

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840074

研究課題名(和文) 新たな小胞体調節因子PecanexのNotchシグナル活性化における機能の研究

研究課題名(英文) The function of a novel ER modulating factor, Pecanex in Notch signaling

研究代表者

山川 智子 (Yamakawa, Tomoko)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20645402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物において、Notchシグナル伝達は細胞の運命決定を制御しており、ヒトでNotchシグナル伝達が失われると、ガンなどの疾患が発症します。pecanex (pcx)はNotchシグナル伝達の構成遺伝子です。私の研究から、Pcxが小胞体に局在し、小胞体の形態形成に必要であることがわかりました。そこで、pcxの調節遺伝子を網羅的に探索し、これまでに、Notchシグナル伝達の既知の構成遺伝子を4遺伝子と、その他、膜融合に必要なATPaseであるNsf2、転写因子をコードするjim lovellを同定しました。これらの調節遺伝子が、pcxと確かに遺伝的相互作用することを示しました。

研究成果の概要(英文)：Notch signaling regulates many cell-fate decision in multi-cellular organism and its defects causes various diseases in human like cancer. pecanex (pcx) is a component of Notch signaling. My study revealed that Pcx is localized to the ER and required for the ER morphogenesis. To further understanding of pcx molecular function, I screened pcx modifiers and identified 6 candidate genes. I obtained 4 genes, which encodes known Notch signaling components, Nsf2 encoding an ATPase required for the vesicle fusion and jim lovell encoding a transcription factor. And I showed that these candidate genes genetically interact with pcx.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Notchシグナル 小胞体 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナル伝達系は、多細胞生物の発生過程で細胞の運命決定に機能しています。私のこれまでの研究から、ショウジョウバエ *Pecanex* (*Pcx*)は、小胞体の形態形成や機能の制御で働き、Notch シグナル伝達の正常な活性化に必要であると考えられました。そこで、*pcx* の分子機能を理解するため、*Pcx* の調節因子を網羅的に探索した結果、3 つの調節因子 (*Big brain*、*Delta*、*Nsf2*)が同定できました。その他、4 つの未同定な調節因子が存在しています。

2. 研究の目的

本研究では、*Pcx* と、同定された調節因子との関連を解析することにより、Notch シグナル伝達系の活性化に必要な小胞体の働きを理解することを目的としています。これらの研究から、Notch シグナル伝達系の制御に関わる新たなプロセスを明らかにできると考えています。

3. 研究の方法

(1) 未同定な調節遺伝子の同定

pcx ヘテロ接合体胚は、25 においてサナギ致死を示し、28 では成虫まで生存します。そこで、第二・第三染色体上の任意の領域を欠損した染色体欠失突然変異系統 (*Df* 系統)を用いて *pcx* ヘテロ接合体胚を作成し、それぞれ 25 と 28 で飼育することによって、本来の致死性を変化させる *Df* 系統を調べました。25 における致死性を変化させる *Df* 系統は、*pcx* の抑制性調節遺伝子を含む領域を欠失しており、28 における致死性を変化させる *Df* 系統は、*pcx* の促進性調節遺伝子を含んでいると考えられます。*Df* 系統における欠失した領域には、複数の遺伝子が含まれているため、個々の突然変異体を用いて同様の実験を行い、責任遺伝子の同定を行いました。

(2) これまでに同定した調節遺伝子 (*Nsf2*、*jim lovell*)と *pcx* の相互関係の解析

Nsf2: *Nsf2* と *pcx* の遺伝的相互作用を確かめるため、*Nsf2* の様々な領域が欠失した突然変異体を用いて、*pcx* ホモ接合体と交配させ、得られた *pcx* ヘテロ接合体胚を 25 と 28 で飼育しました。*Nsf2* 突然変異体は、*Nsf2* の大半の配列が欠失している系統と、ATPase 活性ドメインにおけるアミノ酸がバリンからアラニンに置換されている系統、第二エクソンのグリシンがアラニンに置換されている系統の三種類を用いました。28 では、コントロールと同じく成虫まで生存しましたが、25 において、コントロールとは異なり、すべての *Nsf2* 突然変異体から生じた *pcx* ヘテロ接合体が成虫まで生存しました。

jim lovell: *jim lovell* は、重力応答に関連する遺伝子であることが報告されています。そこで、*jim lovell* と *pcx* の遺伝的相互作用を確かめる

ため、登坂能力測定を行いました。生まれて 2 日たったオスを 1 匹ずつ筒状のプラスチック容器 (バイアル)に入れ、バイアルの底を実験台に軽くたたきつけ、ショウジョウバエを底に落とします。正常な個体は、底につくと同時に即座にバイアルの壁を登る反応を示します。1 分以内に 5cm の境界を越えることができなかった場合を登坂失敗として、野生型、*jim lovell* 突然変異体、*pcx* 突然変異体、*jim lovell* と *pcx* 二重突然変異体について調べました (図.1)。その結果、野生型が 4.5% の割合で登坂失敗を示すのに対し、*jim lovell* 突然変異体は 16.5% の割合で登坂を失敗するという、登坂能力の低下が見られました。*pcx* 突然変異体は 8% の割合で、有意差は示されませんでした。ところが、*jim lovell* と *pcx* 二重突然変異体は 64.3% で登坂を失敗し、顕著な登坂能力の低下が見られました。

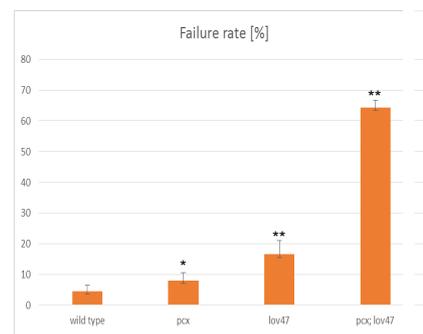


図.1 登坂能力測定における登坂失敗の割合

4. 研究成果

(1) 未同定な調節遺伝子の同定

未同定な 4 遺伝子の中で、3 遺伝子 (*jim lovell*、*neuralized*、*Brother of Bearded A*)について責任遺伝子を同定することができました。これまでの成果をまとめると、*Big brain*、*Delta*、*neuralized*、*Brother of Bearded A* といった 4 つの Notch シグナル伝達系における既知構成遺伝子が得られており、このことは、本研究で用いた探索方法により、*pcx* の調節遺伝子が適切に発見できていることを示唆しています。また、*neuralized* と *Brother of Bearded A* は双方向に機能することが知られていますが、本探索において、*neuralized* は *pcx* の促進性調節遺伝子として、*Brother of Bearded A* は抑制性調節遺伝子として同定されており、論理的に矛盾のない結果が得られています。1 遺伝子については、3 遺伝子まで候補が絞られてきました。これらの候補遺伝子の中に、既知の Notch シグナル伝達構成遺伝子が含まれないことから、新たな Notch シグナル構成遺伝子を同定できる可能性が期待されます。

(2) これまでに同定した調節遺伝子 (*Nsf2*、*jim lovell*)と *pcx* の相互関係の解析

Nsf2: 哺乳類の *Nsf* は、その ATPase 活性が小胞体膜を含めた膜の融合に必要な SNARE 複合体の解離に必要であることが報告されて

います。細胞分裂において、小胞体は細かい小胞状に断片化し、娘細胞へと分かれた後、再構築されることが知られています ()。Nsf の ATPase 活性はこの再構築に必要なと考えられています。Nsf2 は、胚期において機能する Nsf のショウジョウバエホモログであり ()、pcx 機能を欠失した胚 (pcx 胚) において、小胞体が肥大することから、pcx は小胞体の断片化を促進するか、再構築を抑制すると予想され、Nsf2 とは双方向に機能するはずで。本探索において、Nsf2 は pcx の抑制性調節遺伝子として同定されており、論理に矛盾はありません。また、ATPase 活性ドメインに変異を生じた Nsf2 突然変異体が pcx との相互作用を示したことから、ATPase 活性が pcx を介した、小胞体の形態形成と Notch シグナル伝達との関連を理解するカギとなるのではないかと考えています。

jim lovell: *jim lovell* は重力応答に関与する転写因子をコードしており、振動や傾きを検知する弦音神経で発現しています。*jim lovell* 単独や *pcx* 単独の突然変異体と比べ、*jim lovell* と *pcx* 同時に失った二重突然変異体が顕著な登坂能力の低下を示したことから、*jim lovell* と *pcx* が遺伝的な相互作用を示すことを明らかにしました。

<引用文献>

Lars Dreier, Tom A. Rapoport, In Vitro Formation of the Endoplasmic Reticulum Occurs Independently of Microtubules by a Controlled Fusion Reaction, *The Journal of Cell Biology*, vol. 148, 2000, 883-898

Jessica A. Golby, Leigh Anna Tolar, Leo Pallanch, Partitioning of N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion (NSF) Protein Function in *Drosophila melanogaster*: dNSF1 Is Required in the Nervous System, and dNSF2 Is Required in Mesoderm, vol. 158, 2001, 265-278

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 4 件)

Takashi Okumura, Takeshi Sasamura, Momoko Inatomi, Shunya Hozumi, Mitsutoshi Nakamura, Ryo Hatori, Kiichiro Taniguchi, Naotaka Nakazawa, Emiko Suzuki, Reo Maeda, **Tomoko Yamakawa**, and Kenji Matsuno, Class I Myosins Have Overlapping and Specialized Functions in Left-Right Asymmetric Development in *Drosophila*, *Genetics*, 査読有, vol. 199, No. 4, 2015, 1183-1199, DOI: 10.1534/genetics.115.174698

Ishio A, Sasamura T, Ayukawa T, Kuroda J,

Ishikawa HO, Aoyama N, Matsumoto K, Gushiken T, Okajima T, **Yamakawa T**, Matsuno K, O-Fucose Monosaccharide of *Drosophila* Notch Has a Temperature-sensitive Function and Cooperates with O-Glucose Glycan in Notch Transport and Notch Signaling Activation, *J Biol Chem*, 査読有, vol. 290, 2015, 505-519, DOI: 10.1074/jbc.M114.616847

Kyoichi Sawamura, Kazunori Maehara, Yoko Keira, Hiroyuki O. Ishikawa, Takeshi Sasamura, **Tomoko Yamakawa**, Kenji Matsuno, A test of double interspecific introgression of nucleoporin genes in *Drosophila*, *G3*, 査読有, vol. 4, No. 11, 2014, 2101-6, DOI: 10.1534/g3.114.014027

Minoru Nakayama, Hiroyuki O. Ishikawa, Hiroyasu Sato, Takao Usui, Takayuki Okuda, Hiroyuki Yashiro, Hironori Ishikawa, Yoshie Taikou, Asako Minami, Kengo Kato, Masataka Taki, Toshiro Aigaki, Wataru Gunji, Masaya Ohtsu, Yasufumi Murakami, Sei-ichi Tanuma, Junpei Kuroda, Takeshi Sasamura, **Tomoko Yamakawa**, and Kenji Matsuno, A Gain-of-function Screen to Identify Genes that Induce Acute Adult Death in *Drosophila*, *BMC Genetics*, 査読有, vol. 15, No. 46, 2014, DOI: 10.1186/1471-2156-15-46

〔学会発表〕(計 9 件)

山川智子、Identification of genetic modifiers that interact with *pecanex*, encoding a component of Notch signaling in *Drosophila*, 第 48 回日本発生物学会大会、2015 年 6 月 3 日、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

山川智子、The function of novel ER modulating factor, Pecanex in Notch signaling, 3rd Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, 2015 年 5 月 12 日、北京 (中国)

山川智子、Identification of genetic modifiers that interact with *pecanex*, encoding a component of Notch signaling in *Drosophila*, Finnish-Japanese joint symposium on Morphogenesis and Signaling, 2015 年 3 月 3 日、ヘルシンキ (フィンランド)

山川智子、The function of novel ER modulating factor, Pecanex in Notch signaling, 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

山川智子、Identification of genetic modifiers that interact with *pecanex*, encoding a component of Notch signaling in *Drosophila*, Gordon Research Conference, 2014 年 7 月 21 日、レイストン (アメリカ)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山川 智子 (YAMAKAWA, Tomoko)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：20645402

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：