

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770071

研究課題名（和文） インスリン様ペプチドの発現・分泌制御機構に関する研究

研究課題名（英文） Study on regulatory mechanisms of the expression and secretion of insulin-like peptides

研究代表者

岡本 直樹 (OKAMOTO NAOKI)

独立行政法人理化学研究所・成長シグナル研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：10577969

研究成果の概要（和文）：

キイロショウジョウバエおよび膵ランゲルハンス島β細胞由来培養細胞株を用いて、インスリン様ペプチドの機能を制御するメカニズムについて幅広い視点から解析を行った。転写因子 Dachshund と Eyeless による昆虫と哺乳類で保存されたインスリン様ペプチドの転写調節機構の一端を解明するとともに、血中においてインスリン様ペプチドと直接的に結合し活性を調節する新規分泌性因子、分泌型おとりインスリン受容体（SDR）を発見した。

研究成果の概要（英文）：

Regulatory mechanisms of the function of insulin-like peptides (ILPs) were analyzed by using fruit fly *Drosophila melanogaster* and mammalian pancreatic β cells-derived cell line. We found that the evolutionally conserved regulatory mechanism of the insulin expression by two transcriptional factors, Dachshund and Eyeless. We further characterized a novel ILPs-binding protein called secreted decoy of InR (SDR) that binds to ILPs in the circulating hemolymph and antagonizes insulin/IGF signaling during development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：インスリン様ペプチド、インスリン産生細胞、成長、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

全ての多細胞生物は単一の卵母細胞からの発生を経て、ほぼ決まった個体サイズへと成長する。近年、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた遺伝学的解析により、どのような遺伝子やシグナル伝達経路によって体及び組織の成長が制御され、体の大きさが決定されるのかが势力的に研究されている (Edgar BA., *Nat.Rev.Genet.* 2006)。ショウジョウバエは幼虫期と蛹期を経て成虫へと変態する完全変態昆虫である。幼虫期には摂食に伴い栄養依存的に急激に成長し、蛹期

には幼虫期の中に溜めこんだ体内の栄養分を利用して変態する。その結果、最終的な体のサイズが決定される (Stern D., *Curr. Biol.* 2003)。つまり、体及び組織の成長はその生体内における栄養状態と密接にリンクして制御されていると言える。

この栄養依存的な成長制御因子として最も良く研究されているのがインスリン様ペプチド (insulin-like peptides; ILPs) である (Brogiolo W. et al., *Curr. Biol.* 2001)。これは、血糖値調節で知られるインスリンに構造のよく似た内分泌ペプチドホルモン群の総称である。脊椎動物ではインスリンの他、成長

疾患の原因遺伝子としても知られるインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor; IGF) が良く知られている。ILPs は昆虫を始めとする無脊椎動物にも広く存在しており、構造・機能ともに高度に保存されている。ショウジョウバエの ILPs (DILPs) は、主にインスリン産生細胞 (insulin-producing cells; IPCs) と呼ばれる脳間部の神経分泌細胞で産生され、血中に分泌される (Rulifson E. et al., *Science* 2002)。DILPs の発現・分泌は、摂食に伴う栄養レベルの上昇により制御されている (Ikeya T. et al., *Curr. Biol.* 2002; Géminard C. et al., *Cell Metab.* 2009)。DILPs は、脊椎動物のインスリンと IGF 両方の機能を合わせ持つことが知られており、分泌された DILPs は末梢組織に作用し、糖代謝、エネルギー代謝、体及び組織の成長を制御する (Rulifson E. et al., *Science* 2002)。このように、脳 IPCs で産生される DILPs は、体内の栄養状態の変化に応じて代謝及び成長を直接的に制御する非常に重要な因子である。つまり、個体が固有の体の大きさに正しく成長するためには、DILPs の機能を正確に制御することが必要不可欠であると言える。

しかしながら、これまでの研究では、体の成長を直接的に制御する DILPs の機能がどのように制御されているのか、ほとんど理解されていない。また、摂食に伴う体内の栄養状態の変化がどのように感知され、脳 IPCs における DILPs の産生が制御されているのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、体内の栄養状態の変化に伴う体及び組織の成長制御機構を明らかにすることを目的とし、DILPs の機能を制御する機構の解明を目指した。特に、1) 脳 IPCs における DILPs の発現・分泌制御機構、2) 血中における DILPs の活性制御機構に着目して解析を進めた。ショウジョウバエを用いた分子遺伝学的解析を中心とし、内分泌学及び生化学的解析を組み合わせることにより、様々な視点から解析を進めた。本研究では哺乳類培養細胞を用いた解析も試みることにより、その制御機構の保存性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 脳 IPCs における DILPs の発現・分泌制御機構の解析

- ① 脳 IPCs 特異的に発現可能な GAL4 ドライバーを用いて、様々な転写因子をコードする遺伝子に対する RNAi を誘導し、F1 個体の成虫頭部における各 *dilps* の発現

レベルを解析した (*in vivo* RNAi スクリーニング)。

- ② RNAi スクリーニングで特定の *dilps* の発現レベルが有意に変化した候補転写因子の発現解析を行い、脳 IPCs における局在を確認した。
- ③ 候補転写因子による *dilp* 発現制御機構を免疫沈降法、レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法、ゲルシフトアッセイにより解析した。
- ④ ラット膵ランゲルハンス β 細胞由来細胞株 (Rin-m) を用いて、機能的保存性を解析した。

(2) 血中における DILPs の活性制御機構の解析

- ① 全身で発現可能な GAL4 ドライバーを用いて、様々な分泌性タンパク質をコードする遺伝子に対する RNAi を誘導し、F1 個体の体重を解析した (*in vivo* RNAi スクリーニング)。
- ② RNAi スクリーニングで体重が有意に変化した候補分泌性タンパク質の発現解析を行った。
- ③ 候補分泌性タンパク質の変異体を作製し、表現型解析、遺伝的相互作用の解析を行った。
- ④ 候補分泌性タンパク質と DILPs の直接的な結合を免疫沈降法により解析した。

4. 研究成果

(1) 脳 IPCs における DILPs の発現・分泌制御機構の解析

- ① 脳 IPCs 特異的な RNAi スクリーニングにより、Dachshund (Dac) と Eyeless (Ey) の 2 種類の転写因子が、*dilp5* 遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。
- ② 免疫染色法により、Dac と Ey が脳 IPCs において強く発現していることを確認した (図 1)。
- ③ 免疫沈降法、レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法、ゲルシフトアッセイにより、Dac と Ey が複合体を形成し、*dilp5* のプロモーター領域に直接結合し、協調的に転写調節していることが明らかになった。
- ④ Rin-m 細胞を用いた解析により、哺乳類のインスリン遺伝子の発現においても、Dac と Ey の両ホモログである Dach1/2 と Pax6 が協調的な働きをしている可能性を示した。

(結論 1)

本研究により、転写因子 Dac と Ey が協調的に特定の *dilp* (*dilp5*) の発現を制御するこ

とが明らかになった(図1)。さらに、同様の機構が哺乳類でも保存されている可能性が示された(Okamoto N. et al., PNAS 2012)。しかしながら、*dilp5* の発現が栄養状態に応じてどのように制御されているのかは不明であり、今後解析を進める必要がある。

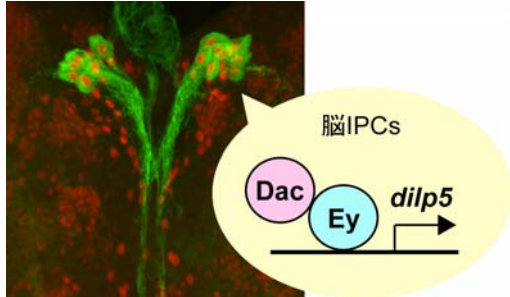


図1. 脳 IPCs における *dilp5* 発現制御機構。ショウジョウバエの幼虫期の脳 IPCs (緑) の核に局在する Dac (赤) の免疫染色像(写真)。脳 IPCs において Dac と Ey が複合体をつくり、*dilp5* プロモーターに直接結合し、*dilp5* の遺伝子発現を制御する(模式図)。

(2) 血中における DILPs の活性制御機構の解析

- ① 様々な分泌性タンパク質をコードする遺伝子に対する RNAi スクリーニングを行った結果、CG3837 遺伝子(後に、分泌型おとりインスリン様受容体 [Secreted Decoy of InR ; SDR] と命名) の機能低下により体サイズが顕著に大きくなることを見出した。SDR は、インスリン様受容体の細胞外ドメインの構造に非常に良く似ているが、細胞膜貫通領域及び細胞内領域を持たないタンパク質であった(図2)。
- ② 発現・局在解析の結果、SDR は主に脳神経系のグリア細胞から血中に分泌されることが明らかになった。
- ③ SDR 遺伝子欠失変異体を作製し、表現型解析を行った結果、SDR 変異体では体の成長速度が顕著に増加し、結果的に体サイズが大きくなること、逆に、SDR 過剰発現個体は、体サイズが顕著に小さくなることが明らかになった。
- ④ 免疫沈降法により、SDR がいくつかの DILPs と直接的に結合することが明らかになった。
- ⑤ 末梢組織におけるインスリン/IGF シグナル伝達経路の活性を解析した結果、SDR 機能欠損により活性化し、過剰発現により低下していることが明らかになった。

- ⑥ SDR 変異体を栄養の枯渇した培地で飼育すると、体サイズが大きくなるとともに、蛹期における致死率が顕著に上昇した。

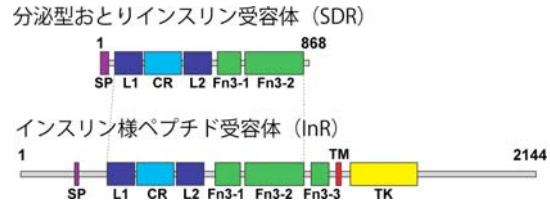


図2. SDR とインスリン様ペプチド受容体 (InR) の構造。

SDR には細胞膜貫通領域 (TM) と細胞内チロシンリン酸基転移酵素領域 (TK) を含む細胞内領域は存在しないが、細胞外領域の構造はインスリン様受容体と非常に良く似ている。

(結論 2)

本研究により、SDR は血中に分泌され、“おとり受容体”として血中の DILPs に直接結合し、細胞膜上の正規の受容体への結合を阻害することにより、体の成長を負に制御していることが示された(図3)。また、SDR は、栄養状態の変化に対して成長と栄養貯蔵のバランスを保つのに必要な因子であることが示唆された(Okamoto N. et al., Genes. Dev. 2013)。

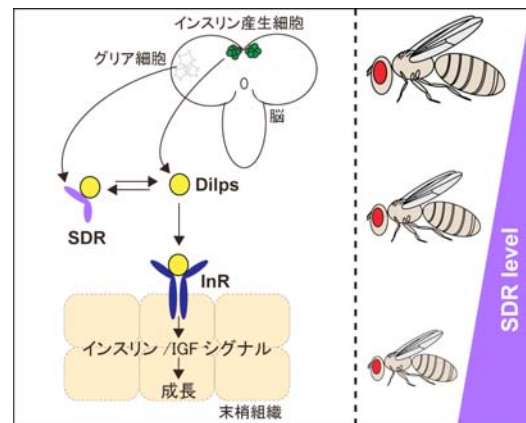


図3. SDR の作用機序の模式図。

グリア細胞から分泌された SDR は、体液中で Dilp に直接結合し、細胞膜上にある本来のインスリン様ペプチド受容体 (InR) への結合を阻害することで、体の成長を抑制する。

(研究成果に対する内外の状況と将来展望)

独特の研究手法と視点から行った本研究は、ILPs の進化・機能的本質の理解につながるものであり、新規性が高い。本研究成果は、

新聞各紙でも報道されるなど注目された。また、血中における DILPs の活性制御に関する論文は、Faculty of 1000 の Recommended に選ばれるなど高く評価されている。

本研究の結果をもとに研究を展開することで、組織間相互作用による ILPs の発現調節、および成長・代謝調節への理解に向けて、今後さらなる研究を優位に推進できると期待される。本研究で解明された ILPs 遺伝子発現調節と血中での機能調節機構は、我々ヒトを含む哺乳類においても保存されることが示唆されている。ゆえに、本研究成果は動物界における栄養依存的な成長制御機構の重要な一面を明らかにしただけでなく、将来的にインスリンや IGF が関与する糖尿病や成長疾患、がんなどの病態理解と治療に向けた手法開発の一助になることが大いに期待される。

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 2 件)

- ① Naoki Okamoto, Rinna Nakamori, Tomoka Murai, Yuki Yamauchi, Aya Masuda, Takashi Nishimura. A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in *Drosophila*. *Genes. Dev.* 27, 2013, 87–97.
(査読有り)
- ② Naoki Okamoto, Yuka Nishimori, Takashi Nishimura. Conserved role for the Dachshund protein with *Drosophila* Pax6 homolog Eyeless in insulin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 2012, 2406–2411.
(査読有り)

[学会発表] (計 16 件)

- ① Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: Secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to restrict body growth in *Drosophila*, 第 46 回 日本発生生物学会, 2012 年 5 月 31 日、松江.
- ② Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: Secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to restrict body growth in *Drosophila*, 2nd Psia-Pacific *Drosophila* Research Conference 2013, May 14, 2013, Seoul, South Korea.
- ③ 岡本直樹, 西村隆史: ショウジョウバエ分泌型インスリン受容体は、体の成長を抑制する、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、博多.
- ④ Naoki Okamoto, Takashi Nishimura:

Secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to restrict body growth in *Drosophila*, 日本ショウジョウバエ研究集会 2012, 2012 年 10 月 15 日、東京.

- ⑤ Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: Regulatory mechanism of the *Drosophila* insulin-like peptide gene expression, 日本ショウジョウバエ研究集会 2012, 2012 年 10 月 14 日、東京.
- ⑥ Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: Regulatory mechanism of the *Drosophila* insulin-like peptides gene expression, *New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences*, September 27, 2012 Tokyo, Japan.
- ⑦ Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: Regulatory mechanism of the *Drosophila* insulin-like peptides gene expression, 24th International Congress of Entomology 2012, August 24, 2012, Daegu, South Korea.
- ⑧ 岡本直樹: 昆虫インスリンの機能を調節するメカニズム、2012 年度日本農芸化学会第 1 回例会シンポジウム「昆虫の行動を規定する化学」、2012 年 7 月 21 日、東京.
- ⑨ Naoki Okamoto, Tomoka Murai, Takashi Nishimura: Regulation of the systemic growth by insulin-like peptides during *Drosophila* development, 第 45 回 日本発生生物学会、第 64 回 日本細胞生物学会合同大会、2012 年 5 月 31 日、神戸.
- ⑩ Yuka Nishimori, Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: Transcriptional regulation of *Drosophila* insulin-like peptides by nutrition, 第 45 回 日本発生生物学会、第 64 回 日本細胞生物学会合同大会、2012 年 5 月 31 日、神戸.
- ⑪ Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: Conserved role for the Dachshund protein with *Drosophila* Pax6 homolog Eyeless in insulin expression, 第 45 回 日本発生生物学会、第 64 回 日本細胞生物学会合同大会、2012 年 5 月 29 日、神戸.
- ⑫ 岡本直樹: 昆虫と哺乳類で保存されたインスリン発現制御機構、名古屋大学 GCOE セミナー アドバンス生命理学持論、2012 年 1 月 27 日、名古屋.
- ⑬ Naoki Okamoto, Yuka Nishimori, Takashi Nishimura: An Evolutionarily Conserved Function of Dachshund/DACH to Regulate

Insulin Expression Together with Eyeless/PAX6、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜。

- ⑭ 岡本直樹, 西村隆史: 昆虫と哺乳類で保存された Dachshund/DACH によるインスリン様ペプチド発現制御機構、昆虫ワークショップ2011、2011年10月13日、博多。
- ⑮ Naoki Okamoto, Yuka Nishimori, Takashi Nishimura: An Evolutionarily Conserved Function of Dachshund/DACH to Regulate Insulin Expression Together with Eyeless/PAX6, Exciting Biology Series - Cellular development: Biology at the interface, September 29, 2011, Kobe, Japan.
- ⑯ Naoki Okamoto, Takashi Nishimura: A transgenic RNA interference screen for regulators of nutrient-dependent growth in the fruit fly *Drosophila melanogaster*, 第44回日本発生生物学会、2011年5月20日、沖縄。

〔図書〕(計1件)

岡本直樹, 西村隆史、日本応用動物昆虫学会電子広報委員会、むしむしコラム・おーどーこん -近くて不思議な虫の世界- : おとり受容体が体の成長を調節する、2013年

〔その他〕

ホームページ : <http://www.cdb.riken.jp/gcs/>

本業績に関する新聞記事 :

- ・ 産経新聞(夕刊)「ゼロからイチを生み出す」(2012年5月28日)
- ・ 神戸新聞(朝刊)「成長制御のタンパク質ハエ体内から理研神戸発見 糖尿病治療に応用も」(2013年1月3日)
- ・ 読売新聞(夕刊)「成長制御するたんぱく質発見」(2013年1月15日)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 直樹 (OKAMOTO NAOKI)

独立行政法人理化学研究所・成長シグナル研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号 : 10577969