

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891023

研究課題名(和文)細胞外二本鎖RNAの細胞間伝播機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanisms by which the extracellular dsRNA systemically spreads.

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身性RNAiに関する新規因子を同定するために、線虫*C. elegans*を用いて順遺伝学的なサプレッサースクリーニングを行い、全身性RNAiが効きにくい変異体(*rsd*変異体)における全身性RNAiの不全を抑圧する遺伝子変異体を取得した。遺伝子マッピングやトランスジェニックレスキュー実験を行う事で、そのうちの一つの原因遺伝子を同定した。同定した遺伝子は金属イオンを輸送すると考えられる溶質輸送体であり、最終年度は本輸送体の機能解析を中心に行い、本輸送体が小胞輸送の制御に関わる事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In *C. elegans*, dsRNA can systemically spread throughout the animal and lead to non-cell autonomous RNAi in cells distinct from the cells where dsRNA is originally introduced. This RNA silencing phenomenon is called the "systemic RNAi". Systemic RNAi is thought to largely depend on vesicle transport because clathrin-dependent endocytosis and several proteins that localize endomembrane systems have been shown to be involved in systemic RNAi. However, underlying molecular mechanisms by which dsRNA is secreted to the extracellular space and enters into cells still unclear. To identify new factors that is involved in systemic dsRNA spread, genetic screening in which a strain defective in systemic RNAi restores RNAi ability was performed using *C. elegans*. One of the causal genes of the mutants was identified and analyzed.

研究分野：生物学

キーワード：全身性RNAi

1. 研究開始当初の背景

血液などの体液中に RNA が存在することは古くから知られていたが、その生理的な意義については謎が多かった。こうした中、「マスト細胞が細胞外 RNA として機能的な microRNA と mRNA を細胞外に放出し、細胞外 RNA が別の細胞へ伝播する」という Valadi らの発見によって細胞間情報伝達における細胞外 RNA の重要性が認識されるようになった (Valadi et al., Nat Cell Biol 2007)。一方、RNAi 現象が最初に見出された *C. elegans* や一部の植物においては、dsRNA が細胞間を伝播し、細胞非自立的に遺伝子の発現を抑制する全身性 RNAi (systemic RNAi) という現象が RNAi の発見当初から知られていた (Fire et al., Nature 1998)。この現象は、一部の哺乳動物の培養細胞でも観察されることから、進化的に保存された機構であると考えられる。また、人工的な dsRNA に限らず、dsRNA 様の構造を持つ micro RNA の前駆体が細胞外に存在することから、生理的にも systemic RNAi と同様の機構が存在する可能性がある。

EpsinR はクラスリン及びホスホイノシタイド結合タンパク質で酵母や哺乳類細胞ではエンドソーム-ゴルジ体間の小胞輸送に関わることが示されている (Mills et al., J. Cell Biol 2003, Hirst et al., Mol Biol Cell 2003)。Plasterk らによって全身性 RNAi において線虫 EpsinR ホモログが生殖細胞に限定的に必要とされるということが報告されていたが (Tijsterman et al., Curr Biol 2004) 我々は systemic RNAi に関わる遺伝子のスクリーニングを通じて、EpsinR が普遍的に全身性 RNAi に不可欠であることを見出していた (投稿中)。他方、Hunter らによって、dsRNA が細胞膜を通過する為には SID-1 というチャネル分子が必要であることが示されてきた (Winston et al., Science 2002)。SID-1 は哺乳動物にもホモログが存在し、同様の機能を有することが示されている。しかし、SID-1 や EpsinR が dsRNA を取り込むメカニズムについては不明な点が多く、取り込みに関わる関連分子についても全く明らかになっていなかった。こうした中、我々は EpsinR 変異体の抑圧変異体スクリーニングを行い、抑圧変異体を取得していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞外 RNA が細胞内へ取り込まれる分子メカニズムを解明することである。そのために、線虫 EpsinR が systemic RNAi に関与するという事実を手がかりに研究を展開する。研究開始当初、EpsinR は dsRNA を受け取る側の細胞において必要であり、ホスホイノシタイドとの結合を担う ENTH ドメインの発現が全身性 RNAi に必要十分であることを明らかとしていた (投稿中)。そこで、

「systemic RNAi において細胞外 dsRNA が特定のホスホイノシタイドを介して細胞に取り込まれる」という仮説を検証し、その分子メカニズムを解明することを目指した。

また、細胞外 RNA の取り込みと分泌に関わる新たな分子ネットワークを解明するべく、単離したサプレッサー変異体を同定・解析を進めることを計画した。

3. 研究の方法

ホスホイノシタイドの修飾に関わる酵素遺伝子の遺伝子欠失変異体やドミナントネガティブ発現株、過剰発現株を用いて、ホスホイノシタイドが systemic RNAi に関与するか否かを検証する。また、既に単離している EpsinR サプレッサー変異体の原因遺伝子を同定する。同定したサプレッサー遺伝子の systemic RNAi における役割を調べるべく、変異体の解析と原因遺伝子がコードするタンパク質の発現パターン、細胞内局在を明らかにする。

4. 研究成果

ENTH ドメインはゴルジ体やエンドソームに多く存在するホスホイノシタイド (PI) である PI(4)P や PI(3,5)P₂ と結合する。PI と全身性 RNAi の関連性に迫るべく、*vps-34* 遺伝子の全身性 RNAi における必要性を検証した。最終的に、*vps-34* は全身性 RNAi に必要である可能性があるが、本遺伝子を端緒に解析を展開する事は困難であることが判明した。

先行論文では、*vps-34* を RNAi によってノックダウンした細胞や線虫を用いて、別の遺伝子に対する RNAi の効果を調べる事で、PI

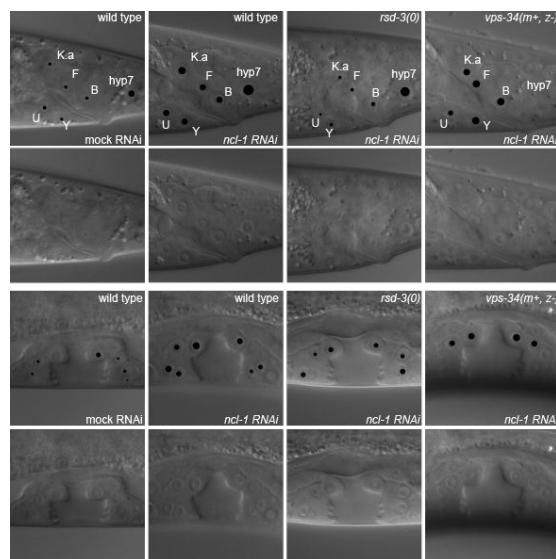


図1. 食餌法 *ncl-1* RNAi による各種変異体株における RNAi の効果の検証。*vps-34* 変異体においても RNAi は作用した。核小体を黒丸で示した。

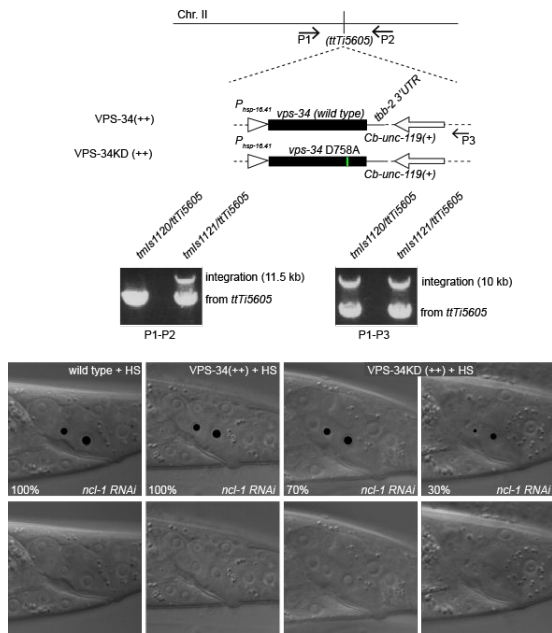


図2. 野生型と活性中心を破壊した VPS-34 を過剰発現する線虫の作出と、*ncl-1* RNAi による RNAi への関与の検証。MosSCI 法を用いて熱ストレスで VPS-34 を発現するコンストラクトのシングルコピーを Chr. II に挿入した。VPS-34(KD)を過剰発現する株では RNAi が効きにくくなる。

