【解説】

線虫C. エレガンスの休眠・寿命を制御するインスリン様ペプチド インスリン様分子の新たな生理機能

河野 強

「休眠」は多くの生物種における優れた生存戦略の一つである。モデル生物・線虫 *C. elegans* は生育環境の悪化にตอบสนองして幼虫時に生育を停止し、休眠ステージに入る。これまでの研究から、① *C. elegans* の休眠制御にはインスリン様シグナルが関与すること、② 40 種存在すると推定されるインスリン様ペプチドのうち一部のペプチドがインスリン様シグナルの亢進・抑制を行うこと、③ インスリン様シグナルは寿命制御にも関与すること、④ インスリン様シグナルによる寿命制御は哺乳動物にも共通であること、などが明らかとなった。本稿では *C. elegans* の休眠・寿命を制御するインスリン様ペプチドを中心として、それらの構造と機能などについて概説する。

線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド研究の背景

線虫 *C. elegans* の「休眠」に関する研究は、1975年に Ressel らによる休眠幼虫（耐久型の第3期幼虫であり耐性幼虫と呼ぶ）の発見に端を発する⁽¹⁾。その後、Riddle・Albert らによる変異株の作出とエピスタシス解析

Insulin-Like Peptides Regulating Diapause and Lifespan of the Nematode *Caenorhabditis elegans*: New Physiological Functions of Insulin-Like Molecules
Tsuyoshi KAWANO, 鳥取大学農学部

などの遺伝学的手法を用いた研究に進展した⁽²⁾。このうち、温度感受性変異株 *daf-2* (dauer formation abnormal-2) は1齢ならびに2齢幼虫時に制限温度下 (25°C) に置かれると構成的に耐性幼虫となる (dauer larva formation)。1993年に Kenyon らは、この *daf-2* 変異体の成虫寿命は野生株の約2倍であることを報告した⁽³⁾。そして、1997年に木村・Ruvkun らによって *daf-2* 遺伝子の正体が明らかにされた。この遺伝子はインスリン受容体様タンパクをコードしていたのである⁽⁴⁾。この発見を契機にインスリン様ペプチド遺伝子の探索が過熱した。なお、1998年に解明されたゲノム配列上ではインスリン受容体様タンパクをコードする遺伝子は *daf-2* のみである⁽⁵⁾。休眠・寿命制御機構ならびに細胞内情報伝達の詳細に関しては、成書に譲る⁽⁶⁻⁸⁾ (図1)。

線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチド遺伝子の 発見と推定ペプチド構造

インスリン様ペプチドとはインスリンと構造上類似するペプチドの総称であり、必ずしも生理機能を同じくするものではない。したがって、インスリン特有の3対のジスルフィド結合を有するものであればインスリン様ペ

◇◇◇ コ ラ ム ◇◇◇

生物にとって「種の保存」は最も重要な課題の一つです。環境変化に適応できずに絶滅した種も多数に上り（自然淘汰）、また、人為的に絶滅に追い込まれた（る）種も後を絶ちません。ある種の生物は「休眠」によって種の保存を図ります。休眠とは生育環境に応答して一時的に発生・生育を停止する現象であり、最も優れた生存戦略の一つです。植物ですと種子・球根・芽の状態で休眠します。乾燥時のクマシの休眠やカイコの休眠卵は通好みですね。哺乳類の「冬眠」も休眠の一種と定義づけることができます。生物は種を越えて「休眠」という戦略をとります。本稿で取り上げた線虫 *C. elegans* も生育環境の悪化に応答して休眠します。

線虫 *C. elegans* というと「アポトーシス」「RNA干渉」が頭に浮かぶ読者も多いでしょう。*C. elegans* の中でGFPを再構築して光らせた研究も有名です。これらの研究はノーベル賞対象となりました。最近では、「*C. elegans* を用いて、被験者の尿1滴で早期がんを短時間・安価・高精度に検出できる」と多くのマスコミ報道がありました。これらの華々しい研究成果の傍ら、「休眠」に関する研究も長年続けられてきま

