

博士論文

論文題目 食餌環境に応答した神経前駆細胞の活性化機構の解析

氏 名 壹岐 和哉

目次

目次	2
1. 序論	6
2. 材料・方法	9
2.1. 線虫の飼育と用いた株	10
2.1.1. 線虫欠失変異体の遺伝子型の確認	11
2.1.2. 線虫の形質転換	11
2.1.3. 各線虫株の作出	11
2.2. プラスミドとその作出・プライマー	13
2.2.1. プラスミドの作出	15
2.3. 線虫の観察	17
2.3.1. 神経前駆細胞が活性化した個体の測定	17
2.3.2. 脂肪酸メチルの投与	17
2.4. Oil Red O 染色	19
2.5. 免疫沈降	20
2.5.1. タンパク質抽出液の調製	20
2.5.2. 結合の確認	20
3. 実験結果	22
アミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化とその時間依存性	23
線虫の Rag オルソログ RAGA-1 と RAGC-1 は物理的に相互作用する	23
RAGA-1 は p14 依存的に小胞膜状の構造物に局在する	23
Rag および p14 の欠失変異体ではアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化が著しく 減弱する	24
恒常活性化型 Rag の発現はエタノールの存在条件下で神経前駆細胞を活性化する	24
グルコースは神経前駆細胞の活性化におけるエタノールの作用を代替しない	25
アミノ酸と酢酸の投与は神経前駆細胞を活性化させる	25
エタノールを投与した線虫には多数の脂肪滴が形成されている	26
脂肪酸メチルをアミノ酸と同時に投与すると神経前駆細胞を活性化できる	26
アミノ酸と偶数炭素直鎖のアルコールを投与すると神経前駆細胞が活性化する	27
ω -3 脂肪酸と ω -6 脂肪酸の合成はアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化に関与し ない	27
グリセロール 3 リン酸からのリゾホスファチジン酸の合成阻害はアミノ酸とエタノールによる神経 前駆細胞の活性化を抑制する	28

4. 考察.....	30
栄養を感知する細胞の実体	31
エタノールとグルコースの効果の違い	32
脂肪酸に由来する神経前駆細胞活性化因子の実体	32
アルコールの構造的特徴とその神経前駆細胞活性化に対する作用	33
mTORC1 の活性とアミノ酸およびエタノールの作用	34
本研究の意義と応用	35
5. 図表.....	36
図 1 IIS 経路の概略	37
図 2 線虫の神経前駆細胞は摂食に応答して活性化する	38
図 3 アミノ酸とエタノールは協調的に神経前駆細胞を活性化する	39
図 4 アミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞活性化の時間依存性	40
図 5 アミノ酸による Rag の活性化と Ragulator	41
図 6 RagA/B と RagC/D の線虫オルソログの間で物理的な相互作用が見られる	42
図 7 本研究で用いた Rag と p14 の欠失変異	43
図 8 RagA は小胞状の構造物に局在し、p14 の欠失によってこの局在が消失する	44
図 9 Rag および p14 の欠失変異体ではアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化が著しく減弱する	45
図 10 恒常活性化型の Rag を発現させるとエタノールのみの投与で神経前駆細胞の活性化が起きる	46
図 11 グルコースはアミノ酸の存在化でも神経前駆細胞を活性化しない	47
図 12 アミノ酸と酢酸の投与は神経前駆細胞を活性化させる	48
図 13 エタノールを投与した線虫には多数の脂肪滴が形成されている	49
図 14 アセチル CoA の代謝運命と脂肪酸合成	50
図 15 パルミチン酸メチルまたはステアリン酸メチルをアミノ酸と同時に投与すると神経前駆細胞を活性化できる	51
図 16 各種の脂肪酸の合成経路	52
図 17 アミノ酸存在下での神経前駆細胞活性化に対する低級アルコールの効果	53
図 18 オレイン酸をリノール酸へ変換する $\Delta 12$ 不飽和化酵素 <i>fat-2</i> の機能欠損はアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化を抑制しない	54
図 19 アミノ酸の存在下でリノール酸メチルは神経前駆細胞を活性化することができる	55
図 20 グリセロール-3-リン酸からリゾホスファチジン酸への合成阻害はアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化を抑制する	56
図 21 本研究のまとめと想定されるモデル	57
6. 参考文献.....	58
7. 謝辞.....	64

略語一覽

4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

ADP: adenosine diphosphate

ATP: adenosine triphosphate

Cas9: CRISPR associated protein 9

Cb_unc-119: *Caenorhabditis briggsae*'s unc-119

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CoA: coenzyme A

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat

DDW: deionized distilled water

dILP: *Drosophila* insulin-like peptide

DNA: deoxyribonucleic acid

dNTPs: deoxyribonucleoside triphosphates

FOXO: forkhead box O

GAP: guanosine triphosphatase activating protein

GDP: guanosine diphosphate

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase

GEF: Guanine nucleotide exchange factor

GFP: green fluorescent protein

GPCR: G protein-coupled receptor

GTP: guanosine triphosphate

rpm: round per minute

HRV3C: human rhinovirus 3C

IGF: insulin-like growth factor

IIS: insulin and insulin-like growth factor signaling

IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

kbp: kilobase pairs

LPAAT: lysophosphatidic acid acyltransferase

MRWB: modified Ruvkun's witches brew

mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1

NGM: nematode growth medium

PAM: protospacer adjacent motif

PBS: phosphate-based saline

PBST: PBS supplemented with 0.01 % (w/v) Triton-X 100

PCR: polymerase chain reaction
 PDK1: phosphatidylinositide-dependent kinase 1
 PFA: paraformaldehyde
 PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
 PI(4, 5)P₂: phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate
 PI(3, 4, 5)P₃: phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
 PKC: protein kinase C
 PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
 RNA: ribonucleic acid
 RNAi: RNA interference
 S6K1: ribosomal protein S6 kinase 1
 SDS: sodium dodecyl sulfate
 sgRNA: small guide RNA
 TALEN: transcription activator-like effector nuclease
 TBS: Tris-based saline
 TCA: tricarboxylic acid
 UTR: untranslated region
 Zfn: zinc finger nuclease

1. 序論

様々な多細胞生物は、胚発生後も幹細胞や前駆細胞(以下、幹・前駆細胞とよぶ)といった未分化な細胞を有し、必要に応じて自己複製を行ったり、分化への運命決定をされた娘細胞を供給したりする。成体において、多くの幹・前駆細胞は通常細胞周期から逸脱した間期にとどまって未分化性を維持しており、この状態は静止期とよばれる。静止期から分化へと向かう娘細胞を生み出す過程は活性化とよばれ、適切な頻度での静止期からの活性化は組織の恒常性の維持をする上で非常に重要な役割を持つ(Cheung and Rando, 2013)。

近年、マウスやキロショウジョウバエを用いた研究において摂食に応答して活性化する幹・前駆細胞の存在が報告され(Chell and Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011; Yilmaz et al., 2012)、幹・前駆細胞が静止期の維持と活性化のどちらに向かうかを制御する要因として、栄養状態が知られるようになった。この栄養状態に応じた幹・前駆細胞の活性化制御は insulin and IGF (insulin-like growth factor) signaling (IIS)経路(図 1)(以下 IIS 経路と略す)の活性化や mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1)とよばれるタンパク質キナーゼ複合体の活性化を介している。IIS 経路はインスリンまたは IGF によって活性化されるシグナル伝達経路で、活性化するとアダプタータンパク質 IRS を介して脂質キナーゼ PI3K を活性化し、PI(4, 5)P₂ (phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate)から PI(3, 4, 5)P₃ (phosphatidylinositol (3, 4, 5)-bisphosphate)が合成される(Laplanche and Sabatini, 2012)(図 1)。PI3K とは逆に PI(3, 4, 5)P₃ から PI(3, 4, 5)P₂ を合成する酵素に PTEN があり、このシグナル全体を負に制御している(Laplanche and Sabatini, 2012)(図 1)。この PI(3, 4, 5)P₃ からさらに下流の分子群にシグナルが流れ、mTORC1 を活性化して細胞成長を促したり、転写因子 FOXO の核内移行を阻害したりすることで寿命や代謝関連遺伝子の転写を抑制することが知られる(Laplanche and Sabatini, 2012)(図 1)。

栄養状態やインスリン/IGF に対する応答性は不明なものの、マウスの造血幹細胞で IIS 経路を負に制御している脂質ホスファターゼをコードする遺伝子 *Pten* を欠失させると、分化が亢進して幹細胞の維持ができなくなり最終的に幹細胞プールが枯渇することが知られるなど(Yilmaz et al., 2006; Zhang et al., 2006)、IIS 経路の構成因子が幹細胞の静止期維持に重要であることが知られている。さらに、この造血幹細胞で *Pten* を欠失したマウスが急性骨髄性白血病や急性リンパ性白血病を発症したり(Yilmaz et al., 2006; Zhang et al., 2006)、マウスにおいて転写因子 Foxo が慢性骨髄性白血病における leukemia initiating cells を維持している(Naka et al., 2010)など、IIS 経路を構成する分子は腫瘍などの疾患との関連が深い(Laplanche and Sabatini, 2012)。以上のことから、栄養環境に応答した幹・前駆細胞の活性化機構の理解は、腫瘍などの病態の理解につながりうると考えられる。

しかしながらマウスなどのモデル動物を完全な絶食条件や特定の栄養分子のみが存在する条件で長期間飼育することはできないことに加え、幹・前駆細胞の生体内での環境条件下における動態を観察することは一般に困難であるために、食餌中のどのような分子が幹・前駆細胞にどのように作用するか、理解が進んでいない。そこで完全な絶食条件下でも 1 週間以上生存でき、体が透明であるため生きたまま各種の細胞が観察可能な線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下単に線虫と

記す)をモデル動物として利用することにした。また本研究で用いた実験系では、線虫を無機塩のみを含む緩衝液中で無菌的に培養するので外界由来の栄養分子を完全に制御することができ、各栄養分子の効果を詳細に調べることができるという利点も有する。

線虫の神経前駆細胞である P 細胞は、その活性化様式とそれに伴う個体の発生進行の様子が詳細に調べられている(Graves et al., 2007)。この神経前駆細胞は孵化直後の幼虫の腹側両体側面に全部で 6 対存在する。幼虫が摂食して発生を進めると、神経前駆細胞群は腹側正中線へと移動し、併存する様子が観察されるようになる。その後、神経前駆細胞は腹側正中線上で数回分裂をおこない、腹皮神経索を構成する運動神経細胞や表皮、産卵口へと分化する。

この神経前駆細胞の活性化は完全に摂食に依存することが知られ、孵化直後に絶食条件におかれると神経前駆細胞は静止期のまま維持されるが、摂食をさせることで活性化させることができる(Johnson et al., 1984; Kasuga et al., 2013)。私の所属する研究室では、このような明瞭な栄養応答性に着目し、HIS 経路やマイクロ RNA miR-235 が栄養状態に応じた神経前駆細胞の静止期あるいは活性化の制御に関与することをこれまでに見出してきた(Kasuga et al., 2013; 当研究室未発表データ)。そこで本研究では、この系を利用して、神経前駆細胞の活性化における栄養分子の作用を探ることにした。

本研究に先立って、アミノ酸とエタノールの投与が、神経前駆細胞の活性化に十分であること、さらにアミノ酸とエタノールどちらか一方のみの投与では神経前駆細胞の活性化は見られないことを当研究室で見出していた。そこで、これら 2 種の物質が協調的に神経前駆細胞を活性化するメカニズムを調べることで、幹・前駆細胞に対する栄養分子の作用とそれらの間の相互作用の理解につながると考え、アミノ酸とエタノールそれぞれがどのように神経前駆細胞に作用しているか調べた。

2. 材料・方法

2.1. 線虫の飼育と用いた株

線虫は野生型として Bristol N2 を用いた。その飼育は定法(Brenner, 1974)に従って行い、4x peptone NGM (nematode growth medium) (NaCl: 3.0 g/L, Bacto Peptone: 10.0 g/L, Agar Powder: 20.0 g/L, KPO₄: 25.0 mM, MgSO₄: 1 mM, CaCl₂: 1.0 mM, cholesterol: 5.0 mg/L EtOH) 上に食餌として大腸菌 OP50 を塗布し、20 °C で飼育した。実験に用いた株は以下の通りである。

遺伝子型の表記は線虫における統一表記法に従って、

- 遺伝子は<アルファベット小文字 3 または 4 文字>-<数字>、
- 対立遺伝子は<遺伝子名>(<対立遺伝子名>) <染色体番号>
- 染色体外アレイ(外来の DNA が直列に複数コピー結合してできたもの)は<アルファベット 2 小文字文字>Ex<数字>
- プロモーター名は $P_{[遺伝子名]}$

と記した。対立遺伝子や染色体外アレイの内容を詳細に記すのには”[]”を用いている。

株名	遺伝子型
N2	<i>C. elegans</i> wild type, DR subclone of CB original
YB1295	<i>tdEx866[P_{dpy-7}::raga-1 Q63L::GFP + P_{dpy-7}::ragc-1 T40N::mCherry + rol-6(su1006)]</i>
YB1429	<i>raga-1(ok386)</i> II
YB1430	<i>ragc-1(tm1974)</i> IV
YB1732	Y97E10AR.7(<i>tm2367</i>) V
YB2892	<i>raga-1(td94[raga-1::3× FLAG Tag::HRV3C cleavage site::GFP::Cb_unc-119(+)]</i>) II; <i>unc-119(ed3)</i> III?
YB2970	<i>raga-1(td94[raga-1::3× FLAG Tag::HRV3C cleavage site::GFP::Cb_unc-119(+)]</i>) II; <i>unc-119(ed3)</i> III?; Y97E10AR.7(<i>tm2367</i>) V
BX24	<i>fat-1(wa9)</i> IV
BX26	<i>fat-2(wa17)</i> IV
	<i>acl-1(tm3289)</i> X
	<i>acl-2(tm3246)</i> V
	<i>acl-4(xh10), acl-5(xh19)</i> X
	<i>acl-6(tm3396)</i> V
HT1593	<i>unc-119(ed3)</i> III

※GFP: green fluorescent protein

2.1.1. 線虫欠失変異体の遺伝子型の確認

線虫欠失変異体の遺伝子型は Nested PCR (polymerase chain reaction)を用いて確認した。Out プライマーペア (欠失領域をまたいでゲノム DNA (deoxyribonucleic acid)を増幅するプライマーの組) で増幅したゲノム断片から、In プライマーペア (Out プライマーペアの内側で欠失領域をまたいでゲノム DNA を増幅するプライマーの組)、Delta プライマーペア (欠失領域を増幅するプライマーの組) のそれぞれを用いてゲノムの一部を増幅したときの断片の長さによって確認した。具体的には以下の通りである。クローン化した後に増殖させた線虫を 100 μ L の Worm lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 0.45 % (w/v) Nonidet P-40, 0.45 % Tween 20, 0.01 % gelatin, 60 mg/mL proteinase K) 中に懸濁し、60 分間 60 °C でインキュベートして線虫を溶解させた後に、proteinase K を 95 °C で 15 分間加熱して失活させ、鋳型とした。この鋳型を、各々の遺伝子型に応じた Out プライマーペアを用いて、精製リコンビナント Taq ポリメラーゼによる PCR (10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 0.1 % (w/v) Triton-X 100, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 μ M of each primer, 1 M betaine, 0.32 μ L recombinant Taq / 10 μ L reaction mix; 94 °C 1 min→94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 1 min/kbp \times 35 cycles→72 °C 15 min)により増幅した。この増幅産物を鋳型として In プライマーペアと Delta プライマーペアにより再び PCR を行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動により確認した。In プライマーペアを用いた PCR では、野生型は大きな断片のみが増幅、欠失対立遺伝子とのヘテロ接合体では大きな断片と小さな断片が増幅 (大きな断片は増幅効率が著しく悪い場合もあった)、欠失対立遺伝子のホモ接合体では小さな断片のみが増幅し、Delta プライマーペアを用いた PCR では野生型およびヘテロ接合体で増幅が起き、ホモ接合体では増幅が見られない。

2.1.2. 線虫の形質転換

線虫の形質転換はマイクロインジェクション法(Mello et al., 1991)を用いて行った。DNA 混合液を Ultrafree-MC (Merck Millipore)を用いて不純物を除き、卵巣に注入した。生まれた F1 世代から、形質転換体を選別し、F2 世代においても形質転換体が現れるものを株として利用した。

2.1.3. 各線虫株の作出

2.1.3.1. YB1295

pMF470.5 (10 ng/ μ L) + pMF473.2 (10 ng/ μ L) + pRF4 (30 ng/ μ L) + pBlueScript SK + (100 ng/ μ L)という組み合わせで各プラスミドを混合したものをを用いて、野生型株 N2 を形質転換し、作出した。当研究室福山作出。

2.1.3.2. YB1429, YB1430, YB1732

これらの株は、それぞれ VC222 (*raga-1(ok386)* II)、FX01974 (*ragc-1(tm1974)* IV)、Y97E10AR.7(*tm2367*) V という株をそれぞれ 4、2、2 回ずつ野生型株 N2 へ戻し交配を行った

ものである。遺伝型の確認に用いたプライマーの組み合わせは以下の通りである。

対立遺伝子	プライマーペア	プライマー名
<i>ok384</i>	Out	MF847 & MF848
	In	MF849 & MF850
	Delta	MF851 & MF852
<i>tm1974</i>	Out	YS24-5p-ragc-out & YS24-3p-ragc-out
	In	YS24-5p-ragc-in & YS24-3p-ragc-in
	Delta	YS24-5p-ragc-del2 & YS24-3p-ragc-del2
<i>tm2367</i>	Out	KI76 & KI81
	In	KI139 & KI140
	Delta	KI78 & KI79

2.1.3.3. YB2892

CRISPR/Cas9 を用いて、*raga-1* の 3' 末端に *3× Flag Tag::HRV3C cleavage site::GFP::Cb_unc-119(+)* をノックインして作出した。作出方法は先行研究の方法(Dickinson et al., 2013)に従った。pKI188.6 (10 ng/μL) + pKI170.1 (50 ng/μL) + *P_{eff-3}::Cas9* (50 ng/μL) + pMA122 (10 ng/μL) + pGH8 (10 ng/μL) + pCFJ104 (5 ng/μL) + pCFJ90 (2.5 ng/μL) の組成で調製したプラスミド混合液を *unc-119* 変異体である HT1593 株約 90 匹の生殖腺に注入した。NGM(直径 35 mm φ、先述の 4x peptone NGM の Bacto peptone を 1/4 量にしたもの)上で約 8 日間 25 °C でインキュベートし、子の世代が成長して食餌である大腸菌の層が無くなったところで、34 °C で 4 時間熱ショックを与え、再び 25 °C で 24 時間インキュベートした。注入したプラスミドの一つ pMA122 は、体細胞で毒性を持つ PEEL-1 とよばれるタンパク質を熱ショックプロモーターの下につないだもので、pMA122 を染色体外アレイとして保持している個体は死亡する。すなわちこの操作で生存する個体は pMA122 を取り込まなかった個体である。生存した個体のうち、運動が正常なもの、すなわち *unc-119* の表現型が救助された個体では、ノックインの相同組換えの鋳型として用いた pKI188.6 を取り込んだ個体である。この個体は pKI188.6 を単に染色体に保持している可能性があるが、その場合 co-injection marker の pGH8, pCFJ104, pCFJ90 に由来する mCherry が確認できると期待されるので、正常に運動し、mCherry を発現していない個体を探索したところ、そのような個体を 1 個体単離でき、これを YB2892 とした。

2.1.3.4. YB2970

YB1732 と YB2892 とを掛けあわせて作出した。当研究室福山作出。

2.1.3.5. YB3015

pKI191.4 (5 ng/μL) + pRF4 (60 ng/μL) + pBlueScript II SK - (85 ng/μL)という組み合わせで各プラスミドを混合したものを用いて、野生型株 N2 を形質転換した。

2.2. プラスミドとその作出・プライマー

実験に用いたプラスミドおよびプライマーは以下の通りである。

プラスミド名	挿入配列
pKI170.1	5'- GGTAAC TAAACGAAAATAAC -3' (the sequence of small guide RNA targeting the <i>raga-1</i> 3' UTR)
pKI173.1	about 1.5 kbp upstream of <i>raga-1</i> start codon:: <i>raga-1</i> (without stop codon)::[<i>Spe</i> I digestion site]::[stop codon]::3' UTR of <i>raga-1</i> with PAM mutation:: <i>Apa</i> I digestion site]::about 1.5 kbp downstream of <i>raga-1</i> stop codon
pKI174.1	3× FLAG Tag::HRV3C cleavage site:: <i>GFP</i>
pKI178.1	about 1.5 kbp upstream of <i>raga-1</i> start codon:: <i>raga-1</i> (without STOP codon)::3× FLAG Tag::HRV3C cleavage site:: <i>GFP</i> ::[stop codon]:: 3' UTR of <i>raga-1</i> with PAM mutation:: <i>Apa</i> I digestion site]::about 1.5 kbp downstream of <i>raga-1</i> stop codon
pKI185.2	[<i>Spe</i> I digestion site]::loxP:: <i>Cb_unc-119(+)</i> ::loxP:: [<i>Spe</i> I digestion site]
pKI188.6	about 1.5 kbp upstream of <i>raga-1</i> start codon:: <i>raga-1</i> (without stop codon)::3× FLAG Tag::HRV3C cleavage site:: <i>GFP</i> ::[stop codon]:: 3' UTR of <i>raga-1</i> with PAM mutation:: <i>Cb_unc-119(+)</i> ::about 1.5 kbp downstream of <i>raga-1</i> stop codon
pMF449	<i>P_{dpy-7}</i> :: <i>gfp</i> :: <i>unc-54</i> 3' UTR (当研究室で作出した発現ベクター)
pMF450	<i>P_{dpy-7}</i> :: <i>mCherry</i> :: <i>unc-54</i> 3' UTR (当研究室で作出した発現ベクター)
pMF470.5	<i>P_{dpy-7}</i> :: <i>raga-1</i> Q63L:: <i>GFP</i> :: <i>unc-54</i> 3' UTR
pMF473.2	<i>P_{dpy-7}</i> :: <i>ragc-1</i> T40N:: <i>mCherry</i> :: <i>unc-54</i> 3' UTR
pRF4	<i>rol-6(su1006)</i> (Mello et al., 1991)
<i>P_{eft-3}</i> :: <i>Cas9-SV40_NLS</i> :: <i>tbb-2</i> 3' UTR	<i>P_{eft-3}</i> :: <i>Cas9-SV40_NLS</i> :: <i>tbb-2</i> 3' UTR (Friedland et al., 2013) (Addgene #46168)
pMA122	<i>P_{hsp16-41}</i> :: <i>peel-1</i> (Dickinson et al., 2013) (Addgene #34873)
pGH8	<i>P_{rab-8}</i> :: <i>mCherry</i> (Dickinson et al., 2013) (Addgene #19359)

pCFJ104	<i>P_{myo-3}::mCherry</i> (Dickinson et al., 2013) (Addgene #19328)
pCFJ90	<i>P_{myo-2}::mCherry</i> (Dickinson et al., 2013) (Addgene #19327)
<i>P_{U6}::unc-119_sgRNA</i>	<i>P_{U6}::unc-119_sgRNA</i> (Friedland et al., 2013) (Addgene #46169)
pBlueScript SK II -	
pBlueScript SK +	
pGEM T easy	

※HRV3C: human rhinovirus 3C, kbp: kilobase pairs, PAM: protospacer adjacent motif, UTR: untranslated region

プライマー名	配列
KI76	5'- GAATGGCGTGAAATGATCTA -3'
KI78	5'- GGCCAGTGTATGAAGCTTAG -3'
KI79	5'- TCATAATCAGTCTATTTCAACTGG -3'
KI81	5'- GGTTGATGTTCTCGGACAG -3'
KI139	5'- AGAGAAGAGGTAGATTTTTTAAACA -3'
KI140	5'- GGATGAATGAGACCCGATAG -3'
KI173	5'- GGTAATAACGAAAATAACGTTTGTAGAGCTAGAA- -ATAGCAAGTTA -3'
KI174	5'- AAACATTTAGATTTGCAATTCAATTATATAGG -3'
KI184	5'- CCGCTCTAGAACTAGTGACTACAAAGACCATGACG -3'
KI185	5'- TTCTCCTTTACTCATCTGCAGGGGTCCCTGA -3'
KI186	5'- ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC -3'
KI187	5'- GCTTGATATCGAATTCAGTCTTTGTATAGTTCAT- -CCATGCCATG -3'
MF847	5'- GATCCGGCAAGACTTCGATGCG -3'
MF848	5'- AGGTTGCATTCCGAGCAGAGACCGT -3'
MF849	5'- ACATCGCCAGGATTGTTTCGCGTC -3'
MF850	5'- AAGTGCTCGGCTTCTCTGACTGCA -3'
MF851	5'- CCGCATTCTATCGACTCGTTCACCCA -3'
KI177	5'- TGGCGGCCGCTCTAGATCTTTCCCATCTCCATTC -3'
KI178	5'-AATGCGGGGCAAGAACTCGGTGAAATATTCAAATTCG- -TCTAACTAGTGCTTTTCGTCTCGATCGCC -3'
KI179	5'- TTCTTGCCCCGCATTACAGTTA -3'
KI180	5'- GGGCCCAATATAGCACAAATTCATATACAAATACAG -3'
KI181	5'- TGCTATATTGGGCCCTTCATTTGGAATTTAACTGATATTTTCT -3'

KI182	5'- TATAGGGCGAATTGGGTACCAGCATTGCGAGGATCAG -3'
KI209	5'- GGGCCCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTA- -TCTTTGAGCCAATTTATCCAA -3'
KI210	5'- GGGCCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATAC- -GAAGTTATCCTAGTTCTAGACATTCTCTAATG -3'
MF790	5'- CTGGAATCATTCATGGAGAAGTTCC -3'
MF791	5'- ACCACCACAATCCCACAAGTGAAGA -3'
MF810	5'- GGGACACAAGAGAAGCGGAAAAAATTC -3'
MF811	5'- ATTAGAATCACCGTGGGACGGGAATCC -3'
MF828	5'- GCCCCGGGATGGAGTCGGACCCTGACGAGGA -3'
MF830	5'- TCCCCGGGCTTTTCGTCTCGATCGCCTCGA -3'
MF831	5'- TCCCCGGGGAAGTTAACGCCCTGTTTTTAA -3'
MF852	5'- GATGATGACTATCGCAAAGAATCGG -3'
YS24-5p- <i>raga</i> -out	5'- GACCCTGACGAGGATTTTGA -3'
YS24-3p- <i>raga</i> -out	5'- CTTGCTCGATTCTGCTTTG -3'
YS24-5p- <i>raga</i> -in	5'- GATTACCGCTACGGAATCGAC -3'
YS24-3p- <i>raga</i> -in	5'- CCTGCTTTGAAGACACCGAAG -3'
YS24-5p- <i>raga</i> -del2	5'- CACGGTGATTCTAATGGGACA -3'
YS24-3p- <i>raga</i> -del2	5'- TGAAGTTCTGCCTGTGCATC -3'

※配列が長いものは“-“を用いて折り返して表記した。

2.2.1. プラスミドの作出

2.2.1.1. pKI170.1

P_{U6}::unc-119_sgRNA を鋳型にして、KI173 プライマー(*raga-1* を標的とした sgRNA の配列に *P_{U6}::unc-119_sgRNA* に結合する配列をつないだもの)と KI174 プライマー(*P_{U6}::unc-119_sgRNA* に結合する)を用いて PCR により増幅した断片をリン酸化した後に結合し、*P_{U6}::unc-119_sgRNA* の *unc-119* 用の sgRNA (small guide RNA)部分の配列を *raga-1* 用のもの (5'- GGTAAGTAAACGAAAATAAC -3') にして作出した。その後に塩基配列が正しく *raga-1* 用のものになったことを確認した。

2.2.1.2. pKI173.1

野生型線虫株 N2 のゲノム DNA を鋳型にしてプライマーペア KI177 & KI178 を用いて PCR で増幅したもの、プライマーペア KI179 & KI180 を用いて PCR で増幅したもの、プライマーペア KI181 & KI182 を用いて PCR で増幅したもの、*Xpa* I と *Kpn* I で制限酵素消化したもの、の合計 4 つを In-Fusion HD Cloning Kit (TaKaRa) を用いて結合させ、塩基配列が正しいことを確認した。なお、KI179 は *raga-1* の 3' UTR に結合するプライマーであるが、Cas9 の認識配

列である PAM (protospacer adjacent motif) の TGG の配列が TGT になるよう 1 塩基分一致しないように設計しており、CRISPR/Cas9 によって相同組換えを起こした後に再度 Cas9 で切断を受けるのを防いでいる。

2.2.1.3. pKI174.1

3x Flag Tag::HRV3C 配列を鋳型にしてプライマーペア KI184 & KI185 を用いて PCR で増幅したもの、GFP 配列を鋳型にしてプライマーペア KI186 & KI187 を用いて PCR で増幅したもの、*Spe* I と *Eco*R I で制限酵素消化したもの、の合計 3 つを In-Fusion HD Cloning Kit を用いて結合させ、塩基配列が正しいことを確認した。

2.2.1.4. pKI178.1

pKI173.1 を *Spe* I で制限酵素消化したもの、同じく *Spe* I で制限酵素消化して単離した pKI174.1 の挿入配列を結合させた。

2.2.1.5. pKI185.2

Cb_unc-119(+) の配列 (プロモーターから 3' UTR までのゲノム配列) をプライマーペア KI209 & KI 210 を用いて PCR で増幅 (両端に loxP 配列が付加される) したものを pGEM T easy に挿入し、塩基配列が正しいことを確認した。

2.2.1.6. pKI188.6

pKI178.1 を *Apa* I で制限酵素消化したもの、同じく *Apa* I で制限酵素消化して単離した pKI185.2 の挿入配列を結合させた。

2.2.1.7. pMF470.5

raga-1 の配列を含む cDNA から、プライマーペア MF826 & 830 を用いて両端に *Xma* I 認識配列を付加して PCR で増幅したものを pGEM T easy に挿入していた。これを鋳型にプライマーペア MF790 & MF791 を用いて部位特異的変異導入 (Imai et al., 1991) を行い、*raga-1* Q63L の配列を得た。これを *Xma* I で制限酵素消化して、pMF449 を *Xma* I で制限酵素消化したものに結合させて作出した。当研究室福山作出。

2.2.1.8. pMF473.2

ragc-1 の配列を含む cDNA から、プライマーペア MF828 & 831 を用いて両端に *Xma* I 認識配列を付加して PCR で増幅したものを pGEM T easy に挿入していた。これを鋳型にプライマーペア MF810 & MF811 を用いて部位特異的変異導入 (Imai et al., 1991) を行い、*ragc-1* T40N の配列を得た。これを *Xma* I で制限酵素消化して、pMF450 を *Xma* I で制限酵素消化したものに結合させて作出した。当研究室福山作出。

2.3. 線虫の観察

すべての線虫の観察は 4 % (w/v)寒天パッド上で行った。微分干渉顕微鏡像は Zeiss Axio Imager M1 microscope system にて撮影した。

2.3.1. 神経前駆細胞が活性化した個体の測定

アルカリブリーチ法(Fukuyama et al., 2006; Kasuga et al., 2013 で用いられている方法にならった)によって成虫から卵を無菌的に取り出し、各種の栄養と M9 緩衝液 (KH_2PO_4 3.00 g/L, Na_2HPO_4 15.00 g/L, NaCl 5.00 g/L を 121 °C、15 分でオートクレーブをして無菌化した後に 1M MgCl_2 を 1000 分の 1 量加えた)を用いて、15 mL チューブ 1 本あたり 10 mL、卵の数は 1×10^5 程度になるようにして培養した。ただし、不妊と考えられる表現型により卵を多く得られなかった *fat-2* 機能欠損変異体については、 1×10^4 程度に野生型と数を揃えて実験を行った。培養は 20 °C で、1 分間あたり約 30 回転の速度で回転させながら培養した。神経前駆細胞が活性化した個体の割合の測定は断りのない限り、培養約 72 時間の段階で遠心分離によって孵化した個体を集め、寒天パッド上に乗せて微分干渉顕微鏡で腹側正中線上に神経前駆細胞の核が観察されるかどうか判断を行った。図 4 で行った実験では、得た卵を 2 本の 15 mL チューブに分配し、それぞれから 12 時間おきに 0.5 mL を取り出して観察を行うことで、液量の変化が少なくなるようにした。各実験群で観察した個体数は 50 匹である。なお、神経前駆細胞は前方のものから後方のものの順で順次腹側正中線上へ移動するが、1 細胞でも腹側正中線上に核が観察されれば、神経前駆細胞が活性化したと判断した。

アルコールと脂肪酸メチルを除く各栄養は、M9 緩衝液に溶解したものを -20 °C で保存し、必要に応じて融解して利用した。アミノ酸は、完全液体培地(Szewczyk et al., 2003)の必須アミノ酸の 2 倍濃度で与えた。完全液体培地の 10 倍濃度でアミノ酸を含む溶液を M9 緩衝液ベースで調製し(L-Arg·HCl: 11.79 mg/L, L-His: 2.83 mg/L, L-Lys·HCl: 12.83 mg/L, L-Trp: 1.84 mg/L, L-Met: 3.89 mg/L, L-Thr: 7.17 mg/L, L-Leu: 14.39 mg/L, L-Iso: 8.61 mg/L, L-Val: 10.2 mg/L, L-Phe: 6.23 mg/L)、121 °C、15 分のオートクレーブによって完全に溶解させ、-20 °C で保存した。約 1 週間以内に使用する分については、融解させた後に 4 °C で保存した。使用する際には、15 mL チューブ 1 本に必要量の M9 緩衝液を入れ、2 mL のアミノ酸混合液を加えた後に、必要に応じてその他の分子(脂肪酸やグルコースなど)を入れ、最後に無菌的に取り出した卵の懸濁液を加え、液量の合計が 10 mL になるようにした。

2.3.2. 脂肪酸メチルの投与

脂肪酸メチルは疎水性が高いため、界面活性剤 Tween 80 を用いて乳化させ、緩衝液中に懸濁させた。10 mL の液が入った 15 mL チューブの中に 2.5% (w/v) Tween 80 (M9 緩衝液で希釈したもの) 50 μL と脂肪酸メチル(100 μmol 分または 30 μmol 分、10 μmol 分、3 μmol 分)を予め混合したものを加えた。ただし懸濁の程度を完全に揃えるために、脂肪酸メチルと 2.5% (w/v)

Tween 80 50 μL を混合して、水浴型超音波破碎器にて全体が白くなり均一になるまで数分間ソニケーションしたものを段階希釈し、10 mL の緩衝液中に懸濁させ最終濃度 10 mM 用, 3 mM 用, 1 mM 用, 0.3 mM 用の希釈系列を作った。具体的には以下の表のように調製した。

パルミチン酸メチル 31.74 $\mu\text{L} \rightleftharpoons 100 \mu\text{mol}$

最終濃度:	10 mM 用	3 mM 用	1 mM 用	0.3 mM 用
パルミチン酸メチル溶液(μL)	* 95.21	80	50	50
2.5 % (w/v) Tween 80 (μL)	150	114.19	84.00	109.70
合計 (μL)	245.21	194.19	134.00	159.70
投与する量 (μL)	81.74	59.52	53.17	50.95
(vehicle + パルミチン酸メチル)	(50 + 31.74)	(50 + 9.52)	(50 + 3.17)	(50 + 0.95)

*希釈していないパルミチン酸メチル。同じ行の他の数値は、Tween 80 によって希釈された溶液。

ステアリン酸メチル 35.54 $\mu\text{L} \rightleftharpoons 100 \mu\text{mol}$

最終濃度:	10 mM 用	3 mM 用	1 mM 用	0.3 mM 用
ステアリン酸メチル溶液(μL)	* 106.61	80	50	50
2.5 % (w/v) Tween 80 (μL)	150	109.11	82.46	108.92
合計 (μL)	256.61	189.11	132.46	158.92
投与する量 (μL)	85.54	60.66	53.55	51.07
(vehicle + ステアリン酸メチル)	(50 + 35.54)	(50 + 10.66)	(50 + 3.55)	(50 + 1.07)

*希釈していないステアリン酸メチル。同じ行の他の数値は、Tween 80 によって希釈された溶液。

オレイン酸メチル 33.81 μL \rightleftharpoons 100 μmol

最終濃度:	10 mM 用	3 mM 用	1 mM 用	0.3 mM 用
オレイン酸メチル溶液(μL)	* 101.43	80	50	50
2.5 % (w/v) Tween 80 (μL)	150	111.37	83.14	109.28
合計 (μL)	251.43	191.37	133.14	159.28
投与する量 (μL)	83.81	60.14	53.38	51.01
(vehicle + オレイン酸メチル)	(50 + 33.81)	(50 + 10.14)	(50 + 3.38)	(50 + 1.01)

*希釈していないオレイン酸メチル。同じ行の他の数値は、Tween 80 によって希釈された溶液。

リノール酸メチル 33.46 μL \rightleftharpoons 100 μmol

最終濃度:	10 mM 用	3 mM 用	1 mM 用	0.3 mM 用
リノール酸メチル溶液(μL)	* 100.39	80	50	50
2.5 % (w/v) Tween 80 (μL)	150	111.83	83.28	109.35
合計 (μL)	250.39	191.83	133.28	159.35
投与する量 (μL)	83.46	60.04	53.35	51.00
(vehicle + リノール酸メチル)	(50 + 33.46)	(50 + 10.04)	(50 + 3.35)	(50 + 1.00)

*希釈していないリノール酸メチル。同じ行の他の数値は、Tween 80 によって希釈された溶液。

なお、パルミチン酸メチルとステアリン酸メチルは室温で個体として存在するので、熱湯で湯煎にかけることにより融解させ、Tween 80 も同じく湯煎で温めた上で混合し、すぐさま超音波破碎器で懸濁した。vehicle コントロールには 2.5 % (w/v) Tween 80 50 μL のみを加えたものを用いた。なお、脂肪酸メチルの酸化を防ぐため、Tween 80 と混和したものは実験ごとに使い切り、混和前の脂肪酸メチルは窒素封入を行い保存した。

2.4. Oil Red O 染色

先行研究(Soukas et al., 2009)で用いられた方法にならったが、凍結融解を行わず、サンプルの洗浄には 0.01 % (w/v) Triton-X 100 含有 PBS を用いるという改変を加えた。具体的には、10 mL の緩衝液中で培養していた線虫の一齢幼虫およそ 10 万匹をすべて集め、0.01 % (w/v) Triton-X 100 含有 PBS (以下 PBST と記す) を 1 mL で 1 度洗浄した。このとき 1.5 mL チューブにて、約 2,300G での遠心分離を用いて行った。洗浄した後、4 % (w/v) PFA 含有 PBS と 2 \times MRWB (160 mM KCl, 40 mM NaCl, 14 mM EDTA-2Na, 30 mM Na-PIPES (pH 7.2), 0.2 % (v/v)

