

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05436

研究課題名(和文)モデル生物・線虫*C. elegans*を用いた腸ペプチドの分泌制御機構の解明研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanisms of secretion of intestinal peptides using *C. elegans*

研究代表者

河野 強 (KAWANO, Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50270567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：モデル生物・線虫*Caenorhabditis elegans*の休眠・寿命を制御するインスリン様ペプチド・INS-35の分泌制御因子の探索を行った。その際、膜輸送に關与するRabファミリータンパクに着目した。

RNAiスクリーニングにより、INS-35の分泌制御に關わるRab-6.2を選別した。Rab-6.2は腸でのINS-35の分泌制御に關与するのみならず、頭部神経細胞でインスリン様ペプチドDAF-28の分泌にも關与していた。加えて、休眠制御に關与するRab-18を選別した。Rab-18が腸で発現するコレステロールトランスポーターNCR-1の膜輸送制御を介して生育/休眠を制御していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、インスリン様ペプチドの分泌を制御するRab-6.2を同定した。同タンパクはヒトにも存在するが、インスリン分泌に關与することは知られていない。故に、本研究により得られた学術的意義は非常に大きい。同タンパクがインスリン分泌不全による糖尿病発症に關与するかは極めて興味深い(社会的意義)。また、本研究では、Rab-18が腸で発現するコレステロールトランスポーターの膜輸送に關与することを示した(新知見)。この学術的意義は大きい。ヒトのコレステロールトランスポーターNPC1L1の膜輸送機構には不明な点が多く、本知見をNPC1L1阻害、即ち、高脂血症予防に展開する可能性を見出した(社会的意義)。

研究成果の概要(英文)： In this research, I searched Rab family proteins which are relevant to regulation of INS-35, one of the insulin-like peptide of the model organism, *Caenorhabditis elegans*.

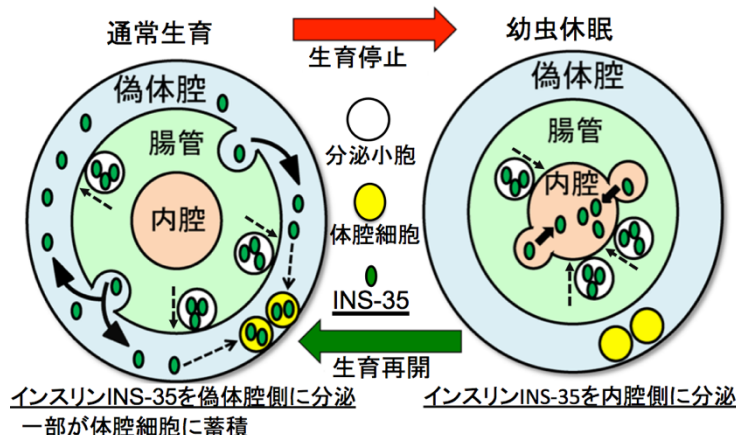
My RNAi screen revealed that Rab-6.2 and Rab-18 are associated with regulation of larval diapause of *C. elegans*. I demonstrated that Rab-6.2 is relevant to regulation of INS-35 secretion in intestine. Moreover, Rab-6.2 is relevant to secretional regulation of DAF-28, one of the *C. elegans* insulin-like peptides, in head neurons. In addition, I next focused on Rab-18. I demonstrated that Rab-18 is associated with membrane traffic of NCR-1, a cholesterol transporter, expressed in intestine. Thereby, Rab-18 is relevant to regulation of larval development/diapause.

研究分野：分子生物学・生物有機化学

キーワード：線虫*C. elegans* 腸ペプチド インスリン 分泌制御 幼虫休眠 コレステロールトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は、モデル生物・線虫 *C. elegans* を用い、インスリン様ペプチドを基軸とした休眠・寿命制御機構に関する研究を展開してきた (河野 強 化学と生物 2017)。休眠・延命を促進するインスリン様ペプチドを世界に先駆けて発見したこと (Kawano et al. BBRC 2000; Matsunaga, Kawano et al. BBRC 2012) を契機に、休眠・寿命を制御する多数のインスリン様ペプチドを同定し、その機能解析を行った。このうち、微小重量に応答して寿命を制御する INS-35 (Honda, Kawano et al. Sci. Rep. 2012) は、(1) 主に腸で産生されること、(2) 幼虫時の生育環境 (餌・フェロモン量) に応答して可逆的に分泌方向を基底膜側 (擬体腔) / 頂端側 (腸管内腔) に変動させること、(3) 通常生育/休眠のスイッチングに関与すること、などを明らかにした (Matsunaga, Kawano et al. Nat. Commun. 2016)。本新発見の概略図を下に示す。



