

**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：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870759

研究課題名(和文) ADAMTS9による蛋白質輸送制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of a novel ADAMTS9 function for protein transport

## 研究代表者

茂泉 佐和子(吉名佐和子)(Moizumi (Yoshina), Sawako)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00424672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：線虫*C.elegans*において、ADAMTS9のホモログであるGON-1の機能を抑制することにより、インスリン分泌細胞におけるインスリン分泌と、末梢組織におけるインスリンシグナル伝達経路のどちらが阻害されるかを検討した。その結果、GON-1の機能抑制により、インスリン分泌とインスリンシグナル伝達経路の両方が阻害されていることが示唆された。さらに、GONドメインのみを発現させることにより、上記の表現型が抑圧されることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that an ADAMTS9 gene variant is associated with type 2 diabetes. The underlying pathology of type 2 diabetes is insulin resistance and beta-cell dysfunction. However, the molecular mechanisms underlying ADAMTS9 function in beta cells and peripheral tissues are unknown.

We investigated whether GON-1, the *C.elegans* homolog of ADAMTS9, is involved in the insulin secretion and insulin signaling in *C.elegans*. We found that both insulin secretion and the insulin-signaling pathway are compromised by GON-1 depletion. These defects in *gon-1* mutants were restored by GON domain expression. These data suggest that the GON domain of GON-1 is involved in protein secretion from insulin secretory cells and in insulin/IGF-like signaling at peripheral tissues.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ADAMTS9 2型糖尿病 *C.elegans*

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ADAMTS9は2000年に初めて報告された蛋白質分解酵素である。これまで本酵素は細胞外に分泌され、細胞外マトリックスを分解し、細胞移動に関与するといわれてきた。ADAMTS9のホモログは線虫 *C. elegans* にも存在し、「*gon-1*」という遺伝子名で知られていた。GON-1はADAMTS9と同様に、細胞移動に関与すると報告されていた。さらに *C. elegans* において GON-1 の発現を抑制することにより、GON-1 の発現細胞内の膜構造に異常を来すことが報告されていた。この現象は、既知の細胞外における GON-1 の機能からは、説明がつかないと考え、GON-1/ADAMTS9 の新たな機能を解明するため研究を行い、申請者は、以下の事を見いだした。

- ADAMTS9/GON-1 が細胞外だけではなく、ER 内でも機能している。
- ADAMTS9/GON-1 は ER 内で ER-Golgi 間の蛋白質輸送に関与する。
- ADAMTS9/GON-1 の ER 内での機能には、C 末端に存在する GON ドメインが ER に存在する事が必要であり、プロテアーゼとしての活性は必要ない。

(2) ヒトにおいて、ADAMTS9 の SNP は 2 型糖尿病のリスク遺伝子の 1 つであることが報告されている。しかし、ADAMTS9 の機能と 2 型糖尿病発症メカニズムの関連は不明である。ADAMTS9 が関与する ER - Golgi 間の蛋白質輸送におけるメカニズムを解明する事により、2 型糖尿病など蛋白質輸送の破綻が関連する疾患の理解を深めることができると考えられた。

## 2. 研究の目的

蛋白質の輸送は細胞が正常に機能するために必須なばかりでなく、神経伝達物質の放出や膵臓からのインスリン分泌をはじめとする調節性分泌、抗原提示など、高等多細胞生物特有の高次機能を支える細胞の基本的活動としても重要である。したがってその破綻は種々の疾患に直結している。

上述した研究成果から、申請者は ADAMTS9/GON-1 がインスリンシグナルに関与している可能性を考え、検証を行うことを目的とした。このことにより、蛋白質輸送の破綻に起因する病態の理解を深め、医学上の展開の基盤とすることを目指した。

## 3. 研究の方法

ヒトにおいて、ADAMTS9 の SNP は 2 型糖尿病のリスク遺伝子の 1 つであることが報告されていることから、線虫 *C. elegans* を用い、ADAMTS9/GON-1 とインスリンシグナルの関連を検討した。

(1) インスリン分泌細胞における GON-1 の機能を検討するための実験を行った。

① *C. elegans* の神経において蛍光タンパクが結合したインスリン様ペプチド (INS-7::mCherry と DAF-28::GFP) を発現させたトランスジェニック株を作成した。この株を用い、*gon-1* の欠損株 (*tm3146*) における INS-7::mCherry と DAF-28::GFP の分泌能を検討した。また、GON ドメインを発現させることにより、これらインスリン様ペプチドの分泌に影響が現れるか否かを検討した。

② *C. elegans* において蛍光タンパクが結合した TGF- $\beta$  ホモログ (DAF-7::mCherry) を発現させたトランスジェニック株を作成した。この株を用い、*gon-1* の欠損株 (*tm3146*) において DAF-7::mCherry が正常に分泌されるか否かを検討した。

③ *C. elegans* において蛍光タンパクが結合した insulin-like receptor の antagonist (INS-18::Venus) を発現させたトランスジェニック株を作成した。この株を用い、*gon-1* の欠損株 (*tm3146*) において INS-18::Venus が正常に分泌されるか否かを検討した。

