

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06639

研究課題名(和文) 同一局在を示す複数のmRNAの局在化機構及び生物学的役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the localization mechanism and biological roles of the mRNAs which show the same subcellular localization

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・准教授

研究者番号：30570600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ初期胚の同じ領域に局在化する5つのmRNAのうち、dia、cno、pyd、smashについて、それぞれの局在化機構を調べた。その結果、diaも既知の3' UTRの2次構造依存的な局在化では無く、ani mRNAと同様に、翻訳依存的にPCFに局在することが明らかとなった。また、cno mRNAに関しても、翻訳依存的に局在化する可能性が示されている。この機構が、この局在に限ったものか、他のパターンを示す局在化mRNAでも機能しているのか、今後明らかにしていきたい。また、pydとsmashに関しては、発現量と局在パターンの結果より、PCF局在を示すスプライスパリアントを絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNAの局在化の過程では、翻訳が抑制されていることが知られている。これまでは、翻訳開始複合体形成の競合的阻害やリボソームのリクルート阻害が知られていたが、阻害のために新たな因子が必要となり、多数の局在化mRNAが明らかになるにつれ、既知の翻訳抑制機構だけで説明するのは困難となっていた。本研究において、我々が明らかにした翻訳抑制機構は、新たな因子は必要なく翻訳されると同時に起動する機構であるため、非常に汎用性が高いと考えている。そのため、一般的な翻訳抑制機構をなる可能性を秘めており、その場合、学術的にも大きなインパクトとなる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of localization of the mRNAs (dia, cno, pyd, and smash) which localize to the same region in early Drosophila embryos. The results showed that dia mRNA localizes to the PCF in a translation-dependent manner, similar to that of the ani mRNA, rather than in a secondary structure-dependent manner in the 3'UTR as previously thought. It has also been shown that cno mRNA may also localize in a translation-dependent manner. It remains to be clarified whether this mechanism is limited to this localization or whether it also works for localized mRNAs that show other patterns. For the pyd and smash mRNA, we narrowed down the splice variants showing the PCF localization based on the expression levels and localization patterns.

研究分野：細胞生物学

キーワード：局在化mRNA ポリプロリン配列 翻訳抑制 ショウジョウバエ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの多核性胞胚期の胚表面に一時的に形成される細胞膜の陥入 (PCF) に局在する mRNA が 5 種 (*ani*、*dia*、*cno*、*pyd*、*smash*) 発見され、そのうち *ani* は、翻訳依存的に PCF に局在することを報告していた。残り 4 つのうち、*dia* mRNA も *ani* 同様翻訳依存的に PCF に局在化するデータを得ていた一方、*cno* は、自身の 3' 非翻訳領域 (UTR) 依存的に PCF に局在化することが示唆されていた。残り 2 種 (*pyd*、*smash*) は、スプライスバリエント (SV) の数が、それぞれ 12 種、10 種予想されていたが、どの SV が発現しているかは不明であった。

### 2. 研究の目的

同一局在を示す複数の mRNA の局在化機構の比較により共通性を見出し、また、それらの局在化の解析により、mRNA 局在化の分子機構及び生物学的役割の解明をすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

*ani* mRNA は、自身の新生ペプチド鎖のアクチン結合ドメイン (ABD) を介して PCF 先端に局在化することを報告したが、その後、ABD の下流ある 7 つの連続したプロリン配列 (polyP) が、リボソームを停滞させ、*ani* mRNA が局在化されるまで翻訳を抑制している可能性を見出した。そこで、この polyP を欠失したコンストラクトを作成し、polyP の有無で、*ani* mRNA の PCF への局在化に影響を与えるか、翻訳に影響を与えるかを、ショウジョウバエ初期胚、培養細胞を用いて解析した。また、*dia* mRNA は polyP を複数コードしていたため、その領域を欠損させたコンストラクトを作成し、同様の解析を行った。*cno* mRNA に関しては、複数の欠失コンストラクトを作成、それぞれにおいてトランスジェニックショウジョウバエを樹立した後、初期胚でそれぞれのコンストラクトを発現させ、局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法により可視化した。*pyd*、*smash* は、PCR 法、リアルタイム PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、初期胚において発現している SV の同定を行った。

### 4. 研究成果

*ani* mRNA の polyP を CRISPR/Cas9 により欠失を複数回試み、複数の欠失候補変異体を得ていたが、シーケンス解析の結果、いずれの系統も polyP が欠失していなかった。*in vitro* での解析では、polyP を欠失させることを確認したが、現在までのところ、欠失変異体の取得までは至っていない。これと並行し、polyP 配列が、*ani* mRNA の翻訳に影響を与えるかどうか、ショウジョウバエの培養細胞 (S2 DRSC 細胞) において解析を行った。polyP によるリボソームの停滞は、活性化 eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) によって、乗り越えることができることが知られている。この eIF5A の活性化には、2 つの酵素が必要だが、そのうち一つの酵素の阻害剤 (GC7) により S2 DRSC 細胞を処理したところ、活性型 eIF5A の量が低下した。そこで、この条件下で、Ani タンパク質量に影響があるか調べたところ、Ani タンパク質量の低下が検出された。polyP を欠失させた *ani* mRNA は、効率は低下するものの PCF へ局在化することは可能である。S2 DRSC 細胞での結果を踏まえると、polyP による翻訳の一時停止と RNA の局在化は独立して起こることが示唆された。

*dia* mRNA も同様に polyP をコードしており、翻訳依存的に自身の新生ペプチド鎖を介して PCF へ局在化することが示唆されていたため、polyP を欠損した RNA ( $\Delta$ FH1) の局在化及びその RNA がコードするタンパク質の局在を調べた。その結果、polyP 欠損 RNA は、PCF に局在化することは可能である (図 1) 一方、タンパク質の異所的な発現が検出された (図 2)。*dia* mRNA の解析からも、polyP による翻訳の一時停止と RNA の局在化は独立して起

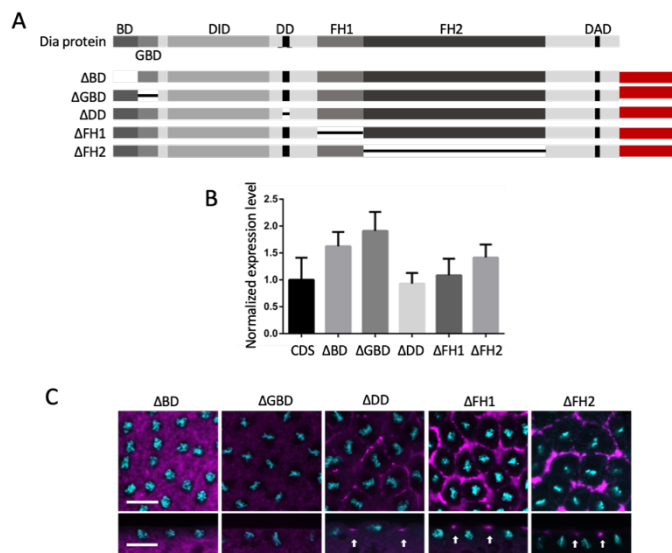


図1. Diaタンパク質のドメイン欠損による局在への影響

- (A) 作製した5種類のコンストラクトを図で示した。略称はN末端からBasic Domain (BD)、GTPase binding domain (GBD)、Diaphanous inhibitory domain (DID)、Dimerization domain (DD)、Formin-homology 1 domain (FH1)、Formin-homology 2 domain (FH2)、Diaphanous autoregulatory domain (DAD) を示している。
- (B) *DsRed* 配列特異的なプライマーでqRT-PCRを行い、ドメイン欠損 *dia* mRNA の発現量を定量した。*GAPDH* mRNA をインターナルコントロールとした。
- (C) 初期胚に対して *DsRed* 配列特異的なアンチセンスプローブを用いてFISHを行った。上段が初期胚の表面、下段は断面である。DNAをシアン、mRNAをマゼンタで示した。組換えmRNAの局在化を矢印で示した。スケールバーは30 μm。

こることが指示されている。

*pyd*、*smash* mRNA は、それぞれ、12種、10種のSVが存在することが予想されていたが、PCF法、リアルタイムPCR法により、初期胚において発現しているSVをそれぞれ6種、5種に絞り込んだ。しかし、SV間で重複している領域が多く、それ以上の絞り込みが困難であったため、それぞれのSVの発現パターンを*in situ*ハイブリダイゼーション法により可視化した。その結果、*pyd*は3種まで絞り込めたが、*smash*はそれ以上の絞り込みができなかったため、SVを構成しているexonを考慮し、トランスジェニックショウジョウバエを作製し、PCF局在に必要なRNA領域の同定を進めている。

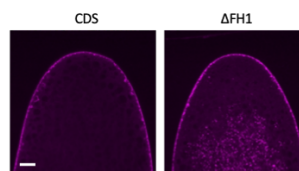


図2 FH1を欠失すると初期胚で異所的なDiaタンパク質の翻訳が起こる

CDS、 $\Delta$ FH1過剰発現系統のStage 1の初期胚を抗RFP抗体により免疫染色した。組換えDiaタンパク質をマゼンタで示した。スケールバーは30  $\mu$ m。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩手楓、田中領、西野冴香、吉田英樹
2. 発表標題 ショウジョウバエ初期胚におけるdiaphanous mRNAの局在メカニズム解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白雨柔、田中領、吉田英樹
2. 発表標題 ショウジョウバエ初期胚におけるcanoe mRNA局在化に必要なcis-elementの同定
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中千裕、平島智貴、吉田英樹
2. 発表標題 ポリプロリンによるAnillinタンパク質発現の時空間的制御の可能性
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------