

(様式第 13号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 小野 真弘

題目: 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)

生理活性ペプチドは情報伝達を担うホルモンの一種であり、生体内の様々な生理機能を調節するため、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-NH₂ を持つペプチド (RFamide) は動物界に広く存在し、RFamide の発見は C 末端に Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ を持つペプチド (FMRFamide) の発見に始まる。FMRFamide は無脊椎動物に広く存在し、様々な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。これまでの研究により、*C. elegans* FLP は運動制御や外界から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、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 (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- β 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に至る。しかし、環境因子の変化を受容した後、そのシグナルがどのようにして下流のシグナルへと伝達されるのかは明らかにされていない。そこで、FLP が環境応答因子として下流の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* 遺伝子破壊株に対する選抜の結果、*flp-6* の機能解析を行った。*flp-6* 遺伝子破壊株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。② FLP-6 は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。③ FLP-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。④ FLP-6 は DAF-28 の分泌を産生レベルで制御する。以上を踏まえ、FLP-6 はフェロモン応答因子として、DAF-28 を産生レベルで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。*npr* 遺伝子群の中でも、唯一 *npr-15* 破壊株が *flp-6* 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* は休眠抑制遺伝子である。② NPR-15 は TGF- β 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タンパク質の α 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は制御する下流のシグナルが異なることから、遺憾ながら、NPR-15はFLP-6受容体ではないと結論づけた。

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。そこで、*frpr*破壊株に対する選抜を行なったが、*flp-6*破壊株と同様に休眠率上昇を示す株を見出すことはできなかった。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破壊株の探索を行い、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。そこで筆者は、これらのうち、休眠制御において重要な役割を果たすASI細胞、ASJ細胞ならびに腸のいずれかで発現すると報告されているNMUR-2、NTR-1、PDFR-1に着目した。これらの遺伝子破壊株の休眠率を測定したところ、唯一*ntr-1*破壊株のみが、*flp-6*破壊株と同様に顕著な休眠率上昇を示した。今後は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く。

NTR-1がFLP-6受容体である可能性を検証するため、①*flp-6*過剰発現とのepistasis解析(NTR-1がFLP-6の下流で機能するのかを検証)、②NTR-1が分泌を制御する下流のシグナルのリガンド分子の特定(NTR-1がDAF-28およびINS-35の分泌を制御するのかを検証)、③NTR-1非存在下でのDAF-28ならびにINS-35産生量の変動解析、④peptide-GPCR matchingプログラム等を用いたNTR-1とFLP-6の結合予測(高い予測スコアが示されれば、NTR-1がFLP-6受容体である可能性が高い)、を行う。

第1章で着目したFLP-6はネコブセンチュウ類(*Meloidogyne* spp.)にも存在し、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、ヒト癌研究ではGPR15とTGF- β の関係性は未解明であることから、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。第3章で着目するNTR-1はヒトV1aのオルソログであり、V1aは様々な精神疾患との関与を示唆する知見が報告されているため、NTR-1の機能解析は精神疾患の予防および治療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。