

令和 2 年 4 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18517

研究課題名(和文)機能性RNAが細胞間を伝搬する分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular and cellular mechanisms underlying intercellular transfer of double stranded RNA

研究代表者

出嶋 克史(Dejima, Katsufumi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60457439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：二本鎖RNA(dsRNA)やマイクロRNAを始めとする機能的RNAは、標的となるRNAの配列特異的に遺伝子の発現を抑圧する働きを有する。機能的RNAは基本的には細胞内で働く分子であるが、一部は細胞外へ放出され、細胞非自律的に遺伝子発現調節を担うことが知られる。しかし、その分子メカニズムについて十分な解明をみない。線虫*C. elegans*における「全身性RNAi」とよばれる、dsRNAが細胞間を伝播することで生じる生命反応に注目し、遺伝子変異体を用いた解析などから亜鉛の輸送に関わる分子などがdsRNAの取り込みに関わることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞間を伝播するという「可動性」と遺伝子配列に応じた作用するという「特異性」と「汎用性」から機能性RNAを使った遺伝子治療は魅力的なアプローチの一つである。最近になり一部の核酸医薬品が実用化されているが、未だに一回あたりの投与量が多く、治療費が高額になるという問題もある。このように、未だに十分な送達システムが構築されたとは言えない状況である。本研究で新たに亜鉛の膜輸送を介した小胞輸送が機能性RNAの細胞間の移動に関与することが明らかになった。この発見を創薬研究に発展させることで、近い将来核酸医薬品などの送達システムの開発に貢献することになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In *C. elegans*, dsRNA spreads throughout the whole body and causes RNA silencing in cell non-autonomous manner. This phenomenon is termed systemic RNAi. Previous genetic studies identified several genes involved in systemic RNAi. The molecular mechanisms by which systemic spread of dsRNA occurs in *C. elegans* appear to be conserved, at least partly, among plants, invertebrates and vertebrates. However, molecules that mediate RNA transport between cells remain largely unknown. We previously reported that mutations in *rsd-3*, a gene encoding conserved ENTH domain protein, is required for efficient import of silencing RNA, and the *rsd-3* mutants displayed an incomplete defect in systemic RNAi. From a genetic screen for mutations able to suppress the defective RNAi phenotype of *rsd-3* mutants, we found a zinc transporter gene is the causal gene of the suppression phenotype.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：C. elegans RNA干渉 systemic RNAi 亜鉛 小胞輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

二本鎖 RNA ( dsRNA ) などの機能性 RNA は、血液などの体液に存在し細胞間情報伝達を担う。安全性や特異性の高い核酸医薬品として治療に応用できる可能性や癌化との関連性から、近年、その重要性が注目されている。しかしながら、機能性 RNA が細胞間を伝搬する分子機序については十分な解明をみない。

機能性 RNA が細胞間を伝搬する現象は進化的に保存されており、元々は線虫 *C. elegans* において、全身性 RNA 干渉 ( RNAi ) という現象として見出された ( Fire et al., Nature 1998、図 1 )。すなわち、線虫では細胞外に放出された dsRNA が別の細胞にも伝搬し、細胞非自律的に RNAi が生じる。これまでに、dsRNA が細胞膜を通過する為には SID-1 というチャネル様分子が必要であること ( Winston et al., Science 2002 )、エンドサイトーシスや activated cdc-42-associated kinase が dsRNA の取り込みに関わること ( Saleh et al., Nature Cell Biol., 2006, Jose et al., PNAS 2012 ) などが報告されている。また、全身性 RNAi において、ゴルジ体からエンドソームへの小胞輸送に関わる EpsinR の線虫ホモログが生殖細胞に限定的に必要とされることが報告されていたが、我々は、EpsinR ホモログが細胞種を問わず全身性 RNAi に不可欠であることを見出していた ( Tijsterman et al., Curr Biol 2004, Imae et al., Sci. Rep 2015 )。しかしながら、dsRNA が細胞間を伝播する現象は、これらの分子のみでは十分な説明がつかず、全身性 RNAi に関わる分子の大半が未同定であると考えられた。上記の理由で、dsRNA が細胞非自律的に作用する分子機序を理解する為には新規分子の探索が必須である。線虫 *C. elegans* を用いて順遺伝学的な抑圧変異体スクリーニングを行い、EpsinR 変異体における全身性 RNAi の不全を改善する変異体を取得してきた。