2-mercaptoethanol, 1 mM spermidine-trihydrochloride, 0.4 M spermine)を等量ずつ混合した固定液を 250 μ L 加えて室温で 2 分間固定を行った。遠心分離により固定液を除いた後に PBST 1 mL を用いて 3 回洗浄を行った。60 % (v/v) isopropanol を 1 mL 加えて 15 分間室温で脱水した。遠心分離によって isopropanol を除き、Oil Red O 染色液を 250 μ L 加えて 15 分間回転混和し、PBST 1mL で 3 回洗浄した。なお、Oil Red O 染色液は、5.0 (mg/mL)となるように Oil Red O をイソプロパノールに加え(溶けきらず、飽和溶液となる)、2 日以上回転混和を行ったものをストックとして室温で保存した。使用直前に 60 % (v/v)となるよう DDW で希釈し、10 分間以上回転混和をし、Millex-HV, Syringe-Driven Filter Unit (SLHVX13NL)によって不溶物を除いて染色に供した。これをスライドガラスに乗せて観察を行った。顕微鏡は Zeiss Axio Imager M1 microscope system を、カメラは DP20 (OLYMPUS)を用いた。

2.5. 免疫沈降

2.5.1. タンパク質抽出液の調製

2.1 節冒頭に記した通常の飼育条件で、成虫(野生型約 45 匹および *ragc-1* 欠失変異体約 80 匹)を直径 100 mm の培地上で培養(野生型は 4 日間で、*ragc-1* 欠失変異体は 5 日間)したものを 5 枚用意した。得られた線虫の集団(卵から成虫まで混ざったもの)を、M9 緩衝液を用いて 15 mL チューブに集め、M9 緩衝液で 3 回洗浄して大腸菌を除いた。なお、線虫を集める作業以降はすべて氷上で行った。得られた線虫の集団の体積の約 5 倍量の可溶化バッファー(40 mM Na-Hepes (pH 7.4), 75 mM NaCl, 1 % (w/v) Nonidet P-40, 15 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM Na₃P₂O₇, 2Na-EDTA, 1 μ g/mL Leupeptine, 2 μ g/mL Aprotinine)を加え、超音波破碎(UD-201 (TOMY)を用いて OUTPUT: 4, CYCLE: 40 で 20 秒間破碎 20 秒間静置を 10 回以上繰り返した)を行った。大半の個体が破碎されたことを顕微鏡で確認した後、1.5 mL に分注して 150,000 rpm で 1 分間遠心分離し、不溶物を除いた。親水性 PVDF 性フィルター Millex-HV (Merck Millipore; catalog number: SLHVX13NL)を用いて濾過した後に Pierce 660 nm Protein Assay Kit を用いてタンパク質の濃度を定量した。可溶化バッファーを用いてタンパク質濃度を野生型と *ragc-1* 欠失変異体で揃えた(およそ 1.5-2.0 mg protein/mL)。

2.5.2. 結合の確認

得られたタンパク質抽出液 650 μ L を Blocking One (ナカライテスク)でブロッキングした Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham)ビーズ 10 μ L と 15 分間インキュベートしてビーズに非特異的に結合するタンパク質を吸着させた。ビーズを除いた後、90 μ L は免疫沈降前のタンパク質を検出するためのサンプルとして 30 μ L の 4x Laemmli サンプルバッファー (200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40 % (v/v) glycerol, 80.0 mg/mL sodium dodecyl sulfate (SDS), 20 % (v/v) β -mercaptoethanol, 0.80 mg/mL bromophenol blue)と混和して 100 °C で 5 分間加熱した。ラット由来抗 RAGC-1 モノクローマ抗体(クローン 1A12)産生ハイブリドーマの培養上清をビーズの 10 倍

量加えて終夜インキュベートしたものに抽出液を加えて 4 °C で 1.5 時間インキュベートした。ビーズを 0.1 % (w/v) NP-40 (ナカライテスク) 含有 TBS (Tris-based saline) で 3 回洗浄し、さらに洗浄バッファー (75 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM 2Na-EDTA, 100 mM NaCl, 0.1 % (w/v) Nonidet P-40) で 3 回洗浄した。洗浄バッファーを用いて 4x Laemmli サンプルバッファーを 4 倍希釈したものをビーズに加え、ボイルしてサンプルとした。電気泳動の前にビーズは除いた。

得られたサンプルは SDS-PAGE 電気泳動の後に、転写膜である Immobilon-P メンブレン, PVDF, 0.45 µm (Merck Millipore; catalog number: IPVH00010) に転写し、検出を行った。検出の際、ブロッキングは Blocking One を用い、一次抗体に用いた抗体は、抗 RAGA-1: 当研究室で作成したウサギ由来ポリクローナル抗体を Blocking One で 1:500 に希釈したもの、抗 RAGC-1: 当研究室で作成したウサギ由来ポリクローナル抗体を Blocking One で 1:1000 に希釈したもの、抗 α -tubulin: マウス由来モノクローナル抗体 DM1 α (Sigma-Aldrich; catalog number: T9026) を Blocking One で 1:1000 に希釈したものをを用いた。これらの抗体希釈液に転写膜を浸し、4 °C にて終夜インキュベートした。その後 Tween 20 含有 TBS (20 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 0.2 % (w/v) Tween 20) (以下 TBST) 約 5 mL を加えて室温で 5 分間振盪することを 3 回繰り返して洗浄を行った。二次抗体は Goat anti-Rabbit IgG Antibody, HRP conjugate, Species Absorbed (Merck Millipore; catalog number: AP187P) または Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc γ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch; catalog number: 115-035-071) を Blocking One で 1:10,000 に希釈したものをを用いた。これらの抗体希釈液に転写膜を浸し、室温にて 1 時間インキュベートした。その後 TBST 約 5 mL を加えて室温で 10 分間振盪することを 3 回繰り返して洗浄を行い、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore) を用いて発色させ、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) で検出を行った。

3. 実験結果

アミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化とその時間依存性

序論で述べたように、孵化直後の線虫の神経前駆細胞は摂食に応答して活性化し、腹側正中線上へと移動を行う(図 2)が、当研究室では以前より、アミノ酸とエタノールを投与するだけでも神経前駆細胞を活性化させることを見出していた(図 3)。さらにこの神経前駆細胞の活性化はエタノールのみやアミノ酸のみの投与では実現できず、アミノ酸とエタノールが協調的に作用していることも見出していた(図 3)。アミノ酸とエタノールを与えて神経前駆細胞が活性化した個体の割合を経時的に調べると、48 時間後から神経前駆細胞の活性化した個体が現れ始め、120 時間後にはほぼすべての個体で神経前駆細胞の活性化がおきることが分かった(図 4)。この結果に基づき、断りの無い限り本研究での神経前駆細胞の活性化は増減が判断しやすい 3 日目での観察を行うことにした。

線虫の Rag オルソログ RAGA-1 と RAGC-1 は物理的に相互作用する

近年アミノ酸はタンパク質の構成分子としてだけでなく、シグナル分子として mTORC1 と呼ばれるタンパク質キナーゼ複合体を活性化することが、ヒトの培養細胞(Sancak et al., 2008)や、キイロシヨウジョウバエの培養細胞(Kim et al., 2008)で報告されてきた。このシグナルには Rag とよばれる G タンパク質が介在していることが知られている(Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008)。そこで個体レベルにおいてもアミノ酸の感知に Rag が用いられているのではないかと考えた。すなわちアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化に Rag が介在しているのではないかと考えた。Rag には RAGA と RagB、そして RagC と RagD からなる 2 つの異なるサブタイプが存在し、それらが会合してヘテロ二量体を形成すると考えられている(Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008、図 5)。線虫には RAGA と RagB のオルソログとして *raga-1* という遺伝子が(Schreiber et al., 2010)、RagC と RagD のオルソログとして *ragc-1* という遺伝子が存在する(Fukuyama et al., 2012)。そこでまず、線虫においても両者が結合するか検討した。線虫のタンパク質抽出液に対して RAGC-1 に結合する抗体で免疫沈降を行ったところ、野生型では RAGA-1 が共沈したのに対し、*ragc-1* 欠失変異体において共沈は見られなかった(図 6)。したがって、線虫においても Rag は各サブタイプどうしで結合すると考えられる。なお、本研究で用いた Rag の欠失変異は、G タンパク質がグアニンヌクレオチドと結合するのに必要なモチーフ(G1 から G5 までの 5 つのモチーフ)(Bourne et al., 1991)を複数欠いており、Rag の機能は完全に失われていると考えられる(図 7)。

RAGA-1 は p14 依存的に小胞膜状の構造物に局在する

本研究に先立って、Rag と同一の機能に関わっている分子を酵母 two-hybrid 法スクリーニングによって探索した結果、RAGC-1 と結合するタンパク質として Y97E10AR.7(以下哺乳類のオルソログにならって以降 p14 とよぶ)を単離していた(壹岐、修士論文)。線虫の *p14* 欠失変異体において、

産卵数の減少、胚性致死率の上昇、脂肪滴の過剰蓄積、さらには後期エンドソームまたはリソソームの肥大という特異な表現型が *raga-1* および *ragc-1* 欠失変異体と合致していたため、p14 は Rag と同じ機能に関与していることが予想されていた(壹岐、修士論文)。哺乳動物では Rag はリソソームの膜に局在していると考えられているが、これは Ragulator とよばれる、p14 を構成因子として含むリソソーム局在性タンパク質複合体との結合によって実現している(Sancak et al., 2010、図 5)。Ragulator は現在、p18 や p14、MP1、HBXIP、C7orf59 の 5 種類のタンパク質からなる複合体として知られる(Bar-Peled et al., 2012)。そこで線虫においても p14 が Rag の局在制御に必要なかどうか検討を行った。CRISPR/Cas9 を利用して線虫の染色体上の *raga-1* の停止コドンの直前に GFP を含む塩基配列をノックインし、内在性の RAGA-1 を GFP との融合タンパク質として発現する株を作出した。RAGA-1 を発現する組織のなかでも、後期エンドソームをはじめとする小胞が大きく観察が容易な腸細胞において RAGA-1::GFP 融合タンパク質の局在を調べたところ、細胞質と考えられる細胞内部全体に GFP の蛍光が認められたのに加え、小胞膜様の構造物にも局在している様子が観察された(図 8)。しかし *p14* の欠失変異体においては RAGA-1::GFP の小胞膜様構造物への局在は見られなくなり、細胞内全体に散在している様子が観察され(図 8)、線虫においても p14 は Rag の局在を制御していることが示唆された。

Rag および p14 の欠失変異体ではアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化が著しく減弱する

線虫においても RagA/B と RagC/D のオルソログ同士が結合することや、p14 が RagA/B のオルソログの局在制御に関与していることが示唆された。さらに p14 を含む複合体 Ragulator は現在 RagA/B の GEF (guanine nucleotide exchange factor)であることが報告されている(Bar-Peled et al., 2012)。そこで、培養細胞と同様に Rag および p14 が線虫においてもアミノ酸のシグナル伝達に用いられているのか調べることにした。まず *raga-1* や *ragc-1*、*p14* の欠失変異体にアミノ酸とエタノールを投与して神経前駆細胞の活性化した個体の割合を計測した。その結果、いずれの変異体においても神経前駆細胞が活性化した割合は著しく抑制されていることが認められた(図 9)。ただし神経前駆細胞が活性化している個体も存在しており、Rag と同様の機能を担っている分子の存在が考えられる。実際、アミノ酸による mTORC1 の活性化には、Vps34 (Gulati et al., 2008; Nobukuni et al., 2005)や MAP4K3 (Findlay et al., 2007)などの分子が関与しているという報告がある。

恒常活性化型 Rag の発現はエタノールの存在条件下で神経前駆細胞を活性化する

Rag や p14 の欠失は神経前駆細胞の活性化を大きく減弱させることが分かったが、もし Rag が本来に神経前駆細胞の活性化におけるアミノ酸の作用に介在しているのであれば、Rag によるシグナル伝達経路を十分に活性化することで、アミノ酸が存在しない条件でも神経前駆細胞は活性化すると考えられる。哺乳動物培養細胞において Rag はアミノ酸の投与に応答して RagA または RagB が GTP 結合型、RagC または RagD が GDP 結合型になることで mTORC1 と結合し、これを後期エンドソームまたはリソソーム膜上に引き寄せることで活性化することが提唱されている (Sancak et al., 2008)。そこで当研究室では表皮細胞および神経前駆細胞特異的に機能する *dpy-7* 遺伝子のプロモーター下で、GTP 結合型模倣体の RAGA-1 (RAGA-1 Q63L) と GDP 結合型模倣体の RAGC-1 (RAGC-1 T40N) (両者の組を恒常活性化型の Rag とよぶことにした) を発現する株を作出していた。この株を用いると、エタノールのみを投与した条件において、およそ 5 割の個体において神経前駆細胞の活性化が起きることを見出していた (図 10)。すなわちアミノ酸投与の効果は恒常活性化型の Rag の発現によって代替できることが明らかとなった。この結果と、Rag や p14 の欠失変異体においてアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化が減弱したことから、神経前駆細胞の活性化におけるアミノ酸の作用には Rag が介在していると考えられる。しかし一方で、エタノール非存在下では恒常活性化型の Rag を発現させるだけでは神経前駆細胞を活性化させることができなかったことから、エタノールの作用は依然として必須である。

グルコースは神経前駆細胞の活性化におけるエタノールの作用を代替しない

神経前駆細胞の活性化にはエタノールの作用は必須であり、Rag の機能と協調していることが分かったので、次にエタノールの作用について解析を行うことにした。最初に、エタノールが単なる炭素源の供給として必要であったり、エネルギーを得るために必要であったりするのではないかと考えた。そこで代表的な炭素源およびエネルギー源であるグルコースとアミノ酸の投与を試みた。しかし予想に反してグルコースとアミノ酸の投与では神経前駆細胞は全く活性化させることができなかった (図 11)。このことから、エタノールはグルコースとは異なる代謝中間産物に導かれるか、エタノール特異的に応答する仕組みが存在することが予想される。

アミノ酸と酢酸の投与は神経前駆細胞を活性化させる

次に、エタノールそのものが作用しているのか、代謝産物も同様の作用を有しているのか調べることにした。エタノールはアルコール脱水素酵素とアルデヒド脱水素酵素による酸化を受けて酢酸へと変換される。そこで最初にアミノ酸と酢酸を投与する実験を行った。すると各濃度の酢酸を投与した条件において、10 mM の酢酸ナトリウムとアミノ酸を与えた群において神経前駆細胞の活性化が認められた (図 12)。すなわちエタノールの作用はその代謝産物によって代替できる。なお、

100 mM の酢酸ナトリウムとアミノ酸を加えた群では神経前駆細胞の活性化はごく一部に限られ、過剰量の酢酸を投与すると阻害的な効果が現れる。

エタノールを投与した線虫には多数の脂肪滴が形成されている

酢酸は補酵素 A (以下アセチル CoA (coenzyme A)) のチオール基に転移してアセチル CoA となる。アセチル CoA は TCA 回路で酸化を受ける運命や、脂肪酸やケトン体生成、イソプレノイド、ポリケタイドなどの二次代謝産物合成の前駆体となる運命をたどる (図 14 (a))。

本研究を行っている過程で、エタノールを投与した線虫の頭部に、小胞状の構造物が顕著に蓄積していることを認めていた (図 13 (a))。類似の構造物が摂食を行ったときにできることを先に見出しており、摂食に伴って生じる脂肪滴である可能性を考えた。そこで実際に脂肪滴が蓄積しているか Oil Red O 染色法によって検討をおこなったところ、培養 2 日目の時点で栄養分子を投与していない群やアミノ酸のみを投与した群、さらにはアミノ酸とグルコースを投与した群では Oil Red O によって染色される脂肪滴がほとんど観察されなかったのに対し、エタノールのみを投与した群やアミノ酸とエタノールを投与した群では腸細胞で複数の脂肪滴を含む個体が見られた (図 13 (b))。このことは、投与したエタノールをもとにパルミチン酸、およびステアリン酸を合成しているという報告 (Castro et al., 2012) ととも矛盾しない。以上のことから、エタノールから生合成される脂肪酸は神経前駆細胞の活性化に関与するのではないかと考えた。そこでパルミチン酸およびステアリン酸をアミノ酸とともに投与して神経前駆細胞を活性化できるか検討を行った。

脂肪酸メチルをアミノ酸と同時に投与すると神経前駆細胞を活性化できる

脂肪酸そのものは非常に毒性が高かったため高濃度で投与する実験に供することができなかった (壹岐、未発表データ)。しかしながら、昆虫細胞の培地中で脂肪酸供給源として利用されている脂肪酸のメチルエステル体 (Inlow et al., 1989) は、線虫に対しても脂肪酸と比較して毒性が顕著に低いことを見出したため、脂肪酸メチルを利用することにした。

脂肪酸メチルを緩衝液中に懸濁させるため、昆虫細胞培地の例 (Inlow et al., 1989) を参考に、界面活性剤である Tween 80 を用いて乳化させたものを投与した。脂肪酸の生合成では最初に炭素数 16 のパルミチン酸を主に生成する (図 14 (b)) ので、パルミチン酸メチルが神経前駆細胞の活性化に作用するか最初に調べた。するとアミノ酸と Tween 80 を投与した群では神経前駆細胞の活性化が認められなかったのに対し、アミノ酸とパルミチン酸メチルを投与した群ではパルミチン酸メチルの容量依存的に神経前駆細胞の活性化が見られた (図 15 (a))。ただし、10 mM のパルミチン酸メチルは一部が不溶化していた。一方パルミチン酸から 2 炭素分の伸長反応を受けて生じる (図 16、図 14 (b)) ステアリン酸のメチルエステル体も同様に投与するとアミノ酸の存在下で神経前駆細胞を活性化できた (図 15 (b))。ただし 3 mM 以上の濃度で一部が析出し、活性化できた個体の割合も高くなかった。以上より、パルミチン酸およびステアリン酸がアミノ酸の存在下で神経前駆細胞

を活性化できることが分かった。

さて、パルミチン酸メチルおよびステアリン酸メチルはアミノ酸とともに投与することで神経前駆細胞を活性化できることを確認したが、これら飽和脂肪酸のメチルエステル体はエタノールと比較すると神経前駆細胞を活性化させる効率が顕著に低い。パルミチン酸メチルおよびステアリン酸メチルはそれぞれ 10 mM、3 mM で凝集して一部が不溶化してしまったため、線虫への取り込み効率が低い可能性がある。そこでステアリン酸から合成され(図 16、図 14 (b))、かつ培養温度で液体のため、不溶化しても摂取されうると推測されるオレイン酸のメチルエステル体についても同様の検討を行った。アミノ酸とオレイン酸メチルを投与したところ、10 mM の濃度で依然として一部が不溶化してしまったが、アミノ酸とエタノールを投与したときと同程度に神経前駆細胞を活性化させることができた(図 15 (c))。以上の観察結果は、アミノ酸存在下での神経前駆細胞の活性化におけるエタノールの作用が、エタノールから生合成される脂肪酸を介するというモデルと矛盾しない。

アミノ酸と偶数炭素直鎖のアルコールを投与すると神経前駆細胞が活性化する

脂肪酸を投与する実験では、メチルエステル体を用いたため、加水分解によって生じるメタノールが活性の本体である可能性が残る。そこでメタノールを含めた低級アルコールをアミノ酸とともに投与して神経前駆細胞を活性化できるか、検討を行った。そこで、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、2-メチル-1-プロパノールの 7 種を 10 mM の濃度でアミノ酸とともに投与した。するとエタノールを投与した群と、1-ブタノールを投与した群でのみ神経前駆細胞の活性化が見られた(図 17)。このことから、アミノ酸とパルミチン酸メチルによる神経前駆細胞の活性化は加水分解の結果生じるメタノールに由来しないことが示唆された。また同時に、アミノ酸の存在下ではエタノールと 1-ブタノールという、少なくとも 2 つの偶数炭素直鎖のアルコールが神経前駆細胞を活性化できることを見出した。

ω -3 脂肪酸と ω -6 脂肪酸の合成はアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化に関与しない

オレイン酸は Δ 12 不飽和化酵素によって不飽和化を受け、リノール酸へと変換される(図 16、図 18 (a))。リノール酸は不飽和炭素-炭素結合を 2 つ有する ω -6 脂肪酸の一つである。一部の ω -6 脂肪酸はメチル末端から 3 番目の炭素と 4 番目の炭素の結合に不飽和化を受け、 ω -3 脂肪酸と呼ばれる脂肪酸に変換される(図 16、図 18 (a))。アラキドン酸をはじめとする ω -6 脂肪酸やエイコサペンタエン酸をはじめとする ω -3 脂肪酸が炎症の制御をおこなったり(Calder, 2006; Simopoulos, 2002)、 ω -3 脂肪酸がインスリン抵抗性を低下させる(Fedor and Kelley, 2009; White et al., 2010)など、

様々な生理活性を持つことが知られる。哺乳類はこれらの多価不飽和脂肪酸を合成できないが、線虫は ω -6 脂肪酸と ω -3 脂肪酸の両方を合成することができる(Zhu et al., 2008)。そこで様々な生理活性を有する多価不飽和脂肪酸の合成がアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化に必要などうか検討した。多価不飽和脂肪酸の合成は、 Δ 12 不飽和化酵素によるオレイン酸からリノール酸への変換を経るので、 Δ 12 不飽和化酵素 FAT-2 の活性を失って多価不飽和脂肪酸を *de novo* 合成できない変異体(Watts and Browse, 2002)にアミノ酸とエタノールと投与して神経前駆細胞の活性化した個体の割合を測定した。その結果、*fat-2* 機能欠損変異体において神経前駆細胞の活性化した個体の割合は野生型と比べて減少することはなかった(図 18 (b))。また、 ω -6 脂肪酸から ω -3 脂肪酸を合成する酵素である n-3 不飽和化酵素の線虫オルソログをコードする *fat-1* の機能欠損変異体(Watts and Browse, 2002)においても神経前駆細胞の活性化した個体の割合は野生型と比較して顕著な差はなかった(図 18 (c))。これらの結果から、アミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化には多価不飽和脂肪酸は関与しないことが示唆された。しかしながらリノール酸とアミノ酸を投与すると非常に効率よく神経前駆細胞を活性化することができたことから(図 19)、多価不飽和脂肪酸はアミノ酸存在下での神経前駆細胞の活性化に必要なではないが、十分であることが示された。

グリセロール 3 リン酸からのリゾホスファチジン酸の合成阻害はアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化を抑制する

ここまででアミノ酸とエタノールを投与して神経前駆細胞が活性化する条件では脂肪滴が蓄積していることを見出し、エタノールは脂肪酸メチルで代替できることを見出した。線虫の脂肪滴は主にトリアシルグリセロールで構成されていることが知られているので(Zhang et al., 2012)、次にトリアシルグリセロールのような複合脂質の合成が神経前駆細胞の活性化に関与する可能性を検討した。グリセロール-3-リン酸にアシル基が 1 つまたは複数結合してできる複合脂質はグリセロリン脂質とよばれる。グリセロール-3-リン酸のリン酸基のついていない側の末端の炭素に、GPAT (glycerol 3-phosphate acyltransferase)と呼ばれる酵素によってアシル基が転移されることによって、リゾホスファチジン酸と呼ばれるグリセロリン脂質が生合成される(Coleman and Lee, 2004)。GPAT は小胞体局在型とミトコンドリア局在型の 2 つが存在する(Wendel et al., 2009)。リゾホスファチジン酸にさらに LPAAT (lysophosphatidic acid acyltransferase)と呼ばれる酵素によってアシル基が転移され、ホスファチジン酸と呼ばれる脂質に変換される(Coleman and Lee, 2004)。ホスファチジン酸はジアシルグリセロールやトリアシルグリセロール、リン脂質の前駆体として利用される重要な脂質である(Athenstaedt and Daum, 1999)。この一連の過程の最初の転移酵素 GPAT には線虫オルソログが存在し、小胞体局在型は *acl-4* および *acl-5*、ミトコンドリア局在型は *acl-6* という遺伝子でコードされる(Ohba et al., 2013)。そこでこれらの遺伝子が神経前駆細胞の活性化に与える影響を調べたところ、アミノ酸とエタノールを投与した栄養条件で、*acl-4* と *acl-5* の二重欠失変異体は神経前駆細胞の

活性化した個体の割合が減少した(図 20 (a))。このことから、リゾホスファチジン酸またはリゾホスファチジン酸が修飾を受けてできるグリセロリン脂質の合成が、神経前駆細胞の活性化に重要であると示唆された。このとき神経前駆細胞が活性化し始める2日目の個体の脂肪滴をOil Red O 染色で確認すると、野生型では脂肪滴が蓄積している個体が多く見られたが、*acl-4*と*acl-5*の二重欠失変異体ではほとんどの個体で脂肪滴が蓄積していなかった(図 20 (b))。一方で*acl-6* 欠失変異体については野生型とくらべて神経前駆細胞の活性化した個体の割合の減少が見られなかった(図 20 (c))が、線虫のGPATがミトコンドリア局在型である*acl-6*よりも小胞体局在型であるACL-4とACL-5の方に大きく依存しているという報告(Ohba et al., 2013)と矛盾しない。

リゾホスファチジン酸はLPAATの機能によりさらにアシル基転移を受けるが、LPAATの線虫オルソログは、*acl-1*と*acl-2*という遺伝子でコードされる(Ohba et al., 2013)。LPAATは小胞体に局在するが、ACL-1とACL-2はともに小胞体局在型分子であると考えられている(Ohba et al., 2013)。*acl-1*と*acl-2*の欠失変異体は、野生型と同程度にアミノ酸とエタノール存在下で神経前駆細胞が活性化した(図 20 (d))。これらの変異体でのアシル基転移活性はわずかに減少するだけ(Ohba et al., 2013)なので、ホスファチジン酸以降のグリセロリン脂質合成が重要である可能性は依然として残っている。

4. 考察

本研究では、アミノ酸とエタノールが協調的に神経前駆細胞を活性化させるという知見を足がかりに、アミノ酸の作用にはアミノ酸のシグナルを伝達する G タンパク質 Rag が介在している可能性を見出し、エタノールの作用は脂肪酸で代替できることを見出した(図 21)。さらにエタノールの作用はグルコースでは代替できず、同じ炭素・エネルギー源であっても神経前駆細胞の活性化に対する作用が異なりうることを見出した。また、グリセロリン脂質の合成を阻害するとアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化が抑制されたことから、食餌中のエタノールは脂肪酸へと変換され、グリセロリン脂質として作用している可能性が考えられる(図 21)。

栄養を感知する細胞の実体

アミノ酸を与える代わりに恒常活性化型の Rag を発現させても、エタノール存在下で神経前駆細胞が活性化することを示したが、このときの恒常活性化型の Rag は *dpy-7* 遺伝子のプロモーターを用いて表皮細胞および神経前駆細胞でのみ発現させていた。神経前駆細胞が直接栄養分子を感知して活性化することがまず考えられるが、神経前駆細胞が栄養を感知せずに表皮細胞が感知し、分泌タンパク質などを介して神経前駆細胞を活性化するという細胞非自律的な制御も考えられる。実際、飢餓時の神経前駆細胞の休眠維持に必要なマイクロ RNA miR-235 は、表皮細胞のみで発現させても神経前駆細胞の休眠を維持することができることから、表皮を介した細胞非自律的な神経前駆細胞の活性化制御を担う細胞間シグナルの存在が提唱されている(Kasuga et al., 2013)。マウスやキイロショウジョウバエにおいても、「ニッチ(niche)」と呼ばれる幹細胞の周囲の微小環境を作り出す細胞や、神経前駆細胞に隣接するグリア細胞が栄養状態の変化に応答し、幹・前駆細胞の活性化を制御するといった細胞あるいは組織間シグナルを介した栄養感知メカニズムが存在する(Chell and Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011; Yilmaz et al., 2012)。具体的には、カロリー制限下におかれたマウスの腸では、パネート細胞とよばれる抗菌物質を分泌する細胞が Bst1 と呼ばれる酵素による cyclic ADP ribose の合成が亢進し、cyclic ADP ribose が分泌されることで隣接する腸幹細胞の自己複製を亢進させ、分化を抑制するというモデルが提唱されている(Yilmaz et al., 2012)。キイロショウジョウバエにおいては、fat body とよばれる哺乳動物の肝臓や脂肪組織と類似の機能を有する組織がアミノ酸を感知して何らかの分泌因子を介して脳のグリア細胞にシグナルを送り、グリア細胞に dILP (*Drosophila* insulin-like peptide)とよばれるインスリン様ペプチドを分泌させて神経前駆細胞を活性化するという仕組みの存在が知られている(Shim et al., 2013; Sousa-Nunes et al., 2011)。fat body とグリア細胞は隣接していない組織同士であり、栄養の変化を伝えるシグナルは隣接する細胞間のみならず、大きく離れた組織間でも伝達されうる。cyclic ADP ribose を合成する酵素 Bst1 のオルソログが線虫には存在しないため、マウスの腸幹細胞で見られるような制御は存在しないと考えられるが、インスリン様のタンパク質は多数存在するため、線虫の神経前駆細胞も他の細胞からのインスリン様タンパク質の分泌を受けて活性化する可能性は十分考えられる。

エタノールとグルコースの効果の違い

本研究で、エタノールと同じくアセチル CoA を供給する炭素源であるグルコースが、エタノールとは異なってアミノ酸存在下で神経前駆細胞の活性化を亢進しないことを見出した。一方当研究室では、IIS 経路の負の制御因子 PTEN の線虫オルソログをコードする *daf-18* (Mihaylova et al., 1999) の欠失変異体や、IIS 経路の下流に存在する転写因子 FOXO の線虫オルソログをコードする *daf-16* (Lee et al., 2001) の欠失変異体 (PTEN と FOXO については図 1 参照) は、グルコースのみを与えるだけでエタノールほど効率的ではないものの神経前駆細胞が活性化するという結果も得ている (当研究室未発表データ)。すなわち IIS 経路が活性化していると考えられる条件ではグルコースも神経前駆細胞を活性化させる作用を持つ。この原因として、IIS 経路の活性化によってグルコースの代謝運命が大きく変化する可能性が考えられる。例えば *Pten* 欠失マウスでは解糖系によるグルコースの異化が亢進しており (Blouin et al., 2010)、逆に *Pten* を過剰発現しているマウスでは解糖系によるグルコースの異化が低下している (Garcia-Cao et al., 2012)。さらに FOXO3a をマウスの培養細胞でノックダウンすると解糖系の亢進が見られる (Khatri et al., 2010)。このような知見から、飢餓条件の線虫ではグルコースは解糖系を経た代謝によって神経前駆細胞を活性化させるのに十分なアセチル CoA や脂肪酸を合成できていないが、IIS 経路の活性化に伴い、グルコースの異化が亢進して十分なアセチル CoA や脂肪酸が供給される可能性が考えられる。

脂肪酸に由来する神経前駆細胞活性化因子の実体

神経前駆細胞の活性化において脂肪酸がエタノールの効果を代替することを見出したが、最終的に栄養分子がいかなる分子に変換されて神経前駆細胞の活性化に作用しているかは依然不明である。

神経前駆細胞の活性化に多価不飽和脂肪酸が必要ではないことが本研究によって示唆されたことから、アミノ酸存在下での神経前駆細胞の活性化を確認できたパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸に加え、パルミチン酸が最初に伸長反応を受けてできる ω -7 脂肪酸 (パルミトレイン酸、バクセン酸等) や、オレイン酸から伸長反応を受けてできる ω -9 脂肪酸 (エイコセン酸、エルカ酸等) のいずれかが関与する可能性と、脂肪酸の種類に依存しないで関与する可能性が考えられる (図 16)。脂肪酸をリガンドとする受容体としてこれまでペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) α や PPAR γ 、PPAR δ が知られているが (Berger and Moller, 2002)、そのアミノ酸配列から、線虫にはオルソログが存在しないと考えられている。しかし、リノール酸に応答することが報告された核内受容体 HNF4 (Yuan et al., 2009) にホモロジーのある *nhr-49* は脂肪酸の β 酸化や不飽和化、輸送などに関わる遺伝子群の発現調節を行うが、この遺伝子群は PPAR α および PPAR δ が発現調節を行う遺伝子群と類似しており、線虫では *nhr-49* が PPAR と同等の役割を果たしている可能性が指摘されている (Gilst et al., 2005)。そこから *nhr-49* が

脂肪酸の受容体としてはたらいっている可能性があり、本研究で観察されたアミノ酸と脂肪酸メチルの投与による神経前駆細胞の活性化に関与しているかもしれない。HNF のオルソログは他に *nhr-35* や *nhr-64*、*nhr-69* が知られ、これらの遺伝子が神経前駆細胞の活性化を制御している可能性もある。

生合成された脂肪酸も、さらに代謝を受けて他の分子の生合成に利用される可能性がある。実際、エタノールを摂食させるとトリアシルグリセロールを主成分とする脂肪滴が蓄積し、グリセロール-3-リン酸からリゾホスファチジン酸への変換を阻害すると神経前駆細胞の活性化が抑制された。すなわち、グリセロリン脂質合成が少なくとも部分的に神経前駆細胞の活性化に必要であることが示唆された。グリセロリン脂質がシグナル伝達に関与する例としては、ジアシルグリセロールが PKC (protein kinase C) を活性化することや (Berridge, 1993)、リゾホスファチジン酸が LPA₁ から LPA₆ までの 6 種存在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して細胞増殖などに働くこと (Moolenaar et al., 2004; Okudaira et al., 2010; van Corven et al., 1989)、ホスファチジン酸が mTORC1 を活性化すること (Foster, 2013, 2007) などが知られている。この中でも、ホスファチジン酸は注目すべき特徴を有する。摂食に応じたマウスの腸幹細胞の活性化に mTORC1 が関与したり (Yilmaz et al., 2012)、線虫の神経前駆細胞の活性化に Rag が関与したりすることなど、幹・前駆細胞の活性化に mTORC1 の活性化は重要であると考えられる。この mTORC1 の活性化にアミノ酸とホスファチジン酸は協調的にはたらくことが分かっており (Fang et al., 2001)、細胞の成長や分裂に必要な脂質の量に応じた応答の実現に用いられていると考えられている (Foster, 2013)。もしホスファチジン酸の合成が神経前駆細胞の活性化に用いられているならば、グリセロリン脂質が関与するという結果も説明できる。すなわちエタノールがホスファチジン酸に変換されて、アミノ酸と協調的に神経前駆細胞を活性化している可能性は本研究の結果に矛盾しない。

脂肪酸の作用として、シグナル伝達経路を活性化している可能性以外に、ミストイル化やパルミトイル化 (Resh, 1999)、n-オクタン酸化 (Kojima et al., 1999) といったタンパク質の修飾に寄与している可能性や、生体膜の供給源として用いられている可能性も否定はできない。特に後者は、生体膜はグリセロリン脂質を豊富に含むことから、脂肪酸の作用の可能性として十分に考慮する必要がある。

アルコールの構造的特徴とその神経前駆細胞活性化に対する作用

パルミチン酸やステアリン酸、オレイン酸、リノール酸のいずれのメチルエステル体もアミノ酸存在下で神経前駆細胞を活性化できた。さらに、様々な低級アルコールをアミノ酸とともに投与する実験では、エタノールと 1-ブタノールは神経前駆細胞を活性化できたが、メタノールや 1-プロパノール、2-プロパノール、2-ブタノール、2-メチル-1-プロパノールではできなかった。1 級アルコールである 1-ブタノールは酸化されると酪酸になるが、補酵素 A と結合してブチリル CoA となった後にアセチル CoA が付加されて脂肪酸合成に用いられたり、 β 酸化を受けて 2 分子のアセチル CoA となったりすることが予想されるので、脂肪酸がアミノ酸存在下での神経前駆細胞の活性化を起こす

という仮説と矛盾しない。一方、酸化されるとケトンを生じて脂肪酸合成には寄与しない 2 級アルコールである 2-プロパノールと 2-ブタノールは、神経前駆細胞の活性化を誘導しなかった。1-プロパノールは酸化されるとプロピオン酸を生成し脂肪酸合成に利用されうるが、神経前駆細胞は活性化しなかった。これは、1-プロパノールからは神経前駆細胞を活性化させるのに十分な量の脂肪酸が合成できないことによる可能性と、プロピオン酸から生じるプロピオニル CoA から合成しうる奇数鎖の脂肪酸に活性化能がない可能性が考えられる。また、線虫において mTORC1 の活性化に必要とされるモノメチル分岐鎖脂肪酸(Zhu et al., 2013)の前駆体となりうる、分岐鎖を持つ 1 級アルコールである 2-メチル-1-プロパノールは、アミノ酸存在下で神経前駆細胞を活性化できなかったことから、モノメチル分岐鎖脂肪酸は、パルミチン酸やステアリン酸のような直鎖の脂肪酸と異なり、アミノ酸存在下での神経前駆細胞の活性化には十分ではない可能性がある。

mTORC1 の活性とアミノ酸およびエタノールの作用

以前より当研究室では、IIS 経路が恒常的に活性化していると考えられる PTEN(線虫オルソログは *daf-18*)の変異体では、エタノールのみ存在する条件で神経前駆細胞が活性化することを見出していた。また、インスリン/IGF は神経幹細胞の分化や前駆細胞の増殖を促進することが知られ(Åberg et al., 2003; Arsenijevic et al., 2001; Brooker et al., 2000; Drago et al., 1991)、キロショウジョウバエにおいて IIS 経路の活性化で神経前駆細胞を活性化できたり(Sousa-Nunes et al., 2011)、摂食による mTORC1 の活性化がマウスの腸幹細胞において観察されている(Yilmaz et al., 2012)。これらのことから mTORC1 の活性化は幹・前駆細胞の活性化に大きく寄与していることが考えられる。本研究においても、神経前駆細胞の活性化におけるアミノ酸の効果は mTORC1 を活性化する G タンパク質 Rag の機能を介していることが示唆されたため、アミノ酸による mTORC1 の活性化とエタノールの作用が並行して神経前駆細胞の活性化に寄与している、もしくはアミノ酸とエタノールの両者が協調的に mTORC1 を活性化に寄与しているのではないかと考えられる。

これまでアミノ酸による mTORC1 の活性化は mTORC1 の代表的な基質である p70 S6K1 (ribosomal protein S6 kinase 1)と 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)のリン酸化状態によって検出されてきた(Hay and Sonenberg, 2004; Wullschlegel et al., 2006)。しかし、線虫での mTORC1 の活性の測定は哺乳類と異なり基質のリン酸化を検出する抗体が存在しないため、mTORC1 の基質のリン酸化を指標とした mTORC1 の活性測定ができず、上述のような神経前駆細胞と mTORC1 の活性の相関が調べられていない。しかし線虫に用いることができる抗体を作出したり、近年めざましい発展を遂げている Zfn (zinc finger nuclease)や TALEN (transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/Cas9 (CRISPR associated protein 9)といった遺伝子編集技術によりペプチドタグをノックインしたりするなどして、mTORC1 の活性を測定できるようになると期待される。これが可能になれば、アミノ酸とエタノールが mTORC1 の活性に影響を与えるか、与えるとしたらどの組織で活性化が起きているかなど、栄養分子による神経前駆細胞の活性化と mTORC1 の活性化に関

する重要な知見が得られると期待される。

本研究の意義と応用

前駆細胞の活性化について、個別の栄養を投与した研究は少なく、多価不飽和脂肪酸が神経幹細胞を活性化する例はあるものの(Sakayori et al., 2013)、多価不飽和脂肪酸ではない脂肪酸が前駆細胞を活性化することはこれまで報告されていない。さらにアミノ酸とエタノールは神経前駆細胞を活性化するが、グルコースとアミノ酸は神経前駆細胞を活性化できないことから、同じ炭素源であっても、神経前駆細胞を活性化できるものと、まったくできないものがあることが明らかとなった。このことは脂質と糖質の作用の違いを顕著に反映しているものとも考えられ、飢餓条件に置かれた生物が発生を再開させるのにあたって、脂質とアミノ酸が両方存在する条件を、十分に栄養が存在する条件として認識している可能性が考えられる。

序論で述べたように栄養応答の破綻は様々な病態との関連が深い、アミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化のメカニズムも疾患との関係があるかもしれない。がん抑制遺伝子である PTEN の線虫オルソログ *daf-18* の欠失変異体において、エタノールのみを投与した条件で神経前駆細胞が活性化することを当研究室で見出していることから、アミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化のメカニズムが腫瘍などの病態と関連することは十分考えられる。

エタノールや脂肪酸がどのように神経前駆細胞の活性化に関与しているのか明らかにできていないが、本研究を行った生物種が線虫であるため遺伝学スクリーニングによって神経前駆細胞の活性化に関与する遺伝子の探索を行うことができる。当研究室では現在、神経前駆細胞が活性化した後活性が上昇するプロモーターを同定しており、このプロモーターによって蛍光タンパク質を発現する株では、神経前駆細胞の活性化に応じて蛍光が観察される。例えば、突然変異誘発剤によってこの株に無作為な変異を起こし、アミノ酸のみを投与した条件でも神経前駆細胞が活性化して蛍光が観察され、アミノ酸すら存在しない栄養のない条件では蛍光が観察されなくなる個体を探し出すことによって、アミノ酸と協調的に神経前駆細胞を活性化する遺伝学的背景を同定する。生体内の前駆細胞の活性化を指標とした遺伝学的スクリーニングはこれまで例がなく、こういったスクリーニングによって未知の前駆細胞活性化メカニズムの同定に貢献できるかもしれない。

5. 図表

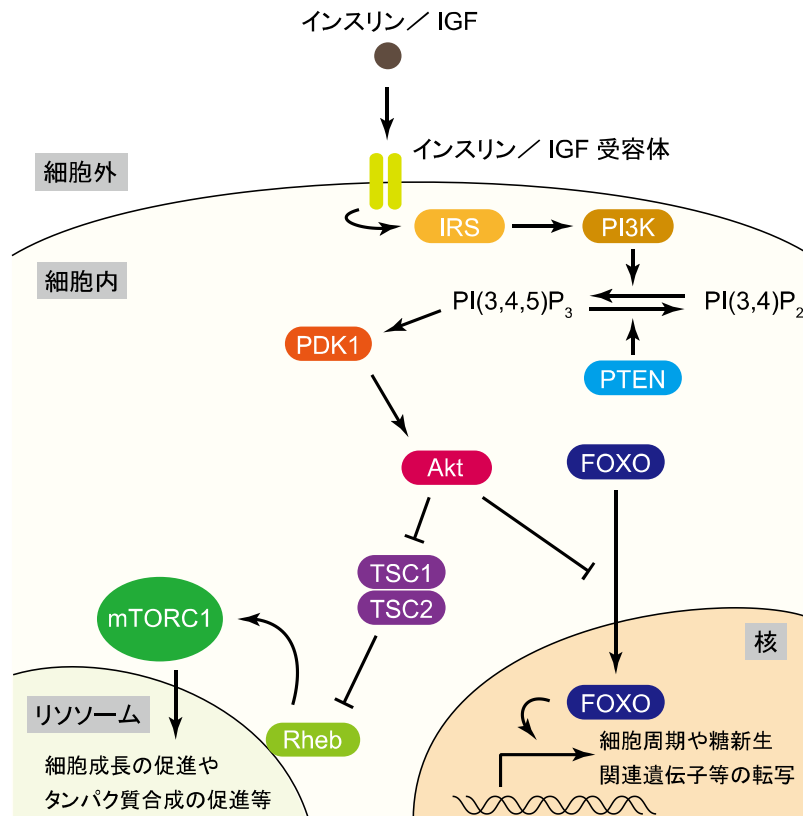


図 1 IIS 経路の概略

インスリンまたは IGF (insulin-like growth factor) をインスリン／IGF 受容体が感知すると、IRS1 とよばれるタンパク質を引き寄せてリン酸化し、これにより PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) を引き寄せて活性化する。PI3K は PI(4, 5)P₂ (phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate) のようなイノシトールリン酸のイノシトール部分の 3 位のヒドロキシル基をリン酸化する酵素であるが、PI(4, 5)P₂ をリン酸化することで PI(3, 4, 5)P₃ (phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate) に変換する。この PI(3, 4, 5)P₃ がセリン／スレオニンキナーゼ PDK1 (phosphatidylinositolide-dependent kinase 1) を活性化し、下流へシグナルを伝える。PI(4, 5)P₂ から PI(3, 4, 5)P₃ への変換は PTEN (線虫オルソログは DAF-18) と呼ばれる脂質ホスファターゼによって触媒される。すなわち PTEN は IIS 経路を負に制御している。一方活性化した PDK1 はセリン／スレオニンキナーゼ Akt をリン酸化して活性化する。活性化した Akt は転写因子 FOXO (forkhead box O; 線虫オルソログは DAF-16) をリン酸化して核内への移行を阻害する。FOXO は細胞周期や糖新生など様々な過程に関わる遺伝子の発現を調節する。Akt は FOXO をリン酸化する以外に、TSC1 と TSC2 というタンパク質の複合体をリン酸化して不活性化する。TSC1 と TSC2 の複合体は低分子量 G タンパク質 Rheb の GAP (guanosine triphosphatase activating protein) としてはたらき、Rheb を不活性化する。結果として IIS 経路によって Rheb は活性化され、mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) を活性化する。mTORC1 は細胞の成長や翻訳の促進、オートファジーの抑制など様々な機能に関与する。なお、この図は (Laplanche and Sabatini, 2012) に基づいて作成した。

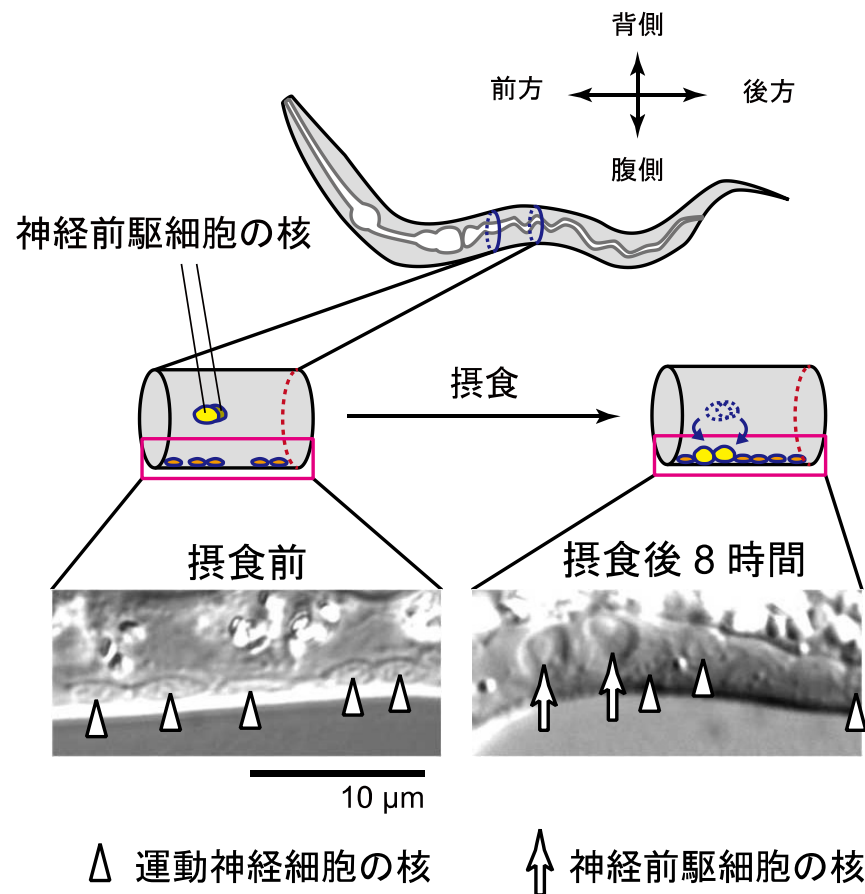
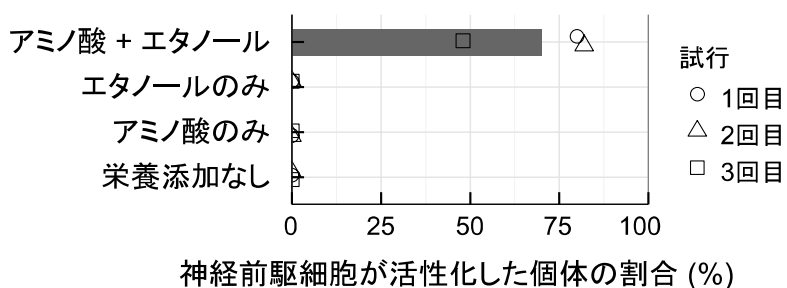


図 2 線虫の神経前駆細胞は摂食に応答して活性化する

孵化直後の線虫の神経前駆細胞は体側面に存在しており、飢餓条件におかれたときは、そのまま体側面上で静止期に維持されるが、摂食を開始すると活性化して腹側正中線上へと移動を行う。移動した神経前駆細胞の核は微分干渉顕微鏡によって染色などを施すことなく容易に検出することができる。摂食前では腹側正中線上には分化した神経細胞の核(矢頭)しか観察されないが、摂食後 8 時間では神経前駆細胞の核(矢印)も観察される。

(a)



(b)

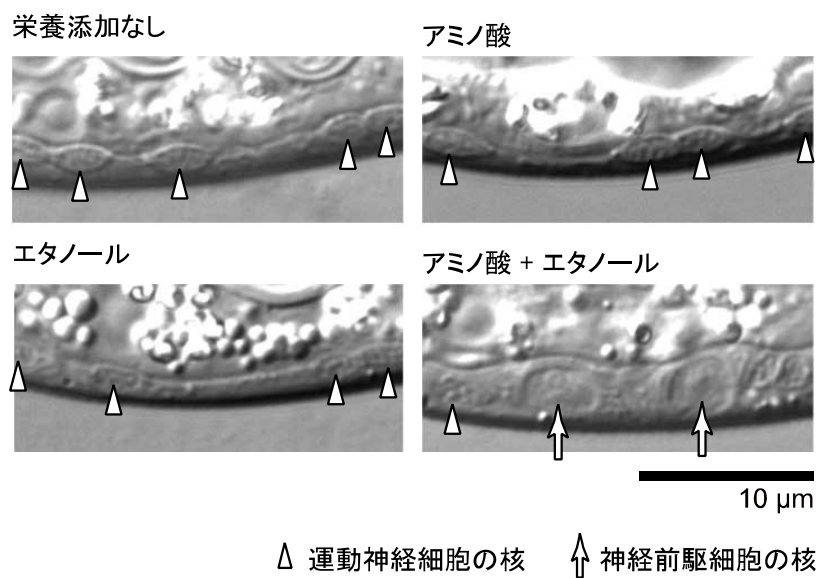


図 3 アミノ酸とエタノールは協調的に神経前駆細胞を活性化する

- (a) 栄養を投与していない群やエタノールのみを投与した群、アミノ酸のみを投与した群では培養 3 日目で神経前駆細胞の活性化した個体が存在しなかったのに対し、両者を投与した群ではおよそ 70%の個体で神経前駆細胞が活性化していた。
- (b) 各条件で培養した線虫の腹側正中線上の細胞を微分干渉顕微鏡で観察した。運動神経細胞の核(矢頭)はいずれの群でも観察されているが、アミノ酸とエタノールの両方を投与した群では神経前駆細胞の核(矢印)が観察された。

どちらの図においても、エタノールの濃度は 10 mM を用いている。

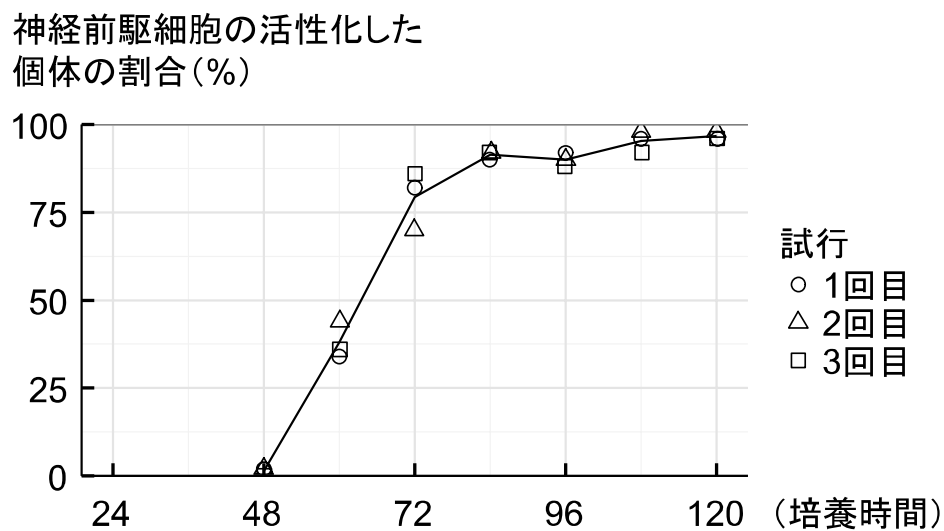


図 4 アミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞活性化の時間依存性

アミノ酸とエタノールを投与した後に 48 時間後から 12 時間ごとに神経前駆細胞の活性化した個体の割合を測定した。48 時間後では活性化はほとんど見られないが、60 時間後には約 35%、72 時間後には約 80%と、2 日後から 3 日後の間に多くの個体で神経前駆細胞が活性化し、120 時間後、すなわち 5 日後にはほぼすべての個体で神経前駆細胞の活性化が見られた。エタノールの濃度は 10 mM を用いている。

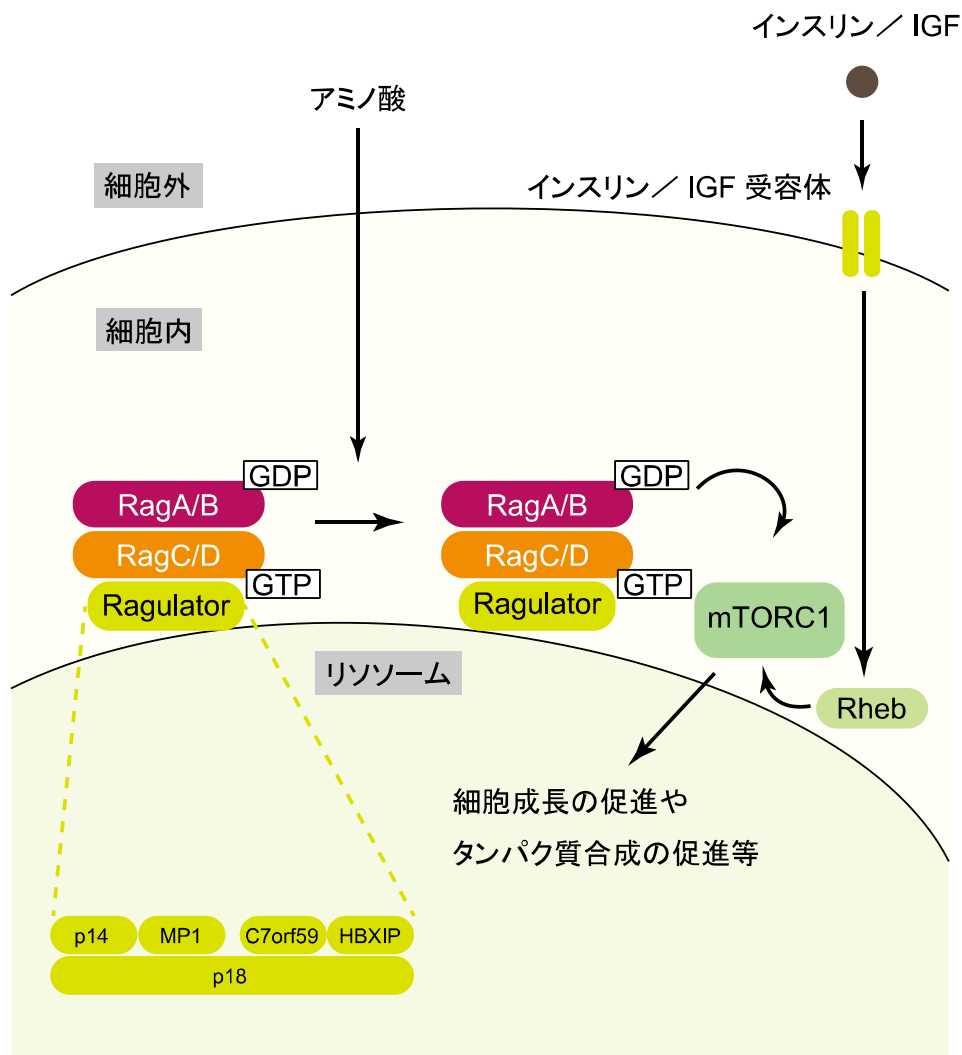


図 5 アミノ酸による Rag の活性化と Ragulator

アミノ酸による G タンパク質 Rag の活性化について提唱されているモデル。アミノ酸はタンパク質キナーゼ複合体 mTORC1 を活性化することが知られており、Rag とよばれる G タンパク質の活性を介している。Rag は哺乳類では RagA と Rag、RagC と RagD という 2 つのサブタイプが存在し、両者の間でヘテロ二量体を形成するが、アミノ酸に応答して RagA/B が GTP 結合型、RagC/D が GDP 結合型になることで活性化すると考えられている。Rag は Ragulator と呼ばれる複合体によってリソソーム膜上に係留されていることが知られている。Ragulator は現在 p18 と p14、MP1、C7orf59、HBXIP の 5 つを構成因子にもつと考えられている。なお、本図は(Bar-Peled et al., 2012; Sancak et al., 2010)に基づいて作成した。

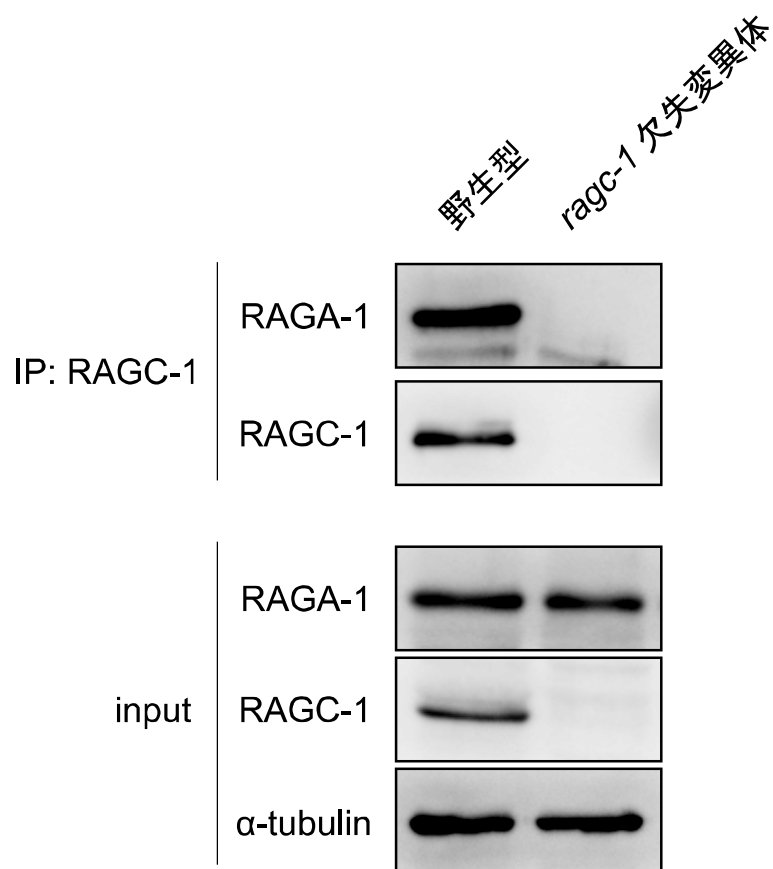


図 6 RagA/B と RagC/D の線虫オルソログの間で物理的な相互作用が見られる

免疫沈降法によって線虫の内在の RAGA-1 と RAGC-1 が結合するか調べた。野生型の線虫のタンパク質抽出液からは抗 RAGC-1 抗体で RAGA-1 を共沈させることができるが、*ragc-1* 欠失変異体では RAGA-1 の発現量は低下していないに関わらず、RAGC-1 と共沈した RAGA-1 は検出できなかった。すなわち線虫においても Rag の各サブタイプ同士で結合する。

