

令和元年10月2日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292061

研究課題名(和文)線虫の休眠打破機構に関する化学生物学的研究

研究課題名(英文)A research of chemical biology on regulatory mechanisms of recovery from diapause in *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) 9,500,000円

研究成果の概要(和文)：線虫 *C. elegans* の幼虫休眠打破物質であるウラシルの受容体タンパクを同定し、受容体以降の細胞内情報伝達機構ならびに休眠制御機構の解析を行った。

休眠打破に重要な役割を果たすASJ神経細胞で特異的に発現するGタンパク共役型受容体SRH-11をウラシル受容体として同定した。SRH-11はcGMP濃度を上昇させることにより休眠打破を誘導する可能性を示した。さらに、SRH-11神経細胞で産生される短鎖ペプチドNLP-3ならびにFLP-21がTGF- β 様タンパクDAF-7ならびにインスリン様ペプチドINS-35の分泌をそれぞれ制御することにより休眠を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネコブセンチュウの農業被害は甚大であり、土壌燻蒸等の環境負荷が大きい防除法は敬遠され、今後、排除されると予想される。そこで、ネコブセンチュウの新たな防除法の開発が求められている。本研究はモデル生物・線虫 *C. elegans* の休眠打破(ネコブセンチュウでは宿主浸入後の感染成立)に着目し、その機構を化学生物学的に解明することにより、ネコブセンチュウ防除法の開発に資する。本研究では休眠打破物質がその受容体を介してどのように機能するかを明確した。休眠は多くの種が保有する生存戦略の一つであり、本研究の学術的意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have identified the receptor for uracil, which induces recovery from larval diapause of the nematode *Caenorhabditis elegans*, and elucidated the cellular signal transduction. We have also analyzed the regulatory mechanism of larval diapause.

The chemosensory neurons ASJs play an important role in regulation of recovery from larval diapause. We identified a G protein-coupled receptor, SRH-11, which is expressed especially in the ASJs, as a receptor for uracil. It is possible that SRH-11 bound by uracil increases a second messenger, cGMP, concentration to induce the recovery. Moreover, we have demonstrated that short peptides NLP-3 and FLP-21, which are expressed in ASJs, regulate secretion of a TGF- β like protein, DAF-7, and an insulin-like peptide, INS-35, respectively. This secretory regulation possibly modulates larval diapause.

研究分野：生物有機化学・分子生物学

キーワード：休眠 線虫 受容体 情報伝達 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

(1) 「休眠」は生育環境に適応した優れた生存戦略の1つであり、幅広い種がこの戦略をとる。モデル生物・線虫 *Caenorhabditis elegans* も生育環境の悪化にตอบสนองして幼虫休眠を行う。*C. elegans* の休眠誘導機構は専ら海外の研究者により詳細に解析された。休眠誘導物質の単離・構造解析と受容体の同定、タンパク/ペプチドホルモンによる情報伝達機構の解析、最終的に休眠を決定づけるステロイドホルモンの同定、などが行われた。

(2) 一方、生育環境が改善した際の休眠打破機構に関する知見は極めて少ない。エサとなる大腸菌の培養液中に休眠打破物質の存在が示唆されていたが、単離には至らず、未解明のままであった。申請者らは、世界に先駆けて大腸菌培養濾液中の休眠打破物質としてウラシルを同定した。これは、ウラシルが生理活性を有することを示す最初の例となった。しかしながら、ウラシルは培地成分に由来する休眠打破物質である可能性があった。そこで申請者らは、ウラシルを含まない最少培地を用いた培養濾液より精製を試み、エサとなる大腸菌が産生する休眠打破物質(未同定)が存在することを明らかにしている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、化学生物学的な切り口により休眠打破機構を解析し、線虫における休眠制御機構の全容解明に迫ることを目的とする。本研究では、(1)発見以来約30年間単離・構造決定がなされなかった休眠打破物質(トリガー)の単離・構造解析、(2)休眠打破物質の受容体の同定、(3)受容体以降の細胞内情報伝達機構の解明、(4)下流で休眠打破を実行する物質(主にペプチド類)の同定、(5)その作用点の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 最少培地を用いて餌となる大腸菌を培養し、新たな休眠打破物質の単離・構造決定を試みる。休眠打破物質ウラシルの類縁化合物の休眠打破活性を測定する。

(2) 休眠打破を制御する神経細胞 ASJ に発現する受容体遺伝子を探索し、遺伝子破壊線虫を用いてウラシルによる休眠打破の有無を検証する。受容体遺伝子を哺乳動物細胞に発現させ、ウラシルとの結合を検証する。

(3) 神経細胞 ASJ で発現する $G\alpha$ 遺伝子を探索し、遺伝子破壊線虫のウラシルによる休眠打破を検証する。さらに、特定した $G\alpha$ とウラシル受容体タンパクの結合を酵母ツーハイブリットシステムで検証する。ウラシル受容体タンパク SRH-11 を哺乳動物細胞に発現させ、ウラシル投与後の細胞内セカンドメッセンジャー濃度の変動を検証する。

(4) 神経細胞 ASJ で発現する短鎖ペプチド遺伝子を探索し、遺伝子破壊線虫の休眠変動を検証する。

(5) 休眠を制御する短鎖ペプチドの作用点を既知の休眠制御経路である TGF- β 経路あるいはインスリン経路に特定する。

4. 研究成果

(1) 新たな休眠打破物質の単離・構造決定を試みた。培地由来の物質の混入を極力排除するため、最少培地 M9 を用いて餌となる大腸菌の培養液を大量に調製した。各種クロマトグラフィーならびに HILIC HPLC を駆使して精製を進めたが、単離は困難を極めた。不純物を含む活性画分の NMR 測定を行ったところ、多糖類に由来すると推定されるスペクトルが得られた。ウラシルの類縁化合物であるチミン、ウリジン、シトシンの休眠打破活性を測定したところ、いずれも活性を示さなかった(図1)。

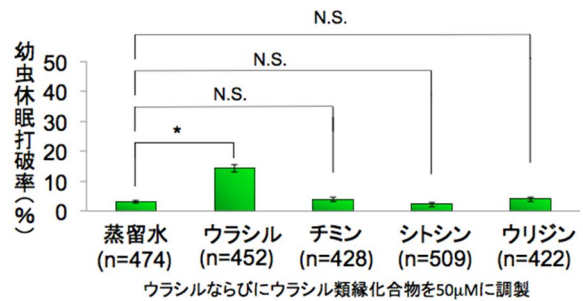


図1 ウラシルならびにウラシル類縁化合物の休眠打破活性

(2) データベース WormBase を検索し、神経細胞 ASJ で特異的に発現する受容体遺伝子を探索したところ、GPCR をコードする *srh-11* を見出した。遺伝子破壊線虫はウラシルによる休眠打破率が著しく低下したことから(図2) SRH-11 がウラシル受容体であると推定した。

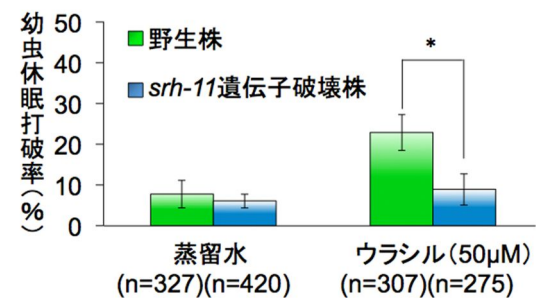


図2 *srh-11* 破壊株はウラシルによって休眠打破されない

そこで、SRH-11 を哺乳動物細胞 HEK293T 細胞で発現させ、ウラシルとの結合を検証することとした。発現ベクター-pcDNA-FLAG に *srh-11* cDNA を挿入して HEK293T 細胞に形質導入後、抗 FLAG 抗体を用いて GPCR である SRH-11 が細胞膜上に存在することを確認し

た(図3)

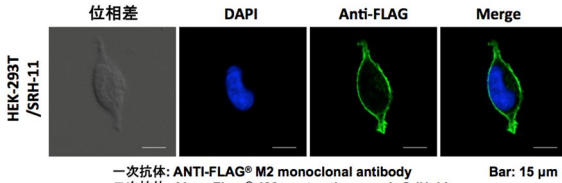


図3 発現 SRH-11 の膜局在

次いで、トリチウムラベルしたウラシルとの結合を検証した。膜画分へのウラシルの特異的結合が確認でき、高い親和性(解離定数 $K_d=100\text{nM}$, 最大結合量 $B_{\text{max}}=890\text{ fmol/mg}$ タンパク)を示したことから(図4)ウラシルの受容体は SRH-11 であると結論づけた。

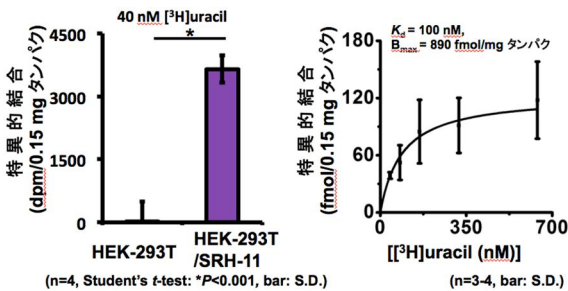


図4 SRH-11 発現 HEK293T 細胞膜画分へのウラシルの特異的結合

(3) ウラシル受容体 SRH-11 以降の細胞内情報伝達機構を解明すべく、休眠打破制御神経細胞 ASJ で発現する $G\alpha$ の休眠制御を検証することとした。データベース WormBase を検索したところ、5 種の $G\alpha$ 遺伝子が ASJ で発現しており、これらの遺伝子破壊線虫のウラシルによる休眠打破の変動を検証した。その結果、*gpa-9*, *-10*, *-14* が *srh-11* 破壊と同様に休眠打破率の低下を示した(図5)。

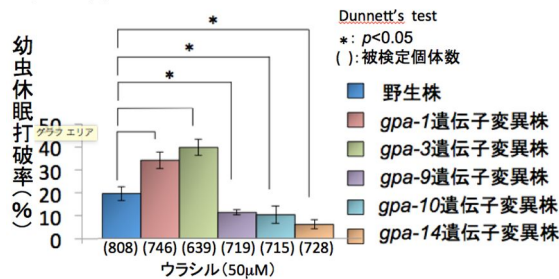


図5 $G\alpha$ 遺伝子破壊線虫の休眠打破率

gpa-9, *-10*, *-14* に対して酵母ツーハイブリットシステムを用いて *srh-11* との相互作用を検証したところ、GPA-9 が SRH-11 と共役する可能性が高いことが示唆された。

SRH-11 発現 HEK293T 細胞にウラシルを添加した際のセカンドメッセンジャー(cAMP, Ca^{2+} , cGMP)濃度の変動を検証した。レポータータンパクを共発現しウラシル添加後の発光量の変動を検証したところ、cAMP, Ca^{2+} 濃度の変動は認められなかった。一方、抗 cGMP

抗体に対するアセチルコリンエステラーゼ-cGMP コンジュゲートと cGMP の拮抗的結合を指標として cGMP 産生量の変動を検証したところ、SRH-11 発現 HEK293T 細胞のみウラシル添加による cGMP 濃度の上昇が認められた(図6)。

