

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04379

研究課題名(和文) 器官サイズ制御機構の解明 線虫における咽頭サイズ制御の遺伝学的アプローチ

研究課題名(英文) Organ size regulation - An approach by *C. elegans* genetics

研究代表者

西脇 清二 (Nishiwaki, Kiyoji)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30342827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：線虫 *C. elegans* の咽頭をモデルとして、器官サイズ制御機構の解析を行った。*C. elegans* の咽頭は筋肉、マージナル細胞、神経、分泌腺などを含む62個の細胞からなる。変異原EMS処理により、咽頭長が野生型よりも長くなる変異体を多数分離した。これらの変異体を解析したところ、咽頭長制御に関して(1)アピカル細胞外マトリックス、(2)ベーサル細胞外マトリックス(基底膜)、(3)細胞外ROS生成の少なくとも3種類の独立な制御があることが分かった。また、何れの変異体でも咽頭の細胞数に変化は無かった。本研究から、線虫の咽頭長制御には細胞外の分子機構が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the regulatory mechanism for organ size using *C. elegans* pharynx as a model system. The *C. elegans* pharynx consists of 62 cells involving muscle, marginal, neural, and gland cells. Using EMS mutagenesis, we isolated various mutants having an elongated pharynx phenotype. Genetic analyses of these mutants revealed that there are at least three independent mechanisms: (1) Regulation of apical extracellular matrix, (2) regulation of basal extracellular matrix, and (3) generation of extracellular reactive oxygen species. None of the mutants exhibited abnormalities in the pharyngeal cell number. Our findings indicate that extracellular molecular mechanisms act in a major role to regulate pharynx length.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官サイズ制御 咽頭 線虫 細胞外マトリックス

### 1. 研究開始当初の背景

動物の器官サイズの制御機構は発生生物学の重要な課題の一つである。動物の体のサイズは、同じ種の中でも栄養状態などの生育環境や遺伝的要因によって大きく異なる場合がある。栄養状態が悪いと通常個体は小さくなるが、これには insulin や TOR シグナリングを介する栄養状態のセンシング機構が働くことが知られている(Broggiolo et al., Curr. Biol. 11, 213, 2001; Martin and Hall, Curr. Opin. Cell Biol. 17, 158, 2005)。近年このような液性因子のシグナルの下流では、ショウジョウバエで発見され、進化的に保存された Hippo 経路による細胞増殖制御があることが分かってきた(Zhao et al., Nat. Cell Biol. 13, 877, 2011)。このように個体としての体のサイズ制御の分子機構は次第に明らかになりつつある。しかしながら、犬の品種でも例えばダックスフントは体の大きさの割に足が短い。人においても、体の大きさはあまり変わらないが、手足や頭部のサイズがかなり違う場合を日常的に経験する。内臓器官においても個体差は存在するであろう。このような個体差は遺伝的要因が大きいと思われるが、具体的な分子機構はまだよくわかっていない。そこで、申請者は *C. elegans* を用いて体のサイズは正常だが内臓器官のサイズが異なる変異体を分離し、原因遺伝子を同定・解析することで、器官サイズの制御機構の解明を行いたいと考えた。興味深いことに、当研究室で生殖巣形成リーダー細胞の移動異常変異体として単離・解析している *mig-17* 変異体では、生殖巣の伸長方向異常に加えて、咽頭のサイズにも異常をきたし、咽頭のサイズが長くなることが分かった。

### 2. 研究の目的

申請者は線虫の ADAMTS family 分泌型メタロプロテアーゼをコードする *mig-17* 遺伝子の変異体では、咽頭のサイズが長くなることを見出した。さらに咽頭サイズに着目したスクリーニングから、新たな変異体の分離に成功した。本研究では咽頭サイズ異常変異体の分離・解析から、咽頭サイズ制御に関わる遺伝子群を同定し、その遺伝子産物の局在や機能を分子生物学・細胞生物学的手法により解析する。これらの研究から動物の発生過程における器官サイズ制御機構についてモデルを提示する。

### 3. 研究の方法

(1) 咽頭サイズ制御における MIG-17 の機能解析 (咽頭サイズ制御に関与する MIG-17 のドメイン解析) (2) 咽頭サイズ制御における *mig-17* 関連遺伝子と基底膜関連遺伝子の機能解析 (種々の既存変異体で咽頭表現型を

