

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790092

研究課題名(和文)二本鎖RNAの細胞間移動を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms involved in the intercellular transfer of double-stranded RNA

研究代表者

今江 理恵子 (Imae, Rieko)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60584000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：線虫 *C. elegans* では、二本鎖RNA (double-stranded RNA ; dsRNA) は細胞内においてRNA干渉 (RNAi) を引き起こすだけでなく、細胞外に分泌されて別の細胞にも伝搬し、RNAiを引き起こす (systemic RNAi) 。本研究では、systemic RNAiに関わるメンブレントラフィック関連遺伝子のスクリーニングを行い、その過程で、ヒトepsinRの線虫相同分子であるRSD-3が、全身の細胞においてdsRNAの細胞内取り込みの過程で機能すること、細胞内において主にtrans-golgi network(TGN)に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：RNA silencing signals in *C. elegans* spread among cells, leading to RNAi throughout the body. Here, we show that RNAi Spreading Defective-3 (rsd-3), which encodes a homolog of epsinR, a conserved ENTH (epsin N-terminal homology) domain protein, generally participates in cellular uptake of silencing RNA. RSD-3 is previously thought to be involved in systemic RNAi only in germ cells, but we isolated several deletion alleles of rsd-3, and found that these mutants are defective in the spread of silencing RNA not only into germ cells but also into somatic cells. RSD-3 is ubiquitously expressed, and intracellularly localized to the trans-Golgi network (TGN) and endosomes. Tissue-specific rescue experiments indicate that RSD-3 is required for importing silencing RNA into cells rather than exporting from cells. Our results suggest that endomembrane trafficking through the TGN and endosomes generally plays an important role in cellular uptake of silencing RNA.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：RNAi メンブレントラフィック

1. 研究開始当初の背景

二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) は細胞内において RNA 干渉 (RNAi) を引き起こすが、線虫 *C. elegans* を含むいくつかの生物種では、dsRNA は細胞外に分泌されて別の細胞にも伝搬し、RNAi を引き起こす。この現象は systemic RNAi と呼ばれており、これに類似した現象は哺乳動物細胞でも観察されることから、dsRNA の細胞間移動は進化的に保存された現象であると考えられる。線虫において、dsRNA の細胞間移動に関わる分子としては dsRNA のトランスポーターである SID-1 が同定されており、dsRNA の細胞内への取り込みに関わることが知られている。一方、ショウジョウバエ S2 細胞においては、dsRNA の取り込みにはエンドサイトーシスが関わることが報告されており、線虫においても同様のメカニズムが保存されていることが示唆されている。また最近、エンドソームに局在する SID-5 という分子が、dsRNA の細胞からの分泌において機能することが報告された。このように、systemic RNAi にはメンブレントラフィックが重要な役割を担うことが予想されるが、具体的にどのような輸送経路が関わるのか、全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、メンブレントラフィック関連遺伝子に焦点を当て、dsRNA がどのようにして細胞内外を移動するのか、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) systemic RNAi に関わる遺伝子の探索

systemic RNAi に関わるメンブレントラフィック関連遺伝子を同定するため、エンドサイトーシス関連遺伝子や小分子 G 蛋白質など、様々なメンブレントラフィック関連遺伝子の線虫変異体を用いて、systemic RNAi に異常を示すものを探索した。systemic RNAi のアッセイ系には、線虫における RNAi の手法として汎用される feeding RNAi 法を用い、RNAi のターゲット遺伝子には、体細胞で機能する *bli-3* と生殖腺で機能する *pos-1* を用いた。

(2) RSD-3 の発現部位の解析

RSD-3 の発現組織を明らかにするために、*rsd-3* のゲノム領域の C 末側に GFP を付加したトランスジーンを発現する株を作成し、観察した。また、RSD-3 の細胞内局在を明らかにするために、各オルガネラマーカーを用いて解析した。具体的には、上皮細胞に C 末に ECFP を付加した RSD-3 を発現させ、同時に Venus を付加した各オルガネラマーカー (初期エンドソーム、後期エンドソーム、medial Golgi、trans-Golgi network (TGN)) を発現させて、局在を観察した。また、coelomocyte において各オルガネラマーカー (GFP) を発

現するストレインに C 末に mCherry を付加した RSD-3 を発現させることにより、coelomocyte における局在も解析した。

(3) RNAi マシナリー自体への寄与の解析

RSD-3 が RNAi のマシナリーそのものに関与するかどうか調べるため、*rsd-3* 変異体において、生殖腺及び体細胞における RNAi の機構が正常かどうか、以下の方法で確認した。生殖腺については、生殖腺で機能する遺伝子である *pos-1* の dsRNA を様々な濃度で生殖腺にインジェクションし、生まれた卵の胚致死率をカウントした。体細胞については、体壁筋に GFP を発現するトランスジェニック体のバックグラウンドで体壁筋に GFP に対する dsRNA を発現させ、GFP の消光の度合いを観察した。

(4) RSD-3 が機能する細胞の同定

Feeding RNAi においては、まず摂取した大腸菌由来の dsRNA は腸細胞に取り込まれ、いったん擬体腔と呼ばれる線虫の組織間を満たす空間に dsRNA が放出される。その後、全身の細胞が擬体腔の dsRNA を取り込むことにより、全身の細胞で RNAi が引き起こされる。そこで、RSD-3 が腸細胞での取り込み・放出の過程で機能しているのか、擬体腔に放出された後の個々の細胞への取り込みの過程で機能しているのかを調べた。ここでは、体壁筋で GFP を発現する株をバックグラウンドとして用いて、GFP に対する feeding RNAi の効果を評価した。

(5) RSD-3 のドメイン解析

RSD-3 は N 末側にホスホイノシタイドと結合する ENTH ドメイン、C 末側にクラスリン及びクラスリンアダプター結合モチーフを持つ。RSD-3 の機能メカニズムの一端を明らかにするために、どの領域が機能に必要なかを調べた。

4. 研究成果

(1) systemic RNAi に関わる遺伝子の探索

様々なメンブレントラフィック関連遺伝子の変異体に対して feeding RNAi を行ったところ、マクロピノサイトーシスを制御する *ctbp-1* に変異を有する RB733 というストレインにおいて、RNAi の効きが体細胞、生殖腺共に顕著に減弱していることが明らかになった。しかし、この変異体は *ctbp-1* でレスキューされないこと、他の *ctbp-1* 変異体では同様の表現型は観察されないことから、RB733 には *ctbp-1* 以外に変異を有しており、そちらが systemic RNAi に関与している可能性が考えられた。そこで次世代シーケンサーを用いて RB733 の全ゲノムシーケンスを解析したところ、*rsd-3* (RNAi Spreading Defective-3) という遺伝子に変異が入っていることが明らかになった。*ctbp-1* の変異と *rsd-3* の変異を分離したところ、*rsd-3* の変

異のみで、体細胞、生殖腺共に systemic RNAi の異常が見られたこと、この表現型は *rsd-3* の導入によりレスキューされたこと、*rsd-3* の他の変異体を作成し、そちらでも同様の表現型が見られたことから、*rsd-3* が体細胞、生殖細胞共に、systemic RNAi に重要であることが分かった。

rsd-3 は、哺乳動物細胞においてエンドソーム-ゴルジ体間の小胞輸送に関わる epsinR の線虫相同分子をコードしている。*rsd-3* は、systemic RNAi に関わる遺伝子のスクリーニングで同定された分子であるが (Tijsterman *et al*, 2004)、生殖腺においてのみ関わるとされており、これまでに詳細な解析は行われていなかった。Tijsterman らが単離した *rsd-3* 変異体は、トランスポゾン Tc1 が *rsd-3* 遺伝子の中に挿入されたストレインであるが、我々はこの変異体の体細胞では Tc1 の大部分がスプライシングなどによって抜け落ちていることを確認しており、実際、体細胞においては機能的な RSD-3 が発現していることも確認した。

(2) RSD-3 の発現部位の解析

rsd-3 のゲノム領域の C 末側に GFP を付加したトランスジーンを発現する株を作成し、観察した結果、RSD-3::GFP が神経や咽頭、腸、筋、上皮、coelomocyte など、全身の細胞において確認された。このことから、RSD-3 はユビキタスに発現することが分かった。RSD-3::GFP は、細胞内ではドット状及び細胞質に見られたことから、何らかのオルガネラ及び細胞質に存在すると考えられた。そこで次に、RSD-3 の細胞内局在を調べた。上皮細胞において、RSD-3::ECFP 及び Venus 付加した各種オルガネラマーカーを発現させ、局在を観察した結果、RSD-3::ECFP は主に TGN マーカーと良く共局在し、一部初期エンドソームや後期エンドソームマーカーとも部分的に共局在、あるいは近接して存在する様子が見られた。この結果から、RSD-3 は細胞内において主に TGN に局在し、一部はエンドソームにも局在することが明らかになった。また、coelomocyte においても同様の局在を示すことが確認された。RSD-3 の哺乳動物相同分子である epsinR も、同様の細胞内局在を示すことが報告されていることから、RSD-3 は epsinR と同様、エンドソーム-ゴルジ体の小胞輸送経路を制御していることが示唆される。

(3) RNAi マシナリー自体への寄与の解析

生殖腺に様々な濃度の *pos-1* dsRNA をインジェクションし、胚致死率をカウントしたところ、いずれの濃度においても *rsd-3* 変異体では野生株と同程度の胚致死率が見られた。また、GFP を発現する体壁筋において GFP に対する dsRNA を発現させた場合にも、*rsd-3* 変異体では野生株と同程度の GFP の消光が見られた。これらの結果から、RSD-3 は生殖腺、

体細胞共に、RNAi のマシナリー自体には寄与していないことが明らかになった。

(4) RSD-3 が機能する細胞の同定

rsd-3 変異体において体壁筋特異的、あるいは腸特異的に RSD-3 を発現させ、体壁筋における feeding RNAi の異常がレスキューされるかを検討した結果、体壁筋特異的な RSD-3 発現によりレスキューが確認されたが、腸特異的発現ではレスキューが見られなかった。この結果から、RSD-3 は dsRNA を分泌する細胞ではなく、取り込む細胞において機能することが示唆された。さらに、擬体腔に *pos-1* dsRNA をインジェクションし、生殖腺での RNAi が起こるかどうかを解析したところ、*rsd-3* 変異体では RNAi が起きにくいことが分かった。このことから、RSD-3 は様々な細胞種において、dsRNA を分泌する細胞ではなく、取り込む細胞で機能することが明らかになった。

(5) RSD-3 のドメイン解析

rsd-3 変異体に RSD-3 の N 末側 (ENTH ドメイン)のみ、あるいは C 末側のみを発現させ、systemic RNAi の異常をレスキューするか解析した。その結果、N 末側 (ENTH ドメイン)のみで異常を十分に回復できるが、C 末領域のみでは全く回復できないことが分かった。この結果から、RSD-3 の機能にはクラスリンとの結合は必要なく、ENTH ドメインのみで十分であることが明らかになった。

ENTH ドメインの最も N 末端には、脂質と結合するとヘリックスを形成する、0モチーフと呼ばれる領域が存在し、膜との結合に必須であることが知られている。一方、ENTH ドメイン含有タンパクである epsin1 は、メンブレントラフィックにおける機能の他に、核内において転写に関わる機能も有することが示唆されている。そこで、0モチーフを欠損する ENTH ドメインを発現させて、*rsd-3* 変異体の systemic RNAi の異常をレスキューするか解析したところ、全く回復できないことが分かった。この結果から、RSD-3 の機能には膜との結合が必須であり、メンブレントラフィックの制御を介して機能していることが示唆された。