の RNAi への関与が示唆されていた (Saleh et al., Nature Cell Biol., 2006)。本研究では遺伝学的により厳密に PI の関与を明らかにし、更なるメカニズムの解析に用いることを意図して、RNAi によるロックダウンではなく、遺伝子機能破壊株を用いる事で *vps-34* の全身性 RNAi への関与を調べることにした。*vps-34* 遺伝子破壊株は、幼虫後期 (L4 期) に致死となる (Roggo et al., EMBO J 2002)。そこで L4 期よりも早い段階で RNAi の効果を評価するべく *ncl-1* RNAi を行い、核小体が大きくなる表現型を指標に *vps-34* の全身性 RNAi の効率を食餌法による RNAi により検証した。本手法では腸細胞から他の細胞への RNAi の伝播を評価する事が可能である。図1に示すように既知の RNAi 異常変異体では *ncl-1* RNAi が効かなくなるが、*vps-34* 変異体では *ncl-1* RNAi は正常に作用した。変異体株では母性効果により機能が残っている為に、RNAi 異常という表現型が検出されなかった可能性が考えられた。

そこで、野生型タンパク質と触媒部位に変異を導入したドミナントネガティブタンパク質の過剰発現株を作成した。野生型タンパク質の過剰発現株は正常に発生し、生殖可能であったが、ドミナントネガティブタンパク質の過剰発現株はタンパク質を誘導する前の状態においても大多数が不稔となった。不稔からの escaper を用いる事でドミナントネガティブタンパク質の発現を誘導させた場合の *ncl-1* RNAi の効果を調べたところ、低い浸透度 (30%程度) で RNAi が効かなくなる事を見出した (図2)。他方、野生型タンパク質の過剰発現株では全身性 RNAi が正常に作用したため、本分子による PI (3,5)P の余剰な

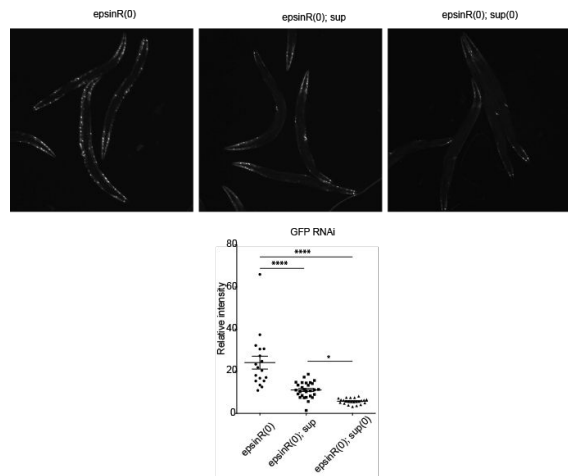


図3. *ccIs4251* (Pmyo-3::Mito+NLS-GFP) を有するそれぞれの変異体に対して *gfp* RNAi を feeding 法で行った。Egg から RNAi を開始し、96 時間後に day 1 adult の *gfp* 蛍光を比較した。*epsinR(0)* 変異体では RNAi の効きが悪く *gfp* に対する RNAi を行っても *gfp* 蛍光が残存する。スクリーニングで単離した株 (中) では *gfp* に対する RNAi が作用するようになる。抑圧遺伝子のノックアウトでは更に *gfp* が RNAi が作用する。

合成は dsRNA の伝搬に影響しないことが考えられた。

全身性 RNAi に関与する新規因子を同定するために、線虫 *C. elegans* を用いて順遺伝学的なサブレッサースクリーニングを行い、全身性 RNAi が効きにくい変異体 (*rsd* 変異体) における全身性 RNAi の不全を抑圧する遺伝子変異体を取得してきた。GFP に対する dsRNA を摂食により線虫体内に導入し、*rsd* 変異体の体壁筋における GFP の消光を指標にスクリーニングし、全身性 RNAi の不全を抑圧する変異体を複数単離した。遺伝子マッピングやトランスジェニックレスキュー実験を行う事で、そのうちの一つの原因遺伝子を同定した。また、独自に CRISPR-Cas9 法にて原因遺伝子のノックアウトを行ったところ、新たに取得したノックアウト株も順遺伝学手法で単離した株と同様に全身性 RNAi の不全に対する抑圧効果を示した。しかし、抑圧効果はスクリーニングで得られた点変異株と比べるとより強い抑圧効果を示した。従って、スクリーニングで得られた株は weak allele である事が示唆された。同定した遺伝子は金属イオンを輸送すると考えられる溶質輸送体であった。発現解析を行ったところ、本遺伝子は咽頭、腸、上皮など全身で広く発現している事が判明した。最終年度は本輸送体の機能解析を中心に行い、本輸送体が細胞内膜系に局在し、小胞輸送の制御に関わる事を明らかとした。加えて、既知の全身性 RNAi 関連遺伝子との遺伝学的相互作用を調べる事で、本分子が一部の分子と並行した経路あるいはそれらの下流で働く事が示唆された。働機能性 RNA の伝播に関わる新規因子として溶質輸送体を同定し、本輸送体を介した小胞輸送が dsRNA の伝播に関わる事を、現在、論文とし

て発表する準備を行っている。

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 2件)

1. Akiyoshi S, Nomura KH, Dejima K, Murata D, Matsuda A, Kanaki N, Takaki T, Mihara H, Nagaishi T, Furukawa S, Ando KG, Yoshina S, Mitani S, Togayachi A, Suzuki Y, Shikanai T, Narimatsu H, Nomura K. RNAi screening of human glycogene orthologs in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the construction of the *C. elegans* glycogene database. *Glycobiology*. 2015, 25(1):8-20.
2. Dejima K, Kang S, Mitani S, Cosman PC, Chisholm AD. Syndecan defines precise spindle orientation by modulating Wnt signaling in *C. elegans*. *Development*. 2014, 141(22):4354-65. This work was selected by F1000.

[学会発表](計 5件)

出嶋克史, Sukryool Kang, 三谷昌平, Pamela C. Cosman, Andrew D. Chisholm, 線虫 *C. elegans* の初期胚においてシンデカンは Wnt 依存的な紡錘体の制御に関わる 第 34 回日本糖質学会年会, 2015.08.02. (招待講演) 東京大学(東京都文京区)

松田采子, 村田大輔, 野村和子, 金氣菜々子, 力武茉莉花, 出嶋克史, 三谷昌平, 野村一也, 線虫 *C. elegans* の生殖幹細胞の自己複製に必要な GPI アンカー型タンパク質の同定, 第 34 回日本糖質学会年会, 2015.08.02. 東京大学(東京都文京区)

Mark Edgley, Vinci Au, Katsufumi Dejima, Lisa Fernando, Stephane Flibotte, Sayaka Hori, Satoru Iwata, Angela Miller, Tomoko Motohashi, Greta Raymant, Yuji Suehiro, Jon Taylor, Sawako Yoshina, Shohei Mitani, Donald Moerman, Comprehensive Biology: How do we complete the *C. elegans* Knockout Project. 20th International *C. elegans* Conference, 2015.6.24. ロサンゼルス(USA)

Yuji Suehiro, Sawako Yoshina, Tomoko Motohashi, Satoru Iwata, Katsufumi Dejima, Shohei Mitani, Risk of gene deletion in worms with impaired DNA repair machinery. 20th International *C. elegans* Conference, 2015.6.24. ロサンゼルス(USA)

出嶋 克史, 今江 理恵子, 三谷 昌平、線虫 *C. elegans* における全身性 RNAi を負に制御する因子の探索 第 37 回日本分子生物

学会年会 2014.11.25. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)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