

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790217

研究課題名(和文) eEF1B $\Delta$ Lによるポリグルタミン蛋白質凝集の制御

研究課題名(英文) Control of polyglutamine protein aggregation by eEF1B $\Delta$ L

研究代表者

貝塚 拓 (Kaitsuka, Taku)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00435926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らはこれまでに、脳特異的に発現するeEF1B $\Delta$ Lが新規のストレス応答性の転写因子であることを発見している。本研究ではeEF1B $\Delta$ Lのポリグルタミン病での役割を明らかにすることを目的として研究を進めたが、eEF1B $\Delta$ Lがポリグルタミン蛋白質凝集に關与する明確な根拠は得られなかった。一方で、eEF1B $\Delta$ L欠損マウスでその表現型を解析したところ、欠損マウスは正常に発育するが学習行動に障害が出るのがわかり、eEF1B $\Delta$ Lは成体での学習・記憶機能を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In previous study, we have found that eEF1B $\Delta$ L is a new brain-specific transcriptional factor involved in stress responses. In this study, to investigate the role of eEF1B $\Delta$ L in the pathophysiology of polyglutamine diseases, several experiments were done. However, obvious evidence that eEF1B $\Delta$ L influences on polyglutamine protein aggregation has not been obtained. Then the phenotype of eEF1B $\Delta$ L knockout mice was examined. These mice developed normally, but showed deficits in learning behavior. Therefore, it is suggested that eEF1B $\Delta$ L is involved in the brain function especially learning and memory in the adulthood.

研究分野：分子生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：選択的スプライシング ポリグルタミン病 行動解析 学習・記憶

## 1. 研究開始当初の背景

研究者らはこれまでに、蛋白質翻訳伸長因子である eEF1B $\delta$  (eukaryotic elongation factor 1B $\delta$ ) が熱ストレスに応答した選択的スプライシングにより既存のアイソフォームである eEF1B $\delta$ 1 と長鎖のアイソフォームである eEF1B $\delta$ L を発現することを発見している。興味深いことに、eEF1B $\delta$ L は蛋白質翻訳因子である eEF1B $\delta$ 1 とは機能が全く異なり、シャペロン蛋白質などのストレス応答遺伝子の転写を誘導する転写制御因子であることがわかっている。さらに、eEF1B $\delta$ L は脳に豊富に存在していることを見いだしている。

生物は選択的スプライシングによって、多様な RNA バリエントを発現する。近年、哺乳類の脳でも極めて多様な RNA バリエントが存在することが報告されており、選択的スプライシングは神経系の発達および神経変性疾患に関与する可能性が示唆されている。

ポリグルタミン病やアルツハイマー病を含む神経変性疾患では、異常蛋白質のミスフォールディングにより特定の蛋白質が凝集した封入体を形成する。シャペロン蛋白質の発現は、ストレス環境下での蛋白質変性・凝集から細胞を保護する働きがあり、蛋白質凝集を伴う疾患に蛋白質の品質管理機構として重要な役割をもつ。事実、シャペロン蛋白質である HSP70 はポリグルタミン凝集体を改善し、細胞毒性を抑制することが示されている。

以上のことから、eEF1B $\delta$ L はシャペロン蛋白質の転写調節を介しポリグルタミン病などの疾患に関与するのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では eEF1B $\delta$ L の選択的スプライシングの制御機構とポリグルタミン病での役割を明らかにすることを目的として研究を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) 選択的スプライシングの制御機構

選択的スプライシングはスプライシング調節因子と呼ばれる RNA 結合蛋白質により制御されている。通常、スプライシングを受けるエクソンとその前後 300 bp 付近にスプライシング調節因子が結合するコンセンサス配列が存在している。eEF1B $\delta$  遺伝子でエクソンスキッピングが起こる exonIII と前後 300 bp のイントロン領域には FOX、NOVA や MBNL1 などが結合するコンセンサス配列が含まれている。そこで、上記スプライシング調節因子の発現プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクトし、eEF1B $\delta$ 1 と eEF1B $\delta$ L の発現量の変化を RT-PCR 法により解析し、ど

の調節因子が exonIII を含むスプライシングに重要か検討する。

さらに siRNA によるノックダウン系でも同様にスプライシングの変化を RT-PCR 法により解析する。

### (2) ポリグルタミン病での役割

103 のポリグルタミンをもつ 103Q プラスミドを Addgene より入手し、103Q-EGFP 発現プラスミドを常法に従い構築する。103Q-EGFP プラスミドを HEK293 細胞または初代神経細胞に強制発現させ、eEF1B $\delta$ 1 および eEF1B $\delta$ L の発現量を RT-PCR 法により解析する。さらに eEF1B $\delta$ L を過剰発現もしくはノックダウンさせたときの 103Q 蛋白質凝集について検討する。

### (3) eEF1B $\delta$ L 欠損マウスの表現型解析

eEF1B $\delta$ L 欠損マウスの表現型を以下の行動試験により評価する。

- ① オープンフィールド試験
- ② 高架式十字迷路
- ③ 8 方向放射状迷路
- ④ Y 字迷路
- ⑤ テールサスペンション試験
- ⑥ 恐怖条件付け試験

## 4. 研究成果

### (1) 選択的スプライシングの制御機構

HEK293 細胞に MBNL1 および MBNL2 を過剰発現あるいはノックダウンさせても eEF1B $\delta$ L の発現に有意な差は認められなかった。(図 1、図 2)

図1 MBNL過剰発現のeEF1B $\delta$ L発現レベルに対する影響

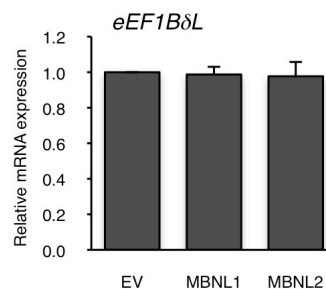
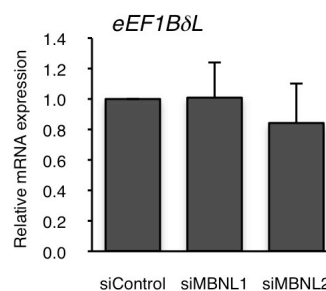


図2 MBNLノックダウンのeEF1B $\delta$ L発現レベルに対する影響



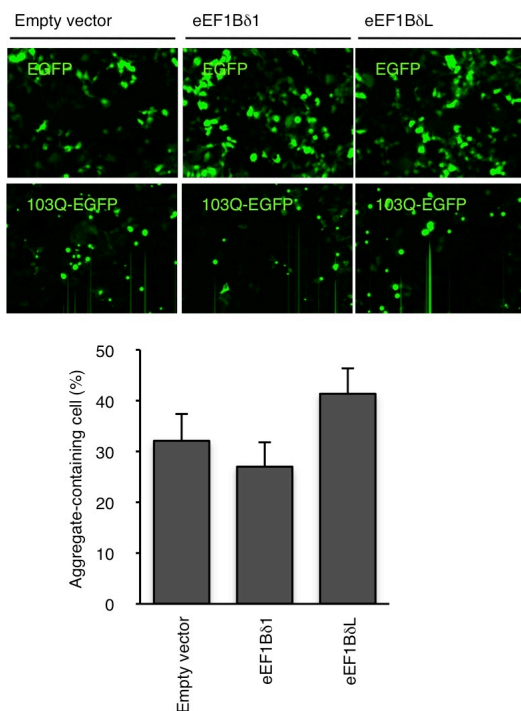
さらに FOX1/2 および NOVA1/2 を変動させても有意差は認められなかった。以上のこと

から eEF1B  $\delta$  遺伝子のスプライシングには他の調節因子が関与する可能性が示唆された。現在までに約 40 のスプライシング調節因子がわかっているが、今後は全ての遺伝子のノックダウン系を用いて網羅的に解析する必要がある。

### (2) ポリグルタミン蛋白質凝集

HEK293 細胞に発現させた 103Q-EGFP は蛋白質凝集を生ずる。これに eEF1  $\delta$  L を発現させることで蛋白質凝集の抑制を期待したが、有意な差は認められなかった (図 3)。

