

平成22年 5月29日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20770097
研究課題名(和文) 線虫を用いた個体発生とエネルギー恒常性をリンクする鍵因子群の解析
研究課題名(英文) Genetic screening for key factors that link development and energy homeostasis using *C. elegans*
研究代表者
福山 征光(MASAMITSU FUKUYAMA)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：20422389

研究成果の概要(和文)：

我々ヒトを含めて動物は、栄養状態に応じて手足や胴体など各々の体の部位がバランスよく成長する性質を持っており、その成長調節機能の破綻は腫瘍などの病態に関連があると考えられているが、どのような遺伝子が栄養に応答した成長調節機能に関わっているか未知の部分が多い。本研究ではインスリン/インスリン様成長因子や、アミノ酸を感知する Rag という遺伝子産物が栄養の有無を感知し、各組織の成長を協調的に司る可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：

Animal development is greatly influenced by nutrient status, and growth of each organ is precisely coordinated according to the body size. Although derangement of nutrient-dependent growth is thought to be associated with tumorigenesis, the mechanism that links development with nutrient status remains elusive. In this study, I have obtained several findings which suggest that genetic products called insulin/insulin-like growth factors and Rag play an important role in coordinating development with nutritional conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

多細胞動物において、栄養状態に応じて個体の成長とエネルギー恒常性を協調的に調節することは生存に必須の生命活動である。例えば、人間を含む多くの動物は貧栄養状態に応答して、個体の矮小化や成長・性成熟などを遅滞させるだけでなく、寿命を延ばすこともある。また、エネルギー恒常性の破綻は、糖尿病や循環器疾患に深く関連している。近年、個体レベルにおいて発生とエネルギー恒常性を協調的に制御する重要なシグナル伝達経路として、インスリン/IGF 経路（以下「IIS 経路」）と AMPK (5' -AMP activated protein kinase) 経路が注目されるようになった。これらの経路は主に培養細胞を用いた研究より、細胞分裂や細胞成長、それに糖や脂質代謝への関与は示唆されてきたが、最近の *C.エレガンス*（以下「線虫」）やショウジョウバエ、マウスを用いた個体に着目したアプローチにより、IIS 経路による寿命の制御などの新たな生理的機能や、AMP だけでなくレプチンなどのホルモンが AMPK 活性を調節する知見が報告されたりと、依然としてその個体における機能と上流や下流のシグナル伝達系については未知な部分が多い。

2. 研究の目的

IIS 経路と AMPK 経路が線虫の飢餓時の生存維持と発生制御に重要な役割を果たす知見を基盤として、両経路が上流や下流シグナル伝達系とクロストークし、エネルギー恒常性維持と発生を協調的に調節する遺伝学的経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *daf-18/PTEN*, *daf-16/FOXO*, *aak-1, 2/AMPK* 変異体において異常な飢餓応答の解明：オートファジーや脂肪滴の GFP マーカー、ブドウ糖やトリグリセリドなどの代謝中間体の測定、および代謝酵素の発現や局在をモニターすることにより探索する。

(2) *daf-18/PTEN*, *daf-16/FOXO*, *aak-1, 2/AMPK* の機能している組織の同定：組織特異的プロモーターを用いて変異体内に野生型遺伝子を特定組織で発現させ、表現型の救助を評価したり、抗リン酸化抗体を作製し IIS 経路や AMPK 経路の飢餓時・摂食時における活性の揺らぎを解析することにより、どの組織で両経路が個体レベルでのエネルギー恒常性維持と発生を制御しているか明らかにする。

(3) Rheb-TOR-S6K 経路が IIS 経路と AMPK 経路の下流で働き個体レベルでのエネルギー恒

常性維持と発生を制御しているかの検討：培養細胞実験系より、Rheb-TOR-S6K 経路は IIS 経路によって活性化され、AMPK 経路によって不活性化されていると考えられているが、その *in vivo* での生理学的意義はよくわかっていない。そこで、Rheb-TOR-S6K 経路が個体レベルでのエネルギー恒常性維持と発生を制御しているか、そして IIS 経路と AMPK 経路の下流で機能しているかを遺伝学的に評価する。また強制発現による表現型評価も行う。さらに哺乳動物実験系で TOR 経路の活性をモニターするのによく使われる S6K の抗リン酸化抗体を線虫の S6K のリン酸化ペプチドを用いて作製し、L1 飢餓と摂食時、野生株と *daf-18/PTEN*, *daf-16/FOXO*, *aak-1, 2/AMPK* 変異体と比較する。

(4) *daf-18/PTEN*, *daf-16/FOXO*, *aak-1, 2/AMPK* の下流で働く新奇遺伝子の同定と機能解析：*daf-18/PTEN*, *daf-16/FOXO*, *aak-1, 2/AMPK* 変異体は L1 飢餓時に生存率が著しく減少する（図 1）。そこでこの表現型を抑制する変異体をスクリーニングし、その変異体の原因遺伝子のクローニングと機能解析を行う。また、逆の表現型、すなわち野生株より L1 飢餓時に長生きする変異体などの探索を時間的余裕があれば行う。

4. 研究成果

平成 20 年度の研究において、IIS 経路に関しては *daf-18/PTEN* の変異体を用いた解析から、飢餓時において、表皮と腸の細胞で IIS 経路を抑制するのが恒常性の維持に非常に重要であることを示唆する結果を得た。また、*daf-18/PTEN* の変異体や *akt-1/AKT* の恒常活性化体を用いた研究より、表皮における IIS 経路の活性が、表皮や筋肉の幹細胞の発生プログラムの進行を制御することを示唆する結果を得た。AMPK に関しては、腸と神経系において何らかの飢餓応答を担うことを示唆する結果を得ている。現在、AMPK が感覚神経において、機能していることを示唆するデータを得ている。過去の大部分の AMPK に関する研究は、筋肉や脂肪組織などの末梢組織における生理機能を対象としており、神経での AMPK の研究はあまり例がない。興味深いことに、AMPK は感覚神経で機能することを示唆するデータを最近得ており、今後、どのような遺伝学的経路を介して、どのような飢餓応答を制御しているかを明らかにすることにより、AMPK の新たな生理機能を見いだすことができるかもしれない。

上述した平成 20 年度の研究では、表皮で発現しているインスリン/IGF 経路の因子であ

る *akt-1* が表皮の一部である神経芽細胞の栄養依存的な発生進行を仲介していることを示唆する知見を得た。平成 21 年度の研究ではその知見を基盤に、表皮で発現している恒常活性化体 *akt-1* が非細胞自律的に筋芽細胞の栄養依存的な発生進行も仲介していることを示唆する結果を得た。また、IIS 経路で機能する下流エフェクターの一つである蛋白質複合体 TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1) は、インスリン/IGF 刺激以外にもアミノ酸刺激によっても活性化されるが、その「アミノ酸シグナル」を仲介する G 蛋白質 Rag の線虫ホモログ (*raga-1* と *ragc-1*) も、表皮による神経芽細胞や筋芽細胞の栄養依存的な発生進行に関わることを示唆する知見を得た。TORC1 を活性化する「アミノ酸シグナル」は哺乳動物培養細胞を用いた実験系で、培地のアミノ酸飢餓と再添加によって認められることができるシグナル伝達であるが、そのような極端なアミノ酸濃度の変化が起こらない生体内でのアミノ酸シグナルの生理的意義は依存として未知の部分が多い。その観点から考えると、非細胞自律的な芽細胞の栄養依存的な発生進行の制御という Rag の生理機能を見出すことができたのは、本研究の重要な成果と捉えることができる。

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 1 件)

- ① 春日 秀文、福山 征光、紺谷 圏二、堅田 利明、アミノ酸シグナル伝達に介在する G タンパク質 Rag、細胞、査読無、第 42 巻 3 号、2010、pp20-23

[学会発表] (計 9 件)

- ① 福山 征光、佐久 健介、朴 梨瑛、下村 裕美、春日 秀文、Ann Rougvie、堅田 利明、The insulin/IGF signaling and Rag-mediated pathways couple nutrients and stem cell quiescence in *C. elegans*、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 12 日、横浜
- ② 春日 秀文、福山 征光、堅田 利明、線虫 *C. elegans* を用いた TOR 経路に関わる新規因子の探索と解析、ファーマ・バイオフォーラム 2009、2009 年 11 月 15 日、名古屋

屋

- ③ 福山 征光、下村 裕美、長屋 涼太郎、春日 秀文、田杭 靖丈、壺岐 和哉、伊藤 有佳子、梶保 博昭、紺谷 圏二、堅田 利明、アミノ酸シグナルにおける Rag の機能解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸
- ④ Fukuyama M, Sakuma K, Astumi Y, Shimomura H, Kasuga H, Rougvie A and Katada T、Distinct control of survival, and somatic and germline development during L1 diapause by the insulin/IGF signaling and AMPK pathway、17th International *C. elegans* Meeting、2009 年 6 月 26 日、米国ロスアンゼルス
- ⑤ 春日 秀文、福山 征光、堅田 利明；線虫 *C. elegans* を用いた TOR 経路の新規因子探索、文部科学省特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」「細胞情報ネットワークを統合する G 蛋白質シグナル研究の新展開」合同若手ワークショップ、2009 年 1 月 30 日、神戸
- ⑥ 佐久間 健介、朴 梨瑛、福山 征光、堅田 利明、線虫 *C. elegans* を用いた AMPK の各組織における飢餓応答の解明、第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会 BMB2008、2008 年 12 月 10 日、神戸
- ⑦ 長屋 涼太郎、福山 征光、堅田 利明；線虫 *C. elegans* を用いた TOR 経路で機能する新規因子の探索、ファーマ・バイオフォーラム 2008；2008 年 11 月 30 日、東京
- ⑧ 佐久間 健介、朴 梨瑛、福山 征光、堅田 利明、線虫 *C. elegans* を用いた AMPK の各組織における飢餓応答の解明、東京大学生命科学ネットワークシンポジウム 2008、2008 年 9 月 23 日、東京
- ⑨ 福山 征光、朴 梨瑛、渥美 由梨子、佐久間 健介、下村 裕美、長屋 涼太、紺谷 圏

二、堅田 利明、線虫を用いたインスリン
/IGF シグナル経路の研究、第7回生命科学
研究会、2008年5月29日、別府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 征光 (MASAMITSU FUKUYAMA)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：20422389

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者