

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06246

研究課題名(和文) 脂肪酸がシグナルとして個体成長を促進するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Growth promoting mechanism by fatty acids

研究代表者

福山 征光 (Fukuyama, Masamitsu)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・講師

研究者番号：20422389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食餌環境は動物の成長を促進する最も重要な環境因子であるが、その作用機構は不明な点が多い。申請者は、線虫*C. elegans* (以下、線虫)が、脂肪酸とアミノ酸が、一時停止した個体成長を再始動させ促進する「シグナル」として協調的に機能することを示唆する知見を得た。我々は順遺伝学的スクリーニングにより、アミノ酸を与えるだけで、脂肪酸がなくともある程度成長をすすめる「脂肪酸非要求性変異体」としてヘッジホッグアシル化酵素をコードするを同定した。は神経細胞で発現し、脂質合成酵素の発現を抑制することで、個体成長を負に制御することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長期での適切な食事が健全な成長に重要であることは周知の事実であるが、その生物学的なメカニズムは不明な点が多く残されている。例えば、食事の中のどの栄養成分が、どのように成長を促進するか、遺伝子や細胞の解像度では詳細な記述が不十分であり、詳しく理解されていないのが現状である。我々は、個体の一生の成長過程を1細胞の解像度で追跡可能である*C. elegans*という線虫をもちい、食事の中のどの栄養素が、どの遺伝子を介して成長を制御しているかを研究してきた。本研究では、神経系でという遺伝子をはたらき、脂質の代謝を制御することで、個体の成長を制御する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Nutrients are the most proximal factors that promote animals growth. However, the mechanism by which they confer the effect remains largely uncovered. We have shown that combination of ethanol, or fatty acids and essential amino acids trigger initiation of larval growth in *C. elegans*. We found that gene suppresses larval growth by suppressing expression of lipid biosynthesis genes and accumulation of lipid droplets. is exclusively expressed in neuronal cells. These findings suggest that the nervous system regulates animal growth by regulating lipid metabolism via .

研究分野：分子遺伝学

キーワード：線虫 栄養 脂肪酸 必須アミノ酸 成長

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食餌環境は動物の成長を促進する最も重要な環境因子であるが、その作用機構は不明な点が多い。申請者は、線虫 *C. elegans* (以下、線虫) が、栄養の貧富に鋭敏に応答し、個体成長を停止あるいは進行させる性質を用いて、脂肪酸とアミノ酸が、一時停止した個体成長を再始動させ促進する「シグナル」として協調的に機能することを示唆する知見を得た。すなわち、インスリン/IGF シグナリング (IIS) 経路を恒常活性化させた線虫は、脂肪酸を与えるだけで、アミノ酸がなくともある程度成長をすすめる (Nature 2013; Curr Biol 2015)。一方、順遺伝学的スクリーニングにより、アミノ酸を与えるだけで、脂肪酸がなくともある程度成長をすすめる「脂肪酸非要求性変異体」群を単離することに成功している。そこで本研究では、IIS 経路と並行に機能する「脂肪酸非要求性変異体」の原因遺伝子群を同定・解析することで、脂肪酸がシグナルとして成長を促進するメカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、「脂肪酸非要求性変異体」の責任遺伝子群を同定し、その機能する組織や、食餌あるいは脂肪酸の有無における発現量やパターンの変化、IIS 経路との相互作用を評価することにより、食餌中の脂肪酸が個体成長をシグナルとして促進する機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1: 「脂肪酸非要求性変異体」の責任遺伝子群の同定

これまでに、EMS 処理した個体由来する F1 を 3500 系統スクリーニングし、4 系統の「脂肪酸非要求性変異体」を単離した。これらの変異体は、餌が豊富な培養条件下では野生型と同様に成長し繁殖する。これらの変異体に対して 6 回のアウトクロスを既に終了しており、全て劣性遺伝することがわかっている。これら変異体群のゲノム配列を次世代シーケンスによって決定し、EMS による変異が蓄積した領域を同定し、その領域内に存在する責任遺伝子を救助アッセイによって同定する (EMS density mapping; Doitsidou et al., Genetics 2016)。責任遺伝子の変異が null 変異でないかと推測される場合、Crispr/Cas9 システムをもちいて、タンパク質コード領域が全て欠失した null 変異体を作成し、点変異体と共に以降の解析に使用する。

