

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790154

研究課題名(和文)腸細胞オルガネラの動態を制御する栄養・飢餓シグナルとその伝達経路の解析

研究課題名(英文)Study on nutritional signalings regulating the 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) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：成虫初期の線虫(*C. elegans*)腸細胞に豊富に存在する顆粒状オルガネラは、飢餓条件下で速やかに崩壊する。この崩壊はリソソームの形成不全を示す変異体でも認められることから、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るものと考えられた。このオルガネラ分解を制御する栄養・飢餓シグナルを解析した結果、熱で不活性化する疎水性の栄養因子がオルガネラの形成・維持に必須であること、インスリン様シグナルがオルガネラの動態を制御していることを明らかにした。また、RNA干渉法を利用した遺伝子スクリーニングにより、このオルガネラの形成・維持・崩壊を制御する複数の遺伝因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：The granular organelles that fill the *C. elegans* intestinal cells at the young adult stage deteriorate rapidly by food deprivation. This phenomenon also occurs in the mutant worms defective of the lysosome formation, suggesting that the deterioration is not dependent on autophagy and lysosome. The analyses of the nutritional signalings regulating the organelle revealed that the organelle requires a heat-labile hydrophobic nutrient for its formation and/or maintenance, and that the insulin/insulin-like growth factor signaling modulates the organelle. Furthermore, the multiple genetic factors regulating the formation, maintenance and/or deterioration of the organelle were identified by genetic screening using the RNA interference technique.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：栄養シグナル オルガネラ 線虫 飢餓 インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

従属栄養生物はエネルギー源や生体構成因子として様々な栄養分子を摂取するが、これらの栄養分子は更にシグナル分子としても働き、栄養環境に対する適切な応答を個体に引き起こす (Sci STKE. 2006, re7 (2006))。その例としては、血中のグルコース濃度の上昇がインスリン分泌を促進し血糖値を下げるように働くこと、ロイシンなどの必須アミノ酸が mTOR (mammalian target of rapamycin) を介して S6 kinase を活性化しタンパク質合成を促進すること (J Physiol. 582 Pt 2, 813-23 (2007)) などが挙げられる。多細胞動物として最も単純なモデル生物である線虫 *C. elegans* においても、寿命が短いこと、体の構造が比較的単純な上に透明で観察が容易なこと、といった利点を活かして、飢餓等の栄養条件が性決定 (Science. 302, 1046-9 (2003))・発生 (Science. 305, 1743-6 (2004))・耐性幼虫形成 (IUBMB Life. 61, 607-12 (2009))・寿命 (Nat Rev Genet. 8, 835-44 (2007)) などに与える影響が解析された。その中でも特に、インスリン様シグナル (Insulin/insulin-like growth factor signaling) 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、このような栄養シグナルには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た。

線虫の腸は、栄養成分の吸収・代謝・貯蔵を担う器官であり、栄養シグナルによる生理機能調節を最も強く受けている細胞であると予想される。更にこの器官は、4 個ないし 2 個の上皮細胞が向き合って腸管腔を形成し、全体でもたった 20 個の細胞から成る筒状の単純な構造をしていることから、栄養シグナル等の腸の基本的な生理機能を調べる研究材料として非常に優れていると考えられる。しかしながら、線虫の腸の発生・分化に関わる解析は進んでいるものの、その生理機能に着目した研究は少ないのが実情である。

私の所属研究室ではこれまでに、線虫の腸細胞に発現するペプチド輸送体である HAF-4 及び HAF-9 の解析を進め、これらの膜輸送体タンパク質が終齢幼虫から成虫にかけて腸細胞内を埋め尽くす直径約 2  $\mu\text{m}$  の大型のオルガネラに局在すること、これらの遺伝子欠損変異体ではこのオルガネラの形成不全を起こすことを示してきた。このオルガネラは非酸性ながらリソソームマーカー陽性という、ユニークな特徴を有するリソソーム様オルガネラである (J Cell Sci. 113, 2595-606 (2000)、Mol Biol Cell. 20, 2979-90 (2009))。更に、飢餓条件下でこのオルガネラが選択的かつ急速に減少し、消失することを明らかにした。その際、このオルガネラに特異的に局在する HAF-4 及び HAF-9 が網目状に局在変化することから、オートファジーによって分解されているのではなく、構造が崩壊している

ことが窺える。更に、この崩壊は絶食処理開始わずか数時間で完了することから、単にオルガネラの構成要素の不足というよりも、積極的な崩壊機構によるものであると考えられ、そこには栄養シグナルの欠如もしくは栄養因子の不足を感知する飢餓シグナルによって引き起こされる未知の機構が関与していると思われる。

HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラは、非酸性ながらリソソームマーカー陽性というユニークな特徴を有するものの、その機能は未だ不明である。しかし、線虫の腸が栄養成分の吸収・代謝・貯蔵を担う器官であること、及び飢餓条件下で崩壊することから、ある種の栄養分子の貯蔵庫としての役割を果たしているのではないかと予想される。栄養状態によって生じるオルガネラレベルでの急激な動態変化は、その分子機構や生理的意義も含めて大変興味深い現象である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、線虫 *Caenorhabditis elegans* の腸細胞におけるオルガネラの形成・維持・崩壊を制御する栄養・飢餓シグナルを解析し、栄養環境変化に対応したオルガネラの動態変化に関わる分子基盤を解明することにある。線虫の腸細胞に豊富に存在する HAF-4・HAF-9 陽性のリソソーム様オルガネラは、飢餓条件下で急速に崩壊する。栄養・飢餓シグナル及び、そのシグナルによる生理機能調節に関するシグナル伝達経路とオルガネラの形成・維持・崩壊を結ぶ新たなメカニズムの解明を目指す。

### (1) 飢餓による腸細胞オルガネラ崩壊の経時変化

線虫 (*C. elegans*) の腸細胞には、前述の HAF-4・HAF-9 陽性リソソーム様オルガネラの他に酸性顆粒、脂肪滴といった複数種の顆粒状オルガネラ (腸内顆粒) が存在する。酸性顆粒は飢餓により減少しないが、脂肪滴は、エネルギー源としての脂肪酸の貯蔵形態である中性脂肪の貯蔵オルガネラであることから、飢餓により減少する可能性が考えられた。そこで、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラと脂肪滴の飢餓飼育条件下での経時変化を比較した。

### (2) 摂食障害を示す変異体における線虫腸細胞オルガネラの形成

飢餓条件下での HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの崩壊が、飢餓によるものなのか、それとも餌を感知できないことに伴う神経支配によるものかを明らかにするために、摂食障害を示す変異体において、餌の存在下でこのオルガネラが形成・維持されるか調べた。

### (3) 飢餓による腸細胞オルガネラ崩壊への酸性オルガネラの関与

飢餓条件下での HAF-4・HAF-9 陽性オルガ

ネラの崩壊に、酸性オルガネラ(リソソーム)が関与しているか調べた。

(4) 腸細胞オルガネラの形成・維持・崩壊に関わる栄養因子

飢餓条件下での HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの崩壊の引き金になっているのが、具体的にどの栄養素の欠乏によるものなのかを調べた。

(5) 腸細胞オルガネラの形成・維持・崩壊に関わる遺伝子のスクリーニング

遺伝学的解析手法が確立している線虫の利点を生かして、腸細胞オルガネラの動態変化に与る遺伝要因の網羅的なスクリーニングに着手した。

(6) 腸細胞オルガネラの形成・維持に対するインスリン様シグナルの関与

インスリン様シグナル伝達経路は、線虫において栄養シグナルにより活性化し、寿命や代謝などの様々な生理機能を制御していることが知られている。そこで、インスリン様シグナルが HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの動態に関与しているか調べた。

### 3. 研究の方法

(1) 飢餓による腸細胞オルガネラ崩壊の経時変化

HAF-9::mCherry (蛍光タンパク質 mCherry 融合型 HAF-9) を発現するトランスジェニック線虫と脂肪滴マーカーである DHS-3::GFP 発現線虫を掛け合わせ、同一個体において、両蛍光タンパク質の飢餓条件下での経時変化を解析した。

(2) 摂食障害を示す変異体における線虫腸細胞オルガネラの形成

咽頭筋特異的に発現するニコチン受容体の変異により摂食障害の表現型を示す変異体 *eat-2(ad1116)*、*eat-2(ad465)* や、EAT-2 の機能に重要な EAT-18 の変異体 *eat-18(ad820)*、*eat-18(ad1110)* を用いて、これらの変異体において通常飼育条件下で腸内顆粒が形成されるか解析した。また、これらの変異体をオルガネラマーカー発現線虫と掛け合わせ、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラが形成されているか解析した。

(3) 飢餓による腸細胞オルガネラ崩壊への酸性オルガネラの関与

腸細胞において酸性オルガネラの形成不全を示す変異体 (*glo-1(zu391)*) において、飢餓条件下で腸内顆粒の減少が認められるか解析した。また、この変異体をオルガネラマーカー発現線虫と掛け合わせ、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラへの影響を解析した。

(4) 線虫腸細胞オルガネラの形成・維持・崩壊に関わる栄養因子

既知組成の合成培地を用いた線虫培養系を検討した。線虫の合成培地に関する情報は、Lu & Goetsch (1993) *Nematologica* 39, 303-31 を改変したものを線虫コミュニティより入手しており(私信)、その組成は、糖(2種)・アミノ酸(19種)・核酸(5種)・脂質(2種)・ビタミン(14種)・重金属(6種)など多岐に渡る。また、通常実験室で線虫に餌として与えている大腸菌を分画し、この腸細胞オルガネラの形成・維持に関わる栄養因子を同定するアプローチを試みた。

(5) 腸細胞オルガネラの形成・維持・崩壊に関わる遺伝子のスクリーニング

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餌として与えるだけで、効率的に当該遺伝子産物の産生を抑制する (feeding RNAi) ことができる。腸内顆粒の増減を検出する為の RNAi スクリーニング系の検討を行った。

次いで、確立したスクリーニング系を用いて、腸細胞オルガネラの動態変化に与る遺伝要因のスクリーニングを進めた。具体的には、野生型の線虫に対して RNAi を施した時に腸内顆粒が減少する遺伝子、腸内顆粒が少ない変異体に対して RNAi を施した時に腸内顆粒が増加する遺伝子を同定した。一次スクリーニングで得られた陽性クローンについては、クローンの塩基配列の確認及び追試を随時行い、更にオルガネラマーカーを用いて、どの種類の腸内顆粒に影響を及ぼしているのか、解析を進めた。

(6) 腸細胞オルガネラの形成・維持に対するインスリン様シグナルの関与

インスリン様シグナル受容体である DAF-2、シグナルに拮抗的に働く DAF-18、シグナルにより負に制御される転写因子である DAF-16 の遺伝子欠損変異体 (*daf-2(e1368)*、*daf-18(ok480)*、*daf-16(mgDf50)*) における、腸内顆粒の形成及び飢餓応答を解析した。また、これらの変異体をオルガネラマーカー発現線虫と掛け合わせて、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラへの影響を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 飢餓による腸細胞オルガネラ崩壊の経時変化

脂肪滴が飢餓 12 時間以上経過してから縮小・減少するのに対して、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラは 2 時間以内に崩壊することからより素早い飢餓応答を示すことが明らかとなった。この結果は、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの飢餓応答が、単にオルガネラの構成要素の不足というよりも、栄養・飢餓シグナルによる積極的な崩壊機構によるものであるという仮説を支持している。

(2) 摂食障害を示す変異体における線虫腸細胞オルガネラの形成

*eat-2*, *eat-18* の遺伝子欠損変異体では、餌の存在下でも脂肪滴に加えて HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラが選択的に減少していたことから、外界の餌を知覚できなくなったからではなく、餌を食べられずに飢餓状態に陥ったことでオルガネラ崩壊が生じることが示唆された。

### (3) 飢餓による腸細胞オルガネラ崩壊への酸性オルガネラの関与

HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの飢餓条件下での崩壊は、酸性オルガネラの形成不全を示す変異体でも認められたことから、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分解しているという仮説が裏付けられた。

### (4) 線虫腸細胞オルガネラの形成・維持・崩壊に関わる栄養因子

既知組成の合成培地を用いた線虫培養系では HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラは速やかに消失した。従って、この合成培地にはオルガネラの維持に必要な栄養因子が欠如もしくは不足していると考えられた。

そこで、通常実験室で線虫に餌として与えている大腸菌を分画して、このオルガネラの形成・維持に関わる栄養因子を同定するアプローチを試みた。その過程で、通常与えている生菌の代わりに熱処理（摂氏 65 度）で不活性化した大腸菌を餌として与えると、オルガネラの形成不全・崩壊が生じることが明らかとなった。更に、この崩壊も飢餓条件と同様に HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラ選択的であることを示した。紫外線照射により殺滅した大腸菌では通常通りオルガネラが形成・維持されることから、菌の増殖が抑えられたためではなく、熱処理依存の現象といえる。熱処理によりオルガネラの形成・維持に必要な因子が不活性化した可能性、オルガネラの形成・維持に阻害的に働く因子が誘導された可能性が考えられた。

そこで、どちらのメカニズムによるかを解明するために、熱処理大腸菌と大腸菌破砕液（単独給餌では腸内顆粒は維持）の混合液を与えた結果、腸内顆粒が維持された。この結果から、熱処理により不活性化する因子がオルガネラの形成・維持に必要であると考えられた。更にその因子を同定するために大腸菌破砕液の分画を進め、その因子が水に不溶性の画分にあることを突き止めた。

### (5) 腸細胞オルガネラの形成・維持・崩壊に関わる遺伝子のスクリーニング

マルチウェルプレート上で飼育した線虫を、高解像のデジタル顕微鏡を用いてスライドグラス上にマウントせずに直接観察することで、多検体を効率的にスクリーニングする系を確立した。所属研究室で購入済みの RNAi ライブラリー（Open Biosystems 社）を用いて、腸細胞オルガネラの形成・維持に必

要な遺伝子のスクリーニングを進め、これまでに脂質代謝に関わる遺伝子や pH 環境の維持に関わる遺伝子など、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの形成・維持に必要な複数の遺伝子を同定した。

また、腸内顆粒の崩壊に関与する遺伝子をスクリーニングするための実験系を検討した。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培地から線虫を餌のない培地に移さなければならないため、多検体のスクリーニングは非現実的である。そこで種々の検討を重ねた末、EAT-18 の変異体（*eat-18(ad820)*）を用いることで、feeding RNAi を効かせながら、同時にカロリー制限により HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラが形成・維持されなくなる条件を確立した。RNAi ライブラリーに含まれる約 11,000 クローンのうち、1/4 を超えるクローンをスクリーニングし、腸内顆粒が回復する複数のクローンを得たことからスクリーニング系の有効性が実証された。

### (6) 腸細胞オルガネラの形成・維持に対するインスリン様シグナルの関与

また、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの飢餓応答に、栄養シグナル伝達経路であるインスリン様シグナルが関与しているか解析した。インスリン受容体 (DAF-2) の変異体では、餌のある培地上でもシグナルが伝達されないことから、このオルガネラの維持にシグナルが関与しているならばオルガネラが恒常的に減少する可能性が考えられたが、変異による影響は認められなかった。その一方で、シグナルに拮抗的に働く DAF-18 や、シグナルにより負に制御される転写因子 (DAF-16) の変異体において HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラが多重の膜構造を有すると思われる異常な形態を示すことが明らかになった。これらの変異体では富栄養状態における生理状態を反映していると考えられ、HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラが、飢餓のみならず様々な栄養環境に応じてダイナミックに変動するオルガネラであることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) T. Tanji, K. Nishikori, H. Shiraishi, M. Maeda, A. Ohashi-Kobayashi. Co-operative function and mutual stabilization of the half-type ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9 in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 査読有  
Vol. 452 (2013) pp. 467-475.  
DOI:10.1042/BJ20130115.

〔学会発表〕(計 2 3 件)

- 1) 丹治 貴博, 錦織 健児, 白石 博久, 大橋 綾子, 線虫腸細胞で見出された新奇オル

- ガネラ“HEBE 顆粒”、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、仙台
- 2) 高谷 麻衣、立花 繭子、官野 祐季、丹治 貴博、錦織 健児、白石 博久、大橋 綾子、加齢や栄養環境に依存した線虫腸細胞オルガネラのポピュレーション変化、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、仙台
  - 3) 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、2013 年 10 月 20 日、仙台
  - 4) Syoko Haga, Yusuke Kobayashi, Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi. Classification of *Caenorhabditis elegans* intestinal granules using marker proteins. 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、横浜
  - 5) Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi. Starvation-induced selective decrease of intestinal organelles in *Caenorhabditis elegans*. 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、横浜
  - 6) Yuki Kanno, Yusuke Kobayashi, Hiroyuki Hayashi, Yuki Ueda, Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi. 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、2013 年 9 月 12 日、横浜
  - 7) Hirohisa Shiraishi, Takato Oikawa, Maya Ishibashi, Mari Tanabe, Yumi Asanuma, Reiko Aoyama, Kenji Nishikori, Takahiro Tanji, Ayako Ohashi-Kobayashi. Genetic requirements of the pentose phosphate pathway for the intestinal granule formation in *C. elegans*. 19th International *C. elegans* Meeting. 2013 年 6 月 28 日、米国カリフォルニア州ロサンゼルス
  - 8) Maya Ishibashi, Shohei Tashiro, Mari Tanabe, Yumi Asanuma, Takato Oikawa, Kenji Nishikori, Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi. Exploration and analysis of genetic factors involved in the formation of intestinal granules in *C. elegans* via RNAi method. FAOBMB Mini Symposium 2013. 2013 年 4 月 6 日、矢巾
  - 9) Mio Asanuma, Eisuke Kuroda, Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi. Study on nutrient component required for the formation and maintenance of intestinal granules in *C. elegans*. FAOBMB Mini Symposium 2013. 2013 年 4 月 6 日、矢巾
  - 10) 丹治 貴博、錦織 健児、白石 博久、前田 正知、大橋 綾子、線虫の腸細胞オルガネラに局在する ABC 輸送体 HAF-4 と HAF-9 の多量体形成と相互安定化、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜
  - 11) 黒田 英介、丹治 貴博、錦織 健児、浅沼 美音、白石 博久、大橋 綾子、線虫腸細胞に存在する ABC 輸送体 HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの栄養環境に依存した変動、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜
  - 12) Kenji Nishikori, Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi. Identification of proteins affected by the deletion for *haf-4* and *haf-9*, the intestinal ABC transporter genes in *Caenorhabditis elegans*. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences. 2012 年 9 月 27 日、東京
  - 13) Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Hirohisa Shiraishi, Masatomo Maeda, Ayako Ohashi-Kobayashi. Physical interaction of half ABC transporters HAF-4 and HAF-9, which are required for the biogenesis of the intestinal lysosome-related organelles in *Caenorhabditis elegans*. Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis, and Small RNAs in *C. elegans* Topic Meeting 2012. 2012 年 7 月 13-14 日、米国ウィスコンシン州マディソン
  - 14) Kenji Nishikori, Takahiro Tanji, Eisuke Kuroda, Yuki Ueda, Hirohisa Shiraishi, Ayako Ohashi-Kobayashi. Age-dependent alteration of major large intestinal granules in *Caenorhabditis elegans*. Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis, and Small RNAs in *C. elegans* Topic Meeting 2012. 2012 年 7 月 13-14 日、米国ウィスコンシン州マディソン
  - 15) 丹治 貴博、白石 博久、錦織 健児、大橋 綾子、Mutual stabilization of half-type ABC transporters HAF-4 and HAF-9 in *Caenorhabditis elegans*. 第 84 回日本生化学会年会、2011 年 9 月 22 日、京都

〔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