

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08616

研究課題名(和文) リボソーム結合性因子GCN1L1による翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of translation regulation by a ribosome-binding factor GCN1L1

研究代表者

山崎 博未 (Yamazaki, Hiromi)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：20720915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞はアミノ酸飢餓に晒されるとGCN2が翻訳開始因子eIF2をリン酸化することでタンパク質の翻訳を抑制すると同時に、ストレス応答転写因子ATF4の翻訳を活性化する。酵母GCN1は、アミノ酸飢餓時にGCN2の活性化に必要であることが分かっていたが哺乳類におけるGCN1の機能は明らかとなっていなかった。我々は、GCN1のGCN2結合ドメインを欠失したGcn1変異マウスを作出し、詳細な解析を行った。それにより、哺乳類GCN1は、GCN2によるアミノ酸飢餓応答に必要なだけでなくGCN2非依存性の細胞増殖制御にも関わ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

Gcn1変異マウスは、胎生期における成長遅延と出生直後の呼吸不全による致死性を示したが、Gcn2欠失マウスは正常に出生することが報告されている。Gcn1変異マウス由来の線維芽細胞は細胞増殖の低下とG2/M期細胞の増加を示すことから、GCN1はGCN2非依存性の細胞増殖制御を行うことで正常な胚発生に寄与することを遺伝学的に証明することができた。またGcn1変異マウスは、胎仔期・出生直後に重篤な表現型を示すことから、奇形、胎子の発育不全、新生児呼吸窮迫症候群のモデルマウスとしての活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The stress response at the translational level is an energetically cost-saving mechanism because translation consumes a considerable amount of energy. Upon exposure to stresses such as that from amino acid starvation (AAS), the translational initiation factor eIF2 is phosphorylated, which represses general translation. At the same time, eIF2 phosphorylation increases the selective translation of cytoprotective proteins, such as ATF4, that transcriptionally activate the stress-response genes. Among four eIF2 kinases, GCN2 responds to AAS and phosphorylates eIF2. In yeast, Gcn1 is required for Gcn2 activation by AAS, but the roles of GCN1 in mammals remain to be established. Here, we show that GCN1 not only regulates the eIF2-mediated stress response but also the cell cycle and cell proliferation in a GCN2-independent manner. Taking these findings together, we propose that GCN1 integrates cellular information and coordinates the cellular stress response to enhance viability.

研究分野：分子生物学

キーワード：アミノ酸飢餓 翻訳制御 ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質キナーゼ GCN2 はアミノ酸飢餓により活性化し、翻訳開始因子 eIF2 $\alpha$  のリン酸化を介した翻訳制御によるストレス応答を行う。リン酸化 eIF2 $\alpha$  は、5'キャップ構造依存的な翻訳抑制を行うことでエネルギー節約をすると同時に、アミノ酸合成酵素・アミノ酸輸送体などを統一的に制御する転写因子 ATF4 の翻訳を活性化させることで細胞の生存・維持を行う。酵母 GCN1 はアミノ酸飢餓によって増加する非アミノアシル化 tRNA を認識するセンサータンパク質であり、GCN2 の活性化に必要であることが報告されているが、哺乳動物 GCN1 の機能は分かっていなかった。GCN1 は RWD 結合ドメイン(RWDBD)を有しており、本ドメインを介して GCN2、IMPACT、DFRP2/DRG2 と結合する。そこで我々は RWDBD 欠失マウス (*Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> マウス) の作製・解析を行った。*Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> マウスは、胎生期における成長遅延と出生直後に呼吸不全による致死を示した。一方、*Gcn2* 欠失 (KO) マウスは、摂食行動、記憶形成、免疫寛容の異常を示すが、出生前後における致死性を示さず正常に出生・発育する。*Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> マウスは、*Gcn2* KO マウスよりも重篤な表現型を示すことから、GCN1 は GCN2 に依存しない機能も有することが予想された。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、GCN2 非依存的な GCN1 の新しい機能を見出すことにより GCN1 が胎生期・出生直後の発生にどのように寄与するのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

*Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> マウスより胎仔由来線維芽細胞 (MEF) を樹立し、GCN1 のアミノ酸飢餓等種々のストレス応答における役割、細胞増殖・細胞死における役割を検討した。*Gcn2* KO MEF 細胞についても同様の解析を行うことで、GCN2 依存性の検討も行った。また第2エクソンを欠失させた、GCN1 機能タンパク質を発現しない *Gcn1* 欠失マウスも作成し、*Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> マウスとの表現型比較を行った。

## 4. 研究成果

(1) *Gcn1* KO マウスは重篤な成長遅延と致死性を示す。

*Gcn1* KO マウスは *Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> マウスと同様に出生しなかったため、胎生期における解析を行った。その結果、*Gcn1* KO マウスは *Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> マウスよりも重篤な成長遅延を示し、胎生 15.5 日頃までに致死となることが明らかとなった。これらの結果は、GCN1 が RWDBD 以外のドメインを介した機能の存在を示唆するが、詳細な機構については結合因子の同定などにより今後の課題とする。

(2) *Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> MEF 細胞はアミノ酸飢餓応答・UV 照射応答の低下を示す。

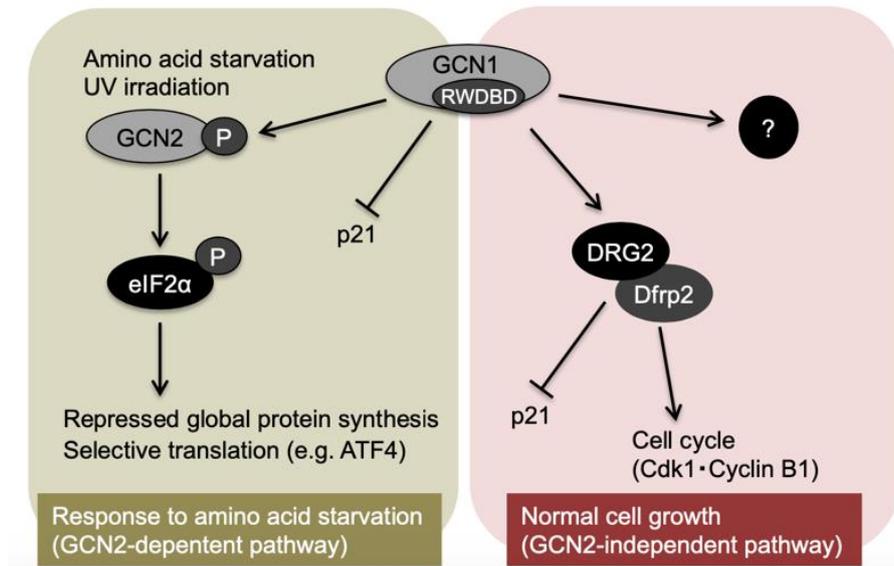
野生型 MEF 細胞を各種アミノ酸飢餓培地により培養すると、GCN2・eIF2 $\alpha$  のリン酸化、ATF4 の核蓄積と標的遺伝子の発現誘導を示すが、*Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> MEF 細胞においてはアミノ酸飢餓応答が減弱化していたことから、哺乳類 GCN1 も酵母と同様にアミノ酸飢餓応答に必須であることが明らかとなった。また、UV 照射は GCN2 依存的な eIF2 $\alpha$  リン酸化を誘導することが知られており、*Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> MEF 細胞に対して UV 照射を行ったところ、GCN2 および eIF2 $\alpha$  のリン酸化が減弱化していた。以上の結果より、GCN1 は UV 照射応答にも関わることを示された。また哺乳類で同定されている GCN2 以外の eIF2 $\alpha$  リン酸化酵素 PKR・PERK・HRI の誘導剤を *Gcn1* <sup>$\Delta$ RWDBD</sup> MEF 細胞および *Gcn2* KO MEF 細胞に処理し GCN1・GCN2 の機能も検討したが、いずれの誘導剤による eIF2 $\alpha$  のリン酸化にも GCN1・GCN2 は必須ではないことが示された。このことより GCN1 は

GCN2によるeIF2 $\alpha$ リン酸化に必要であるがPKR・PERK・HRIによるeIF2 $\alpha$ リン酸化には必要ではないことを示している。

