

生体恒常性維持と分子ネットワーク*

久 場 敬 司

秋田大学大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座

(平成 27 年 9 月 25 日掲載決定)

Biological homeostasis and molecular networks

Keiji Kuba

Department of Biochemistry and Metabolic Science, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : Model organisms, heart, SARS, ACE2, Apelin, CCR4-NOT

はじめに

モデル生物による疾患関連因子の探索は、疾患の病態解明のために有効な戦略のひとつである。ショウジョウバエの変異体から初めて見出されたアンジオテンシン変換酵素 (ACE) のファミリー分子 ACE2 は、昇圧分子アンジオテンシン II を分解することによりレニン-アンジオテンシン系を負に調節するが、私達は ACE2 が SARS ウイルスの受容体であると同時に急性呼吸不全の病態形成の阻止に寄与することを解明し、さらにレニン-アンジオテンシン系の制御とは独立に ACE2 がアミノ酸トランスポーターとして機能することを明らかにした。

生体恒常性の維持は、環境変化やストレス刺激などに対して生体が変容し順応するために必須の生理機能であり、その実体として臓器間、細胞間のネットワーク、あるいは細胞内の分子間、オルガネラ間などのネットワークが注目を集め、その破綻が疾患の発症に繋がると考えられている (図 1)。しかしながら、疾患病

態における生体恒常性の維持機構という視点での研究は、近年の網羅的な遺伝子発現解析、代謝物定量解析、トランスオミクス解析などで明らかになった分子間ネットワークなど、未だ端緒についたばかりである。

私達はショウジョウバエで見出された ACE2 の研究成果に基づき、ショウジョウバエのゲノムワイド RNAi トランスジェニックライブラリーを用いた *in vivo* 心不全スクリーニングを行い、その中から見出した CCR4-NOT 複合体を介した遺伝子発現調節の分子ネットワークが心臓の恒常性維持に不可欠であることを明らかにした。また、ACE2 が心血管ペプチド Apelin によって活性化されることを見出し、Apelin-ACE2 を介したペプチド代謝のネットワークが、心不全病態での恒常性維持に重要であることを解明した。

このように遺伝子改変モデル生物を用いた解析研究により、疾患病態における生体恒常性維持の分子ネットワーク機構を紐解いていくことが可能であることを示してきた。本稿では、ACE2 ならびに循環器疾患の疾患病態における分子ネットワークの同定、解析について私達の研究を中心に概説する。

Corresponding author : Keiji Kuba
Department Biochemistry and Metabolic Science, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
TEL : 81-18-884-6074
FAX : 81-18-884-6443
E-mail : kuba@med.akita-u.ac.jp

*平成 27 年 2 月 12 日秋田医学会教授就任特別講演

モデル生物を用いた疾患関連因子の探索

医学研究におけるモデル生物としては、古典的にはイヌ、ネコ、ラット、モルモットなどがよく用いられたが、遺伝子改変技術の進歩によりマウスが用いられるようになった¹⁾。現在、哺乳類にととまらず、線虫、

シロウジョウバエなどの無脊椎生物からカエル、ゼブラフィッシュ、メダカ、哺乳類のマウス、ラットに至るまで幅広い生物種が医学研究にモデル生物として用いられている (図2)。シロウジョウバエは、体節形成に関わるホメオティック遺伝子の発見でよく知られるように、発生生物学と遺伝学を融合させ、遺伝子レベルで発生を理解する上で優れたモデルとして認知されている。心臓の発生や先天性心疾患において重要である転写因子 *Nkx2.5* はシロウジョウバエにおいて *Tinman* として初めて見出されており、心臓発生における細胞運命決定や遺伝子発現ネットワークはハエか

らヒトまで保存されていることが明らかになっている^{2,3)}。シロウジョウバエの遺伝学的なスクリーニングでは、P-element による変異体を用いた forward genetic screening^{4,5)} や二本鎖 RNA (siRNA) を胚に注入することで RNAi を誘導するスクリーニング⁶⁾ や後述のように RNAi transgenic library を用いたスクリーニングが行われるようになった。シロウジョウバエの心臓は、heart tube と呼ばれる管状の筒であり、myocardial cells と pericardial cells の2層の細胞から成るが、収縮、拡張することにより血液は前後に移動する。シロウジョウバエは、全身の細胞のガス交換を開放系の気

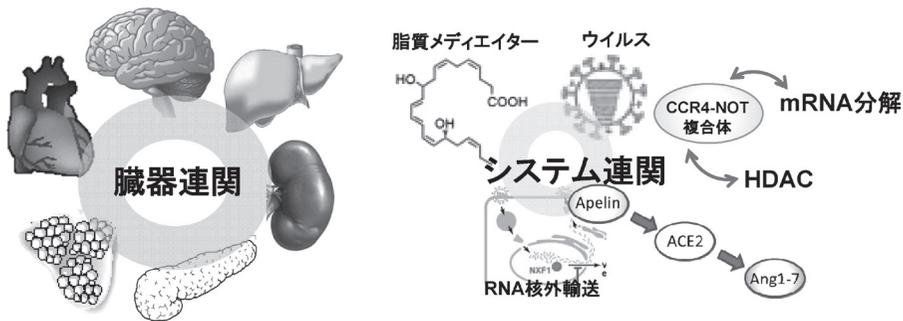
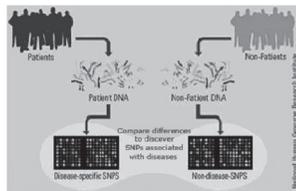
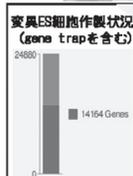


図1. 生体恒常性維持における臓器連関, システム連関を形づくる細胞間, 分子間ネットワーク。

GWAS or human mutations



Mouse mutant screening



International knockout mouse consortium, IKMC & IMPC

Knockout ES cells: 8,923 genes
Knockout mice: 1,885 genes
(out of 24,880 coding genes)

Fly or zebrafish mutant screening

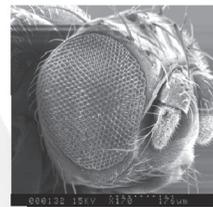


図2. モデル生物による疾患関連遺伝子の探索。

管から直接行うので、哺乳類のように心臓のポンプ機能が損なわれると即座に個体死に至るわけではないことから、不全心や心疾患遺伝子の機能を解析する上でも有効なツールとして注目されている。実際、ショウジョウバエの心臓について、ビデオイメージング⁷⁾や optical coherence tomography⁸⁾ の手法により、M-mode 心エコーのように心機能を測定することが可能となった。またペースングによる不整脈誘導や電気生理学的な解析も行われている。とりわけ、ACE2 の生理機能解析の研究は、P-element がショウジョウバエの ACE2 相同遺伝子 ACER の遺伝子座に挿入された変異体が、ハエの心臓原基の形成に異常をきたすことを見出したことが契機となった⁹⁾。

ACE2 とレニン-アンジオテンシン系

レニン-アンジオテンシン系 (RAS) は、血圧の昇圧因子であるアンジオテンシン II (Ang II) の産生を介して、生体内における血圧調節や腎機能、水、電解質バランスの調節に関与する^{10,11)} (図3)。アンジオテンシン変換酵素 (ACE) は RAS でアンジオテンシン I (Ang I) ペプチドの C 末端から 2 つのアミノ酸を切断して Ang II に変換する (図1) ことで古くから知られているが、他の ACE ファミリー分子の存在は長らく不明のままであった。2000 年、初めての ACE ファミリー

分子として ACE2 が同定され^{1,2)}、その遺伝子座は X 染色体に位置して、ACE とは完全に独立な遺伝子であることがわかった。ACE2 は Ang I と Ang II の両方を基質とするが、C 末端から 1 つのアミノ酸だけを切り出す carboxypeptidase として機能するために、結果的に Ang II の産生を抑制する。すなわち、ACE2 は RAS の負の調節因子といえる。心不全や糖尿病性腎症の患者で ACE2 の発現が低下している一方で、遺伝子欠損マウスなどを用いた解析から、ACE2 による RAS の負の調節が心機能の恒常性の維持に重要な役割を果たすことや糖尿病性腎症の糸球体病変を改善することがわかっている⁷⁾。また一方で、ACE2 はアンジオテンシン以外にも Apelin (アペリン) や [des-Arg⁹]-ブラディキニンなどをも基質としていて、後述のように Apelin 遺伝子欠損マウスを用いた解析から、*in vivo* で ACE2 と Apelin に遺伝学的な相互作用があることが示唆されている^{15,16)}。

SARS レセプターとしての ACE2

2003 年、中国の広東省で初めて報告された重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome; SARS)¹⁷⁾、いわゆる新型肺炎は、わずか数ヶ月の間に世界中で約 8,000 人の感染者、約 800 人の死者を出し、社会的、経済的な打撃を与えた。SARS は高熱と重篤