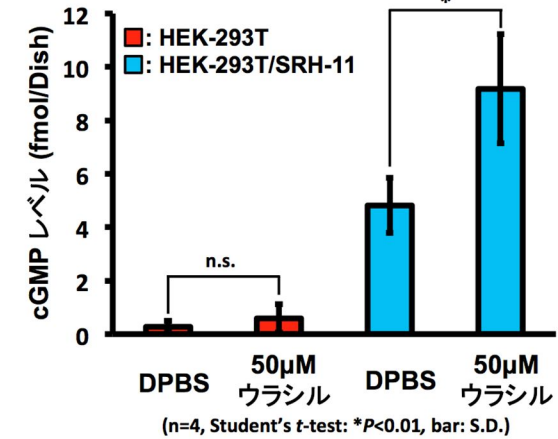


図6 ウラシル添加による cGMP 濃度上昇

以上の結果より、ウラシルの SRH-11 を介した休眠打破には cGMP 濃度の上昇がトリガーとなる可能性が示唆された。

(4) 休眠打破を制御する神経細胞 ASJ において、短鎖ペプチドが休眠を制御するとの仮説の下、ASJ で発現する短鎖ペプチド遺伝子を探した。データベース WormBase を用いて検索した結果、*nlp-3*, *flp-21* を見出した。これらの遺伝子破壊線虫ならびに過剰発現株の休眠率を測定したところ、休眠率の変動が認められた(図7)。

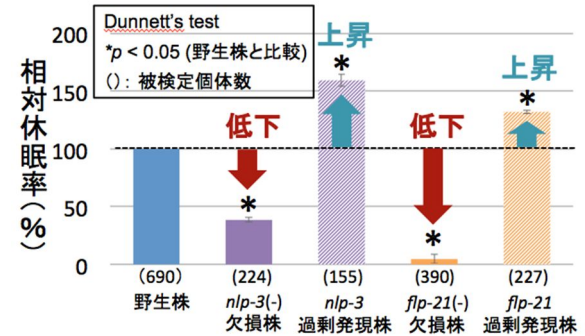


図7 短鎖ペプチド遺伝子 *nlp-3*, *flp-21* の休眠制御への関与

nlp-3 は 3 種の C 末端アミドペプチドをコードしていることから、休眠制御に關するペプチドを特定すべく、ペプチド特異的な発現実験を行った。その結果、C 末端側に位置するペプチド YFDSLQQL-NH₂ のみが休眠制御に關することを明らかにした。

(5) 休眠を制御する短鎖ペプチド NLP-3, FLP-21 の作用点を明らかにすべく、休眠を制御する TGF- β 様タンパク DAF-7 ならびに

インスリン様ペプチドの分泌制御の可能性を検証した。レポーター発現線虫(*daf-7p::DAF-7::mCherry*, *daf-28p::DAF-28::mCherry*, *ins-35p::INS-35::VENUS*)と *nlp-3*, *flp-21* 破壊線虫をそれぞれ交雑し、レポータータンパクの分泌量の変動を体腔細胞への蓄積量を指標として検証した。

nlp-3 破壊により *DAF-7::mCherry* の体腔細胞 A への蓄積が著しく増加した(図 8-1)。すなわち、*nlp-3* 破壊により *DAF-7::mCherry* の分泌が著しく増加した。このことから、NLP-3 は *DAF-7* の分泌を抑制することにより休眠を誘導・維持していると推定される。

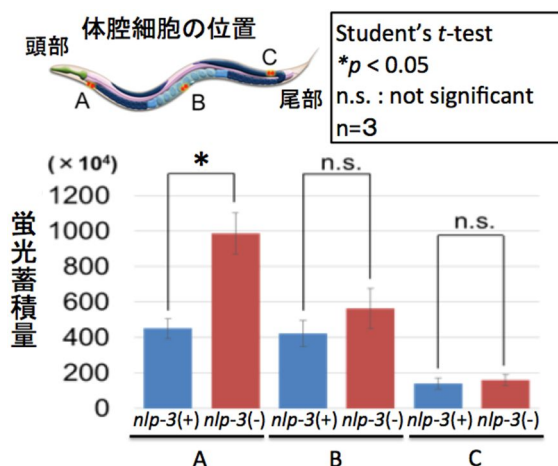


図 8-1 *nlp-3* 破壊による *DAF-7::mCherry* の体腔細胞への蓄積量の変動

なお、*nlp-3* 破壊によるインスリン様ペプチドの分泌変動は認められなかった。

flp-21 破壊により *INS-35::VENUS* の体腔細胞 A への蓄積が著しく増加した(図 8-2)。すなわち、*flp-21* 破壊により *INS-35::VENUS* の分泌が著しく増加した。このことから、FLP-21 は *INS-35* の分泌を抑制することにより休眠を誘導・維持していると推定される。

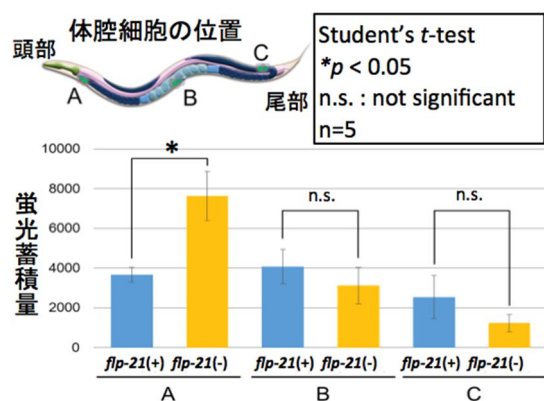


図 8-2 *flp-21* 破壊による *INS-35::VENUS* の体腔細胞への蓄積量の変動
 なお、*flp-21* 破壊による TGF-β様タンパク *DAF-7* ならびにインスリン様ペプチド *DAF-28* の分泌変動は認められなかった。

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 12 件)

(1) 河野 強. 線虫 *C. elegans* の休眠・寿命を制御するインスリン様ペプチド. 化学と生物. 査読有, 55, 2017, 400-406. DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.400

(2) Yohei Matsunaga, Takashi Iwasaki, Tsuyoshi Kawano. Diverse insulin-like peptides of *C. elegans*. International Biology Review. 査読有, 1, 2017, 1-15.

(3) Yuka Kunimatsu, Mizuki Saga, Takashi Iwasaki, Tsuyoshi Kawano. NLP-3, a C-terminal peptide amide of *Caenorhabditis elegans*, regulates its larval diapause by modulating secretion of a TGF-β-like peptide, *DAF-7*. Peptide Science 2016. 査読有, 2017, 213-214.

(4) Toshiya Matsukawa, Yohei Matsunaga, Takashi Iwasaki, Koji Nagata, Masaru Tanokura, Tsuyoshi Kawano. Comparison of physiological functions between antagonistic insulin-like peptides, *INS-23* and *INS-18*, in *Caenorhabditis elegans*. Peptide Science 2016. 査読有, 2017, 45-46.

(5) Tomohiro Bito, Taihei Misaki, Yukinori Yabuta, Takahiro Ishikawa, Tsuyoshi Kawano, Fumio Watanabe. Vitamin B₁₂ deficiency results in severe oxidative stress, leading to memory retention impairment in *Caenorhabditis elegans*. Redox Biology. 査読有, 11, 2017, 21-29. DOI: 10.1016/j.redox.2016.10.013.

(6) Yohei Matsunaga, Yoko Honda, Shuji Honda, Takashi Iwasaki, Hiroshi Qadota, Guy M Benian, Tsuyoshi Kawano. *C. elegans* insulin-like peptides, *INS-35* and *INS-7*, change their secretion polarity in larval diapause. Peptide Science 2015. 査読有, 2016, 79-82.

(7) Yohei Matsunaga, Yoko Honda, Shuji Honda, Takashi Iwasaki, Hiroshi Qadota, Guy M Benian, Tsuyoshi Kawano. Diapause is associated with a change in the polarity of insulin-like peptides. Nature Communications. 査読有, 7, 2016, 10573-10580. DOI: 10.1038/ncomms10573.

(8) Tomohiro Bito, Yukinori Yabuta, Tsuyoshi Ichiyanagi, Tsuyoshi Kawano, Fumio Watanabe. Dodecylamine derivative of cyanocobalamin potently inhibits the activities of cobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthase of *Caenorhabditis elegans*.

FEBS Open Bio. 査読有, 4, 2014, 722-729. DOI: 0.1016/j.fob.2014.07.008. eCollection 2014.

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 原田敦美, 岩崎 崇, 河野 強. 線虫 *C. elegans* の休眠を制御する短鎖ペプチド NLP-24 とその受容体 NPR-17 の機能解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 03 月 17 日~2017 年 03 月 20 日. 京都女子大学 (京都市).
- (2) 国松友香, 松下健二郎, 岩崎 崇, 河野 強. 線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖 C 末端アミドペプチド FLP-21 の機能解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 03 月 17 日~2017 年 03 月 20 日. 京都女子大学(京都市).
- (3) 高須 浩, 金川陽祐, 西村浩二, 河野 強, 尾添嘉久. *C. elegans* の ASJ ニューロンに発現する SRH-11 のリガンド応答. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 03 月 17 日~2017 年 3 月 20 日. 京都女子大学(京都市).
- (4) 松川隼也, 松永洋平, 岩崎 崇, 永田宏次, 田之倉 優, 河野 強. 線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド INS-23, INS の生理機能の比較. ペプチド討論会. 2016 年 10 月 26 日~2016 年 10 月 28 日. 京都テルサ(京都市).
- (5) 高須 浩, 金川陽祐, 河野 強, 尾添嘉久. *C. elegans* の ASJ ニューロンに発現する SRH-11 の機能解析. 日本農芸化学会中四国支部大会. 2016 年 09 月 15 日~2016 年 09 月 16 日. 高知大学 (高知市).
- (6) Yohei Matsunaga, Yoko Honda, Shuji Honda, Takashi Iwasaki, Hiroshi Qadota, Guy M Benian, Tsuyoshi Kawano. *C. elegans* insulin-like peptides, INS- 35 and INS- 7, change their secretion polarity in larval diapause. 第 52 回ペプチド討論会. 2015 年 11 月 16 日~2015 年 11 月 18 日. 神奈川県平塚市.
- (7) Tsuyoshi Kawano, Takumi Fujimori, Maki Komatsu, Takashi Iwasaki. Evaluation of insulin molecules using primary cultured cells of the *C. elegans* TJ356 strain. 20th *C. elegans* International Congress. 2015 年 06 月 24 日~2015 年 06 月 28 日. UCLA, Los Angeles, CA.
- (8) 河野 強, 松永 洋平, 本田 陽子, 本田 修二, 岩崎 崇, 門田 裕志, Benian Guy. 線虫 *C. elegans* における新たなインスリン様シグナル制御機構. 日本農芸化学会 2015 年度大会. 岡山大学津島キャンパス (岡山市).
- (9) Honda Y, Higashibata A, Matsunaga Y, Yonezawa Y, Kawano T, Higashitani A, Kuriyama K, Shimazu T, Tanaka M, Szewczyk NJ, Ishioka N, Honda S. Aging in Space. The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting. 2014 年 06 月 15

日~2014 年 06 月 19 日. 奈良県文化会館 (奈良市).

〔図書〕(計 1 件)

本田洋子, 本田修二, 河野 強. 「老化の生物学」第 10 章:インスリンシグナル 化学同人 (京都)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

(1) 報道関係
プレスリリース
インスリン分泌極性の可逆的変動を発見
平成 28 年 2 月 3 日 (鳥取大学)

新聞報道

インスリン分泌、新たな仕組みを発見
鳥大チーム、糖尿病治療に一石
平成 28 年 2 月 9 日 (毎日新聞)

(2) アウトリーチ活動

鳥取大学サイエンスアカデミー第 414 回
モデル生物・線虫 *C. elegans* の世界
平成 28 年 5 月 14 日 (土) 10:30~12:00
鳥取県立図書館 (鳥取市)

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

尾添 嘉久 (OZOE, Yoshihisa)
鳥根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 80112118

(3) 連携研究者

一柳 剛 (ICHIYANAGI, Tsuyoshi)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 00302240

(4) 連携研究者

藪田 行哲 (YABUTA, Yukinori)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 00379562