

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05615

研究課題名(和文) 昆虫腸管の囲食膜タンパク質はインシュリンシグナルを介してボディサイズを規定する

研究課題名(英文) Peritrophic matrix proteins of Drosophila gut define body size via insulin signaling

研究代表者

川畑 俊一郎 (Kawabata, Shun-ichiro)

九州大学・理学研究院・名誉教授

研究者番号：90183037

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)：Pin-15bのノックダウン(KD)では、胸長やインシュリン量が増加した。酢酸菌、乳酸菌、日和見細菌などを滅菌ハエの幼虫から継続的に感染させると、感染群において滅菌ハエと比較して、KD系統では胸長が増大した。KD系統の囲食膜の透過性が増加し、腸内細菌叢を変化させ、さらに代謝経路が変化させることで、胸長が増加したと考えられた。さらに、KD系統では、総タンパク質量や総中性脂肪量、さらには脂質合成を促進するホルモンが増加した。KD系統では高脂肪食飼育下で短命になり、低栄養食条件では寿命が延伸した。したがって、ハエの囲食膜は腸内細菌叢の恒常性維持に寄与し、宿主の代謝系を制御していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ハエの囲食膜に存在するキチン結合タンパク質の遺伝子をノックダウンすると体長や体重だけでなく、総タンパク質量と総中性脂肪量も増加することが判明した。また、体液中のインシュリン様ペプチドと脂質動員ホルモンも増加した。囲食膜は腸内細菌叢の恒常性維持に寄与し、宿主の代謝系を制御していると考えられた。本研究は「囲食膜の構成タンパク質はボディサイズを規定する」という、新しい概念を導き出した。したがって、本申請課題で提案した研究課題の学術的独創性は非常に高く、今後のヒトの健康維持に対する腸内細菌叢の重要性や腸管免疫系を考察する上でも創造性と影響力に富んでおり、社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：A knockdown (KD) of Drosophila peritrophic protein Pin-15b showed the increased breast length and the insulin level in body fluids. Continuous infection against sterile fly larvae with each of acetobacter 1 (SK1), acetobacter 2 (SK2), lactobacillus (SK3) and opportunistic bacteria (SK4) resulted in the increased breast length in the KD strain, compared to sterile flies. Increased permeability of the peritrophic matrix in the KD strain caused the changes of the gut flora and the metabolic pathways of the flies, resulting in an increase in breast length. In addition, total proteins and total triglycerides, as well as insulin and the lipid mobilizing hormone in the hemolymph plasma, were increased in the KD strain; the KD strain lived shorter lives under high-fat diet rearing and longer lives under low-nutrient diet conditions. It was suggested that the peritrophic matrix contributes to the homeostasis of the gut microbiota and regulates the metabolic system of the host in Drosophila.

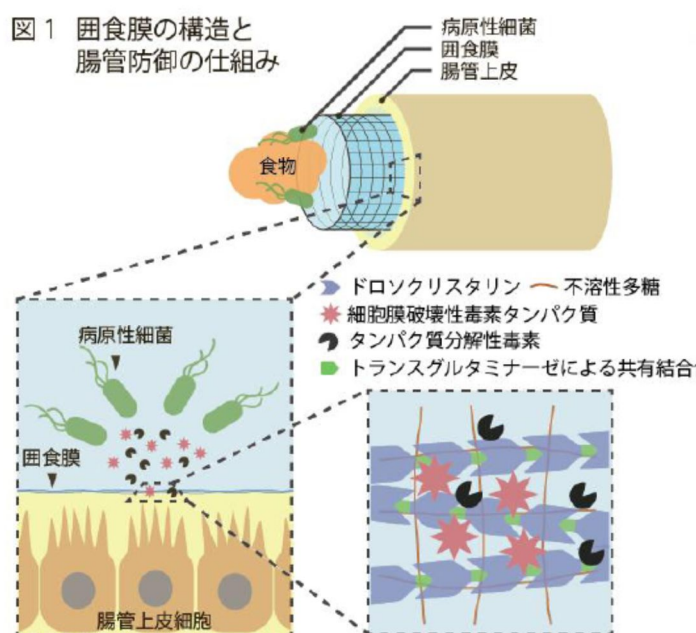
研究分野：比較免疫学

キーワード：キイロショウジョウバエ 囲食膜 遺伝子ノックダウン 腸内細菌叢 インシュリン様ペプチド 酢酸菌 乳酸菌 日和見細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管の内腔には、異物や感染微生物に対する物理的な防御系が備わっており、例えば、哺乳類ではムチン層が腸管上皮を覆ってその役割を果たしている。一方、昆虫の腸管内腔には、不溶性の多糖であるキチンとそれに結合するタンパク質(キチン結合タンパク質)から構築される囲食膜とよばれる構造体が存在し、腸管上皮の防御壁となっている(図1)。囲食膜のキチン結合タンパク質は、システイン(Cys)というアミノ酸を含まないグループであるRebers and Riddiford(R & R)ファミリーとCysを6個、あるいは8個を含むグループであるPeritrophin(Pin)ファミリーに分類される。これまで、黄色ショウジョウバエ(ハエ)においては、R & Rファミリーに属するキチン結合タンパク質であるドロソクリスタリン(Dcy)が報告されていたが、Dcyの囲食膜における感染防御機構の詳細は不明であった。申請者らは、ふたつのアミノ酸、グルタミン(Gln)とリジン(Lys)の側鎖間の架橋反応(イソペプチド形成)を触媒するトランスグルタミナーゼ



(TGase) が、Dcy 分子間を架橋・繊維化することで囲食膜を安定化し、腸管の感染防御に重要な役割を果たしていることを見出した(図1)。次に、Pin ファミリーの感染防御に関わる機能解析を開始したところ、Pin ファミリーに属するハエのキチン結合タンパク質であるPin-15b は、腸管の感染防御に関与するだけでなく、インシュリンシグナルによるエネルギー代謝を介してボディサイズ(体重・長さ)を規定していることが推定された。

2. 研究の目的

本研究は、*GALA/UAS* 法による *Pin-15b* 遺伝子のノックダウン系やリコンビナントタンパク質などを用いて *Pin-15b* タンパク質の腸管の感染防御における役割解明だけでなく、*Pin-15b* タンパク質のインシュリンシグナルを介したボディサイズを規定する分子機構を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) *Pin-15b* 遺伝子ノックダウンや過剰発現による生存率と表現型解析

野生型ハエ (w^{118}) を用いて、*Pin-15b* 遺伝子の発現組織を調べた後、病原性細菌の経口感染による *Pin-15b* 遺伝子の発現誘導を、野生型ハエ (w^{118}) やコントロールハエ (*Gal4>+*) を用いて調べる。次に、*Pin-15b* 遺伝子のノックダウン系を用いて生存率を含む表現型解析を行う。その

際、蛍光染色したデキストランを用いて囲食膜の透過性に及ぼす影響も調べる。もし、*Pin-15b*-ノックダウンハエが幼虫や蛹の段階で致死的な異常をきたすことがあれば、温度感受性の GAL80 を導入したハエを用いて、成虫段階でノックダウンを行う。さらに、*Pin-15b*-ノックダウンハエの腸管での抗菌ペプチド (*Diptericin* と *Cecropin*) 発現をコントロールハエと比較する。病原性細菌の野生株とプロテアーゼや毒素欠損株を用いて、経口感染の影響をノックダウンハエとコントロールハエの生存率で比較する。なお、*Dcy* 遺伝子の Loss-of-function ハエ (*dcy^l*) を比較対照として実験に加える。また、*UAS* の下流に *Pin-15b* 遺伝子を連結し、過剰発現させて生存率や表現型の解析を行う。

(2) *Pin-15b* タンパク質の架橋反応と機能解析

組換えタンパク質 (r*Pin-15b*) を用いて抗体を調製する。申請者らは、TGase は *Pin-15b* を架橋反応により繊維化し、囲食膜を安定化すると推定している。r*Pin-15b* の野生型タンパク質へのアミン基質 (ダンシルカダベリンやピオチン化ペンチルアミンなど) の TGase 依存的な取り込み反応や、架橋反応による r*Pin-15b* の多量体化とプロテアーゼ耐性をウェスタンブロットで解析する。r*Pin-15b* を用いて、ハエ培養細胞由来のタンパク質に対して免疫沈降やピオチン化を応用した 実験法 (BioID 法) などを用いて回収し、*Pin-15b* と相互作用するタンパク質を質量分析により同定する。同定されたタンパク質に対して、ノックダウンやハエ培養細胞を用いて *Pin-15b* 遺伝子や *TGase* 遺伝子の共発現系を用いて解析し、それらの機能を解明する。

(3) *Pin-15b* タンパク質のインシュリンシグナルを介したエネルギー代謝に関する役割

Pin-15b-ノックダウンハエのボディサイズに及ぼす影響を通常の餌培地や低栄養培地の条件下で幼虫と成虫で調べ、野生型や *Dcy*-ノックダウンハエと比較する。ボディサイズは、身長と体重を測定するが、その際、総タンパク量と脂質量 (Triglycerides) の変化量を測定するとともに、体液中の糖 (グルコースとトレハロース) を定量する。また、餌に色素を添加しておき、摂食量の変化を分光学的に調べて、ノックダウンが単に食事量の増加に依存するかどうかを、野生型ハエやコントロールハエと比較する。さらに、*Pin15b*-ノックダウンによる体液中のインシュリン様ペプチド (Iip2) や哺乳類のグルカゴンに相当するアディポキネティックホルモン (AKH) の濃度の変化を定量する。また、インシュリン感受性ニューロンや両ホルモン受容体と *Pin-15b* 遺伝子のダブルノックダウンなどを行って、*Pin-15b* のインシュリンシグナルへの関連を詳細に調べる。一方では、ボディサイズの変化に対して腸管の常在細菌の影響も推定されることから、無菌ハエを用いたノックダウン実験や、無菌ハエにハエ腸管から単離した常在菌の戻し実験等を行う。

4. 研究成果

(1) *Pin-15b* 遺伝子の全身ノックダウンによる成虫ハエの中胸長の長さへの影響を調べた。*Pin-15b* ノックダウン系統において中胸長が有意に増加し、体重についても *Pin-15b* ノックダウン系統において有意な増加が認められた。通常、研究室の飼育下のハエの腸管には、*Acetobacter* 属、*Lactobacillus* 属、*Enterococcus* 属などが検出される。すでに当研究室のハエからは、*A. persici*

(SK1)、*A. indonesiensis* (SK2)、*L. pentosus* (SK3)、*P. rettgeri* (SK4) が単離されていた。抗生物質処理により腸内細菌数を減少させた八工(axenic、AX) を作製し中胸長や体重を比較した。その結果、AX 八工では *Pin-15b* ノックダウンによる増加は見られなかった。そこで、SK1、SK2、SK3、SK4 をそれぞれ羽化後 7 日経過した AX 個体に感染させ、7 日後の中胸長と体重を測定した。しかし、いずれにおいても AX 八工と比較して有意な中胸長の増加は見られなかった。

(2) 昆虫においては、成虫の大きさは幼虫から成虫への移行時にほぼ固定される。そこで、SK1~4 の細菌を、滅菌処理を施した一齢幼虫に感染させた。それぞれの感染群について、羽化後 7~10 日の中胸長と体重を測定したところ、SK1 群、SK3 群と SK4 群について AX 八工と比較して有意に増加した。一方で体重においては、4 群のいずれにおいても AX 八工と比較して有意な増加は認められなかった。腸内細菌は食物や宿主由来の分泌物を分解し、酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸を含む代謝産物を分泌する。次に、腸内細菌の代謝産物が中胸長の増加に寄与しているかを調べるため、最も中胸長に影響を与えた SK4 の培養上清を抗菌処理した幼虫に 1 日おきに与えた。羽化後 2~3 日の中胸長を測定したところ、非投与群と比較し有意な増加が認められた。

(3) さらに、*Pin15b* をノックダウンすると体長や体重だけでなく、総タンパク質量と総中性脂肪量も増加することを明らかにした。代謝関連遺伝子を解析した結果、インスリン様ペプチドと脂質動員ホルモンの発現増加が確認された。このときの腸内細菌を調べた結果、野生型とは異なる細菌叢に変化していた。さらに、無菌飼育したノックダウン個体では体長変化や代謝異常が認められなくなり、酢酸菌や乳酸菌、日和見菌を単独感染させることで表現型がレスキューされた。代謝変化と生存率の関係を調べるため栄養条件を変えて飼育したところ、ノックダウン個体では高脂肪食飼育下で短命になり、酵母を含まない低栄養食条件では寿命が延伸した。以上より、囲食膜は腸内細菌叢の恒常性維持に寄与するとともに、宿主の代謝系を制御していると考えられた。

(4) 酢酸培地で飼育した無菌バエにおいてノックダウン系統は非ノックダウン系統に比べて体長や *Iip2* の発現量が増加した。さらに、ムチン糖鎖と腸内細菌の結合が知られているため、*Pin15b* タンパク質が実際に糖結で修飾されているか、また細菌結合性を示すかについて検証した。無細胞発現系で組換え体の *Pin15b* を調製して代謝標識を行ったところ、O 結合型糖鎖修飾を受けていることが判明した。*Pin15b* タンパク質の細菌結合性については SK3、SK4 との結合が確認され、菌種による結合性の違いがノックダウン系統の細菌叢の組成に影響を与えている可能性が示唆された。以上の結果から、ノックダウン系統で見られた代謝変化は *Pin15b* タンパク質による細菌叢の恒常性が保たれなくなったことで、腸内細菌の代謝産物である酢酸などの供給量に変化し、インスリンシグナルに影響を及ぼしたためと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田俊生、小城真菜、鳴海佳輔、川畑俊一郎
2. 発表標題 ショウジョウバエのフィブリノーゲン様レクチンの機能解析
3. 学会等名 令和4年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://skawa-aloha.jimdofree.com/

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
研究協力者	柴田 俊生 (Shibata Toshio)		

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
---------	---------