

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580112

研究課題名(和文) 線虫が分泌する延命誘導物質に関する化学生物学的研究

研究課題名(英文) Chemical Biology of lifespan-extending substrates secreted by the nematode *Caenorhabditis 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

研究成果の概要(和文)：線虫が分泌する延命誘導物質によって発現が変動するインスリン様遺伝子として *ins-6*, *ins-12*, *ins-35* を同定した。遺伝子破壊線虫を用いた機能解析により、*ins-6* は延命抑制に *ins-12* は延命誘導に寄与すること、また、*ins-35* は成虫寿命の制御には寄与せず、幼虫休眠を著しく抑制することを明らかにした。加えて、*ins-35* の時空間的発現パターンを解析し、寿命・休眠制御との関連づけを行った。

研究成果の概要(英文)：I have identified *Caenorhabditis elegans* insulin-like genes *ins-6*, *ins-12*, and *ins-35*. Expression of these genes was regulated by lifespan-extending substances secreted by *C. elegans*. Gene-disruption revealed that *ins-6* and *ins-12* were relevant to regulation of lifespan. In contrast, *ins-35* was largely relevant to regulation of larval diapause not adult lifespan. In addition, analyses of expression patterns of *ins-35* allowed me to understand the physiological function of the gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：寿命, 休眠, インスリン, 線虫, 発現制御

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン様シグナルによる寿命制御

線虫 *Caenorhabditis elegans* のインスリン受容体様遺伝子 *daf-2* の変異が成虫寿命を2倍に延長するとの報告以降、キイロショウジョウバエおよびマウスにおいてもインスリン様シグナルが寿命を制御することが明らかにされた。現在、インスリン様シグナルによる寿命制御は動物種に共通の機構であると考えられている。また、線虫のインスリン様

シグナルは幼虫休眠を制御することが知られている。

(2) 線虫 *C. elegans* のインスリン様遺伝子

報告者は *C. elegans* の唯一のインスリン受容体様タンパク DAF-2 のリガンド探索を行い、世界に先駆けてインスリン様ペプチド Ceinsulin-1 (INS-18)などを同定し、寿命制御への関与を検証した。一方、ゲノムプロジェクトの終焉を契機に多数のインスリン様遺伝子の存在(現在40種)が示唆され、予想され

るジスルフィド結合様式により α , β , γ の3タイプに分類される。 β , γ は哺乳動物のインスリン族ペプチドと同様のジスルフィド結合様式を有する。このうち、その生理機能が明らかにされたものは *daf-28*, *ins-1*, *ins-7* (Type- β)ならびに *ins-18* (Type- γ)のみである。

(3) 線虫が分泌する延命誘導物質

報告者は世界に先駆けて *C. elegans* の分泌物中に延命誘導活性を見出した。インスリン様シグナル下流に位置する転写因子 DAF-16 の機能抑制を行った場合、この延命誘導活性が消失することから、インスリン様シグナル依存的な延命であると判断した。実際に、延命誘導物質により INS-18 の発現量・発現部位が変動することから、延命誘導物質が寿命を制御する種々のインスリン様分子の発現を制御する可能性に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、環境因子である延命誘導物質による種々のインスリン様分子(寿命制御因子)の発現制御を解析することを通じて、寿命制御における「入力機構」の全容解明に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 延命誘導物質により発現制御を受けるインスリン様遺伝子を同定した。40種のインスリン様遺伝子をドットしたマクロアレイを作製し、延命誘導物質処理・未処理の線虫より mRNA を調製し、それぞれ Cys3 ならびに Cys5 で標識した後、ハイブリダイゼーションを実施した。

(2) 発現量に変動があったインスリン様遺伝子の寿命制御への関与を RNA 干渉法ならびに遺伝子破壊線虫を用いて検証した。RNA 干渉には feeding 法を採用した。また、UV/TMS 法により作製した遺伝子破壊線虫を戻し交雑により純化した。寿命測定を行い、成虫寿命の変動を解析した。

(3) レポーター遺伝子を導入した線虫を用い、各生育段階ならびに延命誘導時の上記インスリン様分子の発現変動を解析した。上流約 3kb を含む各インスリン様遺伝子を増幅し、発現解析様ベクター pPD-Venus に導入した。マイクロインジェクション法を用いて遺伝子導入線虫を作成し、蛍光顕微鏡下で GFP 蛍光を観察することにより各インスリン様遺伝子の発現変動を観察した。

4. 研究成果

(1) 延命誘導物質により発現変動するインスリン様遺伝子

マクロアレイを用いて発現量が発現変動するインスリン様遺伝子をサーチしたところ、*ins-7* (Type- β)、*ins-18* (Type- γ) に加えて、*ins-6* (Type- β)、*ins-12* (Type- γ)、*ins-35* (Type- α)を同

定した。*ins-6* は分子系統樹上 *ins-7* と酷似しており、同一の生理機能(欠失した場合の幼虫休眠誘導・成虫寿命延長)が期待できた。

(2) 各インスリン様遺伝子の寿命への関与

延命誘導物質によって発現量が発現変動する *ins-6*, *ins-12*, *ins-35* を標的とした RNAi を実施し、寿命の変動を観察した。*ins-6* に対する RNAi は寿命延長をもたらした。*ins-12* に対する RNAi は僅かな寿命短縮をもたらした。*ins-35* に対する RNAi では寿命変動が認められなかった。より明確な表現型を観察するために遺伝子破壊線虫を入手し、戻し交雑により不要な変異を排除した後、表現型の観察を行った。*ins-6* 破壊線虫は明確な延命を示した。*ins-12* 破壊線虫は僅かながらの寿命短縮を示した。そこで、延命誘導条件下 (*ins-7* 破壊)における *ins-12* 破壊の影響を検証したところ、*ins-7* 破壊による寿命延長が消失した。また、*ins-35* 破壊線虫は寿命の変動を示さなかった。さらに、各遺伝子破壊の幼虫休眠に対する影響を検証した。休眠誘導条件下(線虫培養液より粗精製したものを添加)において、各遺伝子破壊線虫の休眠率を測定したところ、*ins-12* 破壊は休眠率の低下を示した。一方、*ins-6* 破壊は休眠率の変動を殆ど示さなかった。極めて興味深いことに、*ins-35* 破壊は著しい休眠率の上昇を示した。この休眠率上昇は *ins-7* 破壊によるものを遙かに凌駕していた。

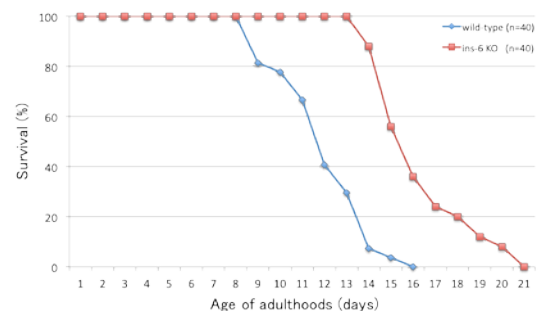


図1. *ins-6* 破壊は成虫寿命を延長させる

野生株ならびに遺伝子破壊線虫の4齢幼虫を FudR 添加培地(生殖細胞の分裂を阻害)上で培養し、寿命を測定した。横軸は生存日数を、縦軸は生存率を示す。n は被試験線虫数を示す。

