

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15023

研究課題名（和文）翻訳開始因子eIF4A1とグルタミン代謝による協調的な発現制御機構

研究課題名（英文）Cooperative expression regulation by eukaryotic translation initiation factor eIF4A1 and glutamine metabolism

研究代表者

七野 悠一（Shichino, Yuichi）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：40748365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞は外界の変化に応じて翻訳と代謝をダイナミックに制御する。本研究では翻訳開始因子eIF4A1と細胞外グルタミンという別個の要素がポリアミン合成を担うODC1遺伝子の翻訳を協調的に制御するという現象の分子機構を追究することで、未だ不明な点の多い翻訳と代謝の協調的機構の理解を目指した。特異的阻害剤やレポーター遺伝子を用いて、ODC1が原因遺伝子であることを特定し、その遺伝子中の翻訳制御に重要な領域を特定した。さらに、このeIF4A1依存的な制御がアミノ酸全般によるものではなくグルタミン特異的であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリアミンと呼ばれる生体分子は細胞増殖、免疫、老化など様々な生命現象に重要であり、その合成の異常亢進はがん化と関連があると考えられている。そのため、細胞内のポリアミン量を一定に保つべく、律速段階を担うODC1の発現は何重もの制御を受けている。本研究で明らかとなったODC1の翻訳制御機構はポリアミンを必要とする様々な生命現象で重要な働きをもつ可能性があり、がん治療研究への発展も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cells dynamically regulate translation and metabolism in response to environmental cues, but their cooperation remains unclear. To understand the synergetic regulation of translation and metabolism, this study investigated the molecular mechanisms of the cooperative regulation of eukaryotic translation initiation factor eIF4A1 and extracellular glutamine for the translation regulation of ODC1, the rate-limiting enzyme for polyamine synthesis. Using specific inhibitors, ODC1 was identified as the causative gene of this phenomenon. Reporter assays revealed the essential regions for translational regulation in the ODC1 gene. Furthermore, this study demonstrated that this eIF4A1-mediated regulation was not caused by amino acids in general, but specific for glutamine.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳 代謝 翻訳開始 グルタミン 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

細胞は外界の変化を感知すると、自身の遺伝子発現と代謝プロファイルを大きく切り換え、新しい環境に適応する。環境応答のような迅速な発現調節が必要な場合には、転写と転写後プロセシングに必要な時間を省略できる翻訳制御が特に活用されている。翻訳はエネルギー消費の大きい過程であるため、細胞内の代謝と翻訳の協調的な制御はストレスに適応するために必須であると考えられている。しかし、両者の関係性には未だ謎が多い。

翻訳は各段階に多彩な調節があるが、律速である開始過程には特に制御が集中している。真核生物の翻訳開始では、mRNA の 5'末端に結合したリボソームの小サブユニットが塩基配列をスキャンし、開始コドンを探る。mRNA の開始コドンの上流は 5'側非翻訳領域 (UTR) と呼ばれ、その配列と結合するタンパク質は開始効率の決定に重要である。

翻訳開始に必須な因子として eIF4A1 が知られている。この因子は 5' UTR に存在する RNA 二次構造を解消してスキャンを促進していると考えられている。eIF4A1 の詳細な機能を解明するため、ヒト培養細胞 HEK293 の *eIF4A1* ノックアウト (KO) 細胞を作製し、その表現型を解析した。この過程で eIF4A1 KO 細胞が培地中のグルタミン源に強い感受性を示すことに気づいた。グルタミンは生育に必須のアミノ酸であるが培地中で自然分解されるため、安定なグルタミン源としてアラニルグルタミンがしばしば使用されている。野生型ではグルタミンとアラニルグルタミンの間で生育に差がなかったのに対し、eIF4A1 KO 細胞はグルタミン培地で培養すると、アラニルグルタミン培地に比べて顕著な生育遅延を示すことを発見した (図 1A)。この原因として eIF4A1 KO 細胞ではグルタミン周辺の代謝系に異常があるのではないかと考え、メタボローム解析を行った。その結果、eIF4A1 KO 細胞ではプトレシンを始めとするポリアミン量が減少しており、グルタミン培地で培養するとさらに減少することがわかった (図 1B)。

プトレシンなどアミノ基を複数もつ化合物はポリアミンと呼ばれ、細胞増殖、免疫、老化など様々な生命現象に重要である。ポリアミン合成の異常亢進はがん化と関連があると考えられており、細胞内のポリアミン量を一定に保つため、何重もの厳密な制御が存在している。前述の eIF4A1 KO 細胞におけるポリアミン低下は、ポリアミンの産生に必要な遺伝子の翻訳が eIF4A1 の KO によって低下したためであると考えられる。その遺伝子を探るため、eIF4A1 KO 細胞に対して細胞内の翻訳状況を次世代シーケンサーにより網羅的に解析するリボソームプロファイリングを行った。その結果、最も翻訳効率が低下する遺伝子として ODC1 が同定された (図 1C)。ODC1 はオルニチンからプトレシンを合成するために必要な酵素であり、ポリアミン合成の律速段階を担っている。以上から、ODC1 の翻訳が翻訳開始因子 eIF4A1 と細胞外グルタミンという別種の因子によって相乗的に制御されており、両者が失われると ODC1 量が大幅に低下して生育が阻害される、という新規機構の存在が示唆された。しかし、eIF4A1 とグルタミンはどのように ODC1 の翻訳を制御するのか、その分子機構は不明であった。

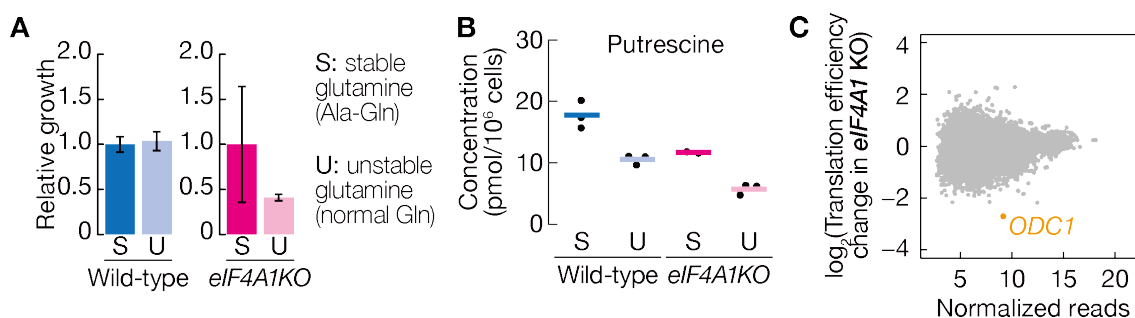


図 1 eIF4A1 KO 細胞のグルタミン依存性およびリボソームプロファイリング結果

2. 研究の目的

本課題では eIF4A1 とグルタミンによる ODC1 の相乗的な翻訳制御の分子機構を明らかにし、翻訳と代謝の協調的調節について深く理解することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、ODC1 遺伝子の発現低下が eIF4A1 KO 細胞のグルタミン培地における生育異常の原因である、という仮説を検証した。ODC1 の機能を阻害すれば野生型細胞でもグルタミン依存的な生育異常が観察されると考え、野生型細胞を特異的阻害剤である DFMO で処理し、生育を測定した。

次に、ODC1 mRNA のどの領域が eIF4A1 依存的な翻訳制御に必要なのかを検討した。候補となる領域としては強固な二次構造と upstream open reading frame (uORF) が考えられた。eIF4A1 は 2 本鎖 RNA をほどく機能を持つため、二次構造が eIF4A1 依存的な制御の鍵となる可能性は高い。また、5' UTR に存在する短い翻訳領域である uORF は、下流 ORF の翻訳を抑制する配列として代表的なものとして知られている。これらの領域が ODC1 mRNA に存在する

か、生物情報学的な解析によって検討した。そして、それら候補領域の寄与をレポーターアッセイにより評価した。ODC1 mRNA の 5' UTR にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたレポーター遺伝子を作製し、5' UTR に様々な変異を導入した。このレポーター遺伝子から試験管内転写反応により mRNA を合成し、それを野生型および eIF4A1 KO 細胞にトランスフェクションにより導入した。そして発光強度から翻訳量を測定した。

また、eIF4A1 とアミノ酸全般の飢餓との関連についても解析を進めた。生育環境からアミノ酸が枯渇すると栄養源制御のマスター制御因子を含む複合体である mTORC1 が不活性化され、翻訳が全体的に低下し、大規模な翻訳プロファイル変動が起こることが知られていた。この翻訳変化が eIF4A1 の KO によってどのように変化するか、mTOR の阻害剤およびアミノ酸を含まない培地を用いて検討した。

4. 研究成果

まず、ODC1 の特異的阻害剤 DFMO で野生型細胞を処理したところ、特定の濃度でグルタミン培地における生育が低下することが判明し、ODC1 遺伝子がグルタミン依存性の原因であることが確かめられた。

次に、ODC1 5' UTR のレポーターアッセイにより eIF4A1 依存的な翻訳制御に必要な領域を決定した。二次構造予測を行うと、ODC1 5' UTR には複数のステムループ構造が予測された (図 2A)。また、リボソームプロファイリングのデータを再解析したところ、ODC1 の 5' UTR の一部にリードが蓄積した部分が存在し、その領域の翻訳が示唆された (図 2B)。さら

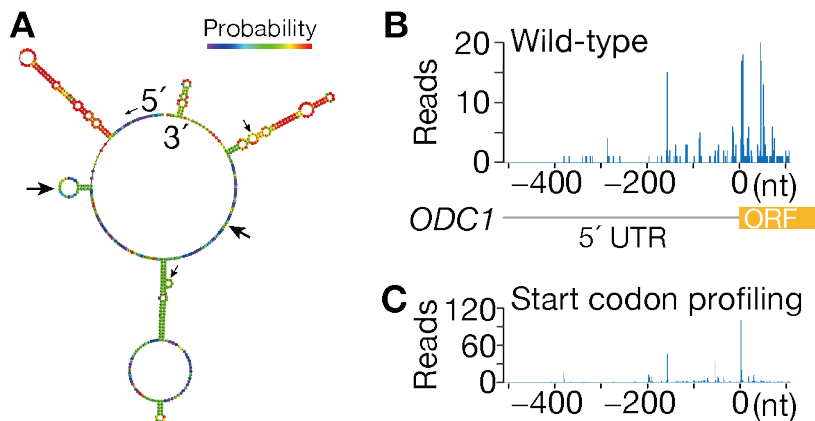


図 2 ODC1 における二次構造と uORF の位置の予測結果

に、開始コドン上にあるリボソームのみを固定する薬剤を用いたリボソームプロファイリングのデータを解析すると、複数の翻訳開始点が 5' UTR 中に存在することがわかった (図 2C)。以上から、5' UTR 中に二次構造と uORF が存在し、翻訳制御が行われている可能性が示唆された。

ODC1 5' UTR を含むレポーター遺伝子に対し、これら候補領域の変異を導入してレポーターアッセイを実施した。二次構造を作ることが示唆されている領域を欠損させたところ、野生型細胞において顕著な翻訳上昇がみられた。また、uORF の開始コドンに変異を導入すると、この場合も翻訳が上昇した。よって、これら両方の要素が ODC1 の翻訳に対して抑制的に働いていることがわかった。さらに eIF4A1 KO 細胞では二次構造や uORF の変異による翻訳上昇の程度が少なく、翻訳抑制における eIF4A1 依存性が確かめられた。

アミノ酸飢餓全般に対する影響についても検討した。まず eIF4A1 KO 細胞の生育が mTOR 阻害剤に対して耐性を示すことが明らかとなった。この条件では翻訳が全般的に低下するが、特に 5' 末端にピリミジンを多くもつ mRNA (TOP mRNA と呼ばれる) の翻訳が著しく低下することが知られている。そこで TOP mRNA のレポーター遺伝子を用いて翻訳低下をアッセイしたところ、mTOR 阻害剤だけでなくアミノ酸全般を枯渇させた培地でも eIF4A1 KO 細胞において TOP mRNA の翻訳低下が減弱する様子が見られた。よって、不安定グルタミンの添加でなくアミノ酸全般を枯渇させた場合は、翻訳低下と細胞生育低下が eIF4A1 KO でむしろ穏やかになることが示唆された。すなわち、eIF4A1 KO 細胞の生育低下という現象はグルタミン特異的な現象であるといえる。

eIF4A1 と細胞外グルタミンが協調的に ODC1 翻訳を制御するという新規の機構は、翻訳と代謝制御のシナジーの理解に大きく貢献すると期待される。今後はこの分子機構をさらに追究し、様々な細胞の生育における本機構の重要性を明らかにすることで、さらに理解を深めていきたいと考えている。なお、グルタミン依存的な ODC1 翻訳制御の分子機構を理解するため、ODC1 mRNA に結合する因子群の変化を網羅的に同定する実験の準備を進めており、この完遂によりさらなる発展が見込まれる。

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 2件 / うちオープンアクセス 9件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Yamashita Akira, Shichino Yuichi, Fujii Kazuki, Koshidaka Yumie, Adachi Mayumi, Sasagawa Eri, Mito Mari, Nakagawa Shinichi, Iwasaki Shintaro, Takao Keizo, Shiina Nobuyuki | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 ILF3 prion-like domain regulates gene expression and fear memory under chronic stress | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 106229 ~ 106229 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106229 | 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 Miyake Takahito, Inoue Yuichi, Shao Xinyan, Seta Takehito, Aoki Yuto, Nguyen Pham Khanh Tien, Shichino Yuichi, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Ikawa Masahito, Yamaguchi Yoshiaki, Okamura Hitoshi, Iwasaki Shintaro, Doi Masao | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 112157 ~ 112157 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112157 | 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 Chen Mingming, Kumakura Naoyoshi, Saito Hironori, Muller Ryan, Nishimoto Madoka, Mito Mari, Gan Pamela, Ingolia Nicholas T, Shirasu Ken, Ito Takuhiro, Shichino Yuichi, Iwasaki Shintaro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 A parasitic fungus employs mutated eIF4A to survive on rocaglate-synthesizing Aglaia plants | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e81302 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.81302 | 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 Zhao Tianyu, Chida Asaka, Shichino Yuichi, Choi Dongwoo, Mizunuma Masaki, Iwasaki Shintaro, Ohya Yoshikazu | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Multifarious Translational Regulation during Replicative Aging in Yeast | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Fungi | 6. 最初と最後の頁 938 ~ 938 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof8090938 | 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 Shichino Yuichi、Iwasaki Shintaro | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Compounds for selective translational inhibition | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 102158 ~ 102158 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2022.102158 | 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 Mito Mari、Shichino Yuichi、Iwasaki Shintaro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Thor-Ribo-Seq: ribosome profiling tailored for low input with RNA-dependent RNA amplification | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 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) 10.1101/2023.01.15.524129 | 査読の有無 無 |
| 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 Wakigawa Taisei、Kimura Yusuke、Mito Mari、Tsubaki Toshiya、Saito Hironori、Khan Abdul Haseeb、Yamamori Tohru、Yamazaki Tomokazu、Higashibata Akira、Tsuboi Tatsuhisa、Saito Taku、Higashitani Atsushi、Shichino Yuichi、Iwasaki Shintaro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Gravitational and mechanical forces drive mitochondrial translation through the cell adhesion-FAK axis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 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) 10.1101/2023.01.18.524628 | 査読の有無 無 |
| 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 Wu Quan、Shichino Yuichi、Abe Takaya、Suetsugu Taeko、Omori Ayaka、Kiyonari Hiroshi、Iwasaki Shintaro、Matsuzaki Fumio | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Selective translation of epigenetic modifiers affects the temporal pattern and differentiation of neural stem cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 470 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28097-y | 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 Kashiwagi Kazuhiro, Shichino Yuichi, Osaki Tatsuya, Sakamoto Ayako, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Mito Mari, Weber Friedemann, Ikeuchi Yoshiho, Iwasaki Shintaro, Ito Takuhiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 eIF2B-capturing viral protein NSs suppresses the integrated stress response | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 7102 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27337-x | 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 Ichihara Kazuya, Matsumoto Akinobu, Nishida Hiroshi, Kito Yuki, Shimizu Hideyuki, Shichino Yuichi, Iwasaki Shintaro, Imami Koshi, Ishihama Yasushi, Nakayama Keiichi I | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 7298 ~ 7317 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab549 | 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 - |

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuichi Shichino |
| 2. 発表標題 Novel repressive role of eIF4A1 during mTORC1 inhibition |
| 3. 学会等名 第60回生物物理学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 七野悠一, 水戸麻理, 柏木一宏, 高橋真理, 伊藤拓宏, Nicholas T. Ingolia, 岩崎信太郎 |
| 2. 発表標題 翻訳開始因子eIF4A1はLARP1による翻訳抑制を促進する |
| 3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| | |
|---------|---|
| 1. 発表者名 | Yuichi Shichino, Mari Mito, Kazuhiro Kashiwagi, Mari Takahashi, Takuhiro Ito, Nicholas T. Ingolia, Shintaro Iwasaki |
| 2. 発表標題 | eIF4A1 facilitates LARP1-mediated translation repression during mTORC1 inhibition |
| 3. 学会等名 | 第22回日本RNA学会年会 |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| | |
|---------|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 | 七野 悠一、岩崎信太郎 |
| 2. 発表標題 | 翻訳開始因子eIF4A1とグルタミン代謝による協調的な発現制御機構 |
| 3. 学会等名 | 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 | 2021年 |

| | |
|---------|---|
| 1. 発表者名 | Yuichi Shichino, Mari Mito, Nicholas T. Ingolia, Shintaro Iwasaki |
| 2. 発表標題 | A specific eIF4A paralog facilitates LARP1-mediated translation repression during mTORC1 inhibition |
| 3. 学会等名 | EMBL Conference: Protein Synthesis and Translational Control (国際学会) |
| 4. 発表年 | 2021年 |

| | |
|---------|---|
| 1. 発表者名 | Yuichi Shichino, Mari Mito, Nicholas T. Ingolia, Shintaro Iwasaki |
| 2. 発表標題 | A specific eIF4A paralog facilitates LARP1-mediated translation repression during mTORC1 inhibition |
| 3. 学会等名 | RNA 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 | 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuichi Shichino, Mari Mito, Kazuhiro Kashiwagi, Mari Takahashi, Takuhiro Ito, Nicholas T. Ingolia, Shintaro Iwasaki |
| 2. 発表標題 eIF4A1 facilitates LARP1-mediated translation repression during mTORC1 inhibition |
| 3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2021 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>プリオン様ドメインがストレス下でもマウスの不快記憶形成を可能にすることを発見 https://www.riken.jp/press/2023/20230330_2/index.html 全身の体内リズムを調和させるRNA配列の発見 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-03-07-0 翻訳阻害剤を介した、植物と糸状菌間の生存競争 https://www.riken.jp/press/2023/20230228_2/ ウイルスによる細胞のストレス応答抑制機構の解明 https://www.riken.jp/press/2021/20211207_2/index.html 非典型的開始コドンからの翻訳開始機構を解明 https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/627/</p> |
|--|

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 | University of California, Berkeley | | |
| ドイツ | Justus-Liebig University | | |