

研究課題別評価書

1. 研究課題名

ショウジョウバエをモデル系とした mRNA 型 non-coding RNA の解析

2. 氏名

影山 裕二

3. 研究のねらい

真核生物のゲノムからはおびただしい数の non-coding RNA が転写されていると考えられている。これら non-coding RNA の多くは、比較的高分子(500 nt〜)で、3' 末端に poly(A)鎖を含み、しばしばスプライシングを受けることから、mRNA 型 non-coding RNA と呼ばれている。mRNA 型 non-coding RNA は、その存在量の多さから、生物学的に重要な分子であると推測されているが、それらが本当にタンパク質をコードしていないのかも含めて、その生物学的役割についてはほとんど解析が進んでいない。

ショウジョウバエでは、32 個の mRNA 型 non-coding RNA 候補遺伝子(MRE 遺伝子)が同定されており、そのほとんどが組織特異的な発現様式を示すことが明らかになっている。細胞分化や行動・記憶などの高次生命現象を指標に、ショウジョウバエ遺伝学の多彩な手法を駆使した解析を行うことにより、mRNA 型 non-coding RNA の機能を明らかにすることができる。本研究課題では、ショウジョウバエ mRNA 型 non-coding RNA 遺伝子群のうち 6 個に焦点を絞り、その機能を詳細に解析することにより、従来の研究では明らかにされなかった RNA 分子の新たな機能の発見を目指した。

4. 研究成果

i) *MRE29/polished rice* 遺伝子の生理機能の同定

ショウジョウバエには32個の mRNA型non-coding RNA候補遺伝子(MRE遺伝子)があり、そのうちの6個(MRE3, 16, 29, 31, 32, 33)は転写産物のほぼ全長を含む完全長cDNAがクローニングされている。これら6個のMREについてRNAiシステムを作成し、その表現型を解析したところ、MRE29のRNAiシステムが胚性致死を示すことが明らかとなった。なお、これまでの研究により、MRE29は胚発生期においては表皮、消化管および気管に発現していることを明らかにしている。

MRE29遺伝子について転写領域を完全に欠失した変異システムを作成し、その表現型を解析したところ、幼虫表皮にある細胞突起(ventral denticleおよびdorsal hair)が完全に消失しており、呼吸器官である気管にみられる細胞突起(taenidium)に著しい異

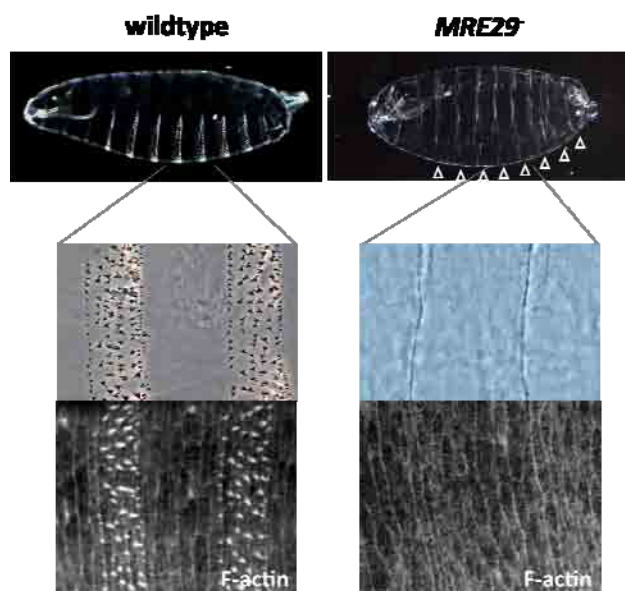


図1. 胚発生期における *pri* 表現型

pri 変異体(右)では、野生型(左)にみられる腹部幼虫表皮の細胞突起(上段矢頭および中段)が欠失しており、細胞突起直下に観察されるはずのアクチン束も消失する(下段)。

常が見られた(図1)。これらの表現型から、*MRE29*遺伝子を*polished rice*(*pri*)と再命名した。*pri*変異体では上記の細胞突起形成に必須とされているアクチン束構造が完全に消失しており、アクチン細胞骨格の再構成制御機構を介して細胞の形態形成に関与していると結論づけられた。

*pri*は胚発生期ばかりでなく、幼虫から蛹にかけての変態期に強く発現するが、*pri*変異の遺伝学的モザイク個体の変態期に致死であることから、変態期の成虫原基の発生においても*pri*が必須であることが示された。さらに変態期特異的に致死となる*pri*の対立遺伝子を作成して解析を行ったところ、変態期において脱皮ホルモンのシグナル伝達に中心的な役割を果たす転写因子群の一部(E74およびE75A)の発現が減少していた。このことから、*pri*が転写因子を介した変態期の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった(図2)。

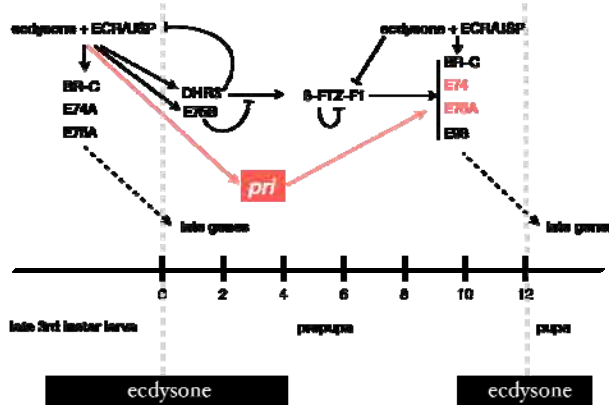


図2. 変態期における *pri* の機能
変態期には、脱皮ホルモン ecdysone の受容体 EcR を起点とした転写因子の遺伝子発現制御カスケードが形成されている。*pri* は、従来知られていた DHR3/FTZ-F1 経路とは独立に、E74 および E75A の発現を制御しており、前蛹期/蛹期の移行に重要な役割を果たしている。

ii) 真核生物で最小の ORF の発見

pri 遺伝子産物が non-coding RNA であるかどうかを検証するため、*pri* cDNA 中の各 ORF に EGFP ORF を挿入したコンストラクトをそれぞれ作成し、ショウジョウバエ培養細胞に導入すると、5' 側の 4 つの ORF (11-32 アミノ酸長) との融合コンストラクトでは蛍光が観察されることから、これら 4 つの ORF が実際に翻訳されていると考えられた。いずれの ORF についても、ORF 断片のみを含むトランスジーンが *pri* 表現型をほぼ回復することができ、また全ての ORF にフレームシフトを導入したトランスジーンでは遺伝子活性が完全になくなることから、これらの ORF が遺伝子活性に必要十分であり、個々の ORF が機能的に冗長であることが判明した。これらの ORF は極端に短いため、近縁種のゲノム配列を元にした通常のアミノ酸配列の類似性解析では高いスコアを示さないが、核酸配列の類似性を元に手動で近縁種ゲノム配列のアラインメントを行うと、核酸配列よりもむしろアミノ酸配列の類似性が高いことが明らかとなった。また、これら 4 つの ORF は LDPTG[Q/T]Y という共通のアミノ酸配列を含んでおり、機能の冗長性とよく一致する。以上の結果から、*pri* 遺伝子は機能的に冗長な 4 つの短鎖ペプチドをポリシストロニックにコードするユニークな遺伝子であることが明らかになった(図3)。 これら ORF のうち 3 個はわずか 11 アミノ酸からなる短鎖ペプチドをコードしており、これは真核生物では最も小さいものである。

iii) *pri* 遺伝子産物の分子機能

pri 遺伝子産物 (PRI ペプチド) の分子機能を明らかにするため、幼虫表皮の denticle 形成に

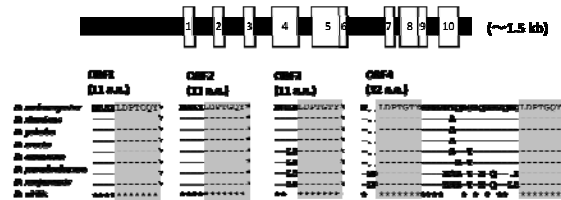


図3. *pri* 遺伝子の ORF

pri mRNA は約 1.5 kb であり、10 個の ORF を含む。このうち 5' 側の 4 個の ORF は翻訳され、遺伝子産物として機能する。これらの遺伝子産物は LDPTG[Q/T]Y という 7 アミノ酸の共通配列を含んでいる。

焦点を絞り、*pri*表現型のさらに詳細な解析を行った。*denticle*形成のマスター遺伝子 *shavenbaby* (*svb*) は転写因子をコードしており、その標的遺伝子である *miniature* や *shavenoid* の発現を制御することが知られている。一連の解析により、a) *pri*変異体では *svb* の発現には変化がみられないにもかかわらず、*miniature* および *shavenoid* の発現はほぼ完全に消失すること、b) SVBタンパク質は核内においてドット状に局在しているが、PRIペプチド存在下では核質全体に検出されること、c) 培養細胞を用いた転写レポーターアッセイから、SVB単独では転写抑制因子として機能するが、PRIペプチド存在下では転写活性化因子として機能すること、d) SVBにはN末端を大きく欠いたアイソフォームが存在し、このアイソフォームはPRIペプチド依存的にみられることが判明し、PRIペプチドはSVBタンパク質の活性制御を介して細胞突起形成に関与することが明らかとなった(図4)。

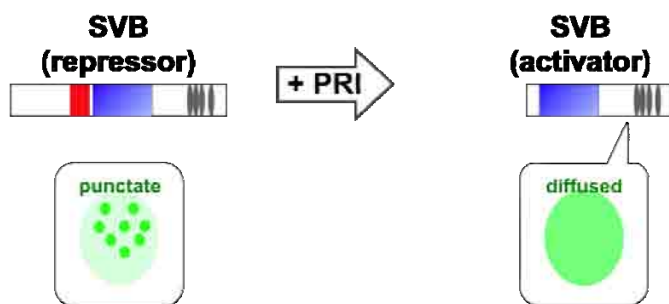


図4. PRI ペプチドの機能
Shavenbaby は転写抑制ドメイン(赤)、転写活性化ドメイン(青)、Znフィンガー型DNA結合ドメイン(灰)を含む転写抑制因子である。PRI ペプチド非存在下では転写抑制因子として機能するが、PRI ペプチド存在下ではN末端が欠失し、転写活性化因子となる。

5. 自己評価

研究計画にあった6個のMRE遺伝子に対するRNAi系統および強制発現系統の作成と表現型の解析については、各系統の致死性や形態異常の有無の観察に関しては計画通り達成された。しかしながら、個々の遺伝子に関する詳細な解析については、*MRE29/pri*に関する解析以外では、*MRE32*変異体のDNAマイクロアレイ解析と大まかな表現型の解析が行われたのみであり、目標とした6個全ての遺伝子に関する解析は達成できなかった。また、non-coding RNAの翻訳性の有無に関しては *MRE29/pri*のみについて行われており、それ以外の遺伝子についての解析は行われていない。これらは計画当初に予想していなかった短鎖ペプチド遺伝子の発見に伴い、並行的に複数の遺伝子を解析するのではなく、特定の遺伝子の詳細な解析に発展的に研究を展開したことに起因している。*pri*遺伝子の遺伝学的解析については予想外の成果を上げることができた一方で、他のMRE遺伝子群の解析については未解決のままであり、特にnon-coding RNAとして働くMREの同定と分子機能の解析については全く進展がみられず、今後の大きな課題として残された。

6. 研究総括の見解

真核生物のゲノムからは、多くのnon-coding RNAが転写されている。ここでは、ショウジョウバエのmRNA型non-coding RNAのうちMRE29に着目し、その機能解析を行った。その結果、この遺伝子は、アクチン細胞骨格の再構成制御機構を介して細胞の形態形成(*denticle*形成)に関与していることを明らかにした。細胞の形態から、MRE29遺伝子をpolished rice (*pri*)と再命名した。さらに *pri* が転写因子(E74およびE75A)を介した変態期の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。ところが、その後 *pri* の10個のORFの内、5'側の4個のORFは翻訳されていること、この *pri* 遺伝子産物が *pri* 遺伝子活性を担っていることなどが判明した。*Denticle* 形成のマスター遺伝子 *shavenbaby* (*svb*)産物(転写因子)は *pri* 存在下で活性を持つようになることも明らかにした。最初の目標であるmRNA型non-coding RNAの解析とはならなかったが、MRE29に関する多くの細胞機能を明らかにした点は非常に高く評価出来る。ORFのうち3個はわずか11アミノ酸からなる短鎖ペプチドをコードしており、真核生物では最も小さな遺伝子産物であった。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Takefumi Kondo, Hashimoto, Y., Kato, K., Inagaki, S., Hayashi, S. and Kageyama, Y.
Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nat. Cell Biol.* 9: 660–665. (2007)

②著書

1. Yoshiko Hashimoto, Kondo, K. and Kageyama, Y. Lilliputians get into the limelight – novel class of small peptide genes in morphogenesis. *Develop. Growth Diff.* 50: S269–276. (2008)
2. 近藤武史、影山裕二 short ORF にコードされる短鎖ペプチドの機能
蛋白質・核酸・酵素 53: 20–27 (2008)
3. 影山裕二、近藤武史 臨床に必要な神経薬理・科学:ポリシストロニックにコードされる短鎖ペプチド *Clinical Neuroscience* 26 (3): 242–243 (2008)
4. 影山裕二、佐藤仁泰
無敵のバイオテクニカルシリーズ・RNA 実験ノート 稲田利文・塩見春彦 編(羊土社)
第3章 4. ショウジョウバエにおける RNAi の誘導 pp109–117. 2008年3月
5. 影山裕二
分子昆虫学 –ポストゲノムの昆虫研究– 畠山正統他 編(共立出版) 第2章 3. 性決定 pp. 68–79、5. Non-coding RNA による分子制御 pp. 118–128. 2009年8月

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Satoko Aratani., Kageyama, Y., Nakamura, A., Fujita, H., Fujii, R., Nishioka, K. and Nakajima, T. MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila*.
Int. J. Molec. Med. 21: 469–476. (2008)
2. Yasuo Agawa, Sarhan, M., Kageyama, Y., Akagi, K., Takai, M., Hashiyama, K, Wada, T., Handa, H., Iwamatsu, A., Hirose, S. and Ueda, H. *Drosophila* Blimp-1 is a transient transcriptional repressor that controls timing of the ecdysone-induced developmental pathway. *Molec. Cell. Biol.* 27: 8739–8747. (2007)