

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590070
 研究課題名（和文）線虫を用いた腸細胞内リソソーム様オルガネラの形成・成熟に関わる遺伝的要因の解明
 研究課題名（英文）Searching for genetic factors involved in formation and maturation of novel lysosome-related granules in *Caenorhabditis elegans* intestine.
 研究代表者
 大橋 綾子 (OHASHI AYAKO)
 岩手医科大学薬学部・教授
 研究者番号：90272484

研究成果の概要（和文）：線虫 *C. elegans* の腸細胞内顆粒の形成異常を指標として、リソソーム様オルガネラの形成・成熟に関わる遺伝的要因を解明する研究を行った。RNAi スクリーニング系を構築し、現在までに 2000 以上のクローンを解析した結果、興味深い遺伝子群が陽性遺伝子として見いだされた。予想していた小胞輸送関連遺伝子に加え、膜成分や脂質の代謝関連遺伝子、他オルガネラでの機能が知られる遺伝子、タンパク質の品質管理に関わる遺伝子等の多岐にわたる遺伝子群の関与が明らかとなった。更に、腸細胞内顆粒形成に必須な遺伝子として最初に同定された2つの ABC 輸送体 HAF-4 と HAF-9 の遺伝学的生化学的相互作用を解析した。

研究成果の概要（英文）：A systemic RNAi screening methods was developed for searching genetic factors involved in the formation and maturation of novel lysosome-related intestinal granules in *Caenorhabditis elegans*. The screening system identified various types of genes which affect the intestinal granular formation and maturation. Genetic and biochemical interaction between HAF-4 and HAF-9, the first two identified ABC transporter genes to be required for the intestinal granular formation, was also analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・生物系薬学

キーワード：ゲノム 薬学 バイオテクノロジー 遺伝学 細胞組織 線虫 腸

1. 研究開始当初の背景

線虫は、細胞の有するオルガネラの中で、リソソームとその関連オルガネラの多様性が 2000 年代に入り相次いで報告され

(Dell'Angelica EC *et al.* *FASEB J.* 14, 1265-1278 (2000))、近年では数々の病態との関わりも指摘されている (Huizing M *et al.* *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 359-386 (2008))。これらのオルガネラの多

様性と機能を支える分子基盤として、プロトンやその他の生体分子の輸送・制御に働く因子の関与が予想されている。しかし、そのようなオルガネラがどのように形成され、機能的に成熟し細分化されていくのかについては、Rab を代表とする一部の小胞輸送系因子群以外にほとんど解析がなされていないのが現状である。

線虫は生きたまま細胞内を観察できる数少ないモデル生物で、物質代謝や膜輸送に関しても近年国内外の研究により、哺乳動物に先駆けて新たな遺伝子が発見されるなど、様々な知見が加速的に蓄積しつつある。申請者は、国内外の研究者とともに抗原ペプチド輸送体 TAP (Transporter associated with antigen processing, 別名 ABCB2/B3) に似た新規な内膜系 ABC (ATP binding cassette) 輸送体である TAPL (TAP-Like, 別名 ABCB9) の機能解明に取り組んできたが、ヒトやマウスの TAPL の薬物排出活性への影響(研究業績 10) や無細胞系でのペプチド輸送活性は示された (Wolters JC *et al.* *J. Biol. Chem.* 280, 23631-23636 (2005)) もの、その生理機能は明らかにできていなかった。

しかし、申請者らは、その線虫ホモログに相当する HAF-4/HAF-9 の解析に取り組むことにより、(1) ペプチド輸送体が、主として腸細胞の大半を占めるリソソーム様オルガネラである腸内顆粒に発現すること、(2) それらの遺伝子の欠損変異体では、その腸内顆粒が消失するというオルガネラ形成異常を示すこと、(3) 更にその形成異常の回復には ATPase 活性 (ひいては基質の輸送活性) が必要なこと、(4) 見いだした腸内顆粒は非酸性顆粒でありながら、LAMP (Lysosome-associated membrane protein) の線虫ホモログ LMP-1 に自家蛍光蛋白を融合させたタンパクが検出されるという、新たな特徴を持つリソソーム様オルガネラであること、(5) 更に欠損変異体では、顕微鏡観察で得られたこれらの特徴以外に、成長遅延やバイオリズムの異常なども見られること、を発見した (Kawai H *et al.* *Mol Biol Cell.* 20, 2979-2990. (2009))。

申請者が平成 19-21 年度の基盤研究 (C) 「オルガネラ異常を引き起こす線虫 ABC 輸送体の生理機能の研究」として行ったこれらの研究は、内膜系 ABC 輸送体の生理機能を解明する大きな一歩となっただけでなく、非酸性リソソーム様顆粒という新たなリソソーム関連オルガネラの形成と成熟を分子レベルで理解するための糸口となった。

これまでの研究成果を得るために、申請者の主催する研究室では、既に各種の腸内顆粒標識マーカーを作成し、また学内の電子顕微

鏡部門と共同で線虫の微細構造観察を行える研究環境も整った。そこで、これらのマーカーや形態学的な解析技術を活用し、モデル生物・線虫を用いた研究で得意とする網羅的 RNAi スクリーニングを組み合わせれば、「線虫腸内顆粒の異常を指標にした、非酸性リソソーム様オルガネラ形成・成熟に関わる更なる新たな要因を遺伝学的に解析できるのではないか」という着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「線虫 *C. elegans* の腸細胞内顆粒の形成異常を指標として、リソソーム様オルガネラの形成・成熟に関わる遺伝的要因を解明すること」である。申請者の前基盤研究 (C) 「オルガネラ異常を引き起こす線虫 ABC 輸送体の生理機能の研究 (平成 19-21 年度)」での研究成果を活かし、線虫腸細胞内における、非酸性でありながらリソソーム関連蛋白が局在するユニークなリソソーム様顆粒の、形成・成熟に関連する更に新たな遺伝子群を見だし、その遺伝子間相互作用の解明へと発展させることを目指す。

本研究は、未解明な部分の多いオルガネラ形成に関わる分子基盤を遺伝学的・形態学的・生化学的に明らかにする点に大きな特色があり、その成果はリソソーム関連疾病の解明にも貢献しうるものである。

具体的には、3 年間の研究期間に、①線虫腸内顆粒の形成・維持に関わる因子の遺伝学的スクリーニング系を構築すること、②線虫での網羅的解析の代表的手段である RNAi ライブラリーによるスクリーニングを実施すること、③最終的に、既に解析を進めている ABC 輸送体 HAF-4, HAF-9 の遺伝子や、スクリーニングによって得られるであろう新たな候補遺伝子について、オルガネラの形成・成熟への関与を遺伝学的、形態学的並びに生化学的に明らかにすること、を目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的は、「線虫を用いた腸細胞内リソソーム様オルガネラの形成・成熟に関わる遺伝的要因の解明」である。その達成に向けての研究を、次に示す 3 段階にわけて計画した。

(1) RNAi スクリーニング系の構築

線虫 *C. elegans* の腸内顆粒の形成・維持に関わる因子を、RNAi 法により効率的にスクリーニングするための諸条件を検討する。

系の構築の為に用いる材料として、腸内非

酸性顆粒を蛍光タンパクの融合により標識した LMP-1::mRFP(又は LMP-1::GFP)、HAF-4::GFP(又は HAF-4::mRFP)を導入した線虫を用意した。具体的な条件として、RNAi feeding 用大腸菌の菌濃度とタイミング、RNAi feeding 処理を施した線虫の飼育温度、観察時期と観察方法、スクリーニング 1 トライアルに必要なタイムスケジュールと線虫継代サイクルを検討し、最適な条件を決定した。

(2) RNAi スクリーニングの実施

線虫での網羅的解析の代表的手段である RNAi ライブラリーによるスクリーニングを実施する。

所属機関の研究費にて購入した線虫 RNAi 用ライブラリー(C.elegans RNAi Feeding Collection Open Biosystems 社)は、1 万を超える数の独立した遺伝子断片を含む大腸菌のライブラリーで、線虫に餌として与えることにより RNAi の効果を示す (Fraser AG et al. Nature 408,449-454 (2000))。①で構築したスクリーニング系に従い、RNAi ライブラリーから順次クローンを単離して行く。

(3) RNAi スクリーニングで得られた、線虫腸内顆粒の形成・成熟に関する陽性遺伝子を中心とした関連遺伝子の解析

得られた候補遺伝子について、それらの関連遺伝子について RNAi スクリーニングを優先して行い、腸内顆粒の異常を観察した。また、入手可能な変異体を用いて、腸内顆粒の異常を観察した。

更に、最初に見つかった遺伝子であるハーフタイプの ABC 輸送体 HAF-4, HAF-9 について、2 つの遺伝子間相互作用の解析を進めた。

4. 研究成果

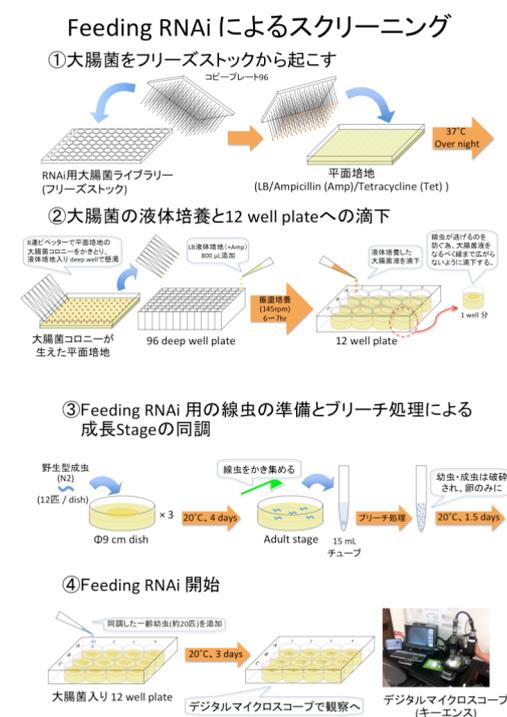
(1) RNAi スクリーニング系の構築

平成 22 年度は、「腸内顆粒の形成・成熟の異常を検出する効率的なスクリーニング条件の設定」を中心に検討した。

アッセイに用いる材料として、通常の野性型線虫 N2 に加え、腸内非酸性顆粒に局在する膜タンパクを蛍光タンパクの融合により標識した LMP-1::mRFP、HAF-9::GFP を導入した線虫を準備した。これらの線虫に対して、その欠損が非酸性顆粒を消失させる遺伝子 *Imp-1*, *haf-9* の RNAi 用大腸菌株と、消失させない遺伝子 *haf-2* の RNAi 用大腸菌株とを、線虫 RNAi ライブラリーより選び、feeding 法による遺伝子抑制効果を調べた。顆粒消失を判断するためのコントロールとしては、既に単離している *Imp-1*, *haf-9*, *haf-2* 欠損変異体線虫を用いた。その結果、変異体から予想した通りの RNAi の効果が feeding 法によっ

ても得られた。また、実際に検討した遺伝子 *Imp-1* や *haf-9* の発現抑制も、LMP-1::mRFP、HAF-9::GFP の蛍光の消失から確認できた。

更にこれらの材料を用いて、大量スクリーニングに適した諸条件 (RNAi feeding 用大腸菌の菌濃度とタイミング、RNAi feeding 処理を施した線虫の飼育温度、観察時期、顕微鏡と併用したデジタルマイクログラフによる観察方法、スクリーニング 1 トライアルに必要なタイムスケジュールと線虫継代サイクル) を決定した。観察に高倍率のデジタルマイクログラフを導入することにより、スライドガラスにマウントせずにプレスクリーニングすることで効率化が可能となった。(詳細は下図参照)



(2) RNAi スクリーニングの実施

平成 23 年度より、「腸内顆粒の形成・成熟の異常を検出する効率的なスクリーニングの実施」を中心に行った。

初年度、決定した大量スクリーニングに適した諸条件を改良しつつ、実際にスクリーニングを開始した。11,000 に及ぶ feeding RNAi クローンを含むライブラリーを用いて、スクリーニングをスタートし、本基盤研究期間内に 2000 クローンを解析した (現在も継続中) が、既に幾つかの陽性クローンを同定できた。

予想していた小胞輸送関連遺伝子に加え、膜成分や脂質の代謝関連遺伝子、糖代謝関連遺伝子、他オルガネラでの機能が知られる遺伝子、タンパク質の品質管理に関わる遺伝子、腸細胞の分化決定と維持に関わる転写因子をコ

ードする遺伝子等、多岐にわたる遺伝子群の関与が明らかとなった。

これらの中には、線虫研究のデータベースである Worm Base に「clear (実体顕微鏡レベルで線虫全体が透明に見える)」表現型として登録されているものとは異なる、新たなクローンも多く存在した。また、clear 表現型を有すると報告された遺伝子群の中にも、我々のスクリーニングにおける観察では腸内顆粒には全く影響がみられないもの、腸内顆粒だけでなく卵のほぼ透過して見えるなど影響が腸に留まらないもの、などが多く存在することもわかった。つまり、「腸内顆粒の形成や成熟の異常」という指標は、新たな表現型として独自の重要な意義をもつことがあらためて確認された。

研究遂行上の問題点は、個々の遺伝子解析と平行してスクリーニングを行うには不足している実験に要するマンパワーであることが明らかとなった為、技術補佐員の実験補助時間を増やすことでカバーした。

(3) 線虫腸内顆粒の形成・成熟に関与する遺伝子群の解析

① 平成 24 年度以降は、「線虫腸内顆粒の形成・成熟の異常を検出する効率的なスクリーニングの実施」を継続しつつ、「線虫腸内顆粒の形成・成熟に関与する遺伝子の解析」を中心に行った。

得られた候補遺伝子は多岐にわたっていたが、そのひとつにペントースリン酸経路の酵素トランスフェラーゼ (tkf) があつたため、ペントースリン酸経路 (PPP) の酵素群の遺伝子に対して、RNAi スクリーニングを行った。また、米国 CGC ストックセンターに登録されている PPP 関連遺伝子の変異体入手し、顆粒の形成異常の表現型を調べた。その結果、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼや 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ、トランスアルドラーゼの 3 つの PPP 関連遺伝子において、tkf と同様顆粒が減少する表現型が得られた。グルタチオンジスルフィドレダクターゼをコードする遺伝子 (gsr) においては、顆粒減少に加え、巨大な液泡の形成という異常も見られた。PPP の主要経路、および酸化還元制御に関わる遺伝子の発現抑制が腸内顆粒形成異常を引き起こしたことから、細胞内の NADPH の産生とそれが絡む酸化還元状態が腸内顆粒形成に関与している可能性が示唆された。

② ① で記載した解析とは独立して、本研究をはじめのきっかけとなった ABC 輸送体遺伝子 HAF-4, HAF-9 の遺伝学的及び生化学的な相互作用についても解析を進めた。

線虫のハーフタイプ ABC 輸送体である

HAF-4 と HAF-9 は、相同性が高く腸細胞のリソソーム様オルガネラの膜上に共局在すること、それぞれの変異体において顆粒の形成異常以外の表現型も共通する結果から、共に働く可能性が考えられていた。

線虫の膜面分タンパク質を用いたウェスタンブロット解析の結果、haf-4 の遺伝子欠損変異体では HAF-4 の発現量が減少することから、両者がヘテロ二量体を形成することで相互の安定化に働くことが示唆された。また、同様の結果は、HAF-4::GFP (蛍光タンパク質 GFP 融合型 HAF-4) や HAF-9::GFP を発現するトランスジェニック線虫に対して、フィーディング RNAi により haf-9 や haf-4 の発現を抑制した時の蛍光強度の解析からも得られた。

更に、線虫の膜面分タンパク質を用いた共免疫沈降の結果、遺伝子導入個体を用いたタグ融合型タンパク質の解析と内在性タンパク質の解析のいずれにおいても、HAF-4 と HAF-9 の相互作用が認められた。この研究内容は学術誌 Biochemical Journal に投稿し、受理された。

(4) 総括

本基盤研究から得られた大きな成果は、注目する腸内顆粒の形成・成熟に関わる遺伝子が多岐に渡っていることが明らかになったことである。今後もスクリーニングを継続し、影響を及ぼす遺伝子群の全貌を明らかにしたい。

更に、本基盤研究を通じて、注目する腸内顆粒の加齢に伴う (時間的) 量的な制御機構の存在や、連動した他のオルガネラ異常などが見いだされており、予想を上回る成果が得られた。これらの発見は、平成 25 年度採択された基盤研究 (C) 「線虫腸細胞をモデルにしたオルガネラ連携とその制御に関わる遺伝的基盤の解明」へと繋がっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Tanji T, Nishikori K, Shiraishi H, Maeda M, Ohashi-Kobayashi A. Cooperative function and mutual stabilization of the half ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9 in *Caenorhabditis elegans*. 査読有 *Biochem. J.* (2013) *in press* 5 Mar. doi: 10.1042/BJ20130115.
- ② Obayashi K, Takeda K, Ohashi K, Kobayashi-Ohashi A, Maeda M.

- Characterization of unusually reduced size of GATA-6 without a PEST sequence. 査読有 *Advances in Bioscience and Biotechnology*. **3**, 314-320. (2012) doi: 10.4236/abb.2012.34045
- ③ Fujimoto Y, Kamakura A, Motohashi Y, Ohashi-Kobayashi A, Maeda M. Transporter associated with antigen processing-like (ABC9) stably expressed in CHO-K1 cells is sorted to the microdomains of lysosomal membranes. 査読有 *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 36-40. (2011) https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/34/1/34_1_36/_article
- ④ Shiraishi H, Tanji T, Natori S, Ohashi-Kobayashi A. Tissue and developmental expression of SRAM, an unconventional Rel-family protein. 査読有 *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **76**, 22-29. (2011) doi: 10.1002/arch.20400.
- ⑤ Kojima N, Morioka T, Urabe D, Yano M, Suga Y, Maezaki N, Ohashi-Kobayashi A, Fujimoto Y, Maeda M, Yamori T, Yoshimitsu T, Tanaka T. Convergent synthesis of fluorescence-labeled probes of *Annonaceous* acetogenins and visualization of their cell distribution. 査読有 *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 8630-8641. (2010) doi: 10.1016/j.bmc.2010.10.004.
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 丹治貴博 他 線虫の腸細胞オルガネラに局在する ABC 輸送体 HAF-4 と HAF-9 の多量体形成と相互安定化 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜
- ② 黒田英介 他 線虫腸細胞に存在する ABC 輸送体 HAF-4・HAF-9 陽性オルガネラの栄養環境に依存した変動 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜
- ③ Kenji Nishikori et al. Identification of proteins affected by the deletion for *haf-4* and *haf-9*, the intestinal ABC transporter genes in *Caenorhabditis elegans*. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences, 2012 年 9 月, 東京
- ④ Hirohisa Shiraishi et al. Dynamic changes of major large intestinal granules in response to aging and starvation in *Caenorhabditis elegans*. New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences, 2012 年 9 月, 東京
- ⑤ Avako Ohashi-Kobayashi et al. Age-dependent alteration of major large intestinal granules in *Caenorhabditis elegans*. Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis, and Small RNAs in *C. elegans* Topic Meeting, 2012 年 7 月, マディソン, 米国
- ⑥ Takahiro Tanji et al. Physical interaction of half ABC transporters HAF-4 and HAF-9, which are required for the biogenesis of the intestinal lysosome-related organelles in *Caenorhabditis elegans*. Aging, Metabolism, Stress, Pathogenesis, and Small RNAs in *C. elegans* Topic Meeting, 2012 年 7 月, マディソン, 米国
- ⑦ 錦織健児 他 成虫期の線虫では加齢に伴った腸内顆粒のリニューアルが起こる 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月, 横浜
- ⑧ Takahiro Tanji et al. Mutual stabilization of half-type ABC transporters HAF-4 and HAF-9 in *Caenorhabditis elegans*. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月, 京都
- ⑨ 錦織健児 他 プロテオミクスによる線虫 (*C. elegans*) リソソーム関連 ABC 輸送体 (HAF-4, HAF-9) の生理機能の解析 第 6 回トランスポーター研究会年会, 2011 年 6 月, 仙台
- ⑩ Takahiro Tanji et al. Genetic and physical interactions between half-type ABC transporters HAF-4 and HAF-9, which are required for the biogenesis of intestinal lysosome-related organelle in *Caenorhabditis elegans*. BMB2010, 2010 年 12 月, 神戸
- ⑪ Kenji Nishikori et al. Changes of protein profiles in the deletion mutant for *haf-4* and *haf-9*, the intestinal ABC transporter genes in *C. elegans*. BMB2010, 2010 年 12 月, 神戸
- ⑫ Kenji Nishikori et al. ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9, homologues of human lysosomal peptide transporter TAP-like are required for biogenesis of a subset of intestinal granules in *Caenorhabditis elegans*. 4th East Asia *C. elegans* Meeting, 2010 年 7 月, 東京
- ⑬ Takahiro Tanji et al. Genetic interaction of HAF-4 and HAF-9, half-type ABC transporters required for the biogenesis of intestinal lysosome-related organelle in *Caenorhabditis elegans*. 4th East

Asia *C. elegans* Meeting, 2010年7月,
東京

- ⑭ Hirohisa Shiraishi et al.
Characterization of HAF-2 as a
lysosomal ABC transporter
in *Caenorhabditis elegans*. 4th East
Asia *C. elegans* Meeting, 2010年7月,
東京

[図書] (計1件)

- ① 大橋綾子 (分担執筆) 生物学大辞典 (東
京化学同人) (2010)

[その他]

ホームページ等

http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page_id=42

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 綾子 (OHASHI AYAKO)

岩手医科大学薬学部・教授

研究者番号 : 90272484

(3) 連携研究者

白石 博久 (SHIRAISHI HIROHISA)

岩手医科大学薬学部・講師

研究者番号 : 80393156

丹治 貴博 (TANJI TAKAHIRO)

岩手医科大学薬学部・助教

研究者番号 : 60453320

錦織 健児 (NISHIKORI KENJI)

岩手医科大学薬学部・助教

研究者番号 : 20563844