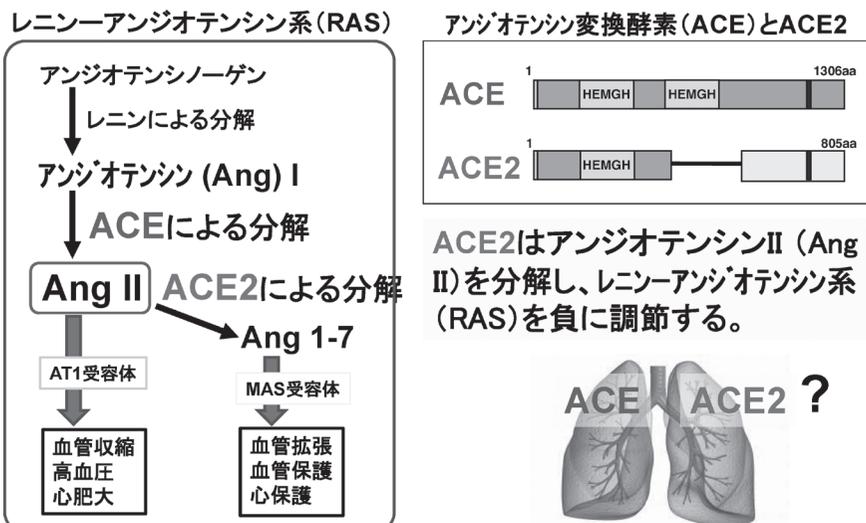


図3. レニン-アンジオテンシン系における ACE (アンジオテンシン変換酵素) と ACE2 の機能と構造。肺は ACE の主な産生臓器であるが、ACE2 の役割は不明であった。

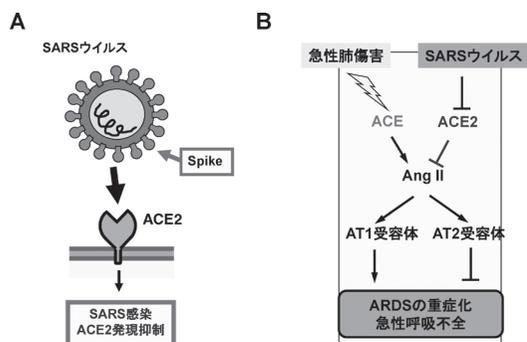


図4. ACE2の生理機能とSARSウイルス感染による急性呼吸不全. SARSウイルス受容体としてのACE2 (A)とSARSの病態形成におけるACE2の肺保護作用と治療への応用 (B).

な呼吸器症状を発症する呼吸器感染症で、新種のSARSコロナウイルスが病因であるが、興味深いことにACE2がSARSコロナウイルスの感染に不可欠な受容体であることが明らかになった¹⁸⁾(図4A)。また、SARS患者の主な死因は、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)である。ARDSは、SARS以外にも感染、敗血症や肺炎などさまざまな疾患を原因として急激に発症する重症型の急性肺傷害の総称であり、重篤な呼吸不全、著しい炎症所見、ならびに高い死亡率を示す。ところがACE2自身がRASを負に調節することにより、積極的にARDSに対して肺保護作用を発揮することがわかった¹⁹⁾。すなわち、SARS感染によりレセプターであるACE2の発現は低下するが、このACE2発現低下がRASを活性化し、急性肺傷害を悪化させることがわかった(図4B)¹⁸⁾。

アミノ酸トランスポーターとしてのACE2

ACE2が発見された翌年、ACE2相同分子としてCollectrin(コレクトリン)がラット腎部分切除後の腎組織から同定された²⁰⁾。Collectrinは、ACEとはほとんど相同性を示さないもののACE2と高い相同性膜貫通ドメインを持つ。一方で、ペプチドを制御するためのプロテアーゼとしてのcarboxypeptidase domainは全く持っていない。当初、Collectrinは腎集合管に発現する遺伝子として単離されたが、その後の解析により腓ランゲルハンス島のβ細胞のインスリン分泌に重要な役割を担うこと¹⁸⁾や腎近位尿管からのアミノ酸の再吸収に不可欠な分子であること²¹⁾がわかって

きた。実際、Collectrin遺伝子欠損マウスでは、中性アミノ酸トランスポーターB⁰AT1などの発現低下により著名なアミノ酸尿をきたす²²⁾。また、ACE2もCollectrin同様にアミノ酸トランスポーターの発現に重要であることが分かり、ACE2とCollectrinが、遺伝性的アミノ酸欠乏症であるHartnup disease(ペラグラ様光線過敏症、小脳性運動失調などが主症状)の病態発症に関わっていることが示唆されている。さらに、ACE2は腸管上皮における中性アミノ酸の吸収に不可欠であり、腸内細菌叢の恒常性維持に寄与することが分かった²³⁾。