(2) 末梢組織における GON-1 の機能を検討するための実験を行った。

蛍光タンパクが結合した DAF-16 (FOXO の線虫ホモログ) を発現させたトランスジェニック株 (*muIs71*) を用い、*gon-1* 遺伝子を欠損した際に、DAF-16 の局在がどのように変化するかを検討した。さらに、筋肉 または神経 または これら両方で GON ドメインを発現させた際に、DAF-16 の局在がどのように変化するかを検討した。

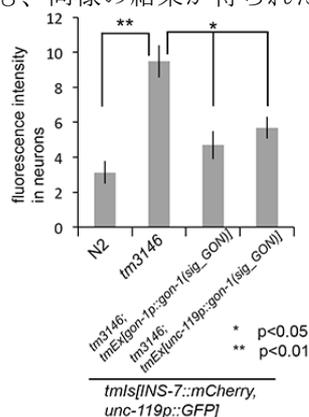
(3) *C. elegans* においてインスリンシグナルは dauer 形成や寿命に関係していることが知られているため、*gon-1* 欠損株や GON ドメインを過剰発現させた株では dauer 形成や寿命が変化しているかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) インスリン分泌細胞における GON-1 機能の検討

① INS-7::mCherry を発現させたトランスジェニック株を用い、*gon-1* 遺伝子の欠損により INS-7::mCherry の分泌に影響を及ぼすか否かを検討した。その結果、*gon-1* 欠損株では INS-7::mCherry の分泌が抑制されていた。この表現型は、GON ドメインを神経特異的プロモーターの下流で発現させた場合も、*gon-1* プロモーターの下流で発現させた場合も抑圧された。(図 1)

DAF-28::GFP を発現させたトランスジェニック株において *gon-1* 遺伝子を欠損させた場合も、同様の結果が得られた。この表現型は、

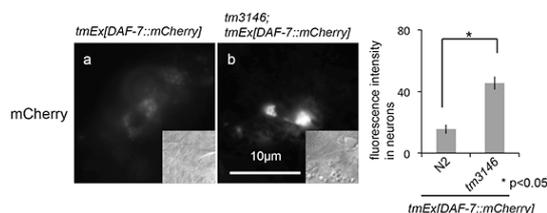


*daf-28* または *gon-1* プロモーターの下流で GON ドメインを発現させることにより抑圧された。

<図 1、インスリン分泌細胞内における INS-7 の蓄積量 (Yoshina *et al.* 2015)>

\**unc-119p*, 神経特異的プロモーター、神経細胞のマーカーとして用いた。

②DAF-7::mCherry を発現させたトランスジェニック株用い、*gon-1* 遺伝子の欠損によって DAF-7::mCherry の分泌がどのように変化するかを検討した。その結果、*gon-1* 欠損株 (*tm3146*) では DAF-7 の分泌が抑制されることを見いだした。(図 2)



<図 2、神経細胞内における DAF-7 の蓄積 (Yoshina *et al.* 2015)>

③INS-18::Venus を発現させたトランスジェニック株用い、*gon-1* 遺伝子の欠損によって INS-18::Venus の分泌がどのように変化するかを検討した。その結果、*gon-1* (*tm3146*) では INS-18 の分泌が抑制されることを見いだした。

(2) DAF-16 (FOXO の線虫ホモログ) を発現させたトランスジェニック株 (*muIs71*) を用い、GON-1 の有無による DAF-16 の局在変化を検討した結果、*gon-1* (*tm3146*); *muIs71* では DAF-16 が核に強く局在するようになることを見いだされた。この表現型は、体壁筋特異的 または 神経特異的プロモーターを用いて GON ドメインを発現させた際には抑圧されなかった。しかし、体壁筋と神経の両方で GON ドメインを発現させた際には、体壁筋の核における DAF-16 の局在は抑圧された。

(3) *gon-1* 変異では DAF-7 (TGF-β ホモログ) やインスリン様ペプチドの分泌が低下していたことから、*gon-1* 変異体における dauer 形成率を検討した。その結果、野生型と比べ

て *gon-1* (*tm3146*) の方が dauer の形成率が高かった。さらに寿命を測定した結果、*gon-1* (*tm3146*) は野生型よりも寿命が長いことを見いだされた。逆に GON ドメインを過剰発現させたトランスジェニック株では、寿命が短くなった。*C. elegans* において *daf-2* (insulin/insulin-like growth factor (IGF) receptor のホモログ) の変異株は長寿であることが知られているが、この *daf-2* 変異体に GON ドメインを過剰発現させることにより、*daf-2* 変異体の寿命が短くなった。

以上の結果より、*C. elegans* において GON-1 の機能抑制により、インスリン分泌とインスリンシグナル伝達経路の両方が阻害されていることを見いだした。さらに、インスリン以外の DAF-7 (TGF-β ホモログ) 等のタンパクの分泌も抑制されていた。タンパクの分泌が抑制されることにより *gon-1* 変異体では dauer 形成が促進され、長寿になると考えられた。ADAMTS9/GON-1 が関わる蛋白質輸送機構については今後の研究課題である。

