

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月13日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20370091

研究課題名（和文） 上皮細胞の形態を制御する短鎖ペプチドの機能

研究課題名（英文） Functional Analysis of a peptide regulator in epidermal morphogenesis

研究代表者

影山 裕二 (KAGEYAMA YUJI)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：90335480

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエ *polished rice* (*pri*) 遺伝子がコードしている、11 および 32 アミノ酸のごく短いペプチド (PRI ペプチド) は、細胞外に分泌されない新しいタイプの活性ペプチドと考えられている。PRI ペプチドの作用機構を明らかにするため、遺伝的相互作用を示す遺伝子を探索したところ、転写因子をコードする *shavenbaby* (*svb*) 遺伝子が同定された。SVB タンパク質は上皮細胞の形態形成を制御するマスター因子であるが、PRI ペプチド存在下では SVB タンパク質の活性化が起こることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

polished rice (*pri*) encodes extremely small 11 or 32 aa-long peptides that do not include any signatures of secretion signal peptide sequences, and therefore its gene products should be of novel type of bioactive molecules. To elucidate molecular mechanisms underlying *pri* function, we found *pri* genetically interacts with *shavenbaby* (*svb*). *svb* encodes a transcription factor and is hydrolysed and activated only in the presence of PRI peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	2,700,000	810,000	23,510,000
2010年度	2,700,000	810,000	23,510,000
2011年度	2,700,000	810,000	23,510,000
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ、発生遺伝、上皮細胞、形態形成、細胞骨格

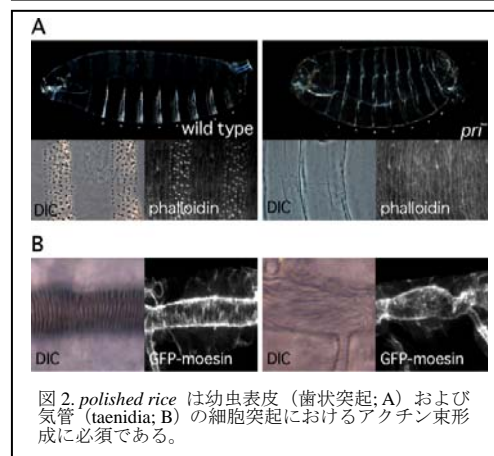
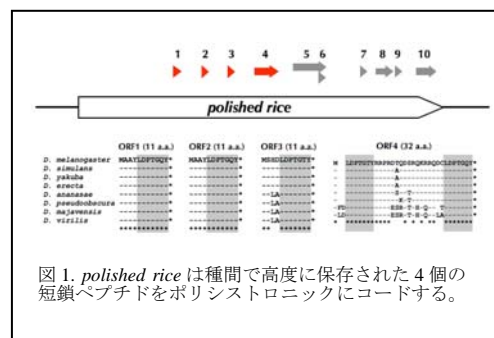
1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は個体あるいは個々の器官を取り囲む細胞であり、個々の器官の生理的役割に応じて細胞表面に様々な小突起（腸

上皮の微絨毛や、内耳感覚毛など）を構築している。これら細胞突起は、アクチン束の集積により形成されることが知られており、アクチン重合開始に必要な Arp2/3,

formin や、アクチン束形成のクロスリンカーである Espin, Fascin などのアクチン制御因子群が細胞内に局在化し、細胞突起の形成に決定的な役割を果たすことが知られている (参考文献 1)。しかしながら、これらアクチン制御因子群の細胞内局在化機構については不明な点が多く残されている。

ショウジョウバエ *polished rice* (*pri*) は、11 あるいは 32 アミノ酸の 4 個の短鎖ペプチド をコードするユニークな遺伝子であり、アクチン束の形成を介して、幼虫表皮および気管の細胞突起形成を細胞非



