

平成 2 6 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機 関 番 号 1 4 6 0 3 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 研究 期 間 平成 2 6 年度～平成 3 0 年度

5. 課 題 番 号 2 6 1 1 6 0 0 6

6. 研究課題名 mRNAの局在化に働く新生鎖の機能解析

7. 研究代表者

研究 者 番 号	研究 代 表 者 名	所 属 部 局 名	職 名
5 0 1 4 2 0 0 5	コウノ ケンジ 河野 憲二	バイオサイエンス研究科	教授

8. 研究分担者

研究 者 番 号	研究 分 担 者 名	所属研究機関名・部局名	職 名

9. 研究実績の概要

1. 翻訳アレストによるXBP1u mRNAの小胞体膜への標的化機構の解明 XBP1u蛋白質のN末側にFlagの配列を付加したFlag-XBP1uをHEK293細胞に発現し、抗Flag抗体による免疫沈降実験、さらに質量分析を行ったところ、シグナル認識粒子(SRP)の成分であるSRP54, SRP72, また、トランスロコンの成分であるSec61などが共沈降してきた。このことは、XBP1uが分泌経路を利用して小胞体膜に運ばれていることを示している。XBP1uは翻訳の一過的停止を起こし、S255A変異(XBP1u(S255A))はさらに強固な翻訳停止を、一方W256A変異(XBP1u(W256A))は翻訳停止を起こさないことを既に報告している。そこでこれらの変異型XBP1uを用いて更なる検討を行った。野生型及び変異型のXBP1uを細胞に発現し、XBP1uで共沈降すると、翻訳停止の強さに比例してSRP54, Sec61を沈降するが、XBP1u(W256A)では両蛋白質との結合がみられないことが明らかとなった。このことは、翻訳の停止に依存して分泌経路を利用していることを示唆している。次年度は、SRPを殆ど含まない小麦胚芽抽出液(WGE)を用いた無細胞蛋白質合成系に膜画分を加え、精製したSRP添加に依存してXBP1uが膜画分に運ばれることを証明する計画である。 2. 翻訳アレストの分子機構の解析 S255A変異は翻訳アレストが増強しているので、このアミノ酸を他の18のアミノ酸すべてに変換して、翻訳アレストの強さを比較したところ、S255A>S(野生型)=S255G>他の17アミノ酸 という結果になり、側鎖の小さいアミノ酸が翻訳停止を起こす傾向が認められた。調べた限りでは、255番目のアミノ酸変異だけが、翻訳停止活性を増強するので、その理由について検討を加える。
--

10. キーワード

(1) 翻訳停止

(2) mRNAの局在化

(3) 小胞体ストレス応答

(4) リボソーム

(5)

(6)

(7)

(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

XBP1u mRNAがXBP1uの翻訳停止に依存して、小胞体膜上に移動する可能性をサポートするデータを得ることができ、本年度の計画通り順調に進展している。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

1. 翻訳アレストによるXBP1u mRNAの小胞体膜への標的化機構の解明

SRPを殆ど含まない小麦胚芽抽出液(WGE)を用いた無細胞蛋白質合成系に膜画分を加え、精製したSRP添加に依存してXBP1uが膜画分に運ばれることを証明する。小胞体ターゲティングシグナルをもつHR2領域を欠失したXBP1u (dHR2) ではXBP1u mRNAを小胞体膜上に運ぶ効率が落ちること、またXBP1u mRNAの特殊スプライシング効率が落ちることを明らかにする。

2. 翻訳アレストの分子機構の解析

生化学的アプローチ： HR2領域が相互作用する分子を光架橋や共免疫沈降により取得し、質量分析などの方法によりそれらの分子を同定する。

遺伝学的アプローチ： ヒト由来のハプロイド細胞 (KBM7細胞にスクリーニング用のレポーター遺伝子を発現させた安定発現細胞を取得後、gene-trap mutagenesisによる遺伝子ノックアウトスクリーニングにより翻訳アレストが解除された細胞を選択し、その遺伝子を同定することを目的とする。スクリーニング系の確立を引き続き目指す。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件 うち査読付論文 計(1)件

著 者 名		論 文 標 題 【掲載確定】						
Mathuranyanon, R., Tsukamoto, T., Takeuchi, A., Ishiwata-Kimata, Y., Tuchiya, Y., Kohno, K., and Kimata, Y		Tight regulation of the unfolded 1 protein sensor Ire1 by its intramolecularly antagonizing subdomain.						
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年				最初と最後の頁
Journal of Cell Science		有	in press	2	0	1	5	in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)								
なし								

著 者 名		論 文 標 題				
都留 秋雄		小胞体ストレスと炎症性腸疾患				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
実験医学		無	32	2	0 1 4	2221-2225
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
なし						

(学会発表) 計(13)件 うち招待講演 計(3)件

発 表 者 名	発 表 標 題	
苅田 聡	SRP経路によるXBP1u mRNAの小胞体局在化機構	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
2014年度日本農芸化学関西支部大会	2014年09月21日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
曾川 愛守榮	異なる翻訳停止における新生ポリペプチド鎖の比較	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
2014年度日本農芸化学関西支部大会	2014年09月21日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
大古殿 美加	XBP1uにおける翻訳停止の分子機構	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
2014年度日本農芸化学関西支部大会	2014年09月21日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
河野 憲二	Unfolded Protein Response(UPR)における翻訳ポージングの重要性	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第87回日本生化学会大会(招待講演)	2014年10月15日～2014年10月17日	国立京都国際会館(京都府京都市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Satoshi Kanda	Novel role of SRP pathway on XBP1u localization and ER homeostasis.	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
EMBO conference Series: The endoplasmic reticulum (ER) as a hub for organelle communication	2014年10月26日～2014年10月31日	Hotel Melia Golf Vichy Catalan (Girona, Spain)

発 表 者 名	発 表 標 題	
斉藤 美知子	小胞体ストレス応答不全による糖尿病発症機構の解明	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Satoshi Kanda, Kota Yanagintani,, Yukiko Yokota, Yuta Esaki, Kenji Kohno	Novel role of SRP pathway on XBP1u localization and ER homeostasis.	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Mirai Kono	Analysis of translational dynamics of XBP1 mRNA	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～2014年11月27日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
河野 未来	Analysis of translational dynamics of XBP1 mRNA	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
「新生鎖の生物学」総括班主催 第一回若手ワークショップ	2015年03月08日～2015年03月10日	八王子セミナーハウス(東京都八王子市)

発表者名	発表標題	
曾川 愛守榮	XBP1u 新生鎖の翻訳停止後にたどる運命	
学会等名	発表年月日	発表場所
「新生鎖の生物学」総括班主催 第一回若手ワークショップ	2015年03月08日～2015年03月10日	八王子セミナーハウス(東京都八王子市)

発表者名	発表標題	
大古殿 美加	XBP1u タンパク質の翻訳停止機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
「新生鎖の生物学」総括班主催 第一回若手ワークショップ	2015年03月08日～2015年03月10日	八王子セミナーハウス(東京都八王子市)

発表者名	発表標題	
Kenji Kohno	Efficient targeting of translation-paused XBP1u to the ER in unfolded protein response.	
学会等名	発表年月日	発表場所
九州大学国際シンポジウム(招待講演)	2015年03月16日～2015年03月17日	九州大学 Centennial Hall(福岡県福岡市)

発表者名	発表標題	
河野 憲二	小胞体ストレス応答機能障害による糖尿病の発症機序	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本薬学会第135回年会(招待講演)	2015年03月25日～2015年03月28日	兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

〔図書〕 計(1)件

著 者 名		出 版 社		
Yanagitani, K. and Kohno, K.		Springer		
書 名		発行年		総ページ数
Regulatory Nascent Polypeptides		2	0	1 4
				315 (291-310)

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

動物細胞工学(河野研究室)
<http://bsw3.naist.jp/courses/courses207.html>
 Laboratories: Molecular and Cell Genetics
<http://bsw3.naist.jp/eng/courses/courses207.html>
 動物細胞工学研究室
<http://bsw3.naist.jp/kouno/kouno.html>