

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06876

研究課題名(和文) eEF1B Lによるタンパク質翻訳と転写制御を介した脳内ストレス応答機構の解明

研究課題名(英文) Study on the control of stress response in the brain via the regulation of protein translation and gene transcription by eEF1BdeltaL

研究代表者

貝塚 拓 (Kaitsuka, Taku)

国際医療福祉大学・福岡薬学部・講師

研究者番号：00435926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では翻訳因子eEF1B 1の脳特異的スプライシングバリエーションeEF1B Lの細胞内機能を調べることで本タンパク質の欠損により生じるてんかん発作の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。研究の結果、eEF1B LはeEF1B 1の既知の結合パートナーや脱リン酸化酵素と相互作用すること、またeEF1B Lの欠損はタンパク質合成量を亢進し、リン酸化型ERKを増加させることなどが明らかとなった。既存の知的障害モデルマウスではリン酸化型ERKの増加がてんかんの原因であることが示されている。以上より本研究の成果はeEF1B Lの分子機構のみならず、てんかん発症のメカニズムに迫るものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選択的スプライシング機構は有限の遺伝子から多様なタンパク質を生み出す精巧な細胞機能であり、進化における脳の複雑化に寄与してきたと言われている。本研究の対象であるeEF1B Lは高等動物にのみ発現するスプライシングバリエーションであり、その機能を解明することは複雑なヒト脳の成り立ちを理解する鍵となり、学術的に意義深い。

eEF1B Lをコードする遺伝子EEF1Dについて、その機能喪失型変異が知的障害と関連することが報告されている。知的障害ではてんかんを併発することが多く、本研究の成果であるeEF1B Lの機能とその欠損によるてんかん発症に関する情報は上記の遺伝子疾患を理解する上で重要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the cellular function of eEF1BdeltaL which is a brain-specific splicing variant of translation elongation factor eEF1Bdelta1. In addition, we attempted to clarify the mechanism about how epileptic seizure which occurs in eEF1BdeltaL knockout mice. As a result, it is found that eEF1BdeltaL interacts with binding partners of eEF1Bdelta1 and protein phosphatase 1. In addition, knockout of eEF1BdeltaL leads to augmented protein synthesis and increased phosphorylation of ERK1/2. It is generally accepted that such increased phosphorylation of ERK1/2 is the cause of audiogenic seizures in a mouse model of an intellectual disability. From the above, the present results suggest the molecular mechanism of eEF1BdeltaL and how its knockout leads to epileptic behavior.

研究分野：衛生化学、神経科学

キーワード：翻訳伸長因子 選択的スプライシング 転写因子 分子シャペロン ストレス応答 てんかん タンパク質合成 脱リン酸化

1. 研究開始当初の背景

神経発達障害は先天性の中枢神経系の機能障害を主な原因としており、その中には知的障害、学習障害や自閉症スペクトラム障害などが含まれる。これらの障害ではいくつかの精神疾患を併存するケースも多く、例えば知的障害者の数十%で自閉症スペクトラム障害やてんかんを併発している。神経発達障害では多くの症例で遺伝的要因が主な病因と考えられており、近年の次世代シーケンス技術の発展により上述の疾患に関連する遺伝子変異が多数同定されている。その中で、因果関係がほぼ特定された遺伝子にはシナプスの形成・伝達に関わるもの、タンパク質翻訳を制御する遺伝子またエピジェネティック制御を含む転写制御遺伝子など多岐に渡る。これら神経発達障害を理解するためには個々の遺伝子の機能を解明し、症例との因果関係を明らかにしていくことが重要である。

ところで、エキソーム解析により知的障害児を有する家系で *EEF1D* 遺伝子が常染色体劣性遺伝の原因遺伝子として同定されている。*EEF1D* はタンパク質翻訳伸長因子である eEF1B δ 1 をコードしており、リボソームでタンパク質翻訳を伸長する eEF1 ファミリーに属する。eEF1 ファミリーには、eEF1A、eEF1B α 、eEF1B δ 1、eEF1B γ があり、eEF1A はリボソームにアミノアシル tRNA を運搬する役目があり、eEF1B α と eEF1B δ 1 はそれぞれ eEF1A のグアニンヌクレオチド交換因子として働く。研究代表者らはこれまでに *EEF1D* 遺伝子の脳特異的な選択的スプライシング産物である eEF1B δ L の機能について研究を行っており、その研究の過程で eEF1B δ L は分子シャペロンをコードする遺伝子の転写を刺激すること、eEF1B δ L の欠損マウス (以下 δ L 欠損マウス) は音刺激に対するてんかん発作つまり聴原性発作を呈することを発見していた。