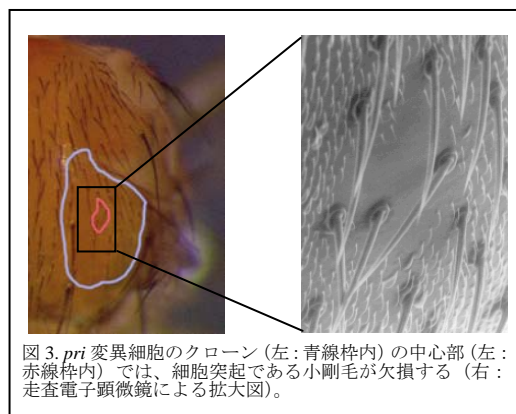
自立的に制御している (図 1-2; 参考文献 2)。ごく最近、*pri* 変異体においてこれらの器官におけるアクチン制御因子の局在が消失することが明らかとなり (橋本ら、未発表)、*pri* 遺伝子がアクチン制御因子の細胞内局在に決定的な役割を果たすことが強く示唆されているが、現在までのところ、その分子機構は全くわかっていない。

2. 研究の目的

上記の現状を踏まえ、本研究では以下の研究を行う。

1) 成虫原基における *pri* 遺伝子の生理機能の解析

pri 遺伝子は変態期の成虫原基に強く発現しており、成虫原基における *pri* の機能欠失は、剛毛や微小毛などの細胞突起の欠損を引き起こすことが明らかになっている (図 3; 橋本ら、未発表)。成虫原基の



pri 変異細胞中におけるアクチン制御因子の局在の変化を解析することにより、*pri* 遺伝子産物の作用点を明らかにする。

2) 細胞内における PRI ペプチドの挙動の解析

PRI ペプチドの分子機構を推測する上で、細胞内におけるその振る舞いは極めて有用な情報となる。また、PRI ペプチドは細胞非自立的な作用を示すことが示されており、PRI ペプチドの細胞内局在を解析することにより、その作用機構についての重要な知見が得られると期待される。PRI ペプチドに対する抗体を作製し、あるいは PRI ペプチドを各種分子タグとの融合ペプチドとして発現するトランスジーン系統を用いることにより、胚発生後期あるいは成虫原基細胞における PRI ペプチドの細胞内における挙動を解析する。

3) PRI ペプチドと相互作用する因子の同定

PRI ペプチドに対する抗体を用いた免疫沈降法により、あるいは上述したタグ融合遺伝子を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより PRI 結合タンパク質を部分精製し、マスマスペクトログラフィーによりその同定を行う。また、PRI 結合タンパク質をコードする遺伝子について突然変異系統を作製し、その表現型の解析を行うことにより、上皮細胞の形態形成における PRI ペプチドの分子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 成虫原基における *pri* 表現型の解析

pri 遺伝子は変態期の成虫原基に強く発現しており、遺伝学的モザイク個体の成虫原基の解析から、*pri* 遺伝子は細胞突起である小剛毛の形成に必須であることが明らかになっている (図 3; 橋本ら、未発表)。これら遺伝学的モザイク個体を用い、*pri* 変異細胞におけるアクチン制御因子の挙動を解析することにより、*pri* 遺伝子産物の作用点を明らかにし、その作用機構を推測する。

1-i) *pri* 変異細胞におけるアクチン制御因子の局在解析

小剛毛の形成に関与するクチン制御因子を対象に、成虫原基の *pri* 変異細胞クローンにおける細胞内局在を解析する。

1-ii) *pri* 変異細胞における細胞骨格の動態

小剛毛細胞の細胞突起形成時には、アクチン束形成とほぼ同時に微小管が形成されることが知られており、アクチン束形成(あるいはその維持)に微小管形成が必要である可能性が考えられる。 β -tubulin-GFP および微小管(+)端マーカーである EB1-GFP を用いた微小管動態のタイムラプス解析を行い、アクチン繊維のマーカーである

moesin-GFP との比較を行うことにより、*pri* 変異細胞におけるこれら細胞骨格の動態を解析する。*pri* 変異細胞において、アクチン束形成だけでなく、微小管の形成にも異常が見られた場合には、微小管形成制御因子の局在についても検討する。

2) PRI ペプチドと相互作用する因子の同定

PRI ペプチドのような短鎖ペプチドは、それ自身で生体内における化学反応を触媒しているとは考えにくく、何らかのパートナーと結合することにより初めてその活性を発揮すると考えられる。従って、PRI ペプチドと物理的に相互作用する因子の同定が、PRI ペプチドの分子活性を考える上で決定的に重要である。

2-i) PRI ペプチドと物理的に相互作用する因子の同定

PRI ペプチドに対する抗体を用いた免疫沈降法により、あるいは上述したタグ融合遺伝子を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより PRI 結合タンパク質を部分精製し、マスマスペクトログラフィーによる同定を行う。また、合成 PRI ペプチドおよび突然変異を導入した合成ペプチドと、当該因子の組換えタンパク質を用い、試験管内結合実験を行うことにより、結合定数の測定を行う。

2-ii) PRI ペプチドと物理的に相互作用する因子の生理機能の解析

PRI 結合タンパク質をコードする遺伝子について、トランスポゾン挿入システムを利用した突然変異系統の作製を行い、変異体の表現型の解析を行う。解析の際には、胚発生期および変態期における *pri* 表現型との関係に注目し、類似の表現型を示すかどうかにも注目する。また、成虫原基の形成に弱い影響を示す *pri* の対立遺伝子 (橋本ら、未発表) との二重変異体の表現型の解析を行い、遺伝学的な相互

作用を明らかにする。

4. 研究成果

1) 成虫原基における *pri* 表現型の解析

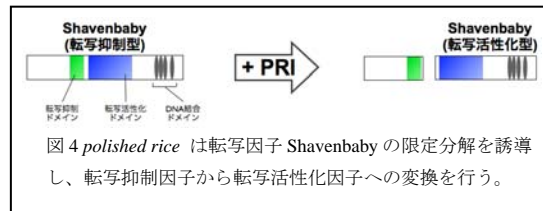
in situ ハイブリダイゼーション法による *pri* 遺伝子の発現解析を行ったところ、*pri* 遺伝子は成虫原基において、変態期のごく限られた発生段階に特異的に発現していることが明らかとなった。この時期は、ステロイドホルモンの一種であるエクジステロイドの力価上昇直後に相当しており、*pri* 遺伝子の発現がエクジステロイドに依存していることが、成虫原基の組織培養を用いた発現誘導や、各種変異系統を用いた遺伝学的実験により示された。また、*pri* 変異系統では、エクジステロイド依存性の転写因子の発現に異常が見られ、エクジステロイド受容体の変異系統と類似の表現型を示すこと、*pri* 遺伝子の過剰発現がこれらの表現型がエクジステロイド受容体の変異系統の表現型を有意に回復させることから、*pri* 遺伝子がエクジステロイドシグナル伝達経路の重要な因子の一つであることが明らかになった。

2) PRI ペプチドと相互作用する因子の同定

pri 遺伝子がコードする短鎖ペプチドの作用機構を明らかにするために、*pri* 遺伝子の変異系統で発現が変化するものを検索したところ、*minute* および *shavened* の二つの遺伝子の発現が、*pri* 遺伝子に依存していることが明らかとなった。これら2つの遺伝子は、転写因子をコードする *shavenbaby* 遺伝子によって直接制御されていることから、*shavenbaby* と *pri* 遺伝子との相互作用を検討したところ、Shavenbaby タンパク質による転写活性化には、*pri* 遺伝子の活性が必要であることが明らかとなった。生化学的解析により、PRI ペプチド存在下では、Shavenbaby の N 末端領域が部分分解され、N 末端側に含まれる転写抑制活性が除去されることにより、

Shavenbaby が本来持つ転写活性化能が発揮されるようになることが明らかとなった。

(1)の研究結果と合わせ、これらの事実は、



PRI ペプチドが、直接あるいは間接的に遺伝子の発現調節に関与することで、変態や細胞の形態形成などの発生現象を制御していることを示している。

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4件) 全て査読あり

① Yuji Kageyama, Kondo T and Hashimoto Y. Coding vs non-coding: Translatability of short ORFs found in putative non-coding transcripts.

Biochimie. 93: 1981-1986. (2011)

② Takefumi Kondo, Plaza, S., Zanet, J., Benrabah, E., Valenti, P., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Payre, F. and Kageyama, Y. Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during *Drosophila* Embryogenesis.

Science 329: 336-339. (2010)

③ Yoshiko Hashimoto, Kondo, K. and Kageyama, Y.

Lilliputians get into the limelight - novel class of small peptide genes in morphogenesis.

Develop. Growth Diff. 50: S269-276. (2008)

④ Satoko Aratani., Kageyama, Y., Nakamura, A., Fujita, H., Fujii, R., Nishioka, K. and Nakajima, T.

MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila*.

Int. J. Molec. Med. 21: 469-476. (2008)

[学会発表] (計13件)

① Yoshiko Hashimoto, Kaori Niimi,

Takefumi Kondo, Yuji Kageyama.
A small peptide gene *polished rice* is essential for trichome formation and metamorphosis in *Drosophila*.
第 44 回日本発生生物学学会年会シンポジウム
「Genetic Control of Morphogenesis」 沖縄 2011 年 5 月 18-21 日

②Yuji Kageyama
Small peptide regulators encoded in extremely short ORFs
4th International Symposium on Nanomedicine 岡崎 2010 年 11 月 29 日-12 月 1 日

③近藤武史、Serge Plaza、Jennifer Zanet、Emilie Benrabah、Philippe Valenti、橋本祥子、小林悟、François Payre、影山裕二
短鎖ペプチドによる転写因子の活性制御
第 12 回日本 RNA 学会年会 東京 2010 年 7 月 27-29 日

④ Yoshiko Hashimoto, Kaori Niimi, Takefumi Kondo, Yuji Kageyama.
A small peptide gene, *polished rice*, participates in *Drosophila* ecdysone signal pathway.
The 18th International Ecdysone Workshop, České Budějovice (Czech Republic), July 19-23, 2010.

⑤Takefumi Kondo, Yoshiko Hashimoto, Yuji Kageyama
polished rice that encodes 11- and 32-aa peptide regulates subnuclear localization and activity of transcription factor Shavenbaby during trichome formation.
The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference 掛川 2009 年 7 月 6-8 日

⑥ Takefumi Kondo, Hashimoto, Y. and Kageyama, Y.
polished rice that encodes 11 and 32 aa-peptide regulates subnuclear localization and activity of transcription factor Shavenbaby in denticle formation.
50th Annual *Drosophila* Research Conference, Chicago (USA), March 4-8, 2009.

⑦Yuji Kageyama, Hashimoto, Y. and Kondo, T.
polished rice, a versatile gene regulator in *Drosophila* development.
50th Annual *Drosophila* Research Conference, Chicago (USA), March 4-8,

2009.

⑧ Yoshiko Hashimoto, Kondo, T. and Kageyama, Y.
polished rice functions in ecdysone signaling.
50th Annual *Drosophila* Research Conference, Ecdysone Workshop, Chicago (USA), March 4, 2009.

⑨影山裕二
Coding vs. Non-coding: Lessons from *Drosophila*.
第 31 回日本分子生物学会シンポジウム
「Expansion of non-protein-coding RNA inventory」神戸 2008 年 12 月 9-12 日

⑩影山裕二、稲垣幸、橋本祥子
ショウジョウバエ *MRE32* RNA は雌特異的に羽化のタイミングを制御している
第 10 回日本 RNA 学会年会 札幌 2008 年 7 月 23-25 日

⑪ Yoshiko Hashimoto, Kondo, T. and Kageyama, Y.
A short peptide gene *polished rice* controls *Drosophila* metamorphosis through intercellular communication.
第 41 回日本発生生物学学会年会 徳島 2008 年 5 月 28-30 日

⑫近藤武史、橋本祥子、影山裕二
上皮形態形成を制御する短鎖ペプチド
第 41 回日本発生生物学学会年会サテライトシンポジウム 徳島 2008 年 5 月 27 日

⑬Yuji Kageyama, Hashimoto, Y. and Kondo, T.
A small peptide gene *polished rice* regulates imaginal development via intercellular communication.
49th Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego (USA), April 2008.

〔図書〕(計 1 件)

①影山裕二
機能性 RNA の分子生物学 河合剛太・清澤秀孔編(クバプロ) 2010 年 12 月
第 IV 章 mRNA 型 non-coding RNA pp. 181-196.

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
影山 裕二 (KAGEYAMA YUJI)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環
遺伝子実験センター・准教授
研究者番号：90335480

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし