

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15099

研究課題名（和文）ストップコドン読み飛ばしにより生まれるSyntaxin17の新たな機能

研究課題名（英文）Stop-codon readthrough provides novel functions for Syntaxin17

研究代表者

川口 紘平（KAWAGUCHI, Kohei）

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：10835515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：作成したアッセイ系を用いて延長型Stx17は神経系の細胞で高発現していることを明らかにした。また、様々な組織において通常型に比べて延長型Stx17は小胞体・ゴルジ体・ミトコンドリアなどに多く局在していることを明らかにした。さらに、延長型Stx17は通常型とは異なるSNAREパートナーと結合することを明らかにした。残念ながら、延長型Stx17特異的ノックアウト系統から明らかな表現系を見出すことは出来なかった。今後は、行動解析などを行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性疾患の数割がナンセンス変異と言われており、ストップコドンの読み飛ばしは多くの疾患の治療戦略として有望である。本研究は、ストップコドンの読み飛ばしが高頻度で起こるショウジョウバエをモデルにすることでメカニズムの一端を明らかにした。この成果は、様々な疾患の治療戦略を生み出す重要な基盤となりうるものである。

研究成果の概要（英文）：Using the assay system we developed, we revealed that the elongated form of Stx17 is highly expressed in neural cells. Additionally, we discovered that the elongated form of Stx17 is more frequently localized in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and mitochondria compared to the regular form across various tissues. Furthermore, we found that the elongated form of Stx17 binds with different SNARE partners than the regular form. Unfortunately, we could not identify any clear phenotypes from the elongated Stx17-specific knockout strains. Moving forward, we plan to conduct behavioral analyses and other investigations.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ショウジョウバエ ストップコドンの読み飛ばし Stx17

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

通常、リボソームはストップコドンを読み飛ばすと翻訳を終了する。しかし、多くの生物において、『ストップコドンの読み飛ばし(stop codon readthrough)』によって、C末端側が延長されたアイソフォームが翻訳されている。ショウジョウバエはストップコドンの読み飛ばしが高頻度に見られ、リボソームプロファイルや比較ゲノム解析により、数百種類の遺伝子でこの奇妙な現象が起こることが明らかにされている [Jungreis et al., Genome Res., 2011; Dun et al., Elife, 2013]。しかしながら、ストップコドンの読み飛ばしにより、翻訳産物の機能が変化することを示す例はこれまで報告されていない。ストップコドンの読み飛ばしにより、タンパク質の機能は変化しうるのだろうか？

SNARE タンパク質は膜融合の実行因子である。申請者はオートファジーに必要な SNARE タンパク質の 1 つである Syntaxin17 (Stx17) の解析の過程で、ショウジョウバエ Stx17 ではストップコドンの読み飛ばしが起こることに気がついた。さらに、ストップコドンの読み飛ばしによって生じる延長型の Stx17 アイソフォームには、C末端にファルネシル化の一つである脂質修飾を受ける CaaX モチーフが新たに付加されることを見出した。Stx17 は非典型的な SNARE であり、タンデムな膜貫通ドメインがヘアピンのように膜に挿入されることでオルガネラ上に局在する。このヘアピン状の膜貫通ドメインは膜からの離脱が可能であり、細胞質からオートファゴソームへの移行を可能にしている。このような知見から、ファルネシル化された延長型 Stx17 は、通常型の Stx17 とは大きく異なり、細胞質からオートファゴソームへ移行できないと予想された。

この仮説を検証するために通常型および延長型 Stx17 の局在を検討した。通常型の Stx17 がオートファゴソーム上に局在する一方、延長型 Stx17 はオートファゴソームには局在せず、ER やミトコンドリアに局在した。この結果は、ストップコドンの読み飛ばしにより生じる延長型 Stx17 は、オートファジーとは異なる経路で機能する可能性を強く示唆している。したがって、延長型 Stx17 の機能を解明することにより、ストップコドン読み飛ばしによる翻訳産物の機能変化を初めて明らかにできると考えられる。

2. 研究の目的

ショウジョウバエでは最初のストップコドンで翻訳が停止された通常型の Stx17 と、ストップコドンの読み飛ばしによって次のストップコドンまで翻訳が進む延長型の Stx17 アイソフォームが存在する。**本研究の目的**は、延長型 Stx17 の機能を解明し、ストップコドンの読み飛ばしによって機能的に異なるアイソフォームが作られることを示すことである。

3. 研究の方法

① 延長型 Stx17 を高発現する組織の同定

ストップコドンの読み飛ばしが起こる頻度は組織ごとに異なる [Hudson et al., PNAS, 2021]。Stx17 のストップコドンの読み飛ばしが高頻度に起こり、その結果、延長型 Stx17 を高発現

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

する組織では、延長型 Stx17 の機能が重要である可能性が高い。そこで、延長型 Stx17 を高発現する組織を同定した。組織ごとの通常型 Stx17 と延長型 Stx17 のタンパク質量を、抗 Stx17 抗体を用いたウエスタンブロットにより明らかにした。

② 延長型 Stx17 の細胞内局在の検討

通常型 Stx17 と延長型 Stx17 の細胞内局在を検討するため、HA タグを付加したそれぞれのコンストラクトを内在性レベルで発現する系統を樹立した。①で明らかにした延長型 Stx17 を高発現している組織を中心に、通常型 Stx17 と延長型 Stx17 の細胞内局在の違いを明らかにした。

③ 通常型および延長型 Stx17 と結合する SNARE タンパク質の同定

SNARE タンパク質は、Qa-, Qb-, Qc-, R-SNARE の4本の α ヘリックスが複合体を形成することで膜融合を促進する。Stx17 は Qa-SNARE に分類される。延長型 Stx17 の機能を理解する上で SNARE パートナーを同定することは重要である。そこで、通常型および延長型 Stx17 の結合タンパク質を探索する。HA タグ付きの通常型および延長型の Stx17 を内在性レベルで発現するショウジョウバエから、抗 HA ビーズを用いて Stx17 を免疫沈降し、結合タンパク質を質量分析により同定した。

④ 延長型 Stx17 を特異的にノックアウトしたショウジョウバエの表現系の解析

延長型 Stx17 特異的ノックアウト系統の表現系を解析した。

4. 研究成果**① 延長型 Stx17 を高発現する組織の同定**

作成したアッセイ系を用いて延長型 Stx17 は神経系の細胞で高発現していることを明らかにした。

② 延長型 Stx17 の細胞内局在の検討

様々な組織において通常型に比べて延長型 Stx17 は小胞体・ゴルジ体・ミトコンドリアなどに多く局在していることを明らかにした。

③ 通常型および延長型 Stx17 と結合する SNARE タンパク質の同定

延長型 Stx17 は通常型とは異なる SNARE パートナーと結合することを明らかにした。

④ 延長型 Stx17 を特異的にノックアウトしたショウジョウバエの表現系の解析

延長型 Stx17 特異的ノックアウト系統から明らかな表現系を見出すことは出来なかった。今後は行動解析などを行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Murakawa Tadayoshi, Nakamura Tsuyoshi, Kawaguchi Kohei, Murayama Futoshi, Zhao Ning, Stasevich Timothy J., Kimura Hiroshi, Fujita Naonobu | 4. 巻 149 |
| 2. 論文標題 A Drosophila toolkit for HA-tagged proteins unveils a block in autophagy flux in the last instar larval fat body | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Development | 6. 最初と最後の頁 0-0 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200243 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 川口紘平, 中村毅, 村川直柔, 小泉美智子, 吉川治孝, 小迫英尊, 藤田尚信 |
| 2. 発表標題 近接依存性標識法による 筋細胞特異的な膜構造体・T管のin vivoプロテオミクス |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|