した。「休眠がインスリン様シグナルによって制御される」との知見は特筆すべき研究成果の一つです。細かな休眠制御機構はさておき、現象面に目を落としましょう。*C. elegans* は、生育密度の上昇を察知しエサの枯渇を予見すると、幼虫時に休眠します。これは、自身の飢餓のみならず、子ども（受精卵約300個）の餓死にも備える機構と認識できます。何と子ども思いのことでしょう！ われわれ人間も見習うべきかもしれません。

C. elegans は寿命研究でも有名です。長寿変異株の詳細な解析により、1遺伝子の変異が寿命を大幅に延長させることが明らかとなりました。寿命はカロリー制限や活性酸素など多面的な要因によって支配されるとした当時の常識を覆す大発見でした。後に、寿命制御にインスリン様シグナルが関与することが明らかとなりました。さらに、マウス、ショウジョウバエなどのモデル生物でもインスリン様シグナルが寿命制御にかかわることが示されました。長寿者のSNPs解析から、インスリン様シグナルがヒトの寿命にもかかわる可能性が示唆されています。他国に先駆けて超高齢化社会を迎えたわが国では、より一層「健康寿命」に取り組むべき時期にきています。

図1 ■ 線虫 *C. elegans* の生活環とインスリン様シグナル

左図は *C. elegans* の生活環を示す。十分な餌があり適度な生育密度の場合には通常生育を行う。卵から孵化した *C. elegans* は4期の幼虫期を経て成虫となり産卵する。この間約3日である。1～2齢幼虫時に生育環境が悪化（高い生育密度・餌不足・高温）すると幼虫休眠する。生育環境が改善されると休眠を打破して4齢幼虫となり生育を続ける。休眠打破線虫と非休眠線虫の成虫寿命は変わらない。右図は *C. elegans* の休眠・寿命を制御するインスリン様シグナル経路を示す。動物種間でよく保存されている。*C. elegans* にはシグナルを亢進あるいは抑制する2種のインスリン様ペプチドが存在する。シグナル下流の転写因子 DAF-16（哺乳動物 FOXO のオースログ）がリン酸化されると細胞質にとどまり、通常生育し（幼虫休眠しない）、通常の寿命を全うする。

プチドということになる。血糖値の調節に働くインスリンは、プロセッシング（3対のジスルフィド結合が形成された後、C鎖が切断・除去される工程）によって生じる2本のポリペプチド（B鎖、A鎖）がA鎖内に1対の、

A鎖-B鎖間に2対のジスルフィド結合を有する構造をとる。同様の構造を有するリラキシンは間接や靱帯の弛緩効果を有する。一方、インスリン様成長因子 IGF は1本鎖ポリペプチド（B、C、Aドメインからなり、Cドメイ

図2 ■ インスリン様ペプチドの推定構造と分類

線虫 *C. elegans* には40種のインスリン様ペプチドが存在すると推定される。予想されるジスルフィド結合の数・様式により Type- α 、 β 、 γ に分類される。Type- γ は哺乳動物のインスリンと同一の3対のジスルフィド結合を有する。

ンは切断・除去されない) がインスリンと同様の3対のジスルフィド結合を形成し、発生・成長・発達に関与する。インスリン様ペプチドは哺乳動物のみならず、マメ科植物、軟体動物、昆虫類など幅広い生物種に存在する。