図3 eEF1B  $\delta$  L 過剰発現のポリグルタミン蛋白質凝集に対する影響



さらに 103Q-EGFP の蛋白質凝集による eEF1B  $\delta$  L の発現についても解析したが有意差は認められなかった。

以上のことから、本研究では eEF1B  $\delta$  L がポリグルタミン蛋白質凝集に関与する根拠は得られなかった。

### (3) eEF1B $\delta$ L 欠損マウスの表現型解析

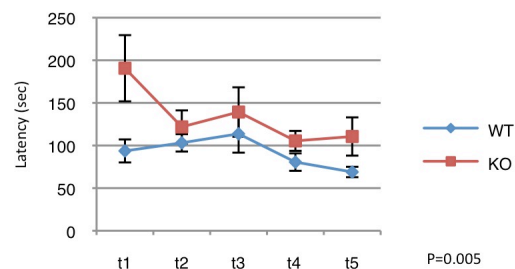
eEF1B  $\delta$  L は脳に豊富に存在することから、欠損マウスで不安・情動・学習・うつ様行動などを評価できる行動解析を行なった (表 1)。オープンフィールド試験や高架式十字迷路では野生型と欠損マウスで有意な差はみられなかったことから、一般的な活動量や不安・情動行動には影響しない可能性が示唆された。一方で、8 方向放射状迷路において欠損マウスは野生型マウスより作業効率があり有意に劣ることがわかった (図 4)。このことから eEF1B  $\delta$  L は学習・記憶に関与することが示唆された。さらに、恐怖条件付け試験の Cued テストにおいて欠損マウスは音に対して過敏に反応する傾向がみられた。恐怖条

件付け試験の体験はマウスにおいて心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 様の症状を引き起こすなどが報告されており、今後さらなる検討が必要である。

表1 eEF1B  $\delta$  L 欠損マウスの表現型解析

Tasks	Phenotype
Body weight	→
Open-field	→
Elevated plus maze	→
8-arm radial maze	↓ (Latency)
Y-maze	→
Tail suspension	→
Fear conditioning	↑ (Cued)

図4 8方向放射状迷路



### (4) eEF1B $\delta$ L 結合蛋白質の同定

研究の過程で熱ストレスに応答して eEF1B  $\delta$  L と結合する蛋白質を見いだした。ヒストン修飾に関与する核内蛋白質で eEF1B  $\delta$  L と同様に脳に高発現していた。eEF1B  $\delta$  L と協同してシャペロン蛋白質の転写を制御する可能性があり非常に興味深い。

### (5) eEF1B $\delta$ L の脱リン酸化による活性制御機構

研究計画には記してないが、研究の過程で eEF1B  $\delta$  L は熱ストレスに応答した脱リン酸化によりその転写活性が制御されることを見いだした。

以上、本研究は eEF1B  $\delta$  L が成体での学習・記憶機能を制御する可能性を示唆するものであり、認知性疾患における eEF1B  $\delta$  L を標的とした治療法の開発に繋がる可能性がある。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Hakim, F., Kaitsuka, T., Mohd Raed, J.,

Wei, F.Y., Shiraki, N., Akagi, T., Yokota, T., Kume, S., and Tomizawa, K. High Oxygen Condition Facilitates the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells into Pancreatic Progenitors and Insulin-Producing Cells. *J. Biol. Chem.*, 289, 9623-9638, 2014. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M113.524363.

- ② Kaitsuka, T., Noguchi, H., Shiraki, N., Kubo, T., Wei, F.Y., Hakim, F., Kume, S., and Tomizawa, K., Generation of functional insulin-producing cells from mouse ES cells through 804G cell-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors. *Stem Cells Transl. Med.*, 3, 114-27. 査読有  
DOI: 10.5966/sctm.2013-0075.
- ③ Ueda, Y., Wei, F.Y., Hide, T., Michiue, H., Takayama, K., Kaitsuka, T., Nakamura, H., Makino, K., Kuratsu, J., Futaki, S., Tomizawa, K., Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating d-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus. *Biomaterials*, 33, 9061-9069, 2012. 査読有  
DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.09.003.

[学会発表] (計 3件)

- ① 大塚和華子、貝塚拓、久保拓也、魏范研、富澤一仁、エリスロポエチンはマウス ES 細胞からインスリン産生細胞への分化を促進する、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日～18 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島鹿児島市)
- ② 水民 敬浩、貝塚拓、羅 歆、魏 范研、宋 文杰、富澤 一仁、チャンネルロドプシンを利用した光応答性のインスリン分泌誘導技術の開発、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日～18 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島鹿児島市)
- ③ Hakim Farzana、貝塚拓、Mohd. Raed Jamiruddin、魏 范研、富澤 一仁、高酸素条件下での培養はヒト iPS 細胞から膵臓前駆細胞およびインスリン産生細胞への分化に促進的に働く、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日～18 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島鹿児島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貝塚 拓 (KAITSUKA, Taku)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：00435926