解析) (3) 新規咽頭サイズ変異体の分離と解析 (遺伝子クローニング、発現部位や表現型・機能の解析) (4) 新規咽頭サイズ変異体間および *mig-17* との遺伝的相互作用の解析 (二重変異体の表現型解析)

### 4. 研究成果

(1) 咽頭サイズ制御における MIG-17 の機能解析

*mig-17* 変異体はもともと生殖巣形成に働くリーダー細胞である distal tip cell (DTC) の移動異常変異体として発見された。*mig-17* 遺伝子は基底膜に局在する ADAMTS family 分泌型メタロプロテアーゼをコードする (Nishiwaki et al., Science 288, 2205, 2000)。我々は *mig-17* 変異体では、咽頭のサイズが長くなることを見出した。*mig-17* には null 変異と考えられる *k174(Q111Stop)* の他、様々な missense 変異が存在する (図 1)。これらの変異体について、成虫の咽頭サイズを測定したところ、いずれの変異体でも野生型に比べて咽頭長が長いことが分かった。DTC 移動異常が最も強い *k174* が咽頭長が最も長く、DTC 移動異常が最も弱い *k113(mutant for 1<sup>st</sup> intron donor)* が最も短かった。

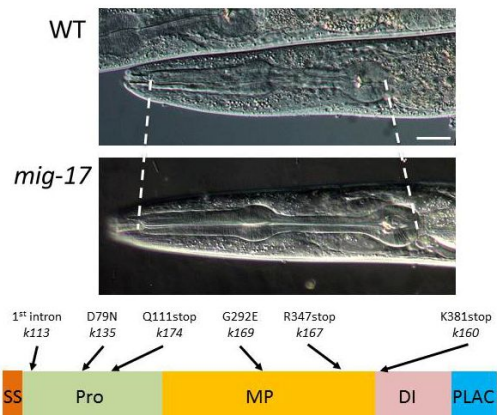


図 1. *mig-17* 変異体の咽頭長異常表現型

(上) 野生型と *mig-17(k74)* を比較した。Bar: 20  $\mu$ m。(下) MIG-17 のドメイン構造と 6 種類の *mig-17* 変異体の変異部位を示した。SS, signal sequence; Pro, prodomain; MP, metalloprotease domain; DI, disintegrin-like domain; PLAC, protease and lacunin domain。

また、DTC 移動制御に必要なである MIG-17 の触媒活性、DI ドメイン、さらに糖鎖修飾はやはり咽頭長制御にも必要であることが分かった。これらの結果から MIG-17 の咽頭長制御における役割は DTC 移動制御と同様であると考えられる。

(2) 咽頭サイズ制御における *mig-17* 関連遺伝子と基底膜関連遺伝子の機能解析

DTC 移動制御の研究から MIG-17 の下流では基底膜分子である IV 型コラーゲン（遺伝子は *let-2*）や fibulin-1（遺伝子は *fbl-1*）が機能することが分かっている（Kubota et al., Curr. Biol. 14, 2011, 2004; Kubota et al., PNAS 105, 20804, 2008）。LET-2 や FBL-1 のアミノ酸置換変異には *mig-17* 変異体の DTC 移動異常を抑制するものがある。これらについて咽頭長を測定したところ、やはり *mig-17* 変異の咽頭長伸長を抑制することが分かった。興味深いことに MIG-17 の共同因子として機能する分泌蛋白質 MIG-18 の欠損（*mig-18* 変異体）は *mig-17* 変異体と同様の DTC 移動異常を示すが、咽頭長は正常であった。これらの結果は MIG-17 による基底膜の制御は DTC 移動制御機構と咽頭長制御機構で類似しているが、異なる部分もあることを示している。

