

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：34504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650086

研究課題名(和文) ADAMTSプロテアーゼによる細胞移動制御におけるリボソーム蛋白質の役割

研究課題名(英文) Role of a ribosomal protein in the ADAMTS protease pathway regulating cell migration

研究代表者

西脇 清二 (Nishiwaki, Kiyoji)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30342827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：MIG-17/ADAMTSプロテアーゼは細胞外マトリックスの制御を介して、線虫*C. elegans*の生殖巣リーダー細胞DTCの移動を制御する。本研究ではリボソームタンパク質RPL-20(G82R)の変異がなぜmig-17変異体のDTC移動異常を抑圧できるのかを追求した。依然として明確な回答は得られていないが、本研究から、RPL-20(G82R)によるmig-17の抑圧は翻訳開始制御には無関係であることが分かった。RPL-20(G82R)は分泌されず、何らかの分泌蛋白質を介してmig-17変異体の異常を抑制していることが示唆された。また、特にRPL-20の腸での働きが重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：MIG-17, an ADAMTS metalloprotease controls migration of gonadal distal tip cells (DTCs) through regulation of extracellular matrix in *C. elegans*. In the present study, we asked why the mutation in a ribosomal protein RPL-20(G82R) can suppress the DTC migration defect in the mig-17 mutants. Although we could not reach a clear understanding of the mechanism, we found that RPL-20(G82R) does not affect the regulatory mechanism of translational initiation. We also showed that RPL-20(G82R) is not secreted, but that it appears to act through unknown secreted proteins to suppress the mig-17 defects. We found that the RPL-20 activity is especially important in the intestine for the suppression to occur.

研究分野：発生生物学

キーワード：ADAMTSプロテアーゼ リボソーム 細胞移動 線虫

1. 研究開始当初の背景

ADAMTS は分泌型のメタロプロテアーゼである。ADAMTS には細胞外マトリックス (ECM) に異常をきたす遺伝病の原因遺伝子が多数見つかり注目を集めている (Porter et al., *Biochem. J.* 386, 15, 2005; Apte, *J. Biol. Chem.* 13, 284, 2009)。線虫の U 字型の生殖巣 (チューブ状上皮よりなる) は原基先端のリーダー細胞 (distal tip cell; DTC) が、幼虫期に U 字型の移動を行うことにより形成される。線虫の ADAMTS の一種をコードする *mig-17* 変異体では DTC が蛇行・迷走するために、生殖巣の形状が異常となる。最近、我々は新規サプレッサー変異 *tk73* の原因遺伝子の同定に成功した。これまで分離、解析してきたサプレッサー遺伝子は *fibulin-1* や *collagen IV* などの基底膜蛋白質をコードしており、*MIG-17* が基底膜で機能することとよく一致していた。しかしながら、大変驚いたことに、*tk73* の原因遺伝子はリボソームの大サブユニット (60S) のコンポーネントである L18a 蛋白質 (線虫では *rpl-20* 遺伝子がコード) をコードしており、*tk73* 変異では L18a のアミノ酸置換により *mig-17* の欠損がバイパスされることが分かった。本研究ではリボソーム蛋白質 L18a の変異により、なぜ分泌型メタロプロテアーゼ *MIG-17* の欠損による細胞移動異常が回復するのか、この不思議なメカニズムの解明を目的とする。

2. 研究の目的

我々は *MIG-17/ADAMTS* が線虫の生殖巣リーダー細胞 DTC の移動を制御することを明らかにし、その下流の ECM 蛋白質の制御カスケードを明らかにしてきた。本研究では L18a が *MIG-17* カスケードで何らかの蛋白質の翻訳制御に特異的に関わっているのか、あるいは翻訳とは無関係なプロセスで機能しているのかなど、L18a 蛋白質の新しい機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) mCherry 融合遺伝子を作成し、RPL-20 蛋白質の発現部位の解析を行う。変異型 RPL-20 がサプレッサーとして機能する組織 (細胞) を組織特異的なプロモーターによる発現解析により決定する。(2) *rpl-20* 変異による *mig-17* の抑圧が、翻訳制御の異常によるものであるのかを解析する。(3) 免疫沈降法により RPL-20 と共沈してくる蛋白質を同定する。また同定できた蛋白質について RNAi を行い、*mig-17* の抑圧の有無を検討する。

4. 研究成果

(1) mCherry-RPL-20 による局在観

RPL-20 の局在を観察するために mCherry-RPL-20 を WT バックグラウンドで過剰発現させ、観察を行った。野生型 RPL-20 (WT) と変異型 RPL-20 (G82R) で局在に変化があるのかを観察するために mCherry-RPL-20 (WT)、mCherry-RPL-20 (G82R) を発現する 2 種類のトランスジェニック線虫を作成した。mCherry-RPL-20 (WT)、mCherry-RPL-20 (G82R) のどちらの局在も大きな差はなく、体の至る所で発現が見られた (図 1)。特に腸で非常に強い蛍光が見られ、DTC でもその局在が観察された (図 1)。しかし、線虫体腔内に存在し、不要になった分泌タンパク質などを取り込み、分解する働きを持つスカベンジャー細胞 (セロモサイト) では蛍光は見られなかった。よって RPL-20 は分泌されている可能性は低いと考えられた。

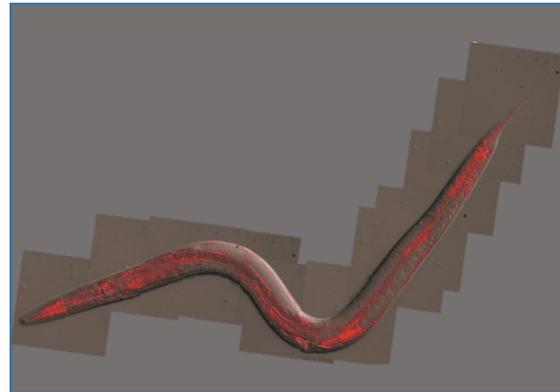


図 1 . mCherry-RPL-20(WT) の発現

今回作成した mCherry-RPL-20 が機能的かどうかを確かめるために、機能欠損変異体で若い幼虫期に致死の *rpl-20(ok2256)* で mCherry-RPL-20 (WT) 過剰発現させた。その結果、*rpl-20(ok2256)* の若い幼虫期で致死となる表現型は回復し、Adult まで成長することができたが、不稔で卵を生まなかった。

また、mCherry-RPL-20 (G82R) が *mig-17(k174)* の生殖巣形成異常の表現型を抑圧することができるのかについて調べた。line 1、3 で *mig-17(k174)* の生殖巣異常を半分程度まで抑圧することができた。Line 2 は僅かな抑圧が見られたが有意差はなかった (図 2)。これらのことから、mCherry-RPL-20 (G82R) は、生殖巣形成異常の抑圧に部分的に機能的であることがわかった。

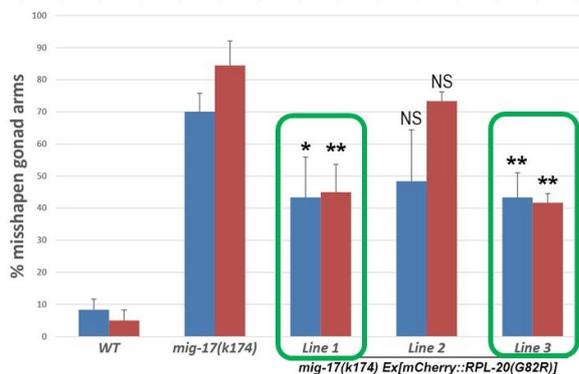


図 2 . mCherry-RPL-20(G82R) による *mig-17(k174)* 変異体 DTC 移動異常の抑圧
縦軸は生殖巣形態異常の割合、青と赤のバーはそれぞれ前後の生殖巣を示す。

(2) RPL-20(G82R)の組織特異的発現実験

変異型 RPL-20(G82R)を種々の組織特異的な promoter 下で過剰発現させ、*mig-17(k174)* 変異体の表現型を抑圧するかどうかを調べた。今回用いた promoter は、*myo-2* (咽頭)、*myo-3* (体壁筋)、*mig-24* (DTC)、*elt-2* (腸)である。

その結果、どの組織で RPL-20(G82R)を発現させた場合においても *mig-17(k174)* 変異体の表現型が抑圧された。また、*elt-2* (腸)で発現させたものは、最も顕著に *mig-17(k174)* 変異体の表現型が抑圧されるという結果となった。これらの結果は RPL-20(G82R)は分泌されてはいないが、何らかの分泌蛋白質を介して *mig-17* 変異体の抑圧に働いている可能性を示唆する。

(3) 翻訳開始制御の解析

リボソームタンパク質は、翻訳を制御する細胞小器官であり、翻訳の開始には翻訳開始因子がかかわる。PERK / PEK-1 や GCN1 / GCN-1 などのリン酸化酵素は、翻訳開始因子の1つである eIF2 α をリン酸化することで、翻訳の抑制を引き起こすと考えられている (Nukazuka et al., *Genes & Dev.* 22: 1025, 2008)。また、target of rapamycin (TOR)は、真核生物の翻訳開始因子(eIF2, eIF4)の上流で働いていると考えられている (Nukazuka et al., *Nature comm.* 2: 484, 2011)。

そこで *tk73* 変異による *mig-17(k174)* の生殖巣形成異常の抑圧がタンパク質の翻訳調節によるものかどうかを調べるため、*pek-1(ok275)*、*gcn-1(nc40)*、*rict-1(nc41)* と *unc-42(e270)* *mig-17(k174)* の 2 重変異体をそれぞれ掛け合わせにより作製した。結果、*mig-17(k174)* は *pek-1(ok275)*、*gcn-1(nc40)*、

rict-1(nc41) のすべてで抑圧、および増強されなかった。このことから、*rpl-20(tk73)* による *mig-17(k174)* の抑圧は、eIF2 α リン酸化および、TOR 経路を介したのではないことが示唆された。

(4) FLAG 融合 RPL-20 の発現確認および *mig-17* 表現型の抑圧活性

tk73 変異が入ることで、RPL-20 は *mig-17(k174)* の生殖巣異常を抑圧することから、RPL-20(G82R)は野生型 RPL-20(WT)で異なる相互作用因子が関わっている可能性がある。そこで、FLAG タグ付きの野生型 RPL-20(WT)および変異型 RPL-20(G82R)を作成し、免疫沈降法により相互作用因子の同定を行おうと考えた。

まず、野生型および *tk73* 変異型の RPL-20 の N 末端、C 末端に 2 \times FLAG 配列を付けたコンストラクトを作成し、トランスジェニック線虫を 3 Line ずつ作成した。それらの FLAG タグ付きの RPL-20 の発現をウエスタンブロット法にて確認した。

FLAG タグ付きの RPL-20 の分子量は約 23 kDa と予想され、20-30 kDa の間に野生型では見られないバンドが検出され、FLAG 融合 RPL-20 の発現を確認した。

今回作成した FLAG 融合 RPL-20(G82R)の *mig-17(k174)* 変異体の抑圧活性を調べた。N 末端 2 \times FLAG 融合 RPL-20(G82R)では、*mig-17(k174)* 変異体の異常を有意に抑圧したのに対して、C 末端 2 \times FLAG 融合 RPL-20(G82R)は異常を抑圧しなかった。このことから N 末端 2 \times FLAG 融合 RPL-20(G82R)は生殖巣形成異常の抑圧に機能的であることがわかった。また、免疫沈降には、抑圧活性の高かった N 末端 2 \times FLAG 融合 RPL-20(G82R)の Line 3 を使用することにした。

(5) FLAG 融合 RPL-20 の免疫沈降および結合タンパク質の確認

2 \times FLAG-RPL-20(G82R)の過剰発現による *mig-17(k174)* 変異体の異常の抑圧が観察され、最も抑圧の強かった Line 3 と 2 \times FLAG-RPL-20(WT)を比較することで *tk73* 変異型 RPL-20 に結合するタンパク質の違いを共免疫沈降法によって解析した。

まず、FLAG が免疫沈降されていることを確認した。anti-FLAG 抗体でのウエスタンブロットにより、20 と 25 kDa の間で野生型(ネガティブコントロール)にはないバンドが確認され、FLAG-RPL-20 が免疫沈降されていた。次に、免疫沈降を行ったサンプルを泳動し、

銀染色することで結合タンパク質を可視化した(図3)。FLAG-RPL-20を免疫沈降したサンプルは野生型と明瞭な差を確認することができた。しかし、FLAG-RPL-20(WT)とFLAG-RPL-20(G82R)でバンドパターンの明確な違いを見つけることはできなかった。

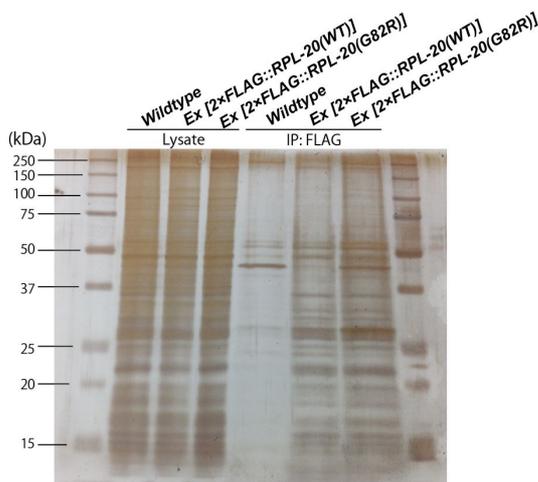


図3. 2xFLAG::RPL-20による免疫沈降FLAG抗体による免疫沈降物をSDS PAGE後、銀染色を行った。

これらのサンプルを用いてLC-MS/MS解析を行った。RPL-20がリボソームサブユニットであることから、当然リボソームサブユニットが多数検出されたが、これ以外のものの中でUNC-44 (Ankyrin-like), HRP-2 (nuclear ribonucleoprotein), NAP-1 (nucleosome assembly protein), LAF-1 (RNA helicase), CCT-6 (chaperonin)などが、野生型に比べて変異型RPL-20に結合しやすいと考えられる結果となった。これらの遺伝子についてRNAiを行い、*mig-17(k174)*変異体のDTC移動異常が抑制されるかを検討したが、有意な抑制は認められなかった。

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7件)

- Ishii, T., Funato, Y., Hashizume, O., Yamazaki, D., Hirata, Y., Nishiwaki, K., Kono, N., Arai, H., Miki, H. (2016). Mg²⁺ Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics* 12: e1006276. (査読有) DOI: 10.1371/journal.pgen.1006276
- Shibata, Y., Kawakado, Y., Hori, N., Tanaka, K., Inoue, R., Takano, T., Kubota, Y., Nishiwaki, K. (2016). Organ Length Control by

an ADAMTS Extracellular Protease in *Caenorhabditis elegans*. *G3(Bethesda)*. 6: 1449-1457. (査読有) DOI: 10.1534/g3.116.028019

- Kim, H.-S. and Nishiwaki, K. (2015). Control of the basement membrane and cell migration by ADAMTS proteinases: Lessons from *C. elegans genetics*. *Matrix Biol.* 44-46C:64-69. (査読有) DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.001
- Kikuchi, T., Shibata, Y., Kim, H.-S., Kubota, Y., Yoshina, S., Mitani, S. and Nishiwaki, K. (2015). The BED finger domain protein MIG-39 halts migration of distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 397: 151-161. (査読有) DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.10.008
- Huang, T-F., Cho, C-Y., Cheng, Y-T., Huang, J-W., Wu, Y-Z., Yeh, A. Y-C., Nishiwaki, K., Chang, S-C., and Wu, Y-C. (2014). BLMP-1/Blimp-1 Regulates the Spatiotemporal Cell Migration Pattern in *C. elegans*. *PLoS Genetics* 10(6): e1004428. (査読有) DOI: 10.1371/journal.pgen
- Kim, H.-S., Kitano, Y., Mori, M., Takano, T., Harbaugh, T. E., Mizutani, K., Yanagimoto, H., Miwa, S., Ihara, S., Kubota, Y., Shibata, Y., Ikenishi, K., Garriga, G., and Nishiwaki, K. (2014). The novel secreted factor MIG-18 acts with MIG-17/ADAMTS to control cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 196: 471-479. (査読有) DOI: 10.1534/genetics.113.157685
- Shibata, Y., Sawa, H., and Nishiwaki, K. (2014). HTZ-1/H2A.z and MYS-1/MYST HAT act redundantly to maintain cell fates in somatic gonadal cells through repression of *ceh-22* in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 141: 209-218. (査読有) DOI: 10.1242/dev.090746

[学会発表](計14件)

- Shibata, Y., Sakata, S., Kawakado, Y., Hori, N., Tanaka, K., Inoue, R., Takano, T., Kubota, Y., Nishiwaki, K. Regulation of pharynx size by apical and basal extracellular matrices in *C. elegans*. CDB Symposium 2016 2016/3/28-30 理化学研究所(兵庫県神戸市)
- Shibata, Y., Konakawa, R., Sawa, H., Nishiwaki, K. Cell-fate-determination mechanism that functions redundantly with BET family protein 第38回日本分子生物学会年会 2015/12/1-4 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- Kondo, S., Yamaoka, R., Kim, H.-S., Nishiwaki, K. Involvement of a ribosomal protein in the MIG-17/ADAMTS-dependent regulation of cell migration in *C. elegans* 第38回日本分子生物学会年会 2015/12/1-4 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- Sakata, S., Tanaka, K., Iseki, M., Nishiwaki, K. *pqn-74* regulates pharynx size in *C. elegans* 第

- 3 8 回日本分子生物学会年会 2015/12/1-4 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
5. Shibata, Y., Konakawa, R., Sawa, H., Nishiwaki, K. The TFIIH and SWI/SNF complexes are required for the cell fate maintenance in *C. elegans*. 20th International *C. elegans* Meeting, 2015/6/24-27 Los Angeles (USA)
 6. Shibata, Y., Takeshita, H., Konakawa, R., Sawa, H., Nishiwaki, K. The TFIIH complex and the SWI/SNF complex is required for the cell fate maintenance in *C. elegans*. 第 3 7 回日本分子生物学会年会 2014/11/25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
 7. Kim, H.-S., Nishiwaki, K. Nuclear membrane proteins act in transport of the Netrin receptor UNC-5 in cell migration in *C. elegans*. 第 3 7 回日本分子生物学会年会 2014/11/25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
 8. Morita, K., Nakaya, K., Kim, H.-S., Nishiwaki, K. Analysis of *flp-10* that controls migration of the gonadal leader cells in *C. elegans* 第 3 7 回日本分子生物学会年会 2014/11/25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
 9. Imanishi, A., Takano, T., Nishiwaki, K. Genetic interactions among ADAMTS metalloproteases and basement membrane molecules in cell migration in *C. elegans* 第 3 7 回日本分子生物学会年会 2014/11/25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
 10. Sakata, S., Tanaka, K., Iseki, M., Shibata, Y., Nishiwaki, K. *pqn-74* regulates pharynx size in *C. elegans* 3 7 回日本分子生物学会年会 2014/11/25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
 11. Kondo, S., Yamaoka, R., Kim, H.-S., Nishiwaki, K. Involvement of a ribosomal protein in the MIG-17/ADAMTS-dependent regulation of cell migration in *C. elegans* 3 7 回日本分子生物学会年会 2014/11/25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
 12. Kim, H.-S., Nishiwaki, K. Nuclear membrane proteins act in transport of the Netrin receptor UNC-5 in cell migration in *C. elegans*. The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014/7/15-19 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)
 13. Morita, K., Kim, H.-S., Nishiwaki, K. Analysis of *flp-10* that controls migration of the gonadal leader cells in *C. elegans*. The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014/7/15-19 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)
 14. Imanishi, A., Takano, T., Nishiwaki, K. Genetic interactions among ADAMTS metalloproteases and basement membrane molecules in cell migration in *C. elegans*. The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014/7/15-19 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

〔その他〕
ホームページ等
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~nishiwaki/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西脇 清二 (NISHIWAKI, Kiyoji)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号 : 30342827

(3) 連携研究者

金 憲誠 (KIM, Hon-Song)
関西学院大学・理工学研究科・博士研究員
研究者番号 : 70469899