2. 研究の目的

上述の背景の下、本研究では、個体モデルを用いて腸ペプチド・タンパクの分泌極性制御因子を探索し、その機能解析を行うことを通じて、未知なる腸ペプチド・タンパクの分泌制御機構を明らかにすることを目的とした。将来的には、本研究で得られた知見を、ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞・オルガノイドを用いた細胞・組織レベルの研究、ならびに、マウスを用いた個体レベルの研究に展開することを視野に入れている。

3. 研究の方法

研究方法の概要は、以下の通りである。膜輸送の制御に関わる Rab ファミリータンパク (線虫 *C. elegans* では 31 種存在) に着目した。(1) 腸ペプチドであるインスリン INS-35 に緑色蛍光マーカー VENUS を連結した分泌極性検出モデルの構築、(2) 順・逆遺伝学的手法による蛍光インスリン分泌極性を制御する遺伝子の同定、(3) 分泌制御遺伝子の機能解析 (時空間的発現パターン・蛍光インスリンとの共局在性・幼虫生育/休眠の制御) を行った。加えて、Rab ファミリータンパクのうち、INS-35 の分泌制御を介さずに幼虫生育/休眠の制御に関与する Rab ファミリータンパクを探索し、その分子機構の解析を行った。

4. 研究成果

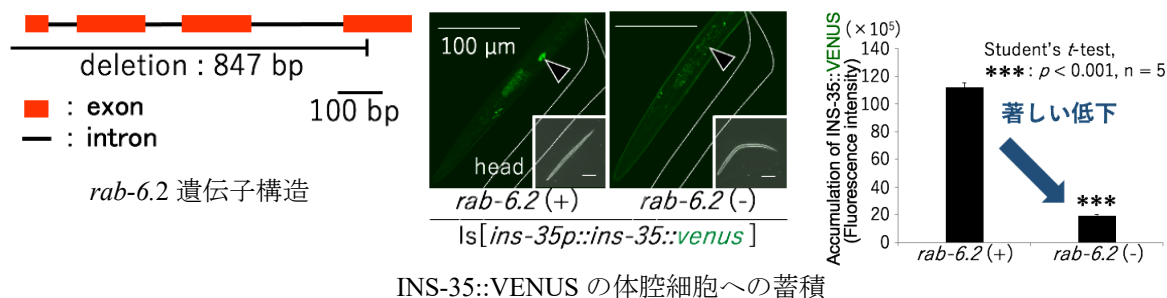
(1) 検定用線虫 (蛍光インスリン INS-35::VENUS 安定発現株) の作出

染色体外遺伝子として存在する蛍光遺伝子 *ins-35p::ins-35::venus* を染色体内に挿入し安定発現株を作出した。本株を用いて INS-35 の分泌制御に関わる Rab ファミリータンパクの探索 (RNAi スクリーニング) を行った。

(2) INS-35 の分泌制御に関わる Rab タンパクの探索・同定と分子遺伝学的解析

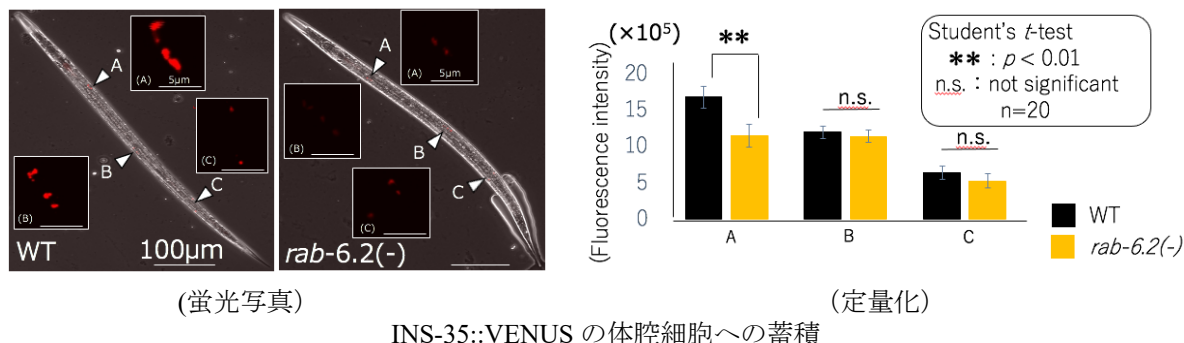
INS-35 の分泌 (INS-35::mRFP の体腔細胞への蓄積) 変動を指標として RNAi スクリーニングを行ったところ、Rab-6.2 が最も INS-35 の分泌を抑制した。そこで、本タンパクが INS-35 の分泌に関与することを証明するために、分子遺伝学的解析を行った。

*rab-6.2* 遺伝子破壊による INS-35 の分泌変動を解析した。(下図)



*rab-6.2* 遺伝子破壊により INS-35::VENUS の体腔細胞への蓄積 (INS-35 の分泌) が著しく低下したことから、Rab-6.2 が INS-35 の分泌を促進することが明らかとなった。このことは、INS-35::VENUS と Rab-6.2::mRFP が腸細胞内で共局在することからも支持された。

一方、*rab-6.2* 遺伝子破壊による休眠上昇率は *ins-35* 遺伝子破壊による休眠上昇率を超えていたことから、Rab-6.2 は他のインスリン様ペプチドの分泌制御に関与する可能性が示唆された。そこで、頭部神経細胞 ASI で産生され、幼虫生育/休眠制御に中心的な役割を果たす DAF-28 に着目した。Rab-6.2 存在下 (野生株)、非存在下 (*rab-6.2* 遺伝子破壊株) に於ける DAF-28 の分泌 (DAF-28::mCherry の体腔細胞への蓄積) 変動を検証した。



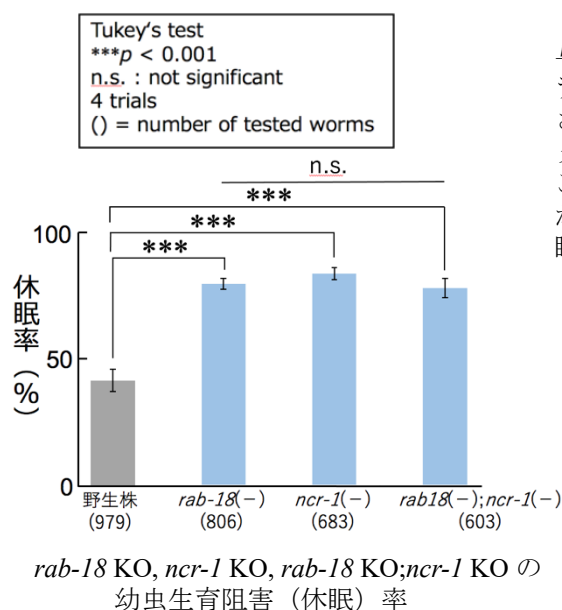
上図に示すように、*rab-6.2* 遺伝子破壊により DAF-28::mCherry の体腔細胞への蓄積 (DAF-28 の分泌) が低下したことから、Rab-6.2 は DAF-28 の分泌制御を介して幼虫生育/休眠制御に関与することが明らかとなった。このことは、Rab-6.2::mRFP が DAF-28 産生細胞である ASI でも発現することからも支持される。

以上をまとめると、Rab-6.2 は腸で産生される INS-35 の分泌のみならず、頭部神経細胞 ASI で産生される DAF-28 の分泌制御を介して、幼虫生育/休眠の制御に関与することが明らかとなった。Rab-6.2 が腸ならびに頭部神経細胞において、インスリン様分子の分泌制御に関与することは非常に興味深い。ヒトにおいて RAB-6 がインスリン様ペプチドの分泌制御に関与する、との報告はない。

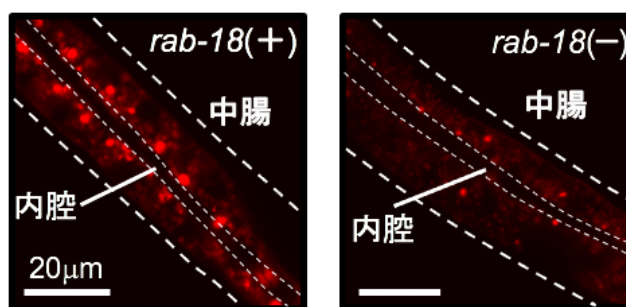
### (3) 幼虫生育/休眠の制御に関わる他の Rab タンパクの探索・同定と分子遺伝学的解析

INS-35 の分泌 (INS-35::VENUS の体腔細胞への蓄積) 変動を指標として RNAi スクリーニングに加えて、幼虫生育/休眠の変動を指標とした RNAi スクリーニングを行った。Rab-18 RNAi は著しい休眠上昇を示すが、INS-35 の分泌には関与しなかった。Rab-18 変異はヒトではワールブルグ・マイクロ症候群の原因となることから、Rab-18 を対象とした分子遺伝学的解析を行うこととした。

分子遺伝学的解析により、Rab-18 はインスリン様シグナルの下流に位置するステロイドホルモンシグナルに関与することが明らかとなった。また、腸特異的 RNAi により Rab-18 の作用点は腸であることが明らかとなった。そこで、ステロイドホルモン *dafacronic acid* の原料となるコレステロール輸送体 NCR-1 に着目した。エピスタシス解析により、*rab-18* の作用点は *ncr-1* であることが明らかとなった。(下図)

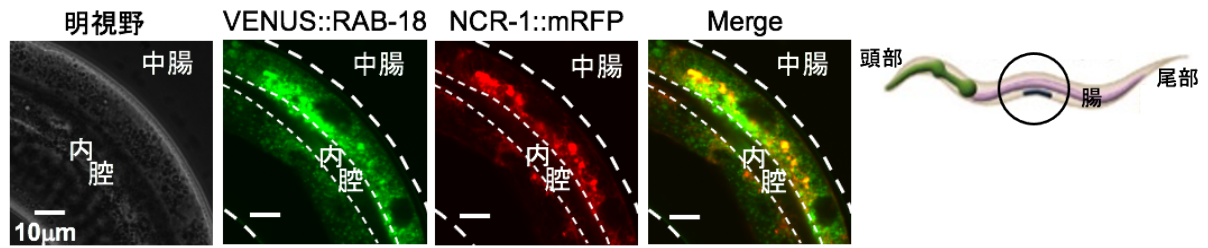


そこで、RAB-18 が NCR-1 の頂端側への膜輸送に関与するのかが検証した。腸で発現するコレステロールトランスporter-NCR-1 は頂端側 (腸管内腔側) に膜輸送されるが、*rab-18* 欠損では頂端側への膜輸送が、*rab-18* 欠損では頂端側への膜輸送が著しく阻害された。(下図) このことから、Rab-18 は NCR-1 の膜輸送に関与し、腸管からのコレステロール吸収の制御を介して、幼虫生育/休眠制御に関与すると結論づけた。



Rab-18 欠損による腸コレステロールトランスporter-NCR-1 の頂端側への輸送不全

このことは、VENUS::RAB-18 と NCR-1::mRFP が腸細胞内で共局在することからも支持された。(下図)



以上をまとめると、腸で機能する RAB-18 はコレステロールトランスポーターNCR-1 の頂端側への膜輸送を制御し、ステロイドホルモン *dafachronic acid* の生合成に関与することを介して幼虫生育/休眠制御に関与することが明らかとなった。NCR-1 はヒト小腸で発現するコレステロールトランスポーターNPC1L1 のホモログであり、NPC1L1 の膜輸送がヒト RAB-18 によって制御されるのかが、非常に興味深い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bito T, Okamoto N, Otsuka K, Yabuta Y, Arima J, Kawano T, Watanabe F.	4. 巻 192
2. 論文標題 Involvement of Spermidine in the Reduced Lifespan of <i>Caenorhabditis elegans</i> During Vitamin B12 Deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo9090192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ono M, Arai C, Kunimatsu Y, Hori Y, Matsunaga Y, Iwasaki T, Kawano T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Regulatory mechanism fo larval diapause by a <i>C. elegans</i> neuropeptide, FLP-6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science 2020	6. 最初と最後の頁 157-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野真弘、松下健二郎、松永洋平、岩崎 崇、河野 強
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド受容体 NPR-15 の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野真弘、荒井千佳子、堀結佳、松永洋平、美藤友博、岩崎 崇、河野 強
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-6 の機能解析
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 皆木友花、粟津利邦、松浦雅実、岩崎 崇、河野 強
2. 発表標題 線虫C. elegansの幼虫休眠を制御するRabファミリータンパクRab-18の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 影山なつみ、松永洋平、国松友香、岩崎 崇、河野 強
2. 発表標題 線虫C. elegansの幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-2の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部 合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野真弘、松永洋平、岩崎 崇、河野 強
2. 発表標題 線虫C. elegansの幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド受容体の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部 合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野真弘、松永洋平、美藤友博、岩崎 崇、河野 強
2. 発表標題 線虫C. elegansの幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド受容体FRPR-4の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長澤 守、大西潤実、松永洋平、岩崎 崇、河野 強
2. 発表標題 インスリン様分子の分泌制御を介して線虫の生育/休眠を制御するRab familyタンパクについて
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 強
2. 発表標題 線虫C. elegansのインスリン様ペプチドから動物界を俯瞰する
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関