責任遺伝子を同定したのちに、GFP レポーター遺伝子などをもちいて、発現組織や細胞内局在を同定する。さらに、責任遺伝子群が複数であり、かつ組織分布や細胞内局在に重複が認められる場合、免疫沈降実験や酵母 2 ハイブリッドシステム、大腸菌由来の組換えタンパク質をもちいて、責任遺伝子がコードするタンパク質同士の物理的相互作用、および栄養の貧富におけるその変化を調べる。また、組織特異的プロモーターをもちいて特定の組織のみに責任遺伝子を発現させ、変異体における表現型への救助効果を評価することで、責任遺伝子群の機能する組織を同定する。

3-2: ヘッジホッグシグナル伝達経路関連因子群の解析

スクリーニングで単離した変異体の責任遺伝子がヘッジホッグシグナル伝達経路に関与する *hhat* (hedgehog acyltransferase) であったので、線虫でも保存されているヘッジホッグシグナル伝達経路関連因子群の解析も上記と同様に解析した。

4. 研究成果

「脂肪酸非要求性変異体」の責任遺伝子群の同定

我々はこれまでに、孵化直後の一齢幼虫の線虫にエタノール、あるいは、エタノールから *de novo* 生合成される脂肪酸と、必須アミノ酸を同時に投与することで、幼虫の様々な組織の幹細胞や前駆細胞が活性化され成長を促進することができることを見出している (Fukuyama et al., 2015; 未発表データ)。これまでの研究により、必須アミノ酸はインスリン/IGF シグナリング経路を介して幹・前駆細胞群を活性化するモデルが提唱されているが (Fukuyama et al., 2015)、エタノールあるいは脂肪酸がどのような遺伝学的経路介して成長を促進するか不明である。そこで、必須アミノ酸のみ投与しても成長をすすめる変異体を EMS を用いてスクリーニングしたところ複数の *hhat-2* 変異体を単離することができた。*hhat-2* は、哺乳動物の hedgehog acyltransferase

を線虫オルソログをコードする。野生型の線虫に必須アミノ酸のみ投与しても、線虫は発生停止した状態を維持するが、*hhat-2*変異体に必須アミノ酸を投与すると体長が増加する(図1)。微分干渉顕微鏡下で、エタノールや脂肪酸を投与した野生型の線虫を観察すると、脂肪滴と推測されるものが見られた。そこで、Oil Red O染色をおこなうと、エタノールを投与した野生型線虫では、Oil Red O染色陽性の脂肪滴が観察されたが、栄養源を投与しない線虫や必須アミノ酸のみ投与した線虫では、脂肪滴の形成は全く認められなかった(図2)。それに対して、*hhat-2*変異体に必須アミノ酸を投与すると、脂肪滴の蓄積が認められた(図2)。この*hhat-2*変異体における脂肪滴の形成は、必須アミノ酸投与を必要とすることが見出された(図2)。一方で、変異体を当初単離した時は、餌を与えた時と同様に、神経前駆細胞の静止期からの活性化も再現性よく認められたが、アウトクロスを進めた個体や、NBRPで作出された由来の異なる*hhat-2*変異体では再現が取れなかった。