### (3) アピカル ECM 関連遺伝子の解析

本研究での変異体スクリーニングで、最も頻繁に分離されるのは *pqn-74* 遺伝子の変異であった。*pqn-74* はキチン結合ドメインを2つもつ線虫のみに保存された分泌蛋白質をコードする。*gfp::pqn-74* 融合遺伝子は *pqn-74* 変異体をレスキューでき、GFP の発現を解析したところ、咽頭の筋肉細胞とマージナル細胞で発現し、咽頭内腔のルーメン（アピカル面）に線状に局在することが分かった（図2）。*B. circulans* キチナーゼ A1 由来の chitin-binding domain (CBD) に Cy3 等の蛍光色素を付けたプローブを用いて染色を行ったところ、キチンは咽頭ルーメンで GFP-PQN-74 と共局在することが分かった。PQN-74 はキチンの局在を制御する可能性が考えられたが、*pqn-74* 変異体においてもキチンの局在は正常であった。

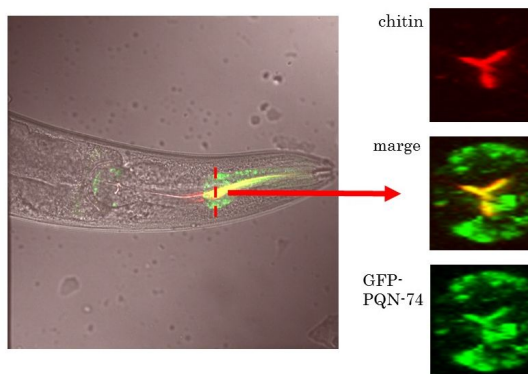


図2 . GFP-PQN-74 の局在  
*gfp::pqn-74* トランスジェニック株を CBD プローブによって染色した。咽頭を共焦点顕微鏡で観察し、Z-section 像を示した。咽頭ルーメンでキチンと GFP が共局在していることが分かる。

キチンはキチン脱アセチル化酵素によってキトサンに変換される。キチン脱アセチル化酵素をコードする *lgx-1* 変異体を入力し、咽頭の表現型を解析したところ、野生型よりも長いことが分かった。この変異体に野生型 *lgx-1* 遺伝子を多コピー導入すると咽頭表現型はレスキューされた。*pqn-74* と *lgx-1* 変異体（ともに null 変異体）を組み合わせるとわずかながら表現型の増強が見られた。そこで *pqn-74* 変異体に *lgx-1* を多コピーで導入したところ、咽頭長は正常に回復した。これらの結果は PQN-74 と LGX-1 が一部重複する経路で働いており、LGX-1 が PQN-74 の下流で機能する可能性を示唆する。また、*pqn-74; mig-17* 二重変異体ではそれぞれの単独変異体よりもさらに咽頭長が長くなったことから、アピカル ECM を制御する PQN-74 と基底膜（ベサル ECM）を制御する MIG-17 は独立な経路で働くと考えられる。

### (4) *gob-1* 遺伝子の解析

トレハロース-6-リン酸脱リン酸化酵素をコードする *gob-1* 遺伝子の変異体が得られた。*gob-1* 変異体における咽頭長の伸長はトレハロースの不足によるのか、あるいはトレハロース-6-リン酸の蓄積によるのかのいずれかであると考えられる。トレハロース-6-リン酸合成酵素をコードする *tps-1* および *tps-2* 遺伝子の欠損変異体は咽頭長に異常はなかった。さらに *gob-1 tps-1; tps-2* の三重変異体を作成すると *gob-1* 変異の咽頭長異常が抑制された。これらの結果から *gob-1* 変異による咽頭長異常はトレハロース-6-リン酸の蓄積によると考えられる。*gob-1* 変異体を CBD プローブで染色すると、キチンの局在が一部線状ではなく破線状になっていた。このことから、蓄積したトレハロース-6-リン酸がキチンの蓄積に關与する分子機構に影響を与えている可能性が考えられる。

### (5) *doxa-1* 遺伝子の解析

Dual oxidase 活性化因子をコードする *doxa-1* 遺伝子の変異体を得られた。Dual oxidase/BLI-3、Tetraspanin/TSP-15、DOXA-1 は複合体として線虫表皮のキューティクル形成において、細胞外に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生することによりコラーゲン分子のチロシン架橋を行うことが知られている（Moribe et al., PLOS Genetics, 8, e1002957, 2012）。そこで、*bli-3* および *tsp-15* 変異体が咽頭長に異常があるのかを調べた。これらの変異体は表皮キューティクルの異常により体長自体が短くなる。そこ