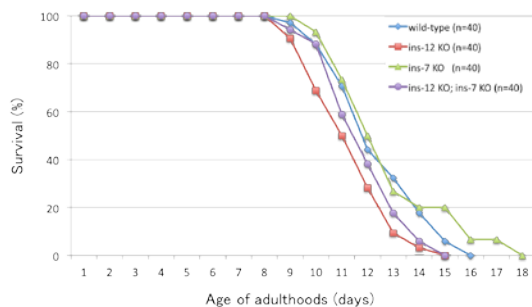


図2. *ins-12* 破壊は寿命延をキャンセルする

野生株、*ins-6* 破壊線虫、*ins-12* 破壊線虫、*ins-7*, *ins-12* 破壊線虫の寿命を測定した。

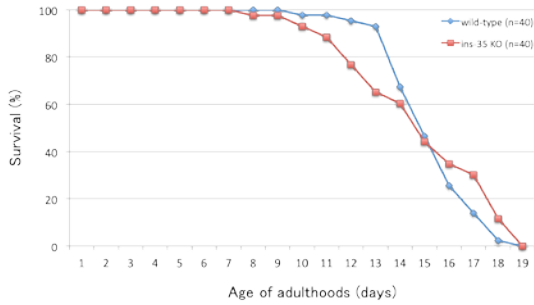


図3. *ins-35* 破壊は成虫寿命に影響しない
野生株ならびに遺伝子破壊線虫の寿命を測定した。

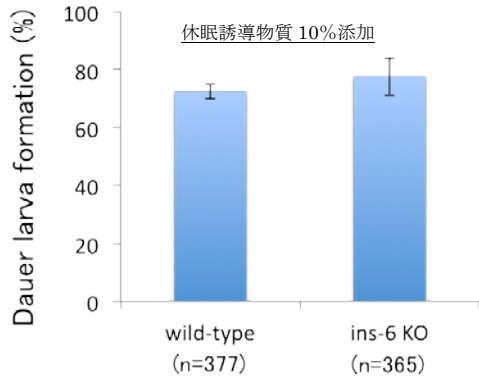


図4. *ins-6* 破壊は幼虫休眠に殆ど影響しない
休眠誘導物質を添加して培地上で野生株ならびに遺伝子破壊線虫の孵化後の線虫を培養し、休眠幼虫(dauer larva)の数を測定した。nは被試験線虫数を示す。

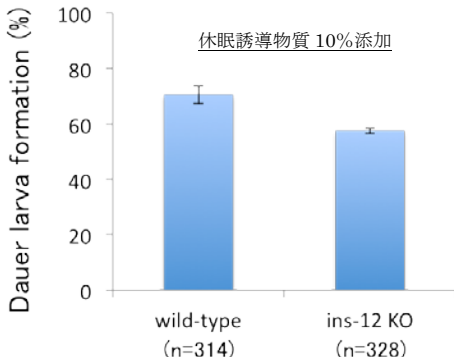


図5. *ins-12* 破壊は幼虫休眠を抑制する

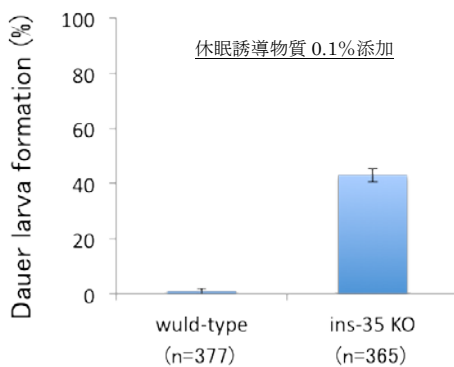


図6. *ins-35* 破壊は幼虫休眠を大幅に促進する

以上の結果と考察を下にまとめる。

- *ins-6* は寿命制御のみに関与する。遺伝子破壊により成虫寿命の延長が認められたことから、INS-6 はインスリン様シグナルを亢進するとアゴニストとして機能すると推定した。分子系統樹上極めて近い *ins-7* が成虫寿命・幼虫休眠の両方に寄与することに対し、*ins-6* が成虫寿命のみに寄与することは極めて興味深い。

- *ins-12* は寿命制御・休眠制御の両方に関与する。遺伝子破壊により延命条件下での寿命延長がほぼ消失したこと、休眠誘導条件下での休眠率が低下したことから、INS-12 はインスリン様シグナルを抑制するアンタゴニストとして機能すると推定した。アンタゴニストとして機能する INS-12, INS-18 が共に Type- γ に属することは極めて興味深い。

- *ins-35* は休眠制御のみに関与する。遺伝子破壊により休眠誘導条件下での休眠率が著しく上昇したことから、INS-35 はインスリン様シグナルを亢進するとアゴニストとして機能すると推定した。また、線虫のインスリン様ペプチドの中では最強のアゴニストであると考えられる。Type- α に属する *insu1n* 様遺伝子が休眠を制御するという知見が得られたのはこれが最初である。

(3) 各インスリン様遺伝子の発現パターンの解析

遺伝子破壊により大幅な休眠率上昇を示した *ins-35* の発現パターンを解析した。

ins-35 は未受精卵において僅かながら発現しており、幼虫期には腸の先端部分で強く発現していた。また、咽頭筋周辺の細胞における発現も認められた。さらに、尾部の腸の先端部分でも弱い発現が認められた。

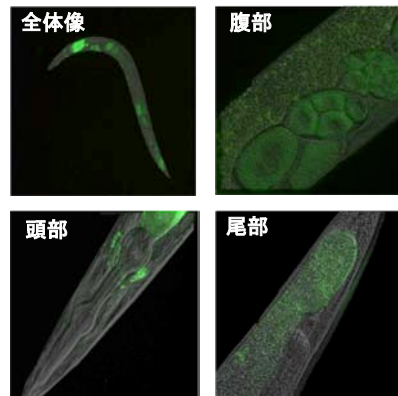


図7. INS-35::VENUS の発現
蛍光微分干渉顕微鏡にて観察した。

また、幼虫休眠時ならびに復帰時の発現変動を観察したところ、腸先端部分の発現変動は殆ど認められなかったが、頭部咽頭筋周辺の発現変動が認められた。すなわち、休眠時

には認められなかった発現が休眠からの復帰時に認められるようになった。

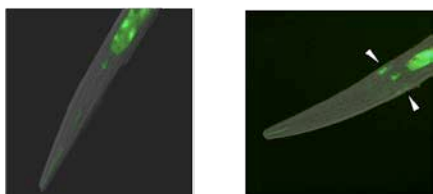


図8. 幼虫休眠期に於ける INS-35::VENUS の発現
左が幼虫休眠期、右が休眠からの復帰時の発現。矢先は
復帰時のみに発現が認められる咽頭筋周辺の細胞を示
す。蛍光微分干渉顕微鏡にて観察した。

以上のことから、咽頭筋周辺の細胞で発現
する INS-35 が幼虫休眠を抑制し、また、幼
虫休眠からの復帰を促進すると考えられる。

現在、構築済みの遺伝子組換え線虫を用い
て INS-6::VENUS ならびに INS-12::VENUS の
発現解析を検討中である。

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 3 件)

- ① Gouda K, Matsunaga Y, Iwasaki T,
and Kawano T, An altered method of feeding
RNAi that knocks down multiple genes
simultaneously in the nematode
Caenorhabditis elegans. *Biosci. Biotechnol.*
Biochem., **74**, 2361-2365, (2010). (査読有)
- ② Matsunaga Y, Ito H, and Kawano T,
Physiological function of INS-12, one of the
Type- γ insulin-like peptides, in *C. elegans*.
Peptide Science, 459-462, (2010). (査読有)
- ③ Yonezawa Y, Kimura Y, and Kawano T,
Physiological function of type- β insulin-like
genes in *C. elegans*. *Peptide Science*, 525-528,
(2008). (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 片山侑希、阪本晃市、河野佳世、松永洋平、岩
崎崇、河野 強 線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制
御するインスリン様ペプチド INS-35 日本農芸
化学会 2011 年度大会 (京都) 2011.3.28
- ② 松永洋平、玄行・安藤恵子、三谷昌平、岩崎崇、
河野 強 線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプ
チド INS-18 の発現制御機構 日本農芸化学会
2011 年度大会 (京都) 2011.3.28
- ③ Yohei Matsunaga, Keiko Gengyo-Ando,
Shohei Mitani, Takashi Iwasaki,
and Tsuyoshi Kawano An approach to
elucidate crosstalk between TGF- β and

insulin/IGF-I signaling in *Caenorhabditis*
elegans. 4 th East Asia *C. elegans* Meeting
(Tokyo, Japan) 2010.6.13

- ④ Yukari Omichi, Kenji Gouda, Takashi
Iwasaki, and Tsuyoshi Kawano Analysis of a
new pathway regulating larval diapause in
Caenorhabditis elegans. 4th East Asia *C.*
elegans Meeting (Tokyo, Japan) 2010.6.12
- ⑤ 松永洋平、伊藤弘子、河野 強 線虫 *C.*
elegans の type- γ インスリン様ペプチドで
ある INS-12 の生理学的機能 第 46 回ペプ
チド討論会 (北九州) 2009.11.5
- ⑥ Yohei Matsunaga, Keiko Gengyo-Ando,
Shohei Mitani, and Tsuyoshi Kawano
Expression mechanism of INS-18, one of the
insulin-like peptides, in *C. elegans*. 17th
International *C. elegans* Meeting (Los Angeles,
USA) 2009.6.26
- ⑦ 松永洋平、安藤-玄行恵子、三谷昌平、河野
強 線虫の休眠・寿命を制御するインスリ
ン様ペプチド 日本農芸化学会 2009 年度大
会 (福岡) 2009.3.28
- ⑧ 合田健司、河野 強 線虫 *C. elegans* にお
ける簡便な三重遺伝子機能抑制法 第 31
回日本分子生物学会年会 (神戸)
2008.12.10
- ⑨ 松永洋平、安藤-玄行恵子、三谷昌平、河野
強 線虫の休眠・寿命を制御するインスリ
ン様ペプチド INS-18 の発現調節機構 第
45 回ペプチド討論会 (東京) 2008.10.29

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ネコブセンチュウ pos-1 遺伝子、及び
その遺伝子発現制御によるネコブセンチュ
ウ防除方法

発明者: 河野 強

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2009-23607

出願年月日: 平成 21 年 10 月 13 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/kawano/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：