

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650085

研究課題名(和文) ペプチドが制御する新たな器官形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of flp-10 that controls organogenesis in c.elegans

研究代表者

金 憲誠 (Kim, Hon-Song)

関西学院大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：70469899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：FMRFアミドおよびFaRPs(FMRFアミド関連ペプチド)は心臓調節、筋調節、痛覚、学習、接触など、多岐にわたる神経活動に関わっている神経ペプチドである。我々は線虫*C.elegans*を用いた遺伝学的スクリーニングによって、線虫FaRPをコードする*flp-10*遺伝子の欠損変異体の単離に成功し、それが生殖巣の形成異常を示すことを見出した。本研究ではFLP-10ペプチドのプロセッシング後の一部であるCペプチドがF1-F0 ATP合成酵素のサブユニットを介して器官に働きかけることで、正しい器官の形成を制御していることを明らかにした。器官の形成における神経ペプチドの新たな機能を提案する。

研究成果の概要(英文)：An FMRFamide has Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ in its carboxyl terminus. These peptides are known to be involved in regulation of neuronal activities. We found that the *C.elegans* FLP-10C peptide, a part of the proteolytic fragment of FMRFamide like peptide (FLP), controls tip cell migration of U-shaped gonads in *C.elegans*. This suggests a novel function of this peptide in regulating gonadogenesis. We identified a protein in the worm lysate specifically co-precipitated with the FLP-10C peptide in a pull-down assay using the biotinylated peptide. LC/MS/MS analysis revealed that the specific protein corresponded to the product of H28016.1. H28016.1 encodes the alpha subunit of mitochondrial ATP synthase. Interestingly, there are some reports that the mitochondrial ATP synthase is also expressed in the plasma membrane. These results suggest that H28016.1 could be the receptor for the FLP-10C peptide to regulate gonadogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官形成 細胞移動 神経ペプチド 線虫

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

FMRF アミドは C 末端側に Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ 構造を持つ、無脊椎動物が産生する神経ペプチドの一種として発見された。近年ヒトを含む脊椎動物などでも RF アミド構造を持つ神経ペプチドとして FaRPs (FMRF amide-related peptide) が存在することがわかり、心臓調節、筋調節、痛覚、学習、接触など、多岐にわたる神経活動に関わっていることが明らかになっている。

モデル生物である線虫 *C. elegans* にも FaRP をコードする *flp-10* 遺伝子が存在する。研究開始当初、申請者は線虫を用いた遺伝学的スクリーニングから生殖巣形成に異常を示す新規変異体として *flp-10(tk28)* 変異体の単離に成功していた (図 1)。

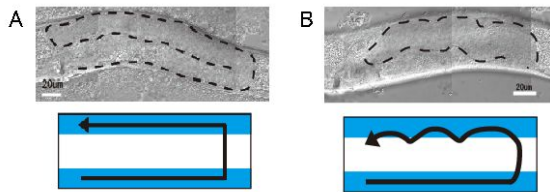


図 1. 野生型(A)および *flp-10(tk28)* 変異体(B)の生殖巣の形態。野生型(A)ではU字型の生殖巣が形成されるのに対して変異体(B)でのそれは形成異常を示す。

2. 研究の目的

線虫 *C. elegans* の U 字型の生殖巣は上皮チューブから成る器官で、その原基先端にある distal tip cell (DTC) と呼ばれるリーダー細胞が二度の方向転換を伴った U 字型の移動を行うことで形成される。この生殖巣形成過程をシンプルな器官形成のモデルとして捉え、FaRP の細胞移動および器官形成における新たな機能の理解を目指すという着想に至った。