で、久留米大学医学部の森部弘樹先生より、表皮のみで野生型遺伝子を発現することにより体長異常がレスキューされた *bli-3* および *tsp-15* 変異体入手し、咽頭長を測定した。その結果、これらの変異体でもやはり咽頭長が長くなることが分かった。

*doxa-1::venus* および *tsp-15::gfp* 融合遺伝子を用いて、発現部位を解析した。その結果、TSP-15 は咽頭のマージナル細胞で発現しており、DOXA-1 は隣接する筋肉細胞で発現することが分かった。マージナル細胞は筋肉細胞に向かって微細な突起を形成しており、DOXA-1 は特にこの突起の周辺に集積していることが分かった。現在のところ、BLI-3 の発現細胞は明らかではないが、DOXA-1 が BLI-3 の活性化因子であることから、これらの3因子は細胞間で図3のような複合体を形成し、細胞外に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生することにより、咽頭長制御に関与していると予想される。また、*doxa-1; mig-17* 二重変異体ではそれぞれの単独変異体よりもさらに咽頭長が長くなったことから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成に関わる DOXA-1 と基底膜（ペーサル ECM）を制御する MIG-17 は独立な経路で働くと考えられる。

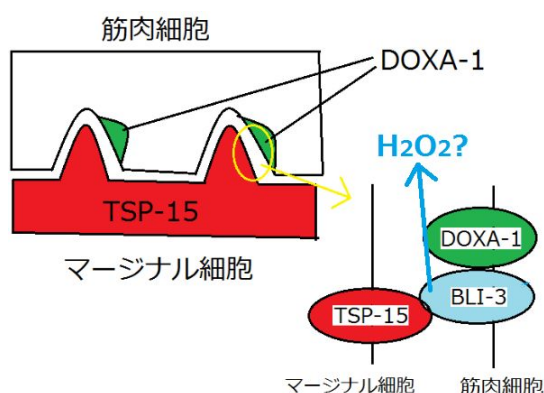


図3 . 咽頭での DOXA-1, TSP-15, BLI-3 による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生のモデル

TSP-15 はマージナル細胞で、DOXA-1 は筋肉細胞で発現している。BLI-3 の発現は不明であるが、筋肉細胞として示している。これら3者は細胞間で複合体を形成し、細胞外に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生する。

#### (6) *pqn-74* 過剰発現株からの新規変異体の分離

野生株にトランスジーンとして *pqn-74* 遺伝子を多コピーで導入すると、野生型よりも咽頭長が短くなる。そこで、このようなトランスジェニック株を変異原であるエチルメタンサルホン酸(EMS)で処理することにより、F<sub>2</sub> 世代で咽頭が長くなる変異体の分離を行った。7 株の変異体の分離に成功し、

3 株について SNP マッピングを行った。このうちの 1 株は II 番染色体の中央付近、他の 2 株は II 番染色体の末端付近に位置する変異であることがわかった。本研究でこれまで分離・解析を行ってきた咽頭長制御遺伝子には II 番染色体のものは無く、これらは新規遺伝子の変異であると考えられる。

#### (7) 咽頭長の制御機構

本研究での成果により、咽頭長制御に関して (1) アピカル細胞外マトリックス、(2) ベーサル細胞外マトリックス(基底膜)、(3) 細胞外 ROS 生成の少なくとも3種類の制御があることが分かった。また、これら3種類の経路は互いに独立であることが示唆された。何れの変異体においても咽頭の細胞数に変化がなかったことから、これらの制御系は線虫の咽頭を構成する細胞のサイズ(長さ)に影響を与えていることが分かった。

#### 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 4 件)

1. Ishii, T., Funato, Y., Hashizume, O., Yamazaki, D., Hirata, Y., Nishiwaki, K., Kono, N., Arai, H., Miki, H. (2016). Mg<sup>2+</sup> Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genetics 12: e1006276. (査読有) DOI: 10.1371/journal.pgen.1006276
2. Shibata, Y., Kawakado, Y., Hori, N., Tanaka, K., Inoue, R., Takano, T., Kubota, Y., Nishiwaki, K. (2016). Organ length control by an ADAMTS extracellular protease in *Caenorhabditis elegans*. G3(Bethesda). 6: 1449-1457. (査読有) DOI: 10.1534/g3.116.028019
3. Kim, H.-S. and Nishiwaki, K. (2015). Control of the basement membrane and cell migration by ADAMTS proteinases: Lessons from *C. elegans genetics*. Matrix Biol. 44-46C:64-69. (査読有) DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.001
4. Kikuchi, T., Shibata, Y., Kim, H.-S., Kubota, Y., Yoshina, S., Mitani, S. and Nishiwaki, K. (2015). The BED finger domain protein MIG-39 halts migration of distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 397: 151-161. (査読有) DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.10.008