本研究により、RSD-3 が全身の細胞において dsRNA の取り込みの過程で機能することが明らかになった。また、dsRNA の細胞内取り込みにおいて、エンドソーム-ゴルジ体の小胞輸送が重要な役割を果たすことが示唆された。今後、RSD-3 がどのような分子のどこからどこへの輸送を担っているかを解析することにより、dsRNA 輸送の詳細なメカニズムを明らかにしたい。

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 6 件)

1. The Tumor Suppressor BCL7B Functions in the Wnt Signaling Pathway. Uehara T, Kage-Nakadai E, Yoshina S, Imae R, Mitani S. PLoS Genet. 2015 Jan 8;11(1):e1004921. doi: 10.1371/journal.pgen.1004921. 査読あり
2. A conditional knockout toolkit for *Caenorhabditis elegans* based on the Cre/loxP recombination. Kage-Nakadai E, Imae R, Suehiro Y, Yoshina S, Hori S, Mitani S. PLoS One. 2014 Dec 4;9(12):e114680. doi: 10.1371/journal.pone.0114680. 査読あり
3. Methods for single/low-copy integration by ultraviolet and trimethylpsoralen treatment in *Caenorhabditis elegans*. Kage-Nakadai E, Imae R, Yoshina S, Mitani S. Methods. 2014 Aug 1;68(3):397-402. doi: 10.1016/j.jymeth.2014.02.036. 査読あり
4. Mitochondria-type GPAT is required for mitochondrial fusion. Ohba Y, Sakuragi T, Kage-Nakadai E, Tomioka NH, Kono N, Imae R, Inoue A, Aoki J, Ishihara N, Inoue T, Mitani S, Arai H. EMBO J. 2013 May 2;32(9):1265-79. doi: 10.1038/emboj.2013.77. 査読あり
5. *C. elegans* Deletion Mutant Consortium. G3 (Bethesda). 2012 Nov;2(11):1415-25. doi: 10.1534/g3.112.003830. (個々の著者名は本文中に記載) 査読あり
6. Ablation of ALCAT1 mitigates hypertrophic cardiomyopathy through effects on oxidative stress and mitophagy. Liu X, Ye B, Miller S, Yuan H, Zhang H, Tian L, Nie J, Imae R, Arai H, Li Y, Cheng Z, Shi Y. Mol Cell Biol. 2012 Nov;32(21):4493-504. doi: 10.1128/MCB.01092-12. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Imae R, Mitani S, Arai H. Characteristic fatty acid composition in the sn-1 position of phosphatidylinositol; Formation and biological significance. 6th International Conference Phospholipase A2 and Lipid Mediators. 2015. 2. 10, 京王プラザホテル(東京・新宿)

2. 今江 理恵子, 三谷 昌平, 新井 洋由 ホスファチジルイノシトールの sn-1 位に豊富なステアリン酸の導入に関わる酵素の同定、第 87 回日本生化学会大会、2014. 10, 17, 国立京都国際会館(京都・京都市)
3. Imae R, Mitani S, Arai H. Analysis of the molecular mechanisms involved in the cellular uptake of double-stranded RNA, Asia-Pacific *C. elegans* Meeting 2014, 2014. 7. 18, 奈良県新公会堂(奈良・奈良市)
4. Imae R, Mitani S, Arai H. Characteristic fatty acid composition in the sn-1 position of phosphatidylinositol; Formation and biological significance. 2014 FASEB Summer Research Conference: Phospholipid Cell Signaling and Metabolism in Inflammation and Cancer, 2014. 6. 4, (Niagara Falls, USA)

〔図書〕(計 2 件)

1. 今江 理恵子, 新井 洋由 「ホスファチジルイノシトールの特徴的脂肪酸鎖の形成機構と生物学的意義」医学のあゆみ, 248 巻 13 号, p.1099-1104, 2014.
2. 今江 理恵子, 三谷 昌平, 新井 洋由 「線虫を用いたホスファチジルイノシトールの脂肪酸組成を規定する酵素群の同定」遺伝子医学 MOOK 24 号, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

今江 理恵子 (Rieko Imae)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号: 60584000

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし