

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460071

研究課題名(和文) 線虫腸細胞をモデルにしたオルガネラ連携とその制御に関わる遺伝的基盤の解明

研究課題名(英文) Genetic analysis of the intestinal granular coordination in *C. elegans*.

研究代表者

大橋 綾子(小林綾子)(Ohashi-Kobayashi, Ayako)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：90272484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：線虫*C. elegans*の腸細胞をモデルとして、オルガネラの連携とその制御に関わる遺伝的要因を解析した。線虫腸内顆粒の形成・成熟異常をもたらす遺伝子を選別するため、RNAi feeding library を用いたRNAiスクリーニングを行った。解析した11,479 クローンのうち、腸内顆粒の著しい減少などの異常が観察されたのは142クローンであった。今後関連する遺伝子群について、様々な腸内顆粒やオルガネラへの影響を解析する基盤が得られた。

研究成果の概要(英文)：The genetic factors involved in the coordination and regulation of intestinal granular organelles were investigated, using the soil nematode *C. elegans*. For comprehensive genetic analysis, we performed feeding RNAi screening, which is popular in *C. elegans*. Out of 11,479 independent clones, 142 clones displayed the significant decrease of major large gut granules in the worms. Some of these clones also showed the tremendous accumulation of birefringent granules, which is minor in normal worms. These results would be a foundation for further understanding the coordination of various intestinal granules and other organelles.

研究分野：生物系薬学

キーワード：オルガネラ連携 腸内顆粒 線虫 網羅的スクリーニング RNAi 脂肪滴 ABC輸送体

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体を構成する細胞には多様なオルガネラが存在し、様々な生命現象を可能にする細胞特有の機能を支えている。細胞のおかれた栄養状態や環境、加齢に応じて、必要な細胞機能を担うオルガネラを質的量的に充実させる一方、不要で過剰なオルガネラは処理されて他のオルガネラの構成成分やエネルギー源として利用される。このように細胞内に共存するオルガネラは、バランスや連携をとりつつ量的質的に調節されていると予想されるが、その分子基盤となる機構については未解明な部分が多い。

2000年より研究代表者らは、小胞輸送系に局在するペプチド輸送体 TAPL (ABCB9) の機能解明に取り組み、その線虫ホモログ HAF-4 と HAF-9 の解析から、①この膜輸送体が腸細胞内顆粒に局在すること、②その顆粒は非酸性顆粒でありながら、リソソームマーカーの線虫ホモログ LMP-1 が存在する新たなオルガネラであること、③この顆粒の形成・成熟に、HAF-4/HAF-9 自身の輸送体活性が必要であること、④欠損変異体では、成長遅延やバイオリズムの異常を生じること、を発見した [文献 1]。これらの研究は、内膜系 ABC 輸送体の生理機能を解明する一歩であると共に、非酸性リソソーム様腸内顆粒という新たなリソソーム関連オルガネラの形成と成熟を分子レベルで理解する糸口となった。

(2) 本課題研究開始当初、研究代表者らは、発見した新たな腸内顆粒 (ペプチド輸送体 HAF-4/HAF-9 陽性顆粒、「HEBE 顆粒」と後に命名) について解析を進め、更に幾つかの研究成果が得られつつあった。

その一つは、腸内顆粒をはじめとする腸細胞のオルガネラは、加齢に伴う時間的量的質的制御を受けていることの発見である。線虫の腸細胞では、前生殖期 (性成熟期) である幼虫最終齢より、成虫初期における生殖期 (産卵期) を経て、老化が始まる後生殖期 (閉経期) に至るまで、大型顆粒が細胞質に充満していることが観察されていた。しかし haf-4/haf-9 変異体の観察をきっかけに、主要オルガネラは成虫 2 日目を境に生殖期から後生殖期にかけて、HEBE 顆粒から脂肪滴などの顆粒へと劇的に置換することを明らかにした。ちなみに HEBE とは HAF-4/9-enriched body evanescent with age (加齢と共に消失する HAF-4/9 に富んだ構造体) の略記で、ギリシャ神話で「若さ」「青春」を象徴する女神ヘーベにあやかり、注目してきた HAF-4/9 陽性顆粒を命名したものである。

更に、HEBE 顆粒の形成・成熟に影響する遺伝子を RNA 干渉法により検索し始めた結果、①HEBE 顆粒の形成・成熟には、予想された小胞輸送系の遺伝子以外にも、多岐に渡る遺伝子が関与する可能性があること、②それらの遺伝子には HEBE 顆粒消失に連動して他のオルガネラを同じく消失させたり、逆に異常蓄

積させたりする遺伝子もあること、などが見出された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「線虫 *C. elegans* の腸細胞をモデルとして、オルガネラの連携とその制御に関わる遺伝的要因を解明すること」である。これまでの研究代表者らの基盤研究 (C) の成果と新たに得た知見を活かし、研究を発展させる。

具体的には、注目してきた線虫腸細胞の非酸性リソソーム様オルガネラ HEBE 顆粒の形成・成熟と連携して、各種オルガネラの存在様式や、脂肪滴 (lipid droplet) や凝集物蓄積体などの出現に影響する遺伝子群を特定し、その遺伝子間相互作用の解明へとつなげることを目指す。

3. 研究の方法

本研究は、大きく 2 つのプロジェクトとして進めた。(1) 線虫腸内オルガネラの形成・維持に関わる因子の遺伝学的スクリーニングを加速的に遂行した。(2) スクリーニングで得られた陽性クローンのうち、特徴的なオルガネラ異常を引き起こした遺伝子について、HEBE 顆粒の形成・成熟ならびに各種オルガネラ機能への影響を優先的に解析した。

(1) RNAi スクリーニングによる腸内顆粒の形成・成熟異常をもたらす遺伝子の選別

線虫腸内顆粒、特に HEBE 顆粒の形成・成熟異常をもたらす遺伝子を選別するため feeding RNAi 法を用いスクリーニングを行った。Open Biosystems の線虫 RNAi ライブラリー (線虫 cDNA 遺伝子断片を含む大腸菌ライブラリー) は、線虫に大腸菌を餌として与えることにより RNAi の効果を示す [文献 2]。各 RNAi 用大腸菌クローンを 12 ウェルプレート内に用意した線虫用寒天培地の各ウェルにまいておき、そこに同調しておいた野生型線虫 N2 Bristol の 1 齢幼虫を一定匹数置き、数日飼育後に成虫 1 日目になった線虫の腸細胞を観察した。

スクリーニングの基本的な流れは、①デジタルマイクロスコープ (キーエンス VHX1000 及び VHX700F) でのプレスクリーニング→②高倍率微分干渉顕微鏡下での観察による候補遺伝子の選別とした。

プレスクリーニングには 1 サイクル約 2 週間、追試を含め陽性遺伝子の選別までの全作業に 4 週間が必要と見積もられた。研究補助員 (週あたり 2 日で平均 1 2 時間の勤務体制) を 2 名 (途中から 3 名に増員) で、RNAi スクリーニングを実施した。

(2) RNAi スクリーニング陽性クローン関連遺伝子群のオルガネラ異常の解析

GFP もしくは RFP/mCherry で標識した各種オルガネラマーカー発現線虫をストックセンター及び海外研究者より入手した。

HEBE 顆粒については、GFP/mCherry 等の蛍光タグを連結した HAF-4 や HAF-9 を発現するトランスジェニック線虫を作製し、顆粒の同定に利用した。

表 1 腸内オルガネラの蛍光標識マーカー一覧

HEBE 顆粒	HAF-4::GFP, HAF9::mCherry, LMP-1::mRFP
脂肪滴	DHS-3::GFP, ATGL-1::GFP
エンドソーム	GFP::RAB-5, GFP::RAB-7
自家蛍光顆粒 (酸性顆粒)	GLO-1::GFP
ミトコンドリア	ges-1p::GFP(mt)
小胞体	vha-6p::GFP::C34B2.10(sp12)

複屈折顆粒は偏光性にて容易に観察でき、自家蛍光顆粒は蛍光観察でも判別した。

4. 研究成果

(1) RNAi スクリーニングによる腸内顆粒の形成・成熟異常をもたらす遺伝子の選別

線虫腸内顆粒 (特に HEBE 顆粒) の形成・成熟異常をもたらす遺伝子を選別するための feeding RNAi スクリーニングは、計画通りに完了した。RNAi feeding library (Open Biosystems) の 11,479 クローンに対して、1 齢幼虫に RNAi を施し成虫にまで成長したのは 11,263 クローンであった。そのうち、高倍率微分干涉顕微鏡下で HEBE 顆粒の形成・成熟異常が観察されたのは、142 クローンであった。

陽性クローンの内訳をみると、予想していた小胞輸送関連遺伝子だけでなく、膜成分や脂質の代謝関連遺伝子、アミノ酸や核酸の代謝関連遺伝子、これまで他オルガネラでの機能が知られる遺伝子、タンパク質の合成 (翻訳関連因子含む) や品質管理等に関わる遺伝子等の関与が明らかになった。

線虫の持つ遺伝子の約 1% が、新たに見出したオルガネラ HEBE 顆粒の形成や成熟に関与していることは非常に興味深い。また、それらの遺伝子には代謝関連酵素やタンパク合成や品質管理に関与する因子もあり、この結果は、「HEBE 顆粒は栄養状態などの生育環境の変化に応じて変動する」という、これまでの研究を支持するものと考えられる。

HAF-4/HAF-9 はヘテロダイマーを形成してペプチド輸送体として機能し、HEBE 顆粒の形成に寄与していると予想している [文献 2]。しかし今回、基質となりえそうなペプチドをコードする遺伝子 (例えば flp や nlp のファミリーなど) は、陽性クローンの中にわずしか見られなかった。多くの ABC 輸送体のように、おそらく HAF-4/HAF-9 も単一のペプチドのみを基質とする輸送体ではないので、今回のスクリーニング系のような単一遺伝子の抑制では検出できなかった可能性が考えられる。

(2)-1 顕著な腸内オルガネラ異常を引き起こす遺伝子の解析 -cdc-48.1/48.2-

基盤研究開始時から注目していた遺伝子 VCP/cdc48 (ユビキチン依存タンパク質品質管理に働く多機能 AAA-ATPase) の線虫ホモログ cdc48 (cdc-48.1 及び cdc-48.2) について基準野生株 N2 並びに各種オルガネラ蛍光標識線虫を用いて解析した。

cdc-48.1/48.2 の RNAi では、HEBE 顆粒の減少のみならず、複屈折顆粒の異常蓄積が観察された。複屈折顆粒は、正常な線虫では細胞中に数個から十数個程度しか見当たらない特殊な顆粒である。HEBE 顆粒の消失と、凝集物蓄積体 (複屈折顆粒) の増大とのオルガネラレベルでの連動性を初めて指摘できた。また、cdc-48.1/48.2 のいずれの RNAi 処理した線虫でも、HEBE 顆粒と共に、脂肪滴の減少も観察された。

そこで、cdc-48.1/48.2 遺伝子の欠損変異体を手し、解析を進めた。その結果から、RNAi のオフターゲット効果 (例えば cdc-48.1 の配列を用いた RNAi で、cdc-48.1 のみならず類似する遺伝子の cdc-48.2 の RNAi も生じている) の可能性が考えられたため、各遺伝子特異的 RNAi の実験系を組み、確認作業を進めている。

(2)-2 腸内オルガネラ異常を引き起こす遺伝子の解析 -V-ATPase サブユニット-

HEBE 顆粒は、非酸性でありながらリソソームマーカー LAMP ホモログ LMP-1 の局在するユニークな顆粒である。そこで、一般にはリソソームの形成と酸性化に関与することが知られる V-ATPase (vacuolar タイプのプロトンポンプ) が、腸内顆粒の形成にどのように関与するのかを RNAi により調べた。

V-ATPase の各サブユニット遺伝子の RNAi が可能なクローンをライブラリーより選択して解析した結果、腸での発現がデータベース WormBase 上で報告されているサブユニットに関しては、著しい成長阻害で成虫に生育しなかった数クローンを除き、いずれのクローンをを用いた場合でも、HEBE 顆粒が消失する、もしくははいびつな形状となるといった異常が観察された。酸性顆粒と推定されている自家蛍光顆粒については、自家蛍光が減弱する遺伝子とあまり変わらない遺伝子との 2 つに大別された。また、これらの RNAi ではいずれも、複屈折顆粒の増える傾向が見られた。

(2)-3 腸内オルガネラ異常を引き起こす遺伝子の解析 -脂質合成を司る遺伝子群-

脂質合成を司る転写調節因子 SREBP ホモログ sbp-1 やコアクチベーター複合体 ARC105/MED15 ホモログ mdt-15 の RNAi を行った結果、顕著な腸内顆粒の消失がみられた。そこで、各種腸内顆粒を蛍光標識した線虫で RNAi を行ったところ、脂肪滴蛍光標識 DHS-3::GFP 線虫では蛍光が消失し、HEBE 顆粒蛍光標識 HAF-4::GFP 線虫では蛍光陽性の顆粒は減少した。

脂質合成には NADPH が必要だが、この NADPH

を産生するペントースリン酸回路(PPP)に関わる酵素の遺伝子発現にも SREBP の寄与が考えられ、線虫学会では報告されている。PPP を構成する酵素のひとつである tkt-1 遺伝子でも、脂肪滴の減少と共に HEBE 顆粒の消失が観察された。HEBE 顆粒と脂肪滴という特徴的な腸内オルガネラの運動性を指摘できた。

今後は、陽性クローン遺伝子について個別に解析を進めるとともに、線虫データベースを活用して遺伝子間の相互作用を調べ、関連する遺伝子群を割り出し、RNAi ライブラリーに含まれていなかった遺伝子等の RNAi にも取り組んでいく。また、本基盤研究の期間に確立した組織特異的 RNAi 技術等を用いて、組織を超えた遺伝子相互作用も解析していきたい。

HEBE 顆粒を中心とした腸内顆粒の生化学的解析については、顆粒の回収単離技術の向上や別アプローチが必要であり、今後の課題として残った。電子顕微鏡を用いた線虫の超微細構造観察と合わせて、検討していきたい。

スクリーニングでは、ミトコンドリアやたんぱく質の合成や品質管理に関わる遺伝子も多く得られた。オルガネラの連携に関しては、今回主に取り上げた腸内顆粒(HEBE 顆粒、脂肪滴、自家蛍光顆粒、複屈折顆粒)のみならず、ミトコンドリアや小胞体など他のオルガネラとの連携についても今後解析を広げていきたい。

[文献]

- [1] Kawai H et al. (2009) Mol. Biol. Cell. 20, 2979-2990
- [2] Fraser AG et al. (2000) Nature 408, 449-454
- [3] Tanji T et al. (2013) Biochem. J. 452, 467-475

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tanji T, Nishikori K, Haga S, Kanno Y, Kobayashi Y, Takaya M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Shiraishi H, Ohashi-Kobayashi A. Characterization of HAF-4- and HAF-9-localizing organelles as distinct organelles in *Caenorhabditis elegans* intestinal cells. BMC Cell Biol. (2016) 査読有 17:4. doi: 10.1186/s12860-015-0076-2.
- ② Motohashi Y, Ohashi-Kobayashi A, Nakanishi-Matsui M, Fujimoto Y, Maeda, M. Intracellular localization of ABC transporter TAPL differs between transient and stable expression.

CellBio (2014) 査読有 3:50-59.

- ③ Takada K, Obayashi K, Ohashi K, Ohashi-Kobayashi A, Nakanishi-Matsui M, Maeda M. Amino-terminal extension of 146 residues of L-type GATA-6 is required for transcriptional activation but not for self-association. Biochem. Biophys. Res. Commun. (2014) 査読有 452:962-966. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.019.
- ④ Tanji T, Nishikori K, Shiraishi H, Maeda M, Ohashi-Kobayashi A. Co-operative function and mutual stabilization of the half ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9 in *Caenorhabditis elegans*. Biochem. J. (2013) 査読有 452:467-475. doi: 10.1042/BJ20130115.

[学会発表] (計 26 件)

- ① 丹治貴博、白石博久、錦織健児、田邊麻莉、田代翔平、佐藤祐紀、高橋あかね、大橋綾子 線虫における *cdc-48* 遺伝子のノックダウンは、腸細胞内の複屈折性物質の蓄積をもたらす (BMB2015、神戸、平成 27 年 12 月 1 日)
- ② Tanji T, Nishikori K, Haga S, Kobayashi Y, Kanno Y, Shiraishi H, Ohashi-Kobayashi A. Characterization of HEBE granules, novel organelles found in the intestine of well-fed young adult *C. elegans* (20th International *C. elegans* Meeting、ロサンゼルス、米国、平成 27 年 6 月 27 日)
- ③ Nishikori K, Takahashi R, Sato M, Tanji T, Shiraishi H, Ohashi-Kobayashi A. Genes involved in proton transport are required for the formation of HEBE granule, which is a novel aging- and fasting-responsive organelle (20th International *C. elegans* Meeting、ロサンゼルス、米国、平成 27 年 6 月 26 日)
- ④ 丹治貴博、錦織健児、白石博久、大橋綾子 腸の若さの指標としての HEBE 顆粒の可能性～線虫の老化と健康寿命に着目して～ (日本薬学会第 135 年会、神戸、平成 27 年 3 月 28 日)
- ⑤ Shiraishi H, Kamikawara M, Suzuki S, Matsuura E, Ogasawara K, Ishida K, Tohyama K, Nishikori K, Tanji T, Ohashi-Kobayashi A. Age- and nutrition-associated change in the morphology and population of intestinal granules in

Caenorhabditis elegans. (*C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in association with the 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 奈良、平成 26 年 7 月 16 日)

- ⑥ 高橋怜衣、西舘佳祐、錦織健児、丹治貴博、白石博久、大橋綾子 線虫腸内に見られる顆粒状オルガネラの形成に関わる遺伝的要因の解析～V-ATPase を構成する遺伝子の関与～ (第 52 回日本薬学会東北支部大会、仙台、平成 25 年 10 月 20 日)
- ⑦ Kanno Y, Kobayashi Y, Hayashi H, Ueda Y, Tanji T, Nishikori K, Shiraishi H, Ohashi-Kobayashi A. Age-associated replacement of the major *C. elegans* intestinal granules by fat storage organelles during adult stage. (第 86 回日本生化学会大会、横浜、平成 25 年 9 月 12 日)
- ⑧ Shiraishi H, Oikawa T, Ishibashi M, Tanabe M, Asanuma Y, Aoyama R, Nishikori K, Tanji T, Ohashi-Kobayashi A. Genetic requirements of the pentose phosphate pathway for the intestinal granule formation in *C. elegans*. (19th International *C. elegans* Meeting、ロサンゼルス、平成 25 年 6 月 28 日)

[図書 他] (計 5 件)

- ① 大橋 綾子 他 (分担執筆)、東京化学同人、スタンダード薬学シリーズ II 第 4 巻 (2014 年 3 月 30 日発刊)
- ② 大橋 綾子 他 (分担執筆)、南江堂、コンパス生化学 (初版) (2014 年 1 月 15 日発刊)
- ③ 大橋 綾子 他 (分担執筆)「未来をつくるいわての研究者・技術者たち」岩手の女性研究者ロールモデル集
- ④ 大橋 綾子 「若さの象徴 HEBE 顆粒：生体防御を支える膜輸送体から見いだされた新しいオルガネラ～岩手医科大学薬学部生体防御学講座の研究教育活動の紹介～」岩手県薬剤師会誌 2014 第 41 号 6-11 頁
- ⑤ 大橋 綾子 他 (分担執筆)、廣川書店、薬学領域の生化学 (第 2 版) (2013 年 8 月 1 日発刊)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ① ホームページ等
http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page_id=42
- ② アウトリーチ活動
- 平成 27 年度 ひらめき☆ときめき☆サイエンス採択事業「若さって何だろう?～スケルトンボディをもつ「線虫」から学ぶ、老化と遺伝子の関係～ (課題番号 ht27045)」(平成 27 年 7 月 25 日 岩手医科大学)
- 平成 25 年度 県立釜石高等学校スーパーサイエンスハイスクール (SSH) 総合大学 (平成 25 年 9 月 12 日釜石高等学校)、実験科学入門 (平成 25 年 9 月 26 日 岩手医科大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 綾子 (OHASHI-KOBAYASHI, Ayako)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：90272484

(3) 連携研究者

白石 博久 (SHIRAISHI, Hirohisa)
岩手医科大学・薬学部・講師
研究者番号：80393156

丹治 貴博 (TANJI, Takahiro)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：60453320

錦織 健児 (NISHIKORI, Kenji)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：20563844