[学会発表](計 14 件)

1. Shibata, Y., Nishiwaki, K. Transdifferentiation is prevented by TLK-1 kinase that represses the level of histone variant H3.3. 21st International *C. elegans* Conference, 2017
2. Nakamura, H., Shibata, Y., Nishiwaki, K.

- Novel genetic suppressors of loss of MIG-17/ADAMTS protease in *C. elegans* 第40回日本分子生物学会年会, 2017
3. Adachi M., Bando, S., Hiramoto, K., Kashima, N., Moribe, H., Shibata, Y., Nishiwaki, K. Regulation of pharynx size through reactive oxygen species in *C. elegans*. 第40回日本分子生物学会年会, 2017
  4. Inoue, R., Matsui, N., Sakata, S., Iseki, M., Shibata, Y., Nishiwaki, K. *gob-1* and related genes regulate pharynx size in *C. elegans* 第40回日本分子生物学会年会, 2017
  5. Yokoi, T., Iwata, A., Yamamoto, Y., Kondo, S., Shibata, Y., Nishiwaki, K. *mig-36* maintains gonad morphology in *C. elegans* 第40回日本分子生物学会年会, 2017
  6. Koshiha, Y., Sakata, S., Shibata, Y., Nishiwaki, K. Isolation and analysis of new mutants having an elongated pharynx in *C. elegans* 第40回日本分子生物学会年会, 2017
  7. Shibata, Y., Sakata, S., Kawakado, Y., Hori, N., Tanaka, K., Inoue, R., Takano, T., Kubota, Y., Nishiwaki, K. Regulation of pharynx size by apical and basal extracellular matrices in *C. elegans*. CDB Symposium 2016
  8. Inoue, R., Sakata, S., Matsui, N., Iseki, M., Shibata, Y., Nishiwaki, K. *gob-1* regulates pharyngeal size in *C. elegans* 第39回日本分子生物学会年会, 2016
  9. Adachi M., Bando, S., Hiramoto, K., Kashima, N., Moribe, H., Shibata, Y., Nishiwaki, K. Regulation of pharynx size through reactive oxygen species in *C. elegans*. 第39回日本分子生物学会年会, 2016
  10. Nakamura, H., Takano, T., Shibata, Y., Nishiwaki, K. Regulation of basement membrane type IV collagen by an ADAMTS protease in *C. elegans* 第39回日本分子生物学会年会, 2016
  11. Shibata, Y., Konakawa, R., Sawa, H., Nishiwaki, K. Cell-fate-determination mechanism that functions redundantly with BET family protein 第38回日本分子生物学会年会 2015
  12. Kondo, S., Yamaoka, R., Kim, H.-S., Nishiwaki, K. Involvement of a ribosomal protein in the MIG-17/ADAMTS-dependent regulation of cell migration in *C. elegans* 第38回日本分子生物学会年会 2015
  13. Sakata, S., Tanaka, K., Iseki, M., Shibata, Y., Nishiwaki, K. *pqn-74* regulates pharynx size in *C. elegans* 第38回日本分子生物学会年会 2015
  14. Shibata, Y., Konakawa, R., Sawa, H., Nishiwaki, K. The TFIID and SWI/SNF complexes are required for the cell fate maintenance in *C. elegans*. 20th International C. elegans Meeting, 2015

{ その他 }

ホームページ等

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~nishiwaki/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西脇 清二 (NISHIWAKI, Kiyoji)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30342827

### (2)研究分担者

久保田 幸彦 (KUBOTA, Yukihiro)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70333325

### (3)連携研究者

柴田 幸政 (SHIBATA, Yukimasa)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：80314053