

体系的遺伝子破壊による線虫ゲノムの機能解析

●三谷昌平

東京女子医科大学医学部

＜研究の目的と進め方＞

線虫は、生活環が3日程度で短く、細胞系譜および形態学的記載が完成していること、ゲノム配列が決定していること、EST配列解析が進んでいることなどから、ゲノム機能学的な解析に適したモデル生物である。本研究においては、このような利点を用い、多細胞生物における遺伝子機能解析を網羅的に行う基礎を作ることを目的とした。具体的には、我々は、従来から多くの線虫を扱う研究室で試みられてきたノックアウト体としての欠失変異体の分離において、2桁程度の効率アップに成功しているので、この手技を中心に据え、ゲノムの機能解析を行うこととした。また、ノックアウト変異体を用いる研究においては、同時にトランスジェニック解析を併用して、より詳細な機能解析を行うことができることに着目し、線虫でのトランスジェニックシステムの開発を行うことを目的とした。

第一のノックアウト変異体の解析においては、技術がどのような種類の遺伝子に対しても使用可能であるので、多くの生命現象に対してアプローチを行っているが、中でも転写制御因子を重要な分子群と考えて基盤作りを行う事とした。すなわち、線虫では、正常発生における細胞系譜が完全に記載されていることを念頭に、発生段階で、各々の細胞での遺伝子制御ネットワークと発生制御の全貌を解析する基盤を作ることを重要な目的とした。線虫でパイオインフォマティクスによりゲノムおよびESTに対しての相同性解析が行われており、転写制御因子としてのモチーフが認められる分子がおおよそ660個程度存在する。それらの欠失変異体を作るべく多く分離することで、変異体の表現型解析を通して、分子レベルでの転写調節に関わる生命現象の詳細な解析ができる基盤を整備することである。

具体的な進め方としては、ゲノム/EST情報から推定され、かつ、過去の線虫研究者が分離していない転写制御因子の欠失変異体およびその他の重要と思われる遺伝子の欠失変異体を網羅的に分離すること、これらの内の代表的な遺伝子について、実際の発生への関与の解析を通して遺伝子制御ネットワークを明らかにすること、欠失変異体をベースにした、ゲノム機能解析に有用な新規なトランスジェニックシステム、ノックアウトシステムの構築を行うことである。

＜研究開始時の研究計画＞

1) 転写制御因子の欠失変異体分離に関して：660個程度の転写制御因子のうち、変異体が存在しない遺伝子について変異体分離を行い遺伝学的実験の基盤を整備する。おおよそ570遺伝子程度が該当していると思われる。

2) 線虫のトランスジェニック解析を行う場合、多くは2種類の使用方法がある。第一は、蛍光蛋白質などを融合することなどにより、興味のある遺伝子の発現パターンを生きた状態でも解析できるようにすることであり、第二は、機能的蛋白質を本来の細胞あるいは異所的に発現させることにより、個体レベルでの機能解析を行うこと

である。このような目的の実験に相応しい効率の良いベクターシステムを構築する。

3) 線虫のトランスジェニック解析では、ほとんどの場合、多数コピーのトランスジーンを導入しており、この場合、生殖腺での発現が起こらないことが多く、発現解析や機能解析が困難であるし、過剰発現による人為的な誤りが入ってしまうリスクもある。少数コピー染色体挿入法は、温度感受性致死変異のレスキューDNAと、挿入時の遺伝マーカーとなる遺伝子のイントロン内に変異型loxP部位を導入したDNAとを同一プラスミドとし、これを遺伝子銃を用いて染色体挿入した株を作出する。これを親株とし、変異型loxP部位を導入したプラスミドとCre蛋白質の強制発現プラスミドを生殖系細胞へマイクロインジェクションすることで、取得できるようにする。染色体外DNA保持株の作製は、温度感受性致死変異のレスキューDNAに目的のレスキューDNAを結合したプラスミドと蛍光蛋白質発現プラスミドとを共トランスフェクトし、蛍光陽性の温度耐性株を得ることで行う。

