

博士論文

短鎖ペプチドと受容体を基軸とした

線虫 *Caenorhabditis elegans* の

休眠制御機構の解明

(The elucidation of the molecular mechanism underlying  
larval diapause in the nematode *Caenorhabditis elegans*  
through short-chain neuropeptides and their receptors)

2023

鳥取大学大学院 連合農学研究科

生命資源科学専攻 資源利用化学講座

生物有機化学分野

D20A2004H 小野 真弘



## <目次>

### I. 概要

(1) 本文	7
(2) 引用文献	11

### II. 序論

(1) 生物にとっての生理活性ペプチドが果たす役割の重要性	14
(2) 生理活性ペプチド FLP の機能を解明する意義	15
(3) 引用文献	16

### III. 本論

#### 第1章

(1) 緒言	18
(2) 材料と方法	20
(3) 実験結果	24
(4) 考察	39
(5) 引用文献	45
(6) 補足資料	49

#### 第2章

(1) 緒言	54
--------	----

(2) 材料と方法	56
(3) 実験結果	60
(4) 考察	74
(5) 引用文献	77
(6) 補足資料	83

### 第3章

(1) 緒言	93
(2) 材料と方法	95
(3) 実験結果	96
(4) 考察	104
(5) 引用文献	106
(6) 補足資料	108

## IV. 総合討論

(1) ASI 細胞および腸細胞における FLP-6 の分子制御機構	110
(2) FLP-6 受容体の探索および機能解析	115
(3) 幼虫生育を促進する孤児受容体 NPR-15	116
(4) 引用文献	118

V. 謝辞	121
-------	-----

## VI. 卷末

(1) 和文摘要	122
(2) 英文摘要	125
(3) 引用文献	128
(4) 本研究の基礎となる学術論文	131



# I. 概要

## 【本文】

生理活性ペプチドは細胞から細胞への情報伝達を担うホルモンの一種であり、この情報伝達によって生体内の様々な生理機能が調節されるため[1]、生理活性ペプチドの新たな発見や機能解明は、農薬ならびに診断薬・治療薬の開発につながる可能性が高い。生理活性ペプチドのうち、C末端部に Arg-Phe-NH<sub>2</sub> を持つペプチド (RFamide) は動物界に広く存在し[2]、RFamide の発見は C 末端に Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> を持つ神経ペプチド (FMRFamide) の発見に始まる[3,4,5]。

FMRFamide は無脊椎動物に広く存在し、神経伝達物質として侵害刺激回避、温度適応、摂食などの生理機能を制御する。FMRFamide 関連ペプチドは線虫類にも FLP (FMRFamide-Like-Peptide) として広く保存されており、モデル生物・線虫 *Caenorhabditis elegans* にも 31 種の遺伝子が存在する[6]。これまでの研究により、*C. elegans* FLP は運動制御や熱、接触、化学物質等の刺激に対する行動制御に関与することが報告されているが[7,8,9,10]、幼虫休眠制御への関与については殆ど未解明であった。

*C. elegans* は劣悪な生育環境（エサの枯渇、個体密度の上昇、高温）に置かれると、頭部感覚神経で環境因子（エサ、個体密度、温度）の変化を受容・統合した後、下流のホルモンシグナル（TGF- $\beta$ 様シグナルおよび、インスリン様シグナル）を制御することで休眠幼虫へと形態を変化させる[11,12]。しかし、環境因子の変化を受容した後、どのように下流のホルモンシグナルへ情報伝達し、制御するのかは明らかにされていなかった。そこで筆者は、FLP が環境応答因子として下流のホルモンシグナルを制御するという予測の下、休眠制御における FLP お

よび FLP 受容体の機能解析を進めた。

第 1 章では、*flp* 遺伝子破壊線虫に対するスクリーニングで選抜した *flp-6* の機能解析を行った。*flp-6* 遺伝子破壊線虫は最も顕著な休眠率上昇を示した。機能解析の結果、以下のことが明らかとなった。①*flp-6* は休眠抑制遺伝子である。②FLP-6 は生育環境中の休眠誘導フェロモン濃度の上昇（個体密度の上昇）に対する応答性を有する。③FLP-6 はインスリン様シグナルのリガンド分子（DAF-28 および INS-35）の分泌を促進することで、幼虫生育を維持（休眠抑制）する。④FLP-6 は DAF-28 の分泌を産生レベルで制御するが、INS-35 の分泌は産生レベルで制御しない（分泌のみを制御する）。以上を踏まえ、FLP-6 はフェロモン応答因子として、DAF-28 については産生レベルで分泌を促進し、INS-35 については分泌のみを促進することにより幼虫生育を維持する、と結論づけた。

第 2 章では、FLP-6 の受容体同定を目的として、他の生命現象では FLP 受容体として同定された神経ペプチド受容体（Neuropeptide Receptor: NPR）を標的とした研究展開を図った[6]。*npr* 遺伝子ファミリーの中でも、唯一 *npr-15* 遺伝子破壊株が *flp-6* 遺伝子破壊株と同様に顕著な休眠率上昇を示した。NPR-15 の機能解析の結果、以下のことが明らかとなった。①*npr-15* は休眠制御遺伝子である。②NPR-15 は TGF- $\beta$  様シグナルのリガンド分子（DAF-7）の分泌を促進することで、幼虫生育を維持（休眠抑制）する。③NPR-15 は DAF-7 の分泌を転写レベルで制御する。④NPR-15 は G タンパク  $\alpha$  サブユニット（GPA-4）と共役して DAF-7 シグナルを制御する。以上を踏まえ、NPR-15 は GPA-4 と共役し、DAF-7 を転写レベルで促進することで幼虫生育を維持（休眠抑制）する、と結論づけた。FLP-6 ならびに NPR-15 は制御する下流のホルモンシグナル経路が異なることから、遺憾ながら、NPR-15 は FLP-6 受容体ではないと結論付けた。

第 3 章では、FLP-6 の受容体同定のために、NPR 以外の神経ペプチド受容

体に着目した研究展開を図った。*C. elegans* はペプチド受容体と目される GPCR 群として、NPR 以外にも FRPR (FMRFamide Peptide Receptor)を有する[13,14]。そこで、*fipr* 遺伝子破壊線虫に対するスクリーニングを行なったが、*flp-6* 破壊線虫と同様に休眠率上昇を示す遺伝子破壊線虫を見出すことはでなかった。これは、FRPR 群にも FLP-6 受容体は存在しないことを示す。一方、Chai らは、筆者と同様に休眠率変動に着目して GPCR 破壊線虫の探索を行い、NPR ならびに FRPR 以外の NMUR-2, NTR-1, PDFR-1, TKR-2 が幼虫休眠に関与する可能性を示した[15]。従って、これらの遺伝子破壊線虫の休眠率を測定したところ、*ntr-1* 遺伝子破壊株および *tkr-2* 遺伝子破壊株が、*flp-6* 遺伝子破壊株と同様に顕著な休眠率上昇を示した。そこで筆者は、この2種類の遺伝子のうち、休眠制御において重要な役割を果たす ASJ 細胞および腸細胞で発現すると報告されている NTR-1 に着目した[16,17]。NTR-1 が FLP-6 であるという予測（期待）の下、NTR-1 の機能解析を進めた結果、NTR-1 は FLP-6 受容体ではないことが明らかとなった。従って、TKR-2 が FLP-6 受容体の最終候補として期待される。

第1章で着目した FLP-6 はネコブセンチュウ類 (*Meloidogyne* spp.) にも存在することから[18]、本研究はネコブセンチュウ防除を指向した農薬の開発への足がかりになる可能性がある。第2章で着目した NPR-15 はヒト GPR15 のオルソログである[19]。さらに、GPR15 およびヒト TGF- $\beta$ シグナルは癌との関連が報告されている[20,21,22]。ヒト癌研究では GPR15 と TGF- $\beta$ の関係性は未解明であることから、本研究は発癌機構ならびに抗がん剤開発に関する新たな知見を提供する可能性がある。

本研究では、線虫 *C. elegans* の幼虫休眠現象に着目して、短鎖神経ペプチドとその受容体を基軸とした展開を図った。本研究で得られた知見は、*C. elegans* の枠を超え、寄生性線虫、ヒトにまで波及する可能性がある、と考えている。筆者

は、本研究が他の研究へ一石を投じる契機となることを期待したい。

## 引用文献

1. Miyazawa T (2014). 生理活性ペプチドからの GPCR リガンド探索. *Farumashia* 50(9): 882-884.
2. Ubuka T, and Tsutsui K (2014). Evolution of gonadotropin-inhibitory hormone receptor and its ligand. *General and Comparative Endocrinology* 209: 148-161.
3. Price AD, and Greenberg JM (1977). Structure of a Molluscan Cardioexcitatory Neuropeptide. *Science* 197(4304): 670-671.
4. Walker RJ, Papaioannou S and Holden-Dye L (2009). A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoan. *Invertebrate Neuroscience* 9: 111-153.
5. Zatylny-Gaudin C and Favrel P (2014). Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. *Frontiers in Endocrinology* 5(178).
6. Li C and Kim K (September 25, 2008). Neuropeptides. *WormBook*.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_neuropeptides/neuropeptides.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_neuropeptides/neuropeptides.html/)  
(accessed 2023\_05\_05).
7. Chang Y-J, Burton T, Ha L, Huang Z, Olajubelo A, and Li C (2015). Modulation of locomotion and reproduction by FLP neuropeptides in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* 10(9).
8. Chew YL, Tanizawa Y, Cho Y, Zhao B, Yu AJ, Ardiel EL, Rabinowitch I, Bai J, Rankin CH, Lu H, Beets I, and Schafer WR (2018). An afferent neuropeptide system transmits mechanosensory signals triggering sensitization and arousal in *C. elegans*. *Neuron* 99:1233-1246.

9. Marques F, Falquet L, Vandeweyer E, Beets I, and Glauser DA (2021). Signaling via the FLP-14/FRPR-19 neuropeptide pathway sustains nociceptive response to repeated noxious stimuli in *C. elegans*. PLOS GENETICS 17(11).
10. Reilly DK, McGlame EJ, Vandeweyer E, Robidoux AN, Muirhead CS, Northcott HT, Joyce W, Alkema MJ, Gegear RJ, Beets I, and Srinivasan J (2021). Distinct neuropeptide-receptor modules regulate a sex-specific behavioral response to a pheromone. Communications Biology 4(1018).
11. Golden JW, and Riddle DL (1982). A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science 218: 578-580.
12. Hu PJ (August 08, 2007). Dauer. WormBook.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_dauer/dauer.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html/) (accessed 2023\_05\_05).
13. Frooninckx L, Rompay VL, Temmerman L, Sinay VE, Beets I, Janssen T, Husson JS, and Schoofs L (2012). Neuropeptide GPCRs in *C. elegans*. Frontiers in Endocrinology 3(167).
14. Mertens I, Meeusen T, Jansen T, Nachman R, and Schoofs L (2005). Molecular characterization of two G protein-coupled receptor splice variants as FLP2 receptors in *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and Biophysical Research Communications 330: 967-974.
15. Chai MC, Park H, Sternberg WP (2022). Brain-wide bidirectional neuropeptide modulation of individual neuron classes regulates a developmental decision. Current Biology 32: 3365-3373.

16. Hammarlund M, Hobert O, Miller D, and Sestan N. Discovery and analysis of the *C. elegans* Neuronal Gene Expression Network. CeNGEN.  
<https://cengen.shinyapps.io/cengenApp-legacy/> (accessed 2023\_05\_05).
17. Garrison LJ, Macosko ZE, Bernstein S, Pokala N, Albrecht RD, and Bargmann IC (2012). Oxytocin/Vasopressin-Related Peptides Have an Ancient Role in Reproductive Behavior. *Science* 338: 540-543.
18. McCoy CJ, Atkinson LE, Zamanianb M, McVeigha P, Day TA, Kimber MJ, Marks NJ, Maule AG, Mousley A (2014). New insights into the FLPerigic complements of parasitic nematodes: Informing deorphanisation approaches. *EuPA Open Proteomics* 3: 262-272.
19. Guo Y, Zhu Q, Chen S, Li Y, Fu D, Qia D, and Ni C (2021). Post-transcriptional suppression of G protein-coupled receptor 15 (GPR15) by microRNA-1225 inhibits proliferation, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *3 Biotech.* 11(3).
20. Chaudhary PK, and Kim S (2021). An insight into GPCR and G-proteins as cancer drivers. *Cells* 10(12).
21. Zhang M, Zhang YY, Chen Y, Wang J, Wang Q, and Hezhe Lu (2021). TGF- $\beta$  Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9(786728).
22. Baba AB, Rah B, Bhat GR, Mushtaq I, Parveen S, Hassan R, Zargar MH, and Afroze D (2022). Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 13(791272).

## II. 序論

### 【生物にとっての生理活性ペプチドが果たす役割の重要性】

多細胞生物は、生育環境ならびに生体内の状況に呼応して、種々の生理機能の調節を行い生命維持・種の保存に努める。その際、生体内の情報伝達に様々な物質を使用するが、動物界ではホルモンを含む生理活性ペプチドを用いて細胞から細胞への情報伝達を行う場合が多々見受けられる。これらの生理活性ペプチドはそれぞれの受容体を介して細胞内の情報伝達に寄与する[1]。従って、生理活性ペプチド・受容体の新たな発見や機能解明は、農薬ならびに診断薬・治療薬の開発につながる可能性が高く、非常に有意義であると考えられる。脊椎動物・無脊椎動物を問わず、動物界に広く存在する生理活性ペプチドとして、C末端部に Arg-Phe-NH<sub>2</sub> を有するペプチド (RFamide) がある[2]。そもそも、RFamide は *Coturnix japonica* (ニホンウズラ) の間脳視床下部から初めて同定され[3]、RFamide の代表例である神経ペプチド Y (NPY) がヒトの運動制御において重要であることが示された[4]。一方、無脊椎動物における RFamide の発見は C 末端に Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> を有する神経ペプチド (FMRFamide) の発見に端を発し、多くの FMRFamide の発見に至っている[5,6,7]。FMRFamide は無脊椎動物に広く存在し、神経伝達物質として侵害刺激回避、温度適応、摂食などの生理機能を制御する[6,7]。

### 【生理活性ペプチド FLP の機能を解明する意義】

無脊椎動物の中でも、モデル生物である自活性土壌線虫 *Caenorhabditis elegans* を含む線虫類には、FMRFamide 関連ペプチドの FLP (FMRFamide-Like-Peptide) が存在する[8]。 *C. elegans* を用いた研究により、FLP は運動制御や熱、接触、化学物質等の刺激に対する行動制御に関与することが明らかにされている[9,10,11,12]。一方で、環境応答戦略として重要な“休眠”への FLP の関与は殆ど明らかにされていない。休眠は生物にとって重要な生存戦略の 1 つであり、その解明の意義は非常に大きいと考えられる。 *C. elegans* は劣悪な生育環境（エサの枯渇、個体密度の上昇、高温）に置かれると、一時的に生育を停止することで幼虫休眠に至る[13]。 *C. elegans* は頭部感覚神経で環境因子（エサ、個体密度、温度）の変化を受容・統合した後、下流のホルモンシグナル（TGF- $\beta$  様シグナルおよび、インスリン様シグナル）、両ホルモンシグナルの下流に位置するステロイドホルモンシグナルを介して幼虫休眠を制御する[14]。しかし、環境因子の変化を受容・統合した後、どのように下流のホルモンシグナルへ伝達されるのかは、明らかにされていない。そこで筆者は、環境因子により初期発動する神経伝達物質として、FLP が生育環境の変化を下流のホルモンシグナルへと伝達すると予測した。以上を踏まえ、本研究の目的を、FLP および FLP 受容体を基軸とした *C. elegans* の休眠制御機構の解明とした。

## 引用文献

1. Miyazawa T (2014). 生理活性ペプチドからの GPCR リガンド探索. *Farumashia* 50(9): 882-884.
2. Ubuka T, and Tsutsui K (2014). Evolution of gonadotropin-inhibitory hormone receptor and its ligand. *General and Comparative Endocrinology* 209: 148-161.
3. Dockray GJ, Reeve JR Jr, Shively J, Gayton RJ, and Barnard CS (1983). A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature* 305(22): 328-330.
4. Adrian ET, Allen MJ, Bloom RS, Ghatei AM, Rossor NM, Roberts WG, Crow JT, Tatemoto K, and Polak MJ (1983). Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306(8): 584-586.
5. Price AD and Greenberg JM (1977). Structure of a Molluscan Cardioexcitatory Neuropeptide. *Science* 197(4304): 670-671.
6. Walker JR, Papaioannou S, and Holden-Dye L (2009). A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoan. *Invertebrate Neuroscience* 9: 111-153.
7. Zatylny-Gaudin C and Favrel P (2014). Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. *Frontiers in Endocrinology* 5(178).
8. Li C and Kim K (September 25, 2008). Neuropeptides. *WormBook*.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_neuropeptides/neuropeptides.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_neuropeptides/neuropeptides.html/)  
(accessed 2023\_05\_05).

9. Chang YJ, Burton T, Ha L, Huang Z, Olajubelo A, and Li C (2015). Modulation of locomotion and reproduction by FLP neuropeptides in the nematode *Caenorhabditis elegans*. PLOS ONE 10(9).
10. Chew YL, Tanizawa Y, Cho Y, Zhao B, Yu AJ, Ardiel EL, Rabinowitch I, Bai J, Rankin CH, Lu H, Beets I, and Schafer WR (2018). An Afferent Neuropeptide System Transmits Mechanosensory Signals Triggering Sensitization and Arousal in *C. elegans*. Neuron 99(6):1233-1246.
11. Margkues F, Falquet L, Beets I, and Glauser DA (2021). Signaling via the FLP-14/FRPR-19 neuropeptide pathway sustains nociceptive re- sponse to repeated noxious stimuli in *C. elegans*. PLOS Genetics 17(11).
12. Reielly DK, McGlame EJ, Vandewyer, Robidoux A, Muirhead CS, Northcott HT, Joyce W, Alkema MJ, Gegear RJ, Beets I, and Srinivasan J (2021). Distinct neuropeptide-receptor modules regulate a sex-specific behavioral response to a pheromone. Communications biology 4(1018).
13. Golden JW and Riddle DL (1982). A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science 218(5): 578-580.
14. Hu PJ (August 08, 2007). Dauer. WormBook.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_dauer/dauer.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html/) (accessed 2023\_05\_05).

### III. 本論

## 第 1 章

線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド  
FLP の探索と FLP-6 の休眠制御機構

(A search for short-chain neuropeptide FLP that regulates larval diapause in  
the nematode *Caenorhabditis elegans* and the molecular mechanism of  
diapause controlled by FLP-6.)

#### 【緒言】

神経ペプチドである FMRFamide は無脊椎動物で非常に良く保存されている [1,2]。線虫 *Caenorhabditis elegans* は FMRFamide-Like Peptide (FLP) ファミリーを有しており、31 種類の遺伝子によってコードされている [3]。 *C. elegans* の FLP は様々な生理反応（運動、産卵、行動、咽頭薬理、雄の交尾、熱回避、学習と記憶、睡眠様行動、凝集、ストレス応答、代謝、産卵、など）に関わることが明らかとなっている [4-6]。一方、FLP が *C. elegans* の幼虫生育/休眠制御にどのように関与しているのかは未解明である。

*C. elegans* は幼虫生育の過程における生育環境（エサ、個体密度、温度）に応じて通常生育/幼虫休眠を決定し、その決定は TGF- $\beta$  様シグナルとインスリン様シグナル、ならびにこれらの下流に位置するステロイドホルモンシグナルによってなされる [7,8]。しかし、生育環境がどのように上記の制御シグナルに関与す

るかについては明らかにされていない。そこで、筆者らは、神経伝達物質として機能すると期待される FLP が環境応答因子として初期応答し、下流のホルモンシグナルを制御していると予測した。本章では、まず *flp* 遺伝子破壊株に対するスクリーニングを行い、遺伝子破壊により著しい休眠率上昇を示した *flp-6* に着目した研究展開を図った。

## 材料と方法

### 1-1. Strains

通常、大腸菌 OP50 (Caenorhabditis Genetics Center: CGC より提供) を播種した線虫増殖培地 (NGM) プレート上で 20°C に維持した[9]。本研究では CGC ならびに日本の National BioResource Project (NBRP) *C. elegans* から入手した以下の遺伝子破壊株を使用した。*flp-1(ok2781)*IV、*flp-2(ok3351)*X、*flp-3(ok3265)*X、*flp-4(sy1600)*II、*flp-5(tm10075)*X、*flp-6(ok3056)*V、*flp-7(ok2625)*X、*flp-8(pk360)*X、*flp-9(ok2730)*IV、*flp-10(ok2624)*IV、*flp-11(tm2706)*X、*flp-12(ok2409)*X、*flp-13(tm2448)*IV、*flp-14(gk1055)*III、*flp-15(gk1186)*III、*flp-16(ok3085)*II、*flp-17(ok3587)*IV、*flp-18(gk3063)*X、*flp-19(ok2461)*X、*flp-20(ok2964)*X、*flp-21(ok889)*V、*flp-22(gk1201)*I、*flp-23(tm4749)*III、*flp-24(gk309)*III、*flp-25(gk1016)*III、*flp-26(gk3015)*X、*flp-27(tm4612)*II、*flp-28(gk1075)*X、*flp-33(gk1038)*I、*flp-34(ok3071)*V、*daf-22(m130)*II、*daf-28(tm2308)*V、*ins-35(ok3297)*V である。また、遺伝子導入株 *tmEx4088*(*Ex[daf-7p::daf-7::mCherry]*) ならびに、*tmEx4106*(*Ex[daf-28p::daf-28::mCherry]*)[10]を東京女子医科大学・三谷教授から分与いただいた。遺伝子導入株 *mgIs40*(*Is[daf-28p::gfp]*)、*unc-119(ed3)*III; *wwIs39*(*Is[ins-35p::gfp; unc-119]*)を CGC から購入した。さらに本章では、筆者が *tkEx1*(*Ex[flp-6p::flp-6]; flp-6(ok3056)*)、*tkEx2*(*Ex[flp-6p::flp-6]*)、*tkIs1*(*Is[flp-6p::flp-6]*)、*tkEx3*(*Ex[flp-6p::flp-6::mrfp]*)ならびに、*tkEx5*(*Ex[ins-35p::ins-35::mrfp]*)を作出し、使用した(下記参照)。また、多重変異株、*tkEx3; daf-22(m130)*、*tkIs1; tmEx4088*、

*tkIs1; tmEx4106*、*tkIs1; tkEx5*、*tkIs1; daf-28(tm2308)*、*tkIs1; ins-35(ok3297)*、*tkIs1; mgIs40* ならびに、*tkIs1; unc-119(ed3); wwIs39* を交雑により作出した。

## 1-2. plasmid の構築ならびに transgenic worm の作出

### 1-2-1. plasmid の構築

本章で使用した各種プラスミドを以下に示すように構築し、プラスミド増幅には大腸菌 DH5 $\alpha$  (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた。本章で使用した全ての PCR プライマーを補足資料、Supplementary Table 1 に記載する。すべての DNA 増幅を high fidelity PCR により行い、得られたプラスミドの塩基配列を確認（受託配列）の上、使用した。

### 1-2-2. *flp-6* transgene (*flp-6p::flp-6*)

*flp-6* 翻訳領域、上流 4.0 kb、ならびに下流 1.0 kb の配列を含むゲノム断片を、線虫ゲノム DNA を鋳型とした PCR で増幅し、10 x A-attachment mix (TOYOBO) を用いて dA 付着後に pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, USA) に挿入した。

### 1-2-3. *flp-6* reporter gene (*flp-6p::flp-6::mrfp*)

塩基配列確認済みの上記 *flp-6* transgene を鋳型として *flp-6* 翻訳領域（ストップコドンを除く）ならびに上流配列 4.0 kb を含むゲノム断片を増幅し、pHK\_mrfp ベクター（国立遺伝学研究所の鹿児島浩博士から好意により提供）*Sma*I サイトに In-Fusion 法（Clontech, CA, USA）を用いて挿入した。

#### 1-2-4. *ins-35* reporter gene (*ins-35p::ins-35::mrfp*)

*ins-35* 翻訳領域（ストップコドン割愛）ならびに、上流 3.0 kb を含むゲノム断片を、線虫ゲノム DNA を鋳型とした PCR で増幅し、上記と同様にして pHK\_mrfp ベクターに挿入した。

#### 1-2-5. transgenic worms

*flp-6(ok3056)* のレスキュー実験のため、*flp-6p::flp-6* 導入遺伝子 (15 ng/μl) を injection marker である *rol-6* (50 ng/μl)（ノースウェスタン大学・James M. Kramer 博士より提供）と共に *flp-6(ok3056)* の生殖腺に注入することで、*flp-6* レスキュー株（*tkEx1(Ex[flp-6p::flp-6]; flp-6(ok3056))*）を作出した[11]。

*flp-6* 過剰発現実験ため、injection marker である pCFJ90[*myo-2p::mcherry::unc-54 3'-utr*] (10 ng/μl) と共に *flp-6p::flp-6* 導入遺伝子を野生株の生殖腺に注入し、同様の方法で *flp-6* 過剰発現株（*tkEx2(Ex[flp-6p::flp-6])*）を作出[11]。得られた *tkEx2* を染色体内固定（紫外線照射）することにより、安定発現株を作出した[12]。その後、野生株との戻し交配を 5 回行うことで不要な変異を除去し、*flp-6* 過剰発現株（*tkIs1(Is[flp-6p::flp-6])*）として以降の実験に用いた。

FLP-6 分泌の挙動を観察するため、*rol-6* (50 ng/μl) と共に発現プラスミド *flp-6p::flp-6::mrfp* を野生株の生殖腺に注入することで、FLP-6::mRFP 発現株（*tkEx3(Ex[flp-6p::flp-6::mrfp])*）を作出した[11]。

INS-35 分泌の挙動を観察するため、injection marker である *lin-44p::gfp*（東京大学・飯野雄一教授より提供）と共に発現プラスミド *ins-35p::ins-35::mrfp* を野生株の生殖腺に注入することで、INS-35::mRFP 発現株（*tkEx5(Ex[ins-35p::ins-35::mrfp])*）を作出した[11]。

### 1-3. 幼虫休眠率測定

幼虫休眠を誘導するフェロモン粗抽出物[13]の存在下で、ダウアー（休眠幼虫）の形成を試験した。1%の粗フェロモン抽出物（v/v）を含む NGM プレートに大腸菌 OP50 を塗布し、各プレートに約 50 匹の線虫を配置した。線虫株の成虫に 20℃で 2~3 時間産卵させた後、成虫を摘出することで、配置した線虫の生育時期を可能な限り揃えた。20℃で 72 時間培養後、顕微鏡を用いて形状の相違によりダウアー幼虫と非ダウアー幼虫を識別（Figure 2B）し、匹数をカウントした。幼虫休眠アッセイでは、3 枚の独立したプレートを 1 トライアルとしてアッセイした。グループ間の多重比較には Dunnett 検定を用いた。

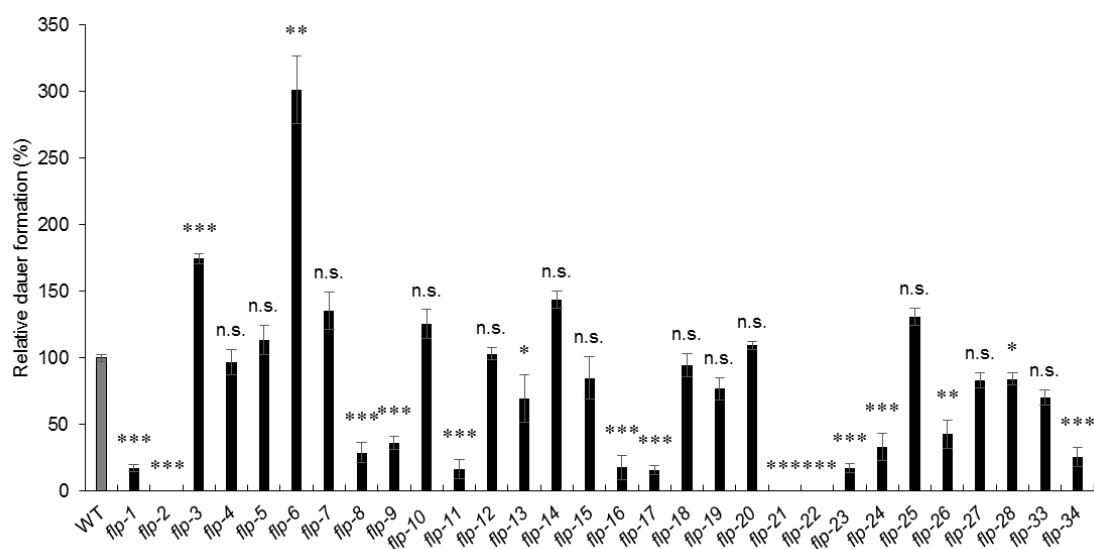
### 1-4. 蛍光測定

蛍光画像の撮影と解析には、FV10i 共焦点レーザー走査型顕微鏡（Olympus, Tokyo, Japan）と FV10-AWS software (Olympus)を用いた。2 群間の蛍光強度の差は、*t*-検定を用いて分析した。0.05 未満の *p* 値の場合は、統計的に有意とみなした。

## 実験結果

### 標的となる *flp* 遺伝子の選抜

線虫 *C. elegans* には 31 種類の *flp* 遺伝子が存在する[6]。本章の対象とすべき *flp* 遺伝子を選抜するため、現存する全ての *flp* 遺伝子破壊線株を入手して、休眠率測定に供した。その結果、Figure 1 に示すように、*flp-3* 遺伝子破壊株 (*flp-3(ok3256)*) と *flp-6* 遺伝子破壊株 (*flp-6(ok3056)*) の 2 種類が休眠率上昇を示し、*flp-6* 遺伝子破壊株の休眠率上昇がより顕著であった。一方、14 種類の遺伝子破壊株が休眠率低下を示した。以上の結果から、休眠率上昇を示した数少ない候補の中でも、より顕著な休眠率の上昇を示した *flp-6* を研究対象とした。



**Figure 1. *flp-6* 遺伝子破壊が最も顕著な休眠率上昇を示す。**

野生株 (N2) の実測値を基準とした、各遺伝子破壊株の相対休眠率を示す。各 mean  $\pm$  sem は 3 枚のプレート (1 トライアル) で休眠率を測定し、算出した。

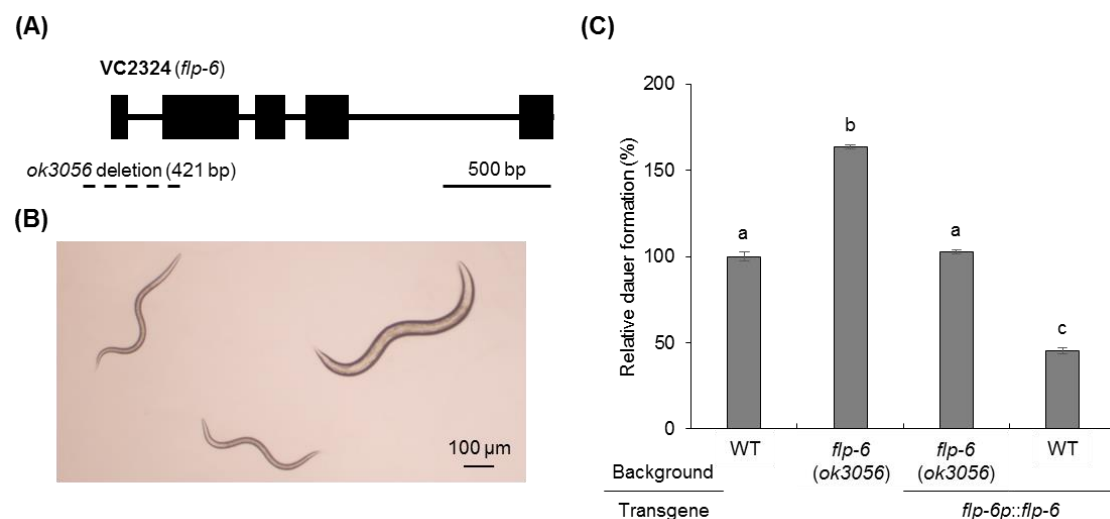
Dunnett 検定を用いて有意差の有無を算出した (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; n.s., not significant)。mean  $\pm$  sem の値、被検体数、試行回数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 2 に示した。

## レスキュー実験

*flp-6* が休眠制御遺伝子であることを立証するため、レスキュー実験を行った。まず、*flp-6* 遺伝子破壊株 (*flp-6(ok3056)*) 中の変異原 (EMS) による不要な変異を除去するため、野生株 (N2) との戻し交雑を 5 回行った後、以下に示す実験に供した。

Figure 2A に示したように、*flp-6(ok3056)* の遺伝子欠損領域は第 1 エキソンと第 2 エキシソンの一部を含む全長 421 塩基である。故に、*flp-6(ok3056)* は幼虫休眠の促進を誘発する機能欠失型の変異株 (*lf*) であり、通常では FLP-6 は通常生育を維持 (休眠を阻害する) と考えられる。そこで、*flp-6(ok3056)* に対して *fp-6* 遺伝子を導入 (レスキュー) することにより N2 との同等の休眠率を示すのか、さらには、野生株に *fp-6* 遺伝子を導入することにより (過剰発現) 休眠率が低下 (通常生育促進) するのかを検証した。

遺伝子破壊株 *flp-6(ok3056)* が N2 と比較して休眠率上昇を示したのに対し、レスキュー株 *tkEx1* が N2 と同等の休眠率の値を示し、さらには過剰発現株 *tkEx2* が *flp-6(ok3056)* とは逆の表現型、つまり休眠率低下を示した (Figure 1C)。以上の結果から、*flp-6(ok3056)* の休眠率上昇は *flp-6* 遺伝子欠損に起因することが明らかとなり、*flp-6* が休眠制御遺伝子であることを立証するに至った。



**Figure 2. *flp-6* 遺伝子は幼虫休眠を阻害するように機能する。**

(A) 四角が *flp-6* のエキソンを示し、破線が *flp-6(ok3056)* の遺伝子欠損領域を示す。(B) 休眠幼虫 (左, 中央) と 4 齢幼虫 (右) を示した。(C) フェロモン添加による休眠誘導条件下での、野生株 (N2) の実測値を基準とした各変異株の相対休眠率を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  を 3 回の休眠率測定で算出した。有意差の有無を Tukey HSD 検定を用いて算出した (異符号間で有意差有り)。 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値、被検体数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 3 に示した。

### 生育環境に対する応答性の有無の検証

*flp-6* が休眠制御遺伝子であることの立証を受けて、FLP-6 が環境応答因子として休眠制御に関わるのかを検証した。エサの枯渇、個体密度の上昇、高温が、休眠誘導を促進する生育環境とされることから[8]、これらの生育環境に対する FLP-6 の応答性を検証することとした。

まず、エサに対する応答性の有無を検証した。エサ (大腸菌 OP50) を培地に添加して生育させた FLP-6::mRFP 発現株 (*tkEx3*) の 2 齢幼虫と、一定期間エサを与えずに生育させた *tkEx3* の 2 齢幼虫を調製した。続いて、体腔細胞内に蓄積し

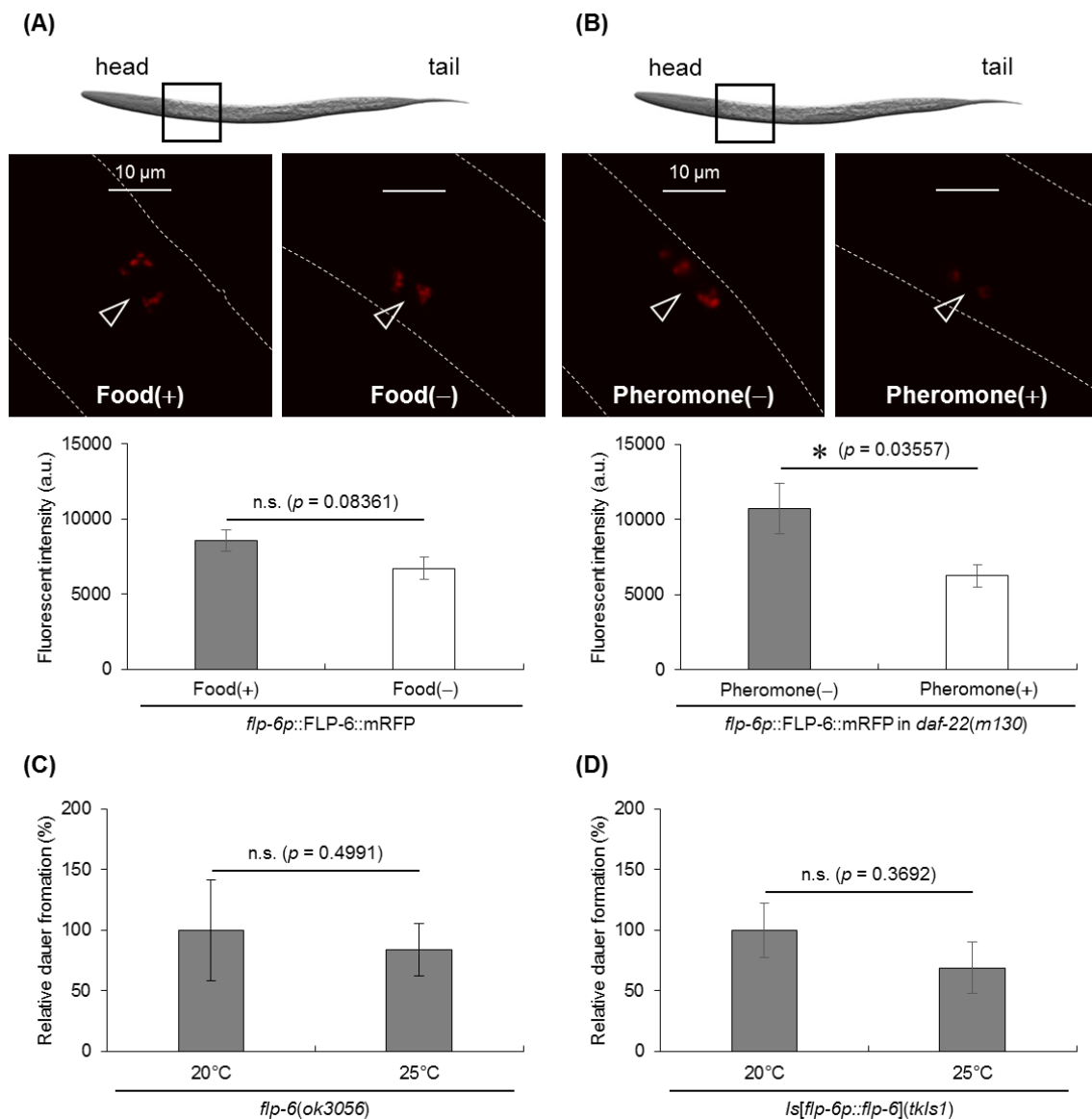
た各 2 齢幼虫の FLP-6::mRFP の蛍光量を、FLP-6 のレポータータンパクとして測定・比較した。体液中へと分泌されたペプチドホルモンの一部は、エンドサイトーシスによって体腔細胞内に取り込まれるため[14]、体腔細胞内に蓄積された FLP-6::mRFP の蛍光量を分泌量の指標とした。体腔細胞は頭部、腹部、尾部の三ヶ所に点在しており、FLP-6 は頭部感覚神経で産生・分泌されていることから[15]、頭部の体腔細胞を蛍光測定の対象とした。その結果、Figure 3A に示すように、エサの有無による FLP-6::mRFP の蛍光量に相違は認められなかった。この結果から、FLP-6 の分泌はエサの有無によって変動せず、FLP-6 はエサ応答性ではないと結論づけた。

次に、個体密度の上昇に対する応答性の有無を検証した。*C. elegans* は休眠誘導フェロモンを継続的に産生・分泌し続けているため[16]、個体密度上昇に伴い生育環境中のフェロモン濃度が上昇し、休眠誘導フェロモンの作用によって幼虫休眠の誘発が促進される。そこで、休眠誘導フェロモンに対する応答性の有無を検証することで、個体密度の上昇に対する FLP-6 の応答性の有無を検証することとした。フェロモン応答性の有無の検証には、*C. elegans* の液体培養濾液より調製したフェロモン粗抽出物を用いた[13]。添加したフェロモンの影響のみに限定するため、フェロモン生合成遺伝子 *daf-22*[16] の破壊条件下での FLP-6 分泌の変動を検証した。FLP-6::mRFP 発現株 (*tkEx3; daf-22(m130)*) をフェロモン粗抽出物添加培地あるいは無添加培地で生育させた 2 齢幼虫を調製した。それぞれの培地で生育させた線虫の頭部体腔細胞内に蓄積した FLP-6::mRFP の蛍光量を測定・比較した。その結果、Figure 3B が示すように、フェロモン添加により FLP-6::mRFP の蛍光量が有意に減少した。この結果から、FLP-6 の分泌はフェロモンに応答して減少し、FLP-6 は個体密度の上昇に対する応答性を有すると推察した。FLP-6 は幼虫生育を維持/促進する機能を有することから、フェロモンに

よる休眠誘導が FLP-6 の分泌を抑制することには齟齬がない、と考えられる。

最後に、高温（25℃）に対する応答性の有無を検証した。*C. elegans* は高温状況に置かれると、自らの生存のために休眠誘導を促進させる[6]。そのため、20℃（通常生育温度）と 25℃（高温）で *flp-6* 遺伝子破壊株（*flp-6(ok3056)*）と *flp-6* 過剰発現株（*tkIs1*）の休眠率測定をそれぞれ行い、さらに 20℃ と 25℃ での野生株（N2）を基準とした各変異株の相対休眠率（遺伝子変異による休眠率の変動具合）をそれぞれ比較することで、高温に対する応答性の有無を検証した。FLP-6 は幼虫生育を維持する（幼虫休眠を阻害）するため、FLP-6 が高温に対する応答性を有するのであれば、温度の上昇による休眠率の上昇は FLP-6 の機能が弱められることで引き起こされる、と考えられる。従って、FLP-6 が温度応答性であれば、*flp-6(ok3056)* は FLP-6 の影響を受けないので、温度の上昇による休眠率の上昇は生じない（20℃ と 25℃ で同等の休眠率の値を示す）と予測される。しかし、N2 は温度の上昇に応じて休眠率が上昇するので、*flp-6(ok3056)* の相対休眠率は 25℃ で低下すると予測される。実際に、20℃ と 25℃ で、それぞれ N2 を基準とした *flp-6(ok3056)* の相対休眠率を算出し、比較したところ、*flp-6(ok3056)* の相対休眠率は 20℃ と 25℃ の間で有意に変動しなかった（Figure 3C）。これは、*flp-6(ok3056)* が N2 と同様に、温度の上昇に応じて休眠率の上昇を示したということである。従って、FLP-6 以外の神経ペプチドが温度の上昇による休眠率の上昇に寄与したと考えられる。同様の実験を *flp-6* 過剰発現株（*tkIs1*）に対しても行った。FLP-6 が温度応答性であれば、FLP-6 の機能が弱められるため、*tkIs1* の休眠率の値は温度の上昇に応じて上昇すると予測される。同様に、N2 の休眠率も温度の上昇に応じて上昇するため、*tkIs1* の相対休眠率は変動しないと予測される。その結果、Figure 3D に示すように、20℃ と 25℃ の間で相対休眠率は有意に変動しなかった。むしろ、有意差こそ無かったものの、相対休眠率の低下を示

した。これは、N2 が温度の上昇による休眠率の上昇を示したのに対して、*tkIs1* は 20℃ と 25℃ の間で同等の休眠率の値を示したということである。従って、FLP-6 は温度上昇の影響を受けていないと考えられる。これらの結果から、FLP-6 は遺伝学的に温度応答性でないと推察した。



**Figure 3. FLP-6 は休眠誘導フェロモンに対する応答性を示す。**

(A) 2 齢幼虫期における、エサを与えた場合とそうでない場合の頭部体腔細胞に蓄積した FLP-6::mRFP の蛍光量を示す。各 mean ± sem はそれぞれの被検体数

(Food(+)=14; Food(-)=16)に応じて算出した。有意差の有無は  $t$ -検定を用いて算出した (n.s., not significant)。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 4 に示した。(B) 2 齢幼虫期における、*daf-22* 遺伝子破壊下でフェロモンを与えた場合とそうでない場合の頭部体腔細胞に蓄積した FLP-6::mRFP の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (Pheromone(+)=8; Pheromone(-)=12) に応じて算出した。有意差の有無は  $t$ -検定を用いて算出した (\*  $p < 0.05$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 4 に示した。(C) コントロールの野生株 (N2) の実測値を基準とした、20℃ および 25℃ での *flp-6* 遺伝子破壊株の相対休眠率を示す。各 mean  $\pm$  sem は 3 回の休眠率測定で算出した。有意差の有無は  $t$ -検定を用いて算出した (n.s., not significant)。mean  $\pm$  sem の値、被検体数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 4 に示した。(D) コントロールの N2 の実測値を基準とした、20℃ および 25℃ での *flp-6* 過剰発現株の相対休眠率を示す。各 mean  $\pm$  sem は 3 回の休眠率測定で算出した。有意差の有無は  $t$ -検定を用いて算出した (n.s., not significant)。mean  $\pm$  sem の値、被検体数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 4 に示した。

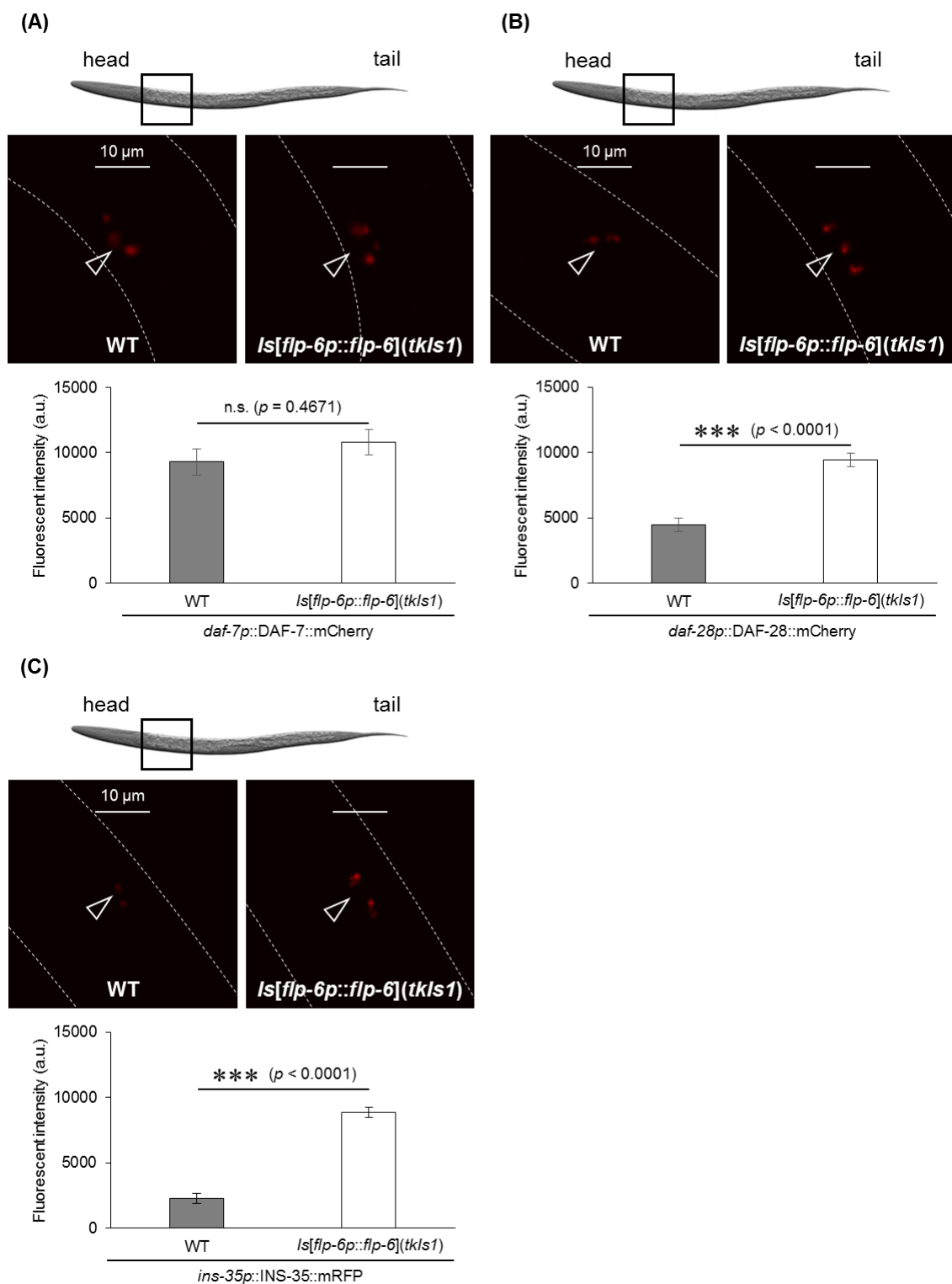
### ホルモンシグナル伝達経路への関与の検証

通常生育/幼虫休眠の決定は、下流のホルモンシグナルである TGF- $\beta$  様シグナル伝達経路 (DAF-7 が唯一のリガンド) ならびにインスリン様シグナル伝達経路 (40 種類のインスリン様ペプチドの存在が推定) によりなされる[8]。40 種類のインスリン様ペプチドのうち DAF-28 が最も優位にインスリン様シグナルを制御する[17,18]。TGF- $\beta$  様シグナルのリガンド DAF-7 ならびにインスリン様シグ

ナルのリガンド DAF-28 は同一の頭部感覚神経細胞（ASI 細胞）で産生・分泌されており、これらリガンド分子の転写はフェロモンの影響を受けることが知られている[17,19,20]。両シグナル伝達の FLP-6 による制御の可能性を検証するため、リガンド分子 DAF-7 ならびに DAF-28 の分泌変動の有無を検討した。まず、DAF-7 レポータータンパク（*daf-7p::DAF-7::mCherry*）を発現する株（*tmEx4088*）を用いて[10]、頭部体腔細胞内に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を測定した。次に、この *tmEx4088* と *flp-6* 過剰発現株（*tkIs1*）を交雑し、*flp-6* 過剰発現下での DAF-7::mCherry（頭部体腔細胞内に蓄積）の蛍光量を同様に測定した。その結果、Figure 4A に示すように、*tmEx4088*（*flp-6* 通常発現）と *tkIs1; tmEx4088*（*flp-6* 過剰発現）で DAF-7::mCherry の蛍光量は同程度であった。さらに、先行研究でも *flp-6* 遺伝子破壊株（*flp-6(ok3056)*）を用いて同様の実験を行ったところ[21]、蛍光量は同程度であった。これらの結果から、FLP-6 は DAF-7 の分泌に影響を及ぼさず、FLP-6 による幼虫休眠の制御は DAF-7 とは無関係であると結論づけた。次に、DAF-28 の分泌に対する FLP-6 の影響を上記と同様の方法で検討した。DAF-28 のレポータータンパク（*daf-28p::DAF-28::mCherry*）を発現する株（*tmEx4106*）を *tkIs1* と交雑させ、頭部体腔細胞に蓄積する DAF-28::mCherry の蛍光量の変動を確認した。*flp-6* 過剰発現下では、蛍光量は有意に増大した（Figure 4B）。さらに、先行研究でも *flp-6(ok3056)*を用いて同様の実験を行ったところ、蛍光量は有意に増大した[21]。これらの結果から、FLP-6 が DAF-28 の分泌を促進することで、通常生育を促進する（幼虫休眠を阻害する）と推察した。

FLP-6 が DAF-7 の分泌に影響を及ぼさず、DAF-28 の分泌を促進することから、FLP-6 は TGF- $\beta$ 様シグナルではなく、インスリン様シグナルに関与することが明らかとなった。40 種類のインスリン様ペプチドのうち、DAF-28 が最も優位にインスリン様シグナルを制御するが、腸での発現が認められている、INS-35 も

休眠制御において重要な役割を果たすことが明らかにされている[22,23]。従って、INS-35 の分泌に対する FLP-6 の影響についても、上記と同様の方法で検討した。INS-35 のレポータータンパク (*ins-35p::INS-35::mRFP*) を発現する株 (*tkEx5*) を *tkIs1* と交雑し、頭部体腔細胞に蓄積する INS-35::mRFP の蛍光量変動を確認したところ、*flp-6* 過剰発現下で蛍光量は有意に増大した (Figure 4C)。さらに、先行研究でも *flp-6(ok3056)* を用いて同様の実験を行ったところ、蛍光量は有意に減少した[21]。これらの結果から、FLP-6 が DAF-28 に加えて INS-35 の分泌を促進することで、通常生育を促進する (幼虫休眠を阻害する) と推察した。



**Figure 4. FLP-6 は DAF-28 および INS-35 の分泌を促進する。**

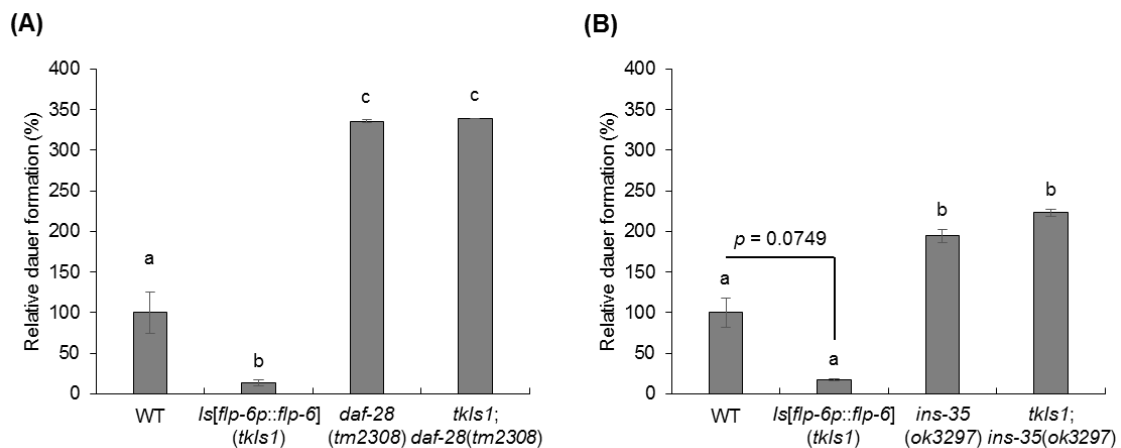
(A) 2 齢幼虫期における、*flp-6* 通常発現下および *flp-6* 過剰発現下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの

被検体数 (WT=20; *Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)*=20) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (n.s., not significant)。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5 に示した。(B) 2 齢幼虫期における、*flp-6* 通常発現下および *flp-6* 過剰発現下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-28::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 20; *Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)*=20) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (\*\*\*)  $p < 0.001$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5 に示した。(C) 2 齢幼虫期における、*flp-6* 通常発現下および *flp-6* 過剰発現下での頭部体腔細胞に蓄積した INS-35::mRFP の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT=20; *Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)*=20) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (\*\*\*)  $p < 0.001$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5 に示した。

### epistasis 解析

FLP-6 が TGF- $\beta$  様シグナル伝達経路ではなく、インスリン様シグナル伝達経路の DAF-28 および INS-35 の分泌を促進することで、幼虫休眠を阻害することが分子遺伝学的に示唆された (Figure 4A, B)。しかし、Figure 4A, B の結果からは、FLP-6 の影響によって DAF-28 および INS-35 の分泌が増大することは明らかにされたが、これらのインスリン様ペプチドの分泌増大によって最終的に幼虫休眠が阻害されることは明らかにされていない。そこで、FLP-6 が DAF-28 を介して最終的に幼虫休眠を阻害しているのかを検証するために、*flp-6* 過剰発現株 (*tkIs1*) と *daf-28* 遺伝子破壊株 (*daf-28(tm2308)*) および *ins-35* 遺伝子破壊株 (*ins-35(ok3297)*) の epistasis (遺伝学的上下関係) 解析を行った。その結果、Figure 5

に示すように、幼虫休眠を抑制する *flp-6* を過剰発現させても、*daf-28(tm2308)* および *ins-35(ok3297)* の幼虫休眠は全く抑制されなかった。この結果から、*daf-28* および *ins-35* は *flp-6* に対して遺伝学的完全上位 (epistatic) であり、*flp-6* は *daf-28* および *ins-35* を介して最終的に幼虫休眠を阻害すると推察した。



**Figure 5.** *daf-28* および *ins-35* は *flp-6* に対して遺伝学的に完全上位である。

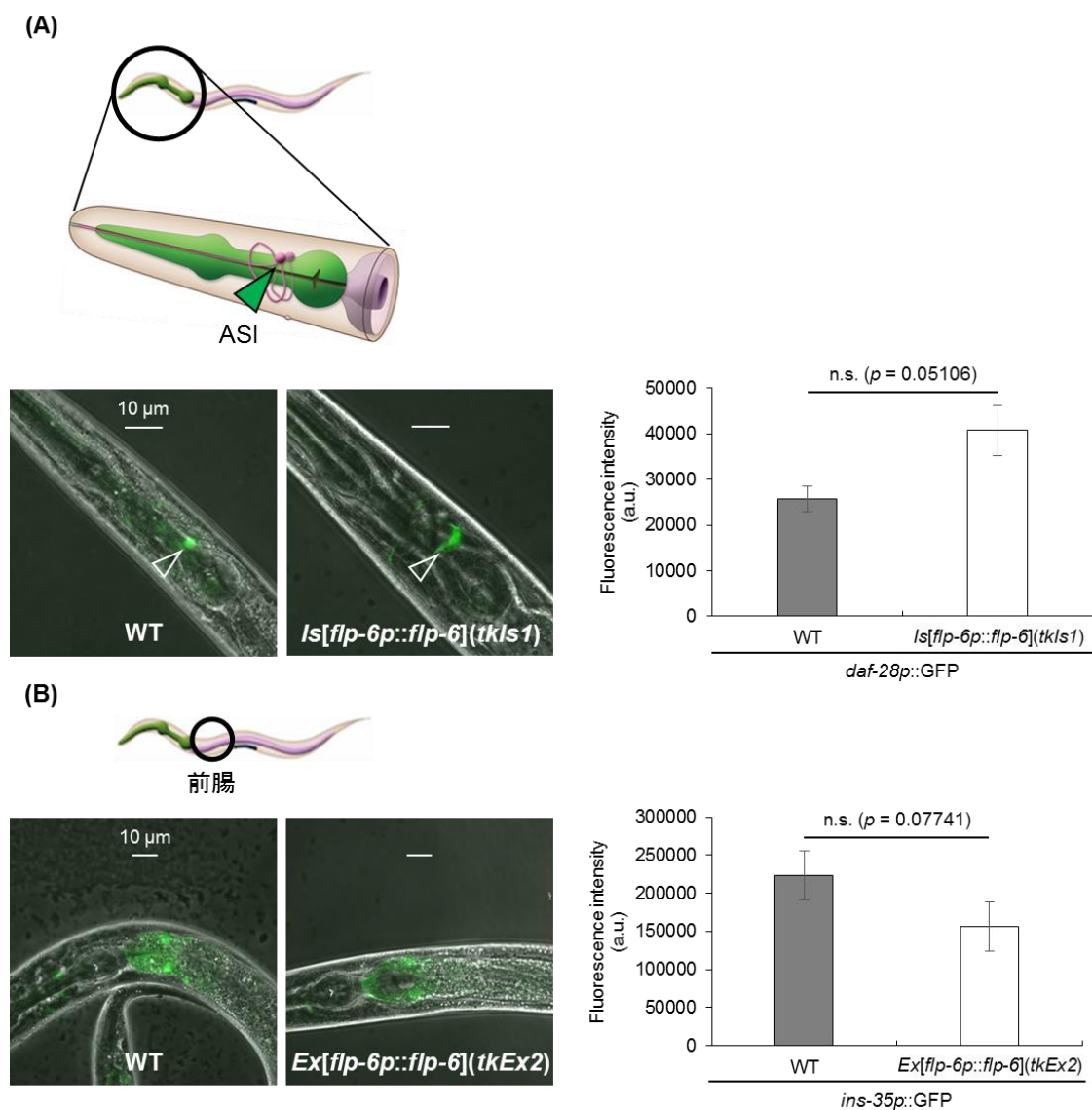
(A, B)フェロモン添加による休眠誘導条件下での、野生株 (N2) の実測値を基準とした各変異株の相対休眠率を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  は3回の休眠率測定で算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した (異符号間で有意差有り)。 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値、被検体数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 6 に示した。

### DAF-28 および INS-35 の産生への関与の検証

FLP-6 の影響によって DAF-28 の分泌が増大することは明らかにされたが (Figure 4B)、それが DAF-28 の産生量増大に起因するものであるのかは不明であった。そこで、FLP-6 による DAF-28 産生制御の可能性を検証することとした。

まず、*daf-28* プロモーター制御下で GFP を発現する株 (*mgIs40*) を用いて、頭部感覚神経 (ASI 細胞) における *daf-28p::GFP* の蛍光量を測定した。次に、この *mgIs40* と *flp-6* 過剰発現株 (*Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)*) を交雑し、*flp-6* 過剰発現下で *daf-28p::GFP* (ASI で発現) の蛍光量を測定した。その結果、Figure 6A に示すように、統計学上の有意差は示さなかったものの *tkIs1; mgIs40* (*flp-6* 過剰発現) で蛍光量が増大した。Figure 4B に示すように、同様の実験で DAF-28 の分泌量も大きく変動した (*flp-6* 過剰発現下で約 2 倍)。以上の結果から、FLP-6 は DAF-28 の産生量を増加させ、結果的に分泌量を増加させることによりインスリン様シグナルを亢進し、幼虫生育を促進 (幼虫休眠を阻害) すると推定した。

DAF-28 の分泌と同様に、INS-35 の分泌も FLP-6 の影響によって増大することが明らかにされた (Figure 4C)。従って、INS-35 についても、分泌量増大が産生量増大に起因するものである可能性が考えられる。そこで、FLP-6 による INS-35 産生制御の可能性を検証した。まず、*ins-35* プロモーター制御下で GFP を発現する株 (*unc-119(ed3); wwIs39*) を用いて、INS-35 の腸 (前腸) における *ins-35p::GFP* の蛍光量を測定した。次に、この *unc-119(ed3); wwIs39* と *flp-6* 過剰発現株 (*tkIs1*) を交雑し、*flp-6* 過剰発現下で *ins-35p::GFP* (前腸で発現) の蛍光量を測定した。その結果、Figure 6B に示すように、*tkIs1; unc-119(ed3); wwIs39* (*flp-6* 過剰発現) で蛍光量は有意に増大しなかった。Figure 5C に示すように、同様の実験で INS-35 の分泌量は大きく変動した (*flp-6* 過剰発現下で約 4 倍)。以上の結果から、FLP-6 は INS-35 の産生は制御せず、分泌量のみを増加させることによりインスリン様シグナルを亢進し、幼虫生育を促進 (幼虫休眠を阻害) すると推定した。



**Figure 6.** FLP-6 は *daf-28* の転写制御に影響を与えるが、*ins-35* の転写制御には影響を与えない。

(A) 2 齢幼虫期における、*flp-6* 通常発現下および *flp-6* 過剰発現下での ASI 細胞に発現した *daf-28p::GFP* の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *ls[flp-6p::flp-6](tkIs1)* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (n.s., not significant)。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 7A に示した。(B) 2 齢幼虫期における、*flp-6* 通常発現下および *flp-6* 過剰発現下での前腸に発現した *ins-35p::GFP* の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$

sem はそれぞれの被検体数 (WT=18; *Ex[flp-6p::flp-6](tkEx2)*=13) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (n.s., not significant)。mean ± sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 7B に示した。

## 考察

第 1 章では、FLP が環境応答因子として初期応答し、下流のホルモンシグナル伝達経路を介して幼虫休眠を調節しているという仮説に基づき、まず、標的となる *flp* 遺伝子の選抜を行った。遺伝子破壊線虫を用いたスクリーニングの結果は、複数の *flp* 遺伝子が、幼虫の発育を抑制または促進する可能性を示すものであった。複数の同種ペプチド遺伝子が幼虫生育を正負に制御する現象は、インスリン様遺伝子の場合にも見受けられる[23,24]。FLP には複数の受容体が存在することが知られており（第 2 章）、一方、インスリン受容体様タンパクは DAF-2 のみである。インスリン様分子の場合には同一受容体を介してアゴニスト・アンタゴニストが幼虫生育を正負に制御するが、FLP の場合には呼応する受容体の相違が幼虫生育を正または負に制御するに至るのではないかと考えている。*flp* 遺伝子破壊株を用いた休眠率測定では、*flp-6* 遺伝子破壊株 (*flp-6(ok3056)*) が最も高い幼虫休眠率を示した。さらに、FLP-6 の分泌量は休眠誘導フェロモンによって減少したことから、FLP-6 が生育環境に対する応答性を有することが示された。これより、筆者は本研究における仮説の一部を実証した。

本章では、FLP-6 が ASI 細胞で産生される線虫インスリン様ペプチドの一つである DAF-28 の産生を調節することにより、最終的に DAF-28 の分泌と幼虫休眠を調節することを示した。ASI 細胞は、通常生育/幼虫休眠を決定する最も重要な神経細胞である[17,19,20,25]。休眠誘導フェロモンの受容体である、DAF-37 が存在する ASI 細胞では、インスリン様ペプチドである DAF-28 だけでなく、TGF- $\beta$ 様分子である DAF-7 も生成する[17,19,20,26]。FLP-6 が DAF-7 には作用せ

ず DAF-28 選択的に作用する点は、極めて興味深い。FLP-6 は DAF-28 の産生を調節することから、FLP-6 による DAF-28 選択的転写促進が、延いてはそれによって DAF-28 の翻訳・分泌量を促進する可能性がある。この可能性を検証するには、FLP-6 の過剰発現下で *daf-28* に対する ASI 細胞特異的 qRT-PCR を実施する必要がある。

本章では、FLP-6 は DAF-28 のみならず、腸細胞で産生されるインスリン様ペプチド INS-35 の分泌を調節することで、最終的に幼虫休眠を調節することも示した。従って、ASI 細胞で産生・分泌された FLP-6 が体液経由で腸にまで到達し、最終的に腸における INS-35 の分泌を制御していると考えられる。FLP-6 は INS-35 の産生を調節しないことから、腸細胞で発現する受容体（未同定）を介して INS-35 の分泌のみを制御し、分泌量を促進する可能性がある。FLP-6 が頭部神経細胞（ASI 細胞）ならびに腸に作用して異なるインスリン様ペプチド（DAF-28, INS-35）を制御する点は、非常に興味深く思われる。

最後に、FLP-6 が幼虫休眠を制御する分子機構を提案する。FLP-6 は ASI 細胞で産生されることが報告されている[15]。さらに、フェロモン受容体 DAF-37 を発現する ASI 細胞では、①DAF-28 の発現は膜結合型グアニル酸シクラーゼ（DAF-11）を介した cGMP 合成によって調節され、②休眠誘導フェロモンはその cGMP 合成に拮抗して幼虫休眠を誘発する、と考えられている[17,26,27,28]。本章では、①FLP-6 分泌量はフェロモンに応答して低下すること、②分泌された FLP-6 は DAF-28 産生調節を介して DAF-28 の分泌量を調節し、通常生育を維持する（幼虫休眠を阻害する）こと、を示した。従って、以下に示すような分子制御機構が考えられる。通常の生育環境下では、FLP-6 は恒常的に分泌されているが、生育環境中のフェロモン濃度が上昇すると、その影響による感覚入力によって cGMP 合成が抑制され、ASI 細胞における FLP-6 分泌が抑えられる(Figure 7A)。

その結果、DAF-28 および INS-35 の分泌も抑えられ、最終的に幼虫休眠の誘発が促進（通常生育の阻害）される。通常の生育状況下では、ASI 細胞で分泌された FLP-6 は DAF-28 の産生を促進することによって、幼虫生育を維持する (Figure 7B)。INS-35 については、通常の生育状況下では、腸にまで到達した FLP-6 が、INS-35 の分泌を促進することで、幼虫生育を維持すると予測される (Figure 7C)。しかし、生育環境中のフェロモン濃度が上昇すると、その影響によって FLP-6 の分泌量が低下する。アデニル酸シクラーゼ (ACY-1) が cAMP 合成を介して cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) を活性化することから [29,30]、FLP-6 分泌の低下によって cAMP 合成が抑制されると、ASI 細胞における DAF-28 の分泌が転写レベルで抑えられ、最終的に幼虫休眠の誘発が促進（通常生育の阻害）される。一方、腸細胞においては、ホスホリパーゼ C (PLC-3) が ITR-1 (イノシトール 1,4,5-トリスリン酸 (IP<sub>3</sub>) 結合ドメイン) を介して細胞内カルシウムイオン濃度を調節することから [31]、FLP-6 分泌の低下によって細胞内カルシウム濃度が低下し、INS-35 の分泌が抑えられ、最終的に幼虫休眠の誘発が促進（通常生育の阻害）される。

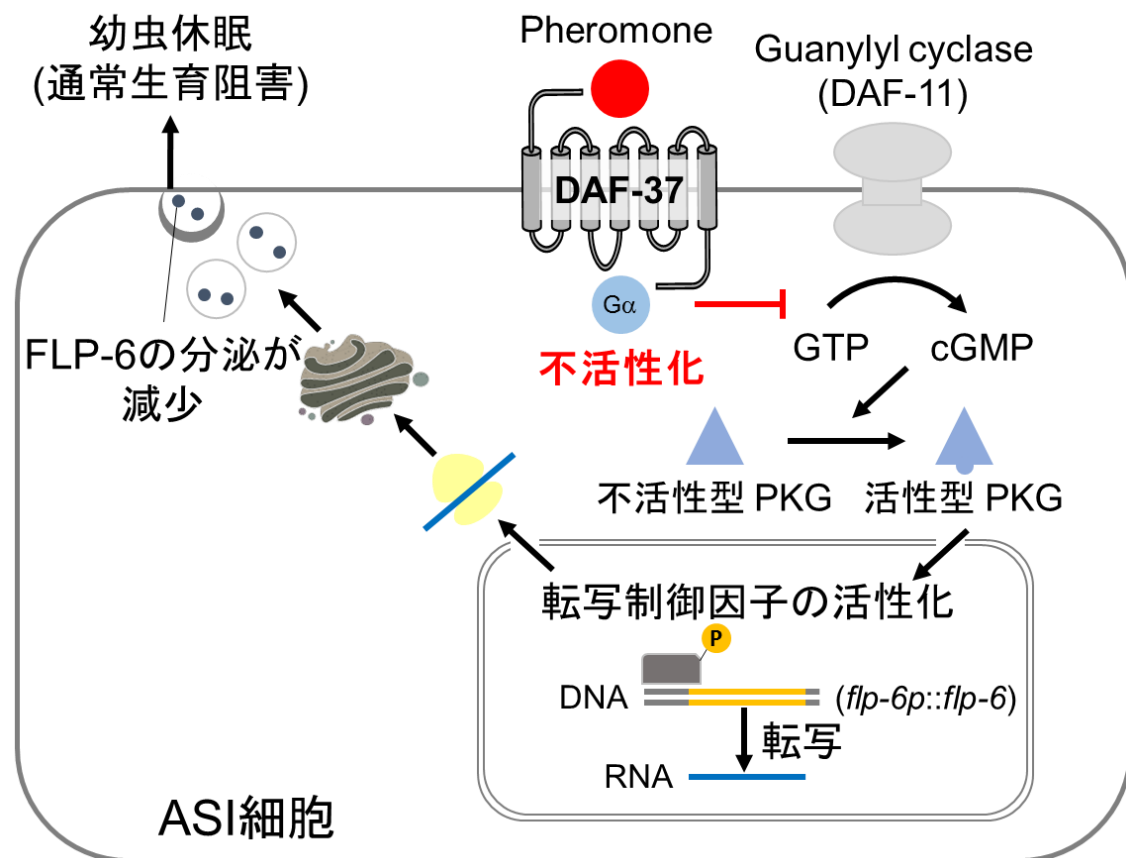


Figure 7A. 休眠誘導フェロモンの感覚入力による FLP-6 の産生・分泌抑制。

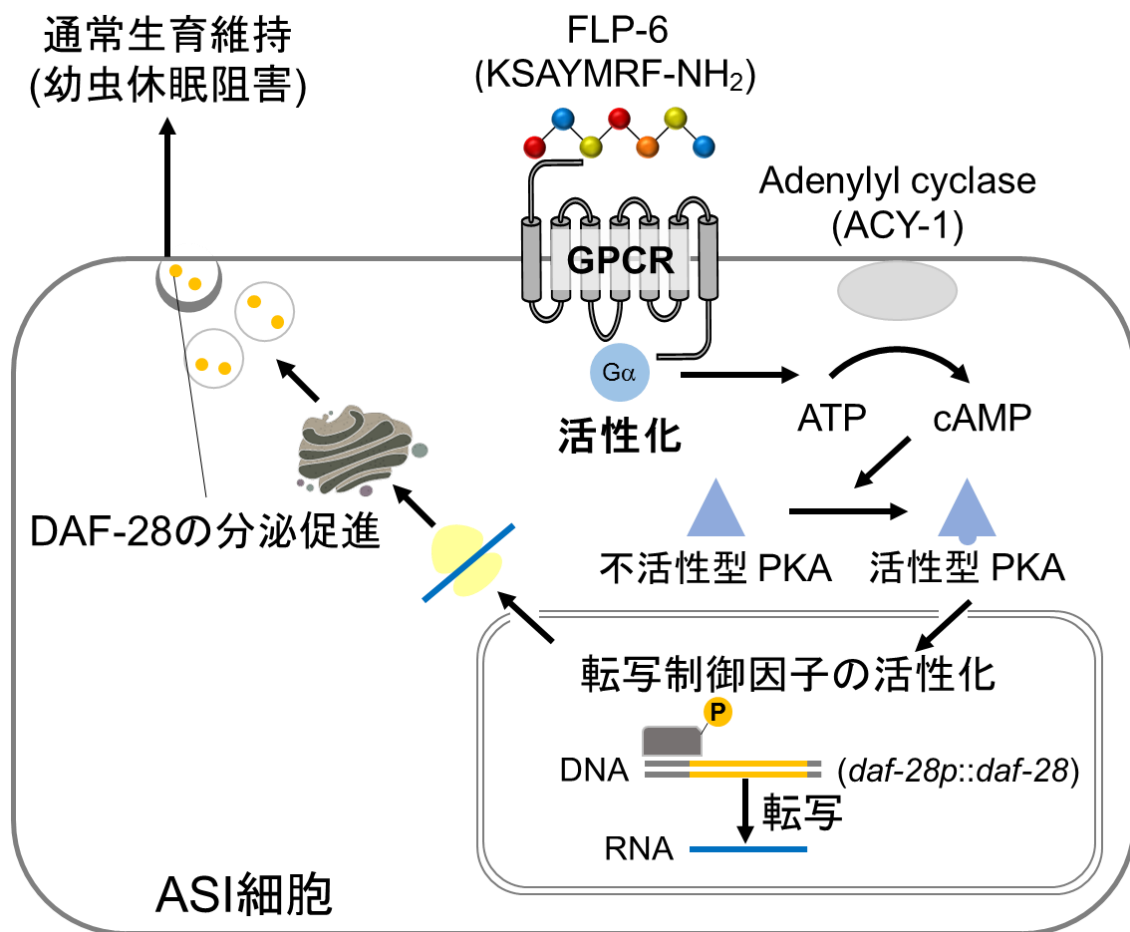


Figure 7B. ASI 細胞における FLP-6 による DAF-28 の産生・分泌抑制。

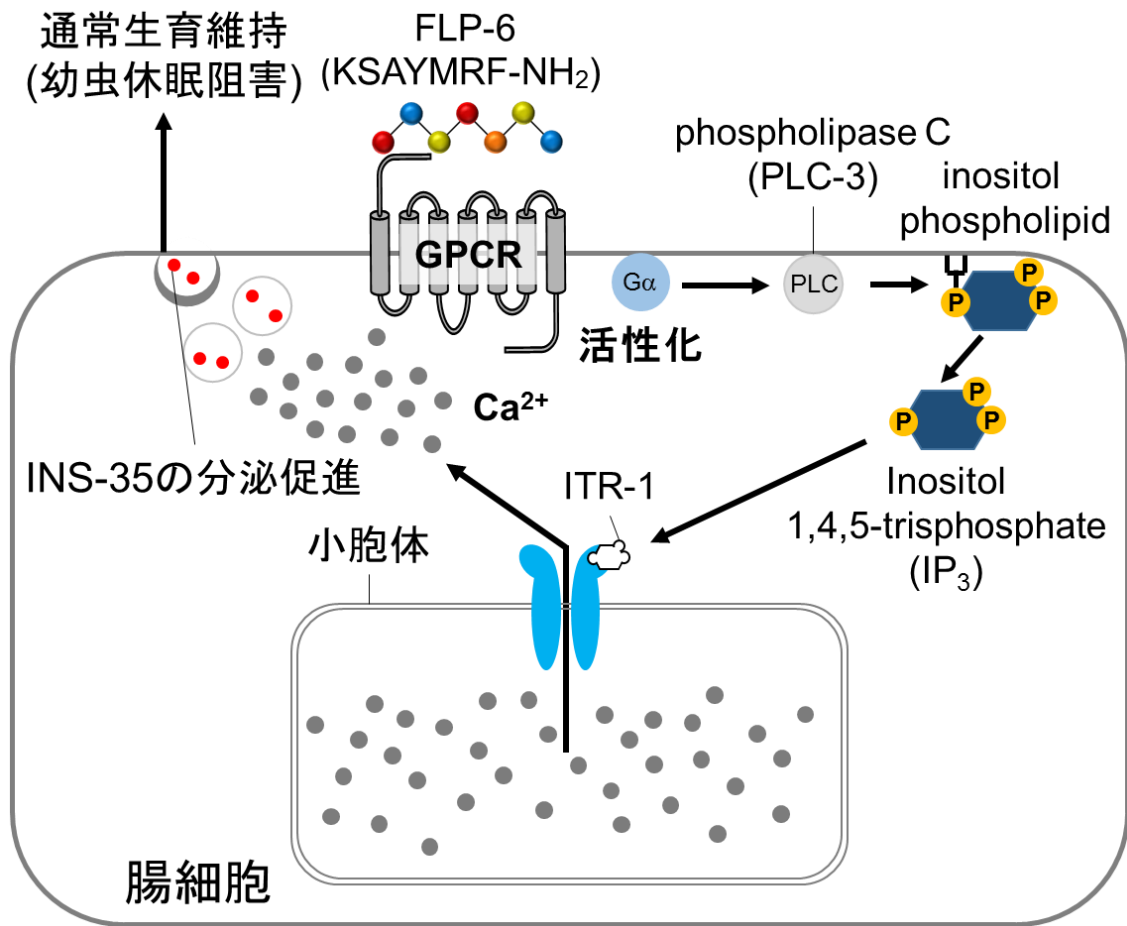


Figure 7C. 腸細胞における FLP-6 による INS-35 の分泌抑制。

## 引用文献

1. Walker RJ, Papaioannou S and Holden-Dye L (2009). A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoan. *Invertebrate Neuroscience* 9: 111-153.
2. Zatylny-Gaudin C and Favrel P (2014). Diversity of the RFamide peptide family in mollusks. *Frontiers in Endocrinology* 5(178).
3. Li C and Kim K (September 25, 2008). Neuropeptides. WormBook.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_neuropeptides/neuropeptides.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_neuropeptides/neuropeptides.html/)  
(accessed 2023\_05\_05).
4. Nagata S (2015) FMRFamides. In: *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*. Academic Press, Cambridge. pp432-433.
5. Orchard I and Lange AB (2013). FMRFamide-Like Peptides (FLPs). In: *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*. Academic Press, Cambridge. pp237-246.
6. Li C and Kim K (2014). Family of FLP peptides in *Caenorhabditis elegans* and related nematodes. *Frontiers in Endocrinology* 5(150).
7. Golden WJ and Riddle LD (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology* 102(2): 368-378.
8. Hu PJ (August 08, 2007). Dauer. WormBook.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_dauer/dauer.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html/) (accessed 2023\_05\_05).

9. Brenner S. (1974). THE GENETICS OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*. Genetics 77(1): 71-94.
10. Yoshina S and Mitani S (2015). Loss of *C. elegans* GON-1, an ADAMTS9 homolog, decreases secretion resulting in altered lifespan and dauer formation. PLOS ONE 10(7).
11. Berkowitz LA, Knight AL, Caldwell GA, and Caldwell KA (2008). Generation of Stable Transgenic *C. elegans* Using Microinjection. Journal of Visualized Experiments 18(833).
12. Kage-Nakadai E, Imae R, Yoshina S, and Mitani S (2014). Methods for single/low-copy integration by ultraviolet and trimethylpsoralen treatment in *Caenorhabditis elegans*. Methods. 68(3): 397–402.
13. Kawano T, Kataoka N, Abe S, Ohtani M, Honda Y, Honda S, and Kimura Y (2005). Lifespan Extending Activity of Substances secreted by the Nematode *Caenorhabditis elegans* That Include the Dauer-Inducing Pheromone. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry 69(12): 2479–2481.
14. Fares H and Greenwald I (2001). Genetic Analysis of Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: Coelomocyte Uptake Defective Mutants. Genetics 159(1): 133-145.
15. Yemini E, Lin A, Nejatbakhsh A, Varol E, Sun R, Mena GE, Samuel ADT, Paninski L, Venkatachalam V, and Hobert O (2020). NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in *C. elegans*. Cell 184(1): 272-288.
16. Butcher RA, Ragains JP, Li W, Ruvkun G, Clardy J, Mak HY (2009). Biosynthesis of the *Caenorhabditis elegans* dauer pheromone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(6): 1875-1879.

17. Li W, Kennedy SG, and Ruvkun, G (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes & Development* 17: 844–858.
18. Fernandes de Abreu DA, Caballero A, Fardel P, Stroustrup N, Chen Z, Lee K, Keyes WD, Nash ZM, Lopez-Moyado IF, Vaggi F, Cornils A, Regenass M, Neagu A, Ostojic I, Liu C, Cho Y, Sifoglu D, Shen Y, Fontana W, Lu H, Csikasz-Nagy A, Murphy CT, Antebi A, Blanc E, Apfeld J, Zhang Y, Alcedo J and Chng Q (2014) An Insulin-to-Insulin Regulatory Network Orchestrates Phenotypic Specificity in Development and Physiology. *PLOS Genetics* 10(3).
19. Ren P, Lim CS, Johnsen R, Albert PS, Pilgrim D and Riddle LD (1996). Control of *C. elegans* Larval Development by Neuronal Expression of a TGF- $\beta$  Homolog. *Science* 274(5291): 1389-1391.
20. Schackwitz WS, Inoue T and Thomas JH (1996). Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* 17(4): 719-728.
21. 荒井千佳子(2017). 線虫 *C. elegans* の休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-6 の機能解析, 鳥取大学農学部生物資源環境学科学士論文(未公刊).
22. Matsunaga Y, Honda Y, Honda S, Iwasaki T, Qadota H, Benian GM and Kawano T (2016). Diapause is associated with a change in the polarity of secretion of insulin-like peptides. *Nature Communications* 7: 10573.
23. Zheng S, Chiu H, Boudreau J, Papanicolaou T, Bendena W and Chin-Sang I (2018). A functional study of all 40 *C. elegans* insulin-like peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 293(43): 16912-16922.
24. Matsunaga Y and Kawano T (2018). The *C. elegans* insulin-like peptides (ILPs). *AIMS Biophysics* 5(4): 217-230.

25. Bargmann CI and Horvitz HR (1991). Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 251(4998): 1243–1246.
26. Park D, O’Doherty I, Somvanshi RK, Bethke A, Schroeder FC, Kumar U and Riddle DL (2012). Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(25): 9917-9922.
27. Vowels JJ and Thomas JH (1994). Multiple chemosensory defects in *daf-11* and *daf-21* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 138(2): 303–316.
28. Birnby DA, Link EM, Vowels JJ, Tian H, Colacurcio PL and Thomas JH (2000). A Transmembrane Guanylyl Cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) Regulate a Common Set of Chemosensory Behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155(1): 85–104.
29. Yu B, Wang X, Wei S, Fu T, Dzakah EE, Waqas A, Walthall WW, and Shan G (2017). Convergent Transcriptional Programs Regulate cAMP Levels in *C. elegans* GABAergic Motor Neurons. *Developmental Cell* 43: 212-226.
30. Xiao Y, Liu F, Zhao PJ, Zou CG, and Zhang KQ (2017). PKA/KIN-1 mediates innate immune responses to bacterial pathogens in *Caenorhabditis elegans*. *Innate Immunity* 23(8): 656-666.
31. Espelt VM, Estevez YA, Yin X, Strange K (2005). Oscillatory Ca<sup>2+</sup> Signaling in the Isolated *Caenorhabditis elegans* Intestine: Role of the Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor and Phospholipases C  $\beta$  and  $\gamma$ . *Journal of General Physiology* 126(4): 379-392.

## 補足資料

**Supplementary table 1. 本章で用いた各プライマーの配列**

primer name		sequence 5' to 3'	
		FW	RV
<i>flp-6(ok3056)</i>	deletion	CTCATCCAAATTCAGACATGTTC ACAACCTGACCTTCGCAGACGT	CGATTTTCGCGAATGAAGCTAGA TCCAGTTGGTCCTTACAAGAGCA
<i>flp-6p::flp-6</i>	rescue	gaggaattcCACAAAGTGCCCGTTGAAACACA	ctgcagCATACACCACTTGGTGATTGCCA
<i>flp-6p::flp-6::mrfp</i>	reporter gene	ctctagaggatcccCACAAAGTGCCCGTTGAAACACA	cctttggccaatcccTCGTCCGAATCTCATGTATGCTGA
<i>daf-22(m130)</i>	deletion	AAGTTTGTTGCCAGTGAA ACTTTTCCGATTTTCCGGTT	CCTGGCTACGTAGTTCCTCAA TCGTTGGAGTCGGTATGACA
<i>daf-28(tm2308)</i>	deletion	GCACCCGATCTGACGACACT ACCGAGAGGTAGGGTAATT	TCCGCCCACTTTGAGCTATA GGGTTATCACTAGGAAGTTG

**Supplementary table 2. Figure 1 のデータの詳細**

Target gene	Absolute	Relative	Number			<i>p</i> value
	dauer formation (%)	dauer fromation (%)	dauer	non-dauer	total (trials)	
Wild type	52.4 ± 2.9	100.0 ± 2.7	1,655	1,513	3,168(13)	
<i>flp-1(ok2781)</i>	7.2 ± 1.1	16.8 ± 2.6	13	166	179(1)	< .0001
<i>flp-2(ok3351)</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0	155	155(1)	< .0001
<i>flp-3(ok3265) bc x 5</i>	94.6 ± 2.1	174.6 ± 3.8	158	9	167(1)	< .0001
<i>flp-4(sy1600)</i>	51.3 ± 5.0	97.0 ± 9.5	100	96	196(1)	1.0000
<i>flp-5(gk3123)</i>	51.6 ± 5.0	113.1 ± 10.9	107	103	210(1)	1.0000
<i>flp-6(ok3265) bc x 5</i>	51.9 ± 4.4	301.4 ± 25.3	116	108	224(1)	0.0041
<i>flp-7(ok2625) bc x 5</i>	72.8 ± 7.5	135.4 ± 13.9	173	64	237(1)	0.1170
<i>flp-8(pk4360)</i>	15.2 ± 4.0	28.7 ± 7.5	43	244	287(1)	0.0004
<i>flp-9(ok2730)</i>	18.3 ± 2.5	35.8 ± 4.9	54	241	295(1)	< .0001
<i>flp-10(ok2624)</i>	58.9 ± 5.0	125.5 ± 10.7	77	54	131(1)	0.9997
<i>flp-11(tm2706)</i>	10.2 ± 4.4	16.7 ± 7.2	18	171	189(1)	< .0001
<i>flp-12(ok2409)</i>	52.5 ± 2.3	103.0 ± 4.5	136	122	258(1)	1.0000
<i>flp-13(tm2448)</i>	27.9 ± 7.1	69.3 ± 17.6	58	153	211(1)	0.0290
<i>flp-14(gk1055)</i>	67.4 ± 3.0	143.6 ± 6.3	101	49	150(1)	0.4771
<i>flp-15(gk1186)</i>	38.7 ± 7.3	84.8 ± 16.0	103	162	265(1)	0.6197
<i>flp-16(ok3085)</i>	12.0 ± 6.1	17.6 ± 9.0	25	164	189(1)	< .0001
<i>flp-17(n4894)</i>	7.9 ± 1.6	15.5 ± 3.1	18	210	228(1)	< .0001
<i>flp-18(gk3063) bc x 5</i>	52.5 ± 4.8	94.3 ± 8.7	131	116	247(1)	1.0000
<i>flp-19(ok2460)</i>	36.0 ± 4.0	76.7 ± 8.4	75	132	207(1)	0.3553
<i>flp-20(ok2964)</i>	55.8 ± 1.5	109.3 ± 2.9	187	148	335(1)	1.0000
<i>flp-21(ok889)</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0	215	215(1)	< .0001
<i>flp-22(gk1201)</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0	45	45(1)	< .0001
<i>flp-23(tm4749)</i>	10.3 ± 2.1	16.9 ± 3.5	19	165	184(1)	< .0001
<i>flp-24(gk3109)</i>	15.5 ± 4.8	32.9 ± 10.2	30	165	195(1)	< .0001
<i>flp-25(gk1016)</i>	66.7 ± 3.3	130.8 ± 6.5	162	81	243(1)	0.5475
<i>flp-26(gk3015)</i>	21.7 ± 5.4	42.7 ± 10.5	50	180	230(1)	0.0021
<i>flp-27(gk3331)</i>	39.0 ± 2.6	83.2 ± 5.6	75	117	192(1)	0.6558
<i>flp-28(gk1075)</i>	76.9 ± 4.2	83.9 ± 4.6	155	46	201(1)	0.0289
<i>flp-33(gk1038)</i>	33.0 ± 2.7	70.4 ± 5.7	58	120	178(1)	0.1629
<i>flp-34(ok3071)</i>	17.5 ± 4.9	25.7 ± 7.2	16	72	88(1)	0.0003

**Supplementary table 3. Figure 2C のデータの詳細**

	Background	Target gene	Absolute dauer formation (%)	Relative dauer formation (%)	dauer	Number non-dauer	total (trials)
1	Wild type	—	56.5 ± 1.4	100.0 ± 2.6	607	483	1,090 (3)
2	<i>flp-6(ok3056)</i>	—	92.4 ± 0.7	163.7 ± 1.3	827	69	896 (3)
3	<i>flp-6(ok3056)</i>	<i>flp-6p::flp-6</i>	58.1 ± 0.7	102.9 ± 1.2	366	257	623 (3)
4	Wild type	<i>flp-6p::flp-6</i>	25.6 ± 1.0	45.4 ± 1.8	177	519	696 (3)

<i>p</i> value		<i>p</i> value	
1 vs 2	< 0.001	2 vs 3	< 0.001
1 vs 3	< 0.001	2 vs 4	< 0.001
1 vs 4	0.233	3 vs 4	< 0.001

**Supplementary table 4. Figure 3 のデータの詳細**

(A)

	Background	Intensity (a.u.)
1	Food(+)	8557.9 ± 707.1
2	Food(−)	6713.1 ± 746.6

(B)

	Background	Intensity (a.u.)
1	Pheromone(+)	10716.6 ± 1679.3
2	Pheromone(−)	6242.5 ± 741.3

(C)

	Background	Temperature	Relative dauer formation to wild type (%)	Relative dauer formation to control (%)	dauer	Number non-dauer	total (trials)	<i>p</i> value
1	<i>flp-6(ok3056)</i>	20 °C	218.8 ± 41.5	100.0 ± 19.0	304	267	571(3)	
2	<i>flp-6(ok3056)</i>	25 °C	182.9 ± 21.4	83.6 ± 9.8	279	330	609(3)	0.4991

(D)

	Background	Temperature	Relative dauer formation to wild type (%)	Relative dauer formation to control (%)	dauer	Number non-dauer	total (trials)	<i>p</i> value
1	<i>Is[flp-6p::flp-6] (tkIs1)</i>	20 °C	19.5 ± 4.6	100.0 ± 23.5	203	1,149	1,352(3)	
2	<i>Is[flp-6p::flp-6] (tkIs1)</i>	25 °C	15.8 ± 3.9	80.9 ± 20.1	196	1,154	1,350(3)	0.3692

### Supplementary table 5. Figure 4 のデータの詳細

(A)		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	9291.6 ± 983.4
2	<i>Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)</i>	10789.9 ± 1556.7

(B)		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	4439.8 ± 513.9
2	<i>Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)</i>	9411.2 ± 470.5

(C)		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	2294.3 ± 338.2
2	<i>Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)</i>	8878.4 ± 1166.2

### Supplementary table 6. Figure 5 のデータの詳細

(A)						
	Target gene	Absolute dauer formation (%)	Relative dauer formation (%)	dauer	Number non-dauer	total (trials)
1	Wild type	29.5 ± 7.5	100.0 ± 25.5	173	420	593 (3)
2	<i>Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)</i>	3.9 ± 1.1	13.3 ± 3.6	30	739	769 (3)
3	<i>daf-28(tm2308)</i>	98.9 ± 0.6	335.7 ± 2.1	536	5	541 (3)
4	<i>tkIs1; daf-28(tm2308)</i>	100.0 ± 0.0	339.4 ± 0.0	584	0	584 (3)

<i>p</i> value		<i>p</i> value	
1 vs 2	0.010	2 vs 3	< 0.001
1 vs 3	< 0.001	2 vs 4	< 0.001
1 vs 4	< 0.001	3 vs 4	0.996

(B)						
	Target gene	Absolute dauer formation (%)	Relative dauer formation (%)	dauer	Number non-dauer	total (trials)
1	Wild type	40.7 ± 18.0	100.0 ± 44.1	272	420	607 (3)
2	<i>Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)</i>	6.9 ± 0.8	17.0 ± 1.9	42	569	611 (3)
3	<i>ins-35(ok3297)</i>	79.1 ± 8.1	194.4 ± 20.0	468	122	590 (3)
4	<i>tkIs1; ins-35(ok3297)</i>	90.8 ± 4.3	223.1 ± 10.6	555	55	610 (3)

<i>p</i> value		<i>p</i> value	
1 vs 2	0.075	2 vs 3	0.002
1 vs 3	0.046	2 vs 4	0.001
1 vs 4	0.014	3 vs 4	0.716

Supplementary table 7. Figure 6 のデータの詳細

(A)

	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	25720.6 ± 2783.0
2	<i>Is[flp-6p::flp-6](tkIs1)</i>	40715.9 ± 5484.3

(B)

	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	223052.9 ± 32080.9
2	<i>Ex[flp-6p::flp-6](tkEx2)</i>	155915.1 ± 17353.7

## 第2章

線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド

受容体 NPR-15 の休眠制御機構

(The mechanism of diapause control of short-chain neuropeptide receptor NPR-15 that regulates larval diapause in the nematode *Caenorhabditis elegans*.)

### 【緒言】

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、様々な生理機能を制御する膜貫通型受容体の主要なスーパーファミリーである。ヒトでは、800 以上の GPCR が同定されており、ヒト遺伝子の約 5% を占めている[1,2]。これらの受容体は、主要な生理学のプロセスを制御するため、製薬業界では特に関心が高いが、その内因性リガンドのいくつかはまだ発見されていない[3]。モデル生物である線虫 *C. elegans* は、ヒト (約 3000Mb) と比較してゲノムが小さい (約 100Mb) にもかかわらず、1000 以上の GPCR を有している[4]。最近の *C. elegans* における GPCR 研究では、自然免疫、胚発生、行動などに焦点が当てられているが[5-7]、休眠制御に関連する GPCR とその分子機構については殆ど知られていない。

*C. elegans* は幼虫生育の過程における生育環境 (エサ、個体密度、温度) に応答して、通常生育/幼虫休眠を決定する。環境からの感覚入力には頭部感覚神経で受容・統合され、下流のホルモンシグナルである TGF- $\beta$  様シグナル、インスリン

様シグナル、そしてステロイドホルモンシグナルへと伝達される[8]。これらホルモシグナルの情報伝達機構はよく研究されているが、環境因子（エサ、個体密度、温度）を知覚した後の分子制御機構は完全には解明されていない。これまでに、個体密度を化学的に媒介する休眠誘導フェロモンが単離・構造決定され、さらに、その受容体 GPCR も同定された [9-12]。一方、休眠制御に関する食物中の基質、ならびに、その受容体は未同定である[13]。これらの環境因子に応答して初期発動する短鎖神経ペプチドが、知覚と下流のホルモシグナルを結びつけて幼虫生育を制御していると仮定した[14]。これが本研究の発端である。

第 1 章では *C. elegans* が有する FMRFamide-Like Peptides (FLPs)に着目し、遺伝子破壊線虫を用いたスクリーニング結果に基づき、筆者が FLP-6 の解析を行った。また、当研究室では FLP-1 および FLP-2 の解析をほぼ終えている[15,16]。FLP 受容体は GPCR である神経ペプチド受容体 (NeuroPeptide Receptor: NPR) であることから、環境応答因子として初期応答した FLP は受容体 NPR を介して幼虫生育を制御すると予測される[17]。そこで、FLP-6 受容体を固定すべく、*npr* 遺伝子破壊株に対するスクリーニングを行ったところ、*npr-15* が遺伝子破壊により唯一著しい休眠率上昇を示した。これは、*flp-6* 遺伝子破壊の結果と一致する。そこで、FLP-6 が NPR-15 を介して幼虫生育を制御するという予測のもと、*npr-15* に着目した研究展開を図った。

## 材料と方法

### 1-1. Strains

本章でも CGC ならびに日本の NBRP から入手した遺伝子破壊株を使用した (補足資料 Supplementary Table 1 に記載)。また、遺伝子導入株、*ksIs2(Is[daf-7p::gfp])* を CGC から購入した。さらに本章では、東京女子医科大学・三谷教授から分与いただいた *tmEx4088(Ex[daf-7p::daf-7::mCherry])*、および *tmEx4106(Ex[daf-28p::daf-28::mCherry])[18]* の安定発現株 *tmls4088(Is[daf-7p::daf-7::mCherry])*、*tmls4106(Is[daf-28p::daf-28::mCherry])* を作出し、以降の実験に供した。また、*tkEx6(Ex[npr-15p::npr-15]; npr-15(ok1626))* の安定発現株 *tkIs6(Is[npr-15p::npr-15]; npr-15(ok1626))*、ならびに、*tkEx7(Ex[gpa-4p::npr-15 cDNA; gpa-4p::npr-15 cDNA::gfp]; npr-15(ok1626))* を作出し、以降の実験に供した(下記参照)。加えて、多重変異株である *tkEx6; npr-15(ok1626)*、*tkEx-7; npr-15(ok1626)*、*tmls4088; npr-15(ok1626)*、*tmls4106; npr-15(ok1626)*、*npr-15(ok1626); daf-3(e1376); lon-2(e678)*、*tmls4088; tkEx-7; npr-15(ok1626)*、*npr-15(ok1626); gpa-4(pk381)*、*npr-15(ok1626); gpa-4XS(dpy-20(e1282); pkIs515[gpa-4XS; dpy-20])*、*tmls4088; gpa-4(pk381)*、*tmls4088; gpa-4XS*、*tmls4106; gpa-4(pk381)* ならびに、*tmls4106; gpa-4XS* を交雑により作出した。

\*XS は導入遺伝子による遺伝子の余分なコピーを示す。

## 1-2. plasmid の構築ならびに transgenic worm の作出

### 1-2-1. plasmid の構築

以下に記載するプラスミドを第 1 章と同様にして構築し、本章で使用了た全てのプライマー配列を補足資料、Supplementary Table 2 に記載する。すべての DNA 増幅を high fidelity PCR により行い、得られたプラスミドの塩基配列を確認した（受託配列）。

### 1-2-2. *npr-15* transgene (*npr-15p::npr-15*)

*npr-15* 翻訳領域、上流 4.5 kb、および下流 0.9 kb の配列を含むゲノム断片を線虫ゲノム DNA を鋳型として増幅し、10 x A-attachment mix (TOYOBO) を用いて dA 付着後に pGEM-T Easy vector (Promega) に挿入した。

### 1-2-3. ASI-specific *npr-15* transgene (*gpa-4p::npr-15 cDNA*)

*npr-15* の cDNA を RT-PCR により増幅し、ASI 細胞特異的発現を誘導する上流配列を含む *gpa-4* プロモーター領域（2.6 kb）、ならびに、転写産物の安定化を誘導する *unc-54* 3'-utr (0.7 kb) をそれぞれ増幅した。これらの断片を、In-Fusion kit (Clontech)を用いて pBluescript (TOYOBO)の *Eco* RV サイトに挿入した。

### 1-2-4. ASI-specific *npr-15* reporter gene (*gpa-4p::npr-15 cDNA::venus*)

ASI-specific *npr-15* transgene（上述）から、終止コドンを除いた *gpa-4* プロモーター領域と *npr-15 cDNA* が結合した断片を増幅し、In-Fusion kit (Clontech)を用いて pPD\_venus ベクターの *Sma* I サイトに挿入した。

### 1-2-5. transgenic worms

第 1 章と同様にして、DAF-7::*mCherry* 安定発現株 (*tmIs4088(Is[daf-7p::daf-7::mCherry])*) および DAF-28::*mCherry* 安定発現株 (*tmIs4106(Is[daf-28p::daf-28::mCherry])*) を作出し、以降の実験に用いた。

*npr-15(ok1626)* のレスキュー実験のため、*npr-15p::npr-15* 導入遺伝子 (15ng/μl) を injection marker である *rol-6* (50 ng/μl) と共に *npr-15(ok1626)* の生殖腺に注入することで、*npr-15* レスキュー株 (*Ex[npr-15p::npr-15]; npr-15(ok1626)(tkEx6)*) を作出した[19]。得られた *tkEx6* に紫外線 (UV) 照射を行い、*npr-15p::npr-15* 導入遺伝子を染色体内に挿入した[20]。その後、野生型 (N2) との戻し交雑を 5 回行うことで不要な変異を除去し、*npr-15* レスキュー株 (*Is[npr-15p::npr-15]; npr-15(ok1626)(tkIs6)*) として以降の実験に用いた。

*npr-15(ok1626)* の ASI 特異的レスキュー実験のため、*gpa-4p::npr-15 cDNA* 導入遺伝子 (15 ng/μl) と発現確認のためのレポーター遺伝子 *gpa-4p::npr-15 cDNA::venus* (15 ng/μl) の混合物を、injection marker である *rol-6* (50 ng/μl) と共に *npr-15(ok1626)* の生殖腺に顕微注入した[19]。

### 1-3. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

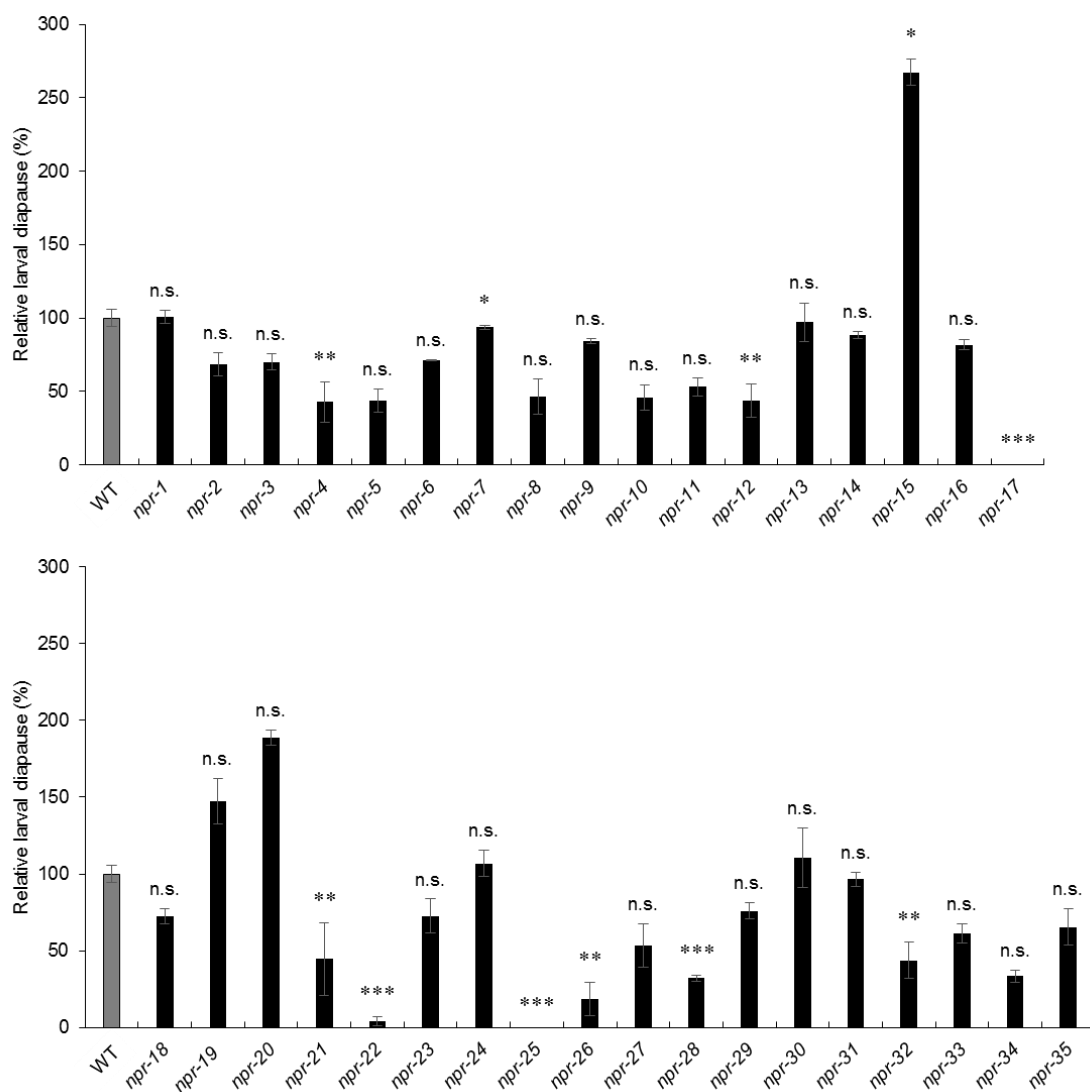
2 齢幼虫期の野生株 (N2) および *npr-15* 遺伝子破壊線虫 (*npr-15(ok1626)*) から total RNA を抽出後、mRNA を調製し、合成した cDNA を PCR に供した。*daf-7* 転写物および  $\beta$ -アクチン (*act-1* は内部標準) のプライマーセットを GENETYX ソフトウェア (GENETYX, Tokyo, Japan) を用いて設計した。使用したプライマーの配列は補足資料、Supplementary Table 2 に記載する。SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) と CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA) を用いて、定

量的 PCR(qPCR)を実施した。3 つのプールの線虫から調製した各 cDNA を用いて、qPCR 試験を 3 回繰り返した。

## 実験結果

### 標的となる *npr* 遺伝子の選抜

幼虫休眠以外の生命現象に関わる FLP の受容体として、GPCR をコードする *npr* 遺伝子が同定されている[17]。そこで、FLP-6 の受容体として NPR が幼虫休眠を制御する役割を担っていると予想した。まず、*npr* 遺伝子 35 種類に対応する遺伝子破壊株を用いて[21]、休眠率を測定した。その結果、Figure 1 に示すように、35 種類の *npr* 遺伝子破壊株の中で *npr-15* 遺伝子破壊株 (*npr-15(ok1626)*) のみが休眠率上昇を示した。一方で、9 種類の遺伝子破壊株が休眠率低下を示した。*flp-6* 遺伝子破壊株 (*flp-6(ok3056)*) の休眠率測定の結果 (第 1 章) と同様に、休眠率上昇を示した *npr* 遺伝子破壊株は *npr-15(ok1626)* のみであった。そこで、NPR-15 が FLP-6 受容体として幼虫休眠を制御するという予測の下、*npr-15* を対象として研究を進めた。



**Figure 1. *npr-15* 遺伝子破壊が唯一休眠率上昇を示す。**

野生株（N2）の実測値を基準とした、各遺伝子破壊株の相対休眠率を示す。各 mean  $\pm$  sem は 3 枚のプレート（1 トライアル）で休眠率を測定し、算出した。Dunnett 検定を用いて有意差の有無を算出した（\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; n.s., not significant）。mean  $\pm$  sem の値、被検体数、試行回数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 3 に示した。

## レスキュー実験

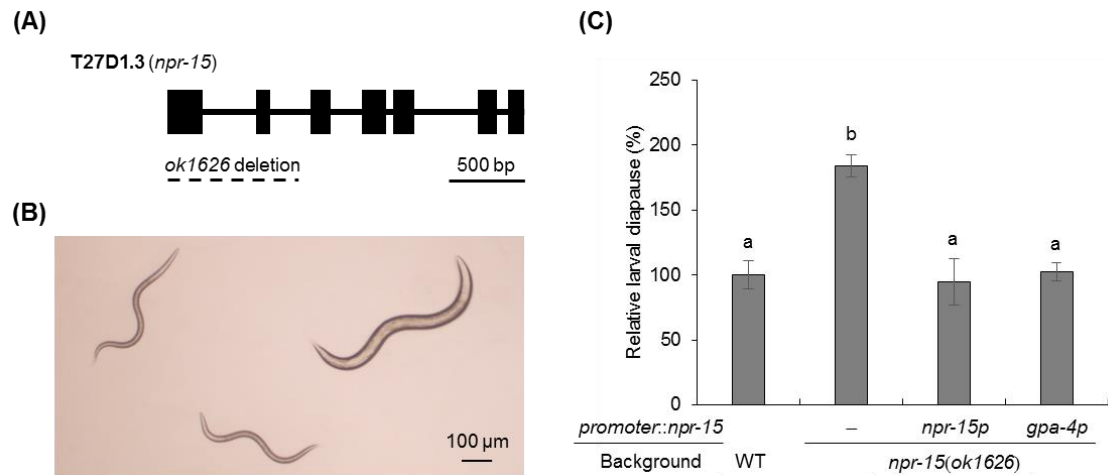
まず、*npr-15* が休眠制御遺伝子であることを立証するため、レスキュー実験を行った。*npr-15* 遺伝子破壊株 (*npr-15(ok1626)*) を野生株 (N2) と 5 回交雑し、変異原 (EMS) による不要な変異を除去した後、以下の実験に供した。

Figure 2A に示すように、*npr-15(ok1626)*線虫は *npr-15* の第 1 および第 2 エキソンを欠失した、null 変異体である。故に、*npr-15(ok1626)*は幼虫休眠の促進を誘発する機能欠失型の変異株(*lf*)であり、通常では幼虫生育を維持/休眠を阻害すると考えられる。そこで、*npr-15(ok1626)*に対して *npr-15* 遺伝子を導入 (レスキュー) することにより N2 との同等の休眠率を示すのかを検証した。

遺伝子破壊株 *npr-15(ok1626)*が N2 と比較して休眠率上昇を示したのに対し、レスキュー株 *tkIs6* (安定発現株) は N2 と同等の休眠率の値を示した (Figure 2C)。以上の結果から、*npr-15(ok1626)*の休眠率上昇は *npr-15* 遺伝子欠損に起因することが明らかとなり、*npr-15* が休眠制御遺伝子であることを立証するに至った。

NPR-15 は、数種の頭部感覚神経細胞で発現している[22]。その中でも ASI 細胞は、主に幼虫の生育を制御する役割を担っている[23]。ASI 細胞は、TGF- $\beta$ 様およびインスリン様シグナル伝達の主要なリガンドである DAF-7 および DAF-28 をそれぞれ発現している[24,25]。故に、NPR-15 は ASI 細胞で発現し、DAF-7、DAF-28 のいずれか、あるいは両方の制御に関与している可能性が考えられる。そこで、NPR-15 の ASI 細胞発現/休眠制御を検証するために、ASI 特異的な発現を駆動する *gpa-4* プロモーターを用いて、ASI 細胞特異的にレスキュー実験を行った[26]。レスキュー遺伝子 *gpa-4p::npr-15 cDNA::unc-54 3'-utr* とレポーター遺伝子 *gpa-4p::npr-15 cDNA::venus* を構築し、*npr-15(ok1626)*に同時導入した。得られた遺伝子導入株 (*tkEx7*) のうち、染色体外配列として導入遺伝子を保有する 3 系統 (ASI 細胞で VENUS 蛍光を発する) を休眠率測定に供した。その結果、

Figure 2C および、補足資料 Supplementary Figure 1 に示すように、*gpa-4* プロモーターを用いてレスキューした株は、N2 と同様の休眠率の値を示した。以上の結果から、ASI で発現する NPR-15 が幼虫休眠を制御すると推察した。



**Figure 2. ASI で発現する NPR-15 は幼虫休眠を阻害するように機能する。**

(A) 四角が *flp-6* のエキソンを示し、破線が *npr-15(ok1626)* の遺伝子欠損領域を示す。(B) 休眠幼虫 (左, 中央) と 4 齢幼虫 (右) を示した。(C) フェロモン添加による休眠誘導条件下での、野生株 (N2) の実測値を基準とした各変異株の相対休眠率を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  は 3 回の休眠率測定で算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した (異符号間で有意差有り)。 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値、被検体数、*p* 値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 4 に示した。残り 2 系統の ASI 細胞特異的な *npr-15* レスキュー株 (*tkEx7*) の数値は Supplementary Figure 1 に示した。

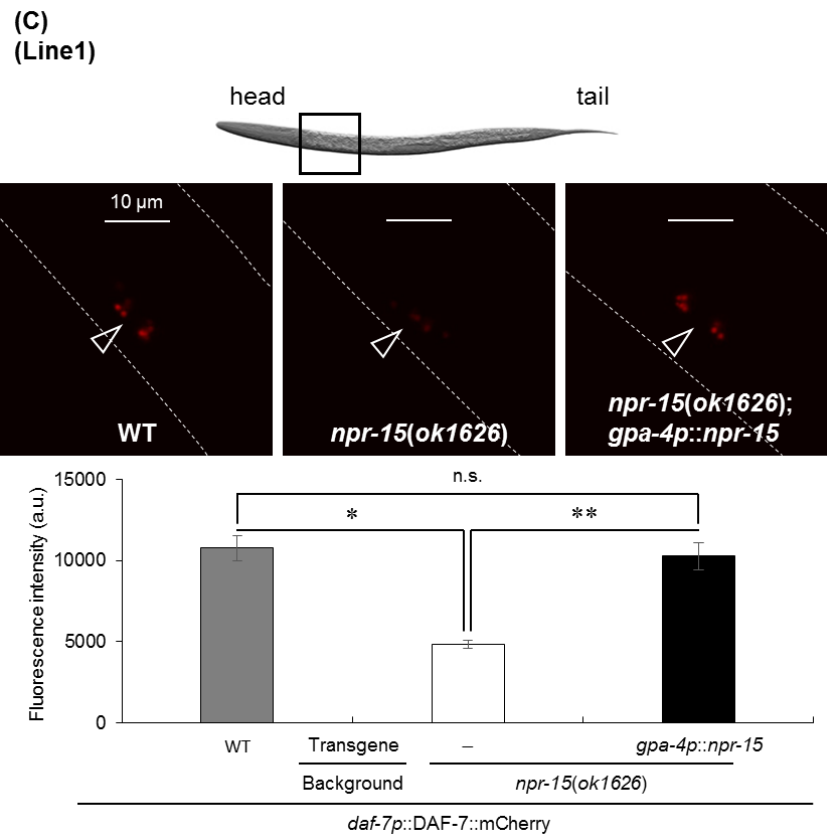
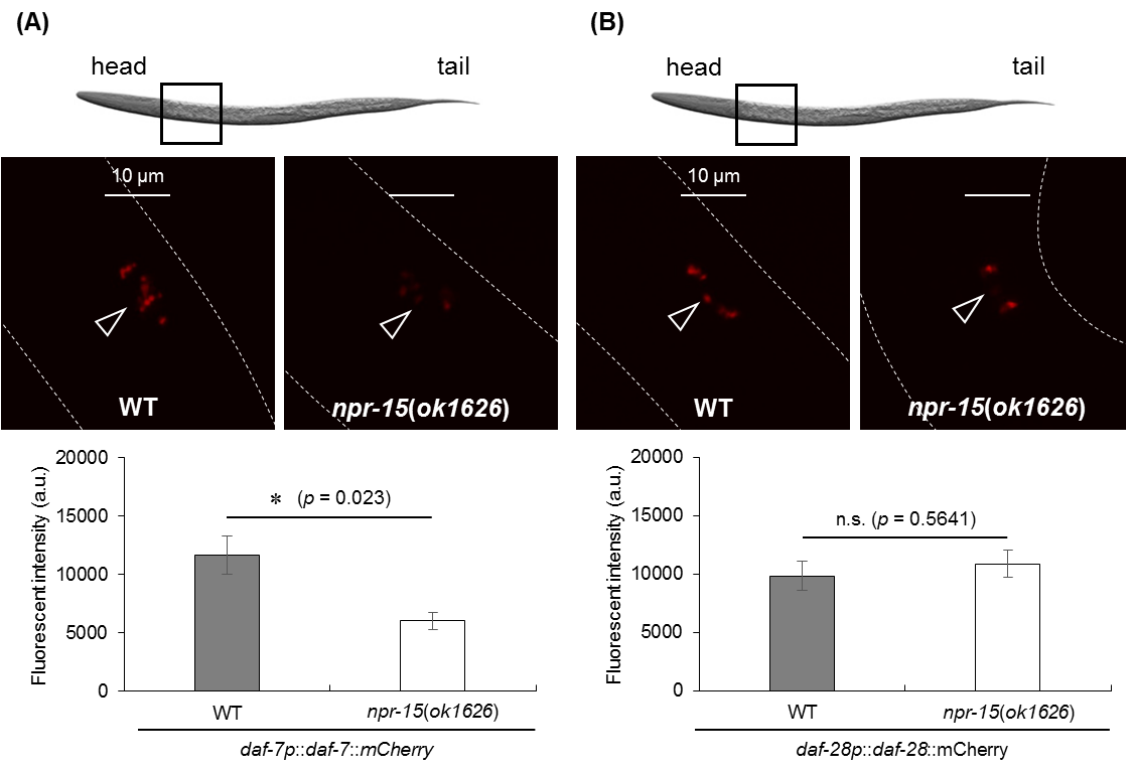
## NPR-15 のホルモンシグナル伝達経路への関与の検証

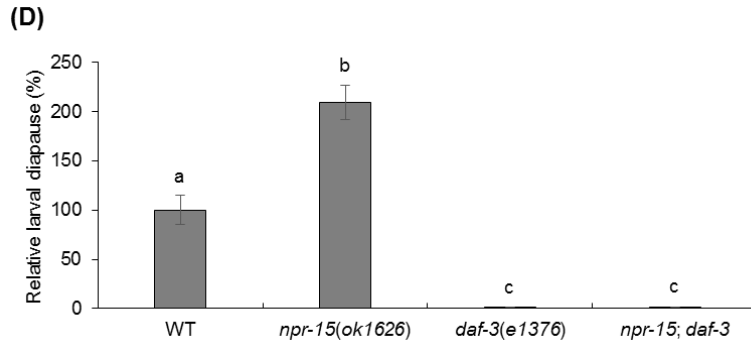
先に述べたように、ASI 細胞は幼虫生育制御に最も重要であり、DAF-7 と DAF-28 を産生・分泌する[24,25]。DAF-7 は TGF- $\beta$ シグナル経路の唯一のリガンドであり、DAF-28 はインスリン様シグナル経路の 40 種類のインスリン様ペプチドの中で最も支配的なリガンドである [25,27]。そこで、NPR-15 が DAF-7 ならびに DAF-28 を介して休眠を制御しているかどうかを検証することとした。まず、DAF-7 のレポータータンパク (*daf-7p::DAF-7::mCherry*) を発現する株 (*tmEX4088*) ならびに DAF-28 のレポータータンパク (*daf-28p::DAF-28::mCherry*) を発現する株 (*tmEX4106*) を用いて[18]、それぞれの安定発現株 *tmIs4088(Is[daf-7p::daf-7::mCherry])* ならびに *tmIs4106(Is[daf-28p::daf-28::mCherry])* を作出した。2 齢幼虫期の *tmIs4088* と *tmIs4106* を用いて、体腔細胞内に蓄積した DAF-7::mCherry と DAF-28::mCherry の蛍光量を測定することにより、DAF-7 ならびに DAF-28 の分泌測定に代えた。DAF-7, DAF-28 は ASI 細胞で産生・分泌されていることから[24,25]、頭部の体腔細胞を蛍光測定の対象とした。*tmIs4088* ならびに *tmIs4106* を *npr-15(ok1626)* と交雑し、頭部体腔細胞内に蓄積した DAF-7::mCherry と DAF-28::mCherry の蛍光量を同様に測定した。その結果、Figure 3A, B および補足資料 Supplementary Table 5A, B に示すように、*npr-15* 遺伝子破壊下で DAF-7::mCherry 蛍光量は有意に減少したが、DAF-28::mCherry の蛍光量は遺伝子破壊の影響を受けなかった。このことから、NPR-15 は DAF-7 の分泌を促進し、通常生育を維持していると推察した。さらに、ASI 細胞で発現する NPR-15 と DAF-7 分泌との関連を検証するため、ASI 細胞特異的レスキュー株 (*tkEx7*) 3 系統を *tmIs4088(daf-7p::daf-7::mCherry)* 線虫と交雑し、これらの蛍光量を測定した。その結果、*npr-15* 遺伝子破壊による DAF-7::mCherry の蛍光量の減少が、*npr-15* の ASI 細胞特異的レスキューにより、*tmIs4088* (*npr-15* 通常発現) と同程度まで回復した (Figure

3C, Supplementary Figure 2)。以上の結果から、ASI 細胞で発現する NPR-15 が DAF-7 分泌促進を介して通常生育を維持する、と推論した。

さらに、NPR-15 の TGF- $\beta$  シグナル (DAF-7 を唯一のリガンドとする) への関与を立証するため、休眠率上昇を示す *npr-15* 遺伝子破壊株 (*npr-15(ok1626)*) と休眠率低下を示す *daf-3* 遺伝子破壊株 (*daf-3(e1376)*) を用いて、epistasis (遺伝学的上下関係) 解析を行った。*daf-3* 遺伝子は TGF- $\beta$  シグナル最下流の転写制御因子 Smad をコードする[28]。故に、*daf-3* 遺伝子破壊 (休眠不全) は、上流の DAF-7 リガンドならびに DAF-7 受容体の遺伝子破壊による休眠誘導を無効化し、通常生育をもたらす。そこで、*npr-15(ok1626)* と *daf-3(e1376)* を交雑し、得られた二重変異株 (*npr-15(ok1626); daf-3(e1376)*) の休眠率を測定した。Figure 3D および、補足資料 Supplementary Table 5D に示すように、*daf-3(e1376)* は休眠率ほぼ 0 を示した。*npr-15(ok1626); daf-3(e1376)* は *daf-3(e1376)* と同等に休眠率ほぼ 0 を示したことから、*daf-3* 遺伝子破壊が *npr-15* 遺伝子破壊による休眠誘導を完全に抑制したと結論づけた。以上の結果から、NPR-15 の幼虫休眠制御は DAF-7 分泌を介した TGF- $\beta$  シグナルに依存していると結論付けた。

この時点で、NPR-15 は FLP-6 の受容体ではないことが濃厚となったが、NPR-15 のさらなる機能解析を進めることとした。





**Figure 3. NPR-15 は DAF-7 の分泌を介して TGF- $\beta$ 様シグナルを制御する。**

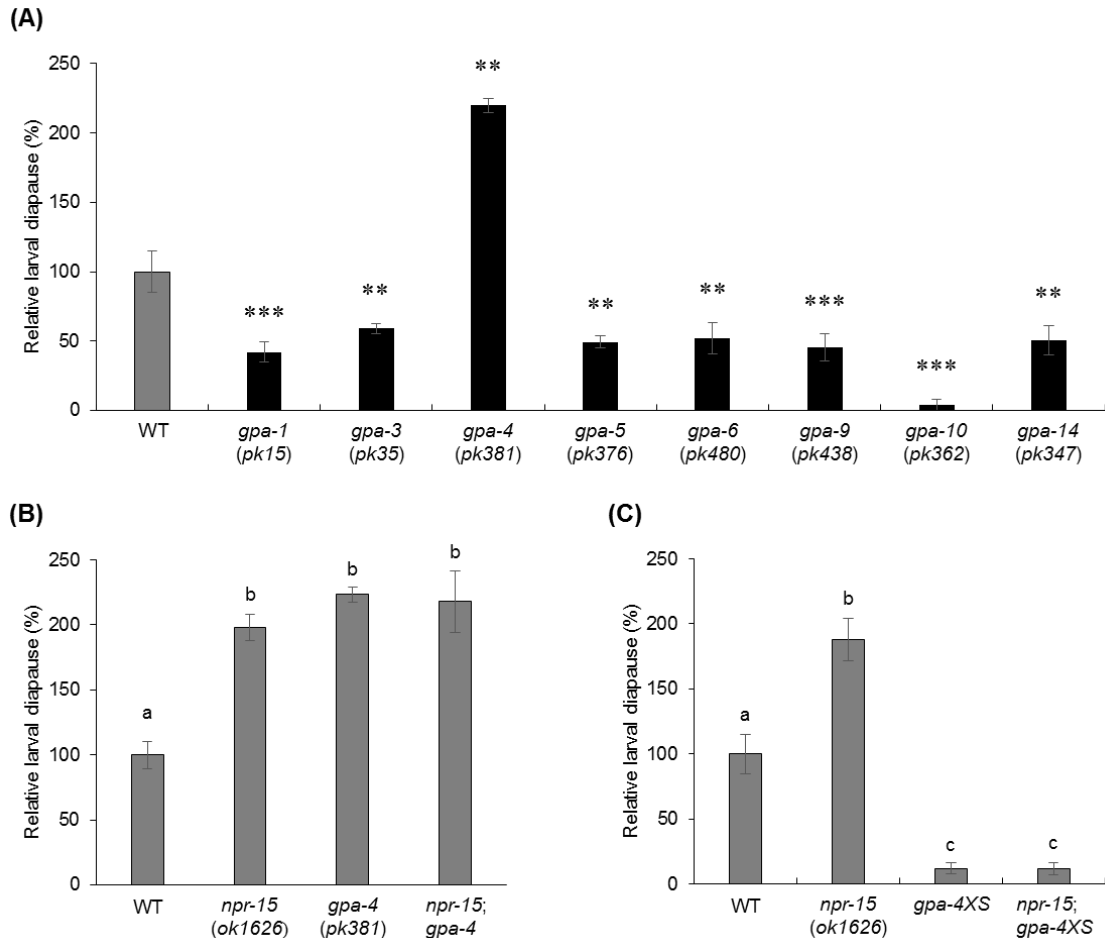
(A) 2 齢幼虫期における、*npr-15* 通常発現下および *npr-15* 遺伝子破壊下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *npr-15(ok1626)* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (\*  $p < 0.05$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5A に示す。(B) 2 齢幼虫期における、*npr-15* 通常発現下および *npr-15* 遺伝子破壊下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-28::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *npr-15(ok1626)* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (n.s.: not significant)。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5B に示した。(C) 2 齢幼虫期における、*npr-15* 通常発現下、*npr-15* 遺伝子破壊下および、*npr-15(ok1626)* の ASI 細胞特異的レスキュー下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *npr-15(ok1626)* = 5; *Ex[gpa-4p::npr-15]*; *npr-15(ok1626)* = 20) に応じて算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , n.s.: not significant)。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5C に、残りの 2 系統 (Line2 および Line3) の数値を Supplementary figure2 に示す。(D) フェロモン添加による休眠誘導条件下での、野生株 (N2) の実測値を基準とした各変異株の相対休眠率を示す。各 mean  $\pm$  sem は 3 回の休眠率測定で算出した。

有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した（異符号間で有意差有り）。  
mean ± sem の値、被検体数、*p* 値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5D に示す。

### GPCR NPR-15 と結合して幼虫休眠を制御する Gαサブユニットの探索

NPR-15 の DAF-7 分泌制御機構を明らかにするため、受容体である GPCR NPR-15 と共役して幼虫休眠を制御する G タンパク質αサブユニットの探索を行った。まず、*gpa* 遺伝子がαサブユニットをコードすることから、*gpa* 遺伝子破壊株の休眠率を測定した。NPR-15 および DAF-7 は ASI で発現することから、測定には ASI 細胞での発現が報告されている *gpa* 遺伝子の破壊株を用いた[22,24,29]。Figure 4A および補足資料 Supplementary table 6A に示すように、唯一 *gpa-4(pk381)* が *npr-15(ok1626)* と同様に顕著な休眠率上昇を示した。さらに、*gpa-4* 遺伝子は NPR-15 と DAF-7 を発現している ASI 細胞でのみ発現していることから[22,24,26,29]、*gpa-4* 遺伝子に着目した研究展開を図った。GPA-4 と GPCR NPR-15 の共役性を検証するために、*gpa-4* 遺伝子の機能喪失型変異株 (*gpa-4(pk381)*) に加え、機能獲得型変異株 (*gpa-4XS*) を用いてエピスタシス解析を行った。*gpa-4(pk381)* ならびに *gpa-4XS* を *npr-15(ok1626)* と交雑することで、*npr-15(ok1626); gpa-4(pk381)*, *npr-15(ok1626); gpa-4XS* をそれぞれ作出し、休眠率測定に供した。Figure 4B に示すように、*npr-15(ok1626); gpa-4(pk381)* の休眠率上昇の値は *npr-15(ok1626)* および *gpa-4(pk381)* の休眠率上昇の値とほぼ同等であり、休眠誘導する遺伝子欠損の相加的効果は認められなかった。さらに、Figure 4C に示すように、*gpa-4XS* は *npr-15(ok1626); gpa-4XS* と同様に、著しい休眠率低下を示した。このことから、*gpa-4* は *npr-15* に対して遺伝学的に上位 (epistatic) であると結

論づけた。以上のことから、NPR-15 は GPA-4 と共役していると結論づけた。



**Figure 4. *gpa-4* は *npr-15* に対して遺伝学的に上位 (epistatic) である。**

(A) 野生株 (N2) の実測値を基準とした、各遺伝子破壊株の相対休眠率を示す。

各 mean  $\pm$  sem は 3 枚のプレート (1 トライアル) で休眠率を測定し、算出した。

Dunnett 検定を用いて有意差の有無を算出した (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; n.s., not significant)。mean  $\pm$  sem の値、被検体数、 $p$  値等の詳細な数値を補

足資料 Supplementary Table 6A に示した。(B)フェロモン添加による休眠誘導条

件下での、N2 の実測値を基準とした各変異株の相対休眠率を示す。各 mean  $\pm$

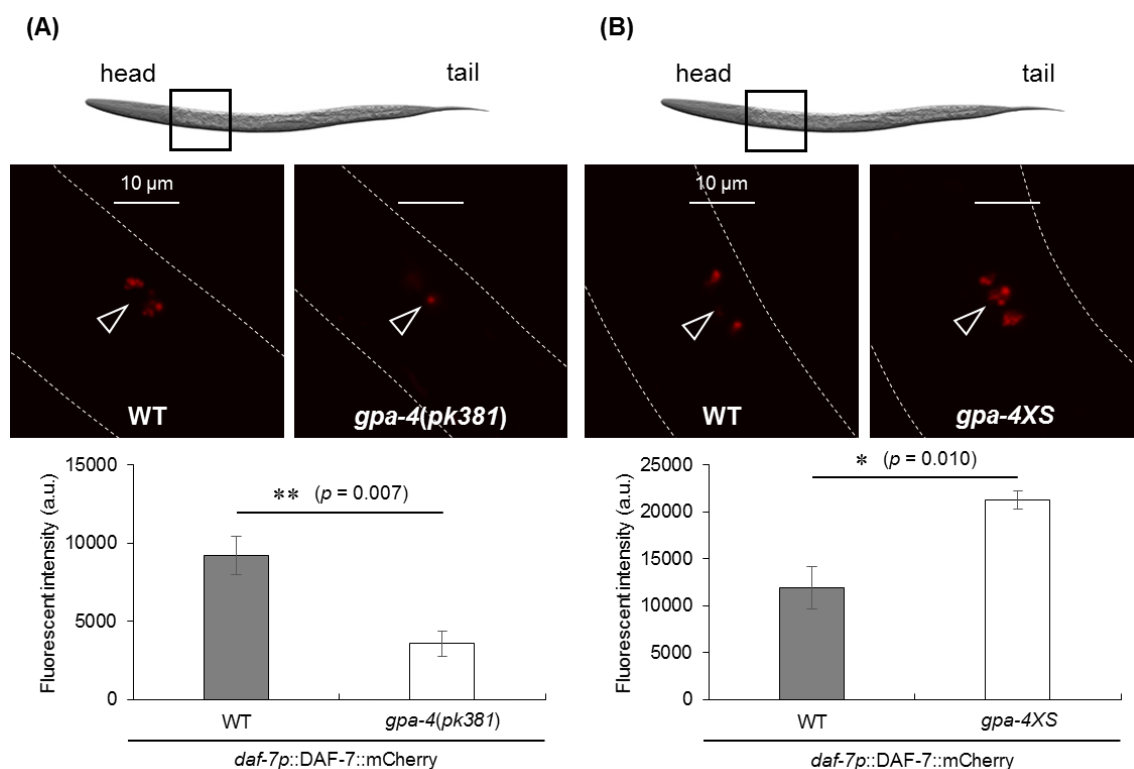
sem は 3 回の休眠率測定で算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて

算出した (異符号間で有意差有り)。mean  $\pm$  sem の値、被検体数、 $p$  値等の詳細

な数値を補足資料 Supplementary Table 6B に示した。(C) フェロモン添加による休眠誘導条件下での、N2 の実測値を基準とした各変異株の相対休眠率を示す。各 mean  $\pm$  sem は 3 回の休眠率測定で算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した（異符号間で有意差有り）。mean  $\pm$  sem の値、被検体数、*p* 値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 6C に示した。

### GPA-4 のホルモンシグナル伝達経路への関与の検証

GPA-4 が NPR-15 と共役することを踏まえ、GPA-4 が同様にリガンド DAF-7 の分泌を制御するかを検証するため、*gpa-4* 機能喪失型変異株 (*gpa-4(pk381)*) ならびに *gpa-4* 機能獲得型変異株 (*dpy-20(e1282); pkIs515*) と *tmls4088(Is[daf-7p::daf-7::mCherry])* を交雑し、蛍光測定を行った。その結果、Figure 5A に示すように、*tmls4088; gpa-4(pk381)* の頭部体腔細胞における蛍光量は、*tmls4088; npr-15(ok1626)* と同様に、予想通り減少した。さらに、Figure 5B に示すように、*tmls4088; gpa-4XS* の頭部体腔細胞における蛍光量は、*tmls4088* と比較して増大した。以上の結果から、GPA-4 は NPR-15 と共に DAF-7 の分泌を制御する役割を担っていることが示唆された。一方、*tmls4106; gpa-4(pk381)* および *tmls4106; gpa-4XS* のいずれも、*tmls4106(Is[daf-28p::daf-28::mcherry])* と比較して、頭部体腔細胞における蛍光量はほとんど変化がなかった（補足資料 Supplementary figure 3A, B）。以上の結果から、ASI 細胞で発現する GPA-4 は、DAF-7 を制御するが、DAF-28 の分泌は制御しないことが明らかとなった。このことは、NPR-15 と GPA-4 の共役を支持するものである。

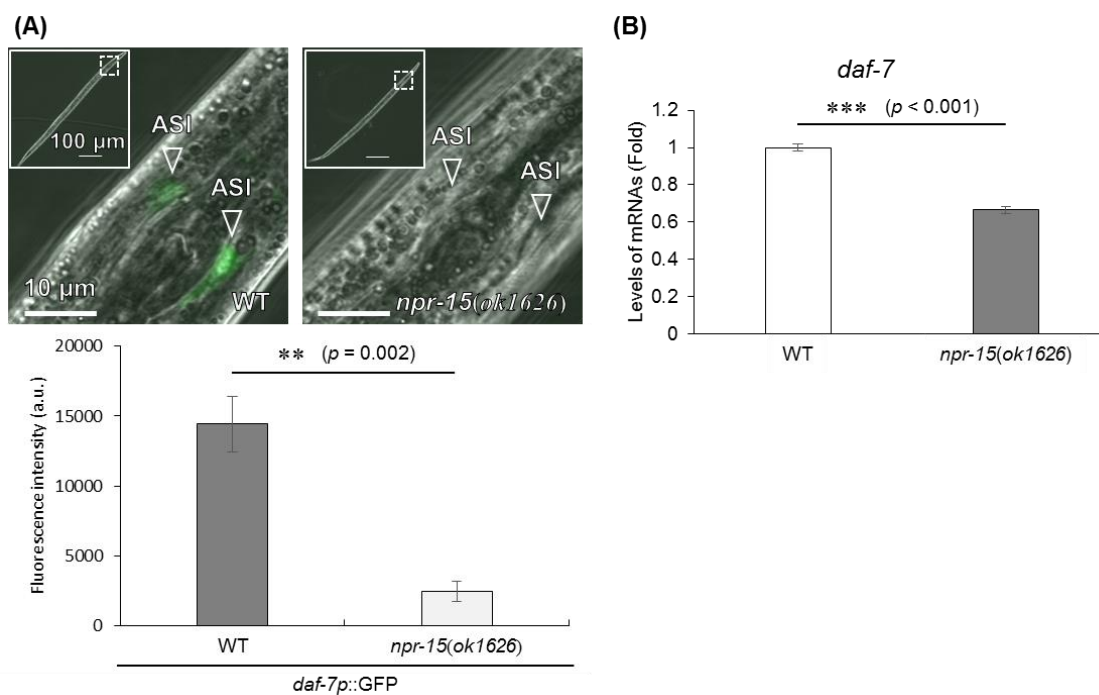


**Figure 5. GPA-4 は DAF-7 の分泌を制御する。**

(A) 2 齢幼虫期における、*gpa-4* 通常発現下および *gpa-4* 機能喪失型変異下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *gpa-4(pk381)* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (\*\*  $p < 0.01$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 7A に示す。(B) 2 齢幼虫期における、*gpa-4* 通常発現下および *gpa-4* 機能獲得型変異下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *gpa-4XS* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (\*  $p < 0.05$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 7B に示す。

### NPR-15 の転写レベルでの DAF-7 産生への関与を検証

ここまでの結果から、ASI 細胞で発現する NPR-15 が G タンパク質 $\alpha$ サブユニットと共役し、DAF-7 の分泌を制御することで、最終的に幼虫休眠を調節していることが示された。しかし、NPR-15 が DAF-7 の分泌そのものを制御するのか、それとも産生を制御することで分泌を制御するのかは明らかにされていない。そこで、NPR-15 による DAF-7 産生制御の可能性を検証することとした。まず、*daf-7* プロモーター制御下で GFP を発現する株 (*ksIs2*) を用いて、頭部感覚神経 (ASI 細胞) における GFP の蛍光量を測定した。次に、この *ksIs2* と *npr-15* 遺伝子破壊株 (*npr-15(ok1626)*) を交雑し、*npr-15* 遺伝子破壊下で GFP (ASI 細胞で発現) の蛍光量を測定した。その結果、Figure 6A が示すように、*ksIs2* と比較して *npr-15(ok1626); ksIs2* で GFP の蛍光量は有意に減少した。すなわち、NPR-15 非存在下では *daf-7p::GFP* 蛍光が減少した。この結果から、NPR-15 は DAF-7 の産生に関与することが示された。さらに、NPR-15 が DAF-7 の産生を転写レベルで制御するのかを検証したところ、Figure 6B に示すように、*npr-15* 遺伝子破壊下で *daf-7* の転写量は有意に減少した。以上の結果から、NPR-15 は *daf-7* の転写調節を介して DAF-7 の産生を制御し、延いては DAF-7 の分泌量に影響すると考えられる。



**Figure 6. NPR-15 は DAF-7 の産生を転写レベルで制御する。**

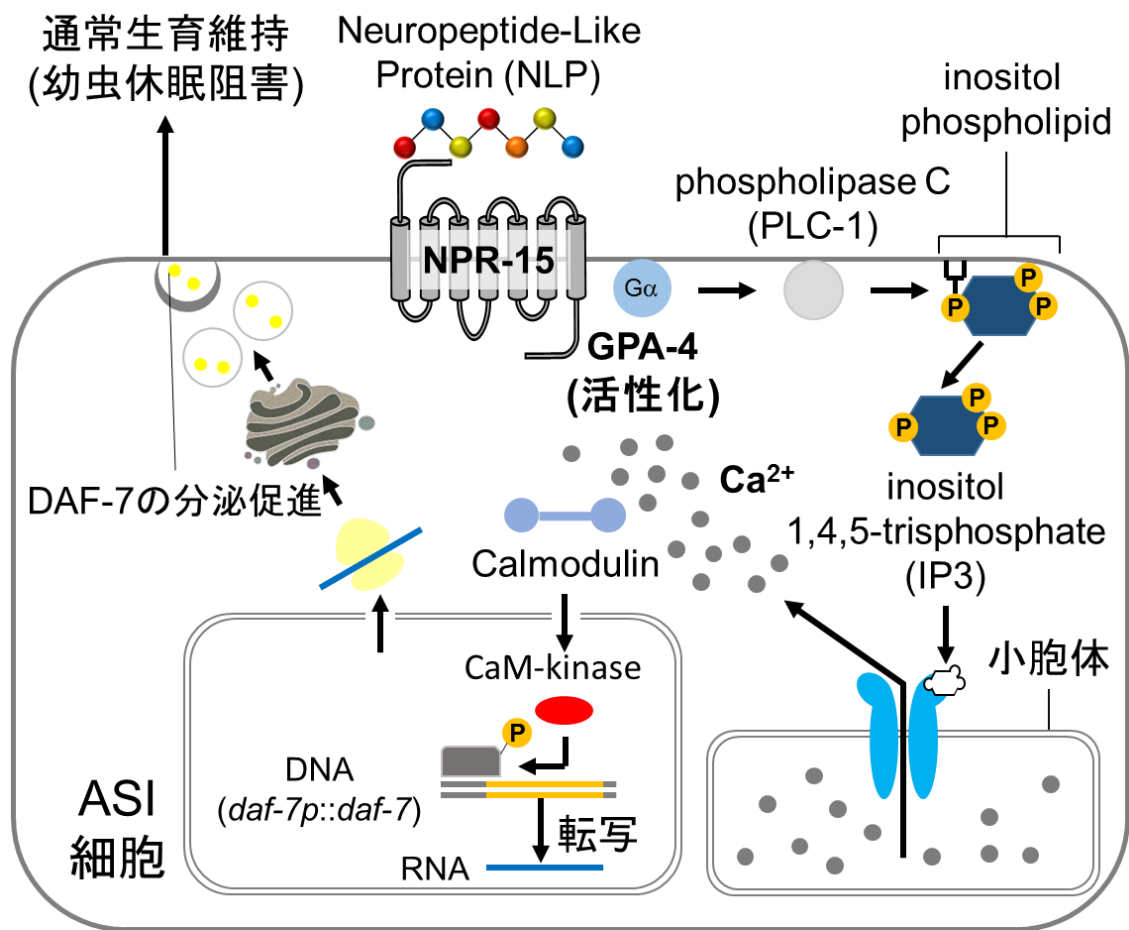
(A) 2 齢幼虫期における、*npr-15* 通常発現下および *npr-15* 遺伝子破壊下での ASI に発現した *daf-7p::GFP* の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *npr-15(ok1626)* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (\*\*  $p < 0.01$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 8A に示した。(B) 2 齢幼虫期における、*npr-15* 通常発現下および *npr-15* 遺伝子破壊下での、*act-1* を内部表現とした *daf-7* mRNA の相対的な転写量を示す。各 mean  $\pm$  sem は試行回数 (3 トライアル) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (\*\*\*  $p < 0.001$ )。mean  $\pm$  sem の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 8B に示した。

## 考察

本章では、第 1 章に記述した休眠制御短鎖神経ペプチド FLP-6 の受容体が GPCR NPR-15 である可能性を検証すべく、NPR-15 の分子遺伝学的解析を進めてきた。短鎖神経ペプチド FLP の受容体と目される NPR うち、機能破壊により休眠率上昇を示す (FLP-6 機能破壊は休眠率上昇を示す) GPCR は唯一 NPR-15 であったことが、NPR-15 を解析対象とした理由である。その結果、NPR-15 は主に休眠制御を担う ASI 細胞で機能し、G $\alpha$ サブユニット GPA-4 と共役することを明らかにした。ASI 細胞は TGF- $\beta$ 様タンパク質である DAF-7 ならびにインスリン様ペプチドである DAF-28 を産生・分泌し、それぞれのシグナル伝達経路を通じて幼虫休眠を制御する重要な役割を担っている[24,25]。NPR-15 は GPA-4 と連携して、DAF-7 を介して休眠制御に関与するが、DAF-28 には関与しない。FLP-6 は DAF-7 ではなく、ASI 細胞で発現する DAF-28 の産生・分泌に関与することから、NPR-15 が関与する下流のホルモンシグナル伝達経路と一致しない。従って、NPR-15 は FLP-6 受容体ではない、と結論付けた。*npr-15* と同様に、遺伝子破壊で休眠率上昇を示す *flp* 遺伝子として、*flp-6* 以外に唯一 *flp-3* が存在する。しかし、FLP-3 も DAF-7 に関与しないことが報告されているため[30]、NPR-15 が関与する下流のホルモンシグナル伝達経路と一致しない。従って、FLP-3 も NPR-15 のリガンドではない、と推論可能である。上記を勘案し、NPR-15 のリガンドとして休眠を制御する神経ペプチドは、FLP 以外に存在する可能性が高い。*C. elegans* は FLP 以外にも Neuropeptide-Like Protein (NLP)ファミリーを発現しており、NLP-3 が NPR-17 を活性化してエサに対する回避行動を高めることが報

告されている[31]。サントリー生命財団・佐竹博士らが開発した peptide-GPCR matching プログラム[32]等を用いて NPR-15 のリガンド候補として NLP を探索し、さらに、分子遺伝学的解析を加えることでリガンド NLP を特定することは可能である、と考える。

同一の神経細胞（ASI 細胞）で産生・分泌され幼虫生育に関わる DAF-7 ならびに DAF-28 が異なる制御を受けることは非常に興味深い。短鎖神経ペプチド FLP-1 は DAF-28 のみを制御し[16]、GPCR NPR-15 は DAF-7 のみを制御する。未同定である FLP-1 受容体は、リガンドが未同定である NPR-15（現在、孤児受容体）とは異なるメカニズムを介して DAF-28 を制御する、と推察している。本章では、NPR-15 が DAF-7 の産生を制御する分子メカニズムの解明に踏み込んだ。NPR-15 は *daf-7* を転写レベルで制御し、故に、NPR-15 は DAF-7 の産生量を結果的に制御する。DAF-7 産生量の制御が延いては DAF-7 分泌量の制御に至ると考えている。さらに、G タンパク質を介したホスホリパーゼ C（PLC）経路は、頭部感覚神経細胞の AWC 細胞で機能することが報告されている[33]。加えて、PLC をコードする遺伝子 *plc-1* は、頭部感覚神経細胞の ASI 細胞にて発現することが報告されている[34]。従って、ASI 細胞でも同様に、PLC 経路が機能する可能性があると考えた。仮に ASI 細胞でも PLC 経路が機能するのであれば、PLC 経路を介して細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、カルモジュリン経路で *daf-7* の転写を制御すると考えられる。従って、Figure 6 に示すような分子制御機構を推察している。本研究では、GPCR が TGF- $\beta$  を直接制御する世界で最初の例を示すことができた。



**Figure 7.** ASI 細胞における NPR-15 による DAF-7 の産生・分泌制御。

一方、ヒト研究に目を向けると、*C. elegans* の NPR-15 はヒト GPR15 のオルソログであり、ヒト GPR15 は癌との関連が報告されている[34,35]。また、*C. elegans* の GPA-4 は腫瘍抑制への関連が報告されているヒト GNAI1 のオルソログである[36]。さらに、ヒト TGF- $\beta$ シグナルも癌に関与している[37,38]。ヒト癌研究では GPR15 と TGF- $\beta$ の関係性は未解明であることから、本研究は新規の発癌機構ならびに新規抗がん剤の開発に関する新たな知見を提供する可能性がある。GPR15 を標的としたアゴニスト化合物が TGF- $\beta$ を介した癌抑制を誘導する可能性があるのではないか、と考えている。

## 引用文献

1. Isberg V, Mordalski S, Munk C, Rataj K, Harpsøe K, Hauser AS, Vroling B, Bojarski AJ, Vriend G, and Gloriam DE (2016). GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Research* 44(D1): D356-D364.
2. Zhang Y, DeVries ME, Skolnick J (2006). Structure modeling of all identified G protein-coupled receptors in the human genome. *PLOS Computational Biology* 2(2).
3. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, and Gloriam DE (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery* 16: 829-842.
4. Bargmann CI (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282(5396): 2028-2033.
5. Venkatesh SR, and Singh V (2021). G protein-coupled receptors: the choreographers of innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Pathogens* 17(1).
6. Matús D, and Prömel S (2018). G proteins and GPCRs in *C. elegans* development: a story of mutual infidelity. *Journal of Developmental Biology* 6(4).
7. Choi W, Ryu SE, Cheon Y, Park Y, Kim S, Kim E, Koo J, Choi H, Moon C, and Kim K. A single chemosensory GPCR is required for a concentration dependent behavioral switching in *C. elegans*. *Current Biology* 32(2): 398-411.
8. Hu PJ (August 08, 2007). Dauer. WormBook.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_dauer/dauer.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html/) (accessed 2023\_05\_05).

9. Jeong PY, Jung M, Yim YH, Kim H, Park M, Hong E, Lee W, Kim YH, Kim K, and Paik YK (2005). Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone, Nature 433: 541-545.
10. Butcher RA, Fujita M, Schroeder FC, and Clardy J (2007). Small-molecule pheromones that control dauer development in *Caenorhabditis elegans*. Nature Chemical Biology 3: 420-422.
11. McGrath PT, Xu Y, Ailion M, Garrison JL, Butcher RA, and Bargmann CI (2011). Parallel evolution of domesticated *Caenorhabditis* species targets pheromone receptor genes. Nature 477: 321-325.
12. Park D, O'Doherty I, Somvanshi RK, Bethke A, Schroeder FC, Kumar U, and Riddle DL (2012). Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein–coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (25): 9917-9922.
13. Golden JM, and Riddle DL (2014). A *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone and an antagonistic component of the food supply. Journal of Chemical Ecology 10: 1265-1280.
14. Chris L, and Kyuhyung K (2014). Family of FLP peptides in *Caenorhabditis elegans* and related nematodes. Frontiers in Endocrinology 5(150).
15. Kageyama N, Nose M, Ono M, Matsunaga Y, Iwasaki T, and Kawano T (2022). The FMRFamide-like peptide FLP-2 is involved in the modulation of larval development and adult lifespan by regulating the secretion of the insulin-like peptide INS-35 in *Caenorhabditis elegans*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 86: 1231-1239.

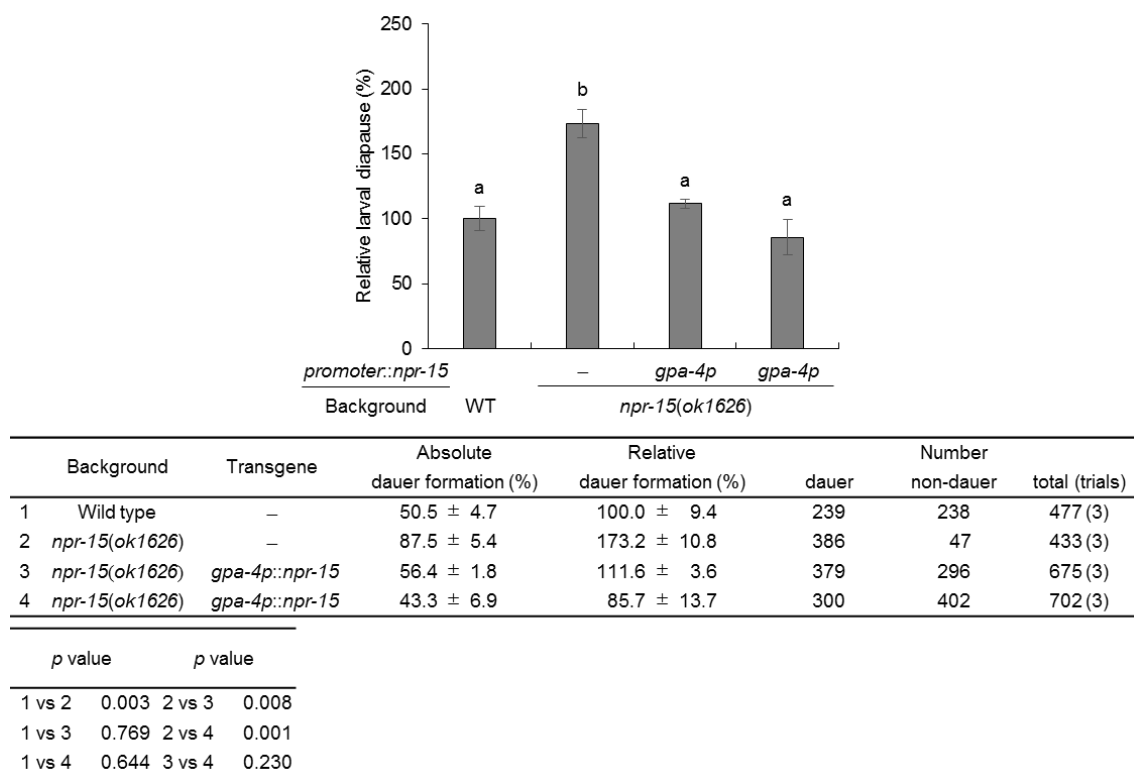
16. Une R, Kageyama N, Ono M, Matsunaga Y, Iwasaki T, and Kawano T (2023). The FMRFamide-like peptide FLP-1 modulates larval development by regulating the production and secretion of the insulin-like peptide DAF-28 in *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 87: 171-178.
17. Li C and Kim K (September 25, 2008). Neuropeptides. WormBook.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_neuropeptides/neuropeptides.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_neuropeptides/neuropeptides.html/)  
(accessed 2023\_05\_05).
18. Yoshina S and Mitani S (2015). Loss of *C. elegans* GON-1, an ADAMTS9 homolog, decreases secretion resulting in altered lifespan and dauer formation. *PLOS ONE* 10(7).
19. Berkowitz LA, Knight AL, Caldwell GA, and Caldwell KA (2008). Generation of Stable Transgenic *C. elegans* Using Microinjection. *Journal of Visualized Experiments* 18(833).
20. Kage-Nakadai E, Imae R, Yoshina S, and Mitani S (2014). Methods for single/low-copy integration by ultraviolet and trimethylpsoralen treatment in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 68(3): 397–402.
21. Chai M C, Park H, Sternberg W P (2022). Brain-wide bidirectional neuropeptide modulation of individual neuron classes regulates a developmental decision. *Current Biology* 32: 3365-3373.
22. Mills H, Wragg R, Hapiak V, Castelletto M, Zahratka J, Harris G, Summers P, Korchnak A, Law W, Bamber B, and Komuniecki R (2012). Monoamines and neuropeptides interact to inhibit aversive behavior in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal* 31: 667-678.

23. Bargmann CI, and Horvitz HR (1991). Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 251: 243-246.
24. Ren P, Lim CS, Johnsen R, Albert PS, Pilgrim D, and Riddle DL (1996). Control of *C. elegans* Larval Development by Neuronal Expression of a TGF- $\beta$  Homolog. *Science* 274: 1389-1391.
25. Li W, Kennedy SG, and Ruvkun G (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes & Development* 17: 844e848.
26. Osuna-Luque J, Ewald CY, and Meister P (2021). Widespread *gpa-4* promoter-driven expression during *Caenorhabditis elegans* development. *microPublication Biology* doi: 10.17912/micropub.biology.000443.
27. Fernandes de Abreu DA, Caballero A, Fardel P, Stroustrup N, Chen Z, Lee K, Keyes WD, Nash ZM, Lopez-Moyado IF, Vaggi F, Cornils A, Regenass M, Neagu A, Ostojic I, Liu C, Cho Y, Sifoglu D, Shen Y, Fontana W, Lu H, Csikasz-Nagy A, Murphy CT, Antebi A, Blanc E, Apfeld J, Zhang Y, Alcedo J, and Chng Q (2014). An Insulin-to-Insulin Regulatory Network Orchestrates Phenotypic Specificity in Development and Physiology. *PLOS Genetics* 10(3).
28. Patterson GI, Kowalik A, Wong A, Liu Y, Ruvkun G (1997). The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF- $\beta$ -related receptor signaling in the *Caenorhabditis elegans dauer* pathway. *Genes & Development* 11: 2679-2690.
29. Jansen G, Thijssen KL, Werner P, Horst M, Hazendonk R, Plasterk RHA (1999). The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics* 21: 414-419.

30. 能勢雅代(2020). 線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-3 の分子機構, 鳥取大学農学部生命環境農学科学士論文(未刊行)
31. Harris G, Mills H, Wragg R, Hapiak V, Castelletto M, Korchnak A and Komuniecki WR (2021). The Monoaminergic Modulation of Sensory-Mediated Aversive Responses in *Caenorhabditis elegans* Requires Glutamatergic/Peptidergic Cotransmission. *Journal of Neuroscience* 30(23): 7889-7899.
32. Shiraishi A, Okuda T, Miyasaka N, and Satake H (2019). Repertoires of G protein-coupled receptors of *Ciona*-specific neuropeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(16):7847-7856.
33. Zhang C, Zhao N, Chen Y, Zhang D, Yan J, Zou W, Zhang K, and Huang X (2016). The Signaling Pathway of *Caenorhabditis elegans* Mediates Chemotaxis Response to the Attractant 2-Heptanone in a Trojan Horse-like Pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 291(45): 23618-23627.
34. Hammarlund M, Hobert O, Miller D, Sestan N. Discovery and analysis of the *C. elegans* Neuronal Gene Expression Network. CeNGEN.  
<https://cengen.shinyapps.io/cengenApp-legacy/> (accessed 2023\_05\_05).
34. Guo Y, Zhu Q, Chen S, Li Y, Fu D, Qia D, and Ni C (2021). Post-transcriptional suppression of G protein-coupled receptor 15 (GPR15) by microRNA-1225 inhibits proliferation, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *3 Biotech.* 11(3).
35. Chaudhary PK, and Kim S (2021). An insight into GPCR and G-proteins as cancer drivers. *Cells* 10(12).

36. Yao J, Liang L, Zhang Y, Ding J, Tian Q, Li J, and He X (2012). GNAI1 Suppresses Tumor Cell Migration and Invasion and is Post-Transcriptionally Regulated by Mir-320a/c/d in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biology & Medicine* 9(4): 234-241.
37. Zhang M, Zhang YY, Chen Y, Wang J, Wang Q, and Hezhe Lu (2021). TGF- $\beta$  Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9(786728).
38. Baba AB, Rah B, Bhat GR, Mushtaq I, Parveen S, Hassan R, Zargar MH, and Afroze D (2022). Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 13(791272).

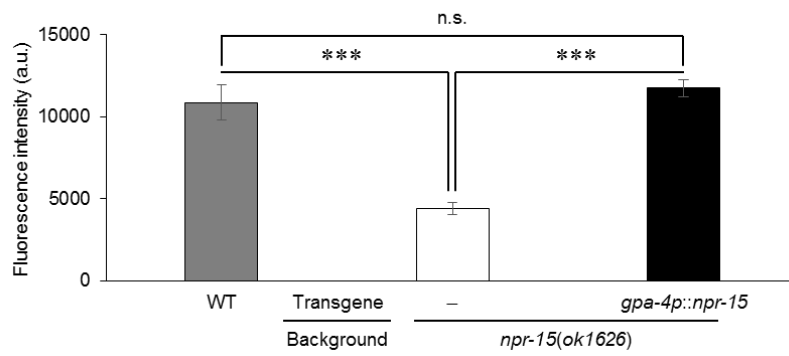
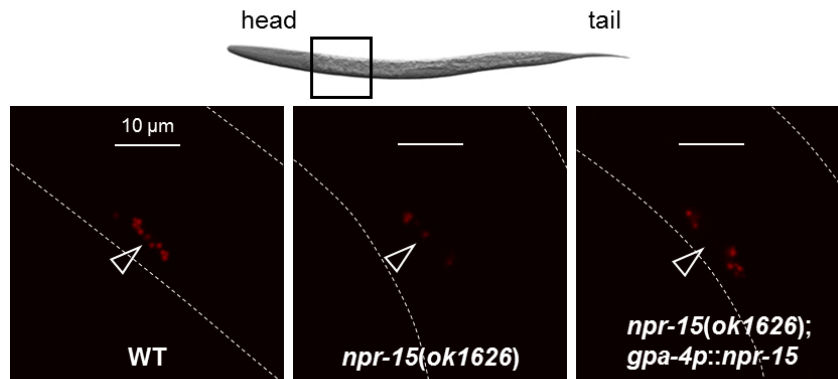
## 補足資料



**Supplementary figure 1.** *npr-15* 遺伝子破壊株の休眠率上昇は、*gpa-4p::npr-15* *cDNA* の導入 (*npr-15* の ASI 細胞特異的レスキュー) によって打ち消される。

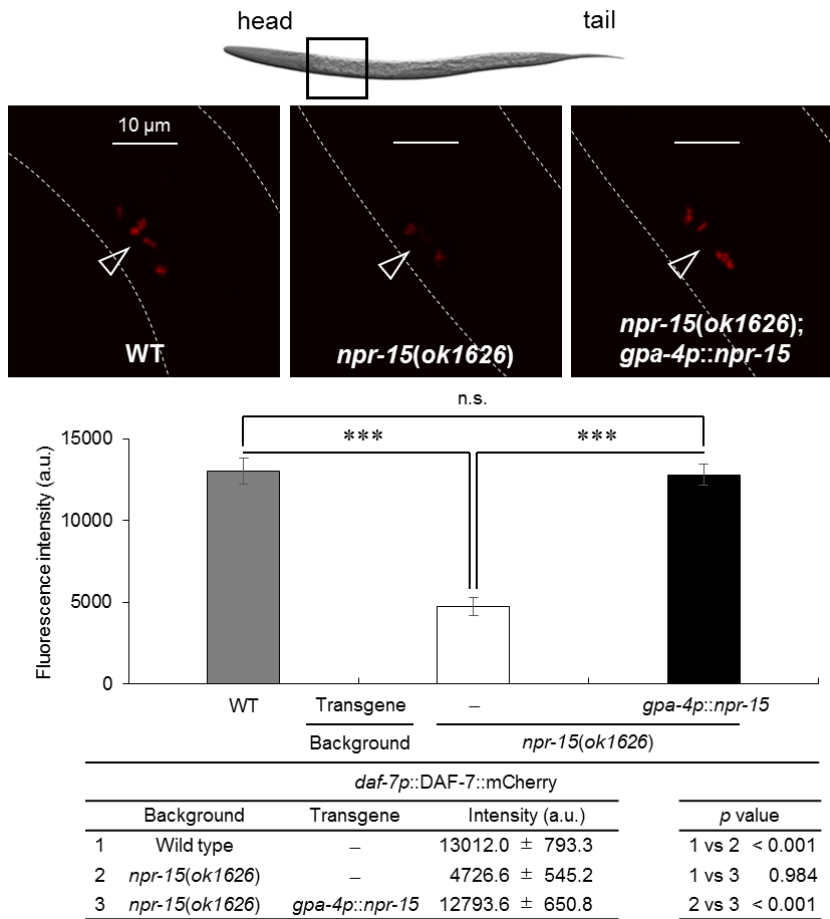
フェロモン添加による休眠誘導条件下での、野生株 (N2) の実測値を基準とした *npr-15(ok1626)* および *Ex[gpa-4p::npr-15]; npr-15(ok1626)* (残りの 2 系統) の相対休眠率を示す。各 mean ± sem は 3 回の休眠率測定で算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した (異符号間で有意差有り)。

(Line2)



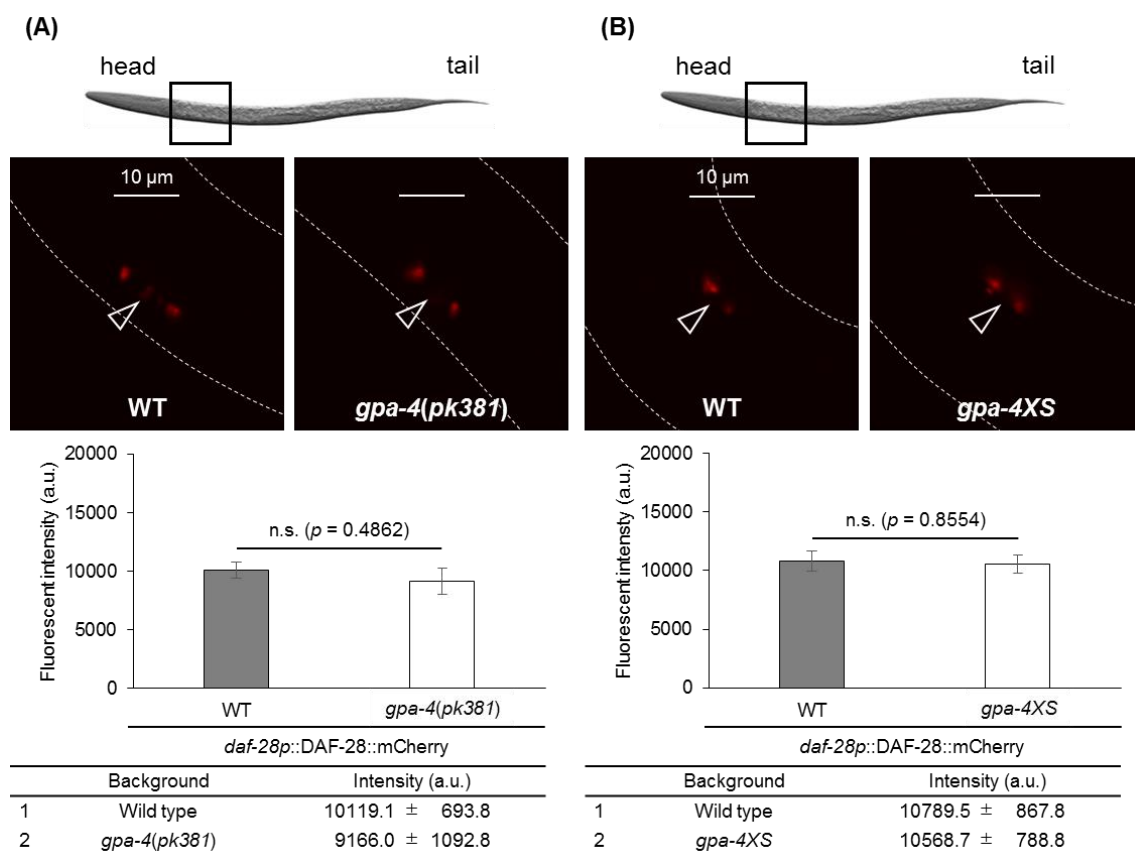
<i>daf-7p::DAF-7::mCherry</i>			
Background	Transgene	Intensity (a.u.)	<i>p</i> value
1 Wild type	–	10873.9 ± 1087.5	1 vs 2 < 0.001
2 <i>npr-15(ok1626)</i>	–	4394.7 ± 348.9	1 vs 3 0.727
3 <i>npr-15(ok1626)</i>	<i>gpa-4p::npr-15</i>	11741.5 ± 544.1	2 vs 3 < 0.001

(Line3)



**Supplementary figure 2.** *npr-15* 遺伝子破壊による DAF-7 の分泌減少は、*gpa-4p::npr-15 cDNA* の導入 (*npr-15* の ASI 細胞特異的レスキュー) によって、*npr-15* と同程度にまで回復する。

2 齢幼虫期における、*npr-15* 通常発現下、*npr-15* 遺伝子破壊下および、*npr-15* 遺伝子破壊の ASI 細胞特異的レスキュー下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を示す。各 mean ± sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *npr-15(ok1626)* = 5; *Ex[gpa-4p::npr-15]; npr-15(ok1626)* = 20) に応じて算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した (\*\*\*)  $p < 0.001$ , n.s.: not significant)。



**Supplementary figure 3. GPA-4 は DAF-28 の分泌に関与していない。**

(A) 2 齢幼虫期における、*gpa-4* 通常発現下および *gpa-4* 機能喪失型変異下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-28::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *gpa-4(pk381)* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (n.s.: not significant)。(B) 2 齢幼虫期における、*gpa-4* 通常発現下および *gpa-4* 機能獲得が多変異下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-28::mCherry の蛍光量を示す。各 mean  $\pm$  sem はそれぞれの被検体数 (WT = 5; *gpa-4XS* = 5) に応じて算出した。有意差の有無は *t*-検定を用いて算出した (n.s.: not significant)。

**Supplementary table 1. 本章で用いた変異株の一覧**

Strain	allele	description		
RB1330	<i>npr-1(ok1447)</i> X	deletion	loss of function	provided
XA3702	<i>npr-2(ok419)</i> IV	deletion	loss of function	provided
C10C6.2	<i>npr-3(tm1583)</i> IV	deletion	loss of function	provided
C16D6.2	<i>npr-4(tm1782)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB1393	<i>npr-5(ok1583)</i> V	deletion	loss of function	provided
F41E7.3	<i>npr-6(tm1497)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB761	<i>npr-7(ok527)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB1329	<i>npr-8(ok1446)</i> X	deletion	loss of function	provided
ZK455.3	<i>npr-9(tm1652)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB1325	<i>npr-10(ok1442)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB799	<i>npr-11(ok594)</i> X	deletion	loss of function	provided
T22D1.12	<i>npr-12(tm1498)</i> IV	deletion	loss of function	provided
ZC412.1	<i>npr-13(tm1504)</i> V	deletion	loss of function	provided
RB1836	<i>npr-14(ok2375)</i> I	deletion	loss of function	provided
RB1429	<i>npr-15(ok1626)</i> III	deletion	loss of function	provided
RB1365	<i>npr-16(ok1541)</i> X	deletion	loss of function	provided
C06G4.5	<i>npr-17(tm3170)</i> III	deletion	loss of function	provided
RB1289	<i>npr-18(ok1388)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB1668	<i>npr-19(ok2068)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB1958	<i>npr-20(ok2575)</i> II	deletion	loss of function	provided
Y59H11AL.1	<i>npr-22(tm13562)</i> IV	deletion	loss of function	provided
Y34D9A.2	<i>npr-23(tm13141)</i> I	deletion	loss of function	provided
VC2421	<i>npr-24(ok3192)</i> X	deletion	loss of function	provided
RB1632	<i>npr-25(ok2008)</i> V	deletion	loss of function	provided
F55E10.7	<i>npr-28(tm11155)</i> X	deletion	loss of function	provided
H10E21.2	<i>npr-30(tm6617)</i> III	deletion	loss of function	provided
RB1938	<i>npr-32(ok2541)</i> IV	deletion	loss of function	provided
Y54E2A.1	<i>npr-34(tm1665)</i> II	deletion	loss of function	provided
VC2526	<i>npr-35(ok3258)</i> IV	deletion	loss of function	provided
CB2198	<i>daf-3(e1376); lon-2(e678)</i> X	mutation	loss of function	provided
NL332	<i>gpa-1(pk15)</i> V	mutation	loss of function	provided
NL335	<i>gpa-3(pk35)</i> V	mutation	loss of function	provided
NL790	<i>gpa-4(pk381)</i> IV	deletion	loss of function	provided
NL1137	<i>gpa-5(pk376)</i> X	mutation	loss of function	provided
NL1146	<i>gpa-6(pk480)</i> X	deletion	loss of function	provided
NL793	<i>gpa-9(pk438)</i> V	deletion	loss of function	provided
NL1147	<i>gpa-10(pk362)</i> V	deletion	loss of function	provided
NL788	<i>gpa-14(pk347)</i> I	deletion	loss of function	provided
NL1584	<i>dpy-20(e1282)</i> IV; <i>pkIs515[gpa-4XS; dpy-20]</i>	mutation	gain of function	provided
FK181	<i>ksIs2(Is[daf-7p::gfp])</i>	transgene	expression	provided
tmEx4088	<i>tmEx4088(Ex[daf-7p::daf-7::mCherry])</i>	transgene	expression	provided
tmEx4106	<i>tmEx4106(Ex[daf-28p::daf-28::mCherry])</i>	transgene	expression	provided
tmls4088	<i>tmls4088(Is[daf-7p::daf-7::mCherry])</i>	transgene	expression	produced
tmls4106	<i>tmls4106(Is[daf-28p::daf-28::mCherry])</i>	transgene	expression	produced
tkEx6	<i>tkEx6(Ex[npr-15p::npr-15]; npr-15(ok1626))</i>	transgene	expression	produced
tkIs6	<i>tkIs6(Is[npr-15p::npr-15]; npr-15(ok1626))</i>	transgene	expression	produced
tkEx7	<i>tkEx7(Ex[gpa-4p::npr-15 cDNA; gpa-4p::npr-15 cDNA::gfp]; npr-15(ok1626))</i>	transgene	expression	produced

**Supplementary table 2. 本章で用いた各プライマーの配列**

primer name		sequence 5' to 3'	
		FW	RV
<i>npr-15(ok1626)</i>	deletion	TGCCCTGTTGTATACCGTGA AATCAGTTGGGATCACCGAG	AGCGGCTTCAACAGACATTT ACCTTTCCCTACTGTGCCT
<i>npr-15p::npr-15</i>	rescue	ccgcgggaattcgatGTACTTTATGTGGCAACCAG	gaattcactagtgatCGATTAACTCATTCGTTTT
<i>npr-15p::npr-15::mrfp</i>	reporter gene	gactctagaggatccccGTACTTTATGTGGCAACCAGCAGCTC	cctttggccaatcccATTAAACTAGCCCGTGGACCGACG
<i>npr-15</i> cDNA	rescue	tgtgaacacttttcaacaATGTCCGTAGCGGTGGGCATCCCC	caacttctcattaacctgAGTTAATTTTGATCGGGCACCTGGC
<i>gpa-4p</i>	rescue	gttcgatacgtaggtGACAGAAGACAGAGACTCGA	gtggcgatgcctgtaACAACTTTTCACAAGTGTTT
<i>unc-54 3'-utr</i>	rescue	gctagttttaattgaGTCCAATTACTCTTCAACATCC	ggcgcccttaagctaGAAACAGTTATGTTTGGTATATTGG
<i>gpa-4p::npr-15::gfp</i>	reporter gene	ctctagaggatccccGACAGAAGACAGAGACTCGA	cctttggccaatcccACTAGCCCGTGGACCGACG
<i>gpa-4(pk381)</i>	deletion	GCAATTGCCGATTACCGGAA GAATTGCCGATTGCCGGACA	CAGCAAAGTTGGAGCAACTG ACGTAGGAAACCGTGAGAACA
<i>act-1</i>	qRT-PCR	TCCAAGAGAGGTATCCTTACCC	CTCCATATCATCCAGTTGGTG
<i>daf-7</i>	qRT-PCR	AAGATGAAGCAGCACCGAAC	CATTCTCTGGGTCCATTGGCT

**Supplementary table 3. Figure 1 のデータの詳細**

Target gene	Absolute		Relative		Number		p value
	dauer formation (%)		dauer fromation (%)		dauer	non-dauer	
Wild type	52.1 ± 3.0		100.0 ± 5.8		2,250	1,979	4,229(18)
<i>npr-1(ok1447)</i>	67.6 ± 2.9		100.8 ± 4.3		136	67	203(1) 0.8033
<i>npr-2(ok419)</i>	61.6 ± 6.9		68.4 ± 7.7		131	80	211(1) 0.9991
<i>npr-3(tm1583)</i>	63.1 ± 5.1		70.1 ± 5.6		92	54	146(1) 0.9915
<i>npr-4(tm17829)</i>	16.2 ± 5.3		42.7 ± 14.0		31	156	187(1) 0.0063
<i>npr-5(ok1583)bc x 5</i>	24.8 ± 4.3		43.8 ± 7.7		42	129	171(1) 0.0880
<i>npr-6(sy1571)</i>	40.2 ± 0.2		71.1 ± 0.4		76	113	189(1) 0.9791
<i>npr-7(ok527)</i>	84.3 ± 1.4		93.6 ± 1.5		225	41	266(1) 0.0215
<i>npr-8(tm1553)</i>	22.7 ± 5.9		46.2 ± 12.0		46	158	204(1) 0.0502
<i>npr-9(tm1652)</i>	61.2 ± 1.4		84.1 ± 1.9		148	94	242(1) 0.9996
<i>npr-10(ok1442)</i>	30.8 ± 5.8		45.9 ± 8.7		41	86	127(1) 0.3433
<i>npr-11(tm4763)</i>	26.1 ± 3.0		53.2 ± 6.1		44	125	169(1) 0.1244
<i>npr-12(tm1498)</i>	14.4 ± 3.7		43.8 ± 11.4		29	174	203(1) 0.0033
<i>npr-13(tm1504)</i>	30.7 ± 4.1		97.1 ± 13.1		58	130	188(1) 0.3376
<i>npr-14(ok2375)</i>	79.5 ± 2.4		88.4 ± 2.7		210	50	261(1) 0.0856
<i>npr-15(ok1626)</i>	84.4 ± 2.9		267.3 ± 9.2		140	26	166(1) 0.0210
<i>npr-16(ok1541)</i>	32.1 ± 1.4		81.8 ± 3.7		87	184	271(1) 0.4350
<i>npr-17(tm3170)</i>	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0	212	212(1) < .0001
<i>npr-18(ok1388)</i>	28.4 ± 1.9		72.5 ± 4.9		75	187	262(1) 0.2126
<i>npr-19(ok2068)</i>	57.9 ± 5.7		147.5 ± 14.6		149	104	253(1) 1.0000
<i>npr-20(ok2575)</i>	50.0 ± 1.3		189.0 ± 4.9		131	132	263(1) 1.0000
<i>npr-21(sy1309)</i>	14.0 ± 7.5		44.7 ± 23.8		24	155	179(1) 0.0029
<i>npr-22(tm13562)</i>	3.3 ± 2.4		3.9 ± 2.8		5	126	131(1) < .0001
<i>npr-23(sy1203)</i>	55.7 ± 8.5		72.6 ± 11.0		79	61	140(1) 1.0000
<i>npr-24(ok3192)</i>	63.6 ± 5.1		106.9 ± 8.6		176	102	278(1) 0.9857
<i>npr-25(ok2008)</i>	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0	332	332(1) < .0001
<i>npr-26(sy1307)</i>	14.4 ± 8.4		18.8 ± 10.9		20	147	167(1) 0.0033
<i>npr-27(sy1315)</i>	40.9 ± 11.0		53.3 ± 14.3		63	82	145(1) 0.9894
<i>npr-28(tm11155)</i>	10.6 ± 0.6		32.1 ± 1.9		23	194	217(1) 0.0007
<i>npr-29(sy1270)</i>	58.3 ± 3.9		75.9 ± 5.1		99	71	170(1) 1.0000
<i>npr-30(tm6617)</i>	45.8 ± 8.1		110.4 ± 19.5		132	170	302(1) 1.0000
<i>npr-31(sy1360)</i>	54.7 ± 2.5		96.6 ± 4.4		104	87	191(1) 1.0000
<i>npr-32(ok2541)</i>	17.1 ± 4.7		43.7 ± 11.9		47	218	265(1) 0.0087
<i>npr-33(sy1272)</i>	46.8 ± 4.9		61.0 ± 6.3		72	77	149(1) 1.0000
<i>npr-34(tm1665)</i>	25.1 ± 2.9		33.5 ± 3.8		47	144	191(1) 0.0967
<i>npr-35(ok3258)</i>	32.1 ± 5.8		65.4 ± 11.8		58	163	221(1) 0.4371

**Supplementary table 4. Figure 2C のデータの詳細**

	Background	Transgene	Absolute dauer formation (%)	Relative dauer formation (%)	dauer	Number non-dauer	total (trials)
1	Wild type	–	44.2 ± 4.8	100.0 ± 10.8	228	288	516 (3)
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	–	81.3 ± 3.9	184.2 ± 8.7	322	73	395 (3)
3	<i>npr-15(ok1626)</i>	<i>npr-15p::npr-15</i>	41.7 ± 8.0	94.5 ± 18.1	155	226	381 (3)
4	<i>npr-15(ok1626)</i>	<i>gpa-4p::npr-15</i>	45.2 ± 3.1	102.4 ± 7.1	234	312	546 (3)

	<i>p</i> value		<i>p</i> value
1 vs 2	0.006	2 vs 3	0.009
1 vs 3	0.980	2 vs 4	0.004
1 vs 4	0.975	3 vs 4	0.859

**Supplementary table 5. Figure 3 のデータの詳細**

(A)

	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	11642.0 ± 1657.3
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	6041.3 ± 733.9

(B)

	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	9824.5 ± 1234.6
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	10844.7 ± 1161.9

(C)

	Background	Transgene	Intensity (a.u.)	<i>p</i> value
1	Wild type	–	10775.3 ± 795.9	1 vs 2 0.021
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	–	4847.7 ± 227.5	1 vs 3 0.952
3	<i>npr-15(ok1626)</i>	<i>gpa-4p::npr-15</i>	10287.0 ± 832.9	2 vs 3 0.007

(D)

	Target gene	Absolute dauer formation (%)	Relative dauer formation (%)	dauer	Number non-dauer	total (trials)
1	Wild type	27.0 ± 4.1	100.0 ± 15.0	158	424	582 (3)
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	56.5 ± 4.7	209.1 ± 17.4	319	244	563 (3)
3	<i>daf-3(e1376)</i>	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.6	1	649	650 (3)
4	<i>npr-15;daf-3</i>	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.6	1	670	671 (3)

	<i>p</i> value		<i>p</i> value
1 vs 2	< 0.001	2 vs 3	< 0.001
1 vs 3	0.001	2 vs 4	< 0.001
1 vs 4	0.001	3 vs 4	1.000

Supplementary table 6. Figure 4 のデータの詳細

(A)

Target gene	Absolute	Relative	Number			<i>p</i> value
	dauer formation (%)	dauer formation (%)	dauer	non-dauer	total (trials)	
Wild type	49.7 ± 7.4	100.0 ± 4.3	347	293	640(2)	
<i>gpa-1(pk15)</i>	27.5 ± 4.8	41.9 ± 7.3	91	232	323(1)	0.0003
<i>gpa-3(pk35)</i>	38.9 ± 2.3	59.1 ± 3.5	123	190	313(1)	0.0059
<i>gpa-4(pk381)</i>	73.9 ± 1.7	219.8 ± 5.1	153	55	208(1)	0.0018
<i>gpa-5(pk376)</i>	32.4 ± 2.9	49.4 ± 4.4	169	353	522(1)	0.0010
<i>gpa-6(pk480)</i>	34.3 ± 7.4	52.3 ± 11.3	130	249	379(1)	0.0016
<i>gpa-9(pk438)</i>	29.8 ± 6.2	45.4 ± 9.5	112	249	361(1)	0.0005
<i>gpa-10(pk362)</i>	2.7 ± 2.7	4.1 ± 4.1	27	530	557(1)	< 0.0001
<i>gpa-14(pk347)</i>	33.2 ± 7.1	50.6 ± 10.8	226	398	624(1)	0.0012

(B)

	Target gene	Absolute	Relative	Number		
		dauer formation (%)	dauer formation (%)	dauer	non-dauer	total (trials)
1	Wild type	31.4 ± 3.3	100.0 ± 10.4	195	434	629 (3)
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	62.2 ± 3.2	198.0 ± 10.3	372	223	595 (3)
3	<i>gpa-4(pk381)</i>	70.1 ± 1.7	223.2 ± 5.5	458	193	651 (3)
4	<i>npr-15; gpa-4</i>	68.4 ± 7.4	217.9 ± 23.6	392	185	577 (3)

<i>p</i> value		<i>p</i> value	
1 vs 2	0.001	2 vs 3	0.330
1 vs 3	< 0.001	2 vs 4	0.506
1 vs 4	< 0.001	3 vs 4	0.977

(C)

	Target gene	Absolute	Relative	Number		
		dauer formation (%)	dauer formation (%)	dauer	non-dauer	total (trials)
1	Wild type	38.4 ± 5.8	100.0 ± 15.1	222	370	592 (3)
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	72.2 ± 6.3	187.9 ± 16.3	339	229	568 (3)
3	<i>gpa-4XS</i>	4.6 ± 1.5	12.0 ± 4.0	10	225	235 (3)
4	<i>npr-15; gpa-4XS</i>	4.6 ± 1.8	11.8 ± 4.7	21	382	403 (3)

<i>p</i> value		<i>p</i> value	
1 vs 2	0.005	2 vs 3	< 0.001
1 vs 3	0.005	2 vs 4	< 0.001
1 vs 4	0.005	3 vs 4	1.000

# Supplementary table 7. Figure 5 のデータの詳細

(A)		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	9201.2 $\pm$ 1249.7
2	<i>gpa-4(pk381)</i>	3562.9 $\pm$ 793.6

(B)		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	11908.6 $\pm$ 2227.5
2	<i>gpa-4XS</i>	21242.4 $\pm$ 997.4

# Supplementary table 8. Figure 6 のデータの詳細

(A)		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	14427.1 $\pm$ 1978.1
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	2437.7 $\pm$ 732.1

(B)		
	Background	Level of mRNAs (Fold)
1	Wild type	1.0003 $\pm$ 0.017
2	<i>npr-15(ok1626)</i>	0.6649 $\pm$ 0.020

## 第3章

### FLP-6 受容体の探索

(A search for FLP-6 receptor.)

#### 【緒言】

第2章では、FLP-6 受容体の探索に際して NPR (NeuroPeptide Receptor) ファミリーに着目した。これは、既存の研究において、多くの FLP 受容体が NPR であるとの既存の研究結果に基づいてのことであった。*npr* 遺伝子破壊株を用いたスクリーニングでは、*flp-6(ok3056)*と同様に遺伝子破壊による休眠率上昇を示したのは *npr-15(ok1626)*のみであった。これを受けて、NPR-15 が FLP-6 受容体であるとの予測（期待）の下、NPR-15 の分子遺伝学的解析を進めてきたが、NPR-15 は FLP-6 受容体でないことが判明した。この結果から、FLP-6 受容体は NPR 以外の神経ペプチド受容体（GPCR）であると予測される。そこで、NPR 以外にも FLP 受容体として同定された神経ペプチド受容体（FMRFamide Peptide Receptor: FRPR）のファミリーに着目し[1,2]、遺伝子破壊株を用いたスクリーニングを実施したが、休眠率上昇を示した株は皆無であった（Figure 1）。従って、FLP-6 受容体は FRPR ファミリーにも含まれないことが判明した。Chai らは筆者と同様に、*C. elegans* の休眠現象に着目して休眠現象に関わる GPCR を探索した[3]。Chai らは、NPR ならびに FRPR 以外の GPCR にも着目し、*nmur-2*, *ntr-1*, *pdfr-1*, *tkr-2* の遺伝子破壊株が休眠率上昇を示すことを明らかにしている[3]。そこで本章

では、FLP-6 受容体を固定すべく、これらの遺伝子に着目した研究展開を図った。

## 材料と方法

### 1-1. Strains

本章でも CGC ならびに日本の NBRP から入手した以下の遺伝子破壊株を使用した。*frpr-1(sy1292)X*、*frpr-2(sy1364)X*、*frpr-3(ok3202)V*、*frpr-4(ok2376)II*、*frpr-5(sy1274)V*、*frpr-6(tm12691)V*、*frpr-7(sy1296)X*、*frpr-8(tm10970)IV*、*frpr-9(sy1294)V*、*frpr-10(ok1504)IV*、*frpr-11(sy1278)V*、*frpr-12(sy1581)V*、*frpr-13(sy1298)V*、*frpr-14(sy1300)II*、*frpr-15(tm7561)V*、*frpr-16(sy1366)II*、*frpr-17(sy1302)X*、*frpr-18(ok2698)V*、*frpr-19(sy1304)IV*、*nmur-2(ok3502)II*、*ntr-1(ok2780)I*、*pdf-1(ok3425)III*、*tkr-2(ok1620)IV*。また、著者が以前に作出した遺伝子導入株 *tkEx5(Ex[ins-35p::ins-35::mrfp])*、*tmls4088(Is[daf-7p::daf-7::mCherry])*、*tmls4106(Is[daf-28p::daf-28::mCherry])*、*tkIs1(Is[flp-6p::flp-6])* を使用した。さらに本研究では、著者が *tkIs5(Is[ins-35p::ins-35::mrfp])* を作出し、使用した（下記参照）。多重変異株、*tmls4088;ntr-1(ok2780)*、*tmls4106;ntr-1(ok2780)*、*tkIs1;ntr-1(ok2780)* ならびに、*tkIs5;ntr-1(ok2780)* を交雑により作出した。

### 1-2. transgenic worm の作出

INS-35::mRFP 発現株 (*tkEx5(Ex[ins-35p::ins-35::mrfp])*) を染色体内固定（紫外線照射）することにより、安定発現株を作出した[4]。その後、野生株（N2）との戻し交配を 5 回行うことで不要な変異を除去し、INS-35::mRFP 発現株 (*tkIs5(Is[ins-35p::ins-35::mrfp])*) として以降の実験に用いた。

## 実験結果

### 標的となる *frpr* 遺伝子の選抜

第2章で FLP-6 受容体として機能する NPR の存在が否定されたため、NPR 以外で FLP 受容体として同定された神経ペプチド受容体 (FRPR) に着目した[2]。線虫 *C. elegans* には FRPR をコードする遺伝子が 19 種類存在する[1]。そこで、FLP-6 の受容体候補となる FRPR を選抜するために、*flp-6* と同様に遺伝子破壊で休眠率上昇を示す *frpr* 遺伝子の探索を行った。現存する全ての *frpr* 遺伝子破壊線株を入手し、休眠率を測定したところ、休眠率上昇を示す株は皆無であった (Figure 1)。以上の結果から、FLP-6 の受容体候補となり得る FRPR を発見できなかった。そこで、FRPR を FLP-6 の受容体候補から外し、他の神経ペプチド受容体 (GPCR) に着目することとした。

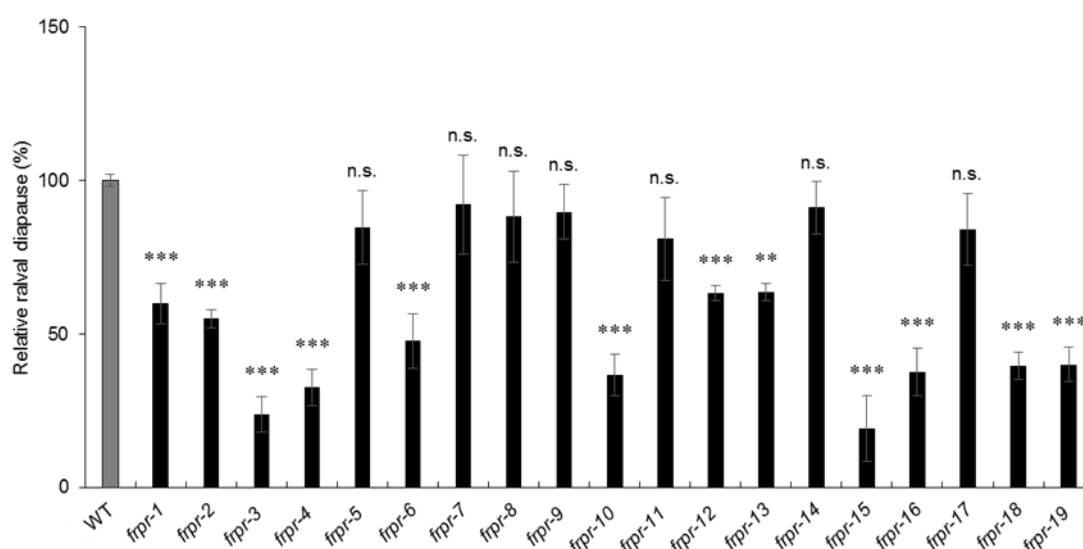
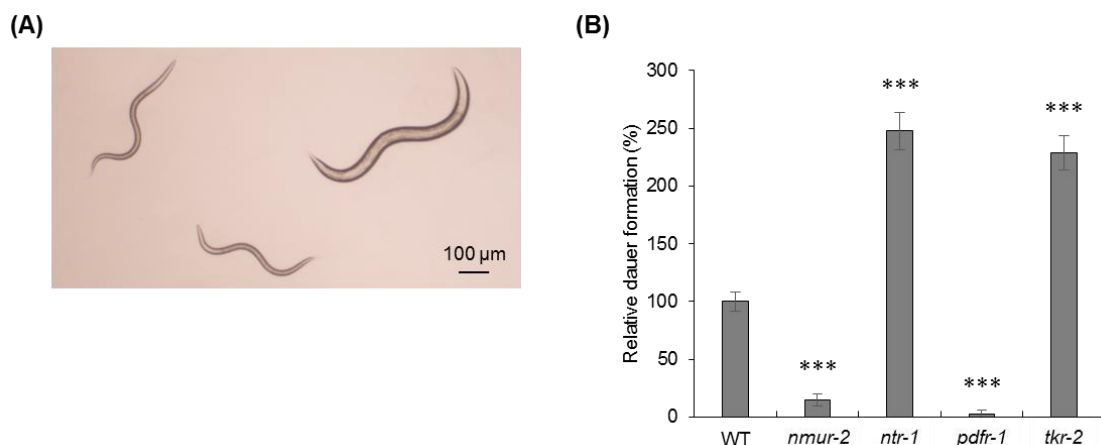


Figure 1. *frpr* 遺伝子破壊株は休眠率上昇を示さない。

野生株 (N2) の実測値を基準とした、各遺伝子破壊株の相対休眠率を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  は 3 枚のプレート (1 トライアル) で休眠率を測定し、算出した。Dunnett 検定を用いて有意差の有無を算出した ( $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ ; n.s., not significant)。 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値、被検体数、試行回数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 2 に示した。

### 標的となる *gpcr* 遺伝子の選抜

線虫 *C. elegans* には NPR および FRPR 以外に複数の神経ペプチド受容体 (GPCR) が存在する[1]。先行研究 (Chai ら) で、これらの GPCR 遺伝子に対する休眠率測定が実施されたところ、*nmur-2(ok3502)*、*ntr-1(ok2780)*、*pdf-1(ok3425)*、*tkr-2(ok1620)* の 4 種類の遺伝子破壊株が *flp-6* 遺伝子破壊株と同様に休眠率上昇を示した[3]。故に、*nmur-2*、*ntr-1*、*pdf-1*、*tkr-2* の 4 種類を、FLP-6 受容体をコードする遺伝子の候補とした。まず、*nmur-2*、*ntr-1*、*pdf-1*、*tkr-2* が FLP-6 受容体をコードする可能性を検証するために、それぞれの遺伝子破壊株 (*nmur-2(ok3502)*、*ntr-1(ok2780)*、*pdf-1(ok3425)*、*tkr-2(ok1620)*) の休眠率測定を同時に行った。その結果、Figure 2 に示すように、*ntr-1(ok2780)* および *tkr-2(ok1620)* が顕著な休眠率上昇を示した。これら 2 種類の遺伝子の中でも、*ntr-1* は休眠制御において重要な役割を果たす ASJ 細胞および腸細胞の両方で発現するため[5,6]、*ntr-1* 遺伝子に対する分子遺伝学的解析を進めていくこととした。



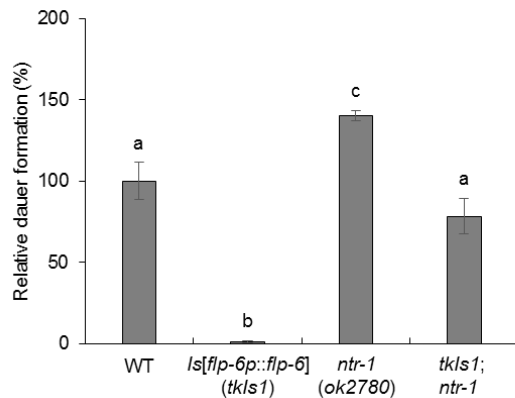
**Figure 2.** *ntr-1(ok2780)*および *tkr-2(ok1620)*が顕著な休眠率上昇を示す。

(A) 休眠幼虫（左，中央）と4齢幼虫（右）を示した。(B) 野生株（N2）の実測値を基準とした、各遺伝子破壊株の相対休眠率を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  は3枚のプレート（1 トライアル）で休眠率を測定し、算出した。Dunnett 検定を用いて有意差の有無を算出した（\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ）。 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値、被検体数、試行回数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 3 に示した。

## epistasis 解析

遺伝子破壊線虫の休眠率測定の結果から、*ntr-1* 遺伝子破壊が *flp-6* 遺伝子破壊と同様に休眠率が上昇することが示された。従って、NTR-1 は FLP-6 受容体である可能性が考えられる。そこで、この可能性を検証するために、休眠率低下を示す *flp-6* 過剰発現株 (*tkIs1*) と休眠率上昇を示す *ntr-1* 遺伝子破壊株 (*ntr-1(ok2780)*) の epistasis（遺伝学的上下関係）解析を行った。その結果、Figure 3 に示すように、*flp-6* 過剰発現による休眠率低下は *ntr-1* 遺伝子破壊により部分的に打ち消され、二重変異体は野生株とほぼ同等の休眠率の値を示した。この結果から、*ntr-1* は *flp-6* に対して部分的に遺伝学的上位（epistatic）であり、*flp-6* は *ntr-1* を介して最終的に通常生育を維持（幼虫休眠を阻害）すると推察した。すなわち、

NTR-1 が FLP-6 受容体である可能性が示されたことになる。この可能性を検証し、NTR-1 が FLP-6 受容体であることを立証するため、NTR-1 のホルモンシグナル伝達経路への関与を検証した。



**Figure 3.** *ntr-1* は *flp-6* に対して遺伝学的に部分的上位である。

フェロモン添加による休眠誘導条件下での、野生株 (N2) の実測値を基準とした各変異株の相対休眠率を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  は3枚のプレート (1 トライアル) で休眠率を測定し、算出した。有意差の有無は Tukey HSD 検定を用いて算出した (異符号間で有意差有り)。 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値、被検体数、 $p$  値等の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 4 に示した。

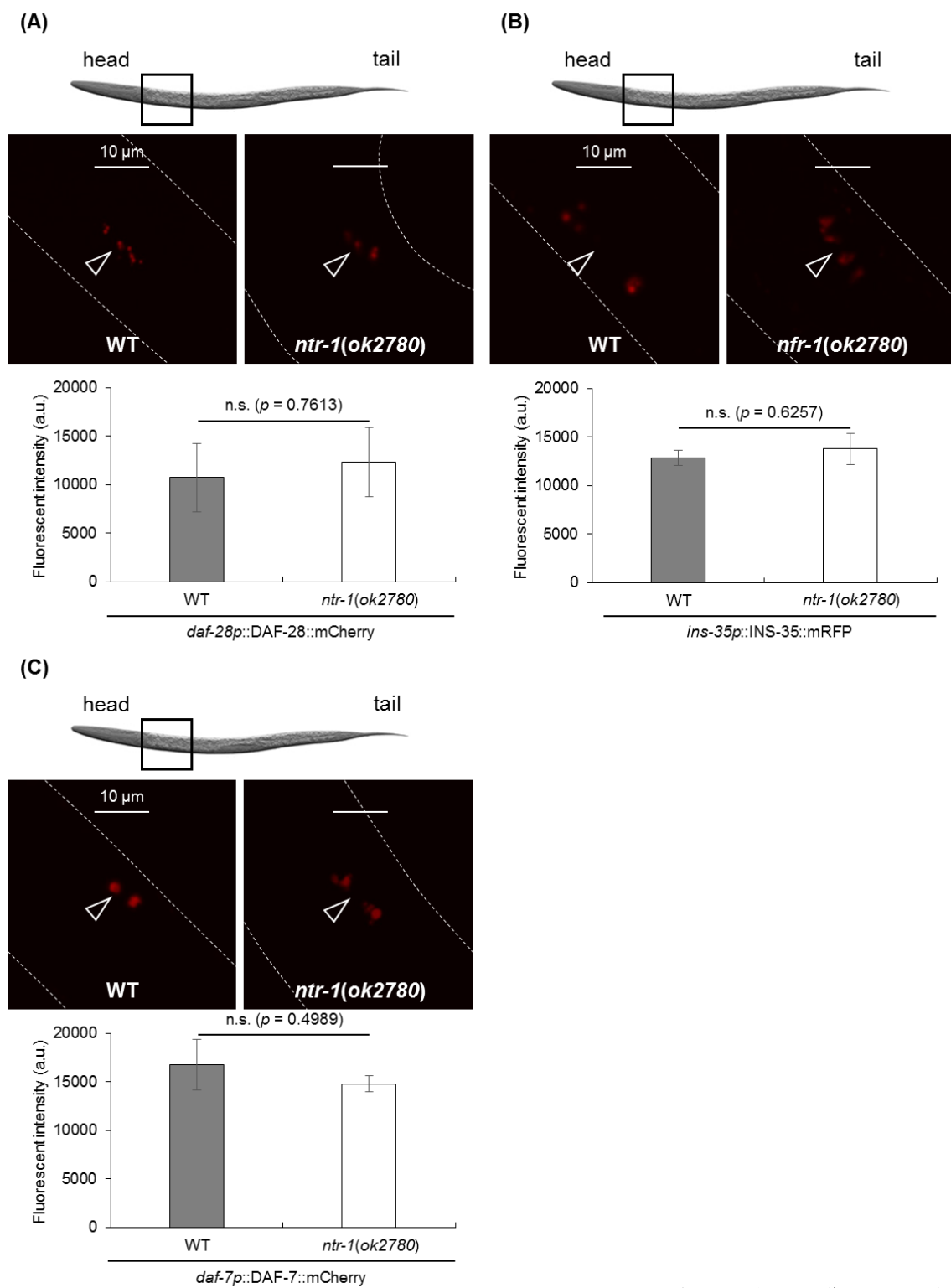
### ホルモンシグナル伝達経路への関与の検証

通常生育/幼虫休眠の決定は、下流のホルモンシグナルである TGF- $\beta$  様シグナル伝達経路 (DAF-7 が唯一のリガンド) ならびにインスリン様シグナル伝達経路 (40 種類のインスリン様ペプチドの存在が推定) によりなされる[7]。そして、40 種類のインスリン様ペプチドのうち DAF-28 が最も優位にインスリン様シグナルを制御する[8,9]。TGF- $\beta$  様シグナルのリガンド DAF-7 は頭部感覚神経細胞

の ASI 細胞で産生・分泌されている[10]。一方で、インスリン様シグナルのリガンド DAF-28 は頭部感覚神経細胞の ASI 細胞および ASJ 細胞で産生・分泌されている[8]。そして、これらリガンド分子の転写はエサおよびフェロモンの影響を受けることが知られている[8,10]。さらに、DAF-28 を除けば、40 種類のインスリン様ペプチドのうち、腸で産生・分泌される INS-35 も休眠制御において重要な役割を果たすことが明らかにされている[11]。第 1 章では、ASI 細胞で発現するフェロモン応答性の FLP-6 が、DAF-7 ではなく DAF-28 および INS-35 の分泌に関与することが示された。そこで、神経ペプチド受容体 (NTR-1) の下流のホルモンシグナル経路が、FLP-6 のそれと一致するのかを検証するため、リガンド分子 DAF-7、DAF-28 および INS-35 の分泌変動の有無を検討した。まず、2 齢幼虫期の DAF-28 レポータータンパク (*daf-28p::DAF-28::mCherry*) を発現する株 (*tmls4106*) および、INS-35 レポータータンパク (*ins-35p::INS-35::mRFP*) を発現する株 (*tkIs5*) を用いて、頭部体腔細胞内に蓄積した DAF-28::mCherry および INS-35::mRFP の蛍光量を測定した。次に、この *tmls4106* ならびに *tkIs5* を *ntr-1(ok2780)* と交雑させ、*ntr-1* 遺伝子破壊下で DAF-28::mCherry および INS-35::mRFP (頭部体腔細胞内に蓄積) の蛍光量を同様に測定した。その結果、Figure 4A, B に示すように、*ntr-1* 遺伝子破壊下では DAF-28::mCherry および INS-35::mRFP の蛍光量は、*ntr-1* 通常発現下と同程度であった。この結果から、NTR-1 は DAF-28 および INS-35 の分泌に影響を及ぼさないことが明らかとなった。従って、この時点で NTR-1 は FLP-6 受容体でないことが明らかとなった。

次に、NTR-1 の TGF- $\beta$  様シグナルへの関与を明らかにするため、DAF-7 の分泌に対する NTR-1 の影響を上記と同様の方法で検討した。DAF-7 のレポータータンパク (*daf-7p::DAF-7::mCherry*) を発現する株 (*tmls4088*) を *ntr-1(ok2780)* と交雑させ、頭部体腔細胞に蓄積する DAF-7::mCherry の蛍光量の変動を確認した。

その結果、*ntr-1* 遺伝子破壊下では、蛍光量は *ntr-1* 通常発現下と同程度であった (Figure 4C)。この結果から、NTR-1 は TGF- $\beta$  様シグナル (DAF-7 を唯一のリガンドとする) に関与しないことが明らかとなった。従って、NTR-1 は DAF-28 および INS-35 以外のインスリン様分子を介して、幼虫休眠を阻害すると推察した。



**Figure 4.** NTR-1 は DAF-28、INS-35 および DAF-7 のいずれの分泌制御にも関与しない。

(A) 2 齢幼虫期における、*ntr-1* 通常発現下および *ntr-1* 遺伝子破壊下での頭部体

腔細胞に蓄積した DAF-28::mCherry の蛍光量を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  はそれぞれの被検体数 ( $\text{WT} = 5$ ;  $ntr-1 = 5$ ) に応じて算出した。有意差の有無は  $t$ -検定を用いて算出した (n.s., not significant)。他の遺伝子破壊株を含む、 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5A に示した。(B) 2 齢幼虫期における、 $ntr-1$  通常発現下および  $ntr-1$  遺伝子破壊下での頭部体腔細胞に蓄積した INS-35::mRFP の蛍光量を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  はそれぞれの被検体数 ( $\text{WT} = 5$ ;  $ntr-1 = 5$ ) に応じて算出した。有意差の有無は  $t$ -検定を用いて算出した (n.s., not significant)。他の遺伝子破壊株を含む、 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5B に示した。(C) 2 齢幼虫期における、 $ntr-1$  通常発現下および  $ntr-1$  遺伝子破壊下での頭部体腔細胞に蓄積した DAF-7::mCherry の蛍光量を示す。各  $\text{mean} \pm \text{sem}$  はそれぞれの被検体数 ( $\text{WT} = 5$ ;  $ntr-1 = 5$ ) に応じて算出した。有意差の有無は  $t$ -検定を用いて算出した (n.s., not significant)。他の遺伝子破壊株を含む、 $\text{mean} \pm \text{sem}$  の値の詳細な数値を補足資料 Supplementary Table 5C に示した。

## 考察

第 3 章では FLP-6 受容体の探索に際して、FLP 受容体として同定された神経ペプチド受容体 (FRPR) に対して[1,2]、遺伝子破壊株を用いたスクリーニングを実施したが、休眠率上昇を示した株は皆無であった。そこで、Chai らが *nmur-2*, *ntr-1*, *pdf-1*, *tkr-2* の 4 種類が遺伝子破壊で休眠率上昇を示すことを明らかにしたため[3]、これら 4 種類を、FLP-6 受容体をコードする遺伝子の候補とした。まず、この 4 種類の遺伝子破壊株の休眠率測定を同時に行った。その結果、*ntr-1(ok2780)* および *tkr-2(ok1620)* のみが顕著な休眠率上昇 (*flp-6(ok3056)* と同じ表現型) を示した。この 2 種類の遺伝子の中でも、*ntr-1* は休眠制御において重要な役割を果たす ASJ 細胞および腸細胞で発現するため[5,6]、GPCR 遺伝子 *ntr-1* の分子遺伝学的解析を進めることとした。

それに際して、まず、NTR-1 が FLP-6 と共役する可能性を検証するために、*flp-6* 過剰発現株 (*tkIs1*) と *ntr-1(ok3425)* の epistasis 解析を行った。その結果、*ntr-1* は *flp-6* に対して部分的に遺伝学的上位 (epistatic) であり、*flp-6* は *ntr-1* を介して最終的に通常生育を維持 (幼虫休眠を阻害) する可能性が示された。その次の段階として、NTR-1 が関与する下流のホルモンシグナルが、FLP-6 が関与する下流のホルモンシグナルと一致するのかを検証した。その結果、NTR-1 が関与する下流のホルモンシグナルが、FLP-6 が関与する下流のホルモンシグナルと一致しないことが明らかとなった。従って、NTR-1 は FLP-6 受容体でないことが明らかとなったため、TKR-2 が FLP-6 受容体の最終候補として期待される。

*frpr* 遺伝子破壊株に対するスクリーニングの結果、休眠率低下を示す *frpr* 遺

伝子破壊株は 12 種類も存在したのに対し、休眠率上昇を示す *firpr* 遺伝子破壊株は皆無であった。この結果は幼虫生育を阻害する（幼虫休眠を誘導する）FRPR は多数存在するのにも関わらず、幼虫生育を維持する（幼虫休眠を阻害する）FRPR は存在しないことを示す。従って、幼虫生育を阻害する（幼虫休眠を誘導する）因子は多数存在するが、幼虫生育を維持する（幼虫休眠を阻害する）因子は数少ない可能性が高い。第 2 章で 35 種類の *npr* 遺伝子破壊株に対するスクリーニングを行った際にも、休眠率低下を示す *npr* 遺伝子破壊株は 9 種類も存在したのに対し、休眠率上昇を示す *npr* 遺伝子破壊株は 1 種類しか存在しないことは、この可能性の高さを助長する。これは、あらゆる生育環境中の悪化（エサの枯渇、個体密度の上昇、高温）に対して迅速に対応するために、幼虫生育を阻害する（幼虫休眠を誘導する）因子が多数存在すると考えられる。

## 引用文献

1. Frooninckx L, Rompay VL, Temmerman L, Sinay VE, Beets I, Janssen T, Husson JS and Schoofs L (2012). Neuropeptide GPCRs in *C. elegans*. *Frontiers in Endocrinology* 3(167).
2. Mertens I, Meeusen T, Jansen T, Nachman R, Schoofs L (2005). Molecular characterization of two G protein-coupled receptor splice variants as FLP2 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330: 967-974.
3. Chai MC, Park H, Sternberg WP (2022). Brain-wide bidirectional neuropeptide modulation of individual neuron classes regulates a developmental decision. *Current Biology* 32: 3365-3373.
4. Kage-Nakadai E, Imae R, Yoshina S, and Mitani S (2014). Methods for single/low-copy integration by ultraviolet and trimethylpsoralen treatment in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 68(3): 397–402.
5. Hammarlund M, Hobert O, Miller D, Sestan N. Discovery and analysis of the *C. elegans* Neuronal Gene Expression Network. CeNGEN.  
<https://cengen.shinyapps.io/cengenApp-legacy/> (accessed 2023\_05\_05).
6. Garrison LJ, Macosko ZE, Bernstein S, Pokala N, Albrecht RD, Bargmann IC (2012). Oxytocin/Vasopressin-Related Peptides Have an Ancient Role in Reproductive Behavior. *Science* 338: 540-543.

7. Hu PJ (August 08, 2007). Dauer. WormBook.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_dauer/dauer.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html/) (accessed 2023\_05\_05)
8. Li W, Kennedy GS, and Ruvkun, G (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes & Development* 17: 844–858.
9. Fernandes de Abreu DA, Caballero A, Fardel P, Stroustrup N, Chen Z, Lee K, Keyes WD, Nash ZM, Lopez-Moyado IF, Vaggi F, Cornils A, Regenass M, Neagu A, Ostojic I, Liu C, Cho Y, Sifoglu D, Shen Y, Fontana W, Lu H, Csikasz-Nagy A, Murphy CT, Antebi A, Blanc E, Apfeld J, Zhang Y, Alcedo J, and Chng Q (2014). An insulin-to-insulin regulatory network orchestrates phenotypic specificity in development and physiology. *PLOS Genetics* 10(3).
10. Pandey P, Bhat SU, Singh A, Joy A, Birari V, Kadam YN, and Babu K (2021). Dauer formation in *C. elegans* is modulated through AWC and ASI-dependent chemosensation. *eNeuro* 8(2).
11. Matsunaga Y, Honda Y, Honda S, Iwasaki T, Qadota H, Benian M G and Kawano T (2016). Diapause is associated with a change in the polarity of secretion of insulin-like peptides. *Nature Communications* 7: 10573.

## 補足資料

**Supplementary table 1. 本章で用いた各プライマーの配列**

primer name		sequence 5' to 3'	
		FW	RV
<i>nmur-2(ok3502)</i>	deletion	ATTCACTTTGGCGGTTTCAG CGCAAAATGTTTTAGGGCTC	CGGCTTCTGTTGAGGAAGAG TGTCAAACACGCTTCGAACT
<i>ntr-1(ok2780)</i>	deletion	ATGGGAGCCTTCTTTCCTGT CTCACCCCAACCAATTTC	GTCAGGCACCCAAATCAGT TCGATGCACCATGAAGGTAA
<i>pdf-1(ok3425)</i>	deletion	TTTATGCAGGCTTATTGCCC TCAGGCGGCTTCGAGTATT	CGTGAATCATCGCTACCTT TTTACTCCTTGACGGGAACG

**Supplementary table 2. Figure 1 のデータの詳細**

Target gene	Absolute		Relative		Number			p value
	dauer	formation (%)	dauer	formation (%)	dauer	non-dauer	total (trials)	
Wild type	58.0 ± 3.7		100.0 ± 2.0		1,767	1,103	2,870(12)	
<i>frpr-1(sy1292)</i>	33.9 ± 3.8		59.9 ± 6.7		65	127	192(1)	0.0002
<i>frpr-2(sy1364)</i>	29.8 ± 1.6		55.1 ± 3.0		48	112	160(1)	< .0001
<i>frpr-3(ok3302)</i>	20.4 ± 5.0		23.7 ± 5.8		45	144	189(1)	< .0001
<i>frpr-4(ok2376) bc x 5</i>	28.0 ± 5.0		32.6 ± 5.8		59	157	216(1)	< .0001
<i>frpr-5(sy1274)</i>	45.9 ± 6.4		84.7 ± 11.9		69	78	147(1)	0.5398
<i>frpr-6(tm12691)</i>	22.0 ± 4.1		47.8 ± 8.9		125	441	566(1)	< .0001
<i>frpr-7(sy1296)</i>	35.6 ± 6.3		92.2 ± 16.2		59	109	168(1)	0.9938
<i>frpr-8(tm10970)</i>	62.2 ± 10.5		88.3 ± 14.8		118	72	190(1)	0.8442
<i>frpr-9(sy1294)</i>	48.6 ± 4.8		89.8 ± 8.9		85	89	174(1)	0.9341
<i>frpr-10(ok1504) bc x 5</i>	27.0 ± 5.0		36.5 ± 6.7		74	186	260(1)	< .0001
<i>frpr-11(sy1278)</i>	45.8 ± 7.6		81.0 ± 13.4		81	97	178(1)	0.2610
<i>frpr-12(sy1581)</i>	11.6 ± 0.5		63.4 ± 2.5		26	199	225(1)	0.0008
<i>frpr-13(sy1298)</i>	34.5 ± 1.5		63.7 ± 2.8		58	140	198(1)	0.0010
<i>frpr-14(sy1300)</i>	16.7 ± 1.5		91.2 ± 8.4		37	186	223(1)	0.9795
<i>frpr-15(tm7561)</i>	5.2 ± 2.9		19.3 ± 10.7		4	196	200(1)	< .0001
<i>frpr-16(sy1366)</i>	28.4 ± 5.8		37.7 ± 7.6		57	245	302(1)	< .0001
<i>frpr-17(sy1302)</i>	15.4 ± 2.1		84.1 ± 11.6		35	196	231(1)	0.4846
<i>frpr-18(ok2698) bc x 5</i>	25.3 ± 2.9		39.6 ± 4.5		39	112	151(1)	< .0001
<i>frpr-19(sy1304)</i>	7.3 ± 1.0		40.1 ± 5.7		17	221	238(1)	< .0001

**Supplementary table 3. Figure 2 のデータの詳細**

Target gene	Absolute	Relative	dauer	Number		<i>p</i> value
	dauer formation (%)	dauer formation (%)		non-dauer	total (trials)	
Wild type	30.4 ± 4.3	100.0 ± 14.1	119	251	370(2)	
<i>nmur-2(ok3502)</i>	4.9 ± 1.7	16.2 ± 5.7	9	180	189(1)	0.0001
<i>ntr-1(ok2780)</i>	49.5 ± 3.8	162.8 ± 12.6	110	25	135(1)	<.0001
<i>pdf-1(ok3425)</i>	1.0 ± 1.0	3.2 ± 3.2	2	205	207(1)	<.0001
<i>tkr-2(ok1620)</i>	75.8 ± 4.9	249.6 ± 16.1	97	31	128(1)	<.0001

**Supplementary table 4. Figure 3 のデータの詳細**

	Target gene	Absolute	Relative	dauer	Number	
		dauer formation (%)	dauer formation (%)		non-dauer	total (trials)
1	Wild type	23.7 ± 4.4	100.0 ± 18.6	38	124	162(1)
2	<i>ls[flp-6p::flp-6](tkIs1)</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0	176	176(1)
3	<i>ntr-1(ok2780)</i>	60.6 ± 0.4	256.0 ± 1.5	71	46	117(1)
4	<i>tkIs1; ntr-1</i>	34.6 ± 5.9	146.0 ± 24.9	50	97	147(1)

<i>p</i> value		<i>p</i> value	
1 vs 2	0.025	2 vs 3	< 0.001
1 vs 3	0.003	2 vs 4	0.004
1 vs 4	0.327	3 vs 4	0.016

**Supplementary table 5. Figure 4 のデータの詳細**

<b>(A)</b>		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	10729.0 ± 3557.6
2	<i>ntr-1(ok2780)</i>	12308.9 ± 3549.2

<b>(B)</b>		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	12862.4 ± 766.02
2	<i>ntr-1(ok2780)</i>	13763.0 ± 1572.8

<b>(C)</b>		
	Background	Intensity (a.u.)
1	Wild type	16801.9 ± 2614.6
2	<i>ntr-1(ok2780)</i>	14800.7 ± 805.3

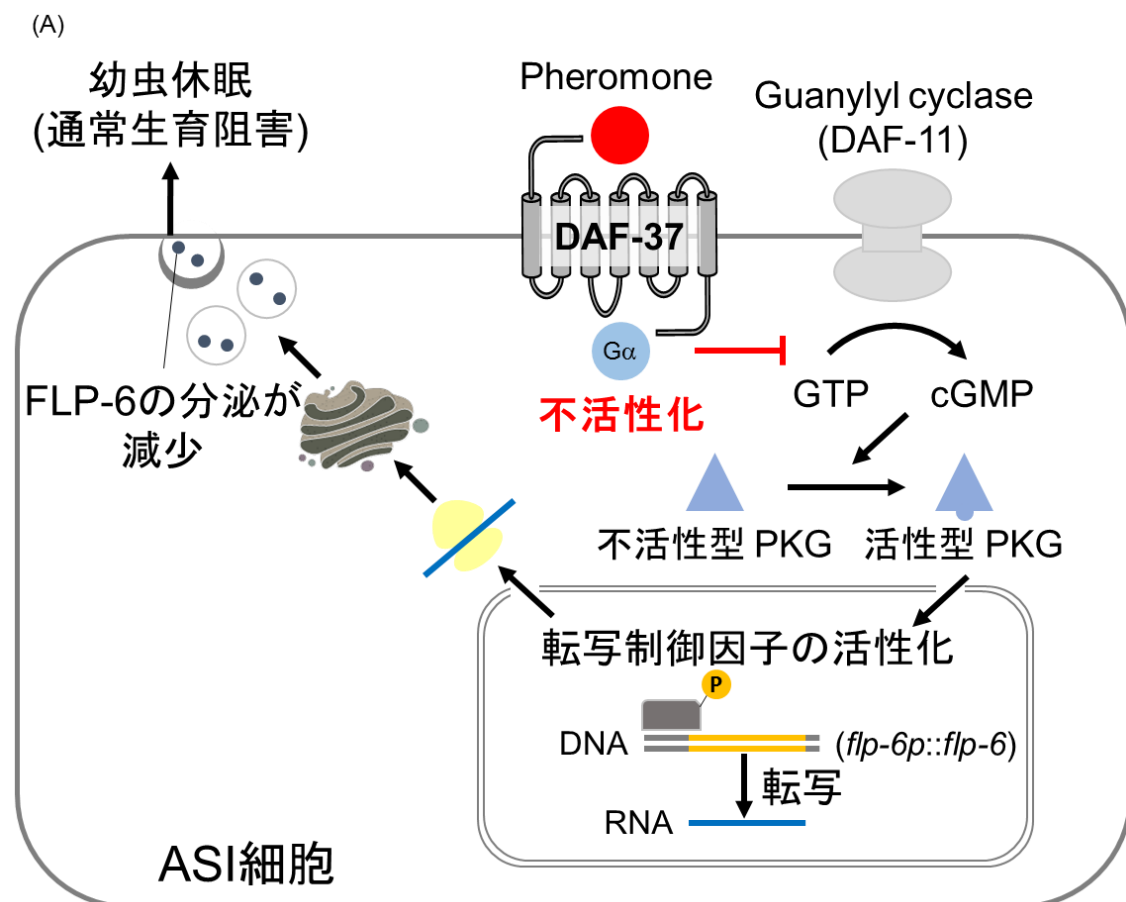
## IV. 総合討論

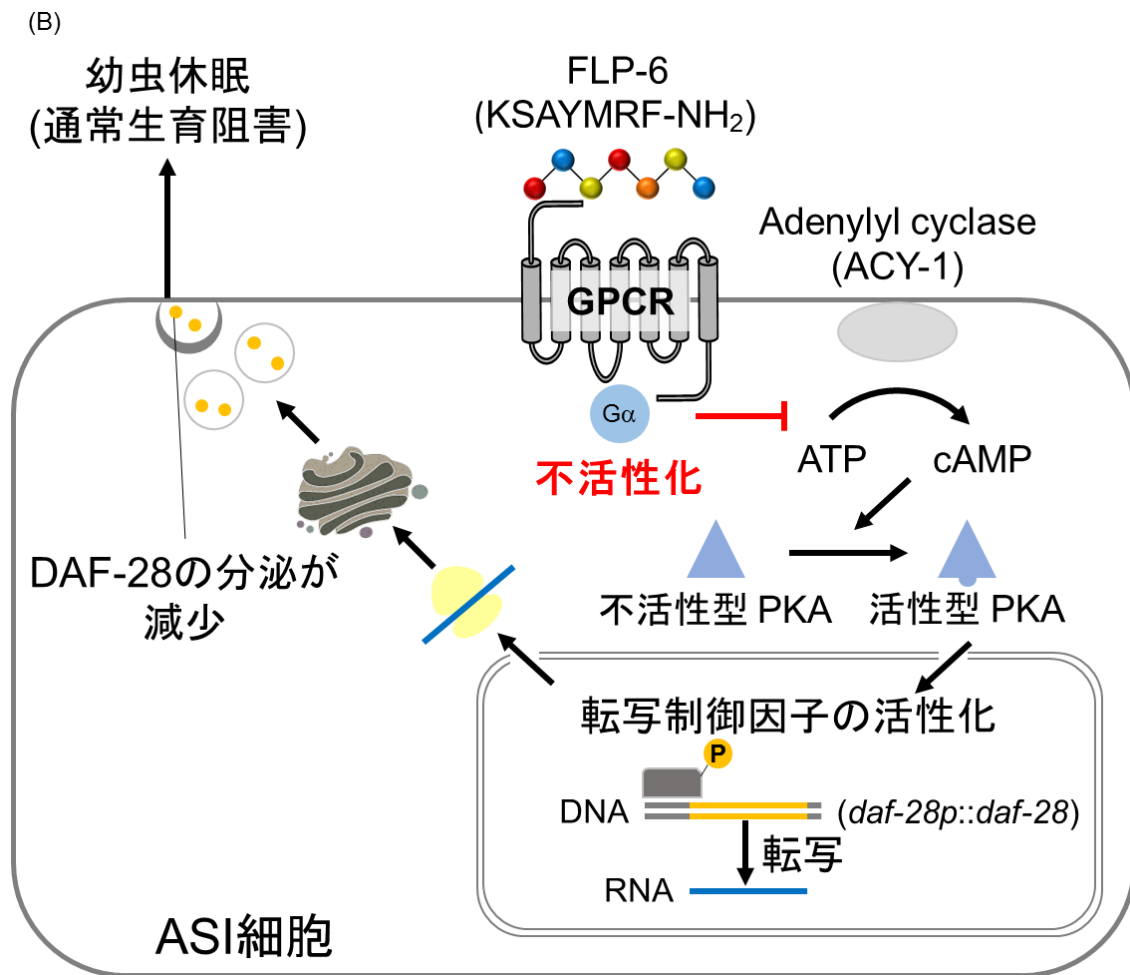
### 【ASI 細胞および腸細胞における FLP-6 の分子制御機構】

第 1 章では、フェロモン応答性の FLP-6 が、インスリン様シグナルのリガンド分子 (DAF-28 および INS-35) の分泌を介して通常生育を維持 (幼虫休眠を阻害) することを示した。加えて、DAF-28 については産生レベルで分泌を制御し、INS-35 については分泌のみを制御することを示した。FLP-6 ならびにフェロモン受容体 DAF-37 は幼虫生育に最も重要な働きを担う頭部感覚神経 ASI 細胞で発現する[1,2]。故に、生育環境中のフェロモン濃度上昇 (生育密度上昇に伴う) により ASI 細胞における FLP-6 の分泌量が減少し、インスリン様シグナルが減少することで、幼虫休眠に至る、と考えられる。ASI 細胞では、DAF-28 に加えて TGF- $\beta$  様分子である DAF-7 も産生・分泌される[3,4,5]。FLP-6 が DAF-28 のみを識別するメカニズムは非常に興味深く、FLP-6 は受容体を介して最終的に *daf-28* の転写を促進し、最終的に DAF-28 の産生・分泌を促進する可能性が高い。一方、当研究室では、DAF-7 の産生・分泌のみに関与する (DAF-28 には影響しない) FLP-11 を固定している[6]。FLP-11 は受容体を介して *daf-7* のみの転写を制御する可能性が考えられる。異なる FLP (FLP-6, FLP-11) が ASI 細胞に作用し、それぞれ異なる生育ホルモン (DAF-28, DAF-7) を転写レベルで制御することにより幼虫生育/休眠を統合的に決定付けることが立証できれば、極めてインパクトの大きい知見になり得ると考えている。

フェロモン応答性 FLP-6 自体の制御機構ならびに FLP-6 のインスリン様シグナル制御に至る制御機構を以下の様に考えている。FLP-6 産生細胞である ASI 細胞ではフェロモン受容体 (DAF-37) ならびにフェロモン応答性グアニル酸シク

ラーゼ (DAF-11) が発現しており [7,8]、FLP-6 の産生ならびに分泌は DAF-11 を介した cGMP 合成経路による転写調節によって制御される可能性が考えられる。この可能性は、ASI 細胞で産生される他の神経ペプチド NLP-3 の発現がフェロモン受容体 DAF-37 を介したシグナルによって調節されることにも裏打ちされる [9]。また、ASI 細胞ではアデニル酸シクラーゼ (ACY-1) の発現が確認されていることから [10]、cAMP を介した DAF-28 の産生および分泌制御の可能性も考えられる。以上を統合すると、FLP-6 のフェロモン応答から DAF-28 の分泌に至るまでの制御機構については、以下の制御モデルが考えられる (Figure 1A, B)。





**Figure 1.** 休眠誘導フェロモンの感覚入力による FLP-6 の産生・分泌抑制から、ASI 細胞における DAF-28 の産生・分泌抑制に至るまでの制御機構。

(A) ①ASI 細胞がフェロモンを感知、②フェロモン受容体 DAF-37 シグナルの発動、③グアニル酸シクラーゼ DAF-11 の不活性化、④cGMP 減少、⑤FLP-6 産生・分泌の抑制、の一連の流れである。(B) ⑥FLP-6 産生・分泌の抑制による FLP-6 受容体の不活性化、⑦アデニル酸シクラーゼ ACY-1 の不活性化、⑧cAMP 減少、⑨PKA 不活性化、⑩daf-28 の転写抑制、⑪DAF-28 の産生・分泌抑制、の一連の流れである。ASI 細胞内のオートクラインによる制御を想定している。

一方、INS-35 は主に腸細胞で産生・分泌されることが報告されている[11]。FLP-6 の腸細胞での発現は確認されていないことから、ASI 細胞で産生・分泌された FLP-6 が体液経由で腸に到達し、INS-35 の分泌を制御すると考えられる（産生は制御しない）。腸細胞においては、ホスホリパーゼ C (PLC-3) が ITR-1 (イノシトール 1,4,5-トリスリン酸 (IP<sub>3</sub>) 結合ドメイン) を介して細胞内カルシウムイオン濃度を調節することが報告されている[12]。従って、腸で発現する FLP-6 受容体を介して細胞内カルシウム濃度を調節し、INS-35 の分泌を最終的に制御する可能性が考えられる。従って、以上を統合すると、INS-35 の分泌制御機構については、以下の制御モデルが考えられる (Figure 2)。

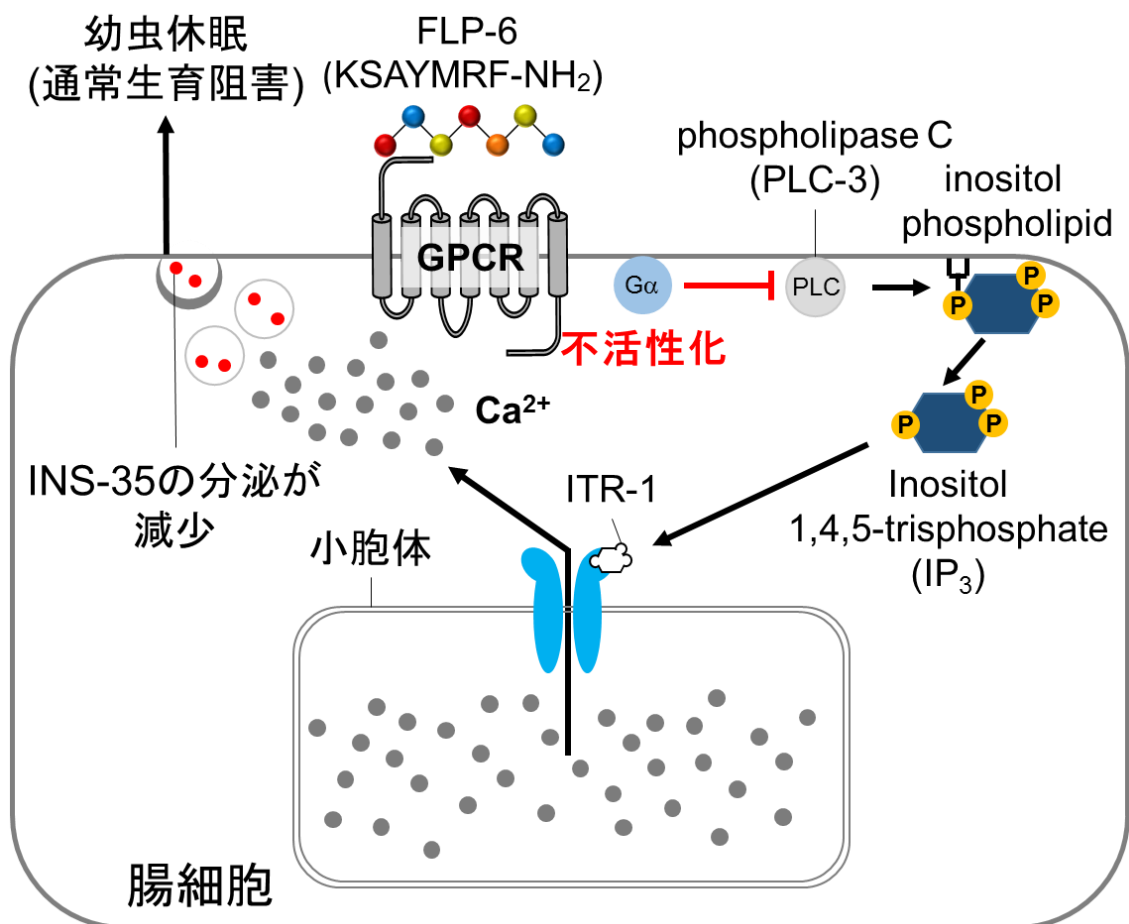


Figure 2. 腸細胞における INS-35 の分泌抑制。

①FLP-6 産生・分泌抑制による FLP-6 受容体の不活性化、②ホスホリパーゼ C (PLC-3) の不活性化、③IP<sub>3</sub> 減少、④細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の低下、⑤DAF-28 の分泌抑制、の一連の流れである（フェロモン応答性 FLP-6 自体の産生・分泌に関する制御機構は割愛）。

上記の可能性を実証するためには、まず、グアニル酸シクラーゼ DAF-11 の存在・非存在下での FLP-6 の産生・分泌変動を検証する必要がある。加えて、DAF-11 非存在下での 8-bromo-cGMP 添加による FLP-6 検証も有効である、と考えている。次いで、DAF-28 産生・分泌制御については、FLP-6→アデニル酸シクラーゼ ACY-1 の流れを検証すべく、ACY-1 破壊による休眠率上昇を立証した後、FLP-6 過剰発現（休眠率低下）と ACY-1 破壊（休眠率上昇）とエピスタシス解析を行う。ACY-1 破壊による休眠率上昇が優位であれば、FLP-6→ACY-1 の流れが立証できると考えている。さらに、ACY-1 存在・非存在下での DAF-28 の産生・分泌変動も検証すべきと考えている。また、技術的困難を伴うが、RT-qPCR を用いて ASI 細胞特異的に *daf-28* の転写量の変動 (FLP-6 存在・非存在下ならびに ACY-1 存在・非存在下) を検証することが望ましい。同様に、INS-35 分泌制御についても、FLP-6→ホスホリパーゼ C (PLC-3) の流れを検証すべく、PLC-3 破壊による休眠率上昇を立証した後、FLP-6 過剰発現（休眠率低下）と PLC-3 破壊（休眠率上昇）とエピスタシス解析を行う。PLC-3 破壊による休眠率上昇が優位であれば、FLP-6→PLC-3 の流れが立証できると考えている。さらに、PLC-3 も FLP-6 と同様に INS-35 の分泌のみを制御することを確認するため、PLC-3 存在・非存在下での INS-35 の産生・分泌変動も検証すべきと考えている。

### 【FLP-6 受容体の探索および機能解析】

第2章では NPR-15 が FLP-6 受容体であるという予測（期待）の下、NPR-15 の分子遺伝学的解析を進めていったが、NPR-15 が FLP-6 受容体でないことが証明された。NPR (NeuroPeptide Receptor)群には FLP-6 受容体は存在しない、との結論に至った。これを受けて第3章では、FRPR 群に着目して FLP-6 受容体の探索を試みたが、FRPR (FMRFamide Peptide Receptor)群にも FLP-6 受容体は存在しない、との結論に至った。そこで、NPR, FRPR 以外の GPCR に着目し、GPCR 遺伝子 (*nmur-2*, *ntr-1*, *pdf-1*, *tkr-2*) 破壊線虫のうち[13]、*flp-6* 遺伝子破壊線虫と同様に休眠率上昇を示す *ntr-1* 遺伝子破壊線虫および *tkr-2* 遺伝子破壊線虫を選別した。さらに、NTR-1 は休眠制御に関わる ASJ 細胞および腸細胞での発現が確認されているため[10,14]、NTR-1 に対象を絞って分子遺伝学的解析を行った。しかし、NTR-1 は FLP-6 受容体でないことが証明された。従って、TKR-2 が FLP-6 受容体の最終候補として期待される。

TKR-2 が FLP-6 受容体であることを示すためには、まず *flp-6* 過剰発現と *tkr-2* 遺伝子破壊のエピスタシス解析を行う必要がある。仮に、*flp-6* 過剰発現による休眠率低下が *tkr-2* 遺伝子破壊による休眠率上昇に準じれば、TKR-2 が FLP-6 受容体として機能する可能性が示されたこととなる。ついで、TKR-2 が FLP-6 と同様に DAF-28 ならびに INS-35 の産生・分泌を制御するかを検証する必要がある。通常、ペプチドと受容体 GPCR のペアリングを証明するには生化学的手法（培養細胞に GPCR を発現させペプチドの結合を検出）が用いられるが、サントリー生命財団・佐竹博士らが開発した peptide-GPCR matching プログラム[15]等を用いて TKR-2 と FLP-6 の結合予測を行えば、TKR-2 が FLP-6 受容体であることをさらに強く裏付けることができる。

FLP-6 は甚大な農業被害を引き起こす植物寄生性線虫であるネコブセンチュ

ウ類 (*Meloidogyne* spp.) にも存在する[16]。故に、ネコブセンチュウ防除を指向した農薬の開発への足がかりになる可能性も考えられる。

### 【幼虫生育を促進する孤児受容体 NPR-15】

遺憾ながら NPR-15 は FLP-6 受容体ではない、との結論に至ったが、機能解析を進めた結果、極めて重要な知見が得られた。①NPR-15 は TGF- $\beta$  様シグナルのリガンド DAF-7 の産生・分泌を制御する。これは GPCR が直接 TGF- $\beta$  を制御することを示す世界初の例である。②また、NPR-15 は G タンパク  $\alpha$  サブユニット GPA-4 と共役して *daf-7* の転写を制御し、延いては幼虫生育を制御する。これらの知見をヒトに展開する。①*C. elegans* NPR-15 はヒト GPR15 のオルソログであり、GPR15 は発ガンに關与する[17,18]。②*C. elegans* NPR-15 と共役する GPA-4 はヒト GNAI1 のオルソログであり、GNAI1 は発ガンに關与する[17,18]。③ヒト TGF- $\beta$  はガン抑制に寄与する[19,20]。以上から、本研究で得られた知見は新たな発ガン機構の発見に一石を投じるものである、と考えている。

NPR-15 は、現在のところリガンド未知の孤児受容体である。*npr-15* 破壊と同様に遺伝子破壊により休眠率上昇を示す *flp* 遺伝子は複数存在するが、いずれも NPR-15 リガンドをコードするものではなかった (制御するホルモンシグナルが異なる)。FLP 以外にも短鎖神経ペプチドとして NLP 群が存在するが、現在のところ、休眠制御への関与は報告されていない。NLP 群に NPR-15 リガンドが含まれる可能性はあるが、発想を転換したい。*flp* 遺伝子破壊で休眠率低下 (*npr-15* 遺伝子破壊による休眠率上昇とは逆) を示すものが複数存在する。当研究室で解析を進めた結果、遺伝子破壊により休眠率低下を示す複数の *flp* 遺伝子が DAF-7 (NPR-15 の標的) の分泌を促進することが判明した。これらの FLP が NPR-15

阻害に働くアンタゴニストとして機能する可能性はないだろうか？GPCR はリガンド（アゴニスト）不在の場合にも活性化状態にあり、下流の G タンパクを活性化する例が知られている。すなわち、上記の FLP が NPR-15 を阻害し休眠率上昇（*npr-15* 破壊と同様の表現型）可能性も考えられる。この可能性を検証すると共に NPR-15 を制御する FLP を探索する予定としている。①まず、遺伝子破壊により休眠率低下を示す FLP に対して NPR-15 と peptide-GPCR matching を実施する（サントリー生命財団・佐竹博士らが開発したプログラム）。②matching 率の高い FLP を選別し、過剰発現株（休眠率上昇）を作出する。③この FLP 過剰発現株と *npr-15* 破壊株（休眠率上昇）とを交雑し、休眠率上昇が相加的であれば、NPR-15 を制御する FLP の発見に繋がるのではないかと考えている。この場合、生化学的手法により FLP と NPR-15 の結合を証明する必要がある。

本研究では、現段階では休眠制御に関わるリガンド FLP とその受容体の同定には至っていない。今後の研究展開によるリガンド FLP と受容体 GPCR とのペアリングを期待する。

## 引用文献

1. Yemini E, Lin A, Nejatbakhsh A, Varol E, Sun R, Mena GE, Samuel ADT, Paninski L, Venkatachalam V, and Hobert O (2020). NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in *C. elegans*. *Cell* 184(1): 272-288.
2. Park D, O'Doherty I, Somvanshi RK, Bethke A, Schroeder FC, Kumar U and Riddle DL (2012). Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(25): 9917-9922.
3. Li W, Kennedy SG, and Ruvkun, G (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes & Development* 17: 844–858.
4. Ren P, Lim CS, Johnsen R, Albert PS, Pilgrim D and Riddle LD (1996). Control of *C. elegans* Larval Development by Neuronal Expression of a TGF- $\beta$  Homolog. *Science* 274(5291): 1389-1391.
5. Schackwitz WS, Inoue T and Thomas JH (1996). Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* 17(4): 719-728.
6. 上垣莉瑚(2022). TGF- $\beta$ 様シグナル経路を介して線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫生育を制御する短鎖神経ペプチド FLP の探索, 鳥取大学農学部生命環境農学科学士論文(未公刊).

7. Vowels JJ and Thomas JH (1994). Multiple chemosensory defects in *daf-11* and *daf-21* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 138(2): 303–316.
8. Birnby DA, Link EM, Vowels JJ, Tian H, Colacurcio PL and Thomas JH (2000). A Transmembrane Guanylyl Cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) Regulate a Common Set of Chemosensory Behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155(1): 85–104.
9. Harris G, Mills H, Wragg R, Hapiak V, Castelletto M, Korchnak A and Komuniecki WR (2010). The monoaminergic modulation of sensory-mediated aversive responses in *Caenorhabditis elegans* requires glutamatergic/peptidergic cotransmission. *Journal of Neuroscience* 30(23): 7889-7899.
10. Hammarlund M, Hobert O, Miller D, Sestan N. Discovery and analysis of the *C. elegans* Neuronal Gene Expression Network. CeNGEN.  
<https://cengen.shinyapps.io/cengenApp-legacy/> (accessed 2023\_05\_05).
11. Matsunaga Y, Honda Y, Honda S, Iwasaki T, Qadota H, Benian GM and Kawano T (2016). Diapause is associated with a change in the polarity of secretion of insulin-like peptides. *Nature Communications* 7: 10573.
12. Espelt VM, Estevez YA, Yin X, Strange K (2005). Oscillatory Ca<sup>2+</sup> Signaling in the Isolated *Caenorhabditis elegans* Intestine: Role of the Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor and Phospholipases C  $\beta$  and  $\gamma$ . *Journal of General Physiology* 126(4): 379-392.
13. Chai MC, Park H, Sternberg WP (2022). Brain-wide bidirectional neuropeptide modulation of individual neuron classes regulates a developmental decision. *Current Biology* 32: 3365-3373.

14. Garrison LJ, Macosko ZE, Bernstein S, Pokala N, Albrecht RD, Bargmann IC (2012). Oxytocin/Vasopressin-Related Peptides Have an Ancient Role in Reproductive Behavior. *Science* 338: 540-543.
15. Shiraishi A, Okuda T, Miyasaka N, and Satake H (2019). Repertoires of G protein-coupled receptors of *Ciona*-specific neuropeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(16): 7847-7856.
16. McCoy CJ, Atkinson LE, Zamanian M, McVeigh P, Day TA, Kimber MJ, Marks NJ, Maule AG, Mousley A (2014). New insights into the FLPerGic complements of parasitic nematodes: Informing deorphanisation approaches. *EuPA Open Proteomics* 3: 262-272.
17. Guo Y, Zhu Q, Chen S, Li Y, Fu D, Qia D, and Ni C (2021). Post-transcriptional suppression of G protein-coupled receptor 15 (GPR15) by microRNA-1225 inhibits proliferation, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *3 Biotech* 11(3).
18. Chaudhary PK, and Kim S (2021). An insight into GPCR and G-proteins as cancer drivers. *Cells* 10(12).
19. Zhang M, Zhang YY, Chen Y, Wang J, Wang Q, and Hezhe Lu (2021). TGF- $\beta$  Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9(786728).
20. Baba AB, Rah B, Bhat GR, Mushtaq I, Parveen S, Hassan R, Zargar MH, and Afroze D (2022). Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 13(791272).

## VI. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、下記の実験材料をご供与頂きました。

<発現ベクター>

pHK\_mrfp (国立遺伝学研究所 鹿児島 浩 博士)

*rol-6* 発現ベクター (ノースウェスタン大学 James M. Kramer 博士)

*lin-44p::gfp* 発現ベクター (東京大学 飯野 雄一 教授)

<線虫変異株>

*daf-7p::DAFD-7::mCherry* 発現線虫, *daf-28p::DAF-28::mCherry* 発現線虫 (東京女子医科大学教授 三谷 昌平 教授)

*ins-35p::INS-35::mRFP* 発現線虫 (株式会社 SRL 松永 洋平 博士)

心より御礼申し上げます。

研究の指導にご尽力下さった河野 強 教授、岩崎 崇 准授教、塩月 孝博 教授、藪田 行哲 准教授に心より感謝申し上げます。

## VI. 巻末

### 和文摘要

生理活性ペプチドは細胞間の情報伝達を担うホルモンの一種であり、この情報伝達によって生体内の様々な生理機能が調節されるため[1]、生理活性ペプチドの新たな発見や機能解明は、農薬ならびに診断薬・治療薬の開発につながる可能性が高い。生理活性ペプチドは線虫類にも FLP (FMRFamide-Like-Peptide) として広く保存されており、モデル生物・線虫 *Caenorhabditis elegans* にも 31 種の遺伝子が存在する[2]。これまでの研究により、*C. elegans* FLP は運動制御や行動制御に関与することが報告されているが[3,4,5,6]、幼虫休眠制御への関与については殆ど未解明であった。

*C. elegans* は劣悪な生育環境に置かれると、頭部感覚神経で環境因子の変化を受容・統合した後、下流のホルモンシグナル（インスリン様シグナルおよび、TGF- $\beta$ 様シグナル）を制御することで休眠幼虫へと形態を変化させる[7,8]。しかし、環境因子の変化を受容した後、どのように下流のホルモンシグナルへ情報伝達し、制御するのかは明らかにされていなかった。そこで筆者は、FLP が環境応答因子として下流のホルモンシグナルを制御するという予測の下、休眠制御における FLP および FLP 受容体の機能解析を進めた。

第 1 章では、*flp* 遺伝子破壊線虫に対するスクリーニングで選抜した *flp-6* の機能解析を行った。*flp-6* 遺伝子破壊線虫は最も顕著な休眠率上昇を示した。機能解析の結果、以下のことが明らかとなった。① *flp-6* は休眠抑制遺伝子である。

②FLP-6 は生育環境中の休眠誘導フェロモン濃度の上昇（個体密度の上昇）に対する応答性を有する。③FLP-6 はインスリン様シグナルのリガンド分子（DAF-28 および INS-35）の分泌を促進することで、幼虫生育を維持（休眠抑制）する。④FLP-6 は DAF-28 の分泌を産生レベルで制御するが、INS-35 の分泌は産生レベルで制御しない。以上を踏まえ、FLP-6 はフェロモン応答因子として、DAF-28 の産生レベルでの分泌と、INS-35 の分泌を促進することにより幼虫生育を維持する、と結論づけた。

第 2 章では、FLP-6 の受容体同定を目的として、他の生命現象では FLP 受容体として同定された神経ペプチド受容体（NeuroPeptide Receptor: NPR）を標的とした研究展開を図った[2]。 *npr* 遺伝子ファミリーの中でも、唯一 *npr-15* 遺伝子破壊株が *flp-6* 遺伝子破壊株と同様に顕著な休眠率上昇を示した。NPR-15 の機能解析の結果、以下のことが明らかとなった。①*npr-15* は休眠制御遺伝子である。②NPR-15 は TGF- $\beta$  様シグナルのリガンド分子（DAF-7）の分泌を促進することで、幼虫生育を維持（休眠抑制）する。③NPR-15 は DAF-7 の分泌を転写レベルで制御する。④NPR-15 は G タンパク  $\alpha$  サブユニット（GPA-4）と共役して DAF-7 シグナルを制御する。以上を踏まえ、NPR-15 は GPA-4 と共役し、DAF-7 の分泌を転写レベルで促進することで幼虫生育を維持（休眠抑制）する、と結論づけた。FLP-6 ならびに NPR-15 は制御する下流のホルモンシグナル経路が異なることから、遺憾ながら、NPR-15 は FLP-6 受容体ではないと結論付けた。

第 3 章では、FLP-6 の受容体同定のために、NPR 以外の神経ペプチド受容体に着目した研究展開を図った。 *C. elegans* はペプチド受容体と目される GPCR 群として、NPR 以外にも FRPR (FMRFamide Peptide Receptor) を有する[9,10]。そこで、*fpr* 遺伝子破壊線虫に対するスクリーニングを行なったが、*flp-6* 破壊線虫と同様に休眠率上昇を示す遺伝子破壊線虫を見出すことはでなかった。これは、

FRPR 群にも FLP-6 受容体は存在しないことを示す。一方、Chai らは、筆者と同様に休眠率変動に着目して GPCR 破壊線虫の探索を行い、NPR ならびに FRPR 以外の NMUR-2, NTR-1, PDFR-1, TKR-2 が幼虫休眠に関与する可能性を示した [11]。従って、筆者は、これらの遺伝子破壊線虫の休眠率を測定したところ、*ntr-1* 遺伝子破壊株および *tkr-2* 遺伝子破壊株が、*flp-6* 遺伝子破壊株と同様に顕著な休眠率上昇を示した。そこで、この 2 つの遺伝子のうち、休眠制御に重要な役割を果たす ASJ 細胞と腸細胞で *ntr-1* が発現することが報告されていることから [12,13]、NTR-1 に注目した。NTR-1 が FLP-6 受容体であるという予測（期待）の下、NTR-1 の機能解析を進めていった結果、NTR-1 は FLP-6 受容体でないことが明らかとなった。従って、TKR-2 が FLP-6 受容体の最終候補として期待される。

第 1 章で着目した FLP-6 はネコブセンチュウ類 (*Meloidogyne* spp.) にも存在することから [14]、本研究はネコブセンチュウ防除を指向した農薬の開発への足がかりになる可能性がある。第 2 章で着目した NPR-15 はヒト GPR15 のオルソログであり [15]、癌との関連が報告されている [16]。さらに、ヒト TGF- $\beta$  シグナルは癌に関与していることから [17,18]、本研究は発癌機構ならびに抗がん剤開発に関する新たな知見を提供する可能性がある。

## 英文摘要

Bioactive peptides are a type of hormone responsible for the transduction of information between cells, and because this information transduction regulates various physiological functions in the body [1], new discoveries and elucidation of functions of bioactive peptides have a high possibility that lead to the development of new agricultural chemicals, diagnostic drugs and therapeutic drugs. Bioactive peptides are widely conserved in nematodes as FLPs (FMRFamide-Like-Peptides), and 31 *flp* genes exist in the model organism *Caenorhabditis elegans* [2]. Previous studies have reported that *C. elegans* FLP is involved in motor and behavior control [3,4,5,6], but its involvement in larval diapause control has remained largely unknown.

When *C. elegans* is placed in a poor growth environment, after receiving and integrating changes in environmental factors in the head sensory neurons, it regulates downstream hormonal signals (insulin-like and TGF- $\beta$ -like signals). It transforms into a dauer larva [7,8]. However, it has not been clarified how information is transmitted to downstream hormonal signals and controlled after receiving changes in environmental factors. Based on the prediction that FLP regulates downstream hormonal signals as an environmental response factor, the author proceeded with the functional analysis of FLP and FLP receptors in diapause control.

In Chapter 1, we analyzed the function of *flp-6*, which was screened against *flp* gene-disrupted animals. The *flp-6* gene-disrupted animal showed the most remarkable increase in diapause rate. As a result of the functional analysis, the following was clarified. ① *flp-*

6 is a diapause suppressor gene. ②FLP-6 is responsive to an increase in diapause-inducing pheromone concentration (increase in population density) in the growth environment. ③FLP-6 promotes the secretion of insulin-like signal ligand molecules (DAF-28 and INS-35) to maintain larval growth (suppress diapause). ④FLP-6 regulates DAF-28 secretion at the production level but not INS-35 secretion at the production level. Based on the above, we conclude that FLP-6, as a pheromone-responsive factor, maintains larval development by promoting the DAF-28 secretion at the production level and the INS-35 secretion.

In Chapter 2, with the aim of identifying the FLP-6 receptor, we aimed to develop research targeting the neuropeptide receptor (NPR), which has been identified as the FLP receptor in other life phenomenon [2]. Among the *npr* gene families, only the *npr-15* gene disrupted animal showed a remarkable increase in diapause rate as well as the *flp-6* gene disrupted animal. Functional analysis of NPR-15 revealed the following. ①*npr-15* is a diapause suppressor gene. ②NPR-15 promotes the secretion of a ligand molecule (DAF-7) for TGF- $\beta$ -like signals, thereby maintaining larval growth (suppressing diapause). ③NPR-15 regulates DAF-7 secretion at the transcriptional level. ④NPR-15 regulates DAF-7 signaling by coupling with the G protein  $\alpha$  subunit (GPA-4). Based on the above, we conclude that NPR-15 maintains larval growth (diapause suppression) by conjugated with GPA-4 and promoting the secretion of DAF-7 at the transcriptional level. Unfortunately, we conclude that NPR-15 is not the FLP-6 receptor because FLP-6 and NPR-15 regulate different downstream hormonal signaling pathways.

In Chapter 3, in order to identify the receptor for FLP-6, we tried to develop research focusing on neuropeptide receptors other than NPR. *C. elegans* has FRPR (FMRFamide Peptide Receptor) in addition to NPR as a group of GPCRs considered to be peptide

receptors [9,10]. Therefore, we screened for the *flpr* gene-disrupted animals, but could not find any gene-disrupted animals that showed an increase in diapause rate like the *flp-6*-disrupted animals. This indicates that there are no FLP-6 receptors in the FRPR group either. On the other hand, Chai et al., similar to the author, focused on changes in the diapause rate to search for GPCR-disrupted nematodes, and indicated the possibility that NMUR-2, NTR-1, PDFR-1, and TKR-2 other than NPR and FRPR were involved in larval diapause [11]. Therefore, the author measured the diapause rate of these gene-disrupted animals and found that the *ntr-1* and *tkr-2* gene disrupted animals showed a remarkable increase in diapause rate, like the *flp-6* gene disrupted animal. Therefore, because the *ntr-1* is reported to be expressed in ASJ cells and intestinal cells that play an important role in larval diapause regulation among these two genes [12,13], we focused on NTR-1. Based on the prediction (expectation) that NTR-1 is an FLP-6 receptor, we proceeded to analyze the function of NTR-1 and found that NTR-1 is not an FLP-6 receptor. Therefore, TKR-2 is expected to be the final candidate for the FLP-6 receptor.

Since FLP-6, which we focused on Chapter 1, also exists in root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) [14], and may provide a foothold for the development of pesticides aimed at controlling root-knot nematodes. NPR-15, which we focused on in Chapter 2, is an ortholog of human GPR15 [15] and has been reported to be associated with cancer [16]. Furthermore, since human TGF- $\beta$  signaling is involved in cancer [17,18], this study may provide new insights into the mechanism of carcinogenesis and the development of anticancer drugs.

## 引用文献

1. Miyazawa T (2014). 生理活性ペプチドからの GPCR リガンド探索. *Farumashia* 50(9): 882-884.
2. Li C and Kim K (September 25, 2008). Neuropeptides. *WormBook*.  
[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_neuropeptides/neuropeptides.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_neuropeptides/neuropeptides.html/)  
(accessed 2023\_05\_05).
3. Chang Y-J, Burton T, Ha L, Huang Z, Olajubelo A, and Li C (2015). Modulation of locomotion and reproduction by FLP neuropeptides in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* 10(9).
4. Chew YL, Tanizawa Y, Cho Y, Zhao B, Yu AJ, Ardiel EL, Rabinowitch I, Bai J, Rankin CH, Lu H, Beets I, and Schafer WR (2018). An afferent neuropeptide system transmits mechanosensory signals triggering sensitization and arousal in *C. elegans*. *Neuron* 99:1233-1246.
5. Marques F, Falquet L, Vandewyer E, Beets I, and Glauser DA (2021). Signaling via the FLP-14/FRPR-19 neuropeptide pathway sustains nociceptive response to repeated noxious stimuli in *C. elegans*. *PLOS Genetics* 17(11).
6. Reilly DK, McGlame EJ, Vandewyer E, Robidoux AN, Muirhead CS, Northcott HT, Joyce W, Alkema MJ, Gegear RJ, Beets I, and Srinivasan J (2021). Distinct neuropeptide-receptor modules regulate a sex-specific behavioral response to a pheromone. *Communications Biology* 4(1018).

7. Golden JW, and Riddle DL (1982). A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 218: 578-580.
8. Hu PJ (August 08, 2007). Dauer. WormBook, [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_dauer/dauer.html/](http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html/) (accessed 2023\_05\_05).
9. Frooninckx L, Rompay VL, Temmerman L, Sinay VE, Beets I, Janssen T, Husson JS, and Schoofs L (2012). Neuropeptide GPCRs in *C. elegans*. *Frontiers in Endocrinology* 3(167).
10. Mertens I, Meeusen T, Jansen T, Nachman R, and Schoofs L (2005). Molecular characterization of two G protein-coupled receptor splice variants as FLP2 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330: 967-974.
11. Chai MC, Park H, Sternberg WP (2022). Brain-wide bidirectional neuropeptide modulation of individual neuron classes regulates a developmental decision. *Current Biology* 32: 3365-3373.
12. Hammarlund M, Hobert O, Miller D, and Sestan N. Discovery and analysis of the *C. elegans* Neuronal Gene Expression Network. CeNGEN. <https://cengen.shinyapps.io/cengenApp-legacy/> (accessed 2023\_05\_05).
13. Garrison LJ, Macosko ZE, Bernstein S, Pokala N, Albrecht RD, and Bargmann IC (2012). Oxytocin/Vasopressin-Related Peptides Have an Ancient Role in Reproductive Behavior. *Science* 338: 540-543.

14. McCoy CJ, Atkinson LE, Zamanian M, McVeigh P, Day TA, Kimber MJ, Marks NJ, Maule AG, Mousley A (2014). New insights into the FLPeric complements of parasitic nematodes: Informing deorphanisation approaches. *EuPA Open Proteomics* 3: 262-272.
15. Guo Y, Zhu Q, Chen S, Li Y, Fu D, Qia D, and Ni C (2021). Post-transcriptional suppression of G protein-coupled receptor 15 (GPR15) by microRNA-1225 inhibits proliferation, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *3 Biotech*. 11(3).
16. Chaudhary PK, and Kim S (2021). An insight into GPCR and G-proteins as cancer drivers. *Cells* 10(12).
17. Zhang M, Zhang YY, Chen Y, Wang J, Wang Q, and Hezhe Lu (2021). TGF- $\beta$  Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9(786728).
18. Baba AB, Rah B, Bhat GR, Mushtaq I, Parveen S, Hassan R, Zargar MH, and Afroze D (2022). Transforming Growth Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 13(791272).

## 本研究の基礎となる学術論文

### 第 1 章

1. Ono, M., Arai, C., Kunimatsu, Y., Hori, Y., Matsunaga, Y., Bito, T., Iwasaki, T., and Kawano, T. (2020). Regulatory Mechanism of Larval Diapause by a *C. elegans* Neuropeptide, FLP-6. PEPTIDE SCIENCE 2020. 157-160. (ISBN: 978-4-931541-214).
2. Ono, M., Matsunaga, Y., Bito, T., Iwasaki, T. and Kawano, T. (2021). Regulatory Mechanism of Larval Development by a *C. elegans* Neuropeptide FLP-6 in the Intestine. PEPTIDE SCIENCE 2021. 87-90. (ISBN: 978-4-931541-221).

### 第 2 章

3. Ono, M., Matsushita, K., Maega, S., Asano, N., Matsunaga, Y., Bito, T., Iwasaki, T. and Kawano, T. (2023). The G protein-coupled receptor neuropeptide receptor-15 modulates larval development via the transforming growth factor- $\beta$  DAF-7 protein in *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and Biophysical Research Communications 660(11): 28-34.

