

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570170

研究課題名（和文）線虫の個体の大きさ制御の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for the control of body size in the nematode

研究代表者

大島 靖美（OHSHIMA YASUMI）

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：90037606

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究成果の概要：我々は、以前、変異により線虫 *C. elegans* を大型化する遺伝子 *egl-4* が G キナーゼを、小型化する遺伝子 *sma-5* が MAP キナーゼをコードすることを明らかにしたが、不明であったこれらの基質その他の信号伝達経路を明らかにすることを主な目的とした。酵母ツーハイブリッド系によるスクリーニングの結果、EGL-4 及び SMA-5 と相互作用する因子をそれぞれ 6 種類及び 2 種類同定した。前者の 3 つ（DRN-1、C52B9.4、COL-167）の変異体の体積は野生型より有意に小さく、これらが大きさの制御に関与することが示唆される。種々の発現系を検討した結果、カイコ抽出液を用いる試験管内翻訳系により、全長の EGL-4 タンパク質の発現、精製に成功した。これを用いて、タンパク質リン酸化活性の証明、基質の探索を行う予定である。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：発生・分化、シグナル伝達、遺伝子、体の大きさ、線虫、G キナーゼ、MAP キナーゼ、変異体

1. 研究開始当初の背景

動植物を問わず、生物の個体や器官の大きさは種によって大きく異なり、生物の重要な特性である。例えば、哺乳動物、高等植物においてその最大の種と最小の種との重さや体積の比は、いずれも 1 千万倍以上に達する。動物においては、その大きさは代謝速度、寿命、運動速度、体の構造、生態的地位などとも関連する。しかし、個体や器官の大きさの決定や制御の機構の全体像はどの生物についても不明である。多細

胞生物の個体、器官の大きさは、基本的にそれを構成する細胞の数と大きさによって決定される。例えば、ヒトの体重はマウスの約 3000 倍であり、これはほぼ細胞数の違いによるが、その機構は全く不明である。植物の成長においては、細胞の伸長・大型化も重要である。個体の大きさの要因は、一般的に、1) 年令または日令、2) 栄養、温度などの環境、3) 遺伝的要因の 3 つに大別される。昔から、人類は家畜、農作物、花等について、選抜や交配によって優

れた、多様な品種を作り出し、利用して来たが、大きさはその重要な要因の一つである。生物の大きさの制御機構が分子レベルで研究されるようになったのはわずか10年余り前であり、その機構は未だに大部分不明であるが、今後重要な研究分野となると予測される。またその結果は、再生医療などの医学や有用品種の作成などの重要な応用に結びつくと考えられる。

このような情勢を背景として、本研究代表者は、優れたモデル生物である線虫 *C. elegans* を材料として、その個体・器官・細胞の大きさの制御機構について独創的な研究を行って来た。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究を更に発展させるために、以下を大きな目的として研究を行う。

- (1) 変異により大型化するEGL-4 Gキナーゼの信号伝達経路の解明
- (2) 変異により小型化するSMA-5 MAPキナーゼの機能と信号伝達経路の解明
- (3) 新たな大型変異体の分離とその原因遺伝子の解明

3. 研究の方法

(1) 酵母のツーハイブリッド法により、EGL-4 または SMA-5 タンパク質と相互作用する因子を同定する。

(2) (1)によって同定された、EGL-4に関連する可能性のある因子につき、突然変異体 (mutant) を *Caenorhabditis Genetics Center*, またはノックアウト変異体を系統的に作成している三谷昌平氏から入手する。これらの変異体の各々につきその大きさの表現型を調べ、各因子が大きさの調節に関与する可能性を調べる。

(3) (2)の各変異と *egl-4* 変異との二重変異体につき、その大きさの表現型を調べ、EGL-4 と遺伝学的に (*in vivo* で) 関連する因子を同定する。即ち、単独変異体が小型であり、*egl-4* との二重変異体も小型 (*egl-4* 大型変異を抑制する) であれば、その遺伝子は実際 *egl-4* 遺伝子の下流で働く と推定される。また、単独変異体が大型であり、二重変異体と同じ程度に大型であれば、その遺伝子は *egl-4* 遺伝子と同じ経路中のど

