

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890224

研究課題名（和文） siRNA の細胞内輸送の分子メカニズムに関する研究

研究課題名（英文） Molecular basis underlying intracellular transport of siRNA

研究代表者

中台 枝里子（鹿毛枝里子）（NAKADAI ERIKO）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40453790

研究成果の概要：RNAi が組織間を伝播する systemic RNAi は線虫において発見された現象であるが、様々な生物種で共通した機構である。本研究では systemic RNAi に必須な膜タンパク質 SID-1 に着目し、その生理機能を解析した。また systemic RNAi にはエンドサイトーシス経路の関与が示唆されていることから、一連のエンドサイトーシス経路の遺伝子群の線虫変異体を用いて体系的に RNAi の作用様式を解析した。その結果、systemic RNAi に関わる 2 つの遺伝子を新規に同定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：線虫、RNA 干渉

1. 研究開始当初の背景

RNAi が組織間を伝播する systemic RNAi は線虫において発見された現象であるが、様々な生物種で共通した機構である。これまでに SID-1 と呼ばれる膜タンパク質に変異が起こると、RNAi が組織・細胞を越えて伝播することができないという重要な知見が報告されている。SID-1 はヒトをはじめとする哺乳類においても保存されており、本来は systemic

RNAi とは別の重要な生命現象に関わっている可能性がある。SID-1 タンパク質は、dsRNA を細胞外から細胞内へ通過させる dsRNA チャネルであると一般には考えられているが、未だ議論が残るところである。一方で、ショウジョウバエの細胞を用いた実験により、dsRNA の細胞内取り込みにはエンドサイトーシス経路が重要な役割を果たしていることも示されている。また、線虫においても systemic RNAi にはエンドサイトーシス経路

の関与が示唆されている。このように RNAi の伝播の分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究は、SID-1 とエンドサイトーシスという2つの側面に着目し、systemic RNAi の分子的基盤の一端を明らかにすることを目的とする。

まず SID-1 の生理機能解析を行う。線虫には *sid-1* 遺伝子とそのパラログ *ZK721.1* 遺伝子が存在する。新規に変異体を作製し、systemic RNAi の異常を詳細に解析するとともに systemic RNAi とは別に本来何をしている分子なのかをエンドサイトーシスなどに着目して明らかにしたい。

さらに、既に分離されているエンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスに関わると思われる遺伝子の線虫変異体を用い、RNAi の作用様式を解析することで、小胞輸送の systemic RNAi における役割とそこで働く分子の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) *sid-1* 変異体分離と systemic RNAi における表現型の解析

線虫の既存の *sid-1* 変異体では、systemic RNAi が無効であることが知られているが、それ以外の表現型は見つかっていない。線虫には *sid-1* 遺伝子以外に、もう一つのパラログ遺伝子 *ZK721.1* が存在するが表現型は解析されていない。そこで新規に *sid-1* 変異体およびパラログ遺伝子変異体を分離し、解析を行うこととした。当研究室では、TMP と紫外線による欠失変異の導入と PCR スクリーニングによるハイスループットの変異体分離システムを確立しており、またスクリーニング用のライブラリとしては、現在線虫ゲノム上に存在する約2万個の全遺伝子に対して複数アリル分離可能なゲノム数の mutant bank を保有しているため、迅速な変異体分離が可能である。

次に、新規に分離した *sid-1* 変異体が確かに機能を欠損しているか、*ZK721.1* 遺伝子が systemic RNAi に対して *sid-1* と同様の機能を有するか検証するため、*ZK721.1* 欠失変異体において餌を介する RNAi (dsRNA 発現ベクターを導入した大腸菌を餌として線虫に与えて全身的な RNAi を起こす方法で、Systemic RNAi の一つ。)の効果を調べた。具体的には、

表現型を容易に識別できる *unc-22* 遺伝子に対する RNAi (筋肉の痙攣が起こる。体細胞での RNAi の検証) および、*pos-1* 遺伝子に対する RNAi (子供が胚性致死になる。生殖細胞での RNAi の検証) を行い、表現型がみとめられるかどうか検証した。

(2) 蛍光標識化 dsRNA や siRNA を用いた取り込み実験

dsRNA や siRNA の挙動を可視化するため Cy3 などで蛍光標識した RNA を用い、腸への取り込みや、偽体腔にマイクロインジェクションし、蛍光顕微鏡下で組織への取り込みを観察した。各種細胞内オルガネラマーカー(エンドソーム、リソソームなどの膜上に GFP などを発現するレポーター)を導入した線虫を用いることにより、dsRNA や siRNA の細胞内での挙動を経時的に追跡できる。上記の評価系を用いて *sid-1* 遺伝子、*ZK721.1* 遺伝子変異体の解析を行った。さらに、*sid-1* 遺伝子と *ZK721.1* 遺伝子が冗長して働いている可能性を考え、両遺伝子の変異体の交配により、*sid-1;ZK721.1* 二重変異体を作製し、表現型を調べた。

(3) systemic RNAi 以外の生理機能解析

通常的生活環境下では、線虫は外来性の RNAi を受けていないと考えられる。生理的に、*sid-1* 遺伝子、*ZK721.1* 遺伝子はどのような機能を持っているかが興味深い。これら遺伝子が、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス経路に関与する可能性を考え、以下のような実験を行い検証した。