4) 分離した変異体を用いていろいろな生命現象の解明に役立てる。特に、発生、神経系の機能、アポトーシス、RNAiのメカニズムに関連する遺伝子の変異体を用いた機能解析を並行して行う。

＜研究期間の成果＞

(I) 転写因子などの変異体の分離

転写因子およびその他の遺伝子の欠失変異体分離：総数約2,000アリルを越えた。遺伝子数では1,800程度であると思われる。そのうち、転写制御因子と思われる遺伝子群については、437遺伝子について変異体分離済みである。全転写制御因子のおおよそ3分の2程度の変異体を分離できたことになる。既に存在しており入手可能な状態であるので、分離を行わなかった遺伝子も含めて、8割程度の遺伝子に関して変異体が存在し、使用可能な状態であることになり、そのうちの半分以上は、我々が貢献したことになる。このような転写制御因子の変異体の表現型解析や、レポーターを用いた制御機構の解明については、対象遺伝子数が多いこともあり、まだ進行中である。

(II) 線虫におけるトランスジェニック解析を効率化するためのベクターシステムの開発

線虫での遺伝子発現解析のために有効なTAクローニングベクターをベースとした、マルチカラー発現解析ベクターの開発を行った（投稿準備中）。ベクターの構造は、Multiple Cloning Site内にXcm Iサイトを2個入れることにより、Xcm I酵素にて消化すると、断端の3'末端に1個のTのオーバーハングができるように設計されている。通常の制限酵素も複数種類導入されており、制限酵素消化DNA断片のサブクローニングも可能である。ベクターは、マルチカラーで検出できるように、EBFP、ECFP、EYFP、venus、EGFP、DsRed、DsRed monomerなどが予めMultiple Cloning Siteの後ろに入れてある。蛍光蛋白質の後ろにはunc-86遺伝子由来の3' untranslated region

が入れてあり、Multiple Cloning SiteにPCR増幅した任意のプロモーターをサブクローニングすることができて、直ちに発現解析に供することができる。

発現パターンが分かった場合、そのプロモーターを用いて異所的に種々の遺伝子を発現することで機能解析を行うことが重要となる。例えば、変異体に本来の遺伝子を導入することで、表現型の回復を検証するレスキュー実験の場合、本来のプロモーターではなく、既知の異なるプロモーターを使用することで、本来の発現パターンのうちのサブセットで発現させ、どの細胞で発現することが観察している表現型に重要であるかを検証する実験であるとか、機能ドメインに人工的に変異を導入した場合に、機能を持つか否かの検定を行うことが必要な場合がある。我々の開発したベクターでは、蛍光蛋白質の前または後ろに線虫あるいは他の生物由来のcDNAを繋ぐことで、このような機能解析が発現パターンの確認と同時にできるようになっている。また、蛍光蛋白質を取り除いて機能解析用cDNAのみを入れることもできる。このようなベクターを応用した研究は、発表論文(9) Izumikawa et al.にて使用し、chondroitin polymerizing factor遺伝子(pfc-1)の発現パターンが酵素反応上隣のスレップを担っているchondroitin synthase遺伝子(sq-5)とオーバーラップしていることが確かめられた。

さらにこのベクターに改変を加え、次項の目的にも使用可能なコンストラクトを作成している。

(III) 1 コピートランスジェニックシステムの開発

線虫のトランスジェニック実験の場合、生殖腺の卵母細胞合胞体にガラス針を用いてDNA液を顕微注射して、混合して注入する蛍光マーカーもしくは表現型マーカーを指標に、トランスジェニック体を得ることが多い。この場合、注入されたDNAは生殖細胞内で組換えを起こし、1 Mb程度のマルチコピー染色体外DNAとして子孫に伝達されることがほとんどである。この場合、細胞分裂に際して、娘細胞に伝達され無い場合があり、トランスジェニックに関してモザイク状態となる。また、個体レベルでは、子孫に伝達される頻度が多い場合、10-50%程度であったり(株によりもっと高い場合も低い場合もある)、継代時に失われることがあり得る。さらに、染色体外トランスジェニックの場合、生殖腺でのサイレンシングを受けること、体細胞では過剰発現を起こすことがあることなどの重大な問題点も存在する。

一方で、遺伝子銃を用いて、最初から染色体挿入した単一コピートランスジェニックを作出することが可能であるという報告があり、上記の問題点はほぼ解決された。しかし、染色体外トランスジェニック法に比べるとはるかに効率が低く、実際の研究の間では多用されているとは言えない。

これらの問題を解決すべく、予め、変異型loxPサイトを入れておいたプラスミドを遺伝子銃にて単一コピー挿入を行った。このloxPサイトに対して、挿入は起こるが切り出しが起こらない変異型loxPを持つプラスミドとCreを生殖腺合胞体細胞に顕微注射法にて遺伝子した。その結果、高効率で単一コピー染色体挿入が容易に実現できることが分かった。単一コピー染色体挿入用の変異型loxPサイト付きのプラスミドは、上述のマルチカラー発現ベクターにオリゴヌクレオチドを用いて変異型loxPサイトを付加することで作成した。

(IV) 変異体株の表現型解析を中心とした個々の遺伝子機能解析

線虫は、生活環が短い代表的なモデル実験生物である。野生型でのニューロンを含めた全細胞の形態や発生の記述が充実しているため、表現型解析を行う上でもとても扱いやすい。我々は、分離した多くの変異体の中で、特に興味深い遺伝子を選び、表現型解析を中心にして、該当する遺伝子の機能を解明する研究を進めている。

発表論文(1) Hao et al.では、線虫において神経線維のガイダンスメカニズムに関するslt-1遺伝子の機能をその変異体を用いて明らかにした。

SLT-1はRobo受容体(SAX-3)に対するリガンドとして知られている。幼虫期ではSLT-1は背側の筋肉で発現しており、SAX-3を発現する軸索が反発して腹側へ伸展するのを助けている。腹側への伸展は、UNC-6(Netrin)に対しての誘因でも行われている。unc-6とslt-1の二重変異体では、腹側への軸索伸展が完全に異常になる軸索もある。胚発生期にSLT-1は前方の表皮で発現しており、CANニューロンの移動に必要である。しかし、slt-1変異体ではsax-3変異体で見られるような頭部神経環の構造異常が見られない。SAX-3受容体は、SLT-1リガンドに依存した神経ガイダンスと依存しない神経ガイダンスに関わっている。

発表論文(2) Ishihara et al.では、HEN-1の線虫における高次行動決定における機能をhen-1遺伝子の変異体などを用いて明らかにした。

HEN-1は構造としてはLDL受容体モチーフを持つ分泌性蛋白質であると考えられる。野生型の線虫では、化学走性アッセイによって、好きな化学物質に誘引され、嫌いな化学物質に対して逃避する。好きな化学物質の勾配を寒天培地上に作成しておく、濃度の高い方向へ移動するが、途中で、嫌いな化学物質でバリアーを作っておくと、濃度依存的にそこを越えることができなくなっていく。すなわち、2種類の感覚シグナルを統合して行動を決定していると考えられる。hen-1変異体では、好きな化学物質や嫌いな化学物質に対する感覚受容そのものには異常はないが、嫌いな化学物質による好きな化学物質への走化性の抑制度が大きくなる。すなわち、個々の化学物質への感受性に対してではなく、両者を統合して行動決定する過程に異常があると考えられる。hen-1変異体では、NaClに対する条件付け学習に対しての欠損や、温度走性学習に対しての欠損も見られる。蛍光蛋白質レポーター解析により、HEN-1蛋白質は、ASEおよびAIYニューロンで発現していた。HEN-1蛋白質を頭部の異なる細胞で発現させることでhen-1変異体が回復することから、HEN-1は細胞非自律的に働いていると考えられる。ヒートショックプロモーターを用いたレスキュー実験により、HEN-1蛋白質は成虫になってから働くことが見いだされた。

発表論文(3) Iwahashi et al.では、線虫ER蛋白質reticulon(rtn)ファミリーに着目し、線虫におけるRNTの発現と機能に関して解析を行った。

線虫のゲノム上には、単一のRTNをコードする遺伝子が見いだされる。免疫組織化学染色法により、線虫のRTNは生殖腺および胚で検出される。3種類のスプライシングバリエーションが見つかるが、そのうち、RTN-Cは胚発生時のみに見いだされ、孵化後には速やかに消失する。酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、RTNは

RME-1のC末端側に結合することが示唆された。RME-1は卵黄蛋白質のエンドサイトーシスに関与する分子であるので、RTNもその機能の一部を担っているのかも知れない。

発表論文(4) Kimura et al.では、線虫ニューロンの可塑的变化におけるCaシグナリングの役割を明らかにするべく、CaMK/CREBのカスケードについて、発現および変異体での機能解析を行った。

線虫において、カスケードの構成分子であるCKK-1の発現パターンを蛍光蛋白質レポーターにて調べた。CKK-1は頭部および尾部のニューロンおよび産卵筋で発現が見られた。CRH-1 (CREBホモログ)の発現パターンはin situ ハイブリダイゼーションにて検出され、頭部ニューロンと生殖腺で検出された。CRE::GFPレポータートランスジェニックにて、CREBによる発現制御を観察した。野生型線虫にレポーター単独で発現した場合、ほとんど蛍光は観察されなかった。活性型のCMK-1をトランスジェニック発現すると、強い蛍光が観察され、リン酸化欠損変異体では起こらなかった。このような蛍光増強は、ckk-1変異体では弱い低下、crh-1変異体では強い低下を示した。

発表論文(5) Mizuguchi et al.では、chondroitin合成酵素sqv-5遺伝子の細胞分裂における機能について、RNAiと欠失変異体を用いて明らかにした。

線虫のコンドロイチン合成酵素の生体内での意義を調べるために、コンドロイチンの発現パターンを免疫組織化学的に調べたところ、成虫では生殖腺、卵母細胞や子宮で観察された。胚発生期では、卵殻と細胞表面で見られた。RNAi法でコンドロイチン合成酵素遺伝子sqv-5を抑制したところ、種々の表現型が観察された。卵細胞は変形し、F1世代の胚は死滅した。RNAiのエスケーパーを観察したところ、ced-2、ced-5、ced-10などの変異体で観察されるような生殖腺の細胞移動などの形態形成の異常が見られた。このような異常は、sqv-5遺伝子の欠失変異体tm546でも確認された。この現象はコンドロイチンに特異的で、ヘパラン硫酸合成に関わる遺伝子rib-1やrib-2のRNAiでは見られなかった。sqv-5遺伝子のRNAi下での表現型を詳細に調べる目的で、1細胞期から4次元顕微鏡にて観察を行ったところ、細胞分裂の異常が認められた。核のマーカーであるhistone-GFPと同時に観察すると、多核になっていることが分かり、コンドロイチンが細胞膜分裂に関わっていることが分かった。

発表論文(6) Ogura et al.では、SPN-4蛋白質のmRNA制御に関する機能を明らかにした。

線虫の胚発生制御を行っているGLP-1蛋白質は時間空間的な制御を受ける。glp-1の母性mRNA3' UTRがこの制御に重要である。位置制御領域により後部割球での翻訳が抑制される。POS-1 (CCCH zinc finger蛋白質)は、この部位に結合して翻訳抑制を行っている。SPN-4はPOS-1結合蛋白質であり、初期胚に存在する。SPN-4は、glp-1 mRNAが前方割球で翻訳されるのに必要であることをRNAiおよび欠失変異体で示した。

発表論文(7) Wang et al.では、線虫でのアポトーシスの際に、周辺の細胞に貪食されるための信号の伝達経路内でのPSR-1蛋白質の機能を明らかにした。

アポトーシスの際には、生細胞では細胞膜の内側に局限しているphosphatidylserineが細胞膜の外側へ露出し、これが貪食細胞へ「eat-me」シグナルを送ることが知ら

れている。貪食細胞では、PSR-1 (phosphatidylserine受容体)がこの信号を伝達する目的で重要であることがpsr-1遺伝子の変異体で示された。in vitroで、線虫PSR-1はphosphatidylserineに特異的に結合した。psr-1は、アポトーシス細胞の貪食に関わっている既知の蛋白質のうち、CED-2、CED-5、CED-10、CED-12、と同一のカスケードで作用した。PSR-1は、直接的にCED-5およびCED-12と相互作用して信号を伝えていることが明らかになった。

発表論文(8) Hanazawa et al.では、翻訳開始因子eIF-5Aの線虫ホモログの機能を変異体を用いて解析した。

線虫ゲノム上には、2つのeIF-5Aホモログ (iff-1とiff-2)が存在する。iff-2変異体では、体細胞の成長異常などを呈した。一方、iff-1変異体では不妊となった。iff-1変異体の生殖腺では、卵および精子の細胞増殖が異常となっていた。有糸分裂は異常だが、減数分裂像は観察された。生殖系列に局在する蛋白質であるPGL-1の局在が、変異体で異常になっていた。

発表論文(10) Schumacher et al.では、線虫ゲノム上に存在するBH3-only蛋白質CED-13の機能の解析を行った。

CED-13はBH3-only蛋白質をコードしている。ced-13 mRNAはDNA損傷を受けたときに発現上昇し、この変化にはp53ホモログcep-1遺伝子機能が必要である。CED-13蛋白質はBcl-2ホモログであるCED-9と相互作用することが分かった。体細胞で、ced-13遺伝子を過剰発現すると、通常はアポトーシスを起こさない細胞が死滅する。従来から知られていたBH3-only蛋白質であるEGL-1のみならず、CED-13も同様の働きをしていると考えられた。

発表論文(11) Watanabe et al.では、線虫の体の大きさを決定している遺伝子sma-5の同定を行い、その機能を変異体を用いて章かにした。

sma-5変異体は体がとても小さく、成長が遅い。ポジショナルクローニングにて、sma-5遺伝子がBMK1/ERK5ホモログをコードしていることが分かり、レスキュー実験、RNAiや欠失変異体の分離による機能阻害実験で確認された。sma-5変異体の体の大きさが小さいのは、個々の細胞が小さくなっているためであることが分かった。sma-5遺伝子は、腸管、排泄管細胞および表皮で発現していた。体の大きさの制御に関しては、表皮が重要であることが明らかになった。

発表論文(12) Kagoshima et al.では、線虫におけるRUNXホモログrnt-1転写因子の発現と機能を明らかにした。

胚発生期でのRNT-1::GFPの発現パターンは、H0-2、V1-6、T blast細胞で見られた。幼虫〜成虫期では、主に、(表皮の一種である) seam cellsで見られた。rnt-1変異体では、T細胞の不均等分裂に異常が起こったり、雄でのray構造が奇形となった。RNT-1のT細胞の不均等分裂における機能は、Wntシグナル伝達を介していると考えられた。GFP::POP-1やTLP-1::GFPレポーター発現を用いてT細胞の不均等分裂において、rnt-1変異体バックグラウンドにより、RNT-1はTLP-1の上流で、また、POP-1の下流またはパラレルな位置で働いていることが示唆された。

発表論文(13) Duchaine et al.では、線虫におけるDCR-1蛋白質in vivoで結合する分子群をプロテオミクス手法を用いて見だし、それらの分子群がRNAiなどに関わる小分子RNAパスイにおいてどの部分でどのように働いているかを明らかにした。

Dicerは多くの生物で、二本鎖RNAを介した遺伝子抑制に関わるRNase III関連分子である。線虫ゲノム上には、そのホモログDCR-1が存在する。タグ付きDCR-1をdcr-1遺伝子変異体に導入してレスキューした個体よりDCR-1結合蛋白質を精製し、MSによって蛋白質を同定解析した。20個の分子が高頻度に結合が確認され、既にRNAiに関わっていると知られているRDE-1なども精製されてきた。これらの遺伝子の中で、機能が未知のものについて、欠失変異体を分離し、外来性のdsRNAによって起こるRNAi現象、内在性のsiRNAによって起こる現象、発生制御に関わるmicroRNAに関わる現象における役割を明らかにした。RNA phosphataseの1つであるPIR-1はDCR-1の基質のプロセッシングに必要であり、pir-1変異体ではRNAiが起こらなくなる。内在性のsiRNAの産生に必要とされるのは、ERI-1やRRF-3であり、これらの変異体ではRNAiが増強されることが知られている。ERI-1と一緒に働いているERI-3やERI-5の変異体でもRNAi現象が増強されていることが明らかになった。これらの現象は、DCR-1を共有するこれらの小分子RNAを介した分子メカニズムの間で競合が起こっており、内在性siRNA経路の抑制により、外来性siRNAの働き (RNAi) が強くなることを示している。

(V)その他の解析の進行状況

変異体は前述のように多数分離済みであり、変異体をベースにした精密な遺伝子機能解析を行う上で前提条件になる他の技術開発もメドが立った。

これらを用いた転写因子の網羅的機能解析を進めている。残念ながら対象遺伝子数が多いので、現時点では、解析はごく一部であり、別の機会に報告させていただく。また、当初は、転写因子変異体として解析を開始したが解析の結果、観察される表現型が転写因子の欠失によるものではなく、変異導入した時に、同時に加わった別の遺伝子の欠失に由来することが判明したものがある。Etsファミリー遺伝子C42D8.4遺伝子の欠失変異体アリルtm866は、G蛋白質シグナリングに関わる分子AGS-3の変異アリルtm1859も持っていた。この変異体は、基本的な運動は正常であるが、餌のあるプレート上で自由に行動させても、狭い範囲でしか動かない。また、体の大きさが野生型より若干小さい。AGS-3はGoloco motifとTetratrico peptide motifを持ち、前者は三量体G蛋白質の α サブユニットに結合して、GiのGDIとして働くことにより、結果的にcyclic AMPカスケードを活性化することが知られていた。AGS-3は哺乳類では、コカインなどの薬物中毒の際に発現増加し、これを抑制することで中毒を軽減できることも知られている。ags-3変異体の表現型は、既知の感覚異常変異体che-2などと酷似しているがags-3変異体の場合には、信号伝達の低下という形で表現型を呈していると考えられた。che-2変異体の表現型は体が大きくなり、動きの範囲が広いegl-4変異体によって抑圧されることが知られている。EGL-4はcyclic GMP依存性プロテインキナーゼ(PKG)であることが知られている。ags-3変異体の表現型もegl-4変異体によって抑圧を受けた。線虫AGS-3蛋白質は線虫EGL-4蛋白質と結合することが明らかになった。さらに、各々のマウスホモログを用いて解析を行ったところ、脳に高発現するタイプのマウスAGS-3ホモログはマウスPKGと結合活性があるが、ユビキタスに発現しているAGS-3ホモログはPKGと結合しないことが明らかになった。遺伝学的解析により、AGS-3は、PKGを抑制していることが明らかになったので、AGS-3の機能においては、cAMPカスケードのみならず、

cGMPカスケードが極めて重要であることが示唆された(投稿中)。

転写因子のカスケードの他にも、RNAiに関わる遺伝子群の欠失変異体の分離と機能解析を進めている。また、同様に、アポトーシスに関わる遺伝子群なども並行して進行しており、近日中に論文発表などの成果に繋がることを期待している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

欠失変異体分離については、分離数および分離された株の質において、世界のセンターとしての地位を得ている。欠失変異体の分離数としては、単一研究室としては、世界で最大となっており、最大の供給源としての不動の位置付けを得つつある。多くの変異体の解析は我々自身だけでは不可能なので、無償提供することで、研究者全体の便宜をはかっており、大変好評である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

個別の遺伝子の機能解析には多くの時間を要している。結果を慎重に判断しながら進行しているので、避けられない面もある。単一コピー染色体挿入の方法論もまだ、応用段階に入っていない。現在までの解析では、欠失変異体の表現型を単純に解析するのみでも非常の多くの生命科学的情報を得られてきたこともあり、後回しにしまったことが大きな原因であろうと考えられる。

〈今後の課題〉

今後は、本研究で開発したノックアウトおよびトランスジェニックシステムを総合的に応用した解析を急ぐことが重要となると思われる。また、単一コピー染色体挿入法とリコンビナーゼ・トランスジェニック株を併用することでコンディショナルノックアウト法の開発を行いたい。

一方、転写因子などの網羅的欠失変異体がほぼ整備された分子群については、従来通りの発現パターンの解析によるサーベイとそれによって想定される範疇の変異体表現型解析をトランスジェニック法と組み合わせることにより、各々の遺伝子機能のより詳細な理解とお互いの関係を解明して行くことが多細胞生物の発生などの現象を根本的に解き明かして行くために避けて通れない課題であることも認識している。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- (1) Hao JC, Yu T, Fujisawa K, Culotti J, Gengyo-Ando K, Mitani S, Moulder, G, Barstead R, Tessier-Lavigne M, & Bargmann CI: C. elegans Slit acts in midline, dorsal ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* 32, 25-38 (2001)
- (2) Ishihara T, Iino Y, Mohri A, Mori I, Gengyo-Ando K, Mitani, S, & Katsura I: HEN-1, a novel secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 109, 639-649 (2002)
- (3) Iwahashi J, Kawasaki I, Kohara Y, Gengyo-Ando K, Mitani S, Ohshima Y, Hamada N, Hara K, Kawagishi T & Toyoda T: *Caenorhabditis elegans* reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 293, 697-704 (2002)
- (4) Kimura Y, Corcoran EE, Eto K, Gengyo-Ando K, Muramatsu M, Kobayashi, R, Freedman JH, Mitani S, Hagiwara M, Means AR & Tokumitsu H: A CaM-

- kinase cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep.* 3, 962-966 (2002)
- (5) Mizuguchi S, Uyama T, Kitagawa H, Nomura KH, Dejima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Sugahara K & Nomura K: Involvement of chondroitin proteoglycans in cytokinesis of embryonic cells of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 423, 443-448, 2003.
 - (6) Ogura K, Kishimoto N, Mitani S, Gengyo-Ando K & Kohara Y: Translational control of maternal *glp-1* mRNA by POS-1 and its interacting protein SPN-4 in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 130, 2495-2503, 2003.
 - (7) Wang X, Wu Y-C, Fadok VA., Lee M-C, Gengyo-Ando K, Cheng L-C, Ledwich D, Hsu P-K, Chen J-Y, Chou B-K, Henson P, Mitani S & Xue D: Cell Corpse Engulfment Mediated by *C. elegans* Phosphatidylserine Receptor Through CED-5 and CED-12. *Science* 302, 1563-1566, 2003.
 - (8) Hanazawa M, Kawasaki I, Kunitomo H, Gengyo-Ando K, Bennett KL, Mitani S, & Iino Y: The *C. elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1. *Mech. Dev.* 121, 213-224, 2004.
 - (9) Izumikawa T, Kitagawa H, Mizuguchi S, Nomura KH, Nomura K, Tamura J, Gengyo-Ando K, Mitani S & Sugahara K: Nematode chondroitin polymerizing factor showing cell/organ-specific expression is indispensable for chondroitin synthesis and embryonic cell division. *J. Biol. Chem.*, 279, 53755-53761 (2004)
 - (10) Schumacher B, Schertel C, Wittenburg N, Tuck S, Mitani S, Gartner A, Conradt B & Shaham S: *C. elegans ced-13* can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death and Differentiation*, 12, 153-161 (2005)
 - (11) Watanabe N, Nagamatsu Y, Gengyo-Ando K, Mitani S & Ohshima Y: Control of body size by SMA-5, a homolog of MAP kinase BMK1/ERK5 in *C. elegans*. *Development* 132, 3175-3184 (2005)
 - (12) Kagoshima H, Sawa H, Mitani S, Bürglin TR, Shigesada K & Kohara Y: A Runx family transcription factor RNT-1/MAB-2 is required for asymmetric cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 287, 262-273 (2005)
 - (13) Duchaine TF, Wohlshlegel JA, Kennedy S, Bei Y, Conte D, Pang K, Brownell DR, Harding S, Mitani S, Ruvkun G, Yates III JR, & Mello CC: Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* 124, 343-354 (2006)