先に述べたように *C. elegans* のゲノム解読は1998年に終了しており、約100Mbの塩基配列が明らかとなった⁽⁶⁾。多細胞生物で初のゲノム解読終了である。これを契機にポストゲノム研究が進展し、RNAi・遺伝子破壊などの逆遺伝学的手法を用いた機能解析が容易になった^(9, 10)。上述のように1997年に休眠・寿命制御にかかわる *daf-2* 遺伝子がインスリン受容体様タンパク質をコードしていることが明らかとなり⁽⁴⁾、DAF-2リガンドであるインスリン様ペプチドの探索が加速した。1998年に筆者らは、当時進行中であったゲノムプロジェクト情報を基にインスリンと同様のジスルフィド結合を有するインスリン様ペプチド Ceinsulin-1 (現在の名称は INS-18)、Ceinsulin-2 (現在の名称は INS-17) をコードする cDNA を RACE 法により同定し、*C. elegans* 研究者の同人誌 Worm Breeder's Gazette 上に公表した⁽¹¹⁾。同年、Duret らはゲノム情報より10種のインスリン様遺伝子の存在を予想し、推定ペプチドの高次構造モデルを示した。推定されたインスリン様ペプチドはジスルフィド結合様式により Type- α (3種)、Type- β (6種)、Type- γ (1種) に分類された⁽¹²⁾。このうち、Type- γ はインスリンと同一の3対のジスルフィド結合様式を有する。筆者らが発見した Ceinsulin-1、-2 も Type- γ に属する。2001年に Pierce らは37種のインスリン様遺伝子を同定し (上述の12種のインスリン様遺伝子を含む)、それらの遺伝子に *ins* 番号を付与し *ins-1* ~ *ins-37* と命名した⁽¹³⁾。現在、40種のインスリン様遺伝子が同定されているが、このうち *daf-28* のみが *ins* 番号を付与されてい

ない。これは、順遺伝学的に得られた変異株 *daf-28* が既に存在しており、原因遺伝子を特定するとインスリン様遺伝子であったことによる⁽¹⁴⁾ (図2)。

線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチドによる 休眠・寿命制御

多数のインスリン様遺伝子の存在が示唆されていたことから、当初、1遺伝子の機能抑制 (RNA 干渉)・機能破壊 (遺伝子破壊)・過剰発現では目立った表現型は得られないと考えられていた (冗長性)。筆者らは、遺伝子破壊線虫が流布していない (ナショナルバイオリソースプロジェクト (線虫) ならびに *C. elegans* Gene Knock-out Consortium が立ち上がっていない) 2000年に RNA 干渉によって Ceinsulin-1 (INS-18) が寿命制御に関与することを示した⁽¹⁵⁾。これにより、多数存在するインスリン様遺伝子の一つの機能抑制を行うことにより、冗長性を越えて生理機能の解析が可能であることが示された。以降、RNA 干渉・遺伝子破壊・過剰発現により多数のインスリン様遺伝子の休眠・寿命制御への関与が示された。最近、Fernandes de Abreu らはインスリン様遺伝子破壊線虫の休眠・寿命などの変動を網羅的に検証した⁽¹⁶⁾。これまでに示されたインスリン様ペプチドの休眠・寿命への関与を表1にまとめる。このうち、INS-1、-17、-18、-23 はインスリン様シグナルに対してアンタゴニスティックに働き、シグナルを抑制する^(13, 17~19)。しかしながら、これらのペプチドが DAF-2 受容体の拮抗的アンタゴニストなのかパーシャルアゴニストなのかは明らかにされていない。ここで、拮抗的アンタゴニストとは受容体に結合はするが、従来のリガンドとは異なり受容体を全く活性化しない分子を言う。拮抗的アンタゴニストが受容体に結合すると、従来のリガンドの受容体への結合ならびに受容体活性化を阻害する。また、パー

表1 ■ 各インスリン様ペプチドの休眠・寿命制御効果

分子種	Type	幼虫休眠誘導	幼虫休眠打破	成虫寿命延長	分子種	Type	幼虫休眠誘導	幼虫休眠打破	成虫寿命延長
DAF-28	β	抑制	促進	抑制	INS-20	α	なし	なし	なし
INS-1	β	促進	抑制	促進	INS-21	α	なし	なし	なし
INS-2	β	なし	なし	なし	INS-22	α	なし	なし	なし
INS-3	β	なし	なし	なし	INS-23	α	促進	抑制	なし／促進
INS-4	β	抑制	なし	なし	INS-24	α	なし	不明	不明
INS-5	β	なし	なし	なし	INS-25	α	なし	なし	なし
INS-6	β	抑制	促進	抑制	INS-26	α	抑制	なし	なし
INS-7	β	抑制	なし	抑制	INS-27	α	抑制	なし	なし
INS-8	β	なし	なし	なし	INS-28	α	抑制	なし	なし
INS-9	β	なし	なし	なし	INS-29	α	なし	なし	なし
INS-10	β	促進	抑制	なし	INS-30	α	なし	なし	なし
INS-11	γ	なし	なし	なし	INS-31	α	なし	なし	なし
INS-12	γ	抑制	促進	なし	INS-32	γ	促進	不明	不明
INS-13	γ	なし	なし	なし	INS-33	α	抑制	なし	なし
INS-14	γ	なし	なし	なし	INS-34	α	なし	なし	なし
INS-15	γ	なし	なし	なし	INS-35	α	抑制	なし	抑制
INS-16	γ	なし	なし	なし	INS-36	α	なし	不明	不明
INS-17	γ	促進	なし	なし	INS-37	γ	なし	不明	不明
INS-18	γ	促進	抑制	促進	INS-38	γ	なし	なし	なし
INS-19	γ	なし	なし	なし	INS-39	α	なし	不明	抑制

■ は特に効果が大きいことを示す。

INS-23の寿命延長効果は筆者らと Fernandes de Abreu らで結果が異なる。

線虫 *C. elegans* の40種のインスリン様ペプチド (DAF-28, INS-1~39) の幼虫休眠誘導・打破ならびに成虫寿命延長効果を一覧表にまとめた。RNAi 遺伝子破壊、過剰発現による表現型を参照した。生理機能が認められないものが半数以上に上る。休眠のみに関与するもの、寿命のみに関与するもの、両者に関与するものなどさまざまな分子種が存在する。幼虫休眠誘導・幼虫休眠打破・成虫寿命延長それぞれにおいて主に機能する分子種は限られている。

シャルアゴニストとは受容体に結合し、僅かながら受容体を活性化する分子を言う。パーシャルアゴニストが拮抗的に受容体に結合すると、従来のリガンドの受容体への結合を阻害し、結果的に受容体活性化を弱める。現在のところ、アンタゴニストとして機能するインスリン様ペプチドはすべての生物種において知られておらず、たいへん興味深い問題である。

線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチドの多様な機能

インスリン受容体様タンパク DAF-2 は多様な生命現象を制御する。これに呼応して、リガンドである種々のインスリン様ペプチドも多様な生命現象に関わる。インスリン様ペプチド INS-1 は連合学習 (エサの有無と塩濃度あるいはエサの有無と温度との関連づけ) に関与するとして脚光を浴びた^(20, 21)。この研究は「老化に伴う記憶能力低下」に一石を投じることとなった。また、INS-27 ならびに-31 は病原体抵抗性に関与し、INS-23 ならびに-27 は熱耐性に関与する⁽¹⁶⁾。INS-3 ならびに-33 は生殖系を制御するとの報告があった⁽²²⁾。ヒトデの生殖巣刺激ホルモンがインスリン様ペプチドであり、Gタンパク質共役膜7回貫通型受容体 (GPCR) を介する可能性が

示唆された⁽²³⁾。また、哺乳動物のリラキシン受容体は長いN末端細胞外領域にロイシンリッチリピートを有する LGR (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled Receptor) であることが判明している⁽²⁴⁾。*C. elegans* のインスリン様ペプチドにも DAF-2 受容体ではなく GPCR を介して機能するものが存在するかもしれない。

線虫 *C. elegans* のインスリン様ペプチドの合成・分泌制御

産生されたペプチドホルモンは分泌されることにより生理機能に与る。ヒトインスリンは膵臓ランゲルハンス島β細胞で産生され分泌される。血中グルコース濃度に応答したインスリンの分泌機構はよく調べられており、その機構に基づく糖尿病治療薬も多数開発されている。また、インクレチンはインスリンの分泌を促進する消化管ペプチドであり、その分解酵素阻害剤も糖尿病治療薬として用いられている⁽²⁵⁾。キイロショウジョウバエにも7種のインスリン様ペプチド (*Drosophila* insulin-like peptides; Dilps) が存在するが、このうち Dilp-5 は栄養状態によりその発現が制御される⁽²⁶⁾。*C. elegans* のインスリン様ペプチドとしては、DAF-28 が産生細胞 ASI に

