

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770185

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いた mRNA の新規小胞体標的化の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of mRNA targeting to the ER in SRP-independent manner

研究代表者

吉田 英樹 (Yoshida, Hideki)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・助教

研究者番号：30570600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：mRNA の新規小胞体標的化機構の分子メカニズムを明らかにするために『ショウジョウバエ培養細胞における RNA イメージングシステムの構築』及び『未知の標的化機構で小胞体へ標的化するであろう mRNA の網羅的な同定』を行なった。既知の標的化機構で小胞体へ標的化する mRNA を構築したイメージングシステムを用い可視化した結果、同システムが確かに機能することを確認した。このシステムを用い、未知の機構で小胞体へ標的化する mRNA の可視化も成功し、既知の標的化機構と独立して働いている可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the novel mechanism of mRNA targeting to the ER, we had established green fluorescent protein (GFP)-mediated RNA visualization system in *Drosophila* cultured cells to analyze the mRNA localization and widely identified the mRNAs which are targeted to the ER in a novel manner. As a result of the visualization of mRNA localization, which is targeted in a conventional mechanism by using the system we established, GFP dot signals were observed in the cytoplasm. On the other hand, the GFP signals were hardly observed in the conventional targeting mechanism-disrupted cells. From these data, we have judged the visualization system we established certainly works. By this visualization system, the localization of mRNA, which was identified as a mRNA targeted to the ER in non-conventional manner, was observed and the mRNA also formed foci in the cytoplasm. Interestingly, the GFP dot formation was not affected even if the conventional mechanism was suppressed by RNA interference.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：RNA イメージング mRNA の小胞体標的化 ショウジョウバエ 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の構成タンパク質や細胞外へ分泌されるタンパク質をコードする mRNA は、その mRNA 内に小胞体へ標的化する情報が書き込まれていることが知られている。一方で、その情報を持たない mRNA も小胞体へ標的化していることを示唆する結果も報告されていたが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

mRNA の新規小胞体標的化機構の分子メカニズム、更にその生物学的意義を解明する為に、まずは解析系の構築及び解析対象 mRNA の同定を目指した。更に、同定した mRNA の小胞体標的化に必要な配列の同定も試みた。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ培養細胞をホモジナイズし、その細胞抽出液をショ糖密度超遠心法により分画、得られた小胞体画分に分画された mRNA を RNA-seq 解析により網羅的に同定した。これと並行し、ショウジョウバエの培養細胞において小胞体へ標的化する mRNA を、GFP を介して間接的に mRNA を可視化するシステムを構築し、同定した小胞体標的化 mRNA の細胞内局在を解析した。

4. 研究成果

ショウジョウバエの培養細胞において、GFP を用いて間接的に mRNA の細胞内局在を可視化できるシステムの構築に成功した。また、これと並行して、ショウジョウバエ培養細胞において、未知の機構で小胞体へ標的化する可能性の高い mRNA の同定も完了した。その中には、がん遺伝子や糖尿病に関与する遺伝子等も含まれた。これらの mRNA のうち、がん遺伝子である *yorkie* (*yki*) 遺伝子の mRNA を、構築したシステムにて可視化したところ、ドット状の GFP シグナルが観察された。更に、このドット形成に必要な十分な配列が、3' 非翻訳領域と呼ばれる mRNA の安定性や細胞内局在の制御に関与する部位に存在することを見出した。これまでは、*yki* 遺伝子の機能発現制御は、タンパク質への翻訳後の修飾によって行なわれることが知られていたが、本研究により、*yki* 遺伝子の機能発現における新たな制御機構の可能性が示唆された。

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 12 件)

Hiroshi Yanai (6 人中 3 番目), *Drosophila* myeloid leukemia factor acts with DREF to activate the JNK signaling pathway., *Oncogenesis*, 査

読有, 3, 2014, 1-7

Nicole Vo (6 人中 4 番目), *Drosophila* Mcm10 is required for DNA replication and differentiation in the compound eye., *PLOS ONE*, 査読有, 9, 2014, 1-15

Ritsuko Sahashi (7 人中 5 番目), Functional analysis of *Drosophila* DNA polymerase ϵ p58 subunit., *Am. J. Cancer Res.*, 査読有, 3, 2013, 478-489

Koichi Eguchi (7 人中 3 番目), The *Drosophila* DOCK family protein sponge is involved in differentiation of R7 photoreceptor cells., *Exp. Cell Res.*, 査読有, 319, 2013, 2179-2195

Ly Luong Linh (6 人中 5 番目), dNF-YB plays dual roles in cell death and cell differentiation during *Drosophila* eye development., *Gene*, 査読有, 520, 2013, 106-118

Shunsuke Fujiwara (3 人中 2 番目), DREF, a concertmaster for Hippo pathway and JNK pathway in *Drosophila*., *J. carcinogene Mutagene*, 査読有, 4, 2013, doi: 10.4172/2157-2518.1000e110

Toshimi Sugimoto (5 人中 3 番目), Overexpression of *Drosophila* RFX3 induces apoptosis and interferes with differentiation of photoreceptor cells., *J. carcinogene Mutagene*, 査読有, 4, 2013, doi: 10.4172/2157-2518.1000137

Takako Ueda (6 人中 4 番目), RNA-based diagnosis in a multicellular specimen by whole mount in situ hybridization using an RNA-specific probe., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 査読有, 20, 2012, doi: 10.1016/j.bmc.2012.08.028.

Reina Hashimoto (3 人中 2 番目), Sarcoglycan complex formation is involved in regulation of EGFR signaling during *Drosophila* eye development. *HOAJ Biology*, 査読有, 1, 2012, doi: <http://dx.doi.org/10.7243/2050-0874-1-7>,

Yuta Ushijima (8 人中 5 番目), Roles of histone H3K9 methyltransferases during *Drosophila* spermatogenesis., *Chromosome Res.*, 査読有, 20, 2012, doi: 10.1007/s10577-012-9276-1.

Osamu Suyari (6 人中 4 番目), Differential requirement for the N-terminal catalytic domain of the DNA polymerase ρ 255 subunit in the mitotic cell cycle and the endocycle., *Gene*, 査読有, 495, 2012, doi: 10.1016/j.gene.2011.12.056.

Shunsuke Fujiwara (5 人中 4 番目), The

warts gene as a novel target of the *Drosophila* DRE/DREF transcription pathway. Am. J. Cancer Res., 査読有, 2, 2012, 36-44

〔学会発表〕(計 14 件)

田中領(5人中5番目)、Localization analysis of predicted metaphase furrow-localized mRNA in *Drosophila* early embryos、The 19th Annual meeting of RNA Society、2014年6月3日～8日、カナダ

梅河内隆成(10人中10番目)、Identification of non-canonical mRNAs targeting to the ER and analysis on subcellular localization of mRNA by RNA imaging system、The 19th Annual meeting of RNA Society、2014年6月3日～8日、カナダ

田中領(4人中4番目)、Localization analysis of predicted metaphase furrow-localized mRNA in *Drosophila* early embryos、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸
梅河内隆成(10人中10番目)、Identification of mRNAs not bearing signal sequence in the ER fraction and analysis of the mRNAs subcellular localization、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸
梅河内隆成(9人中9番目)、非古典的経路で小胞体へ標的化する mRNA の同定及び同機構解析系の構築、第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月19日～21日、名古屋

島村真衣(7人中6番目)、Cabeza ノックダウンはショウジョウバエ成虫複眼の形態異常を誘導する、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

前田頌太(6人中5番目)、ショウジョウバエ DNA ポリメラーゼε p255 サブユニットと相互作用する遺伝子の探索、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

森下和茂(4人中4番目)、ショウジョウバエ DOCK family 遺伝子の機能解析、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

Nguyen Huu Tho(4人中3番目)、A *Drosophila* model for function analysis of organic carrier partner 1、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

戸田成美(5人中4番目)、ショウジョウバエ精子形成過程におけるエビジェネティック制御因子 Jumonji(Jarid2)の動態、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

藤原俊介(7人中6番目)、ショウジョウ

バエ転写因子 DREF を中心とした転写制御ネットワーク : DREF の標的としての Hippo 経路関連遺伝子の同定、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

梅河内隆成(7人中7番目)、mRNA 新規小胞体標的化機構の分子メカニズムの解明、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

Ly Luong Linh(6人中5番目)、dNF-YB plays dual roles in cell death and cell differentiation during *Drosophila* eye development、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡

梅河内隆成(8人中8番目)、Identification of mRNAs targeting to the ER、The 22nd CDB Meeting: RNA Sciences in cell and developmental biology II、2012年6月11日～13日、神戸

〔図書〕(計 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 :
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・工芸科学研究科・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：