

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580150

研究課題名(和文) 線虫の休眠・寿命を制御するインスリン様ペプチドの統合的機能解析

研究課題名(英文) Integrated functional analyses of insulin-like peptides which regulate diapause and lifespan in *Caenorhabditis 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) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：線虫のインスリン様シグナルは幼虫休眠ならびに成虫寿命を制御することが知られている。現在、40種類のインスリン様ペプチドの存在が示唆されているが、機能が明確になったものは少ない。そこで、報告者らは機能未知のインスリン様ペプチドの機能を明らかにすると共に、インスリンネットワークがどのように協調して休眠・寿命制御を行っているのかを統合的に明らかにすることを目的として、計算化学的手法を用いた「分子レベル」での機能解析、初代培養細胞を用いた「細胞レベル」での評価系の構築、分子生物学的手法を用いた「個体レベル」での機能解析を行った。さらに、インスリン様分子の発現調節機構に関するモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Insulin/IGF-1 signaling is known to regulate larval diapause and lifespan of the nematode *Caenorhabditis elegans*. So far, 40 of insulin-like genes have been identified in *C. elegans*. So far, 40 of insulin-like genes have been identified in *C. elegans*. In order to identify an insulin-like molecule which physiological function is unknown as well as to elucidate how insulin-like molecules cooperatively regulate diapause and lifespan, we performed three experiments as follows. 1, a functional analysis in "molecular level" using molecular modeling; 2, a functional analysis in "cellular level" using a primary culture; 3, a functional analysis in "organism level" using molecular biological techniques. Moreover, we proposed a model for regulatory mechanism of expression of an insulin-like gene.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：生物有機化学

キーワード：インスリン 寿命 休眠 線虫

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン様シグナルによる休眠・寿命制御

線虫 *Caenorhabditis elegans* のインスリン受容体様遺伝子 *daf-2* の変異が成虫寿命を2倍に延長するとの報告以降、キイロショウジョウバエおよびマウスにおいてもインスリン様シグナルが寿命を制御することが明らかにされた。現在、インスリン様シグナルによる寿命制御は動物種に共通の機構であると考えられている。また、線虫のインスリン様シグナルは幼虫休眠を制御することが知られている。

(2) 線虫 *C. elegans* のインスリン様分子

ゲノムプロジェクトの終焉を契機に多数のインスリン様遺伝子の存在(現在40種)が示唆され、予想されるジスルフィド結合様式により $\alpha\beta\gamma$ の3タイプに分類される。 $\beta\gamma$ は哺乳動物のインスリン族ペプチドと同様のジスルフィド結合様式を有する。このうち、その生理機能が明らかにされたものは *daf-28*, *ins-1*, *ins-6*, *ins-7* (Type- β)ならびに *ins-17*, *ins-18* (Type- γ)のみである。Type- α の機能解析は殆ど進んでいない。このうち、*ins-17*, *ins-18* は報告者が世界に先駆けて同定・解析を進めたインスリン様遺伝子である。インスリン様分子にはアゴニスト・アンタゴニストが存在し、両者が拮抗してインスリン様シグナルを制御すると考えられる。

(3) インスリン様分子の機能解析

インスリン様分子の機能解析には遺伝子破壊・レスキュー・過剰発現等の分子生物学的手法が用いられてきた。この場合、複数存在するインスリン様分子の影響を排除することは不可能である。よって、個々のインスリン様分子を個別に解析するシステムが必要であるが、現在のところ存在しない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、個々のインスリン様分子の機構を解析する「細胞レベル」でのシステムを構築し、分子生物学的手法による「個体レベル」でのインスリン様分子の解析を加味して、休眠・寿命制御機構を統合的に解析する。また、インスリン様分子の機能の相違を規定する因子の同定を試みる。加えて、DAF-2 受容体の *in silico* 解析を行い、インスリン様シグナルの ON/OFF 機構を考察する。これらを通じて、休眠・寿命を制御するインスリン様分子による「入力機構」の全容解明に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 初代培養細胞を用いたインスリン様分子評価系の構築

インスリン様シグナルの下流に位置する転写因子 DAF-16 の C 末端に GFP を連結した融合タンパク (DAF-16::GFP) を恒常的に発

現する TJ356 株を用いる。定法に従い初代培養細胞を調製し、インスリン様分子添加前後での DAF-16::GFP の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

(2) 休眠・寿命を制御する新たなインスリン様分子の探索と機能解析

機能解析が進んでいない Type- α インスリン様分子より休眠に関与するものを特定するために、RNAi スクリーニングを行う。休眠誘導フェロモン存在下で線虫を培養し、RNAi による休眠率の変動を観察する。RNAi には摂食法を用いる。加えて、個体レベルの機能解析として遺伝子破壊、遺伝子導入などの手法を用いて休眠・寿命への関与を検証する。

(3) 発現パターンの解析

レポーター遺伝子を導入した線虫を用い、各生育段階ならびに延命誘導時の上記インスリン様分子の発現変動を解析する。開始メチオニン (ATG) 上流約 3kb を含む各インスリン遺伝子プロモーター領域を増幅し、発現解析用ベクター pPD-Venus あるいは pHK-mRFP に導入する。マイクロインジェクションにより Venus ならびに mRFP を共発現する線虫を作出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察を行い、各インスリン様遺伝子の発現パターンを解析する。また、qRT-PCR を併用し、mRNA レベルでの発現変動を解析する。

(4) DAF-2 受容体の *in silico* 解析

X 線結晶解析により立体構造が解かれたヒトインスリン受容体の構造を参照し、Insight III を用いて DAF-2 受容体の高次構造を推定する。

4. 研究成果

(1) 細胞レベルでのインスリン様分子の機能評価系の構築

TJ356 株より調製した初代培養細胞では DAF-16::GFP は核に局在していた。そこで、遺伝子組換え INS-6 (アゴニスト) を添加し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、DAF-16::GFP は細胞質に移行した。これはインスリン様シグナルが駆動し、DAF-16::GFP がリン酸化したことを意味する。一方、ヒトインスリンを添加した場合には、DAF-16::GFP は核に局在したままであった (図 1)。以上のことから、本系によって種特的にインスリン様分子のアゴニスト機能を評価できると結論付けた。また、興味深いことに N 末端にマルトース結合タンパク (MBP) を結合した MBP::INS-6 もアゴニストとして機能することが明らかとなった。この結果はインスリン様分子の機能には C 末端側が重要であることに起因すると考えられる。この結果はインスリンの N 末端タグ標識が可能であることを示し、分子レベルでインスリンと受容体の結合を観察可能であることを示す。今後、アンタゴニスト INS-18 の遺

伝子工学による調製ならびに本システムによる評価を行う予定である。

(2) 新たなインスリン様分子の同定と機構解析

機能解析が行われていない Type- α インスリン様分子を解析するために、RNAi スクリ

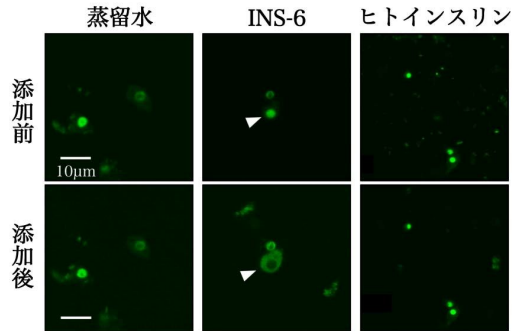


図 1. TJ356 株初代培養細胞における DAF-16::GFP の局在。上段は試料添加前、下段は試料添加 2 時間後の共焦点レーザー顕微鏡写真。矢先は DAF-16::GFP が核から細胞質に移行したことを示す。

ーニングを行い幼虫休眠を制御する新たなインスリン様分子を探索した。その結果、*ins-23* RNAi により休眠率が低下する (INS-23 はアンタゴニストとして機能する) ことが明らかとなった。そこで、遺伝子破壊株、復旧株、過剰発現株の休眠率を測定し、幼虫休眠において INS-23 がアンタゴニストとして機能することを明らかにした (図 2)。さらに、遺伝子二重破壊株の解析により、INS-23 は INS-18 と相加的に機能することを明らかにした。

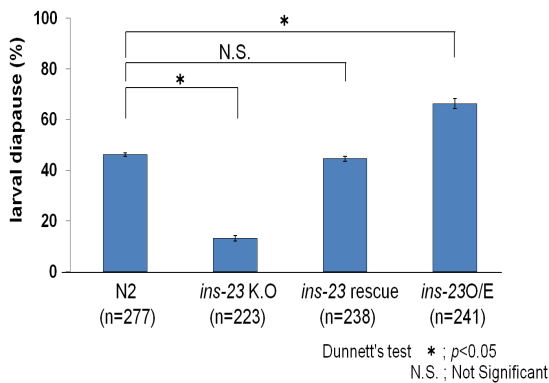


図 2. *ins-23* の休眠への関与。遺伝子破壊により休眠率が低下し、遺伝子復旧により休眠率が野生株と同等となった。さらに、過剰発現により、休眠率が上昇した。n は用いた線虫の数を示す。

同じくアンタゴニストとして機能する INS-18 は休眠ならびに寿命を制御し、INS-23 は休眠のみを制御する。これが何に起因するのか (発現制御あるいはインスリン様分子の構造) を明らかにするために、プロモーター置換実験を行った。*ins-18* プロモーター領域 *ins-23* 構造遺伝子を連結したもの

ins18P::ins-23 ならびに *ins-23* プロモーター領域に *ins-18* 構造遺伝子を連結したもの *ins23P::ins-18* を構築し、*ins-18* 破壊株、*ins-23* 破壊株ならびに野生株に導入し、休眠率ならびに寿命の変動を観察した (図 3, 4)。その結果、INS-18 ならびに INS-23 は共に DAF-2 アンタゴニストとして機能するが、プロモーター領域による時空間的発現制御により休眠ならびに寿命制御への関与が規定されていると推論した。

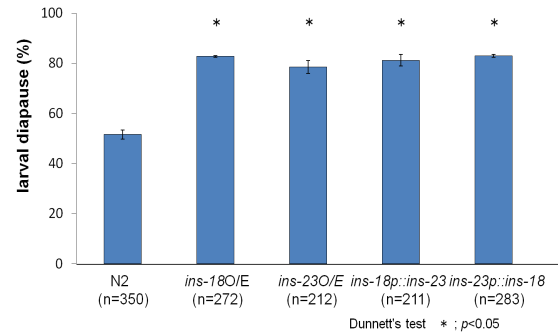


図 3. プロモーター領域を入れ換えた場合の休眠率変動。*ins-18*, *ins-23* のプロモーターを入れ換えた遺伝子を導入し、過剰発現を行った。n は用いた線虫の数を示す。

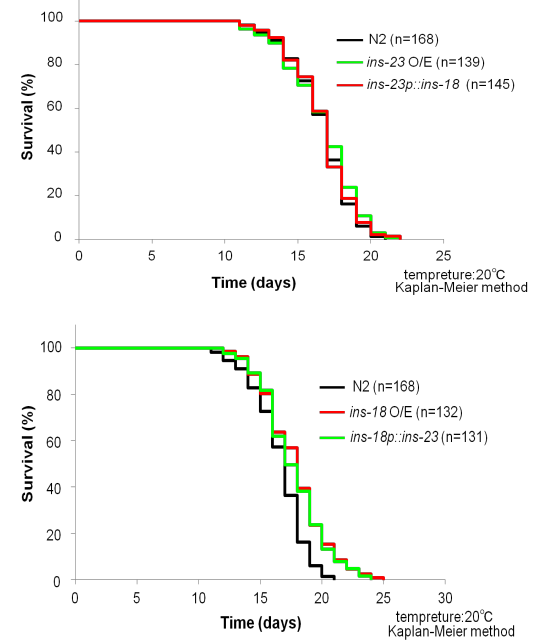


図 4. プロモーター領域を入れ換えた場合の寿命変動。*ins-18*, *ins-23* のプロモーターを入れ換えた遺伝子を導入し、過剰発現を行った。n は用いた線虫の数を示す。

(3) 発現パターンの解析

INS-23 ならびに INS-18 は時空間的発現を制御するプロモーターにより休眠/寿命への関与が規定されること (上述) をうけて、両者の発現パターンを比較した。*ins-23* プロモーターで VENUS をドライブさせ、*ins-18* プロモーターで mRFP をドライブさせた。