FLP-10 および FaRP は前駆体として産生されたあと、プロセッシングによって 3 つのペプチド (A, B, C) に切断され、そのうち B ペプチドにアミド基が付加され、FLP ペプチドとして機能することがわかってきた (図 2)。切断後の RF 基を持たない A および C ペプチドは無機能の不要な断片として考えられていたが、驚いたことに *flp-10(tk28)* 変異体の生殖巣形成異常は FLP-10C ペプチドの発現によってのみ回復した。これは本来機能を持たないと考えられてきたペプチドが器官形成において機能しているということを示唆する決定的な証拠であった。そこで当該研究では線虫 *C. elegans* の生殖巣形成モデルを用いた解析を行うことで、細胞の移動および器官形成過程において RF 基を持たないプロセッシング後のペプチドが持つ新規機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FLP-10C ペプチドの機能解析

FLP-10C ペプチド発現部位の特定

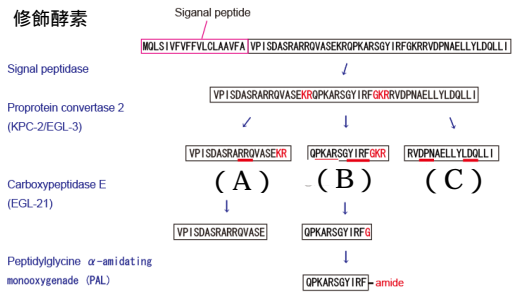


図 2. FLP-10 のプロセッシング経路。前駆体として産生された FLP-10 は修飾酵素による一連の修飾、切断を受けることで 3 つのペプチド断片 (A, B, C) へと切断されたのち、B ペプチドにアミド基が転移され FMRF アミドとして働く。

組織特異的プロモーターを用いた変異体表現型回復実験

(2) FLP-10C 受容体の同定

遺伝学的スクリーニングによる *flp-10* (*tk28*) 抑圧変異体の単離

生化学的アプローチ (免疫沈降法) による C ペプチド結合タンパク質の探索および同定

(3) FLP-10C と受容体候補分子の機能解析

受容体候補遺伝子 *H28016.1* の DTC における機能解析

H28016.1 のネガティブレギュレーターとしての FLP-10C の機能

4. 研究成果

(1) FLP-10C ペプチドの機能解析

FLP-10C ペプチド発現部位の特定

tk28 変異は *flp-10* 遺伝子の 4 塩基目のシトシン (C) がチミン (T) に変わっており、N 末端から 2 番目のグルタミン (CAA) がストップコドン (TAA) となる完全機能欠失変異体である。FLP-10C の発現場所を特定するために、N 末端側に GFP を付加した融合タンパク質 (GFP-FLP-10C) を作製し、*flp-10(tk28)* 変異体にマイクロインジェクションによって導入しトランスジェニック株を得た。この株は変異体の表現型をほぼ完全にレスキューしたため、GFP-FLP-10C 融合タンパク質は機能的であると判断した。発現した GFP-FLP-10C の蛍光を蛍光顕微鏡で観察したところ、頭部及び後ろ側の神経細胞で発現していることが分かった。また線虫体腔内に存在し、不要になった分泌タンパク質などを取り込み、分解する働きを持つスカベンジャー細胞 (セロモサイト) にも蛍光シグナルが検出されたことから、FLP-10C は神経細胞で産生されたのち体腔へと分泌していることが予想された。

組織特異的プロモーターを用いた変異体表現型回復実験

次に C ペプチドの異所発現によって *flp-10* (*tk28*) 変異体の生殖巣形成異常が回復しう

るのかということ、DTC、体壁筋、神経細胞（タッチニューロン）特異的プロモーターを用いて検証した。これらのプロモーターの下流にシグナルペプチドおよび GFP-FLP-10C を融合させ、それぞれ *flp-10(tk28)* 変異体で発現させたところ、いずれの組織特異的プロモーターを用いた場合においても *flp-10(tk28)* 変異体の生殖巣形成異常は野生型と同程度にまで回復した。この結果から FLP-10C は体腔に分泌することが DTC の移動および生殖巣の形態形成において重要であることがわかった。

(2) FLP-10C 受容体の同定

遺伝学的スクリーニングによる *flp-10* (*tk28*) 抑圧変異体の単離

上述した FLP-10C の異所発現によるレスキュー実験の結果は、体腔に分泌された FLP-10C が、移動する DTC に作用している可能性を示唆している。このことから FLP-10C の受容体が DTC 表面に存在していると仮定し、遺伝学的スクリーニングによるレセプター分子の同定を試みた。変異原であるエチルメタンスルホン酸（EMS）処理によって、*flp-10(tk28)* 変異体の表現型を抑制する変異を誘発し、機能獲得型のサプレッサー変異株の単離を期待したが、目的の変異体は得られなかった。

生化学的アプローチ（免疫沈降法）による C ペプチド結合タンパク質の探索および同定

遺伝学的スクリーニングに代わり、生化学的アプローチによって FLP-10C に結合するタンパク質の探索を行った。ビオチン化した FLP-10C をベイトとし線虫抽出液とインキュベートした後、SDS-PAGE によって結合タンパク質を展開し FLP-10C 特異的に出現したバンドを切り出し、液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）によるタンパク質の同定を行った。その結果、そのバンドの主要な成分は線虫 F_1 - F_0 ATP 合成酵素のサブユニット H28016.1 であることがわかった。内在性の H28016.1 タンパク質と GFP-FLP-10C の結合は哺乳類の抗 ATP 合成酵素サブユニット抗体を用いて、共免疫沈降実験によっても確認できたため、 F_1 - F_0 ATP 合成酵素/H28016.1 が FLP-10C 結合タンパク質であると結論した。

(3) FLP-10C と受容体候補分子の機能解析

受容体候補遺伝子 *H28016.1* の DTC における機能解析

H28016.1/ F_1 - F_0 ATP 合成酵素はミトコンドリアで機能し、生物の生存に必須な ATP 合成に関わる分子であるため、欠損変異体や RNAi によるノックダウンなどの機能喪失個体は致死であった。そこでこの遺伝子が生殖巣形態形成に関与しているのかどうかを調べるため、DTC 発現プロモーターを用いて H28016.1 を過剰発現させ生殖巣の形態形成へ及ぼす影響を調べた。その結果、H28016.1

過剰発現株では非発現株に比べて有意に生殖巣形態形成異常が観察された。

H28016.1 のネガティブレギュレーターとしての FLP-10C の機能

H28016.1 が DTC 表層で FLP-10C の受容体として機能していると仮定すると、その過剰発現によって引き起こされた生殖巣形成異常は受容体-リガンドの量的な平衡状態が崩れたことに起因するのではないかと推測した。この仮説を検証するために H28016.1 過剰発現株においてリガンドである FLP-10C を共発現させることで生殖巣形成に与える影響を調べた。DTC 特異的プロモーターで H28016.1 を過剰発現させたトランスジェニック株に、*flp-10* プロモーター下にシグナルペプチドと共に融合した FLP-10C を導入したところ、驚いたことに H28016.1 の過剰発現によって引き起こされた生殖巣形態形成異常が有意に回復した（図 3）。

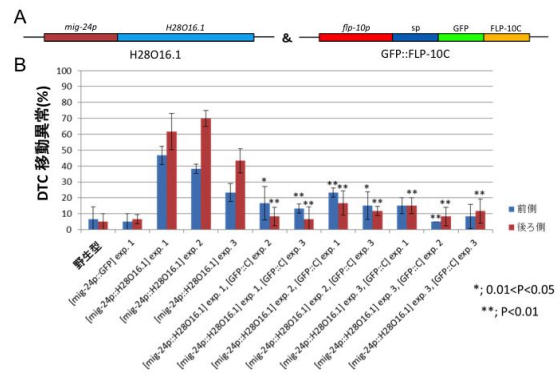


図 3 . A. DTC 特異的プロモーターである *mig-24p* の下流に *H28016.1* を融合させたプラスミドと、*flp-10* プロモーターの下流にシグナルペプチド (*sp*)、*GFP*、*FLP-10C* の順に融合させたプラスミドの模式図。B. 生殖巣形態形成異常の割合、横軸は線虫の種類を示している。青色は前側、赤色は後ろ側の生殖巣を示している。[*mig-24p::H28016.1*] 過剰発現によって引き起こされた形成異常が [*GFP::FLP-10C*] の共発現によって有意に回復していることがわかる。exp は独立の試行、n=60、** : $P < 0.01$ 、* : $0.01 < P < 0.05$ (対 [*mig-24p::H28016.1*] 前側、後ろ側)、error bar は SD を示す。

このような結果から FLP-10C は DTC に存在する H28016.1 に対してネガティブに作用することで正常な生殖巣形成において機能することが考えられた。一方、このような FLP-10C による H28016.1 に対するネガティブな作用は、シグナルペプチドを除いた FLP-10C を DTC 内で発現させた場合には見られなかった（データ未表示）。この結果は FLP-10C と H28016.1 との作用が DTC の細胞表面で起こっていることを強く示唆している。これらの結果から H28016.1/ F_1 - F_0 ATP 合成酵素（サブユニット）は DTC 外もしくは表面において FLP-10C の受容体として機能することで生殖巣形態形成を制御しているという新たなモデルを提案する。

本研究課題では本来無機能であると考えられていたプロセッシング後のペプチドが器官形成において F_1-F_0 ATP 合成酵素とともに働くことを見出し、新規の器官形成機構を提案したという点ではインパクトのある研究成果になったといえる。

F_1-F_0 ATP 合成酵素には膜ドメインと膜外ドメインが存在し、サブユニットは膜外ドメインに位置している。これまでに血管内皮細胞やがん細胞などではミトコンドリアだけではなく細胞表面にも ATP 合成酵素が存在していることが報告されている。それらはアンギオスタチンの受容体として機能し、血管形成やがんの転移において抑制的な働きを持っていることがわかっている。このような知見を踏まえると、線虫 DTC においても F_1-F_0 ATP 合成酵素が細胞表面上に存在し、FLP-10C の受容体として機能している可能性は十分に考えられる。今後 FLP-10C のペプチド抗体などを用いて DTC での細胞膜局在を立証する必要がある。また、以外のサブユニットの関与を検証することで、 F_1-F_0 ATP 合成酵素の複合体として機能しているのかどうかを明らかにする必要がある。

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1件)

Kim HS, Kitano Y, Mori M, Takano T, Harbaugh TE, Mizutani K, Yanagimoto H, Miwa S, Ihara S, Kubota Y, Shibata Y, Ikenishi K, Garriga G and Nishiwaki K. The novel secreted factor MIG-18 acts with MIG-17/ADAMTS to control cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 196(2): 471-479, 2014 (査読あり)

[学会発表](計5件)

森田啓介、仲矢圭吾、金憲誠、西脇清二「線虫の生殖巣リーダー細胞の移動を制御する *flp-10* 遺伝子の解析」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、ポスター発表

Keisuke Morita, Hon-Song Kim, Kiyoji Nishiwaki. Analysis of *flp-10* that controls migration of the gonadal leader cells in *C. elegans*. *C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* meeting, 2014年7月16日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)、ポスター発表

金憲誠「ペプチドが制御する新たな器官形成機構について」日本発生物学会2013秋季シンポジウム、2013年11月19日、神戸しあわせの村(兵庫県神戸市)、口頭発表

Hon-Song Kim and Kiyoji Nishiwaki. Nuclear membrane proteins act in transport of the Netrin receptor, UNC-5 in cell migration in *C. elegans*. 19th International *C. elegans* meeting, 2013年6月27日、UCLA, Los Angeles, USA, 口頭発表

Hon-Song Kim and Kiyoji Nishiwaki. Nuclear membrane proteins act in transport of the Netrin receptor, UNC-5 in cell migration in *C. elegans*. 第46回日本発生物学会年会、2013年5月31日、くにびきメッセ(島根県松江市)、口頭発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 憲誠 (Kim, Hon-Song)

関西学院大学理工学研究科・博士研究員

研究者番号: 70469899

(4) 研究協力者

森田 啓介 (Morita, Keisuke)