において生育環境の悪化（生育密度上昇・餌の枯渇）に応答して分泌が抑制されることが知られている⁽¹⁴⁾。この分泌制御因子としてASNA-1が同定され、ヒトASNA1オースログは膵臓ランゲルハンス島 β 細胞においてインスリンの分泌を制御することが明らかとなった⁽²⁷⁾。また、最近、三谷らは2型糖尿病のリスクファクターであるメタロプロテアーゼADAMTS9の線虫オースログGON-1がDAF-28, INS-7, -18の分泌制御にかかわることを示した⁽²⁸⁾。ごく最近、筆者らは、寿命・休眠を制御するINS-35に関して、①主に腸で産生されるINS-35は通常生育時には偽体腔側に分泌され、②休眠時には内腔側に分泌方向を変え、③休眠が打破されると再び偽体腔側に分泌されることなどを発見した^(29, 30)（図3）。この「生育状況に応答した分泌極性の可逆的変動」は内分泌学の常識を覆すものであった。これまでの内分泌学の考えは「①神経細胞・上皮細胞において分泌性ペプチドはトランスゴルジネットワークで選別され分泌小胞に濃縮・パッケージングされる。②その際、分泌小胞の送達先は小胞に付着している種々の分子であらかじめ決定済みである。③よって、送達先（頂端側／基底側）は分泌性ペプチドごとに一定である。」というものである。上述のASNA-1はINS-35の分泌制御因子でもあったが、分泌極性の変動には関与しなかった⁽³⁰⁾。現在、筆者らは、遺伝学的手法を用いて分泌極性変動制御因子の同定

を試みている。

おわりに

これまでの*C. elegans*のインスリン様ペプチドに関する研究から、解決すべき興味深い課題が浮上した。何故*C. elegans*には多数のインスリン様遺伝子が存在するのか？ どのようにして各々のインスリン様ペプチドがそれぞれ特有の生命現象に与するのか？ なぜ*C. elegans*のインスリン様ペプチドにはアンタゴニスト／パーシャルアゴニストが存在するのか？ どのようにして多数のインスリン様ペプチドが唯一の受容体DAF-2を介して多様な生命現象に与するのか？ 各々のインスリン様ペプチドの時空間的発現・分泌はどのように制御されているのか？ などなど。今後の研究の進展が待たれる。

文献

- 1) R. C. Cassada & R. L. Russell: *Dev. Biol.*, **46**, 326 (1975).
- 2) D. L. Riddle, M. M. Swanson & P. S. Albert: *Nature*, **290**, 668 (1981).
- 3) C. Kenyon, J. Chang, E. Gensch, A. Rudner & R. Tabtiang: *Nature*, **366**, 461 (1993).
- 4) K. D. Kimura, H. A. Tissenbaum, Y. Liu & G. Ruvkun: *Science*, **277**, 942 (1997).
- 5) *C. elegans* Sequencing Consortium: *Science*, **282**, 2012 (1998).
- 6) P. J. Hu: *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org>. (2007).
- 7) C. T. Murphy & P. J. Hu: insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.164.1, <http://www.wormbook.org>. (2013).
- 8) 本田陽子, 本田修二, 河野 強: “老化の生物学”, 化学同人, 2014, p. 164.
- 9) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver & C. C. Mello: *Nature*, **391**, 806 (1998).
- 10) K. Gengyo-Ando & S. Mitani: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 64 (2000).
- 11) T. Kawano, K. Takuwa, T. Nakajima & Y. Kimura: *Worm Breed. Gaz.*, **15**, 47 (1998).
- 12) L. Duret, N. Guex, M. C. Peitsch & A. Bairoch: *Genome Res.*, **8**, 348 (1998).
- 13) S. B. Pierce, M. Costa, R. Wisotzkey, S. Devadhar, S. A. Homburger, A. R. Buchman, K. C. Ferguson, J. Heller, D. M. Platt, A. A. Pasquinelli *et al.*: *Genes Dev.*, **15**, 672 (2001).
- 14) W. Li, S. G. Kennedy & G. Ruvkun: *Genes Dev.*, **17**, 844 (2003).
- 15) T. Kawano, Y. Ito, M. Ishiguro, K. Takuwa, T. Nakajima & Y. Kimura: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 431 (2000).
- 16) D. A. Fernandes de Abreu, A. Caballero, P. Fardel, N. Stroustrup, Z. Chen, K. Lee, W. D. Keyes, Z. M. Nash, I. F. Lo'pez-Moyado, F. Vaggi *et al.*: *PLoS Genet.*, **10**, e1004225 (2014).
- 17) Y. Matsunaga, K. Nakajima, K. Gengyo-Ando, S. Mitani,

図3 ■ INS-35の分泌極性の可逆的変動

上図に線虫*C. elegans*の雌雄同体成虫の体制を示す。下図にINS-35分泌の模式図を示す。通常生育時には腸で産生されたINS-35は偽体腔側に分泌され、インスリン様シグナルを充進する。また、分泌されたINS-35の一部は体腔細胞に取り込まれる。一方、幼虫休眠時にはINS-35は内腔側へと分泌方向を変え、内腔に蓄積され徐々に分解される。休眠打破時には再び分泌方向を変え、偽体腔側に分泌される。

- T. Iwasaki & T. Kawano: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **762**, 168 (2012).
- 18) Y. Matsunaga, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, T. Iwasaki & T. Kawano: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **423**, 478 (2012).
 - 19) T. Matsukawa, Y. Matsunaga, T. Iwasaki, K. Nagata, M. Tanokura & T. Kawano: *Pept. Sci.*, (2017), in press.
 - 20) M. Tomioka, T. Adachi, H. Suzuki, H. Kunitomo, W. R. Schafer & Y. Iino: *Neuron*, **51**, 613 (2006).
 - 21) E. Kodama, A. Kuhara, A. Mohri-Shiomi, K. D. Kimura, M. Okumura, M. Tomioka, Y. Iino & I. Mori: *Genes Dev.*, **20**, 2955 (2006).
 - 22) D. Michaelson, D. Z. Korta, Y. Capua & E. J. Hubbard: *Development*, **137**, 671 (2010).
 - 23) M. Mita, M. Yoshikuni, K. Ohno, Y. Shibata, B. Paul-Prasanth, S. Pitchayawasin, M. Isobe & Y. Nagahama: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9507 (2009).
 - 24) S. Y. Hsu, K. Nakabayashi, S. Nishi, J. Kumagai, M. Kudo, O. D. Sherwood & A. J. Hsueh: *Science*, **295**, 671 (2002).
 - 25) 糖尿病と治療薬: <http://kusuri-jouhou.com/pharmacology/diabetes.html>
 - 26) N. Okamoto & T. Nishimura: *Dev. Cell*, **35**, 295 (2015).
 - 27) G. Kao, C. Nordenson, M. Still, A. Ronnlund, S. Tuck & P. Naredi: *Cell*, **128**, 577 (2007).
 - 28) S. Yoshina & S. Mitani: *PLoS ONE*, **10**, e0133966 (2015).
 - 29) Y. Honda, A. Higashibata, Y. Matsunaga, Y. Yonezawa, T. Kawano, A. Higashitani, K. Kuriyama, T. Shimazu, M. Tanaka, N. J. Szewczyk *et al.*: *Sci. Rep.*, **2**, 487 (2012).
 - 30) Y. Matsunaga, Y. Honda, S. Honda, T. Iwasaki, H. Qadota, G. M. Benian & T. Kawano: *Nat. Commun.*, **7**, 10573 (2016).

プロフィール

河野 強 (Tsuyoshi KAWANO)

＜略歴＞1986年東京大学農学部農芸化学科卒業／1992年日本学術振興会特別研究員 (DC2→PD)／1993年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了／1994年(財)サントリー生物有機科学研究所研究員／1997年鳥取大学農学部講師／1999年同助教授／2007年同教授、現在に至る＜研究テーマと抱負＞ペプチドを基軸とした睡眠・寿命制御機構の解明、腸ペプチドの分泌制御機構＜趣味＞温泉めぐり、囲碁・将棋、コブクロ＜所属研究室ホームページ＞<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/kawano/>

Copyright © 2017 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.400