一方で、 δ L 欠損マウスでは何が原因でてんかん発作が起こるのか、タンパク質合成に影響した結果か、分子シャペロンの誘導が抑制されたことによるものか。また脳特異的なスプライシングバリエーション eEF1B δ L の脳神経系での本来の生理機能や役割などが未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では eEF1B δ L の欠損により翻訳伸長因子群とタンパク質合成系が如何に影響を受けるか、また脳のどの領域でどのような遺伝子発現に影響を受けるのかを調べ、 δ L 欠損マウスがなぜ聴原性発作を発症するのかを明らかにすることを目的とした。さらに本研究をとおして *EEF1D* 遺伝子変異が知的障害の発症に如何に関係するのかの糸口を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

eEF1B δ L の欠損が翻訳伸長因子群とタンパク質合成系に与える影響について調べるために下記の項目を実施した。

(1) 翻訳伸長因子群の構成変化

δ L 欠損マウスでは代償的な eEF1B δ 1 の増加と eEF1B α の減少が認められており、細胞内で eEF1 ファミリーの構成が変化していると考えられた。そこで海馬の総タンパク質を抽出し、翻訳伸長因子群 (eEF1A、eEF1B α ・ δ 1、eEF2、VARS) のタンパク質レベルを野生型と欠損マウスで比較した。また eEF1B δ の抗体 (δ 1/L の両者を認識する) で免疫沈降させて共沈降するタンパク質を野生型と δ L 欠損マウスで比較し、eEF1 複合体形成の相違点を解析した。

(2) 総タンパク質合成への影響

野生型と δ L 欠損マウスの胎仔海馬より培養神経細胞を作成し、³⁵S-メチオニン/システインの合成タンパク質への取り込み量を指標として総タンパク質合成量を比較した。

以前の研究から δ L 欠損マウスの海馬では分子シャペロン遺伝子の発現は野生型と差が見られなかったが、興味深いことに脳下垂体などの領域では分子シャペロン *Dnajb1* 遺伝子発現の低下が認められた。そこで eEF1B δ L の欠損が下垂体でどのような遺伝子発現に影響するかについて調べるために下記の項目を実施した。

(3) 下垂体遺伝子発現変動

野生型と δ L 欠損マウスの下垂体を単離し、トータル RNA を抽出したのちマイクロアレイにより変動遺伝子を網羅的に解析した。また分子シャペロンをコードする遺伝子 (*Hspa1*、*Hspb1*、*Hspd1*、*Dnajb1*、*Cryab*) の発現量を比較した。

δ L 欠損マウスが如何にして聴原性発作を発症するのかを調べるために下記の項目を実施した。

(4) シグナル伝達タンパク質への影響

δ L 欠損マウスと同様に聴原性発作を呈する脆弱 X 症候群のモデルマウスでは総タンパク質合成の増加と MAPK (ERK1/2) カスケードの亢進が認められ、その活性化がてんかん発作

の原因であることが報告されている。そこでシグナル伝達タンパク質 (ERK、Akt など) の量的・質的レベルを野生型と欠損マウスで比較した。

最後に当初の研究計画には記載していなかったが、これまでの研究で発見した eEF1B δ L の脱リン酸化による活性制御機構についてさらに詳しく調べるために以下の項目を実施した。

- (5) プロテインフォスファターゼ 1 (PP1) との相互作用
eEF1B δ L の脱リン酸化は PP1 阻害剤であるオカダ酸添加により阻害されることが分かっていたため、Neuro-2a 細胞の総タンパク質抽出物について eEF1B δ の抗体で免疫沈降させ、PP1 が共沈するか否か調べた。また eEF1B δ L の組換えタンパク質を精製し、PP1 タンパク質と *in vitro* で反応させ、PP1 により直接脱リン酸化を受けるか否か検討した。

4. 研究成果

上述の研究手法の各項目に対応して本研究では以下の実験結果が得られた。

- (1) eEF1 ファミリーの構成変化について

- ① δ L 欠損マウスの海馬において、以前の結果と同様に eEF1B δ 1 レベルの増加と eEF1B α レベルの減少が確認された。他の eEF1 ファミリーのタンパク質レベルは野生型と δ L 欠損マウスで有意な差は認められなかった (図 1)。
- ② 野生型と δ L 欠損マウスの脳総タンパク質抽出物を用いて eEF1B δ 抗体で免疫沈降した分画において、野生型では既知の eEF1 複合体の構成因子が全て共沈降したが、欠損マウスでは一部の構成因子の共沈降が減少した。

- (2) タンパク質合成への影響について

- ① δ L 欠損マウスの海馬培養神経細胞で、総タンパク質合成の有意な亢進が認められた (図 2)。
- (3) 下垂体遺伝子発現への影響について
- ① δ L 欠損マウスの下垂体において野生型と比較して下垂体前葉ホルモンをコードする *Pomc*、*Gh*、*Pr1*、*Cga* の遺伝子発現量が減少していた。
- ② δ L 欠損マウスの下垂体において *Dnajb1* の発現が有意に減少したが、他の分子シャペロンをコードする遺伝子発現レベルに差はなかった。

- (4) シグナル伝達タンパク質の量的・質的变化について

- ① δ L 欠損マウスの海馬で、リン酸化型 ERK レベルが野生型に比べて増加傾向にあった。一方でリン酸化型 Akt レベルに差はみられなかった (図 3)。

- (5) PP1 による脱リン酸化について

- ① Neuro-2a 細胞の総タンパク質抽出物において PP1 は eEF1B δ 1/L と共沈降した (図 4)。
- ② eEF1B δ L は PP1 により直接脱リン酸化された。また eEF1B δ L の既知のリン酸化サイト Ser499 のリン酸化特異的抗体で調べたところ、PP1 による脱リン酸化はこの Ser499 で起こった (図 5)。

以上の結果を総括すると、eEF1B δ L は神経細胞において eEF1B δ 1 と相互作用する eEF1B 複合体の構成因子と結合することで、eEF1A から eEF1B 複合体を引き離し、翻訳伸長反応を抑制する可能性が示唆された。その考察をサポートするように δ L 欠損では総タンパク質合成量が亢進している。また総タン

図1 eEF1ファミリータンパク質レベル

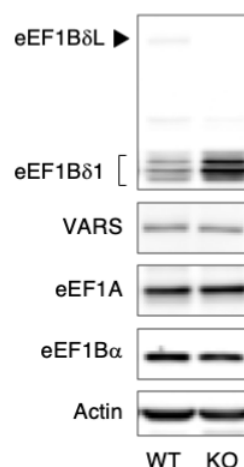


図2 総タンパク質合成量

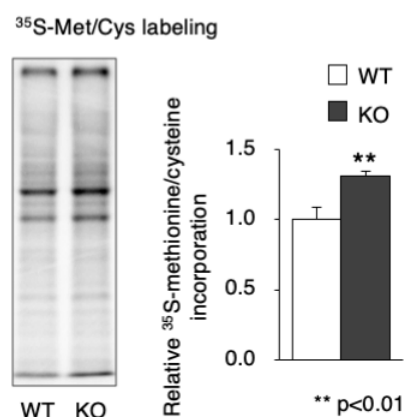
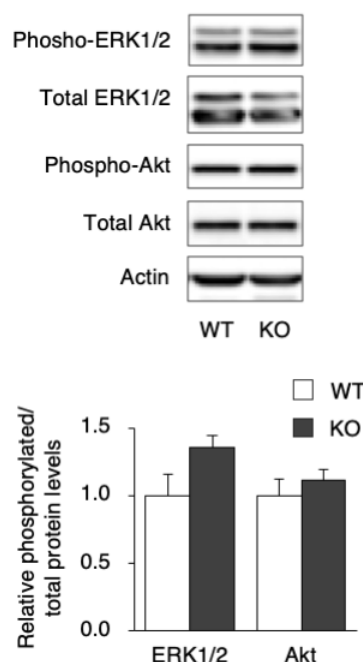


図3 リン酸化型 ERK、Akt レベル



パク質合成量の亢進が ERK1/2 のリン酸化を刺激し、欠損マウスで聴原性発作を引き起こしている可能性が提起されたが、今後はその直接の証明が必要である。他に eEF1B δ L は下垂体前葉ホルモンの遺伝子転写を制御する可能性が提起されたが、今後は血清中の下垂体前葉ホルモンの測定とその減少による表現型の探索が必須である。さらに本研究の当初の計画には記載していなかったが、研究を遂行する過程で eEF1B δ L が PP1 による直接脱リン酸化されることを明らかにした。

ところで eEF1B δ L は脳特異的な選択的スプライシングにより生成され、本来のタンパク質とは異なる機能を有する非常にユニークなタンパク質である。生物の進化、特に哺乳類の脳の複雑化において選択的スプライシング機構は重要な役割を果たしている。その機構により細胞は単一の遺伝子から多様なタンパク質を生み出すことで、限られた資源（遺伝子）から複雑な細胞内機能を可能にしたと言える。そのような選択的スプライシング産物の中でも eEF1B δ L は哺乳類と鳥類に限定して発現するバリエーションであり、本タンパク質の機能を探究することは高度な情報処理を行うヒト脳への進化を考える意味でも非常に興味深い。

さらに前述のとおり eEF1B δ L をコードする *EEF1D* の変異が知的障害で同定されており、ヒト疾患との関連性が示されている。また *EEF1D* の機能欠失型変異はパーキンソン病発症との関連も示唆されている。以上のことから、本研究は eEF1B δ L の細胞内機能を解明する上で重要な知見であり、さらに本遺伝子変異による上記疾患の理解と治療薬開発に極めて重要と考える。今後はヒト人工多能性幹細胞において遺伝子変異を導入することで上記疾患モデルを作成し、発症メカニズム研究とその治療法開発へと展開していく計画である。

図4 eEF1B δ 1/L と PP1 の共沈降

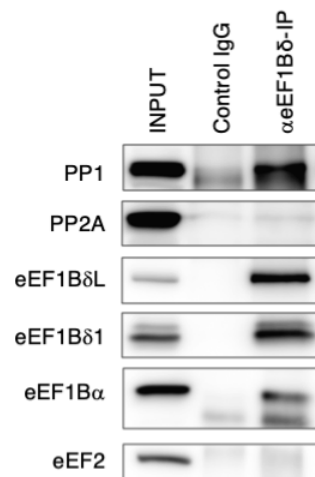
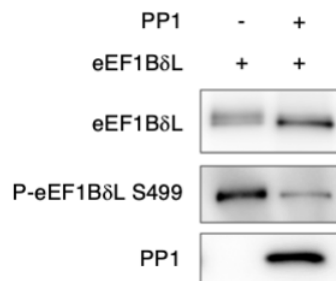


図5 *in vitro* PP1 脱リン酸化アッセイ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 4件）

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 -
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 Kaitsuka Taku, Matsushita Masayuki, Matsushita Nobuko	4. 巻 529
2. 論文標題 SIRT2 inhibition activates hypoxia-inducible factor 1 signaling and mediates neuronal survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 957 ~ 962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.159	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 Mellott Alayna, Rockwood Jananie, Zhelay Tetyana, Luu Charles Tuan, Kaitsuka Taku, Kozak J. Ashot	4. 巻 472
2. 論文標題 TRPM7 channel activity in Jurkat T lymphocytes during magnesium depletion and loading: implications for divalent metal entry and cytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1589 ~ 1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-020-02457-3	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 該当する

1. 著者名 Beesetty Pavani, Rockwood Jananie, Kaitsuka Taku, Zhelay Tetyana, Hourani Siham, Matsushita Masayuki, Kozak J. Ashot	4. 巻 -
2. 論文標題 Phagocytic activity of splenic macrophages is enhanced and accompanied by cytosolic alkalinization in TRPM7 kinase dead mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15683	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 該当する

1. 著者名 Kaitsuka Taku, Hakim Farzana	4. 巻 10
2. 論文標題 Response of Pluripotent Stem Cells to Environmental Stress and Its Application for Directed Differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10020084	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, Tomizawa Kazuhito, Matsushita Masayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Heat Shock-Induced Dephosphorylation of Eukaryotic Elongation Factor 1B L by Protein Phosphatase 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 598578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2020.598578	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 35
2. 論文標題 翻訳伸長因子Eef1dの変異が引き起こすてんかん様発作とその発症メカニズムに関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 92~95
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6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, 小島 理恵, 川部 雅章, 野口 洋文, 白木 伸明, 桑 昭苑, 富澤 一仁
2. 発表標題 網目構造の合成繊維シートから成る培養担体は多能性幹細胞の膀胱系譜への分化を促進する
3. 学会等名 日本組織培養学会 第92回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子 瞳, 貝塚 拓, 富澤 一仁
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の概日リズムの同調刺激に対する反応とそのメカニズムに関する研究
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

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

1. 発表者名 金子 瞳, 貝塚 拓, 富澤 一仁
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の概日リズム特性に関する研究
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 貝塚 拓, 高松 岳矢, 片桐 千秋, 松下 正之
2. 発表標題 熱ストレス応答タンパク質eEF1B Lのリン酸化/脱リン酸化による機能制御
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	NYU Langone Medical Center	Wright State University	