(3) *Gcn1<sup>ARWDBD</sup>* MEF細胞は細胞増殖の低下とG2/M期細胞の増加を示す。

*Gcn1<sup>ARWDBD</sup>* 胎仔が成長遅延を示したことから、GCN1が細胞増殖に関わる可能性について検討した。*Gcn1<sup>ARWDBD</sup>* MEF細胞は、アポトーシスマーカーである切断型PARPとCaspase-3発現については野生型MEFと同程度あったが、細胞増殖の低下を示した。そこでMEF細胞のDNA含量測定により細胞周期を解析したところ、G2/M期の細胞が増加していた。さらに、*Gcn1<sup>ARWDBD</sup>* MEF細胞においてはG2/M進行に関わるCdk1、Cyclin B1の発現低下と、サイクリン・Cdk1複合体阻害に働くp21の発現増加を示したことから、これらの細胞周期関連因子の発現変動によりG2/Mアレストが起こり、細胞増殖の低下が起きているものと考えられた。一方、*Gcn2* KO MEF細胞は、p21の発現増加は示すものの、細胞増殖の低下、G2/M期細胞の増加、Cdk1・Cyclin B1の発現低下を示さなかった。以上のことから、GCN1ではGCN2非依存性に細胞周期を制御していることが示された。

GCN1結合因子DRG2のノックダウン細胞は*Gcn1<sup>ARWDBD</sup>* MEF細胞と酷似した表現型を示すことから、GCN1とDRG2が協調的に細胞増殖制御に関与する可能性が考えられる。以上のことから、GCN1はGCN2を介したアミノ酸飢餓応答のみならず、GCN2経路非依存性に細胞増殖制御を行うことで正常な胚発生に寄与することを新規に見出した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamazaki H, Kasai S, Mimura J, Ye P, Inose-Maruyama A, Tanji K, Wakabayashi K, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Sato T, Ozaki T, Cavener DR, Yamamoto M, Itoh K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Ribosome binding protein GCN1 regulates the cell cycle and cell proliferation and is essential for the embryonic development of mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1008693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008693.	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 Tsushima M, Liu J, Hirao W, Yamazaki H, Tomita H, Itoh K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Emerging evidence for crosstalk between Nrf2 and mitochondria in physiological homeostasis and in heart disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch Pharm Res.	6. 最初と最後の頁 286-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12272-019-01188-z.	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 Kasai S, Yamazaki H, Tanji K, Engler MJ, Matsumiya T, Itoh K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.18-37.	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 Mimura J, Inose-Maruyama A, Taniuchi S, Kosaka K, Yoshida H, Yamazaki H, Kasai S, Harada N, Kaufman RJ, Oyadomari S, Itoh K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Concomitant Nrf2- and ATF4-activation by Carnosic Acid Cooperatively Induces Expression of Cytoprotective Genes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20071706.	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 Imaizumi T, Satake U, Miyashita R, Kawaguchi S, Matsumiya T, Seya K, Ding J, Tanaka H.	4. 巻 337
2. 論文標題 Interferon-induced transmembrane protein 1 and Myxovirus resistance protein 1 are induced by polyinosinic-polycytidylic acid in cultured hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 577047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2019.577047.	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 Kawaguchi S, Sakuraba H, Haga T, Matsumiya T, Seya K, Endo T, Sawada N, Iino C, Kikuchi H, Hiraga H, Fukuda S, Imaizumi T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Positively Modulates TNF- $\alpha$ -Induced CXCL10 Expression in Cultured HuH-7 and HLE Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation.	6. 最初と最後の頁 2095-2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-01073-3.	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 -