RNAi心不全スクリーニングによるCCR4-NOTネットワークの同定

私達はショウジョウバエで見出されたACE2の研究成果に基づき、心不全に関連する未知の遺伝子やネットワークの同定を目指して、オーストリア分子生物科学研究所(IMBA)のRNAiトランスジェニックライブラリー²⁴⁾を用いて大規模な機能的スクリーニングを行った。ショウジョウバエの各UAS-RNAiラインを心筋特異的(TinCA4)-Gal4発現ラインと次々に交配し、心筋特異的に各遺伝子をノックダウンしたショウジョウバエのラインを作製した²⁵⁾(図5A)。一方で、本ライブラリーは、ショウジョウバエ全遺伝子の90%近くをカバーする約2万系統から成ることから、簡便なアッセイ系でハイスループットにスクリーニングを行わねばならない。通常25°Cで飼育するハエを29°Cの高温の環境下におくことで心拍数の増加などを伴う心負荷の状態を誘導できることから、29°C高温環境下の心負荷ストレスにより死亡するラインを選別するというアッセイを採用した(図5B)。哺乳類で保存されているハエ遺伝子8,417個についてスクリーニングを行い、498個の遺伝子を単離した(図5C)。データベースからこれらのハエ遺伝子と相同のヒト、マウスの遺伝子を抽出し、KEGG、C2 gene setsならびに第一次の結合因子群を組み合わせた解析により、心機能調節遺伝子のネットワーク図を作製した(図6)。ショウジョウバエの網羅的RNAiスクリーニングとバイオインフォマティクスを組み合わせた手法により得られたマップが、どこまで意味のあるものかを検証する必要があることから、このネットワーク図の中で新しく見出された遺伝子群に着目して解析を進めたところ、CCR4-NOT複合体^{26,27)}と呼ばれる蛋白質複合体の構

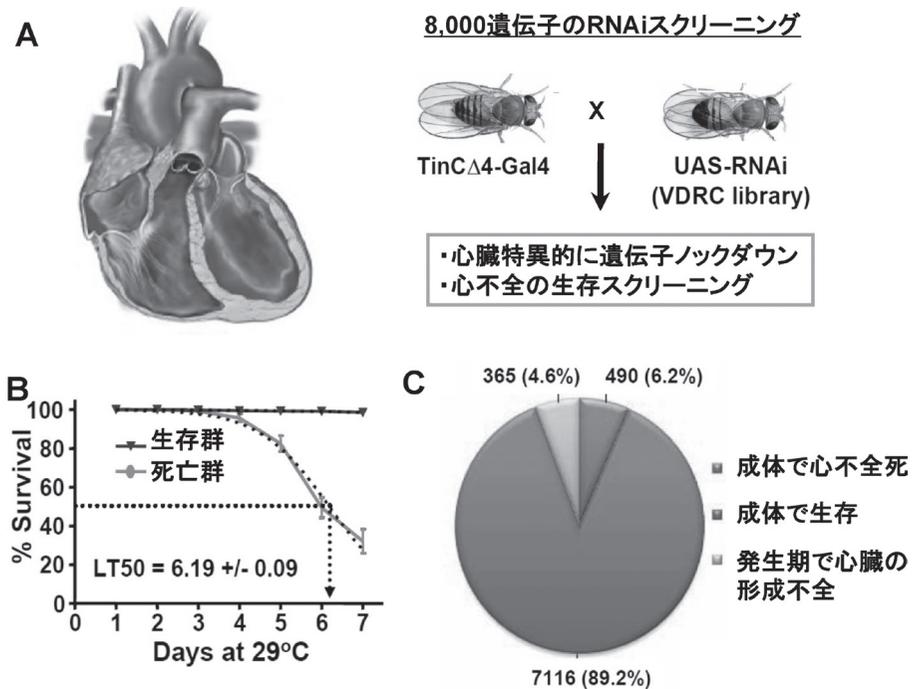


図5. ショウジョウバエ *in vivo* RNAi 心不全スクリーニング. A: 交配により Gal4 を TinCA4 プロモーターで発現させることにより心筋特異的に RNAi を発現させる F1 ラインを作製し、高温環境下での心ストレスで死亡するラインを選別した. B: 高温環境下で心ストレス下のショウジョウバエの生存曲線. C: スクリーニングの結果.