こかで働くと推定される。

(4) (1)によって同定された因子と EGL-4 を大腸菌で発現させ、両者が直接結合するか否かを *in vitro* で調べる。

(5) EGL-4 の全長を大腸菌、酵母 *Pichia pastoris* 等で発現させ、その G キナーゼとしての活性を確認する。また、同様に発現させた基質候補を用い、*in vitro* でのリン酸化を調べる。基質候補としては、DBL-1/TGF β 経路の既知の因子の中で、G キナーゼでリン酸化される可能性の高い配列を持つ DBL-1 及び SMA-2、及び酵母のツーハイブリッド法により、EGL-4 と相互作用することが同定された因子を用いる。

(6) 変異原 EMS を用いる方法に比べ、格段に原因遺伝子の同定が容易であると考えられる Mos1 トランスポゾン挿入による変異誘起を用い、新たな大型変異体を分離、解析する。

(7) SMA-5 に関して、可能であれば、(2)~(5) と同様に解析する。

4. 研究成果

(1) 酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより EGL-4 と相互作用するタンパク質として、Rasホモログ (DRN-1)、七回膜貫通タンパク質 (C52B9.4)、輸送タンパク質 Sec61 α サブユニットホモログ (Y57G11C.15)、CDPジグリセリド合成酵素ホモログ (C33H5.18)、コラーゲンタンパク質 (COL-167) 及び機能未知のタンパク質 (Y43F11C.15) を同定した。同様に、SMA-5 と相互作用する2つの因子 (卵黄タンパク質ピテロジェニン及びリボソームタンパクL22のホモログ) を同定した。

EGL-4にはPKGaとPKGbと呼ばれる2つの異型タンパク質の存在が知られており、PKGaの発現が線虫の体の大きさの制御のために重要であることがわかっている。酵母ツーハイブリッド系での相互作用解析において、6つのEGL-4結合タンパク質はPKGaとのみ結合性をもつことが示された。この結果から、glycine-rich domainを含むEGL-4のN末端付近の領域が結合に必要であることが示される。

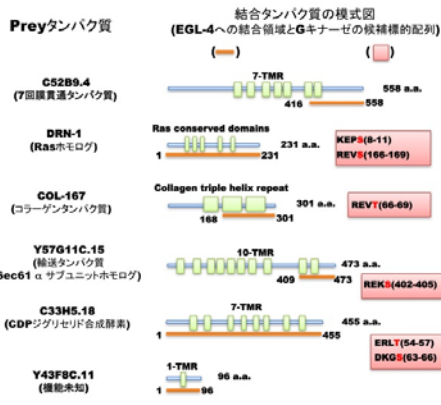


図1. 酵母内でEGL-4に結合したタンパク質

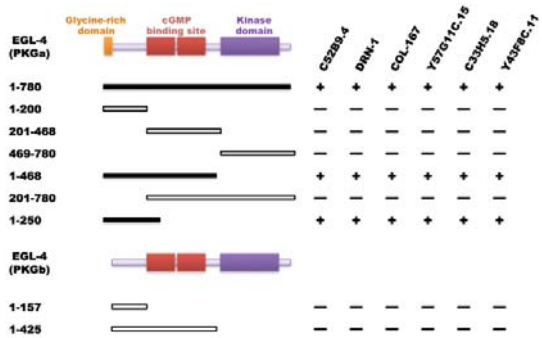


図2. EGL-4結合タンパク質はEGL-4のN末端領域に特異的に結合する。

(2) DRN-1, C52B9.4, COL-167の変異体は、いずれも成虫の体積が野生型より有意に小さいことを明らかにした。この結果は、これらの因子が大きさの制御に関与することを示唆する。

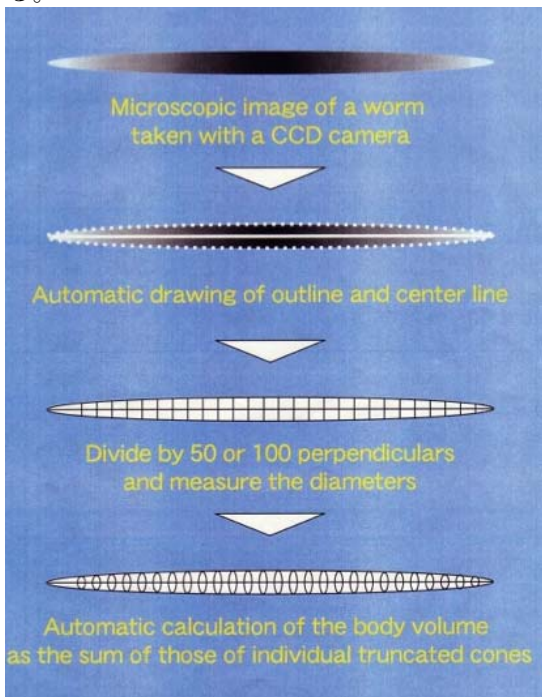


図3. 線虫の体長・直径・体積の自動的測定法

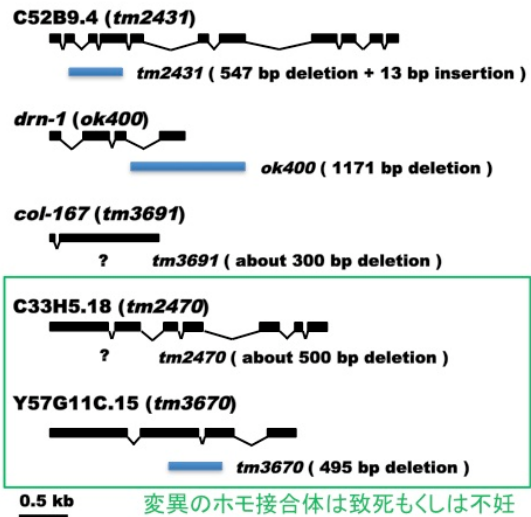


図4. EGL-4結合タンパク質の変異

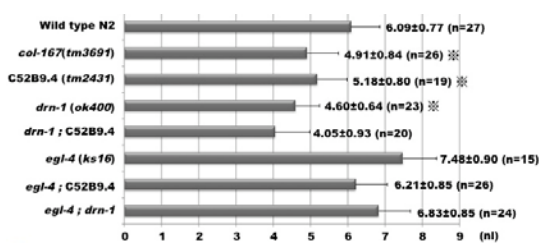


図5. EGL-4結合タンパク質の変異体及び二重変異体の体積の測定結果

(3) *drn-1*, C52B9.4のそれぞれと *egl-4* との二重変異体の大きさは単独変異体の大きさの中間の値を示した。この結果は、DRN-1, C52B9.4 と EGL-4 が独立に大きさを制御することを示唆するが、更に検討が必要である。

(4) DRN-1, C52B9.4, COL-167, Y57G11C.15, Y43F8C.11の各々と MBP (maltose binding protein) との融合タンパク質を大腸菌で発現させた。今後、EGL-4 またはその断片との直接的結合を in vitro で調べる。

(5) 大腸菌、酵母 *Pichia pastoris* においては、いずれも全長の EGL-4 を可溶性タンパク質として発現させることができなかった。カイコ抽出液を用いる試験管内翻訳系により、全長の EGL-4 タンパク質の発現、FLAG タグによる精製に成功した。これを用いて、タンパク質リン酸化活性の証明、基質の探索を行う予定である。酵母 *S. cerevisiae* で発現したものについては、精製がうまくいかなかったが、今後更に検討する価値がある。

(6) 原因遺伝子の同定が EMS 変異誘導よりも容易な、Mos1 トランスポゾンによる変異誘導法を用い、野生型より体積が有意に大きい変異体4株を分離した。

そのうちのより大きい2株について調べたが、Mos1が検出されず、原因遺伝子の同定ができなかった。

(7) SMA-5に関して、(2)~(5)と同様な解析は行っていない。

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)

[学会発表] (計2件)

①宗修平、Control of body size by a TGFβ signal pathway and a G-kinase in *C. elegans*, OIST International Workshop on Gradient and Signalling, 2008年11月20日、沖縄県Okinawa Institute of Science & Technology

②宗修平、線虫 *C. elegans* の TGFβ シグナル伝達経路と G キナーゼによる体の大きさの調節、第31回日本分子生物学会年会、2008年12月9日、神戸市神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 靖美 (OHSHIMA YASUMI)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：90037606

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし