

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0205

研究課題名（和文）eEF1B L欠損によるてんかん様発作の分子病態解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）A study on the molecular mechanisms of epileptic phenotype in eEF1BdeltaL knockout mice(Fostering Joint International Research)

研究代表者

貝塚 拓 (Kaitsuka, Taku)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：00435926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,500,000円

渡航期間： 18ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究ではタンパク質eEF1B Lの核内機能を分子レベルで明らかにすることで、eEF1B L欠損によるてんかん様発作が何故起こるのかを明らかにすることを目的としている。そのために核内タンパク質を専門とする海外研究機関に渡航し、主に以下の成果が得られた。1) eEF1複合体を構成する全ての因子が細胞質と核の両方に存在することがわかった。2) eEF1B LはRNA結合タンパク質と複合体を形成しうることがわかった。3) ChIPシーケンス法を用いて解析したところ、eEF1B LはX染色体上のいくつかの遺伝子に結合しうることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

eEF1B Lは翻訳伸長因子のスプライシングバリエーションであり、本来の機能と異なり、核内にて転写を刺激する機能をもつ非常にユニークなタンパク質である。本機能を解明することは生命科学分野において意義のあることである。さらにeEF1B Lの変異が神経発達障害の原因として同定されており、本タンパク質の分子レベルでの機能制御を明らかにすることは創薬など薬学分野や医学分野においても有意義な研究である。

研究成果の概要（英文）： In this study, I aimed at revealing the molecular function of eEF1BdeltaL protein in nuclear and elucidating how the deletion of this protein led to epileptic seizure in mice. For its purpose, I visited to the foreign researcher who specializes in nuclear proteins and obtained following results. 1) All proteins which constitute eEF1 complex exist in both cytosol and nucleus. 2) eEF1BdeltaL could form a complex with RNA-binding proteins. 3) By ChIP sequencing, it was found that eEF1BdeltaL could bind to some genes in X chromosome.

研究分野：生理学、神経科学、分子生物学

キーワード：翻訳因子 てんかん 遺伝子転写 クロマチン免疫沈降

1. 研究開始当初の背景

(1) てんかんとその原因遺伝子

てんかんは一般人口の約3%が一度は発作を経験すると言われており、比較的発症頻度の高い疾患である。てんかんの発症には脳腫瘍や外傷など外因性によるものや自閉症や発達障害の一つの症状として現れることもあるが、多くの症例ではその原因は不明である。一部の家族性のてんかんで原因遺伝子が同定されており、そのほとんどがNa⁺チャネルやGABA受容体などの中枢神経系に発現する膜蛋白質をコードする遺伝子である。一方でLG11やBRD2などの非チャネルタンパク質をコードする遺伝子も同定されており、てんかん発作にはイオンチャネル以外の関与も示唆されている。

(2) 研究代表者のこれまでの研究

研究代表者らは翻訳伸長因子であるeEF1B δ (eukaryotic elongation factor 1B δ) が既存のアイソフォームであるeEF1B δ 1と長鎖のアイソフォームであるeEF1B δ Lを発現すること、またeEF1B δ Lは翻訳因子であるeEF1B δ 1とは機能が全く異なり、分子シャペロンであるHsp70などの熱ショックタンパク質の転写を誘導する転写制御因子であることを発見した (Kaitsuka et al., EMBO Rep., 2011)。さらに興味深いことにeEF1B δ Lは脳に豊富に存在していることを見出している。そこでeEF1B δ Lの生体における機能を調べるために、eEF1B δ Lの欠損マウスを作成し、その表現型、特に脳・神経系の機能に関する行動解析を行なった。その結果、一般的な活動性や情動・不安行動および学習機能は野生型に比べ顕著な差はなかったが、解析の過程で恐怖条件付け試験における音刺激に対して強直発作に似た激しいけいれんを起こすことがわかった (Kaitsuka et al., Front. Mol. Neurosci., 2018)。しかしながら、eEF1B δ Lの欠損マウスがなぜこのような表現型を呈するのか、その分子メカニズムは明らかにできていなかった。

2. 研究の目的

本国際共同研究では核内タンパク質を専門とする海外研究機関にて、以下の点を明らかにすることによりeEF1B δ Lの欠損によるてんかんがなぜ起こるのかを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

- (1) eEF1B δ Lが核内でどのようなタンパク質複合体を形成するのか。
- (2) eEF1B δ Lは具体的にどの遺伝子領域に結合するのか。

3. 研究の方法

海外共同研究者のラボに1年半滞在し、実験スペースを借り、適宜実験内容について議論しながら以下の研究を行なった。

(1) 複合体解析: eEF1B δ Lは細胞核内でどのような複合体を形成するか以下の手法を用いた同定を試みた。マウス神経芽細胞腫Neuro-2aの核抽出物から抗eEF1B δ 抗体を用いた免疫沈降法により、その結合蛋白質を精製し、LC-MSにより同定した。

(2) CHIP シーケンス: eEF1B δ Lのクロマチン免疫沈降物についてCHIPシーケンス解析を行ない、どの遺伝子領域に相互作用しているか解析した。具体的にはNeuro-2a細胞をホルムアルデヒドによりクロスリンクし、クロマチン調製液を作製し、抗eEF1B δ 抗体によりDNA-蛋白質複合体を免疫沈降させる。その沈降物からDNAを精製後、特殊なDNA配列を付加したライブラリーを作成し、次世代シーケンサにて解析する。得られたシーケンス配列をマウスゲノム配列と並び合わせ、どの領域に高頻度に出現するか解析した。

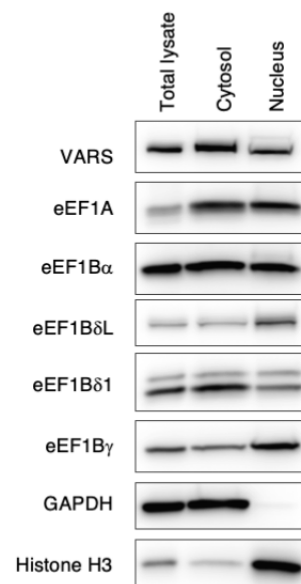
4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① eEF1 複合体構成因子の核局在

Neuro-2a細胞の細胞質と核を分画し、eEF1複合体を構成する因子をウエスタンブロット法により調べたところ、eEF1B δ L以外の因子(VARS、eEF1A、eEF1B α 、eEF1B δ 1、eEF1B γ)も細胞核に局在することが分かった(図1)。GAPDHは細胞質マーカーでHistone H3は核マーカーとして用いている。この結果はeEF1B δ Lは

図1 eEF1複合体構成因子の細胞内局在



核内でもこれら因子と結合し、複合体として機能している可能性を示唆する。

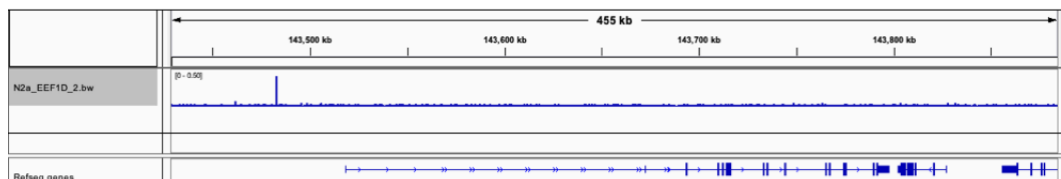
② eEF1B δ L と RNA 結合タンパク質の相互作用

Neuro-2a 細胞の核抽出物から抗 eEF1B δ 抗体により免疫沈降した分画に Hnrnpu などの RNA 結合タンパク質が含まれることが分かった。この結果は eEF1B δ L が RNA 結合タンパク質および RNA と巨大分子を構成して遺伝子転写を制御する可能性を示唆している。

③ eEF1B δ L が相互作用するゲノム領域

Neuro-2a 細胞の核抽出物から抗 eEF1B δ 抗体により免疫沈降したゲノム断片は X 染色体上のいくつかの遺伝子とマッチすることが分かった。ある遺伝子では、eEF1B δ L が結合する領域は転写因子が結合するエンハンサー領域であることが示唆された (図 2)。

図 2 eEF1B δ L が相互作用するゲノム領域



④ eEF1B δ L と膜タンパク質との相互作用

興味深いことに、Neuro-2a 細胞の総タンパク質抽出物から抗 eEF1B δ 抗体により免疫沈降した分画に細胞膜タンパク質が同定された。この結果は eEF1B δ L の細胞膜との相互作用といった新たな機能を示唆するものである。つまり eEF1B δ L は Moon Light タンパク質のように本来の機能 (遺伝子転写) とは全く異なる機能 (細胞間相互作用など?) を有する可能性がある。

(2) 国内外における位置付けとインパクト

背景で述べた通り、本研究では研究代表者がその機能を初めて報告した eEF1B δ L について、その欠損マウスが示す表現型の発症メカニズムを解明することを目的として研究を遂行した。

近年、海外の 2 つの研究グループから eEF1B δ L をコードする EEF1D 遺伝子の変異が重度の知的障害で発見されたとの報告があり、神経発達障害との関連性が注目されている (Reuter et al., JAMA Psychiatry, 2017; Ugur Iseri et al., J. Hum. Genet., 2019)。実際に知的障害ではてんかんを併発することが多く、eEF1B δ L 欠損マウスの表現型を解析することは上述のヒトでの変異のモデルとして有用であり、本研究は医学薬学的な面からも重要な内容である。また前述の通り、本研究では細胞核内で eEF1B δ L が形成しうる複合体の全容についての知見が得られ、さらに eEF1B δ L が相互作用する X 染色体上の遺伝子領域も明らかになりつつある。X 染色体上にはシナプス機能や神経発達障害に関連する遺伝子が多く存在しているため、eEF1B δ L 欠損により X 染色体の一つか複数の遺伝子発現が抑制され、神経発達に影響を及ぼし、結果としててんかんの表現型が現れたと仮説を立てることができる。以上、本研究の成果は神経科学分野および医学薬学分野にインパクトを与える知見であると考えられる。

(3) 今後の展望

今後は①核内の eEF1 構成因子が eEF1B δ L による遺伝子転写刺激作用に如何に関わるか、② eEF1B δ L は RNA と相互作用するか否か、③ eEF1B δ L は X 染色体上の遺伝子の転写を促進するか否か、eEF1B δ L 欠損マウスの脳でそれら遺伝子の発現が阻害されるか否か、を明らかにすることにより、eEF1B δ L 欠損によるてんかん発症のメカニズムを解明していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaitsuka Taku, Kiyonari Hiroshi, Shiraishi Aki, Tomizawa Kazuhito, Matsushita Masayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Deletion of Long Isoform of Eukaryotic Elongation Factor 1B Leads to Audiogenic Seizures and Aversive Stimulus-Induced Long-Lasting Activity Suppression in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2018.00358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Beesetty Pavani, Wiczerzak Krystyna B., Gibson Jennifer N., Kaitsuka Taku, Luu Charles Tuan, Matsushita Masayuki, Kozak J. Ashot	4. 巻 8
2. 論文標題 Inactivation of TRPM7 kinase in mice results in enlarged spleens, reduced T-cell proliferation and diminished store-operated calcium entry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-21004-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kaitsuka Taku, Kojima Rie, Kawabe Masaaki, Noguchi Hirofumi, Shiraki Nobuaki, Kume Shoen, Tomizawa Kazuhito	4. 巻 14
2. 論文標題 A culture substratum with net-like polyamide fibers promotes the differentiation of mouse and human pluripotent stem cells to insulin-producing cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 045019 ~ 045019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1748-605X/ab261c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko Hitomi, Kaitsuka Taku, Tomizawa Kazuhito	4. 巻 9
2. 論文標題 Response to Stimulations Inducing Circadian Rhythm in Human Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 620 ~ 620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9030620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 貝塚 拓	4. 巻 46
2. 論文標題 eEF1B L欠損で生じる聴原性発作	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 111~114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 貝塚 拓、富澤 一仁、松下 正之
2. 発表標題 翻訳因子の長鎖アイソフォームeEF1B Lの欠損マウスは聴原生てんかんを呈する
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taku Kaitsuka, Masayuki Matsushita
2. 発表標題 Regulation of brain-specific splicing of Eef1d and activity control of its nuclear variant, eEF1B L by stress-induced dephosphorylation
3. 学会等名 NEUROSCIENCE 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap http://researchmap.jp/read0108060
--

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ラインバーグ ダニー (Reinberg Danny)	ニューヨーク大学ハワードヒュース医学研究所・生化学・分子薬理学部門・教授	