まず *sid-1* 遺伝子、*ZK721.1* 遺伝子の変異体および二重変異体に分泌型 GFP を発現するレポーターを発現させ、分泌異常や coelomocyte による取り込み異常がないかを観察した。次に飢餓を加えた時のオートファジーの表現型(腸管細胞の萎縮)などの表現型を解析した。また細胞内オルガネラマーカー(エンドソーム、リソソーム、ゴルジ、ER などを発現させ、各オルガネラの形態、大きさなどの異常を調べた。

(4) エンドサイトーシスとエキソサイトーシス分子の変異体による解析

既知のエンドサイトーシスあるいはエキソサイトーシス関連分子について、変異体を作製、あるいは入手し、餌を介する RNAi による効果の有無を検証した。具体的には *unc-22* 遺伝子など数種類の遺伝子に対する大腸菌 RNAi クローンを用いて実験を行った。

4. 研究成果

(1-1) 新規 *sid-1* 遺伝子欠失変異体の分離

変異体の分離は欠失変異をランダムに導入し目的とする欠失変異を PCR でスクリーニングする TMP/UV 法を用いた。まず、新規の *sid-1* 遺伝子欠失変異体を 3 アリル (*tm2642*, *tm2663*, *tm2700*) を分離した。いずれもエクソン領域を大きく欠損していることから、機能欠損変異体であると考えられた。

(1-2) *sid-1* ホモログ遺伝子の同定と遺伝子欠失変異体の分離。 *sid-1* 遺伝子との二重変異体の作製

線虫には *sid-1* と高い相同性を持つ遺伝子、*ZK721.1* が存在することがわかった。そこで両遺伝子が冗長的に働く可能性も考え、*ZK721.1* 遺伝子の欠失変異体を 2 アリル (*tm2731*, *tm2744*) 分離した。いずれもエクソン領域を大きく欠損していることから、機能欠損変異体であると考えている。さらに二重変異体 (*tm2700*; *tm2731*) の作製を行った。

(1-3) systemic RNAi における表現型の解析

sid-1 変異体 (*tm2700*) および *sid-1* 遺伝子と *ZK721.1* 遺伝子との二重変異体 (*tm2700*; *tm2731*) についてはこれまでの報告通り、systemic RNAi が起こらないことを確認した。

(2) 蛍光標識化 dsRNA や siRNA の取り込み

線虫偽体腔に存在するマクロファージ様細胞の細胞内オルガネラを各種トランスジェニックマーカー (初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソーム) で可視化し、蛍光標識 RNA の細胞内挙動を観察した。*sid-1* 単独変異体、*ZK721.1* 単独変異体および二重変異体について解析を行ったが、野生株との間で顕著な差はみとめられなかった。

(3) systemic RNAi 以外の生理機能

SID-1 の本来の生理機能を知るため、*sid-1* 変異体および *sid-1*; *ZK721.1* 二重変異体について、発生や成長速度を野生型 N2 株と比較した。しかしいずれも顕著な差はみられなかった。より詳細な表現型解析を行うべく、種々のトランスジェニックマーカーの作製、導入を進めている。

SID-1 がエンドサイトーシス経路に関わる可能性を考え、CUP アッセイ (coelomocyte と呼ばれる線虫偽体腔に存在するマクロファージ様細胞によるエンドサイトーシスの評価) や RME アッセイ (oocyte によるピテロジェニンの受容体依存的エンドサイトーシス) を *sid-1* 変異体バックグラウンドで行っ

たが、野生型と差はなかった。また細胞内オルガネラのトランスジェニックマーカー (初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソーム) を用いた解析でも、各オルガネラの形態などに顕著な異常はみられなかった。

(4) エンドサイトーシス経路に関わる分子群の systemic RNAi への関与

既に分離済みであったエンドサイトーシス経路に関わるいくつかの遺伝子の変異体を用いて、餌を介した RNAi を行った結果、解析した数十遺伝子の変異体のうち、ある 2 つの遺伝子の変異体において RNAi 効果が減弱することを見いだした。現在詳細な解析を進めるとともに、同定された遺伝子と機能的に関与する遺伝子群の変異体を作製し、同様の表現型がみられるかを解析中である。

本研究課題の遂行により、*sid-1* 関連遺伝子の遺伝的に安定した株が得られ、systemic RNAi の解析を行なうための基盤作りができたと考えている。また systemic RNAi の発現に関与する新たなエンドサイトーシス関連遺伝子を同定したことは、今後 systemic RNAi の分子的基盤の理解に寄与するもの考えられる。

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 1 件)

Hayashi, Y., Hirotsu, T., Iwata, R., Kage-Nakadai, E., Kunitomo, H., Ishihara, T., Iino, Y. and Kubo, T., A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*, *Nature Neuroscience* (2009) in press, 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. 三谷 昌平, 安藤 恵子, 吉名 佐和子, 鴻宗義, 中台 枝里子, (他 2 名), NBRP「線虫」: 遺伝子機能解析のための欠失変異体の収集・保存・提供, 第 31 回日本分子生物学会, 第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.9, 神戸

2. 安藤 恵子, 中台 枝里子, 三谷昌平, 線虫を用いたメンブレントラフィック制御因子の体系的生理機能解析, 第 85 回日本生理学会, 2008.3.26, 東京

[その他]

NBRP ホームページアドレス

<http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中台 枝里子 (鹿毛枝里子)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号:40453790

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし