な活性化は、*nhl-2*ゲノムや、停止コドン直前に*gfp*遺伝子を融合した*nos-1*遺伝子座を含む約27 kbのフォスミドをそれぞれ導入することで救助できる。** $p < 0.01$ (unpaired two-sided t-test), $n = 3$, bars: s. d.

(B) 救助実験で用いた*nos-1*レポーターコンストラクト (赤線) の構造。

nos-1(gv5) に加え *nos-1(ok250)* と *nhl-2(ok818)* の二重変異体も作成したところ、*nhl-2(ok818);nos-1(gv5)* 二重変異体と同様に神経前駆細胞の活性化が認められた。よって、飢餓条件下において、*nhl-2* と *nos-1* は、協調的に神経前駆細胞の静止期を維持するはたらきを持つことが示された。

(3) *nhl-2* と *nos-1* は *foxo* とは並行な遺伝学的経路を介して機能する

nhl-2;nos-1 二重変異体と *foxo* 変異体は類似した表現型を示す。そこで、*nhl-2* と *nos-1*

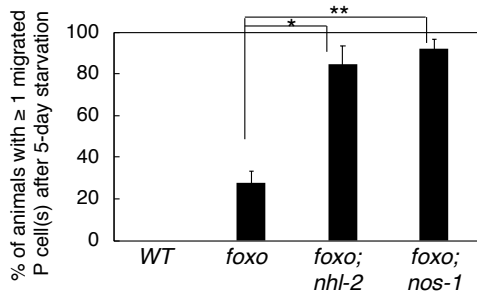


図3. *nhl-2* と *nos-1* は神経前駆細胞の静止期維持に *foxo* とは並行な経路で協調的に関与する

(A) 飢餓5日目に神経前駆細胞が1個以上移動した個体の割合を定量した (3回以上の試行で合計105匹以上数えた)。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (unpaired two-sided t-test), $n = 3$, bars: s. d.

が、*foxo* と同じ遺伝学的経路で機能し、神経前駆細胞の静止期を制御しているかもしれない。この可能性を検討するために、*nhl-2* や *nos-1* と *foxo* の遺伝学的相互作用を評価した。その結果、*nhl-2(ok818)* や *nos-1(gv5)* は *foxo* null 変異体の表現型を顕著に増強した (図 3)。よって、*nhl-2* と *nos-1* は *foxo* とは並行な遺伝学的経路を介して、神経前駆細胞の静止期を制御することが示された。

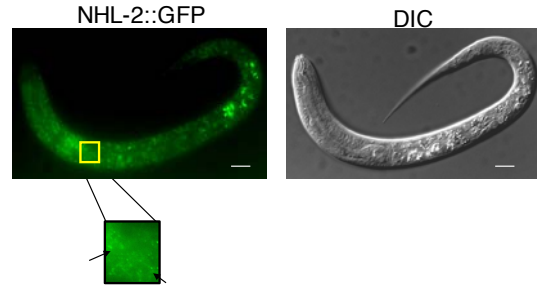


図4. NHL-2::GFP融合タンパク質は全身に発現する
CRISPR-Cas9システムを用いて作成した株の、飢餓5日目におけるNHL-2::GFPの蛍光像。全身でNHL-2::GFP融合タンパク質が発現しており、さらに粒状に局在している様子 (矢印) が確認できた。Bars: 10 μ m.

(4) NHL-2 タンパク質は全身に発現する

nhl-2 と *nos-1* がどの組織で機能するかにするために、まず *nhl-2* の発現を解析した。Crispr/Cas9 システムをもちいて、ゲノム上の *nhl-2* 遺伝子のストップコドンの手前に GFP を挿入した。NHL-2::GFP は全身で発現し、細胞内で粒状の発現パターンを示した (図 4)。栄養条件下および摂食条件下で発現の有無や細胞内局在を比較したが顕著な違いは見出せなかった。

(5) NOS-1 タンパク質は頭部や尾部の感覚神経や介在神経に発現する

次に、*nhl-2;nos-1* 変異体の表現型を救助する *nos-1::gfp* レポーター遺伝子 (図 2) をもちいて発現パターンを解析した。NHL-2::GFP と対照的に、NOS-1::GFP は頭部

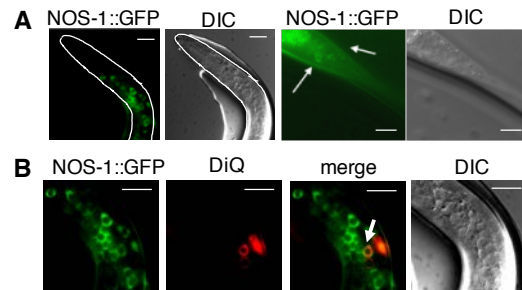


図5. NOS-1::GFP融合タンパク質は頭部と尾部の感覚神経や介在神経に発現する

(A) 頭部の複数の細胞においてNOS-1::GFP融合タンパク質の発現する。尾部の複数の細胞 (矢印) においてNOS-1::GFP融合タンパク質の発現が観察する。Bars: 10 μ m.

(B) 線虫の頭部の写真。DiQ (赤) でラベルされた複数の感覚神経細胞にて、NOS-1::GFPの発現が認められた (矢印)。Bars: 10 μ m.

と尾部の感覚神経や介在神経に局限して認められた (図 5)。栄養条件下および摂食条件下で発現の有無や細胞内局在を比較したが顕著な違いは見出せなかった。

(6) *nhl-2* や *nos-1* は神経系で機能する

発現パターン解析の結果を受けて、*nhl-2* や *nos-1* が *nos-1* の発現する神経系で機能するか検討した。分化した神経に特異的な *rgef-1* 遺伝子のプロモーターをもちいて、*nhl-2* を神経特異的に発現したところ、*nhl-2;nos-1* 二重変異体の表現型は顕著に抑

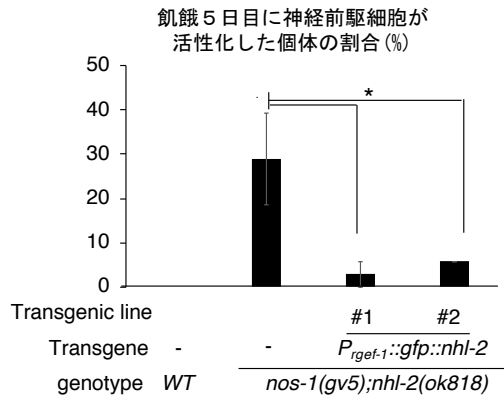


図6. NHL-2は分化した神経において機能する
*P_{rgef-1}::gfp::nhl-2*の形質転換体をそれぞれ2系統ずつ作成し、GFPを発現する個体のうち、飢餓 5 日目に神経前駆細胞が1 個以上移動した個体の割合を定量した (3 回以上の試行で合計105 匹以上数えた)。
***p*<0.05 (unpaired two-sided t-test), *n* ≥4, bars: s. d.

制された (図 6)。

次に、*nhl-2* と同様に *nos-1* を *rgef-1* プロモーターをもちいて神経特異的に発現させたところ、*nhl-2;nos-1* 二重変異体の表現型は顕著に抑制された (図 7)。そこで、*nos-1* の発現が感覚神経や介在神経に局限されていることから、頭部の感覚神経や介在神経に特異的な *che-2* プロモーターをもちいて *nos-1* を発現させたところ、*rgef-1* と同様に救助されることを見出した (図 7)。

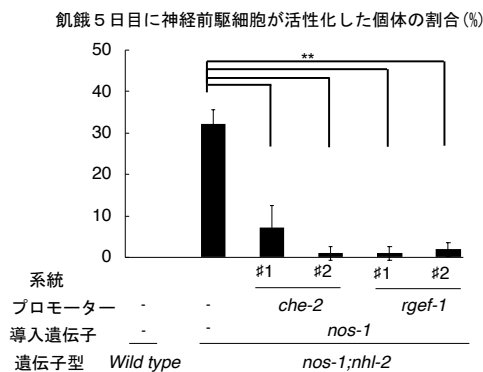


図7. NOS-1は感覚神経と一部の介在神経において機能する
P_{che-2}::gfp::nos-1 及び *P_{rgef-1}::gfp::nos-1*、*P_{pgp-1}::gfp::nos-1*の形質転換体をそれぞれ2系統ずつ作成し、GFPを発現する個体のうち、飢餓 5 日目に神経前駆細胞が1 個以上移動した個体の割合を定量した (3 回以上の試行で合計105 匹以上数えた)。
***p*<0.01 (unpaired two-sided t-test), *n* =3, Bars: s. d.

(7) インスリンリガン드가 *nhl-2* と *nos-1* の下流で機能する可能性

nhl-2 と *nos-1* が分化した神経系で遠隔的に神経前駆細胞の静止期を制御することが示唆された。これまでの他の動物種における先行研究で、NANOSやTRIM-NHLタンパク質は、標的 mRNA の安定性や翻訳を抑制することが示唆されている。そこで、*nhl-2* や *nos-1* は、神経前駆細胞の活性化を促進する分泌因子の mRNA を標的とする可能性が考えられる。そこで、マイクロアレイ解析にて、飢餓条件下の野生型と *nhl-2;nos-1* 二重変異体での発現プロファイルを比較したところ、後者でインスリンリガンダの一つをコードする *ins-39* 遺伝子の発現が更新していることを見出した。そこで、*ins-39* と、*nhl-2* と *nos-1* との遺伝学的相互作用を検討したところ、*ins-39* の機能障害は、*nhl-2;nos-1* 二重変異体の表現型を顕著に抑制した (図 7)。よって、*ins-39* は、*nhl-2* と *nos-1* の標的遺伝子であり、その発現亢進が *nhl-2;nos-1* 二重変異体における神経前駆細胞の活性化に寄与する可能性が示唆された。

飢餓 5 日目に神経前駆細胞が活性化した個体の割合 (%)

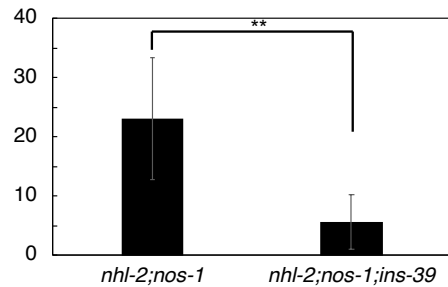


図8. *ins-39*の機能障害は*nhl-2;nos-1*変異体の表現型を抑制する

飢餓 5 日目に神経前駆細胞が1 個以上移動した個体の割合を定量した (3 回以上の試行で合計105 匹以上数えた)。
***p*<0.05 (unpaired two-sided t-test), *n* =4, Bars: s. d.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 坂井田 京、北澤 文、春日 秀文、糸 優彦、福山 征光、紺谷 圈二、堅田 利明. The NANOS/TRIM-NHL complex regulates starvation-induced quiescence of somatic progenitors in *C. elegans*. 第 39 回日本分子生物学会、2016 年
- ② 堅田利明. Gタンパク質に魅せられて 40 年：定量的視点へのこだわり、日本生化学会 関東支部例会、2017 年
- ③ 堅田利明. Gタンパク質に魅せられて、武蔵野大学 薬学研究所・臨床薬学センター 平成 29 年度研究成果発表会・講演会、

2018年

- ④ 福山 征光、頭部神経系と栄養貯蔵組織における栄養応答システムの協調機構の解明、金沢大学新学術創成研究機構 革新的統合バイオ研究コア 栄養・代謝研究ワークショップ、2018年
- ⑤ 福山 征光、*C. elegans* において静止期前駆細胞の活性化を制御する食餌中の栄養分子と遺伝子の解明、第50回日本発生物学会、2018年

[図書] (計1件)

- ① Masamitsu Fukuyama、Reproductive and Developmental Strategies, Diversity and Commonality in Animals、Springer Japan、印刷中

[その他]

ホームページ等

武蔵野大学薬学部・分子細胞生物学研究室
ホームページ

<https://www.musashino-u.ac.jp/research/laboratory/pharmacy/lab/saibo.html>

東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室
ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堅田 利明 (KATADA, Toshiaki)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：10088859

(2) 研究分担者

福山 征光 (FUKUYAMA, Masamitsu)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：20422389