## 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 11 件)

- ① Yoshina S, Suehiro Y, Kage-Nakadai E, Mitani S. Locus-specific integration of extrachromosomal transgenes in *C. elegans* with the CRISPR/Cas9 system. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 査読有  
Volume 5, March 2016, Pages 70-76  
DOI:10.1016/j.bbrep.2015.11.017
- ② Chen AT, Guo C, Itani OA, Budaitis BG, Williams TW, Hopkins CE, McEachin RC, Pande M, Grant AR, Yoshina S, Mitani S, Hu PJ. Longevity Genes Revealed by Integrative Analysis of Isoform-Specific *daf-16*/FoxO Mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 査読有  
2015 Oct;201(2):613-29.  
DOI: 10.1534/genetics.115.177998.
- ③ Yoshina S, Mitani S. Loss of *C. elegans* GON-1, an ADAMTS9 Homolog, Decreases Secretion Resulting in Altered Lifespan and Dauer Formation. *PLoS One*. 査読有  
2015 Jul 28;10(7):e0133966.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0133966.
- ④ Uehara T, Kage-Nakadai E, Yoshina S, Imae R, Mitani S. The Tumor Suppressor

- BCL7B Functions in the Wnt Signaling Pathway.  
 PLoS Genet. 査読有  
 2015 Jan 8;11(1):e1004921.  
 DOI: 10.1371/journal.pgen.1004921.
- ⑤ Kage-Nakadai E, Imae R, Suehiro Y, Yoshina S, Horii S, Mitani S. A conditional knockout toolkit for *Caenorhabditis elegans* based on the Cre/loxP recombination.  
 PLoS One. 査読有  
 2014 Dec 4;9(12):e114680. DOI: 10.1371/journal.pone.0114680.
- ⑥ Kikuchi T, Shibata Y, Kim HS, Kubota Y, Yoshina S, Mitani S, Nishiwaki K. The BED finger domain protein MIG-39 halts migration of distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*.  
 Dev Biol. 査読有  
 2015 Jan 15;397(2):151-61.  
 DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.10.008.
- ⑦ Wu Y, Cheng S, Zhao H, Zou W, Yoshina S, Mitani S, Zhang H, Wang X. PI3P phosphatase activity is required for autophagosome maturation and autolysosome formation.  
 EMBO Rep. 査読有  
 2014 Sep;15(9):973-81.  
 DOI: 10.15252/embr.201438618.
- ⑧ 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. 査読有  
 2015 Jan;25(1):8-20.  
 DOI: 10.1093/glycob/cwu080.
- ⑨ Kage-Nakadai E, Imae R, Yoshina S, Mitani S. Methods for single/low-copy integration by ultraviolet and trimethylpsoralen treatment in *Caenorhabditis elegans*. Methods. 査読有  
 2014 Aug 1;68(3):397-402. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.02.036.
- ⑩ Xie C, Miyasaka T, Yoshimura S, Hatsuta H, Yoshina S, Kage-Nakadai E, Mitani S, Murayama S, Ihara Y. The homologous carboxyl-terminal domains of microtubule-associated protein 2 and TAU induce neuronal dysfunction and have differential fates in the evolution of neurofibrillary tangles.  
 PLoS One. 査読有  
 2014 Feb 25;9(2):e89796.  
 DOI: 10.1371/journal.pone.0089796.
- ⑪ Ding YH, Du YG, Luo S, Li YX, Li TM, Yoshina S, Wang X, Klage K, Mitani S, Ye K, Dong MQ. Characterization of PUD-1 and PUD-2, two proteins up-regulated in a long-lived *daf-2* mutant.  
 PLoS One. 査読有  
 2013 Jun 14;8(6):e67158.  
 DOI: 10.1371/journal.pone.0067158.
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 吉名 佐和子、三谷 昌平、インスリン分泌細胞と末梢組織における ADAMTS9 の機能解析、第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 24 日、北海道 札幌市 札幌コンベンションセンター
- ② Sawako Yoshina, Shohei Mitani、Analysis of the mechanism of type 2 diabetes involving ADAMTS9 /GON-1、第 8 回アジア・オセアニア生理学会連合 (FAOPS 2015)、2015 年 11 月 23 日、タイ バンコク Centara Grand & Bangkok Convention Centre
- ③ 吉名 佐和子、三谷 昌平、ADAMTS9/GON-1 によるインスリンの分泌と末梢組織での作用制御、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 21 日、兵庫県 神戸国際展示場
- ④ 吉名 佐和子、三谷 昌平、ADAMTS9 によるタンパク輸送調節と 2 型糖尿病発症メカニズムの関係、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11 日、奈良県 奈良県新公会堂
- ⑤ 吉名 佐和子、三谷 昌平、小胞体における ADAMTS9/GON-1 の機能解析、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 19 日、愛知県 ウィンクあいち
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]  
 ○出願状況 (計 0 件)
- 名称：  
 発明者：  
 権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

茂泉 佐和子（吉名 佐和子）(MOIZUMI  
(YOSHINA), sawako)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00424672

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：