

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860087

研究課題名(和文)線虫腸細胞内新奇オルガネラの飢餓応答性に関わる分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular basis of the starvation response of novel intestinal organelles in *C. elegans*

研究代表者

丹治 貴博(Tanji, Takahiro)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60453320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：線虫(*C. elegans*)の腸細胞に豊富に存在するHEBE顆粒は、飢餓条件下で急速に分解する。このオルガネラ分解の分子基盤を明らかにするために、RNAiライブラリーを用いた遺伝要因のスクリーニングを行った結果、HEBE顆粒の飢餓による分解が抑制されたのは、いずれも卵形成の異常を示す個体であった。卵への栄養供給に関わる卵黄タンパク質は、腸細胞で特異的に合成・分泌されて卵に取り込まれるが、HEBE顆粒自身は卵黄タンパク質の輸送には関与しないことから、HEBE顆粒が卵への栄養供給に関わる他の栄養因子の貯蔵に関わる可能性や、生殖腺からのシグナルがHEBE顆粒の動態を調節する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The intestinal cells of the nematode *C. elegans* are filled with granular organelles named HEBE granules, which disintegrate rapidly by food deprivation. To clarify the molecular mechanisms underlying the organelle dynamics, I performed RNAi screening using an RNAi feeding library. As a result, all positive clones which suppressed the starvation response of HEBE granules by RNAi also showed the defect in oogenesis. Although HEBE granules do not participate in the transport of vitellogenin which is synthesized in the intestinal cells and utilized as a nutrient source of embryos, HEBE granules may store other excessive nutrients for the future embryos. Alternatively, signaling molecules from gonad may regulate the dynamics of HEBE granules.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝学 栄養シグナル オルガネラ 線虫 飢餓

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は、細胞ごとにその機能に対応したオルガネラを発達させているが、環境の変化に応じて細胞の機能を維持するための適応戦略として、オルガネラのポピュレーションや性質を変化させることが知られている。寒冷環境下で熱産生を亢進するための褐色脂肪細胞中のミトコンドリア数の増加 (Biochem Soc Trans. 14, 223-5 (1986)) や、栄養環境が悪化した時に不要不急のオルガネラを分解して必要なエネルギーや生体成分を捻出するオートファジーの機構 (J Cell Biol. 119, 301-11 (1992)) が、その例として挙げられる。飢餓応答に関わる分子機構としてインスリン様シグナルや TOR (target of rapamycin) シグナルなどが知られているが、哺乳動物のみならずモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* においても、これらのシグナルが様々な生理機能の調節に関与し、線虫個体の栄養環境によってその活性が制御されることが示されており、生物種間で共通した普遍的な分子基盤があることが明らかとなっている (Science. 328, 321-6 (2010))。

私は所属研究室において、線虫の腸細胞オルガネラが飢餓条件下で選択的に減少することを見出した。このオルガネラは直径 1-2 μm と大型の顆粒 (腸内顆粒) であり、哺乳類のリソソームに局在する ABC 輸送体のホモログである HAF-4 及び HAF-9 が膜に特異的に局在するものの内部が非酸性というユニークな特徴を有する (Mol Biol Cell. 20, 2979-90 (2009))。終齢幼虫から若い成虫にかけて腸細胞内に豊富に存在し、加齢に伴い減少することから、HEBE (HAF-4/HAF-9-enriched body evanescent with age) 顆粒と呼んでいる (HEBE という呼称は、栄養成分の貯蔵・供給に働くことと予想していることも踏まえて、ギリシア神話において青春と神々への給仕を司る女神の名前にあやかり命名した)。更に HEBE 顆粒の飢餓応答に関して、1) HAF-4 及び HAF-9 が網目状に局在変化すること、2) 酸性オルガネラの形成不全を示す変異体 (*glo-1*) においても分解が生じること、3) 電子顕微鏡下で HEBE 顆粒を観察すると、細胞内で並行してオートファジーが進行している傍ら、それとは異なる形態変化を示すことを明らかにした。オートファジーにはいくつかのメカニズムが知られているが、動物細胞ではいずれもリソソームを介していることから、オートファジーやリソソームに依存しない未知の機構により HEBE 顆粒が分解していると考えられた。

更に、脂質貯蔵に働く脂肪滴も飢餓に応答して縮小・減少するものの変化が認められるまで 10 時間以上要するのに対して、HEBE 顆粒は約 2 時間で急速に分解することから、単にオルガネラの構成要素の不足というよりも、積極的な分解機構によるものであると考えられ、そこには飢餓を感知する栄養飢餓シ

グナルが関与していると予想された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、線虫 *Caenorhabditis elegans* の腸細胞の新奇オルガネラ HEBE 顆粒に見られる、飢餓応答時の選択的なオルガネラ分解の分子基盤を明らかにすることであり、オルガネラの未知の環境応答機構の解明や代謝疾患の病態解明にも貢献しうると期待している。

細菌食性の線虫では、遺伝子配列に対応する二本鎖 RNA を発現する大腸菌を給餌するだけで、効率的に当該遺伝子産物の産生を抑制する (フィーディング RNAi) ことができる (Genome Biol. 2, RESEARCH0002 (2001))。しかしながら、RNAi 個体の飢餓応答を解析するためには、RNAi 用大腸菌を塗布した寒天培地から線虫を餌のない培地に移さなければならぬため、多検体のスクリーニングは非現実的である。私は種々の検討を重ねた末、咽頭筋特異的二コチン性アセチルコリン受容体 (EAT-2) の機能に重要な EAT-18 の変異体 (*eat-18(ad820)*) を用いることで、フィーディング RNAi を効かせながら、同時にカロリー制限により HEBE 顆粒が形成・維持されなくなる条件を確立した。このスクリーニング系を活用して、約 11,000 クローンを含む RNAi ライブラリー (Open Biosystems 社) を用いて、HEBE 顆粒の飢餓応答に関わる遺伝子を探索した。

3. 研究の方法

(1) 飢餓に応答した HEBE 顆粒の分解に関わる遺伝要因のスクリーニング

デジタル顕微鏡による一次スクリーニング

カロリー制限を模倣した *eat-18(ad820)* に対して RNAi を行うことで HEBE 顆粒が形成されるようになる遺伝子を探索した。成虫初期の線虫腸細胞内には、通常飼育条件下では HEBE 顆粒が豊富に存在するため、飢餓時の HEBE 顆粒の分解は顆粒を標識しなくても光学顕微鏡下で検出できる。そのため、スクリーニングの第一段階では、RNAi 個体を光学顕微鏡下で観察し、対照群と比較して腸内顆粒が増加する RNAi クローンを探索した。更に迅速なスクリーニングを可能にするためにデジタル顕微鏡 (キーエンス社) を使い、寒天培地上の検体をスライドガラスに移すことなく直接顕微鏡下で観察し、腸内顆粒の増加を判定できるようにした。

微分干渉顕微鏡による二次スクリーニング

一次スクリーニングで陽性の RNAi クローンに関しては、RNAi 個体をスライドガラスに移し、微分干渉顕微鏡を用いてより高い精度で腸内顆粒の増加を判定した。また、この段階で陽性の RNAi クローンに対しては、二本鎖 RNA の発現に関わるプラスミド上の塩基配

列をシーケンシングにより確認した。

共焦点レーザー顕微鏡による三次スクリーニング

二次スクリーニングで陽性の RNAi クローンに関しては、HEBE 顆粒を蛍光タンパク質で標識した線虫株 (*eat-18(ad820); ls[haf-4::GFP]*) を用いて RNAi を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて HEBE 顆粒の増加を判定した。

(2) HEBE 顆粒の飢餓応答に必要な遺伝要因の同定

スクリーニング陽性遺伝子の RNAi もしくは変異が HEBE 顆粒の飢餓応答に与える影響の解析

(1) のスクリーニングで得られた陽性クローンに関して、HEBE 顆粒表面を蛍光タンパク質 (GFP) で標識した線虫株 (*ls[haf-4::GFP]*) に対して RNAi を行った後飢餓に曝し、HEBE 顆粒の飢餓応答が抑制されるか調べた。また、可能な場合はこれらの遺伝子の変異体を入手し、*ls[haf-4::GFP]* との掛け合わせ個体を用いて飢餓実験を行い、HEBE 顆粒の飢餓応答が抑制されるか調べた。

HEBE 顆粒の飢餓応答に対するオートファジーの関与

飢餓による HEBE 顆粒の分解がオートファジーに依存しないという仮説を検証するために、オートファジー関連遺伝子変異体 (*atg-2(bp576)*) と *ls[haf-4::GFP]* との掛け合わせ個体を用いて HEBE 顆粒の飢餓応答を解析した。

4. 研究成果

(1) 飢餓に応答した HEBE 顆粒の分解に関わる遺伝要因のスクリーニング

デジタル顕微鏡を用いた一次スクリーニング及び微分干渉顕微鏡を用いた二次スクリーニングにより、腸内顆粒の飢餓応答に関わる遺伝子の候補を 90 得た。更に共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次スクリーニングを行った結果、HEBE 顆粒の飢餓応答に関わる遺伝子の候補を 36 得た。陽性クローンの中には、RNAi により不妊の表現型を示すものが多く、HEBE 顆粒の分解と生殖腺との関連が窺われた。

また、このスクリーニングと並行して行った野生型の線虫に対する RNAi で、HEBE 顆粒の形成異常を生じるクローンを 105 得たが、これらの中には、GFP 陽性顆粒が減少・縮小するもの、GFP の蛍光が繊維状や網目状に観察されるもの、GFP の蛍光と明視野で観察される顆粒の輪郭が一致しないいびつな形態を示すものなど、これまでの明視野観察では区別できない多様な表現型があることが明らかとなった。

(2) HEBE 顆粒の飢餓応答に必要な遺伝要因の

同定

RNAi もしくは変異体を用いた解析の結果、飢餓による HEBE 顆粒の分解が抑制されたのは、いずれも卵形成に異常を示す個体であった。線虫において卵への栄養供給に関わる卵黄タンパク質は、腸細胞で特異的に合成・分泌されて卵に取り込まれる。HEBE 顆粒自身は卵黄タンパク質の輸送には関与しないこと (BMC Cell Biol. 17, 4 (2016)) から、HEBE 顆粒が卵への栄養供給に関わる他の栄養因子の貯蔵に関わる可能性や、生殖腺からのシグナルが HEBE 顆粒のポピュレーションを調節する可能性が考えられた。

また、オートファジー関連遺伝子の変異体では、HEBE 顆粒の飢餓応答は抑えられないことから、HEBE 顆粒の飢餓による分解がオートファジー非依存であることが強く示唆された。

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)

Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Kenji Nishikori, Reiko Aoyama, Kazuaki Ohashi, Masatomo Maeda, Ayako Ohashi-Kobayashi.

Molecular dissection of *Caenorhabditis elegans* ATP-binding cassette transporter protein HAF-4 to investigate its subcellular localization and dimerization.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有
Vol. 490 (2017) pp. 78-83.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.081.

Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Syoko Haga, Yuki Kanno, Yusuke Kobayashi, Mai Takaya, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi.

Characterization of HAF-4- and HAF-9-localizing organelles as distinct organelles in *Caenorhabditis elegans* intestinal cells.

BMC Cell Biol. 査読有

Vol. 17 (2016) p. 4.

DOI: 0.1186/s12860-015-0076-2.

[学会発表](計20件)

Takahiro Tanji, Reiko Aoyama, Kikuko Kawano, Kenji Nishikori, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi.

RNAi screening of genetic factors involved in the response of intestinal granular organelles to trophic conditions in *C. elegans*.

生命科学系学会合同年次大会、2017年

Kenji Nishikori, Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-

Kobayashi.
Involvement of the oligopeptide transporter PEPT-1 in the formation and aging response of intestinal organelle, HEBE granule, in *C. elegans*.
生命科学系学会合同年次大会、2017年
Hirohisa Shiraishi, Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Ayako Ohashi-Kobayashi.
Effects of mutations in autophagy-related genes on the formation and starvation response of *C. elegans* intestinal granules.
生命科学系学会合同年次大会、2017年
丹治 貴博、錦織 健児、白石 博久、大橋 綾子
線虫 p97 ホモログの発現抑制がもたらす腸細胞オルガネラの異常
第 56 回日本薬学会東北支部大会、2017年
Kenji Nishikori, Takahiro Tanji, Reiko Aoyama, Ayumi Hosoda, Kikuko Kawano, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi.
RNAi screening of genetic factors required for the biogenesis of intestinal granular organelles in *C. elegans* – Involvement of intestinal proton transporters.
21st International *C. elegans* Meeting、2017年
井筒 智成、田代 和己、高橋 怜衣、錦織 健児、丹治 貴博、白石 博久、大橋 綾子
線虫腸細胞オルガネラ HEBE 顆粒の形成へのプロトン輸送体の関与
日本薬学会第 137 年会、2017年
中家 実花、向井 清人、丹治 貴博、錦織 健児、白石 博久、大橋 綾子
オートファジー不全をきたす *atg-2* 変異体における線虫腸内顆粒の飢餓応答
第 89 回日本生化学会大会、2016年
Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Reiko Aoyama, Ayumi Hosoda, Kikuko Kawano, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi.
RNAi screening of genetic factors required for the biogenesis of intestinal granular organelles in *C. elegans*.
第 89 回日本生化学会大会、2016年
錦織 健児、高橋 怜衣、佐藤 真美、丹治 貴博、白石 博久、大橋 綾子
オリゴペプチド輸送体 PEPT-1 及びその機能に関わる腸内プロトン輸送体は線虫の加齢・栄養応答性オルガネラ (HEBE 顆粒) の形成に必要である
第 89 回日本生化学会大会、2016年
Hirohisa Shiraishi, Kenji Nishikori, Yuki Sato, Akane Takahashi, Ryo

Kikuchi, Takahiro Tanji, Ayako Ohashi-Kobayashi.
Prominent accumulation of birefringent granules in the *C. elegans* intestinal cells upon RNAi of *cdc-48.1* and *cdc-48.2*.
C. elegans Topics Meeting: Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis, and Small RNAs、2016年
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、2015年
濱田 佳男、錦織 健児、丹治 貴博、白石 博久、大橋 綾子
加齢及び絶食時に線虫腸細胞内に見られる HEBE 顆粒の消失と、それに伴うペプチド輸送体ホモログ (HAF-4、HAF-9) 局在の変化
第 54 回日本薬学会東北支部大会、2015年
Kenji Nishikori, Rei Takahashi, Mami Sato, Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi.
Genes involved in protein transport are required for the formation of HEBE granules, which is a novel aging and fasting-responsive organelle.
20th International *C. elegans* Meeting、2015年
Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Syoko Haga, Yusuke Kobayashi, Yuki Kanno, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi.
Characterization of HEBE granules, novel organelles found in the intestine of well-fed young adult *C. elegans*.
20th International *C. elegans* Meeting、2015年
Hirohisa Shiraishi, Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Ayako Ohashi-Kobayashi.
Characterization of lysosomal peptide transporters and their localizing intracellular organelles in *Caenorhabditis elegans*.
BIT 's 8th PepCon Annual World Protein & Peptide Conference、2015年
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、2015年
Hirohisa Shiraishi, Maya Kamikawara, Seijun Suzuki, Eri Matsuura, Katsutoshi Ogasawara, Kinji Ishida, Koujiro Tohyama, Kenji Nishikori, Takahiro Tanji, Ayako Ohashi-

Kobayashi.
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, 2014 年

Takahiro Tanji, Kenji Nishikori,
Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-
Kobayashi.

DAF-16 and DAF-18 are required for the
normal formation and/or maintenance of
the specific intestinal organelles in
C. elegans.

C. elegans Topics Meeting: Aging,
Metabolism, Stress, Pathogenesis, and
Small RNAs, 2014 年

錦織 健児、丹治 貴博、白石 博久、大橋
綾子

抗原ペプチド輸送体様タンパク質が局在
する線虫新規オルガネラ

日本比較免疫学会第 26 回学術集会、第 25
回日本生体防御学会学術集会合同大会、
2014 年

上川原 麻弥、鈴木 成惇、錦織 健児、丹
治 貴博、松浦 絵里、小笠原 勝利、石田
欣二、遠山 稿二郎、白石 博久、大橋 綾
子

飢餓および加齢に伴う線虫腸細胞内膜構
造の動的変動の観察

日本生化学会東北支部 第 80 回例会・シ
ンポジウム、2014 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹治 貴博 (TANJI, Takahiro)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号: 60453320