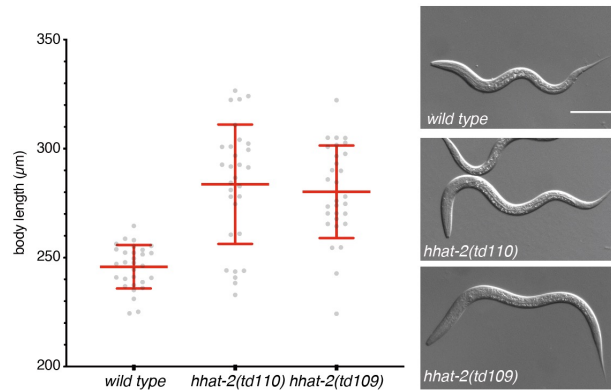


図1 *hhat-2*変異体は必須アミノ酸のみ投与しても成長する

*hhat-2*変異体において恒常活性化している遺伝学的経路を解明するべく、必須アミノ酸を投与した野生型線虫と*hhat-2*変異体の発現プロファイルをRNAシーケンス解析により解析した。*hhat-2*変異体において野生型と比較して2倍以上発現が増加しているもの遺伝子群のうち、脂肪酸伸長酵素をコードする*elo-5*と*elo-6*に着目した。先行研究により*elo-5*と*elo-6*は、分岐鎖脂肪酸の生合成に必須であること、*elo-5*遺伝子および分岐鎖脂肪酸は一齢幼虫の成長に必須であることが報告されている(Kniazeva et al., 2004)。そこで、*elo-5*遺伝子のレポーター遺伝子を作成し、野生型での栄養応答性を調べたところ、*elo-5*はエタノール投与に反応して、顕著に腸での発現が亢進することを見出した(図3)。さらに、野生型の線虫に必須アミノ酸を投与しても*elo-5*レポーター遺伝子の発現は亢進しないが、必須アミノ酸を投与した*hhat-2*変異体では、エタノールを投与した野生型と同様に、腸での*elo-5*レポーター遺伝子の発現が見出された。以上より、必須アミノ酸を投与した*hhat-2*変異体では、エタノールを投与した野生型線虫と共通した遺伝子発現応答が生じていることが示唆された。次に、*hhat-2*が機能する組織を明らかにするため、*hhat-2*遺伝子に*venus*を挿入したレポーター遺伝子を作成し、その局在を調べた。この*hhat-2::venus*レポーター遺伝子は、*hhat-2*プロモーターによって、HHAT-2::VENUS融合タンパク質を発現する。HHAT-2::VENUSは頭部の複数の神経細胞群で見出された(図4)。また、このレポーター遺伝子は、必須アミノ酸を投与した*hhat-2*変異体で認められる体長増加と脂肪滴の蓄積が抑制されることから、*hhat-2*遺伝子は神経で機能することが示唆された。以上より、頭部において発現する*hhat-2*が、腸で発現する*elo-5*や*elo-6*の発現を抑制し分岐鎖脂肪酸の生合成を阻害することで、貧栄養条件下で幼虫の成長を抑制するモデルが考えられる。

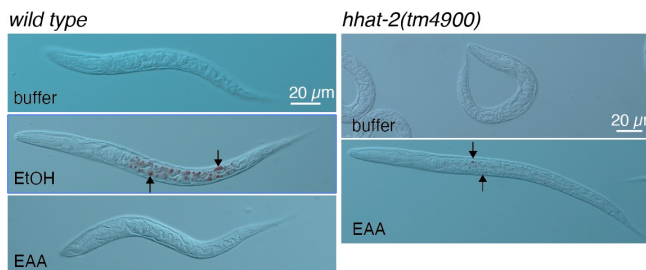


図2 *hhat-2*変異体に必須アミノ酸を投与すると脂肪滴形成が認められる

*hhat-2*の下流で神経と腸の組織連携に関与する組織間シグナルが存在する可能性が考えられる。また、*elo-5*レポーター遺伝子は、野生型線虫ではエタノールに、*hhat-2*変異体では必須アミノ酸に反応して発現が顕著に亢進することを見出すことができた。さらに、RNAシーケンス解析では、エタノール

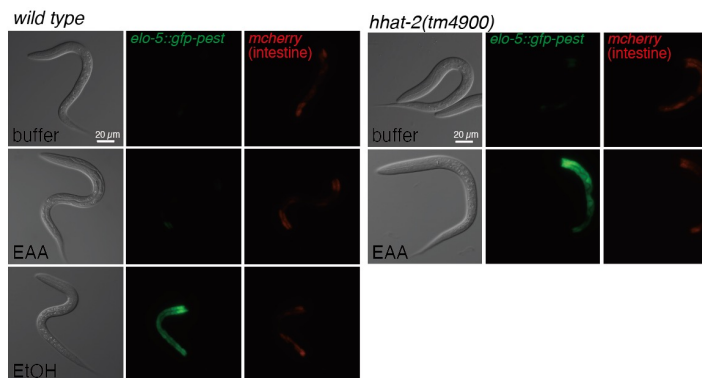


図3 *hhat-2*変異体に必須アミノ酸を投与すると*elo-5*レポーター遺伝子の発現が亢進する

ルや脂肪酸を投与した野生型線虫で *elo-6* 遺伝子の発現が亢進することも見出しており、野生型と *hhat-2* 変異体における *elo-6* レポーター遺伝子の発現解析をおこなっている。エタノールを投与した野生型と必須アミノ酸を投与した *hhat-2* 変異体の両者において共通して変動する代謝中間体を明らかにし、その代謝中間体に応答する遺伝学的経路を明らかにすることで、食餌中の脂質に応答する分子メカニズムが解明できることが期待できる。

Patched-related (PTR)/Patched domain containing protein (PTCHD) 遺伝子群の解析:

線虫では、ヘッジホッグシグナル伝達経路自体は保存されていないが、進化的起源が他の動物のヘッジホッグと同じであると考えられているヘッジホッグ関連遺伝子 (*hedgehog related: hh-r genes*) やヘッジホッグ受容体である Patched、Patched に構造上類似するがヘッジホッグシグナル伝達経路との関連が不明である Patched-related (PTR)/Patched domain containing protein (PTCHD) 遺伝子群などをもつ。これらの遺伝子群は、本研究テーマの脂肪酸による成長促進への関与を積極的に示す知見は得られなかったが、必須アミノ酸による成長制御を負に制御する可能性を見出した。具体的には、ヘッジホッグ関連遺伝子 *gr1-7* が神経前

駆細胞の静止期からの活性化を促進する機能を持つこと、PTR/PTCHD をコードする *ptr-18* 遺伝子が、分泌された GRL-7 タンパク質のエンドサイトーシスを介した分解促進に関与する知見を得て文献①、②に報告した。また、*patched* オルソログをコードする遺伝子の一つである *ptc-3* に関しては、機能阻害をすると胚性致死となること、Crispr/Cas9 システムによるタグ付加が、複数の箇所でも成功しなかったことなどで、成長促進への寄与を検討するに至らなかった。しかしながら、バーゼル大学との共同研究でコレステロール輸送を介した、個体レベルでの脂質代謝に寄与することを見出すことができ文献③に報告した。

<引用文献>

- ① Kume, M., Chiyoda, H., Kontani, K., Katada, T., and Fukuyama, M. (2019). Hedgehog-related genes regulate reactivation of quiescent neural progenitors in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 520, 532-537.
- ② Chiyoda, H., Kume, M., Castillo, C.C. del, Kontani, K., Spang, A., Katada, T., and Fukuyama, M. (2021). *Caenorhabditis elegans* PTR/PTCHD PTR-18 promotes the clearance of extracellular hedgehog-related protein via endocytosis. *Plos Genet* 17, e1009457.
- ③ Castillo, C.E.C. del, Hannich, J.T., Kaech, A., Chiyoda, H., Brewer, J., Fukuyama, M., Færgeman, N.J., Riezman, H., and Spang, A. (2021). Patched regulates lipid homeostasis by controlling cellular cholesterol levels. *Nat Commun* 12, 4898.

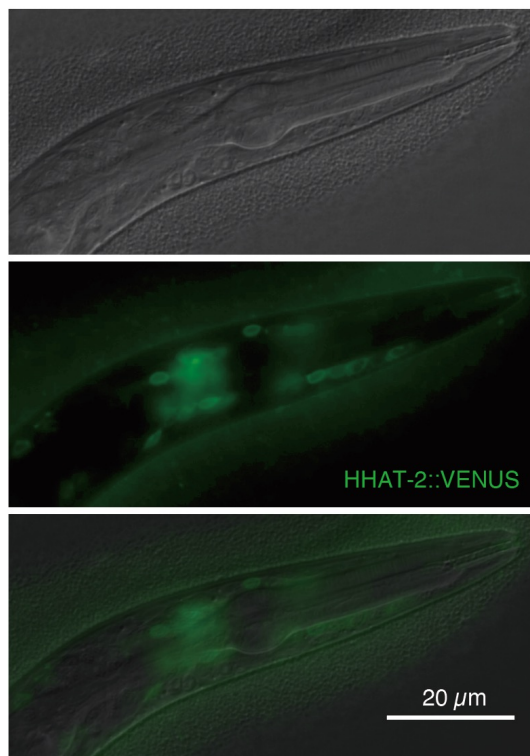


図4 *hhat-2*レポーター遺伝子は頭部の神経細胞で発現する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirohisa Chiyoda, Masahiko Kume, Carla Cadena del Castillo, Kenji Kontani, Anne Spang, Toshiaki Katada, Masamitsu Fukuyama	4. 巻 17
2. 論文標題 Caenorhabditis elegans PTR/PTCHD PTR-18 promotes the clearance of extracellular hedgehog-related protein via endocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plos Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masahiko Kume, Hirohisa Chiyoda, Kenji Kontani, Toshiaki Katada, Masamitsu Fukuyama	4. 巻 520
2. 論文標題 Hedgehog-related Genes Regulate Reactivation of Quiescent Neural Progenitors in Caenorhabditis Elegans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 532-537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cadena del Castillo Carla E., Hannich J. Thomas, Kaech Andres, Chiyoda Hirohisa, Brewer Jonathan, Fukuyama Masamitsu, F?rgeman Nils J., Riezman Howard, Spang Anne	4. 巻 12
2. 論文標題 Patched regulates lipid homeostasis by controlling cellular cholesterol levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24995-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masamitsu Fukuyama & Toshiaki Katada
2. 発表標題 必須アミノ酸欠乏を検知し前駆細胞の活性化を抑制する遺伝学的経路の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会オンライン年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福山 征光
2. 発表標題 必須アミノ酸欠乏センシング機構と その恒常性維持機能の解明
3. 学会等名 第 8 回AAA(Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research)研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福山 征光、千代田 大尚、堅田 利明
2. 発表標題 個体成長と老化を司る栄養応答機構の分子遺伝学的解析
3. 学会等名 群馬大学生体調節研究所 第 5 回内分泌代謝シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山 征光、堅田 利明
2. 発表標題 必須アミノ酸欠乏を検知し線虫の個体成長を停止する遺伝学的経路の解明
3. 学会等名 第 9 2 回日本生化学会大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuyama M. & Katada T.
2. 発表標題 Dietary nutrients and genes that regulate growth in <i>C. elegans</i> .
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Society Congress (FAOPS2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiyoda, H., Kume, M., Katada, T., Fukuyama, M
2. 発表標題 ptr-18/PTCHD maintains quiescence of neural progenitor cells during L1 diapause by suppressing the activity of grl-7 through endocytosis.
3. 学会等名 22nd International C. elegans Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuyama M
2. 発表標題 Nutritional regulation of C. elegans development
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Society Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山 征光
2. 発表標題 線虫の栄養による休眠制御機構の研究
3. 学会等名 ExCELLS研究会「休眠と代謝研究会」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福山 征光
2. 発表標題 線虫の栄養応答性休眠にともなう幹細胞静止期制御機構の解明
3. 学会等名 第6回 幹細胞研究会 「幹細胞の品質管理 休眠・老化・死」(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Fukuyama, M	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Japan	5. 総ページ数 32
3. 書名 Reproductive and Developmental Strategies	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室 http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	バーゼル大学		