

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370090

研究課題名(和文) マイクロペプチドの作用機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for micropeptide functions

研究代表者

影山 裕二 (Kageyama, Yuji)

神戸大学・遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：90335480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のゲノムには、ごく短いORFから生産される小さな機能性ペプチド(マイクロペプチド)をコードする遺伝子が多数存在する。マイクロペプチドは、よく知られた分泌型ペプチド性因子とは異なり、細胞内で機能すると予測されるが、その作用機構の詳細については不明である。本研究では、マイクロペプチドをコードするショウジョウバエ *polished rice* (*pri*) 遺伝子の解析を行い、*pri* 遺伝子が変態期に一過的に発現すること、*pri* 遺伝子がエクジソンにより発現が誘導されること、*pri* 遺伝子が変態期におけるエクジソン依存的な遺伝子発現制御に必須であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic genomes contain a proportional number of "micropeptide" genes that encode small peptides in extremely short ORFs. Micropeptides are distinguished from canonical active peptide molecules, which are translated as a long precursor and secreted into extracellular spaces, and should therefore function in cytoplasm, although little is known about its molecular mechanisms. In this study, we focused on *Drosophila* *polished rice* gene that encode 11- and 32-aa micropeptides. We found that *pri* is specifically expressed in metamorphic stages and induced by ectopic application of ecdysone. Phenotypic analysis of hypomorphic alleles of the *pri* gene demonstrated that *pri* is essential for progress of metamorphosis and regulate ecdysone-dependent gene network.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：マイクロペプチド ショウジョウバエ スクリーニング 遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムの大部分は転写されており、タンパク質コード領域を含まない、いわゆる **non-coding RNA** が数多く存在することが知られている (参考文献 1)。しかしながら、これらの **non-coding RNA** の大部分はごく短い **ORF** を含んでおり、少なくとも一部は実際に翻訳されて、ごく短い機能性ペプチドを産生することが明らかになりつつある。このような、**二次遺伝子産物そのものが極端に短いペプチドをマイクロペプチドと呼ぶ** (参考文献 2)。マイクロペプチドは、比較的高分子の前駆体が細胞内プロセッシングを受けて成熟型のペプチドとなる従来のペプチド性因子とは異なり、分子内に分泌シグナルの配列を含まず、細胞内で機能すると予測されるが、詳細については不明である。

ショウジョウバエ *polished rice* (*pri*) は、11 あるいは 32 アミノ酸の **4 個のマイクロペプチドをコードするユニークな遺伝子** であり、幼虫表皮の細胞突起形成を制御している (図 1-2; 参考文献 3-4)。

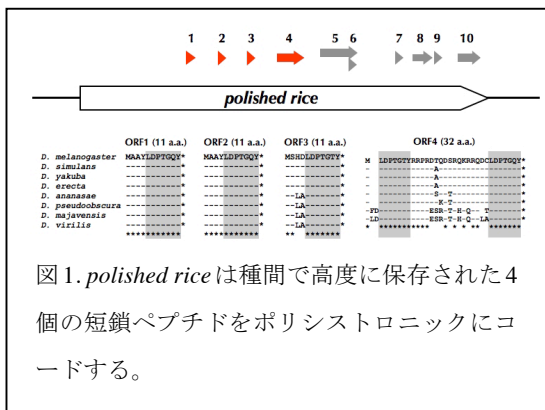


図 1. *polished rice* は種間で高度に保存された 4 個の短鎖ペプチドをポリシストロニックにコードする。

これまでに、*pri* 遺伝子が、幼虫表皮の突起形成を支配する転写因子 **Shavenbaby** の活性を制御しており、*pri* 遺伝子の発現下で **Shavenbaby** の切断が誘導され、核内局在が大きく変化すると同時に、転写抑制因子から転写活性化因子へと活性がスイッチすることがわかっている。これら

の結果は **マイクロペプチドが遺伝子発現を介して発現現象を制御している**ことを示したものであるが、*pri* 遺伝子産物 (**PRI** ペプチド) が直接 **Shavenbaby** タンパク質と相互作用するかどうか、*pri* 遺伝子産物はどのような分子活性持つのかという点については不明のままであり、マイクロペプチドの動作原理を解明するためには、分子メカニズムの解明が必須である。

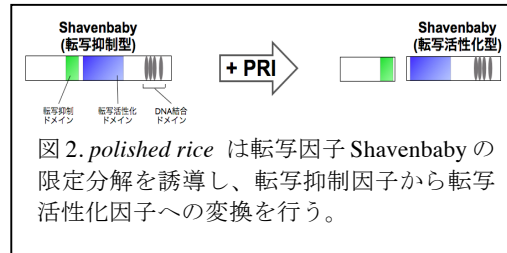


図 2. *polished rice* は転写因子 **Shavenbaby** の限定分解を誘導し、転写抑制因子から転写活性化因子への変換を行う。

### 2. 研究の目的

本研究では、*pri* 遺伝子産物の作用機構を分子生物学的・細胞学的な手法を用いて解析することにより、マイクロペプチドという新規の活性分子による発現制御機能の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

上記の現状を踏まえ、本研究では以下の研究を行う。

#### 1) *pri* 遺伝子と遺伝学的に相互作用する因子の同定

前述の通り、*pri* 遺伝子は **Shavenbaby** の限定分解を誘導することが明らかとなっているが、*pri* 遺伝子がどのような分子メカニズムでその生理活性を発揮しているかについては明らかになっていない。*pri* 変異体の表現型を詳細に解析し、これを遺伝学的に相互作用する遺伝子を同定することにより、マイクロペプチドの作用メカニズムを明らかにする。

#### 2) **PRI** ペプチドと物理的に相互作用する因子の同定

PRI ペプチドを FLAG タグおよび HA タグとの融合ペプチドとして発現する安定細胞株を既に樹立しており、これを用いて免疫沈降による PRI 結合タンパク質の部分精製を行い、マスマスペクトログラフイーにより PRI 結合タンパク質を同定する。同定した PRI 結合タンパク質について、当該遺伝子の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、PRI ペプチドの作用メカニズムを明らかにする。

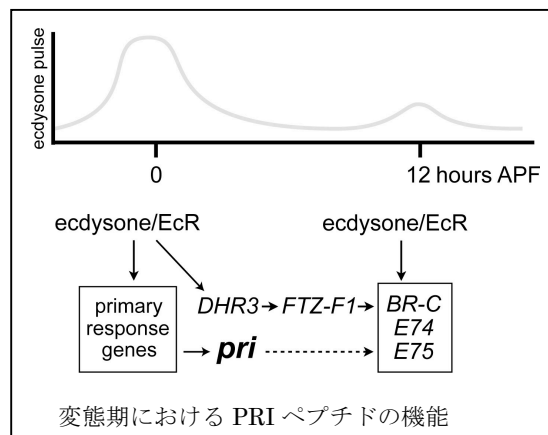
#### 4. 研究成果

##### 1) *pri* 遺伝子と遺伝学的に相互作用する因子の同定

*pri* 遺伝子の細胞内の機能は全くわかっておらず、どのような生化学的活性を持つのかは全く不明である。このような場合、遺伝的形質を指標として *pri* と相互作用する相互作用遺伝子を同定し、その細胞内機能から *pri* 遺伝子産物の帰納を演繹することがもっとも効果的である。

*pri* 遺伝子の発現解析から、*pri* 遺伝子が胚発生のみならず、幼虫期および成虫期においても強い発現を示すことを明らかにしていたが、ノザン解析および *in situ* はイヴルダイゼーション解析により、我々は *pri* 遺伝子が発態期特異的な一過的な発現様式を取ることに気がついた。*pri* 変異体のモザイク解析から、*pri* 遺伝子が発態期の移行に必須であることが示された。また、発態期における時期特異的遺伝子発現には、ステロイドホルモンであるエクジソンとその受容体である EcR が決定的な役割を果たしていることが知られているが、*pri* 変異体において、EcR 遺伝子の発現に変化は見られないもの、その下流の転写因子である E74 および F75 の発現が大きく変動していることが明らかとなった。また、EcR のドミナントネガティブ変異の表現型が *pri* 遺伝子の

過剰発現により顕著に回復することを示した。これらの結果は、*pri* 遺伝子と EcR 遺伝子が強制的に機能していることを強く示唆している (発表論文①)。



##### 2) PRI ペプチドと物理的に相互作用する因子の同定

細胞内で PRI ペプチドと結合しうる因子は、当然のことながら PRI ペプチドの気の玉に関連している可能性がある。培養細胞を用いて 3xHA-3xFLAG と PRI との融合ペプチドをメタロチオネインプロモーターにより発現させ、抗 HA 抗体および抗 FLAG 抗体によるタンデムアフィニティーにより部分生成した後、電気泳動により分画し、タグのみのペプチドと比較して顕著な結合を示す複数のバンドについて、質量分析計でそのアミノ酸配列を解析したが、結合するバンドはごくわずかで、各実験で再現性よく検出されるタンパク質は皆無であった。結合の条件についても塩濃度はもちろんのこと、緩衝液の組成を変えて検討したが、安定した結合を示す結果は得られなかった。発現細胞では PRI ペプチドの活性が上昇していることを Shanvenbaby の切断活性を指標に確認してあるが、今後のさらなる条件検討が必要と思われる。

#### 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 3 件)

① H el ene Chanut-Delalande, Yoshiko

Hashimoto, Anne Pelissier-Monier, Rebecca Spokony, Azza Dib, Takefumi Kondo, Jérôme Bohere, Kaori Niimi, Yvan Latapie, Sachi Inagaki, Laurence Dubois, Philippe Valenti, Cédric Polesello, Satoru Kobayashi, Bernard Moussian, Kevin P. White, Serge Plaza, Yuji Kageyama\* and François Payre\* (2014)

Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development  
*Nat. Cell Biol.* 16: 1035-1044.

② Nakagawa, S., Kageyama, Y. (2014)  
Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism. (review)  
*Biochim. Biophys. Acta.* 1839, 215-222.

③ Kazutaka Akagi, Kageyama, Y., Kayashima, Y., Takakura, Y., Hirose, S. and Ueda, H. (2013)

The binding of multiple nuclear receptors to a single regulatory region is important for the proper expression of EDG84A in *Drosophila melanogaster*.  
*J. Mol. Biol.*, 425, 71-81.

[学会発表] (計 15 件)

① Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yuji Kageyama  
Physiological roles of MRE32 RNA in *Drosophila* optic lobe and wing development.

The 22nd CDB Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II, Kobe, June 11-13, 2012

② Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yasuo Fukami, Yuji Kageyama  
Physiological roles of MRE32 RNA in *Drosophila* optic lobe and wing development.

第 14 回日本 RNA 学会年会、仙台、平成 24 年 7 月

③ Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yuji Kageyama  
Physiological roles of long non-coding RNA MRE32 in the central nervous system and wing development.

第 10 回日本ショウジョウバエ研究会、東京、平成 24 年 10 月

④ Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yuji Kageyama  
MRE32 RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila* adult brain.

The 23rd CDB Meeting: Building multicellular systems from cellular cross-talk, Kobe, Jan., 2013.

⑤ Sachi Inagaki, Natsuki Nakamura, Masanao Sato, Satoru Kobayashi and Yuji Kageyama  
Lobe-less RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*.

第 46 回日本発生生物学会年会、松江、平成 25 年 5 月 28-30 日

⑥ 稲垣幸、佐藤昌直、中村奈月、小林悟、影山裕二  
MRE32/Lobe-less RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*.

第 15 回日本 RNA 学会年会、松山、平成 25 年 7 月 24-26 日

⑦ Sachi Inagaki, Natsuki Nakamura, Masanao Sato, Satoru Kobayashi and Yuji Kageyama  
*Drosophila* Lobe-less RNA is essential for

axon guidance in development of mushroom body neurons.

2013 Riboclub Annual Meeting, Orford (Canada), Sept. 23-25, 2013

⑧ 稲垣幸、佐藤昌直、宮下知之、中村 奈月、小林悟、斉藤実、影山裕二

Lobe-less RNA はショウジョウバエキノコ体の形態形成を介して学習・記憶を制御している

第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月 3-6 日

⑨ 影山裕二、稲垣幸

ショウジョウバエ成虫脳の形態形成と記憶・学習を制御する長鎖ノンコーディング RNA

第 36 回日本分子生物学会ワークショップ「non-coding RNA の分子機能と動作原理」神戸 2013 年 12 月 3-6 日

⑩ Sachi Inagaki, Masanao Sato, Tomoyuki Miyashita, Natsuki Nakamura, Satoru Kobayashi and Yuji Kageyama

Lobe-less RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*.

55th Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego (USA), Mar. 26-30, 2014

⑪ 中村奈月、稲垣幸、影山裕二

長鎖ノンコーディング RNA の神経系における機能:ショウジョウバエ *lobe-less* 変異体の細胞学的解析

第 16 回日本 RNA 学会年会、名古屋、平成 26 年 7 月 23-25 日

⑫ 稲垣幸、佐藤昌直、中村奈月、小林悟、影山裕二

Lobe-less RNA はポリコーム複合体と相

互作用し、ショウジョウバエにおけるキノコ体の形態形成を制御している

第 16 回日本 RNA 学会年会、名古屋、平成 26 年 7 月 23-25 日

⑬ Natsuki Nakamura, Sachi Inagaki, Yuji Kageyama

The function of long noncoding RNA in the central nervous system: Analysis of the lobe-less gene in *Drosophila*

jajRNA2014, Sydney, Nov. 2 – 5, 2014

⑭ Sachi Inagaki, Masanao Sato, Natsuki Nakamura, Satoru Kobayashi, Yuji Kageyama

Lobe-less RNA is a new member of Polycomb group genes and essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*.

jajRNA2014, Sydney, Nov. 2 – 5, 2014

⑮ Yuji Kageyama

Long noncoding RNA in the brain: Lobe-less RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*

The 16<sup>th</sup> Tokyo RNA Club, Tokyo, Nov. 28, 2014

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

影山裕二 (KAGEYAMA, Yuji)  
神戸大学・遺伝子実験センター  
研究者番号：90335480

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：