耐性幼虫期における発現を化学受容神経細胞が存在する頭部ならびに尾部について

比較した。VENUS ならびに mRFP の発現部位はよく一致したことから (図 5), INS-23 ならびに INS-18 が共に頭部ならびに尾部で発現し休眠を誘導すると考えられる。さらに、両者の休眠制御が相加的であることの裏付けともなった。

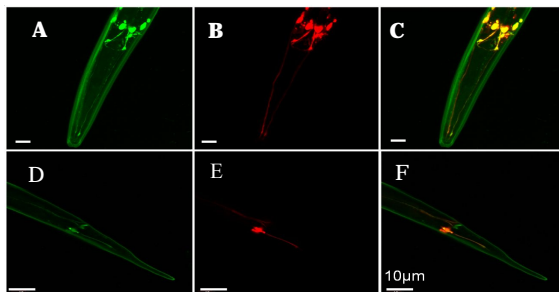


図 5. 幼虫休眠期における INS-23 ならびに INS-18 の発現部位の比較. A : *ins-23p::VENUS* 頭部, B : *ins-18p::mRFP* 頭部, C : merge 頭部, D : *ins-23p::VENUS* 尾部, E : *ins-18p::mRFP* 尾部, F : merge 尾部

一方、加齢期 (寿命が決定される成虫 5 日目) における両者の発現部位を比較したところ、頭部の発現部位はよく一致していたが、尾部における発現部位が異なっていた (図 6) 尾部においては INS-18 のみが腸で発現していた。アンタゴニストである INS-18 は、加齢期に腸で発現することにより、寿命延長を誘導する可能性が考えられる。

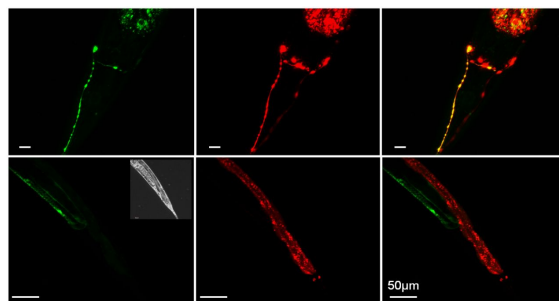


図 6. 加齢期における INS-23 ならびに INS-18 の発現部位の比較. A : *ins-23p::VENUS* 頭部, B : *ins-18p::mRFP* 頭部, C : merge 頭部, D : *ins-23p::VENUS* 尾部, E : *ins-18p::mRFP* 尾部, F : merge 尾部

(4) in silico 解析

線虫ではインスリン受容体様タンパクは DAF-2 のみであり、リガンドであるインスリン様ペプチドがアゴニストあるいはアンタゴニストとしてインスリン様シグナルを制御すると考えられる。そこで、アゴニスト/アンタゴニストの結合により DAF-2 受容体がどのような構造変化をインスリン様シグナルが制御されるのかを推測するために、計算化学により DAF-2 受容体の立体構造を推定した。

X 線結晶解析により構造が解かれたヒトインスリン受容体を参照し、Discover/Insight III

を用いて DAF-II 受容体の高次構造をモデリングした (図 7A)。現在、NMR により高次構造が決定されたアゴニスト INS-6 (図 7B) ならびに計算化学により高次構造が推定したアンタゴニスト INS-18 (図 7C) と DAF-II 受容体との結合等の in silico 解析を進めている。

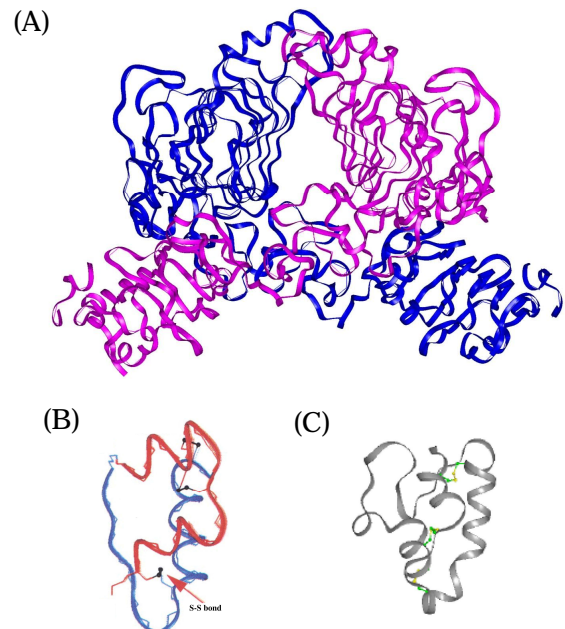


図 7 DAF-2 受容体とリガンドの予想高次構造. (A) 化学計算に基づく DAF-2 受容体の高次構造. 二量体を形成し、膜を貫通して細胞質側に存在する C 末端部位が近距離に位置する. (B) NMR 解析に基づく INS-6 の高次構造 (Hau, QX. et al. Genes Dev. 17:826, 2003). (C) 化学計算に基づく INS-18 の高次構造 (Kawano, T. et al. BBRC 527:431, 2000).

(5) 発現制御機構 (モデル)

ins-18 ならびに *ins-23* のプロモーター領域の解析を行ったところ、インスリン様シグナル下流の転写因子 DAF-16 (FOXO ホモログ) の認識配列が存在した。そこで、*ins-18* 発現が DAF-16 によるフィードバック制御下にある可能性を勘案して、*daf-2* 変異株ならびに *daf-16* 変異株における *ins-18* の発現変動を検証した。

まず、qRT-PCR を実施し *ins-18* mRNA 量の相対的な変動を検討した。野生株、*daf-2(e1370)*、*daf-16(mu86)* より mRNA を調製し、qRT-PCR に供した (図 8A)。*daf-2* 変異株では *ins-18* mRNA 量が約 3 倍に上昇した。これは、*daf-2* 変異により DAF-16 が核に移行し、*ins-18* の転写を促進したためであると考えられる。また、*daf-16* 変異株では *ins-18* mRNA 量が著しく減少した。これは、*daf-16* 変異 (DAF-16 の欠損) により *ins-18* の転写が著しく抑制されたためであると考えられる。よって、*ins-18* は転写因子 DAF-16 による発現制御下にあると考えられる。

次いで、タンパクレベルにおける DAF-16 による発現制御を検討した。野生株、*daf-2(e1370)*、*daf-16(mu86)* に INS-18::VENUS

を発現させ、緑色蛍光を観察した（図 8B）。*daf-2* 変異株では著しく蛍光が増大し、*daf-16* 変異株では蛍光が減少した。この結果は qRT-PCR の結果とよく一致した。以上のことから、*ins-18* は転写因子 DAF-16 による発現制御下にあると結論づけた。

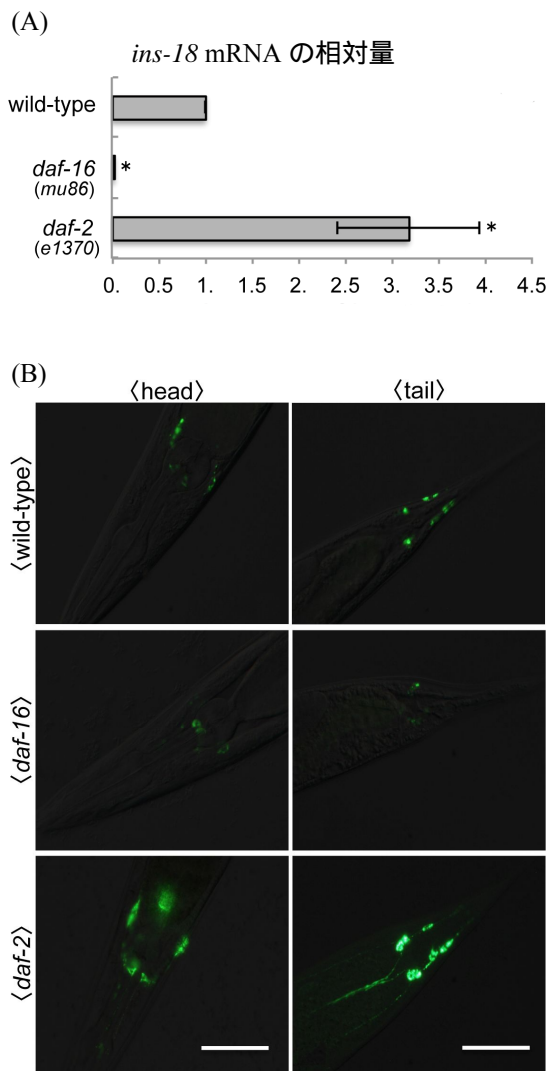


図 8. 転写因子 DAF-16 による *ins-18* の発現制御。(A) qRT-PCR による *ins-18* mRNA 相対量の変動解析。Dunnett 法 検定を用いて有意差検定を行った (*, $P < 0.01$)。 (B) *INS-18::VENUS* の蛍光量の変動。頭部、尾部の VENUS 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。スケールバーは 50 μm。

上記の結果を踏まえて、*ins-18* 発現制御におけるフィードバックモデル（図 9）を提唱する。

生育環境の変化によりアンタゴニストである *INS-18* の相対量画像化する。DAF-2 受容体に *INS-18* が結合し、インスリン様シグナルが減少する。転写因子 DAF-16 はリン酸化を受けず、核に移行する。DAF-16 が *ins-18* プロモーター領域に結合し、転写を促進する。*INS-18* が合成・分泌され、一層 DAF-2 受容体に *INS-18* が結合する。インスリン様シグナルが一層減少する。インスリ

ン様シグナルの遮断が持続する。

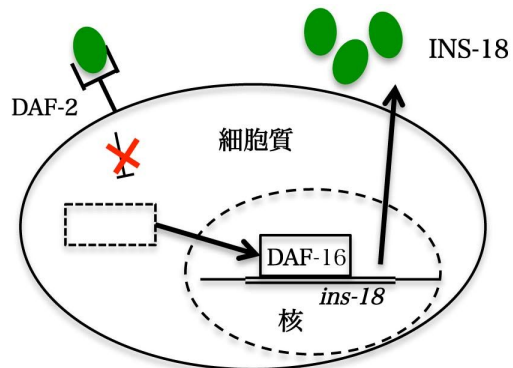


図 9. フィードバックモデル

(6) 総括

本研究では線虫のインスリン様分子の機能を統合的に検証するために、分子レベル (in silico)、細胞レベル、個体レベルでの解析を実施した。

分子レベルでの解析では、アゴニスト *INS-6* ならびにアンタゴニスト *INS-18* を DAF-2 受容体に結合させた際の構造変化 (自己リン酸化の有無) の解析が課題として残るが、早晚解答に至ると考えている。細胞レベルでの解析では、アゴニスト *INS-6* を検証できる系の確立に成功した。また、N 末端側にタグを連結してもアゴニス活性が維持されることを明らかにした。アンタゴニストの評価の評価が待たれる。固体レベルの解析では、定法に従い、遺伝子破壊/復旧/過剰発現による機能解析ならびに発現パターンの解析を行った。加えて、*ins-18* の発現調節機構 (モデル) を提唱するに至った。

本研究がインスリン様シグナルによる休眠・寿命制御機構の全容解明の一助となるものと考えている。

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 10 件)

Bito, T., Matsunaga, Y., Yabuta, Y., Kawano, T., Watanabe, F. Vitamin B₁₂ deficiency in *Caenorhabditis elegans* results in loss of fertility, extended life cycle, and reduced lifespan. *FEBS OpenBio*, 3:112-117 2013 (査読有)

Matsunaga, Y., Nakajima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., and Kawano T. A *Caenorhabditis elegans* insulin-like peptide, *INS-17*: its physiological function and expression pattern. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76:2168-2172 2012 (査読有)

Matsunaga, Y., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Iwasaki, T., and Kawano T. Physiological function, expression pattern, and transcriptional regulation of a *Caenorhabditis*

elegans insulin-like peptide, INS-18 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 423:478-483 2012 (査読有).

Honda, Y., Higashibara, A., Matsunaga, Y., Yonezawa, Y., Kawano, T., Higashitani, A., Kuriyama, K., Shimazu, T., Fukui, K., Tanaka, M., Szewczyk, J N., Ishioka, N., and Honda, S. Genes down-regulated in spaceflight are involved in the control of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports*, 2:487-497 2012 (査読有).

Iwasaki, T., Komatsu, M., Fujimori, Y., and Kawano, T. Functional analysis of INS-6, one of the insulin-like peptides in *C. elegans* using primary culture. *Peptide Science*, 369-382 2012 (査読有).

[学会発表] (計 14 件)

河野強, 大道由香里, 竹歳悠希, 岩崎崇, 一柳剛 線虫 *Caenorhabditis elegans* の休眠打破物質の単離と受容体の探索

2014年度日本農芸化学会(川崎) 2014.3.30

美藤友博, 藪田行哲, 河野強, 渡辺文雄 ビタミンB12欠乏による参加ストレスが線虫(*Caenorhabditis elegans*)の記憶・学習に及ぼす影響 2014年度日本農芸化学会(川崎) 2014.3.30

綿谷佳久, 小竹彩香, 河野強, 岩崎崇 新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の分子機構 2014年度日本農芸化学会(川崎) 2014.3.29

岩崎崇, 綿谷佳久, 小竹彩香, 河野強 新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の発見 2014年度日本農芸化学会(川崎) 2014.3.29

西村芳貴, 西岡美穂, 岩崎崇, 一柳剛, 石原享, 會見忠則, 河野強 エリンギに含まれる抗腫瘍物質の単離・構造解析 2014年度日本農芸化学会(川崎) 2014.3.28

松川隼人, 松永洋平, 岩崎崇, 河野強 線虫のインスリン様ペプチドINS-23の機能と発現パターンの解析2013年度日本農芸化学会(仙台) 2013.3.28

今井恵美, 前川由紀奈, 美藤友博, 松永洋平, 河野強, 藪田行哲, 渡辺文雄 ビタミン B12 が線虫(*C. elegans*)の体内葉酸レベルに及ぼす影響日本農芸化学会中四国支部大会(山口) 2012.9.17

美藤友博, 安井麻里子, 大塚賢二, 藪田行哲, 一柳剛, 河野強, 山地亮一, 乾博, 中野長久, 渡辺文雄 ビタミン B12 アルキルアミン誘導体の生物活性について日本農芸化学会中四国支部大会(山口) 2012.9.17

藤森匠, 小松真希, 松永洋平, 岩崎崇, 河野強 線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド INS-6 の機能解析本農芸化学会中

四国支部大会(山口) 2012.9.17

Yohei Matsunaga, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Takashi Iwasaki, and Tsuyoshi Kawano. INS-35, an agonistic insulin-like peptide of *Caenorhabditis elegans*: Its physiological function and expression patters. 5nd East Asia *C. elegans* Meeting (台北) 2012.6.29

三崎太平, 美藤友博, 藪田行哲, 河野強, 中野長久, 渡辺文雄 ビタミンB12欠乏線虫(*Caenorhabditis elegans*)における酸化ストレス障害の解析第64回日本ビタミン学会(岐阜) 2012.6.22

松永洋平, 片山侑希, 本田陽子, 本田修二, 河野強 線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチドINS-35の生理機能と発現パターン解析2012年度日本農芸化学会(京都) 2012.3.25

中島健輔, 松永洋平, 玄行-安藤恵子, 三谷昌平, 河野強 線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチドINS-17の生理機能と発現パターン解析2012年度日本農芸化学会(京都) 2012.3.25

大塚賢二, 西谷南, 藪田行哲, 一柳剛, 河野強, 渡辺文雄 ビタミンB12アルキルアミン誘導体が線虫 *C. elegans* に及ぼす影響 2012年度日本農芸化学会(京都) 2012.3.24

[その他]

ホームページ等

<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/kawano/>

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: 5 0 2 7 0 5 6 7

(2) 研究分担者

岩崎 崇 (IWASAKI, Takashi)
鳥取大学・農学部・助教
研究者番号: 3 0 5 8 5 5 8 4

(3) 連携研究者

石黒 正路 (ISHIGURO, Masaji)
新潟薬科大学・応用生命化学部・教授
研究者番号: 1 0 2 8 0 6 8 7