## 2. 研究の目的

EpsinR 変異体における全身性 RNAi の不全を改善する変異体の原因遺伝子として進化上保存された細胞内膜系の亜鉛輸送体を同定していた。亜鉛そのものは多くの分子の機能に不可欠であるが、各種亜鉛輸送体が特有の細胞内局在を示す事から ( Kambe et al., Physiol. Rev. 2015 )、局所的な亜鉛の供給制御が細胞内の場所に応じた特定の素過程に重要と考えられる。本件研究に先立ち抑圧変異体スクリーニングによりある種の亜鉛輸送隊体が原因遺伝子である可能性を示唆する予備的なデータを得ていた。これまでに亜鉛輸送体が小胞輸送の制御に関わる報告は数例あるが ( Fang et al., 2008 Mol. Biol. Cell, Groth et al., Development 2013 )、小胞輸送の実働分子との関係性を示した研究はなされていない。そこで、本研究では、小胞輸送の実働分子を探索・解析することで、亜鉛の膜輸送が全身性 RNAi にどのように寄与するかという点に迫った。

## 3. 研究の方法

dsRNA の伝搬に関わる新規因子の同定と解析。亜鉛輸送体が真の原因遺伝子であることを実証するために、本遺伝子の遺伝子ノックアウト株を CRISPR/Cas9 法により取得し、rsd-3 変異体の RNAi 異常を抑圧するかどうかを調べ、更には、本遺伝子のコード領域を含むプラスミドを作成しトランスジェニック株を作成後、抑圧表現型が抑圧されるかどうか検証した。また、亜鉛の輸送に関わる領域のアミノ酸を置換したコンストラクトを作成し抑圧表現型を回復させる活性を有するかどうかという点を調べた。加えて、この輸送体がどの組織で機能するかという点を明らかにするために、腸管、上皮、筋肉で特異的に発現するコンストラクトを作成し、抑圧表現型を回復させる活性を調べた。また、dsRNA を直接擬体腔にイン

ジェクションし、生殖巣に取り込まれて RNAi が作用する効率を調べることで、生殖巣への dsRNA の取り込み能が変異体において亢進しているかどうかという点を調べた。他の亜鉛輸送体が全身性 RNAi に関与する可能性を検証するために、一連の亜鉛輸送隊 28 遺伝子についての遺伝子欠失変異株を取り揃えた。遺伝子ノックアウトコンソーシアムに存在しないものについては CRISPR/Cas 法でノックアウト株を作成した。これらの変異体における全身性 RNAi の効率を評価した。また、これらの変異体の解析を効率的にすすめるために、一連のバランサーツールキットを作成した。亜鉛輸送体の下流因子を同定するために、亜鉛に関連する遺伝子の一連の欠失変異体における全身性 RNAi の効率を評価した。本輸送体の細胞内局在を調べるために、蛍光タンパク質を融合させたコンストラクトを発現するトランスジェニック株を作成した。

#### 4 . 研究成果

CRISPR/Cas9 法により作成した本遺伝子のノックアウト株は、順遺伝学的なスクリーニングで得られた変異株と同様に *rsd-3* 変異体の RNAi 耐性表現型を抑圧した。また、正常型亜鉛輸送体を自身のプロモーターで発現させることで抑圧表現型を完全に回復させた。インジェクション実験などから本分子は細胞非自律的に機能するが、dsRNA の取り込みに関与する可能性を示唆するデータを得た。線虫 *C. elegans* において、亜鉛輸送体は、亜鉛を細胞質側へ取り込むタイプの輸送体が 14 種類、逆に細胞外へ放出するタイプのものが 14 種類存在する。同定した亜鉛輸送体以外でも同様な働きがあるかどうかという点に迫るべく、これら全遺伝子のノックアウト線虫を用いて、それらの変異体における RNAi 効率を検証する実験を計画した。遺伝子ノックアウトには、既に日本国内のナショナルバイオリソースプロジェクトや海外の KO コンソーシアム（アメリカ合衆国およびカナダ）で単離されているもので半数近くの遺伝子のカバーすることができたが、残りの遺伝子については、CRISPR/Cas9 法にて、独自に遺伝子欠失株を作成した。興味深いことに、遺伝学的スクリーニングによって得られた輸送体の変異体以外の変異体では、いずれの株においても RNAi 効率に異常は認められなかった。したがって、本研究の遺伝学的スクリーニングで得られた亜鉛輸送体はユニークな働きを有する可能性がある。その一方で、哺乳類細胞などでは、一部の亜鉛輸送体は機能的重複をしていることが知られる。他の亜鉛輸送体の変異体で RNAi 効率に異常が生じなかったのは、亜鉛輸送体間の機能的な重複による可能性も否定できない。本輸送体の細胞内局在に関して、これまでに、腸管での解析を行ってきた。解析には、本輸送体遺伝子のプロモーター下に本遺伝子のコーディングシーケンスと tagRFP を融合させたコンストラクトを線虫に発現させることで解析した。一連のオルガネラマーカールとの重ね合わせ実験にて、詳細な局在を決定したところ、腸管では、主に後期エンドソームに局在することが明らかとなった。上皮でも同様の実験を行い、同じく後期エンドソームに局在するという結果を得た。亜鉛に関連する遺伝子の一連の変異体における全身性 RNAi 効率をしらべることで本亜鉛輸送体の下流で機能する候補分子を複数得た。

細胞間を伝播するという「可動性」と遺伝子配列に応じた作用するという「特異性」と「汎用性」から機能性 RNA を使った遺伝子治療は魅力的なアプローチの一つである。最近になり一部の核酸医薬品が実用化されているが、未だに一回あたりの投与量が多く、治療費が高額になるという問題もある。このように、未だに十分な送達システムが構築されたとは言えない状況である。本研究で新たに亜鉛の膜輸送を介した小胞輸送が機能性 RNA の細胞間の移動に関与することが明らかになった。この発見を創薬研究に発展させることで、近い将来核酸医薬品などの送達システムの開発に貢献することになると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Dejima Katsufumi, Horii Sayaka, Iwata Satoru, Suehiro Yuji, Yoshina Sawako, Motohashi Tomoko, Mitani Shohei	4. 巻 22
2. 論文標題 An Aneuploidy-Free and Structurally Defined Balancer Chromosome Toolkit for <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 232 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.12.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imae R, Dejima K, Kage-Nakadai E, Arai H, Mitani S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Endomembrane-associated RSD-3 is important for RNAi induced by extracellular silencing RNA in both somatic and germ cells of <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 28198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep28198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Izumikawa T, Dejima K, Watamoto Y, Nomura KH, Kanaki N, Rikitake M, Tou M, Murata D, Yanagita E, Kano A, Mitani S, Nomura K, Kitagawa H.	4. 巻 291
2. 論文標題 Chondroitin 4-O-Sulfotransferase Is Indispensable for Sulfation of Chondroitin and Plays an Important Role in Maintaining Normal Life Span and Oxidative Stress Responses in Nematodes	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 23294-23304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.757328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Katsufumi Dejima, Rieko Imae, Yuji Suehiro and Shohei Mitani
2. 発表標題 An endomembrane-resident zinc transporter negatively regulates systemic RNAi in <i>C. elegans</i> .
3. 学会等名 <i>C. elegans</i> Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting EMBO workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Katsufumi Dejima, Rieko Imae, Yuji Suehiro and Shohei Mitani
2 . 発表標題 An endosome-resident zinc transporter negatively regulates systemic dsRNA spreading in <i>C. elegans</i>
3 . 学会等名 FAOPS2019 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 K. Dejima, S. Hori, S. Iwata, S. Yoshina, Y. Suehiro, T. Motohashi, S. Mitani
2 . 発表標題 Balancer chromosome toolkit for <i>C. elegans</i>
3 . 学会等名 21st International <i>C. elegans</i> Conference University of California, Los Angeles ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Katsufumi Dejima, Rieko Imae Yuji Suehiro and Shohei Mitani
2 . 発表標題 Analysis of suppressor mutants that allow systemic RNAi in the absence of RSD-3
3 . 学会等名 The 7th Asia-Pacific Worm meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Iwata, S., Dejima, K., Hori, S., Yoshina, S., Suehiro, Y., Mitani, S
2 . 発表標題 Genetic engineering of chromosomal balancer toolkit for gene-clusters mediated by CRISPR/Cas9 in <i>Caenorhabditis elegans</i> .
3 . 学会等名 The 7th Asia-Pacific Worm meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----