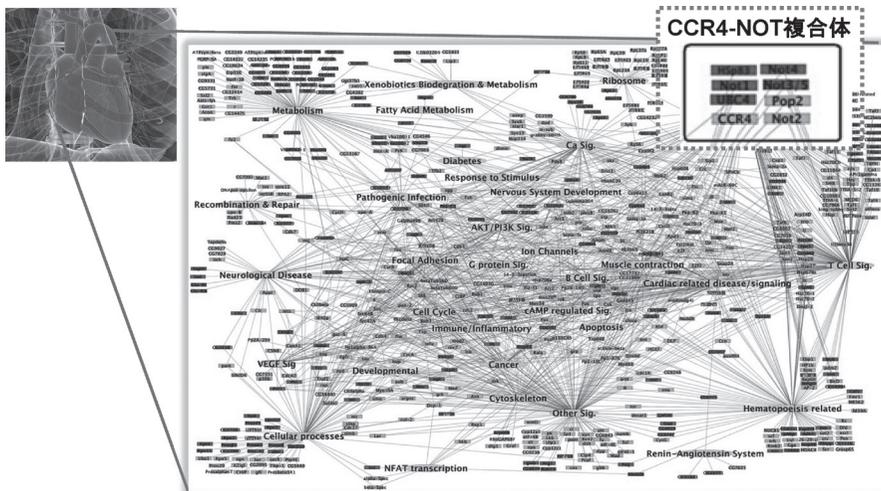


図6. *in vivo* RNAi スクリーニングから分かった心機能調節遺伝子のグローバルマップ.

成因子がスクリーニングでいくつも上がってきていることが分かった。つまり、CCR4-NOT 複合体が新しい心機能の調節因子であることが考えられた。

CCR4-NOT 複合体は、酵母の変異体から見出された分子量 1MDa の蛋白複合体^{26,27}で、転写調節、RNA deadenylase (mRNA の poly-A 分解)、ユビキチンリガーゼ活性を持つことにより多彩な機能を発揮するユニークな分子複合体であるが (図 7A)、哺乳類などの個体における CCR4-NOT 複合体の生理的意義は全く不明であった。ショウジョウバエのスクリーニングで見出された CCR4-NOT の構成因子のうち、統計的なスコア値が高かった NOT3 や UBE の RNAi ラインは、心室の拡張や心筋の筋線維の不整を認めた。実際、ビデオイメージング M-mode 測定でも心室の拡張や収縮不全など著しい心機能の低下を認めた²⁵ (図 7B)。すなわち、CCR4-NOT 複合体はショウジョウバエの心機能を制御することが分かった。

ショウジョウバエで単離された CCR4-NOT が、哺乳類のマウスにおいても重要であるかを検討するために CNOT3 (哺乳類の NOT3) 遺伝子欠損マウスを作製したところ、ホモ欠損は胎生致死であったが、ヘテロ欠損の成体において心エコーによる *in vivo* 心機能を測定したところ加齢に伴い心収縮能が低下することを見出し、*ex vivo* の単離心の Langendorff 心灌流モデルで明らかな心収縮能の低下を認めた (図 8A)。また、

左心室に圧負荷を誘導する心不全モデル (Transverse aortic constriction: TAC) において、著しい心機能低下や線維化の亢進など心不全症状の増悪を認めた。さらに、ヒト SNP (遺伝子多型) の大規模な網羅的解析 (Genome-wide association study: GWAS) において、CNOT3 のプロモーター領域に心電図の QT 時間の長さと同相する SNP を見出し (図 8B)、CNOT3 が実際のヒト不整脈や心不全の病態発症や増悪化にも関与している可能性が示唆され、CCR4-NOT 複合体は種間で保存された心機能の制御因子であることが分かった。ところで、CCR4-NOT を介したネットワークを詳細に解析するために、CNOT3 欠損細胞や心筋組織のマイクロアレイ発現解析を行い、テキストマイニングを中心としたパスウェイ解析を行ったところ、分子ネットワーク上で NOT3 がヒストン修飾と強い相関があることが分かった。そこで、心筋組織のヒストン H3K9 のアセチル化状態を調べたところ、NOT3 欠損マウスで有意に低下していた。さらに、HDAC 阻害剤を NOT3 欠損マウスに投与したところ、ヒストンアセチル化レベルが回復し、心機能低下の表現型はレスキューされた。したがって、CNOT3 による心機能制御には、エピジェネティックな遺伝子発現制御が関与していることがわかった²⁵。

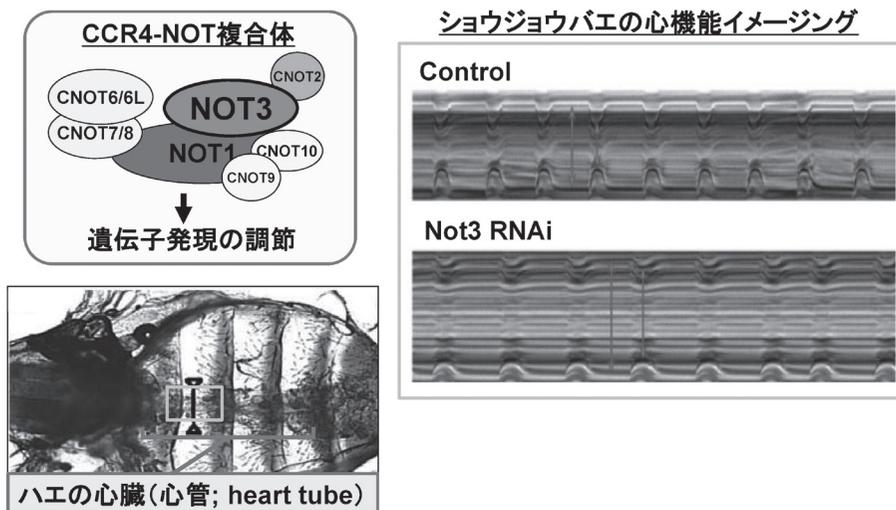


図 7. NOT3 による心臓の機能調節. NOT3 RNAi のショウジョウバエは、心臓 (heart tube) の収縮低下、除脈、脈の不整を認めた。

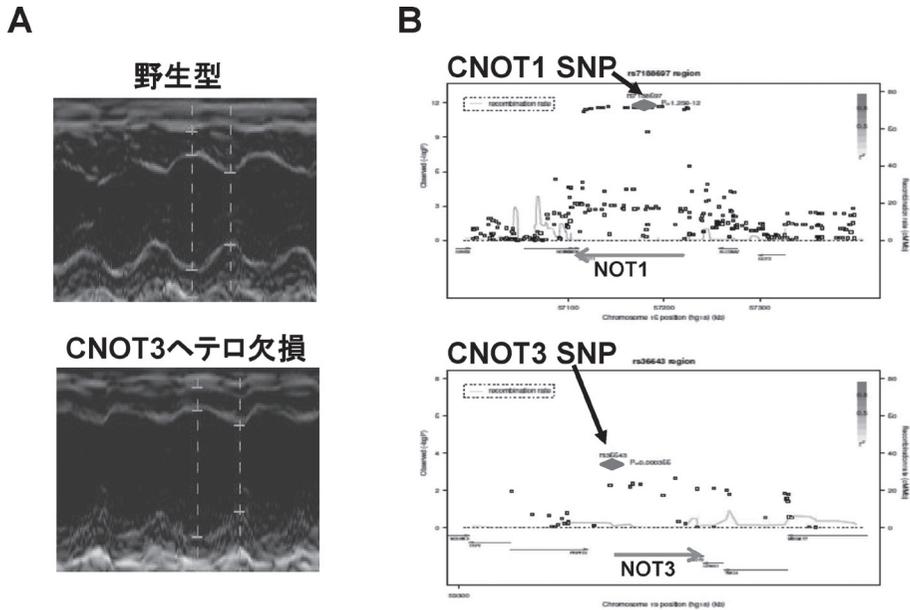


図8. A: *Cnot3*^{+/-}欠損マウスの心エコーによる心機能測定. *Cnot3*^{+/-}ヘテロ欠損では収縮能の低下を認めた. B: ヒト CNOT1 遺伝子のイントロンならびに CNOT3 遺伝子のプロモーターにおける SNP(遺伝子多型)は心電図 QT 時間と相関していた.

ACE2-Apelin-Angiotensin-7 ペプチド代謝を介したネットワーク

前述のように ACE2 はペプチドの C 末端を分解する、いわゆる Carboxypeptidase として機能するが、その基質は Ang II 以外にも Pro-X₁₋₃-Pro-Hydrophobic の配列を持つペプチドであれば基質となりうる¹⁴⁾. 実際、心血管ペプチドのひとつである Apelin ペプチドは、Ang II 同様に ACE2 により高効率に代謝される. Apelin とその受容体 APJ の活性化による Apelin シグナルは、1998 年に Apelin が APJ のリガンドであることが報告されたが、これまでに Apelin 系が心血管系、脂肪細胞分化、糖代謝、水電解質バランスなどさまざまな生体調節に関与することが明らかになっている. 私達はこれまでに遺伝子改変マウスの解析から Apelin が加齢や圧負荷などのストレス下で心収縮力の維持に寄与することを明らかにしてきたが¹⁵⁾、一方で Apelin 系と RAS 系の相互作用には不明な点が多かった. そこで、私達は Apelin 遺伝子欠損 (KO) マウスの心臓について RAS 系関連遺伝子の発現解析を行ったところ、ACE2 の発現レベルが Apelin KO マウスにおいて著しく低下していることが分かった¹⁶⁾. アンジオテン

シンペプチドのメタボローム解析から、Apelin KO マウスでは血漿中の Ang 1-7 ペプチドの発現量が低下していることが分かった. また Ang II の 1 型受容体 (AT1R) と Apelin の二重遺伝子欠損マウス (AT1R/Apelin double KO) を作製したところ、圧負荷の Apelin KO マウスにおける心機能低下は AT1R/Apelin double KO において有意に改善され、ACE2 の発現上昇と相関していた. ところで、Ang II が ACE2 により代謝されて産生される Ang 1-7 は、単なる不活性型のアンジオテンシンペプチドではなく、G タンパク質共役型受容体のひとつである Mas 受容体に結合し、血管拡張や心筋細胞保護などの作用をもつことが知られていた. そこで、Ang 1-7 を Apelin KO マウスに投与したところ、圧負荷心不全モデルの Apelin KO マウスの心機能低下や心肥大が野生型のレベルまで改善された (図 9). また、培養細胞での発現解析やレポーターアッセイから、Apelin が ACE2 のプロモーター活性を上昇させて ACE2 の発現を制御することが分かった. さらに、圧負荷の AT1R KO マウスに Apelin ペプチドを投与したところ、Apelin は野生型マウスと同様に AT1R KO マウスの心機能を改善し、ACE2 の発現を上昇させたことから、Apelin が AT1R と独立に ACE2 を制御

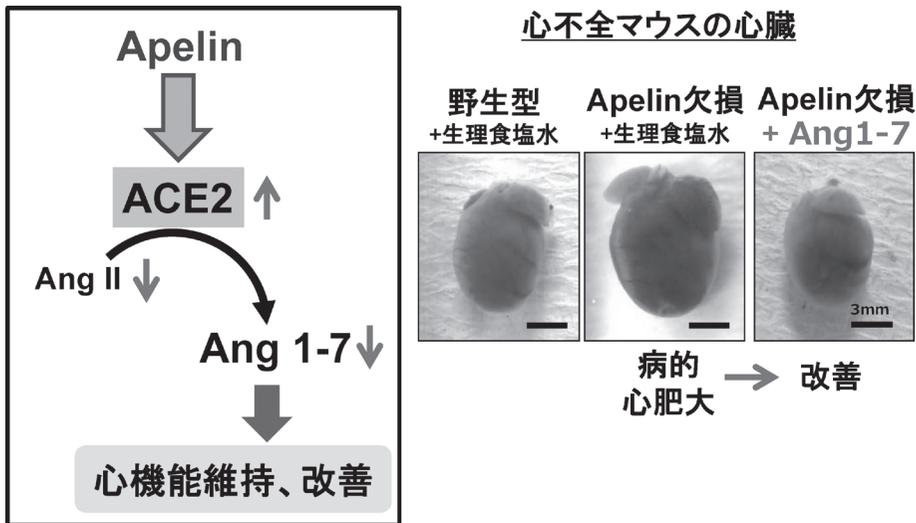


図9. 心不全における Apelin と Ang 1-7 の機能連関. TAC 心不全モデルの Apelin 欠損マウスの心肥大は Ang 1-7 投与により回復したことから, Apelin は, ACE2-Ang 1-7 を介して心肥大を抑制するといえる.

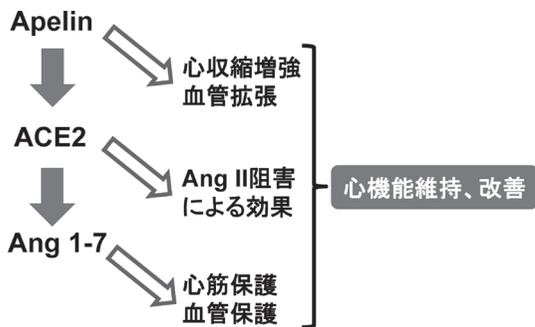


図10. Apelin-ACE2-Ang 1-7 のネットワークによる心機能制御.

することが分かった. したがって, これまで Apelin 系, RAS 系, あるいは Ang1-7-Mas 受容体系がそれぞれ独立に心血管系に作用していると考えられてきたが, Apelin-ACE2-Ang 1-7 の分子ネットワークとして作用することが心不全における心機能の恒常性維持に重要であることが分かった (図10). 今後 Apelin-ACE2-Ang 1-7 経路が新しい治療法の開発につながることを期待される¹⁶⁾.

最後に

本稿では, モデル生物から見出された ACE2 の解析研究から, 心不全病態の形成に関わる心筋細胞内の分子ネットワークならびにペプチド代謝を介したネットワークについて概説した. 疾患の発症メカニズムの理解のためには, ある種の遺伝性疾患や悪性腫瘍の原因遺伝子などは, ひとつの遺伝子変異などで病気の原因を正確に説明できるであろう. しかしながら, 心不全をはじめとした, さまざまな環境要因, 生活習慣などが複雑に発症に関わっている多因子性の疾患では, ひとつの遺伝子, 分子, パスウェイで疾患の全容を理解するのは難しい. 遺伝子改変動物などを用いた機能解析などにより, 生体の恒常性維持機構の動的変化をとらえ, 臓器間, 細胞間, 分子間などのネットワークによる連携, 協調作用に着目するなどの新たな視点での研究が求められている. 近年 TALEN や CRISPR などのゲノム編集技術の進歩により^{28,29)}, モデル生物における遺伝子改変のスピードはますます加速している (図11). また, 次世代シーケンス, 質量分析, ロボット, スーパーコンピュータなどバイオ系での目覚ましい技術革新の時代にあることから, 最新の技術を活用して今後も疾患の病態解明研究に取り組んでいきたいと考えている.

