

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 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390063

研究課題名（和文）SID-1 分子の内在性リガンドの同定と応用

研究課題名（英文）Identification of endogenous SID-1 ligands

研究代表者

三谷 昌平 (MITANI SHOHEI)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：90192757

研究成果の概要（和文）：

RNAi（RNA 干渉）は、遺伝子機能阻害のための頻繁に使われる技術である。この現象が初めて線虫 *C. elegans* で発見された当初より、二本鎖 RNA が細胞間を伝播することが知られており、SID-1 という分子は、伝播する RNA 干渉の際の二本鎖 RNA の取り込みに必要であるとされる少数の蛋白質をコードする。我々は、エンドサイトーシスメカニズムが取り込みに関わっている可能性を検討するために、*vps-45* 遺伝子変異体を調べたところ、ほとんどの遺伝子については弱い表現型であったが、*gon-1* 遺伝子 RNAi を行うと、抵抗性であった。GON-1 蛋白質はメタロプロテアーゼをコードし、DTC と体壁筋での蛋白質の分泌に必要な分子であることが判明した。また、この分泌機能には、GON ドメインのみが必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

RNAi (RNA interference) is now a popular method to downregulate gene functions of interest. In *C. elegans*, it has been known that dsRNAs transmit from cells to other cells. This phenomenon is called as systemic RNAi and SID-1 protein is the representative gene that is required for dsRNA uptake in systemic RNAi. We searched for molecules involved in the phenomenon and found that animals are resistant to *gon-1* RNAi in the *vps-45* mutant background. GON-1 protein is a metalloprotease and necessary for secretion of various proteins from distal tip cells and body wall muscle cells. We found that GON domain alone is important for this secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、生理学一般

キーワード：分子・細胞生理学

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉 (RNAi) は、今現在、広く生命科学研究に使用されている遺伝子機能阻害技術の 1 つである。RNAi は最初に線虫でその現象

が発見された時より、組織・細胞間を伝播することが明らかになっており、その際には、SID-1 という膜蛋白質が必要であることが知られている。この分子は、高等生物にもホモ

ログが存在しており、高等生物でマイクロRNAが細胞間を伝播することが類似の現象の可能性はある。

2. 研究の目的

哺乳類細胞へのsiRNAの導入効率を上げるために、SID-1の関与を含むdsRNAの取り込み機構の分子メカニズムの解明を行うことを目的とした。また、siRNAが細胞から放出されることも必要であり、その現象の分子機構の解析も行うこととした。

3. 研究の方法

線虫個体を用いて、feeding RNAi (餌に二本鎖RNAを発現する大腸菌を供する)を行うと、標的遺伝子の機能阻害を行うことができる。内在性の遺伝子に対してRNAiを施すと、その遺伝子の機能低下の表現型が見られる場合がある。また、マーカーとしてGFPなどの蛍光蛋白質をトランスジェニック発現させておき、GFPに対してのRNAiを施すと、蛍光の消失が起こる。従って、各種のRNAiを用いることで、特定の遺伝子の機能喪失した遺伝子型がRNAiに関してのどのような表現型を呈するかを調べることが可能になる。

4. 研究成果

我々は、エンドサイトーシスに関わる分子VPS-45で非常に弱いRNAi伝播の現弱が見られたことから、これがSID-1と何らかの関わりを持っていると考えた。しかし、表現型が弱く、再現性が低いことから、表現型エンハンサーとなる遺伝子を探索した。VPS-45変異体にGON-1メタロプロテアーゼのfeeding RNAiを作用させると、ほとんど効果がみられず、個体は比較的健康である。一方、gon-1; vps-45二重変異体は極めて病的であり、gon-1がvps-45と共同して、RNAi伝播に関わる可能性が示唆された。GON-1の機能を解析したところ、積荷の種類によらず、体壁筋とdistal tip cellでの分泌に必須の分子であることが明らかになった。細胞への取り込みと細胞からの放出について、一層の解析を続ける予定である。また、エンドサイトーシスに関わる新規分子の単独変異で、RNAi伝播が起らなくなるものを見出した(投稿準備中)。

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31件)

(1) Yoshina S, Sakaki K, Yonezumi-Hayashi A, Gengyo-Ando K, Inoue H, Iino Y & Mitani S: Identification of a novel ADAMTS9/GON-1 function for protein transport from the ER to the Golgi. *Mol. Biol. Cell*, in press.

(2) Nawa M*, Kage-Nakadai E*, Aiso S,

Okamoto K, Mitani S, and Matsuoka M: Reduced Expression of BTBD10, an Akt activator, Drives Impairment of Motor Function. *Cell Death and Differentiation*, in press.

(3) Billi AC, Alessi AF, Khivansara V, Han T, Freeberg M, Mitani S and Kim JK: The *Caenorhabditis elegans* HEN1 ortholog, HENN-1, methylates and stabilizes select subclasses of germline small RNAs. *PLoS Genetics*, Apr 19, 8 (4) e102617 (2012).

(4) Murata D, Nomura KH, Dejima K, Mizuguchi S, Kawasaki N, Matsuishi-Nakajima Y, Ito S, Gengyo-Ando K, Kage-Nakadai E, Mitani S and Nomura K: GPI anchor synthesis in the distal tip cells is indispensable for development and differentiation of germline cells of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell*, 23 (6): 982-995 (2012).

(5) Kuwahara T, Tonegawa R, Mitani S, Iwatsubo T: Phosphorylation of α -synuclein at Ser129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane-binding property in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.*, Mar 2, 287(10):7098-109 (2012).

(6) Imae R, Inoue T, Nakasaki Y, Uchida Y, Ohba Y, Mitani S and Arai H: LYCAT, a homologue of *C. elegans* acl-8, acl-9 and acl-10, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice. *J. Lipid Res.*, 53(3); 335-47 (2012).

(7) Kage-Nakadai E, Kobuna H, Funatsu O, Otori M, Gengyo-Ando K, Yoshina S, Hori S and Mitani S: Single/Low-copy integration of transgenes in *Caenorhabditis elegans* by an ultraviolet and trimethylsolaren method. *BMC Biotechnology*, 12 (1), 1-9 (2012).

(8) Kishikawa J, Fujikawa M, Imamura H, Yasuda K, Noji H, Ishii N, Mitani S, and Yokoyama K: Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*. *Microscopy Research and Technique*, 75(1), 15-19 (2012).

(9) Kage-Nakadai E, Uehara T and Mitani S: Osmotic shock results in hmit induction in *C. elegans* glial and excretory canal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 410, 471-477

(2011).

(10) Nomura K, Murata D, Hayashi Y, Dejima K, Mizuguchi S, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Hirabayashi Y, Ito M and Nomura K: Ceramide glucosyltransferase of the nematode *Caenorhabditis elegans* is involved in oocyte maturation and in early embryonic cell division. *Glycobiology*, 21, 834-848 (2011).

(11) Imae R, Inoue T, Kimura M, Kanamori T, Hara N, Kage-Nakadai E, Mitani S, and Arai H: Intracellular PLAI and acyltransferase involved in *C. elegans* stem cell divisions determine the sn-1 fatty acyl chain of phosphatidylinositol. *Mol. Biol. Cell*, 21, 3114-3124 (2010).

(12) Dejima K, Murata D, Mizuguchi S, Nomura KH, Izumikawa T, Kitagawa H, Gengyo-Ando K, Yoshina S, Ichimiya T, Nishihara S, Mitani S and Nomura K: Two Golgi-resident 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters play distinct roles in heparan sulfate modifications and embryonic and larval development in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 285, 24717-24728 (2010).

(13) Kobuna H, Inoue T, Shibata M, Gengyo-Ando K, Yamamoto K, Mitani S, Arai H: Multivesicular Body Formation Requires OSBP-Related Proteins and Cholesterol. *PLoS Genetics*, 6(8), e1001055 (2010).

(14) Nakae I, Fujino T, Kobayashi T, Sasaki A, Kikko Y, Fukuyama M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Kontani K, Katada T: The Arf-like GTPase Arl8 mediates delivery of endocytosed macromolecules to lysosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell*, 21, 2434-2442 (2010).

(15) Alam H, Williams T, Yoshina S, Mitani S, and Hu PJ: EAK-7 controls development and lifespan by regulating nuclear DAF-16/FoxO activity. *Cell Metabolism*, 12, 30-41 (2010).

(16) Wang X, Li W, Zhao D, Liu B, Shi Y, Chen B, Yang H, Guo P, Geng X, Shang Z, Peden E, Kage-Nakadai E, Mitani S, and Xue D: *C. elegans* transthyretin-like protein TTR-52 mediates recognition of apoptotic cells by CED-1 phagocyte receptor. *Nature*

Cell Biol. 12, 655-664 (2010).

(17) Klassen MP, Wu YE, Maeder CI, Nakae I, Cueva JG, Lehrman EK, Tada M, Gengyo-Ando K, Wang GJ, Goodman M, Mitani S, Kontani K, Katada T and Shen K: An Arf-like small G protein, ARL-8, Promotes the axonal transport of presynaptic cargoes by suppressing vesicle aggregation. *Neuron* 66, 710-723 (2010).

(18) Ogura K, Mitani S, Gengyo-Ando K, Baillie DL, Kohara Y and Goshima Y: Protein phosphatase 2A cooperates with the autophagy-related kinase UNC-51 to regulate axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 137, 1657-1667 (2010).

(19) Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai, Mitani S and Xue D: Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science* 328, 327-334 (2010).

(20) Teramoto T, Sternick LA, Kage-Nakadai E, Sajjadi S, Siembida J, Mitani S, Iwasaki K and Lambie EJ: Combinatorial regulation of three TRPM channels governs magnesium homeostasis. *PLoS One*, 5(3), e9589 (2010).

(21) Kage-Nakadai E, Kobuna H, Kimura M, Gengyo-Ando K, Inoue T, Arai H, Mitani S: Two Very Long Chain Fatty Acid Acyl-CoA Synthetase Genes, *acs-20* and *acs-22*, Have Roles in the Cuticle Surface Barrier in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5 (1), e8857 (2010).

(22) Yamazaki Y, Akashi R, Banno Y, Endo T, Ezura H, Fukami-Kobayashi K, Inaba K, Isa T, Kamei K, Kasai F, Kobayashi M, Kurata N, Kusaba M, Matuzawa T, Mitani S, Nakamura T, Nakamura Y, Nakatsuji N, Naruse K, Niki H, Nitasaka E, Obata Y, Okamoto H, Okuma M, Sato K, Serikawa T, Shiroishi T, Sugawara H, Urushibara H, Yamamoto M, Yaoita Y, Yoshiki A, and Kohara Y: NBRP databases: Databases of biological resources in Japan. *Nucl. Acid Res* 38, D26-D32 (2010).

(23) Gu W, Shirayama M, Conte D Jr, Vasale JJ, Batista PJ, Claycomb JM, Keys J, Chen CG, Chaves DA, Duan SE, Kasschau KD, Falgren N, Mitani S, Carrington JC, Mello CC: Distinct Argonaute-mediated 22G-RNA

pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline. *Mol. Cell* 36, 231-244 (2009).

(24) Claycomb JM, Batista PJ, Pang KM, Gu W, Vasale JJ, van Wolfswinkel JC, Chaves DA, Shirayama M, Mitani S, Ketting RF, Conte D, Jr., and Mello CC: The Argonaute CSR-1 and Its 22G-RNA Cofactors Are Required for Holocentric Chromosome Segregation. *Cell* 139: 123-134 (2009).

(25) Lai H-J, Lo SJ, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D: Differential roles of *Caenorhabditis elegans* DNase II genes in apoptotic DNA degradation and development. *PLoS One* 4: e7348, 1-13 (2009).

(26) Ideo H, Fukushima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Dejima K, Nomura K & Yamashita K: Biological function of the *C. elegans* glycosphingolipid-binding galectin LEC-8. *J. Biol. Chem.* 284: 26493-501 (2009).

(27) Oishi A, Gengyo-Ando K, Mitani S, Mohri-Shiomi A, Kimura KD, Ishihara T and Katsura I: FLR-2, the glycoprotein hormone alpha 2 subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells*, 14:1141-54 (2009).

(28) Geng X, Zhou Q, Kage-Nakadai E, Shi, Yan N, Mitani S and Xue D: *C. elegans* caspase homolog CSP-2 inhibits CED-3 autoactivation and apoptosis in germ cells. *Cell Death and Differentiation*, 16:1385-94. (2009).

(29) Maekawa M, Inoue T, Kobuna H, Nishimura T, Gengyo-Ando K, Mitani S and Arai H: Functional analysis of GS28, an intra-Golgi v-SNARE, in *C. elegans*. *Genes to Cells*, 14:1003-13. (2009).

(30) Dejima K, Murata D, Mizuguchi S, Nomura KH, Gengyo-Ando K, Mitani S, Kamiyama S, Nishihara S, and Nomura K: The functional homolog of the human nucleotide-sugar transporter like protein (hUGTrel1) is involved in maintenance of ER homeostasis and essential for larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 23: 2215-2225 (2009).

(31) Kawai H, Tanji T, Shiraishi H, Yamada

M, Iijima R, Inoue T, Kezuka Y, Ohashi K, Yoshida Y, Tohyama K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Arai H, Ohashi-Kobayashi A, and Maeda M: Normal formation of *Caenorhabditis elegans* intestinal granules requires ABC transporters HAF-4 and HAF-9, which are highly homologous to human lysosomal peptide transporter TAPL (TAP-like). *Mol. Biol. Cell* 20, 2797-2990 (2009).

[その他]
ホームページ等
<http://www.twmu.ac.jp/Basic/physiol2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 昌平 (MITANI SHOHEI)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：90192757