

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：32686

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657137

研究課題名（和文） GPI アンカー修飾は mRNA の局在によって制御されているか

研究課題名（英文） The influence of transcript localization on post-translational modification

研究代表者

山本 美紀 (YAMAMOTO MIKI)

立教大学・理学部・ポストドクトラルフェロー

研究者番号：40301783

研究成果の概要（和文）：

蛋白質が正しい機能を発現するために、蛋白質の翻訳後修飾が必要である。本研究では蛋白質の翻訳後修飾が、その蛋白質の mRNA の局在によって制御されているかどうか検討した。ショウジョウバエの Dally-like 蛋白質(Dlp)は正しく細胞膜に局在して機能するために、翻訳後修飾の一つである GPI アンカー修飾が必要である。そして dlp mRNA は核近傍に存在する。dlp mRNA を遺伝子改変によって核近傍でない領域に発現させた結果、そこから翻訳された蛋白質は正しい機能を示さなかった。また細胞内に蓄積しており、正しく GPI アンカー修飾されていないことを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Post-translational modification of protein is important in promoting proper function of protein. In this study, we investigated whether post-translational modification of protein is regulated by mRNA localization or not. Dally-like protein (Dlp) in Drosophila has GPI-anchor which is a type of post-translational modification. And dlp mRNA shows restricted distribution near nucleus in wing disc cells. We changed the localization of dlp mRNA by replacing 3' -noncoding region of dlp with that of wingless which contains apical localization signal. The products translated from mislocalized mRNA did not show proper function and were accumulated in apical region of cells, suggesting that mRNA localization is involved in protein function and probably post-translational modification.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能・GPI アンカー修飾

1. 研究開始当初の背景

これまで膜蛋白質や分泌蛋白質は、細胞内小胞体で一様に翻訳されると考えられていたが、

(1) 多くの mRNA が細胞内で限局された領域に発現していること

(2) 蛋白質によってはある特定の小胞体で翻訳されることが、その蛋白質の機能発現に重要であること

そして

(3) 蛋白質の機能発現には、蛋白質が多様な翻訳後修飾を正しく受けることが重要であること

が明らかになりつつあった。

しかし、翻訳後修飾がどのように制御されているかについては未解明の部分が多く残されたままで、特に蛋白質がある特定の小胞体で翻訳されること、すなわち mRNA の細胞内での局在が、その翻訳される蛋白質の翻訳後修飾を制御することによって蛋白質の正しい機能発現に参与している可能性については、全く知見がなかった。

我々はショウジョウバエをモデル系として用い、GPI アンカー修飾をうける蛋白質、Dally-like 蛋白質(Dlp)の mRNA が核膜近傍の粗面小胞体に局在していることを見出した。また核膜には、GPI アンカー生合成酵素の一つである Pig-B 蛋白質が局在していることも明らかにした。これらの結果から、Dlp 蛋白質に効率よく GPI アンカーが付加されるためには、dlp mRNA の核膜近傍への局在が重要なのではないかと、即ち mRNA の局在が GPI アンカー修飾を制御しているのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

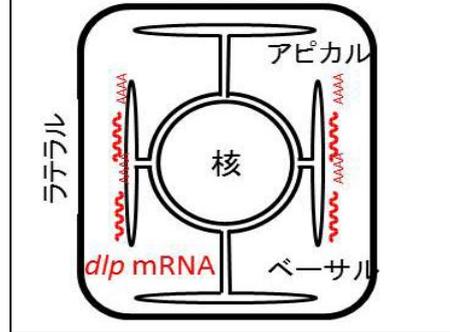
本研究の目的は、蛋白質の翻訳後修飾が、翻訳前の mRNA の段階で(特に mRNA の局在によって)既に制御されているかどうかを示すことにある。本研究では特に、GPI アンカー修飾を受ける Dlp 蛋白質の mRNA 局在が GPI アンカー修飾に果たす役割を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) GPI アンカー修飾を受ける Dlp 蛋白質の mRNA 局在の改変

dlp mRNA は、これまでの我々の解析により核膜近傍に局在することが明らかになっている(図1)。そこでこの局在が、Dlp 蛋白質の機能発現や GPI 修飾に重要であるかどうかを確かめるためには、正しい局在を示す mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質と、局在を改変した dlp mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質の機能や翻訳後修飾を比較する必要がある。そこで、dlp mRNA の非翻訳領域を、

図1 dlp mRNAは核膜近傍に分布する



アピカル局在シグナルを持つ wingless のものと入れ替えた発現ベクターを作成し(図2)、これを発現するトランスジェニックハエを作成した。

図2 dlp mRNAの局在を変化させるための模式図

| 翻訳領域 | 3'非翻訳領域 | mRNA 局在 | 蛋白質 局在 |
|------|---------|---------|--------|
| dlp | dlp | 核膜近傍 | 細胞膜 |
| dlp | wg | アピカル? | ? |

(2) 局在を変えた mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質の機能

まず、異常な局在を示す mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質が、正しい機能を持っているかどうかを検討した。本来の局在を示す mRNA を過剰発現させると、ショウジョウバエ成虫の羽に形態異常が生じることがわかっている。もし局在が異常な mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質が正常な機能を持たないなら、羽の形態異常が起こらない、または起こったとしてもその異常は弱いと考えられる。

(3) 局在を変えた mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質の局在

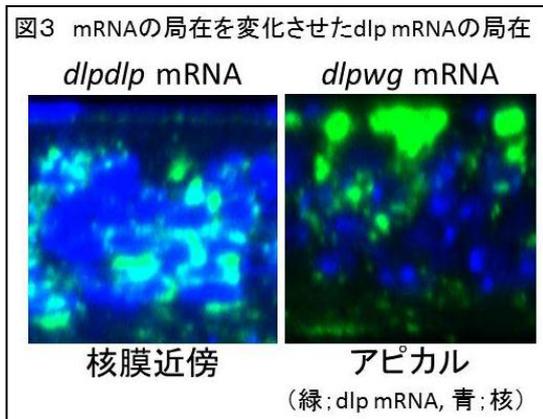
次に、異常な局在を示す mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質が、正しい局在を示すかどうか、ショウジョウバエ幼虫の羽原基の免疫染色によって検討した。本来の Dlp 蛋白質は、細胞の側面(ラテラル側)の細胞膜上に局在することがわかっている。もし局在が異常な mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質が正常な局在を示さないなら、それは mRNA の局在が翻訳産物である蛋白質の局在を制御していることを示している。さらに GPI アンカー修飾は細胞膜に局在するために必要な翻訳後修飾なので、もし局在が異常な mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質が細胞膜に輸送されず、細胞内に蓄積しているようであれば、そ

これは GPI アンカー修飾に異常が生じている可能性を強く示唆するものであると考えられる。

4. 研究成果

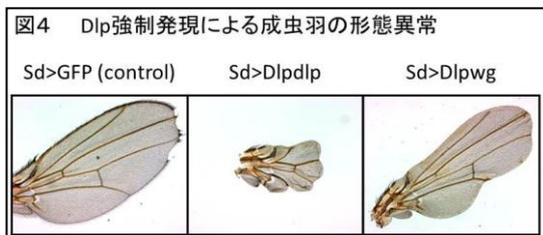
(1) GPI アンカー修飾を受ける蛋白質、Dlp 蛋白質 の mRNA 局在の改変

mRNA の局在を変化させることを目的として作成したトランスジェニックハエでは、目的通り、3' 翻訳領域を wg のものに置換することによって、その局在を核膜近傍から細胞のアピカル側へ変化させることができた (図 3)。



(2) 局在を変えた mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質の機能

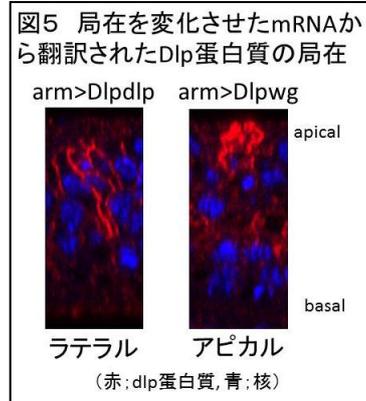
正常な mRNA 局在を示す Dlp (d1pd1p) 蛋白質を強制発現させた場合、成虫の羽は周辺が大きく欠けてサイズが小さくなるが、異常な mRNA 局在を示す Dlp (d1pwg) 蛋白質を強制発現させた場合、その欠け方は弱いことが明らかになった (図 4)。即ち、異常な局在を示す mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質は、正常な Dlp としての機能を持たない可能性が示唆された。



(3) 局在を変えた mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質の局在

正常な mRNA 局在を示す Dlp (d1pd1p) 蛋白質を発現させた場合、その蛋白質は内在性のものと同様に細胞のラテラル膜に局在していた。しかし異常な mRNA 局在を示す Dlp (d1pwg)

蛋白質を発現させた場合、その蛋白質は細胞のアピカル側に蓄積しており、異常な局在を示した (図 5)。さらにその蛋白質は細胞膜というより細胞内に観察され、GPI アンカー修飾が正常になされていない可能性が示唆された。



(4) 得られた成果のインパクト

まず、局在が異常になった mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質が正しい機能を持たないことを示すことができた。このことは、d1p mRNA の核膜近傍への局在が、その翻訳産物の正しい機能発現に重要な働きを担っていることを示している。

次にその蛋白質の局在が異常になっていることを示すことができた。そしてその異常な局在は、GPI-アンカー修飾が正常に行われていないことを示唆するものであり、本研究の目的であった、mRNA の局在が翻訳後修飾を制御している可能性を強く示すことができた。

mRNA の局在による翻訳後修飾の制御は、これまでほとんど報告がなく、本研究の結果は我々の知る限り、世界で初めての発見である。

(5) 今後の課題、展望

まず、今回観察された、異常な局在を示す mRNA から翻訳された Dlp 蛋白質に本当に GPI アンカーが付加されていないかどうか、また付加されていたとしても完全な構造をとっているかどうか、生化学的に証明する必要がある。また GPI アンカー付加以外にも、Dlp 蛋白質が受けるその他の翻訳後修飾、たとえばグリコサミノグリカン修飾なども異常になっているかどうか、生化学的な検討が必要である。

GPI アンカー修飾に異常があることが確認できたら、なぜ Dlp 蛋白質が核膜近傍の小胞体で翻訳される必要があるのか、そのメカニズムについて解析を行う。そのためには、GPI アンカー生合成に関わる酵素の細胞内局在や、GPI アンカーを蛋白質に転移する転移酵素の局在を調べ、核膜近傍の小胞体が GPI アンカーの合成および付加を担当していることを示す。これらの研究によって、

これまで小胞体は機能的に一様であると考えられていたが、小胞体が機能的にいくつかのサブコンパートメント化されているという新しい概念を提示できる。そしてそのようなコンパートメント形成に必要な蛋白質や mRNA がそこに局在するメカニズムを明らかにするなど、広がりのある研究を展開できる。

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 2 件)

① “Cisterna-specific localization of glycosylation-related proteins to the Golgi apparatus.” (2012) Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Shibano, T., Setoguchi, Y., Awano, W., Ueda, R., Okano, H. and Goto, S. *Cell Struct. Funct.* 37 55-63 (査読有)

② “Identification of proteasome components required for apical localization of Choptin using functional genomics.” (2012) Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Awano, W., Aoki-Kinoshita, K. F., Tsuda-Sakurai, K., Okano, H. and Goto, S. *J. Neurogenet.* 26 53-63 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

① 山本 (日野) 美紀、「ショウジョウバエゴルジ体に局在する Golgi complex-related glycoprotein 1 の同定と自然免疫における機能」第 65 回日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 19 日 名古屋 ウィンク愛知

② 山本 (日野) 美紀，“Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity” International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 年 10 月 24 日 東京 National Center of Sciences Building

③ 山本 (日野) 美紀，“Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity” 第 10 回日本ショウジョウバエ研究会 2012 年 10 月 13 日 東京 慈恵医大

④ 山本 (日野) 美紀，“Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity” 第 45 回日本発生生物学会、第 64 回日本細胞生物学会 2012 年 5 月 31 日 神戸 国際会議場

⑤ 山本 (日野) 美紀，“Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate

Immunity” 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 14 日 神奈川 横浜パシフィコ

⑥ 山本 (日野) 美紀 「自然免疫を制御する糖鎖修飾関連分子 Senju の解析」第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉 幕張メッセ

⑦ 山本 (日野) 美紀 「自然免疫を制御する糖鎖修飾関連分子 Senju の解析」第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 24 日 京都 京都国際会議場

⑧ 山本 (日野) 美紀 “Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity” 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference 2011 年 5 月 23 日 Chientan Youth Activity Center, 台湾

[図書] (計 1 件)

① Structure, Function and Formation of Glycans in *Drosophila*. In “Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications.” Mora Montes, H. M. ed. Nova Science publishers, Inc., NY (2012) p165-188 Yamamoto-Hino, M., Okano, H., Kanie, O. and Goto, S.

[その他]

ホームページ等
<http://goto-lab.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 美紀 (YAMAMOTO MIKI)
立教大学・理学部・ポストドクトラルフェロー
研究者番号：40301783