

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440097

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いたyki mRNAのドット形成の分子機構と生体内の機能解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism and biological function of yki mRNA foci formation in *Drosophila*

研究代表者

吉田 英樹 (Yoshida, Hideki)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・助教

研究者番号：30570600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が同定した未知の機構により小胞体画分へ分画されるmRNAの1つであるyorkie mRNAが、自身の3'非翻訳領域の二次構造依存的に、小胞体に隣接するP-bodiesと呼ばれる翻訳抑制に関わるタンパク質とRNAの複合体に集積することを明らかにした。更に、このP-bodies集積に必要な配列を除去したmRNAをショウジョウバエ複眼で発現させると、組織の過形成することを示し、この配列が生体内においても翻訳抑制において重要な役割を担うことを明らかにした。これまでyorkieの制御の研究は、タンパク質の化学修飾に関してがほとんどであったが、それと同等の影響を示す新たな制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We revealed that yorkie (yki) mRNA is localized to the P-bodies, which is ribonucleoprotein complexes for translational repression and exist adjacent to the ER, depending on a secondary RNA structure in its own 3' untranslated region (UTR). Furthermore, we showed that the transgenic flies expressing the yorkie mRNA deleted the secondary RNA structure exhibited the enlarged compound eye phenotype. Further analyses using this fly line indicated that the secondary RNA structure in yki 3' UTR has an important role for translational repression in vivo. For the regulation of yki functional expression, importance of post-translational regulation of Yorkie by phosphorylation has been well established. However, in this study, we suggested another novel regulation which has similarly strong impact on yki gene expression.

研究分野：mRNAの細胞内局在

キーワード：yorkie mRNAの小胞体標的化 ショウジョウバエ SRP非依存的 翻訳抑制 ステムループ

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体へ標的化する mRNA には、その 5' 末端にシグナル配列と呼ばれる疎水性アミノ酸をコードする配列が存在し、その配列の翻訳依存的に小胞体への標的化が起こることが知られていた。一方で、シグナル配列を持たない mRNA は細胞質中にあるリボソームにより翻訳されると考えられていたが、シグナル配列を持たない mRNA の小胞体への標的化を示唆する結果が報告された。しかし、その分子メカニズムはほとんど分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

我々が、シグナル配列を持たず小胞体へ標的化する mRNA として同定した *yorkie* (*yki*) mRNA の標的化に必要な mRNA 内の配列 (シス配列)、標的化に関わるタンパク質 (トランス因子) を同定し、ショウジョウバエ生体を用いて、*yki* mRNA の小胞体標的化の生物学的意義の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

我々が樹立したショウジョウバエ培養細胞における RNA 可視化システムを用いて、*yki* mRNA の細胞内局在を可視化し、段階的な欠失コンストラクトシリーズを用い、小胞体標的化に必要な RNA 配列 (SL2) の同定を行なった。また、同定した配列にストレプトアビジン結合性 RNA タグを連結し、ストレプトアビジンカラムを用い、SL2 に結合するタンパク質の精製をし、質量分析装置により同定を行なった。また、SL2 を欠失した *yki* mRNA を過剰発現する遺伝子組換えショウジョウバエを作製し、その表現型等から SL2 の担う役割を解析した。

### 4. 研究成果

ショウジョウバエ培養細胞における RNA 可視化システムにて、*yki* mRNA の小胞体標的化に 3' 非翻訳領域内のステムループと呼ばれる RNA の二次構造 (SL2) が重要であることを明らかにした。更に、この RNA 可視化システムを用いた詳細な解析により、この SL2 のステムの構造及びループの配列が小胞体標的化に重要であることも明らかにした。この SL2 に結合するタンパク質をストレプトアビジンカラムを用い生化学的に精製、質量分析機により同定をした。RNA 結合タンパク質や翻訳に関与するタンパク質等、12 種類の候補タンパク質を得た。これと並行して、SL2 の生体における機能を調べるために、SL2 欠損 *yki* mRNA を複眼で特異的に過剰発現するショウジョウバエを作製した。このショウジョウバエの複眼は *Yki* タンパク質の機能亢進で誘導される組織の過形成を酷似した表現型を示した。これは、これまでの *yki* 遺伝子を過剰発現しても何も異常が起こらないという常識を覆す結果であった。そこで、更に解析を進めたところ、SL2 には小胞体標的化に必要な

二次構造だけでなく、*yki* mRNA の分解に関わる配列も存在することを見つけ、更に *yki* mRNA の小胞体標的化は *yki* mRNA の翻訳抑制に関与することを明らかにした。このように、*yki* 遺伝子がタンパク質になるまでに mRNA のレベルで 2 つの制御を受けることを明らかにした。

### 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 7 件)

- ① Takanari Umegawachi\*, Hideki Yoshida\*§, Hiromu Koshida, Momoko Yamada, Yasuyuki Ohkawa, Tetsuya Sato, Mikita Suyama, Henry M. Krause, Masamitsu Yamaguchi. Control of tissue size and development by a regulatory element in the *yorkie* 3'UTR. Am. J. Cancer Res. 7 (3):673-687. eCollection 2017. \*These authors contributed equally to this work. § Corresponding author.
- ② Kazushige Morishita, Dang Ngoc Anh Suong, Hideki Yoshida and Masamitsu Yamaguchi. The Drosophila DOCK family protein Sponge is required for development of the air sac primodium. Exp. Cell Res., S0014-4827 (17) 30165-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.044., 2017.
- ③ Nicole Vo, Dang Ngoc-Anh Suong Natsuki Yoshino, Hideki Yoshida, Sue Cotterill and Masamitsu Yamaguchi. Novel roles of HP1a and Mcm10 in DNA replication, genome maintenance and photoreceptor cell differentiation. Nucleic Acids Res. 2017; 45 (3): 1233-1254. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1174>, 2017
- ④ Moyu Goto, Narumi Toda, Kouhei Shimaji, Dang Ngoc-Anh Suong, Nicole Vo, Hiroshi Kimura, Hideki Yoshida, Yoshihiro H. Inoue and Masamitsu Yamaguchi. Polycomb-dependent nucleous localization of Jumonji/Jarid2 during

*Drosophila* spermatogenesis.

Spermatogenesis., 6 (3): e1232023. doi:  
10.1080/21565562.2016.1232023., 2016.

- ⑤ Ei Nakajima, Kouhei Shimaji, Takanari Umegawachi, Saki Tomida, Hideki Yoshida, Nana Yoshimoto, Shingo Izawa, Hiroshi Kimura and Masamitsu Yamaguchi. The Histone Deacetylase Gene Rpd3 Is Required for Starvation Stress Resistance. PLoS One, 11 (12): e0167554. doi: 10.1371/journal.pone.0167554., 2016.
- ⑥ Mako Nakazawa, Yuka Matsushita, Hisaaki Matsubara, Hideki Yoshida, Masamitsu Yamaguchi and Takao Kataoka. The human Bcl-2 family member Bcl-rambo localizes to mitochondria and induces apoptosis and morphological aberration in *Drosophila*. PLoS One., 11(6):e0157823. doi: 10.1371/journal.pone.0157823. eCollection 2016., 2016.
- ⑦ Kouhei Shimaji, Takahiro Konishi, Hideki Yoshida, Hiroshi Kimura and Masamitsu Yamaguchi. Genome-wide genetic screen identified the link between dG9a and epidermal growth factor receptor signaling pathway in vivo. Exp. Cell Res., 346 (1): 53-64. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.06.013., 2016.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 上岡伊吹、川島和、小西篤、青木幹雄、吉田英樹、前田徹、尾崎まみこ、山口政光、ショウジョウバエモデルを用いた自閉症スペクトラム障害 (ASD) 原因候補遺伝子の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- ② 岡田 (櫛村) 由紀恵、徳田隆彦、東裕美子、山本格、中村綾、奥主隆太、上

岡伊吹、京谷茜、吉田英樹、水田依久子、上岡盛夫、永井義隆、中川正法、水野敏樹、山口政光、TDP-43 ALS ショウジョウバエモデルを用いた機能解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

- ③ 梅河内隆成、越田大夢、山田百子、臼井一馬、佐藤哲也、須山幹太、伊藤恵美、大川恭行、山口政光、ヘンリークラウス、吉田英樹、ショウジョウバエの複眼形成における *yki* mRNA の多段階制御の分子メカニズムと生物学的意義の解明、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- ④ 中村綾、山本格、吉田英樹、東裕美子、水田依久子、水野敏樹、中川正法、徳田隆彦、山口政光、ショウジョウバエ CMT 原因遺伝子 / ALS 関連遺伝子 *FIG4* の遺伝学的相互作用因子としてのイオンチャネル活性化因子と long non-coding RNA の同定、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- ⑤ 水田依久子、東裕美子、戸田成美、吉田英樹、山口政光、水野敏樹、Strategy to elucidate pathogenesis of CADASIL using transgenic *Drosophila* models of human NTOCH3、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- ⑥ 坂本優一、田中祐、梅河内隆成、山口政光、吉田英樹、*yki* mRNA の細胞内局在を制御する因子の同定、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」
- ⑦ 山本格、東裕美子、岡田 (櫛村) 由紀

- 恵、吉田英樹、水田依久子、奥主隆太、上岡盛夫、藤掛伸宏、水野敏樹、徳田隆彦、山口政光、ヒト NPM-hMLF1 融合タンパク質は ALS 原因因子 FUS が誘導する凝集体形成を阻害する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑧ 東裕美子、徳田隆彦、岡田（櫛村）由紀恵、山本格、中村綾、奥主隆太、上岡伊吹、水田依久子、上岡盛夫、永井義隆、中川正法、水野敏樹、吉田英樹、山口政光、FUS は神経筋接合部におけるシナプス構造を規定する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑨ 田中領、西野冴香、平島智貴、Krause Henry、山口政光、吉田英樹、ショウジョウバエ 初期胚を用いた Pseudo-cleavage furrow 局在を示す *cno* mRNA の局在化機構の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑩ 平島智貴、田中領、西野冴香、Henry Krause、山口政光、吉田英樹、ショウジョウバエ 初期胚における *scraps* mRNA の Pseudo-cleavage furrow 様局在機構の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑪ 西野冴香、田中領、平島智貴、Henry Krause、山口政光、吉田英樹、ショウジョウバエ 初期胚において pseudo-cleavage furrow 様局在を示す *diaphanous* mRNA の局在化配列の同定、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑫ 松原久典、中澤茉莉子、松下由果、渡辺萌、Nicole Vo、吉田英樹、山口政光、片岡孝夫、ヒト Bcl-rambor はショウジョウバエにおいてミトコンドリアに依存したアポトーシスを誘導する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑬ 後藤萌、戸田成美、吉田英樹、井上喜博、木村宏、山口政光、ショウジョウバエ精子形成過程でのエピジェネティック制御因子 dJmj/dJarid2 の核小体局在を制御する仕組み、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑭ 富田早紀、嶋路耕平、中島英、吉田英樹、山口政光、ショウジョウバエヒストンアセチル化酵素遺伝子 *Tip60* は飢餓耐性獲得に関与する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」
- ⑮ Takanari Umegawachi, Hiromu Koshida, Momoko Yamada, Kazuma Usui, Tetsuya Sato, Mikita Suyama, Megumi Ito, Yasuyuki Ohkawa, Masamitsu Yamaguchi, Krause M. Henry, Hideki Yoshida（発表代表者）、Subcellular localization of *yki* mRNAs is regulated by stem-loop in the 3'UTR. RNA 2016、2016 年 6 月 28 日～7 月 2 日、「国立京都国際会館（京都府・京都市）」

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 英樹 (YOSHIDA Hideki)  
京都工芸繊維大学・応用生物学系・助教  
研究者番号：30570600

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

梅河内 隆成 (UMEGAWACHI Takanari)