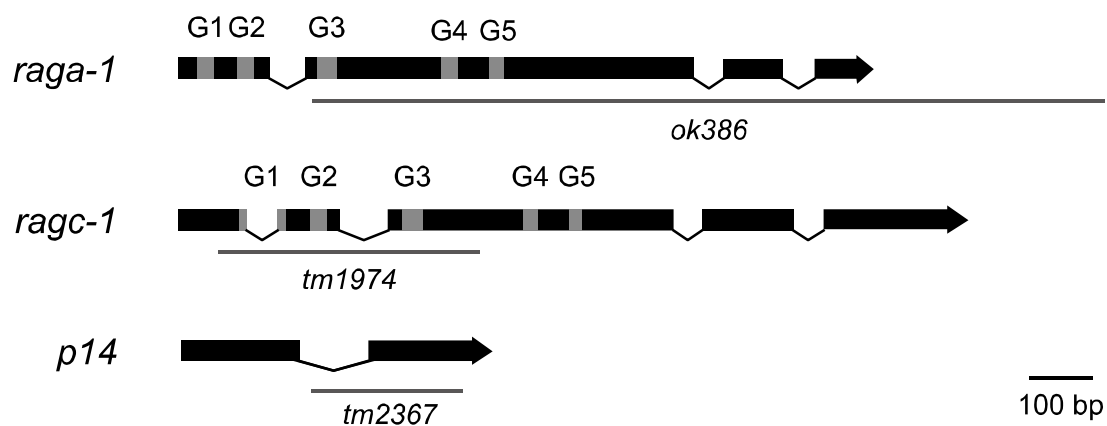


図 7 本研究で用いた Rag と p14 の欠失変異

ゲノム上における *raga-1* と *ragc-1*、そして *p14* の欠失変異(それぞれ、*ok386*, *tm1974*, *tm2367*)の位置を示した。エキソンは黒で、イントロンはエキソンどうしをつなぐ線で、エキソンの最も 3'側は矢印状にして示した。欠失部位は黒の直線で示している。いずれの変異も遺伝子を大きく欠失していることが分かる。*raga-1* と *ragc-1* において灰色で示し、G1 から G5 まで番号を振った領域は、G タンパク質が GTP と結合するのに必要なモチーフ ((Bourne et al., 1991) に基いて領域を決めた) である。G5 についてはコンセンサス配列と異なるアミノ酸残基が多く、実際に GTP との結合に関与しているかは不明である。

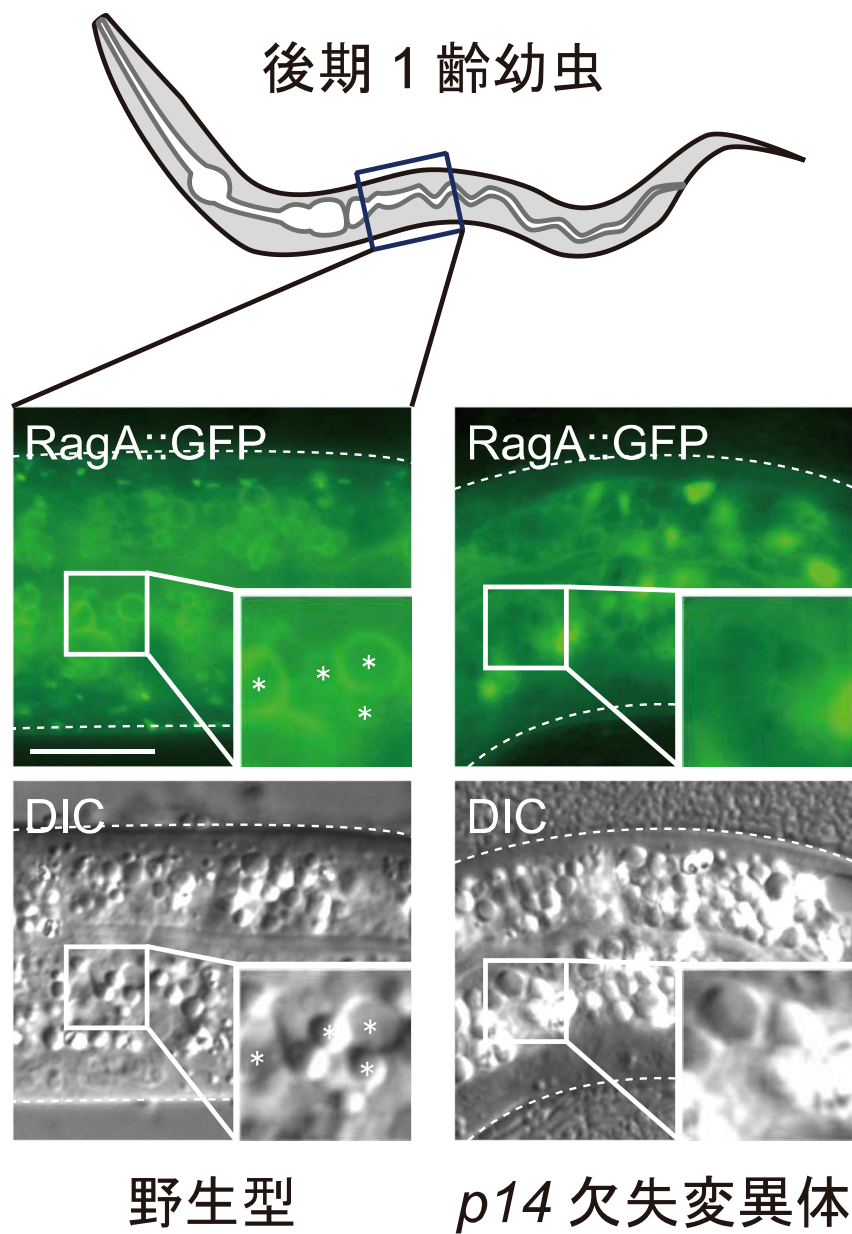


図 8 RagA は小胞状の構造物に局在し、*p14* の欠失によってこの局在が消失する

GFP を *raga-1* の遺伝子座にノックインした野生型株と、これを *p14* 欠失変異体と掛け合わせて作出した株の観察を行った。野生型では一部の GFP が腸細胞の内部で小胞状に局在していることを認めた（*印）。しかし *p14* 欠失変異体ではこのような局在は見られず、細胞質に散在する様子が観察された。点線は体側の輪郭を表している。Scale bar; 10 μ m。

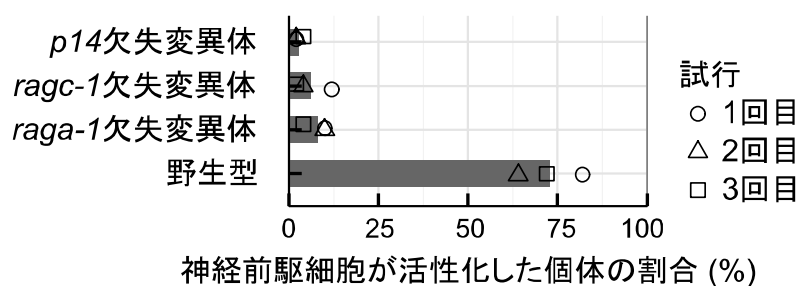


図9 Ragおよびp14の欠失変異体ではアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化が著しく減弱する

野生型および *raga-1* や *ragc-1*、*p14* の各欠失変異体にアミノ酸とエタノールを投与して3日間培養した。野生型に比べていずれの欠失変異体も神経前駆細胞の活性化した個体の割合が著しく減少した。ただし、一部の個体については神経前駆細胞の活性化が観察され、完全には抑制されない。エタノールの濃度は10 mMを用いている。

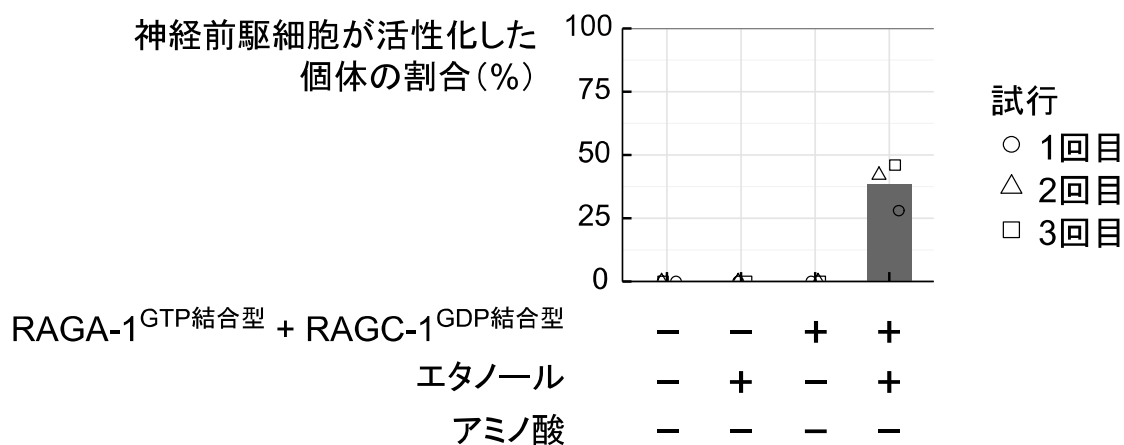


図 10 恒常活性化型の Rag を発現させるとエタノールのみで神経前駆細胞の活性化が起きる

RAGA-1 Q63L と RAGC-1 T40N の遺伝子を染色体外アレイ(形質転換により導入した DNA が直列に多数つながったもの)を持つ個体から卵を取り出して 2 つに分け、栄養分子を投与しない群とエタノールのみを投与する群にして 3 日間培養した。染色体外アレイは一定の確率でしか次世代に伝播されないため、同一親から染色体外アレイを持つものと、持たないものが生まれる。そこで RAGA-1 Q63L に融合させてある GFP によって染色体外アレイを持った個体と持たない個体とを分類し、それぞれについて計数した。各群につき 2 種類を分けて計数したので計 4 群について計数した。その結果、RAGA-1 Q63L と RAGC-1 T40N を含む染色体外アレイを持ち、エタノールを投与した群でのみ、神経前駆細胞の活性化が確認できた。エタノールの濃度は 10 mM を用いている。

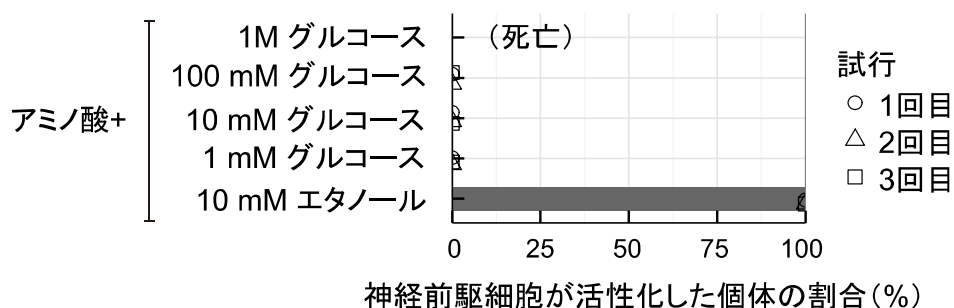
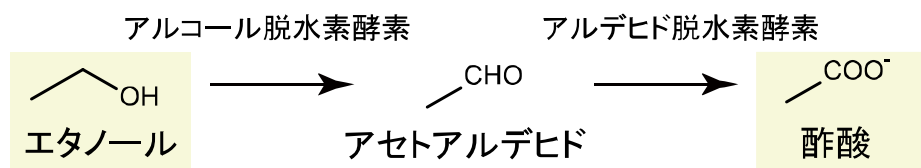


図 11 グルコースはアミノ酸の存在化でも神経前駆細胞を活性化しない

アミノ酸の存在条件下で、グルコースを 1 mM、10 mM、100 mM、1M と各濃度になるように加えたところ、すべての個体で神経前駆細胞の活性化が見られた培養 5 日目の時点でも、神経前駆細胞が活性化した個体は認められなかった。なお、1M のグルコースを投与した群では高浸透圧など何らかの理由でほとんどが孵化前に死亡していた。一部孵化していた個体についてもやはり死亡していた。

(a)



(b)

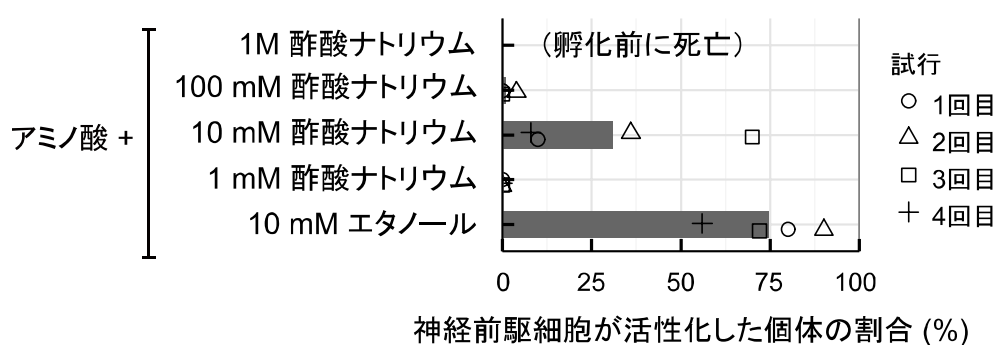


図 12 アミノ酸と酢酸の投与は神経前駆細胞を活性化させる

- (a) エタノールはアルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素の触媒作用により、酢酸に酸化される。
- (b) エタノールから合成されうる代謝産物である酢酸の塩をアミノ酸とともに投与した。10 mM の酢酸ナトリウムとアミノ酸を投与した群で神経前駆細胞の活性化が認められた。100 mM の酢酸ナトリウムとアミノ酸を投与した群においても、神経前駆細胞の活性化が認められた個体も存在しているが(試行 2 回目)、その割合は 4 %と非常に低かった。

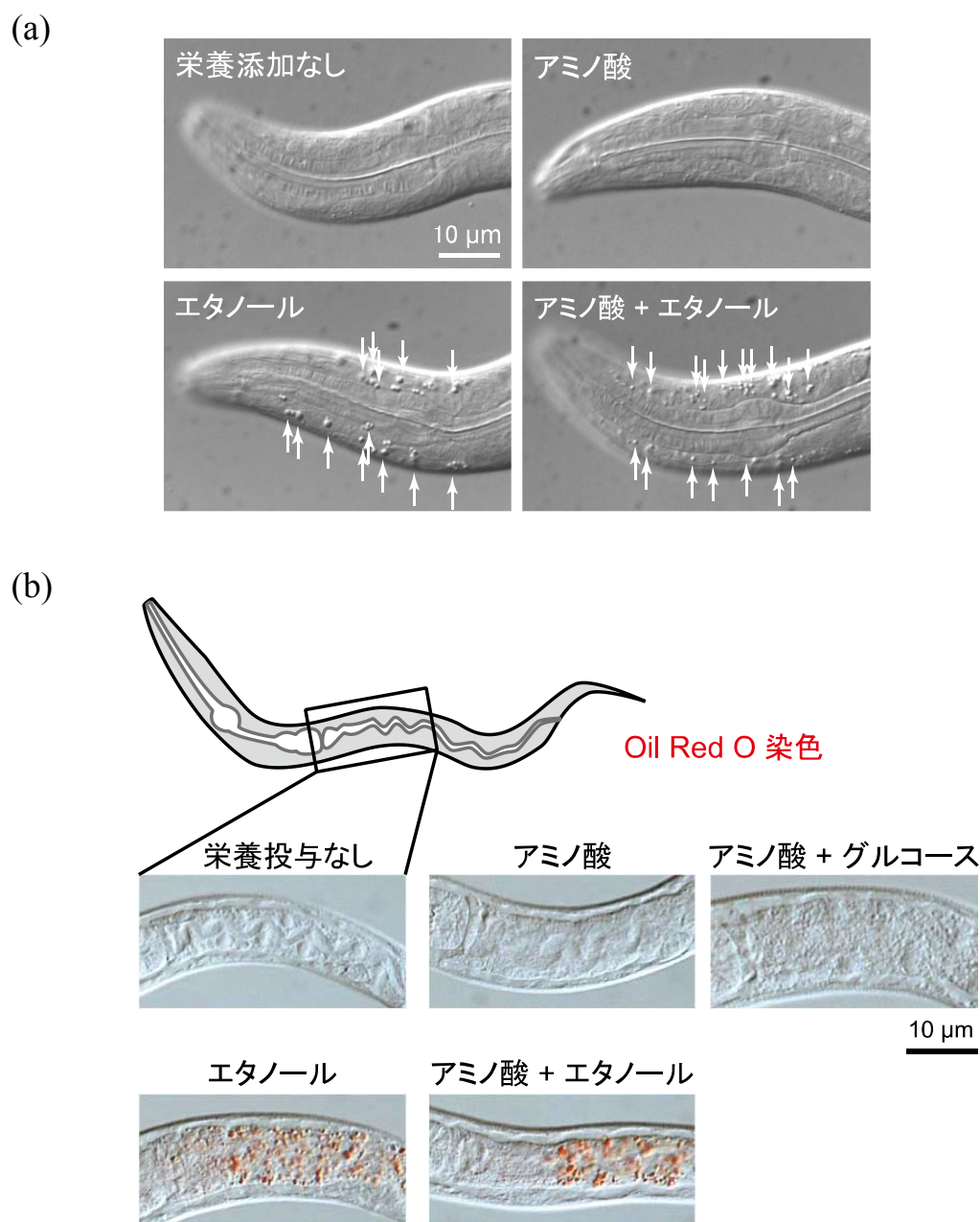
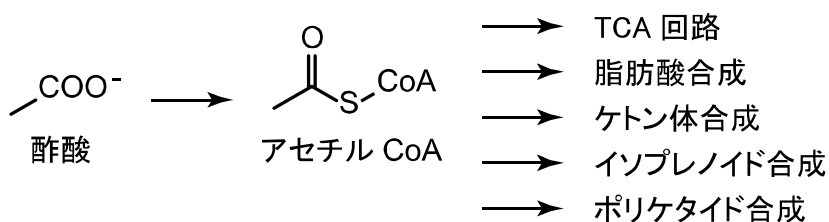


図 13 エタノールを投与した線虫には多数の脂肪滴が形成されている

- (a) アミノ酸やエタノールを投与した時の線虫の頭部を微分干渉顕微鏡で観察した。エタノールのみ、またはアミノ酸とエタノールを投与した群でのみ矢印で示すような顆粒状の構造物が確認できた。培養 3 日目の個体。
- (b) 神経前駆細胞の活性化が開始される培養 2 日目の線虫の脂肪滴を Oil Red O で染色した。エタノールのみ、またはアミノ酸とエタノールを投与した群でのみ脂肪滴が観察され、栄養投与なしやアミノ酸のみの投与、アミノ酸とグルコースの投与の条件では脂肪滴は蓄積しない。なお、用いたエタノールとグルコースの濃度はいずれも 10 mM である。

(a)



(b)

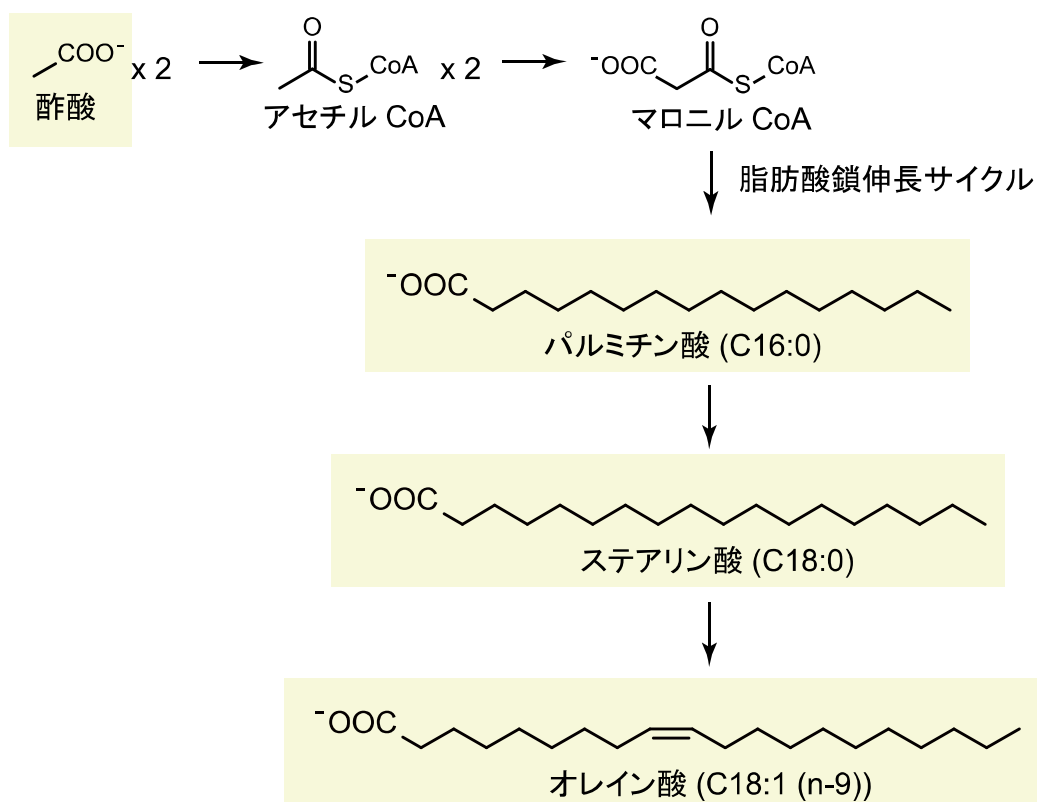


図 14 アセチル CoA の代謝運命と脂肪酸合成

- (a) 酢酸の代謝運命。酢酸は補酵素 A (CoA) とチオエステルを形成することでアセチル CoA となる。アセチル CoA は酸化されてエネルギーを生成したり、二次代謝産物の前駆体として利用されたりする。すなわち、TCA (tricarboxylic acid) 回路で酸化される運命や、脂肪酸やケトン体、イソプレノイド、ポリケタイドを合成する運命などが存在する。
- (b) 酢酸からの脂肪酸合成の過程。マロニル CoA へ変換され、脂肪酸鎖伸長サイクルを経てパルミチン酸となる。さらに 2 分子の伸長を受けてステアリン酸、不飽和化を受けてオレイン酸へと変換される。

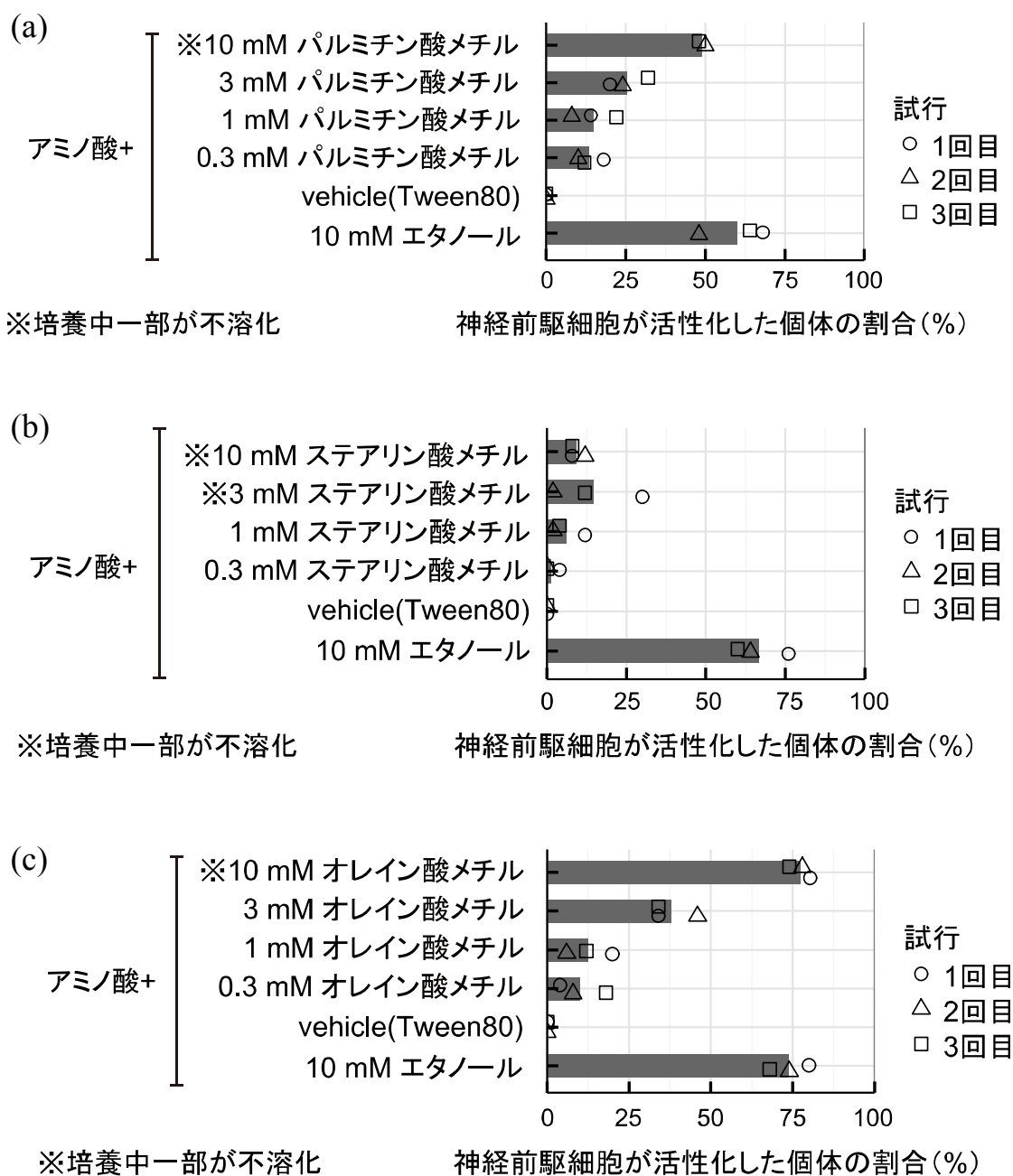


図 15 パルミチン酸メチルまたはステアリン酸メチルをアミノ酸と同時に投

与すると神経前駆細胞を活性化できる

アミノ酸とともに、様々な濃度の(a) パルミチン酸メチルや、(b) ステアリン酸メチル、(c)オレイン酸メチルをアミノ酸とともに投与したところ、培養 3 日目の時点でどちらも神経前駆細胞を活性化していた。アミノ酸と 10 mM のオレイン酸メチルを投与した群ではアミノ酸と 10 mM のエタノールを投与した群と同程度に神経前駆細胞の活性化が起きた。

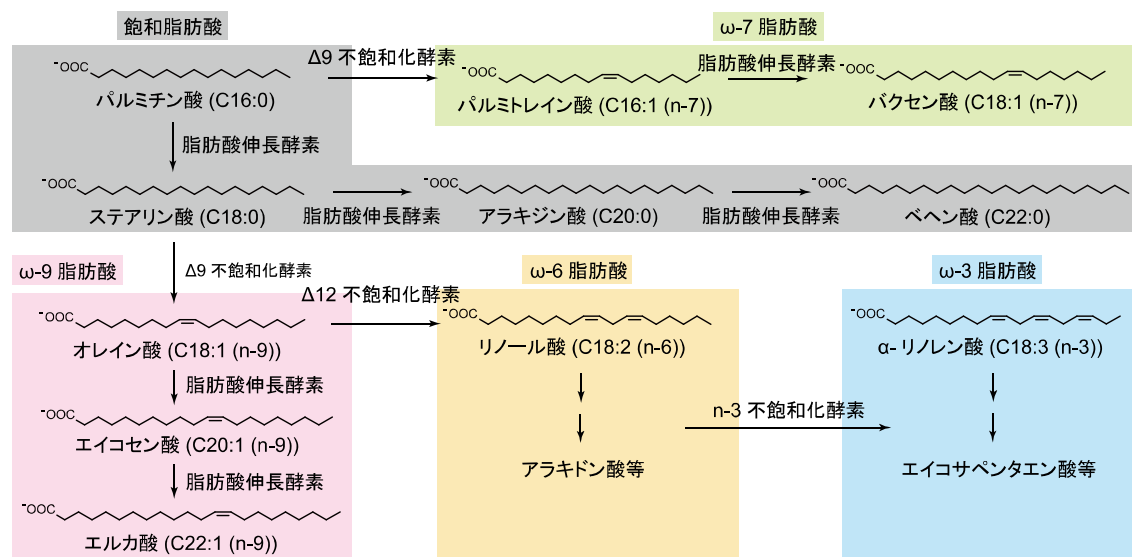


図 16 各種の脂肪酸の合成経路

パルミチン酸から各種の脂肪酸が合成される過程。伸長反応のみで合成される飽和脂肪酸以外は不飽和脂肪酸であり、メチル末端側から何番目の炭素-炭素結合にはじめて二重結合が現れるかで、ω-7 脂肪酸、ω-9 脂肪酸、ω-6 脂肪酸、ω-3 脂肪酸と分類される。なお、この図は (Kahn-Kirby et al., 2004; Shmookler Reis et al., 2011; Watts, 2009) に基いて作成した。

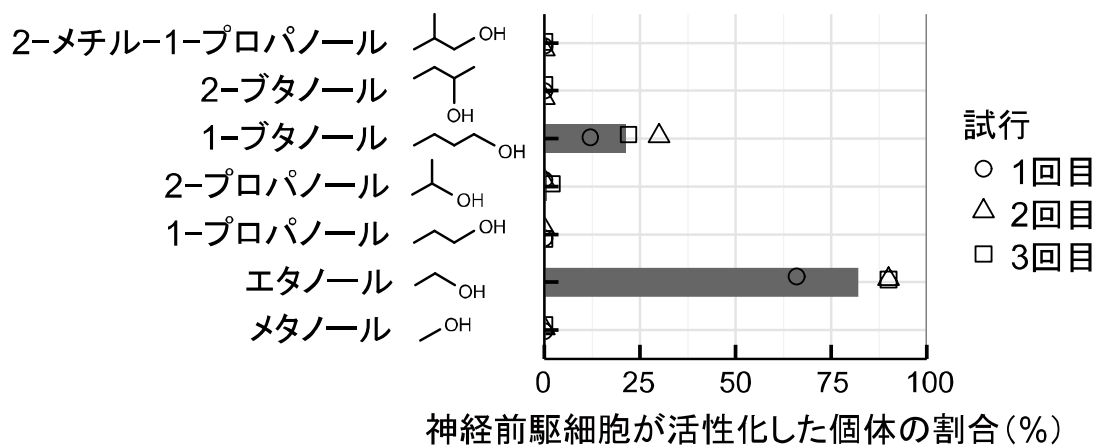


図 17 アミノ酸存在下での神経前駆細胞活性化に対する低級アルコール

の効果

様々な低級アルコールを 10 mM の濃度でアミノ酸とともに投与したところ、エタノールと 1-ブタノールのみ神経前駆細胞を活性化することができた。ただし 1-ブタノールによる活性化はエタノールに比べて効率が悪かった。なお、アルコール名の右には構造式を記した。

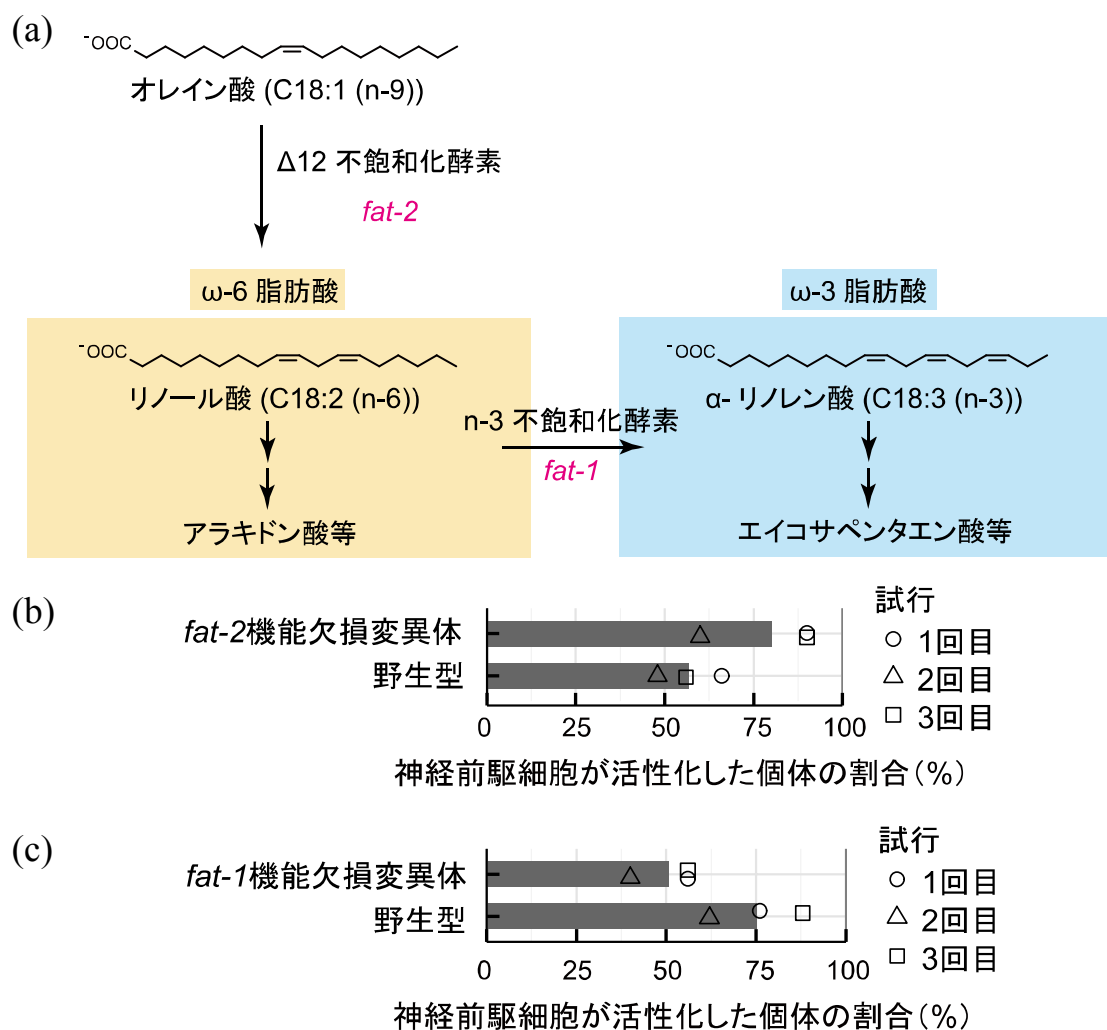


図 18 オレイン酸をリノール酸へ変換する $\Delta 12$ 不飽和化酵素 *fat-2* の機能

欠損はアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化を抑制しない

多価不飽和脂肪酸の関与を調べた。(a) オレイン酸からの多価不飽和脂肪酸の生合成経路。 $\Delta 12$ 不飽和化酵素(線虫オルソログは *fat-2*)を経て ω -6 脂肪酸のリノール酸へと変換される。 ω -6 脂肪酸は n -3 不飽和化酵素(線虫オルソログは *fat-1*)によって ω -3 脂肪酸へと変換される。(b) *fat-2* の機能欠損変異体、(c) *fat-1* 機能欠損変異体のいずれも神経前駆細胞の活性化を大きく抑制することがなかった。

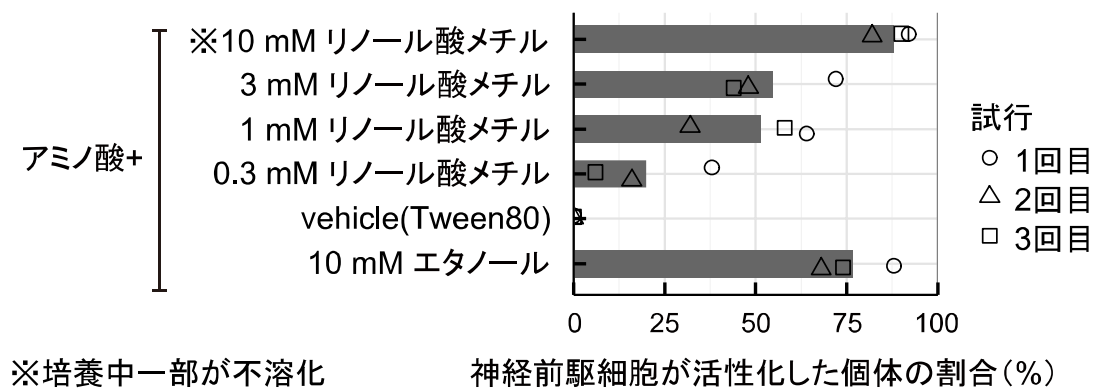


図 19 アミノ酸の存在下でリノール酸メチルは神経前駆細胞を活性化す

ることができる

アミノ酸とともに様々な濃度のリノール酸メチルを投与し、培養3日目で観察した。リノール酸メチルもオレイン酸メチルと同様、10 mM の濃度で投与したとき、エタノールと同程度かそれ以上に神経前駆細胞の活性化した個体の割合が多かった。

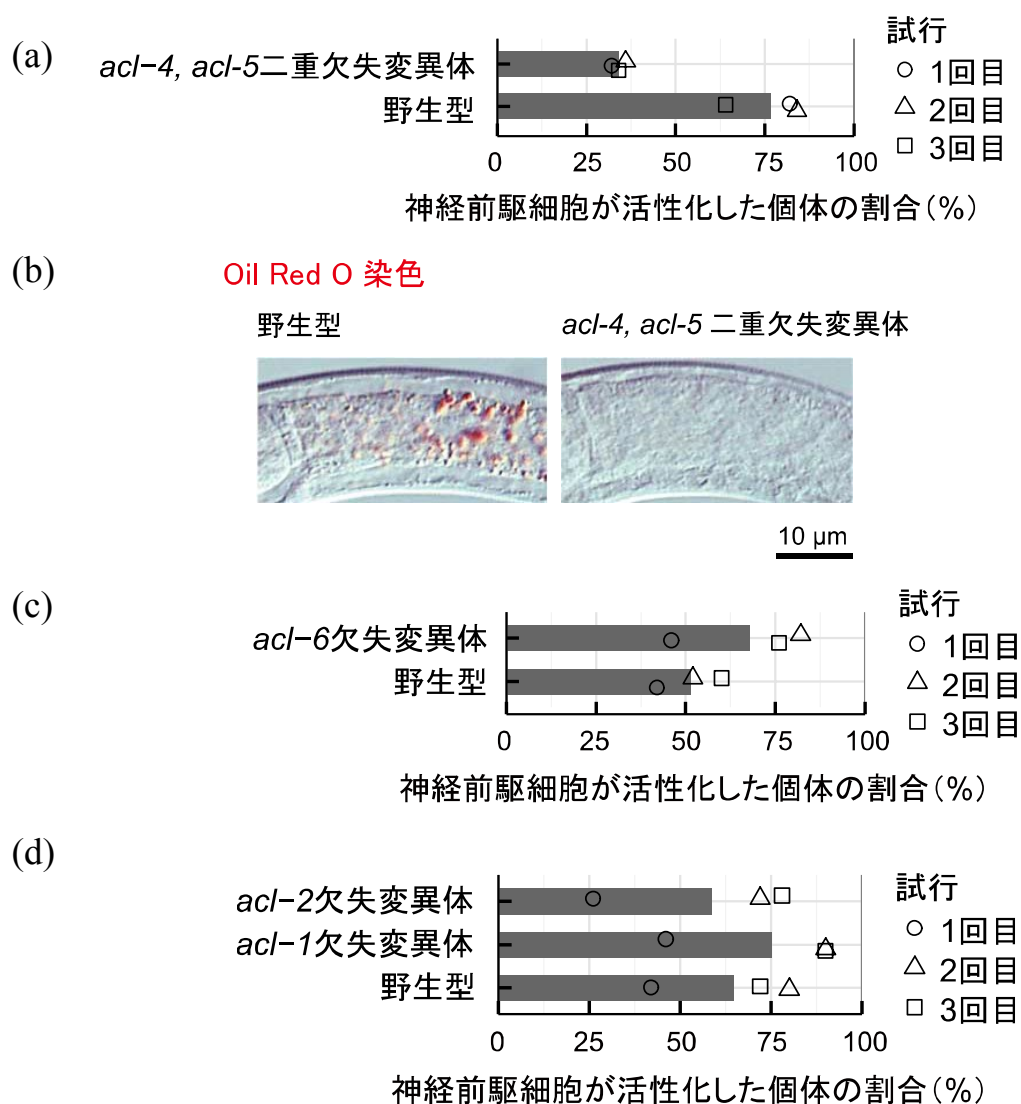


図 20 グリセロール-3-リン酸からリゾホスファチジン酸への合成阻害はアミ

ノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化を抑制する

グリセロリン脂質合成に関わる遺伝子の欠失変異体にアミノ酸とエタノールを投与して培養 3 日目に観察を行った。グリセロール-3-リン酸に GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) の作用でリゾホスファチジン酸が合成される。GPAT はミトコンドリア局在型と小胞体局在型が存在し、線虫においては *acl-4* と *acl-5* がミトコンドリア局在型、*acl-6* が小胞体局在型として知られる。リゾホスファチジン酸は LPAAT (lysophosphatidic acid acyltransferase) によってホスファチジン酸へと変換される。LPAAT の線虫オルソログとして *acl-1* と *acl-2* が知られている。(a) *acl-4, acl-5* 二重欠失変異体は野生型に比べて神経前駆細胞の活性化した個体の割合が減少した。(b) *acl-4, acl-5* 二重欠失変異体の脂肪滴を培養 2 日目で染色すると脂肪滴の蓄積していない。一方で(c) *acl-6* 欠失変異体(d) *acl-1* 欠失変異体や *acl-2* 欠失変異体では同様の減少が見られなかった。

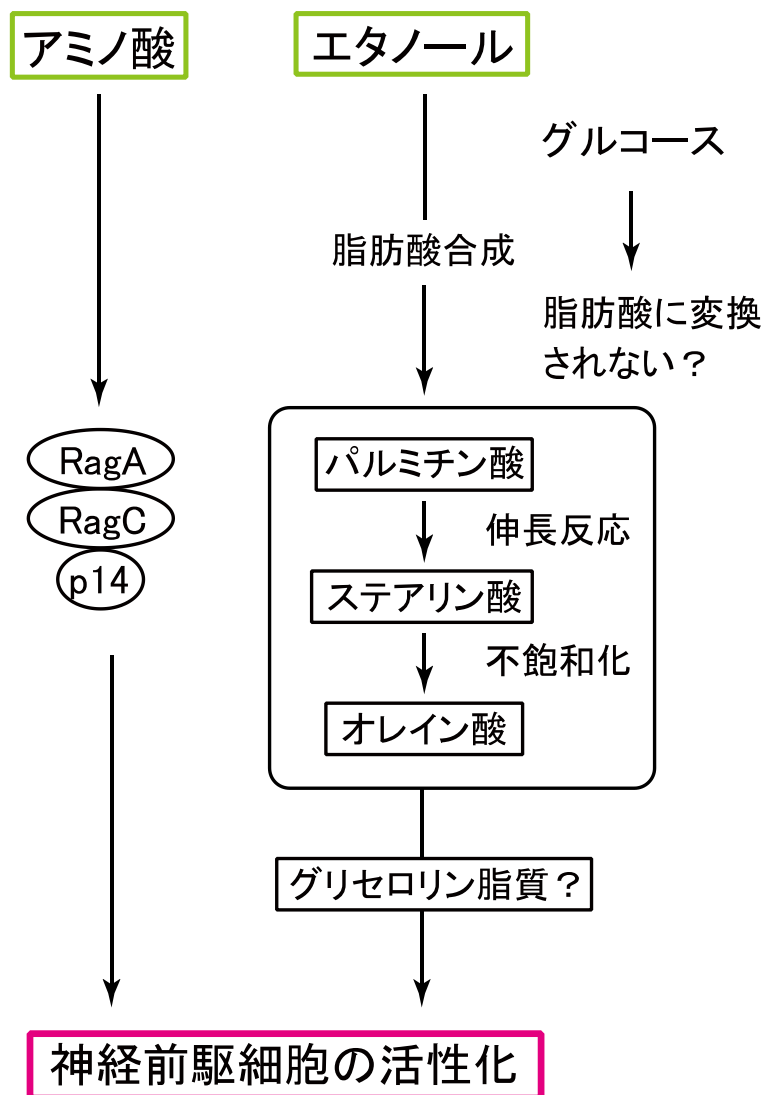


図 21 本研究のまとめと想定されるモデル

本研究ではアミノ酸とエタノールが協調的に線虫の神経前駆細胞を活性化するという現象をもとに、アミノ酸の作用がアミノ酸シグナルに介在する G タンパク質 Rag の機能で説明できることを示し、エタノールの作用がその代謝産物である酢酸や脂肪酸でも代替できることを見出した。また、エタノールの作用はグルコースでは代替できないが、原因の一つとして、エタノールとグルコースでは異なる代謝運命を受けるためにグルコースが脂肪酸合成に利用されないことが考えられる。さらに、グリセロリン脂質の合成を阻害するとアミノ酸とエタノールによる神経前駆細胞の活性化を抑制し、このとき脂肪滴の量が減少していたため、エタノールからは脂肪酸が合成され、一部がグリセロリン脂質に変換されて神経前駆細胞に作用している可能性が考えられる。

6. 参考文献

- Åberg, M.A.I., Åberg, N.D., Palmer, T.D., Alborn, A.M., Carlsson-Skewir, C., Bang, P., Rosengren, L.E., Olsson, T., Gage, F.H., Eriksson, P.S., 2003. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 23–40.
- Arsenijevic, Y., Weiss, S., Schneider, B., Aebischer, P., 2001. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J. Neurosci.* 21, 7194–7202.
- Athenstaedt, K., Daum, G., 1999. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.* 266, 1–16.
- Bar-Peled, L., Schweitzer, L.D., Zoncu, R., Sabatini, D.M., 2012. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150, 1196–1208.
- Berger, J., Moller, D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409–435.
- Berridge, M.J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315–325.
- Blouin, M.J., Zhao, Y., Zakikhani, M., Algire, C., Piura, E., Pollak, M., 2010. Loss of function of PTEN alters the relationship between glucose concentration and cell proliferation, increases glycolysis, and sensitizes cells to 2-deoxyglucose. *Cancer Lett.* 289, 246–253.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Brooker, G.J., Kalloniatis, M., Russo, V.C., Murphy, M., Werther, G.A., Bartlett, P.F., 2000. Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J. Neurosci. Res.* 59, 332–341.
- Calder, P.C., 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1505S–1519S.
- Castro, P. V, Khare, S., Young, B.D., Clarke, S.G., 2012. *Caenorhabditis elegans* battling starvation stress: Low levels of ethanol prolong lifespan in L1 Larvae. *PLoS One* 7, e29984.
- Chell, J.M., Brand, A.H., 2010. Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell* 143, 1161–1173.
- Cheung, T.H., Rando, T. a, 2013. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 329–40.
- Coleman, R. a., Lee, D.P., 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43, 134–176.
- Dickinson, D.J., Ward, J.D., Reiner, D.J., Goldstein, B., 2013. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat. Methods* 10, 1028–34.
- Drago, J., Murphy, M., Carroll, S.M., Harvey, R.P., Bartlett, P.F., 1991. Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2199–2203.
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., Chen, J., 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942–1945.
- Fedor, D., Kelley, D.S., 2009. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 12, 138–46.

- Findlay, G.M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V., Lamb, R.F., 2007. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem. J.* 20, 13–20.
- Foster, D. a., 2007. Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res.* 67, 1–4.
- Foster, D. a., 2013. Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 272–278.
- Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., Colaiácovo, M.P., Church, G.M., Calarco, J. a, 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods* 10, 741–3.
- Fukuyama, M., Rougvie, A.E., Rothman, J.H., 2006. *C. elegans* DAF-18/PTEN Mediates Nutrient-Dependent Arrest of Cell Cycle and Growth in the Germline. *Curr. Biol.* 16, 773–779.
- Fukuyama, M., Sakuma, K., Park, R., Kasuga, H., Nagaya, R., Atsumi, Y., Shimomura, Y., Takahashi, S., Kajiho, H., Rougvie, A., Kontani, K., Katada, T., 2012. *C. elegans* AMPKs promote survival and arrest germline development during nutrient stress. *Biol. Open* 1, 929–36.
- Garcia-Cao, I., Song, M.S., Hobbs, R.M., Laurent, G., Giorgi, C., De Boer, V.C.J., Anastasiou, D., Ito, K., Sasaki, A.T., Rameh, L., Carracedo, A., Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Pinton, P., Haigis, M.C., Pandolfi, P.P., 2012. Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell* 149, 49–62.
- Gilst, M. Van, Hadjivassiliou, H., Jolly, A., Yamamoto, K., 2005. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Biol.* 3, e53.
- Graves, T.A., Farley, S., Goldstein, M.I., Servheen, C., 2007. Identification of functional corridors with movement characteristics of brown bears on the Kenai Peninsula, Alaska. *Landsc. Ecol.* 22, 765–772.
- Gulati, P., Gaspers, L.D., Dann, S.G., Joaquin, M., Nobukuni, T., Natt, F., Kozma, S.C., Thomas, A.P., Thomas, G., 2008. Amino Acids Activate mTOR Complex 1 via Ca²⁺/CaM Signaling to hVps34. *Cell Metab.* 7, 456–465.
- Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–1945.
- Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T., Terada, M., 1991. A simple and rapid method for generating a deletion by PCR. *Nucleic Acids Res.* 19, 2785.
- Inlow, D., Shauger, A., Maiorella, B., 1989. Insect cell culture and baculovirus propagation in protein-free medium. *J. Tissue Cult. Methods* 12, 13–16.
- Johnson, T.E., Mitchell, D.H., Kline, S., Kemal, R., Foy, J., 1984. Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 28, 23–40.
- Kahn-Kirby, A.H., Dantzker, J.L.M., Apicella, A.J., Schafer, W.R., Browse, J., Bargmann, C.I., Watts, J.L., 2004. Specific polyunsaturated fatty acids drive TRPV-dependent sensory signaling in vivo. *Cell* 119, 889–900.
- Kasuga, H., Fukuyama, M., Kitazawa, A., Kontani, K., Katada, T., 2013. The microRNA miR-235 couples blast-cell quiescence to the nutritional state. *Nature* 497, 503–6.
- Khatri, S., Yepiskoposyan, H., Gallo, C.A., Tandon, P., Plas, D.R., 2010. FOXO3a regulates glycolysis via transcriptional control of tumor suppressor TSC1. *J. Biol. Chem.* 285, 15960–15965.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., Guan, K.-L., 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10, 935–45.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a

- growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Laplante, M., Sabatini, D.D.M., 2012. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274–293.
- Lee, R.Y.N., Hench, J., Ruvkun, G., 2001. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Curr. Biol.* 11, 1950–1957.
- Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., Ambros, V., 1991. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* 10, 3959–3970.
- Mihaylova, V.T., Borland, C.Z., Manjarrez, L., Stern, M.J., Sun, H., 1999. The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7427–32.
- Moolenaar, W.H., Van Meeteren, L.A., Giepmans, B.N.G., 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26, 870–881.
- Naka, K., Hoshii, T., Muraguchi, T., Tadokoro, Y., Ooshio, T., Kondo, Y., Nakao, S., Motoyama, N., Hirao, A., 2010. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 463, 676–680.
- Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S.G., Kim, S.Y., Gulati, P., Byfield, M.P., Backer, J.M., Natt, F., Bos, J.L., Zwartkruis, F.J.T., Thomas, G., 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14238–14243.
- Ohba, Y., Sakuragi, T., Kage-Nakadai, E., Tomioka, N.H., Kono, N., Imae, R., Inoue, A., Aoki, J., Ishihara, N., Inoue, T., Mitani, S., Arai, H., 2013. Mitochondria-type GPAT is required for mitochondrial fusion. *EMBO J.* 32, 1265–79.
- Okudaira, S., Yukiura, H., Aoki, J., 2010. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92, 698–706.
- Resh, M.D., 1999. Fatty acylation of proteins: New insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1451, 1–16.
- Sakayori, N., Kimura, R., Osumi, N., 2013. Impact of lipid nutrition on neural stem/progenitor cells. *Stem Cells Int.* 2013, 973508.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., Sabatini, D.M., 2010. Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290–303.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R. a, Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., Sabatini, D.M., 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.
- Schreiber, M., Pierce-Shimomura, J., Chan, S., 2010. Manipulation of behavioral decline in *Caenorhabditis elegans* with the Rag GTPase raga-1. *PLoS Genet.* 6, e1000972.
- Shim, J., Gururaja-Rao, S., Banerjee, U., 2013. Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development* 140, 4647–56.
- Shmookler Reis, R.J., Xu, L., Lee, H., Chae, M., Thaden, J.J., Bharill, P., Tazearslan, C., Siegel, E., Alla, R., Zimniak, P., Ayyadevara, S., 2011. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging (Albany. NY).* 3, 125–147.

- Simopoulos, A.P., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 495–505.
- Soukas, A.A., Kane, E.A.E., Carr, C.E.C., Melo, J.A., Ruvkun, G., 2009. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes ...* 23, 496–511.
- Sousa-Nunes, R., Yee, L.L., Gould, A.P., 2011. Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature* 471, 508–512.
- Szewczyk, N.J., Kozak, E., Conley, C.A., 2003. Chemically defined medium and *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biotechnol.* 3, 19.
- Van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T., Moolenaar, W.H., 1989. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 59, 45–54.
- Watts, J.L., 2009. Fat synthesis and adiposity regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 58–65.
- Watts, J.L., Browse, J., 2002. Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5854–5859.
- Wendel, A. a., Lewin, T.M., Coleman, R. a., 2009. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 501–506.
- White, P.J., Arita, M., Taguchi, R., Kang, J.X., Marette, A., 2010. Transgenic restoration of long-chain n-3 fatty acids in insulin target tissues improves resolution capacity and alleviates obesity-linked inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Diabetes* 59, 3066–3073.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–484.
- Yilmaz, Ö.H., Katajisto, P., Lamming, D.W., Gültekin, Y., Bauer-Rowe, K.E., Sengupta, S., Birsoy, K., Dursun, A., Yilmaz, V.O., Selig, M., Nielsen, G.P., Mino-Kenudson, M., Zukerberg, L.R., Bhan, A.K., Deshpande, V., Sabatini, D.M., 2012. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* 486, 490–5.
- Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., Morrison, S.J., 2006. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441, 475–482.
- Yuan, X., Ta, T.C., Lin, M., Evans, J.R., Dong, Y., Bolotin, E., Sherman, M.A., Forman, B.M., Sladek, F.M., 2009. Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One* 4, e5609.
- Zhang, J., Grindley, J.C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X.C., Ross, J.T., Haug, J.S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K.S., Wiedemann, L.M., Wu, H., Li, L., 2006. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 441, 518–522.
- Zhang, P., Na, H., Liu, Z., Zhang, S., Xue, P., Chen, Y., Pu, J., Peng, G., Huang, X., Yang, F., Xie, Z., Xu, T., Xu, P., Ou, G., Zhang, S.O., Liu, P., 2012. Proteomic Study and Marker Protein Identification of *Caenorhabditis elegans* Lipid Droplets. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 317–328.
- Zhu, G., Chen, H., Wu, X., Zhou, Y., Lu, J., Chen, H., Deng, J., 2008. A modified n-3 fatty acid desaturase gene from *Caenorhabditis briggsae* produced high proportion of DHA and DPA in transgenic mice. *Transgenic Res.* 17, 717–725.

Zhu, H., Shen, H., Sewell, A.K., Kniazeva, M., Han, M., 2013. A novel sphingolipid-TORC1 pathway critically promotes postembryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 2:e00429.

7. 謝辞

学部生のときから数えて 6 年間、素晴らしい研究環境を与えてくださった堅田利明教授に心より御礼申し上げます。お忙しい中様々なご指導をいただき、多くのことを学ぶことができたおかげで、実りの多い 6 年間となりました。

同じ研究グループにて直接のご指導をいただきました福山征光助教には、実験手法、考え方、ミーティングでの議論、相談など様々な場面で本当に多くのことを教わりました。研究生活で最も身近にいてくださり、おかげ様で楽しく研究を進めることができました。そして今この博士論文を書き上げるに至り、書き尽くせないほどの感謝をしております。

紺谷准教授、齋藤助教にはいつも新しい視点からのご指摘をいただき、また様々な実験手法を教えていただいたことでたいへん多くのことを学ばせていただきました。

学術専門支援職員の宇賀英子さん、秘書の高橋恵子さんには円滑に研究を進める上でのご援助をいただき、本当にありがとうございました。

研究やそれ以外の場では、先輩、同期、後輩の皆様のおかげで有意義な毎日を過ごすことができました。本当にありがとうございました。特に同じ研究グループの皆様には卒業生を含めて、様々な議論やご意見をいただき感謝しております。

本研究における研究資材の提供については、線虫変異体の株を提供してくださった東京女子医科大学の三谷昌平先生およびナショナルバイオリソースプロジェクト「実験動物 線虫」、同じく線虫の株を提供してくださった *Caenorhabditis Genetics Center*、東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室の新井洋由先生に御礼申し上げます。

さらに研究生生活を裏から支えてくれた家族、また、この場には書ききれなかった友人、その他の方々のおかげで研究生生活やそれ以外にも充実したものとなりました。

これまで学んだことを活かし、今後の新たな場で活躍したいと考えております。また、私自身が支える側になれるよう、精進したいと思います。

平成 27 年 1 月 9 日