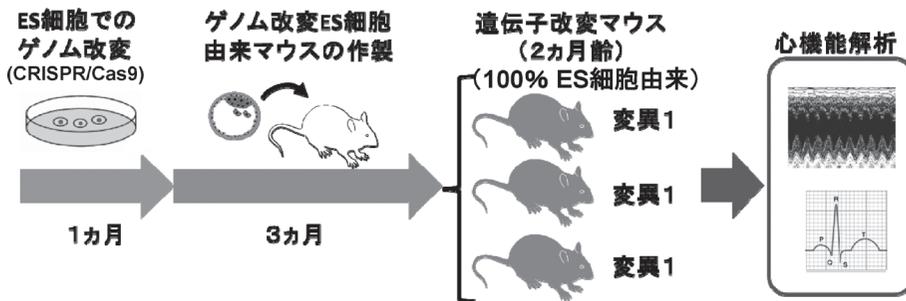


図 11. ゲノム編集を利用した G0 世代 (交配無し) での *in vivo* 遺伝子機能解析.

参考文献

- Mudd, J.O. and Kass, D.A. (2008) Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, **451**, 919-928.
- Bodmer, R., Jan, L. and Jan, Y. (1990) A new homeobox-containing gene, *msh-2*, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*. *Development*, **110**, 661-669.
- Komuro, I. and Izumo, S. (1993) *Csx*: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8145-8149.
- Yi, P., Han, Z., Li, X. and Olson, E.N. (2006) The mevalonate pathway controls heart formation in *Drosophila* by isoprenylation of Ggamma1. *Science*, **313**, 1301-1303.
- King, I.N., Qian, L., Liang, J., *et al.* (2011) A genome-wide screen reveals a role for microRNA-1 in modulating cardiac cell polarity. *Dev. Cell*, **20**, 497-510.
- Kim, Y.O., Park, S.J., Balaban, R.S., *et al.* (2004) A functional genomic screen for cardiogenic genes using RNA interference in developing *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(1), 159-164.
- Ocorr, K., Reeves, N., Wessells, R., *et al.* (2007) *KNCQ* potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3943-3948.
- Wolf, M.J., Amrein, H., Izatt, J.A., *et al.* (2006) *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1394-1399.
- Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., *et al.* (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, **417**, 822-828.
- Kuba, K., Imai, Y. and Penninger, J.M. (2013) Multiple functions of angiotensin-converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases. *Circ. J.*, **77**, 301-308.
- 久場敬司ら (2006) アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) による心血管ペプチド調節機構と疾患治療応用への展望. 実験医学増刊号 **24**(10).
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., *et al.* (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.*, **87**(5), E1-9.
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., *et al.* (2000) A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.*, **275**(43), 33238-33243.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., *et al.* (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.*, **277**(17), 14838-14843.
- Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., *et al.* (2007) Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ. Res.*, **101**(4), e32-42.
- Sato, T., Suzuki, T., Watanabe, H., *et al.* (2013) Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J. Clin. Invest.*, **123**(12), 5203-5211.
- Peiris, J.S., *et al.* (2004) Severe acute respiratory syndrome. *Nat. Med.*, **10**, S88-S97.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., *et al.* (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in

- SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.*, **11**, 875-879.
- 19) Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., *et al.* (2005) Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, **436**, 112-116.
- 20) Zhang, H., Wada, J., Hida, K., *et al.* (2001) Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J. Biol. Chem.*, **276**(20), 17132-17139.
- 21) Fukui, K., Yang, Q., Cao, Y., *et al.* (2005) The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab.*, **2**(6), 373-384.
- 22) Danilczyk, U., Sarao, R., Remy, C., *et al.* (2006) Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature*, **444**(7122), 1088-1091.
- 23) Hashimoto, T., Perlot, T., Kuba, K., *et al.* (2012) ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature*, **487**, 477-481.
- 24) Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., *et al.* (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature*, **448**, 151-156.
- 25) Neely, G., Kuba, K., Cammarato, A., *et al.* (2010) A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*, **141**(1), 142-153.
- 26) Denis, C.L. (1984) Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics*, **108**, 833-844.
- 27) Bartlam, M. and Yamamoto, T. (2010) The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein Cell*, **1**(5), 443-452.
- 28) Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., *et al.* (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**, 819-823.
- 29) Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., *et al.* (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **339**, 823-826.