1. 著者名 Imaizumi T, Sassa N, Kawaguchi S, Matsumiya T, Yoshida H, Seya K, Shiratori T, Hirono K, Tanaka H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Interferon-stimulated gene 60 (ISG60) constitutes a negative feedback loop in the downstream of TLR3 signaling in hCMEC/D3 cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 16-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2018.08.016.	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 Kimura S, Matsumiya T, Shiba Y, Nakanishi M, Hayakari R, Kawaguchi S, Yoshida H, Imaizumi T.	4. 巻 201
2. 論文標題 The Essential Role of Double-Stranded RNA-Dependent Antiviral Signaling in the Degradation of Nonself Single-Stranded RNA in Nonimmune Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 1044-1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800456.	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 Seino S, Kimoto T, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Hayakari R, Seya K, Kawaguchi S, Tsuruga K, Tanaka H, Imaizumi T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Gnetin C, a resveratrol dimer, reduces amyloid- 1-42 (A 42) production and ameliorates A 42-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 105-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.39.105.	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 Imaizumi T, Hayakari R, Watanabe S, Aizawa T, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Kawaguchi S, Tanaka H.	4. 巻 42
2. 論文標題 Cylindromatosis (CYLD), a Deubiquitinase, Attenuates Inflammatory Signaling Pathways by Activating Toll-Like Receptor 3 in Human Mesangial Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kidney Blood Press Res.	6. 最初と最後の頁 942-950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000485084.	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 Fukui K, Yachi K, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Hayakari R, Tsuruga K, Tanaka H, Imaizumi T.	4. 巻 124
2. 論文標題 Rebamipide reduces amyloid- 1-42 (A 42) production and ameliorates A 43-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 40-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.05.005.	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 Imaizumi T, Hayakari R, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Watanabe S, Kawaguchi S, Tanaka H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Chloroquine attenuates TLR3/IFN- signaling in cultured normal human mesangial cells: A possible protective effect against renal damage in lupus nephritis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1004-1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1289646.	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 Shirai K, Shimada T, Yoshida H, Hayakari R, Matsumiya T, Tanji K, Murakami M, Tanaka H, Imaizumi T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Interferon (IFN)-induced protein 35 (IFI35) negatively regulates IFN- $\gamma$ -phosphorylated STAT1-RIG-I-CXCL10/CCL5 axis in U373MG astrocytoma cells treated with polyinosinic-polycytidylic acid.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 60-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2017.01.018.	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 山崎博未, Engler Mate Janos, 伊東健	4. 巻 38
2. 論文標題 Nrf2の抗老化因子としての役割	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 循環制御	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) 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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 山崎博未
2. 発表標題 リボソーム結合因子GCN1L1によるストレス応答と細胞周期制御.
3. 学会等名 レドックス・ライフィノベーション第170委員会20周年記念若手シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Liu, Shuya Kasai, Hiromi Yamazaki, Junsei Mimura, Ken Itoh.
2. 発表標題 Body weight loss in postnatal GCN1L1 knockout mice.
3. 学会等名 第1回弘前メディカルサイエンスフォーラム 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎博未, 葛西秋宅, 三村純正, 叶鵬, 猪瀬-丸山 敦史, 伊東健.
2. 発表標題 リボソーム結合因子GCN1L1は細胞増殖制御および胎仔発生に必須である.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Yamazaki, Shuya Kasai, Junsei Mimura, Peng Ye, Atsushi Inose-Maruyama, Tsubasa Sato, Ken Itoh.
2. 発表標題 GCN1L1, a mouse homologue of eIF-2-alpha kinase activator GCN1, regulates cell cycle and cell proliferation and is essential for embryonic development in mice.
3. 学会等名 The Environmental Response V (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 博未、叶 鵬、葛西 秋宅、三村 純正、猪瀬-丸山 敦史、伊東 健
2. 発表標題 リボソーム結合因子GCN1L1による細胞増殖制御機構
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiromi Yamazaki, Shuya Kasai, Junsei Mimura, Peng Ye, Atsushi Inose Maruyama, Ken Itoh
2. 発表標題 Ribosome binding protein GCN1L1 controls cell cycle and is essential for embryonic development
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuya Kasai, Hiromi Yamazaki, Junsei Mimura, Peng Ye, Atsushi Inose-Maruyama, Ken Itoh
2. 発表標題 Ribosome binding protein GCN1L1 knockout mice exhibit embryonic lethality with growth retardation and reduced cell proliferation
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 博未、叶 鵬、葛西 秋宅、三村 純正、猪瀬-丸山 敦史、伊東 健
2. 発表標題 マウス発生におけるリボソーム結合性因子GCN1L1の役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ,神戸ポートアイランド
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎 博未、葛西 秋宅、三村 純正、伊東 健
2. 発表標題 リボソーム結合因子GCN1L1によるDRG2を介した細胞増殖制御機構
3. 学会等名 レドックス研究会「生命のエネルギー獲得戦略における多様性と共通原理の理解にむけて」,岡崎カンファレンスセンター
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiromi Yamazaki, Ken Itoh.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 30
3. 書名 Nrf2 and its Modulation in Inflammation.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

