

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6月19日現在

機関番号：14501
 研究種目：挑戦的萌芽
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657152
 研究課題名（和文） シグナル配列を持たない短鎖ペプチドはいかにして細胞間情報を伝えるか？
 研究課題名（英文） How do non-signal sequence small peptides transmit intercellular signals?
 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

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、細胞間相互作用を示すものの、シグナル配列を含んでいないことが知られている。PRI ペプチドの細胞間相互作用の分子機構を明らかにするため、PRI ペプチド安定的に発現する培養細胞株を用い、PRI ペプチドと相互作用する因子の同定を試みたところ、タグ付き融合ペプチドとして発現させた PRI ペプチドと共沈する因子を複数同定することができた。

研究成果の概要（英文）： The *polished rice* gene in *Drosophila* encodes extremely small 11 or 32-aa long peptides (PRI peptides) that do not include any signal sequences, although genetic analysis have shown that *pri* shows non-cell autonomous effects to neighboring cells. To elucidate molecular mechanisms underlying the non-cell autonomous signaling by the *pri* gene, we tried to identify PRI peptides-associating proteins using cultured cells. Although we failed to raise specific antibody against PRI peptides, fusion peptides with molecular tags were effectively precipitated with anti-tag antibodies. We identified several proteins that are co-precipitated with PRI fusion peptides.

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

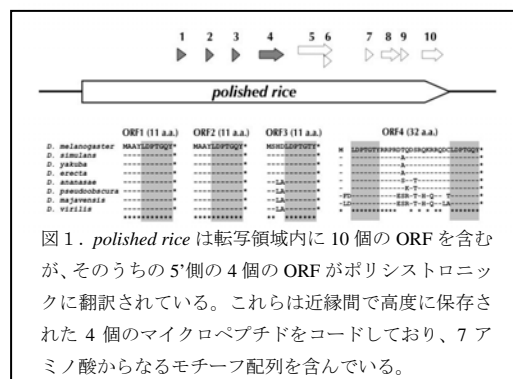
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ、短鎖ペプチド、細胞間シグナル伝達、発生遺伝

1. 研究開始当初の背景

近縁種間のゲノム配列の比較から、進化的に保存されている 100 アミノ酸以下のペプチド遺伝子候補が多数推定されており、酵母で約 1,000 個、ヒトやマウスなどの高等生物では数千個に及ぶと考えられている。これらの短鎖ペプチド候補遺伝子の中には、*pri* 遺伝子のように分子量 2,000 以下のペプ



チドをコードすると思われるものも含まれているが、このように極端に小さなペプチド分子は、細胞内あるいは細胞外において通常のタンパク質とは異なる振る舞いを示す可能性がある。20 アミノ酸以下のペプチドは溶媒中で安定な構造をとらないともいわれており、これらのマイクロペプチドがどのような活性を有しているかは分子生物学の新たな課題の一つである。本研究は PRI ペプチドをモデルに、マイクロペプチドの細胞内あるいは細胞外挙動を解析し、さらには情報伝達機構におけるその役割を分子レベルで理解しようとするものである。現在までに得られている情報は限定的であり、実施には様々な困難が予想されるが、ショウジョウバエ遺伝学を基盤として、細胞生物学的手法あるいは生化学的手法を組み合わせて、出来る限り多くのかつ詳細な情報を得ることにより、この極めてユニークな情報伝達機構の謎に挑みたい。

申請者らが同定した *pri* 遺伝子 (図 1) は、ショウジョウバエの細胞突起 (歯状突起) の形成に必須の遺伝子であり、*pri* がコードする 4 個のマイクロペプチド (PRI ペプチド) はそれぞれが単独で遺伝子活性に十分であることが示されている。また、申請者らは、*pri* 変異が細胞非自立的な表現型を示すことを報告しており、PRI ペプチドが何らかの機構で細胞間の情報伝達に関与していると考えられる。PRI ペプチドは生理機能が明らかになっているごく限られたマイクロペプチドの例の一つであるが、PRI ペプチドを含むマイクロペプチドによる細胞間情報伝達の詳細は全く不明である。

2. 研究の目的

PRI ペプチドによる細胞間情報伝達機構として、

a) シグナル分子そのものではなく従来のリガンド-受容体を介した情報伝達系を制御する

b) ABC トランスポーターなどの特異的分泌機構を介してシグナルを伝達する

c) ギャップジャンクションなどを介して細胞質間を移動する

などの可能性などが考えられる。本研究では、これらの可能性を考慮しながら、遺伝学的あるいは生化学的手法を用いてマイクロペプチドを介した細胞伝達機構を明らかにする。

3. 研究の方法

pri 遺伝子がコードするマイクロペプチド (PRI ペプチド) は、神経分泌ペプチドなどの従来から知られていたペプチド分子群とは異なり、一次翻訳産物そのものが非常に短く、シグナルペプチドを持たないため、細胞質中に存在するか、あるいは従来の分泌経路とは異なる機構により、細胞外に輸送されると考えられる。本研究では、PRI ペプチドの作用機構を明らかにするため、以下の研究を行った。

i) 細胞内における PRI ペプチドの挙動の解析

合成 PRI ペプチドを抗原とした特異抗体を作製し、ショウジョウバエ胚の細胞画分に対するウエスタンブロット法、あるいは全載標本に対する免疫組織化学法により、胚発生後期あるいは成虫原基細胞における細胞内局在を解析する。抗体作製結果が思わしくない場合、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ェニック系統あるいは安定発現細胞株を用い、分子タグに対する抗体を用いて PRI ペプチドの細胞内局在を解析する。

ii) PRI ペプチドと相互作用する因子の同定と解析

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 ペプチドと相互作用を示す因子の同定が、PRI ペプチドの分子活性を考える上で極めて重要である。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、安定発現細胞株より PRI 結合タンパク質を部分精製し、質量分析法による同定を行う。また、pri 過剰発現系統の表現型を指標に、これと遺伝学的相互作用を示す遺伝子を探索する。

4. 研究成果

i) 細胞内における PRI ペプチドの挙動の解析
現在までに、ウサギ (4 種類) およびラット (4 種類) において計 8 種類の PRI ペプチドに対するポリクローナル抗体を作成したが、いずれの抗体も、ELISA 法による合成ペプチドの検出においてはある程度の感度を示すものの、ウェスタンブロット法による定量や免疫組織化学的解析に至るまで可能なものは得られなかった。実験に耐えうる特異抗体が得られなかった理由は不明であるが、遺伝子産物が特に小さく、修飾等を受けている可能性があったので、後述する質量分析の結果が得られるまでは、モノクローナル抗体の作成等のさらなる交代作成は保留することとした。

PRI ペプチドと、FLAG タグ (3xFLAG) および HA タグ (3xHA) との融合ペプチドを安定的に発現する細胞株を作成し、抗タグ抗体による免疫組織化学による検出を行ったところ、発現細胞全体にシグナルが検出された。また、発現細胞の核内に、ややシグナルの強い部分がみられた。同様に発現細胞の培養上清を解

析したが、PRI ペプチドは全く検出されなかった。これらの結果から、PRI ペプチドは、細胞内 (核内を含む) で機能することが示唆された。

ii) PRI ペプチドと相互作用する因子の同定と解析

上記 PRI ペプチド安定発現細胞株を用い、抗タグ抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、PRI ペプチド存在下でのみ沈降すると思われるタンパク質がいくつか同定できた。現在これらのタンパク質について、さらなる検証を行っている。

PRI ペプチドと遺伝学的に相互作用する因子の探索については、2 番染色体上の遺伝子についてはほぼ完了し、現在までのところ、各種シグナル伝達系の突然変異体と酷似した表現型を示すものが同定されており、PRI ペプチドが、他のシグナル伝達関連因子と相互作用しながら機能することを暗示する結果が得られている。

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 2 件)

Kazutaka Akagi, Kageyama, Y., Kayashima, Y., Takakura, Y., Hirose, S. and Ueda, H.

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. (2013)

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)

[学会発表] (計 2 件)

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 回日本発生物学会年会シンポジウム
「Genetic Control of Morphogenesis」 沖

縄 2011年5月18-21日

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18-20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山裕二 (KAGEYAMA YUJI)

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