

線虫の寿命・脂質代謝を制御するインスリン様ペプチドの作用機序

Mode of action of *C. elegans* insulin-like peptides which mediate the longevity and fat metabolism

研究代表者 鳥取大学農学部生産環境化学講座 助教授 河野 強

Associate Professor, Department of Biological and Environmental Chemistry, Tottori University, Tsuyoshi Kawano

共同研究者 東京女子医科大学生理学講座 助教授 三谷昌平

Associate Professor, Department of physiology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine, Shohei Mitani

和文アブストラクト

線虫の寿命・休眠・脂質代謝はインスリンシグナル伝達系で制御されることが知られている。ゲノムプロジェクト情報の解析から、線虫のインスリン様遺伝子は39種存在することが示唆されているが、その生理機能の解析は殆ど進んでいないのが現状である。インスリン様遺伝子の機能解析を行うには、RNA干渉法による機能破壊に加えて、遺伝子破壊線虫の解析が必須となる。また、個々のペプチドの構造と生理機能(寿命・休眠・脂質代謝)との関連付け極めて重要な課題として存在する。今回、我々が先んじて同定したインスリン様ペプチド *Ceinsulin-1* および *-2* の高次構造解析を行い、さらに、遺伝子破壊線虫の作出および解析を行った。また、受容体との結合実験を行うことを目的として、遺伝子工学による *Ceinsulin-3* の大量発現を行った。

Abstract

The insulin-signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans* regulates the longevity, diapause and fat metabolism. The *C. elegans* genome project revealed the existence of 39 insulin-like genes. However, little is known about physiological function of the genes. To elicit the physiological function of each gene, gene-knock-out is inevitable as well as gene-knock-down by the RNAi. Of importance is to connect structure of each peptide to its own physiological function (longevity, diapause or fat metabolism). In this study, we elicit the tertiary structures of the *Ceinsulin-1* and *-2* peptides identified previously. In addition, we established the animals lacking the corresponding gene and analyzed them. We also expressed the *Ceinsulin-3* peptide in a large scale using the recombinant technique to perform binding of the peptide to the receptor protein.

1. 研究目的

線虫 *Caenorhabditis elegans* は、生育環境の悪化に応答して一時的に生育を停止し耐性幼虫を形成することにより休眠する。この耐性幼虫形成はインスリンシグナル伝達系によって制御されることが知られている。最近、このインスリンシグナル伝達系は線虫の寿命・脂質代謝をも制御することが判明した。ごく最近、マウス、ショウジョウバエの寿命も同様のインスリンシグナル伝達系により制御されることが明らかとなった。よって、インスリンシグナル伝達系による寿命制御は動物種に共通であると考えられる。

寿命を制御する線虫のインスリンシグナル伝達系に関する研究はインスリン受容体以降のシグナル伝達を中心に展開されており、リガンド分子であるインスリン様分子を基点とした研究展開は緒に付いたばかりである。ゲノムプロジェクト情報の解析などから、線虫では 39 種のインスリン様分子の存在が示唆されており、多種のリガンド分子による複雑な制御機構が存在するものと考えられる。

本研究では、我々が世界に先駆けて同定したインスリン様ペプチド *Ceinsulin-1, -2, -3* に関して、遺伝子破壊線虫を用いた *in vivo* の解析ならびに *in vitro* での受容体との相互作用の解析を行うことにより、多種のリガンド分子によって制御されるインスリンシグナル伝達系の「入力」機構の解明に迫ることを目的とした。

2. 研究経過

2.1 予想高次構造と受容体認識面の比較

構造と生理機能の関連づけを行うことを目的として、*Ceinsulin-1, -2* の予想高次構造の解析を行った。*Discover III/Insight II* を用いて高次構造を予想し、哺乳動物のインスリンおよびインスリン様成長因子-I (IGF-I) のものと比較した。インスリンと同様に、*Ceinsulin-1, -2* は B ドメインに 2 つの α -ヘリックスを有するが、特徴的な 3 アミノ酸残基 (-Pro-Pro-Gly-) の挿入により α -ヘリックスの 1 つが拡張していると予想された。また、全体的な構造はインスリンおよび IGF-I と大まかに一致していると考えられた (図 1-1)。

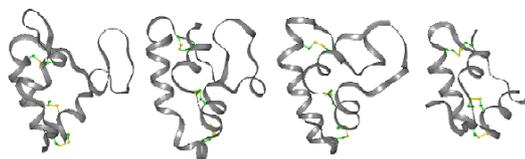


図 1-1. 高次構造の比較

左から IGF-I, *Ceinsulin-1*, *Ceinsulin-2*, *insulin* を示す。それぞれの 3 対のジスルフィド結合を表記してある。

そこで、哺乳動物との交差活性の可能性を検証するために受容体認識面の比較を行った。受容体認識に重要な役割を果たす「分子疎水面」の形状を比較したところ、*Ceinsulin-1, -2* とインスリンの間で異なることから交差活性の可能性は極めて低いと考えた。また、*Ceinsulin-1, -2* の分子疎水面の形状はよく一致しているが、

酸性および塩基性アミノ酸の配置に違いが認められた(図1-2)。

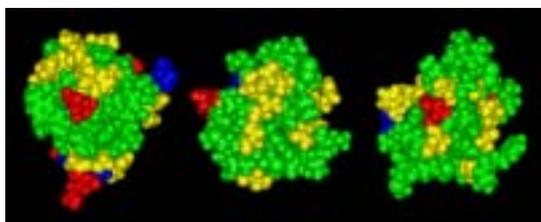


図1-2. 受容体認識面の比較

左から insulin, Ceinsulin-1, Ceinsulin-2 を示す。緑, 黄, 赤, 青はそれぞれ疎水性, 親水性, 酸性, 塩基性アミノ酸を表す。

2.2 インスリン様遺伝子破壊線虫の作出と表現型の観察

Ceinsulin-1, -2 の機能解析を行うことを目的として遺伝子破壊線虫の作出を行った。変異剤 TMP 存在下 UV 照射を行うことにより染色体上にランダムに欠失変異を誘発し, PCR によって増幅される DNA 断片の大きさを指標として, 目的の遺伝子に欠失変異を有する線虫を選別した。その結果, Ceinsulin-1 遺伝子欠失株 tm 339 および Ceinsulin-2 遺伝子欠失株 tm 790 を得た。tm 339, tm 790 はそれぞれ2つのエクソン部位に欠失を有することから, Ceinsulin-1, -2 の産生は不能であると考えられる。繰り返し戻し交雑を行い, 純化を行った後, 表現型の観察を行った。

tm 339 は僅かながら寿命の延長が認められたが, tm 790 は野生株と同様の寿命曲線を示した。これは, RNA 干渉実験結果とよく一致した。次いで, 通常の生育環境下で耐性幼虫形成を観察したところ,

野生株と同様に全く耐性幼虫を形成しなかった。そこで, 耐性幼虫形成誘導フェロモン存在下での耐性幼虫形成率を観察した。高濃度のフェロモン存在下では, tm 339 は対照区と同様の耐性幼虫形成率を示したが, tm 790 では耐性幼虫形成率が低下した。さらに, 低濃度のフェロモン存在下では, tm 339 は耐性幼虫形成率の上昇を示し, tm 790 は耐性幼虫形成率の著しい低下を示した(図2)。受容体 DAF-2 の機能欠損により構成的に耐性幼虫を形成することを考慮すると, Ceinsulin-1 はアゴニストとして機能し, Ceinsulin-2 はアンタゴニストとして機能すると考えられる。

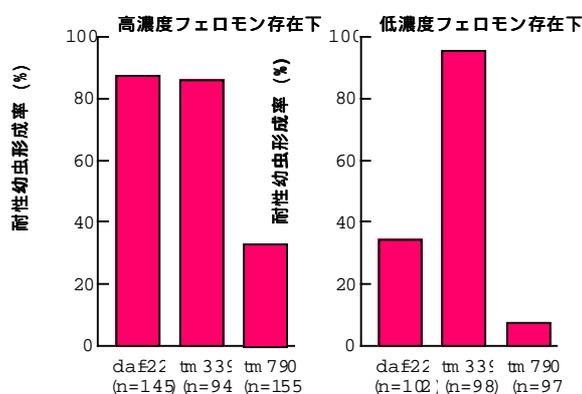


図2. フェロモン存在下での遺伝子欠損株の耐性幼虫形成率

対照区にフェロモン合成不全変異株 daf-22 を用いた。培養液より粗精製したものをフェロモン試料として用いた。

2.3 遺伝子工学による大量発現

遺伝子破壊線虫などを用いた in vivo の研究結果を分子レベルで検証するには,

リガンドと受容体の結合実験など *in vitro* の研究が必要となる。そこで、リガンド分子の調製を目的として、Ceinsulin-3 に関して遺伝子工学による大量発現を行った。マルトース結合タンパクとの融合タンパクとして大腸菌内で発現し、アフィニティー精製後、プロテアーゼにより Ceinsulin-3 部位を遊離させ、逆相 HPLC を用いて最終精製を行った。アミノ酸配列分析で構造を確認後、MALDI-TOF-MS による分子量測定を行った。その結果、3 対のジスルフィド結合が形成されていることが判明した。

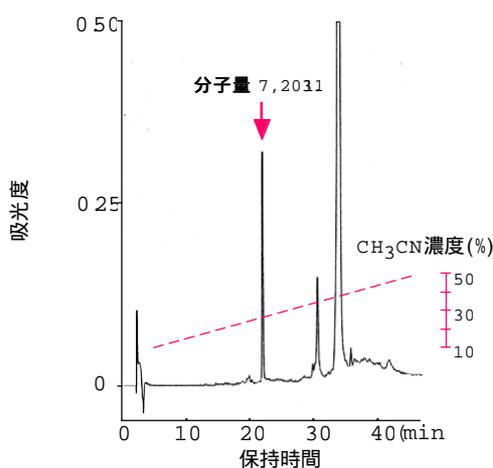


図3. 最終精製の逆相 HPLC プロファイル

3. 研究成果

予想高次構造の解析から、Ceinsulin-1、-2 は同様の構造をとり、同一の受容体を認識すると推定した。また、受容体認識面には僅かな相違が認められた。さらに、遺伝子破壊線虫の解析から、Ceinsulin-1 はアゴニストとして働き、Ceinsulin-2 はアンタゴニストとして働く可能性を示し

た。これまで内因性のホルモンがアンタゴニストとして機能する例は知られていないことから、本研究は極めて重要な発見をもたらしたと考えている。また、遺伝子工学による Ceinsulin-3 の大量発現に成功した。これにより、Ceinsulins と受容体 DAF-2 との結合実験が可能となった。

4. 今後の課題と発展

今後は、Ceinsulins アミノ酸置換体の作出などにより、生理機能を規定するアミノ酸残基の同定が重要となる (*in vivo*)。その結果を受容体との結合実験等で検証し、分子レベルでのインスリン情報伝達系の「入力機構」を明らかにしたい (*in vitro*)。本研究が動物種に共通する休眠・寿命制御機構の解明につながることを期待したい。

5. 発表論文リスト

- (1) Kawano, T., Takuwa, K., Ishiguro, M., Nakajima, T., and Kinura, Y. Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* cDNA encoding a new insulin/IGF-like peptide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2678-2682, (2003).
- (2) Kawano, T., Kataoka, N., Kinura, Y., Gengyo-Ando, K., and Mitani, S. Disruption of the *Caenorhabditis elegans* insulin-like genes Ceinsulin-1 and -2, and analyses of physiological functions. (投稿準備中)
- (3) Kawano, T., Kataoka, N., Masuda, K., and Kinura, Y. Expression of a *C. elegans* IGF-like peptide. *Peptide Science 2003*: M. Ueda (Ed.), 223-226, Protein Research Foundation, Osaka (2004).