

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 29 年 4 月 28 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 鳥取大学大学院
職 名 教授
研 究 代 表 者 河野 強

下記のとおり平成28年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号:16037)

1. 共同研究課題名	インスリン様ペプチドの分泌極性を制御する因子の探索			
2. 共同研究目的	申請者らは、モデル生物 <i>Caenorhabditis elegans</i> を用いて腸で産生されるインスリン様ペプチドの分泌極性が生育状況に応答して可逆的に変動することを発見した(新知見)。このメカニズムの解明を目指して、腸における極性輸送に造詣の深い佐藤健教授と共に、制御因子の探索を行う。			
3. 共同研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平 29 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 河野 強	農学部生物資源環境学科	教授	研究指導・総括	
(分担研究者) 岩崎 崇 原田 敦美 大西 潤実	農学部生物資源環境学科 農学研究科生命資源科学 農学研究科生命資源科学	助教 修士学生 修士学生	蛍光観察と定量解析 変異株の作成と解析 RNAi スクリーニング	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	細胞構造分野	氏 名	佐藤 健

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

報告者らは、線虫の幼虫休眠ならびに成虫寿命を制御するインスリン様ペプチド INS-35, INS-7 が生育環境に応答して分泌極性を可逆的に変動することを明らかにした。また、腸管に蓄積した上記ペプチドが徐々に分解されることを明らかにした。本研究では、この可逆的分泌極性を制御する因子を特定し、その作用機構の解明に迫る。

①検定用線虫 *daf-7(e1372);ins-35p::ins-35::venus;ins-7p::ins-7::mrfp* の作出

②Rab ファミリー遺伝子に対する feeding RNAi の実施

③共焦点レーザー顕微鏡観察による INS-35::VENUS ならびに INS-7::mRFP の局在観察

以上により、可逆的分泌極性を制御する Rab ファミリー遺伝子を特定する。

【検定線虫の作出】

染色体外遺伝子を既存の方法 (Mitani S., *et al. Methods*, 68:397-402, 2014) により染色体内に固定する。

Outcross により不要な変異を除去する。

温度感受性変異株 *daf-7(e1372)* と交雑し、温度シフトにより休眠誘導/休眠打破(蛍光インスリンの分泌方向が偽体腔側/腸管内腔側)可能な線虫を作出する。

【rab RNAi plasmid library の構築】

RT-PCR により rab 部分 cDNA を増幅し、RNAi vector L4440 に組み込む。必要に応じてゲノム断片をクローニングし、inverse PCR によりイントロン部位を除去した後、RNAi vector に組み込む。31 種の plasmids を作成する。

【feeding RNAi の実施と分泌極性変動を制御する rab 遺伝子の特定】

maternal 効果による生育不全の可能性を排除するために、卵から孵化した線虫に対して feeding RNAi (15°C, 16h 以上) を実施し、温度シフト (25.5°C) によりインスリンの分泌方向を腸管内腔側にシフトさせる。さらに、インスリンを腸管内腔側に蓄積した線虫を温度シフト (15°C) し、インスリンの分泌方向を偽体腔側にシフトさせる。蛍光観察により、分泌方向シフトに異常を誘起する RNAi plasmid を特定する。

7. 共同研究の成果

【検定線虫の作出】

計画通りに検定線虫の作出を終え、休眠フェロモンによるインスリン様ペプチドの分泌極性変動と温度感受性変異による分泌極性変動を比較した。両者に殆ど差異は見受けられなかったことから、作出した検定線虫を以降の研究に用いた。ただし、フェロモンによる誘導の場合と同様に INS-7::mRFP の分泌極性の変動は極めて緩やかであったことから、INS-35::VENUS の分泌方向(偽体腔側/腸管内腔側)を指標とした。

【分泌極性の変動に関与する rab 遺伝子の特定】

線虫の rab family 遺伝子31種を標的とした RNAi plasmids を作成し、feeding 法により検定線虫を RNAi 処理した。孵化直後に feeding RNAi を実施し、温度シフトにより分泌方向を偽体腔側から腸管内腔側にシフトさせた。体腔細胞(偽体腔側)の蛍光ならびに腸管内腔の蛍光を指標として分泌方向の変動異常を検出した。

31種の rab family 遺伝子のうち、*rab-8*, *aex-6*, *rab-11.1*, *F53F10.4* に対する RNAi が腸管内腔の蛍光減少ならびに体腔細胞の蛍光増加が認められた(図1)。

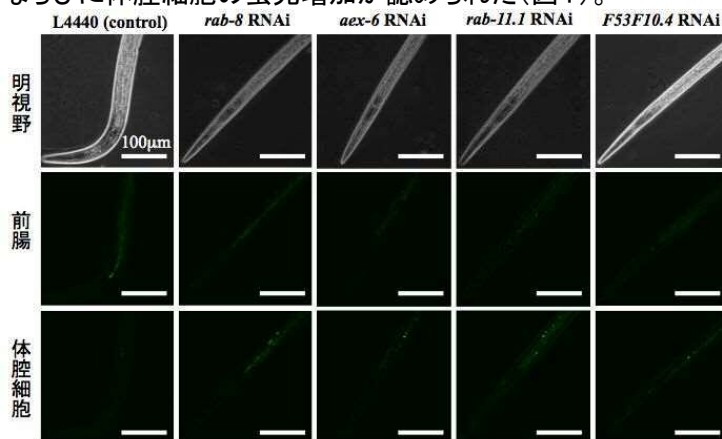


図1. RNAi による腸管側への分泌シフト阻害

これらの遺伝子の機能抑制により腸管内腔側への INS-35::VENUS の分泌シフトが阻害され、INS-35::VENUS の体腔細胞への蓄積が認められた。よって、これらの遺伝子は偽体腔側から腸管内腔側への分泌シフトに関与する、と考えられる。

現在、腸管側から偽体腔側の分泌シフトに関与する遺伝子の RNAi スクリーニングを行っている。

【今後の課題】より明確な表現型を得るために、RNAi 感受性変異、遺伝子破壊の利用ならびに過剰発現が必要であると考えられる。

また、順遺伝学的手法による分泌制御遺伝子の獲得も有効であろうと考えている。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

上述の研究結果にさらなる解析結果を加えて、第54回ペプチド討論会(平成29年11月20日~22日、大阪府立大学)で発表する予定です。