

令和 4 年 4 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22616

研究課題名(和文) リボソームヘテロジェネイティによる開始コドン選択制御の解析

研究課題名(英文) Protein translation regulated by ribosome heterogeneity

研究代表者

細金 正樹 (Hosogane, Masaki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30734347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞種によらずに均一な機能を持つと考えられてきたリボソームは、その構成因子を変化させることで細胞種特異的なリボソームとして働くことが明らかになってきた。そこで、本研究では開始コドンの認識に関わる開始因子(eIF)ならびに翻訳伸長を制御する伸長因子(eEF)に着目し、それらの分子の異なる組織間のヘテロジェネイティの生理的な意義、生じるメカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究の遺伝子発現解析によってeIFよりもeEFの方が組織間の発現変動が大きいことが明らかとなり、特に発現差が顕著であった伸長因子eEF1A2遺伝子の発現制御を担う候補遺伝子を13個同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の報告でeEF1A2の遺伝子変異が自閉症や拡張性心筋症の原因遺伝子であることが示されている。その一方で、eEF1A2の翻訳調節への意義、eEF1A2の組織間のヘテロジェネイティが生じるメカニズムが不明である。本研究によりeEF1A2の神経系での発現制御を担う候補分子が同定された。これらの分子を詳細に解析することで神経系におけるリボソームの働きの違いを作り出す仕組みや、その破綻による疾患発症のメカニズムを解明する一助になることが期待される。また、eEF1A2自体の機能と疾患発症の関連にも不明な点が多く、eEF1A2の機能解析を行う共同プロジェクトを始動するなど新しい研究への波及効果があった。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that tissue specific function of ribosome is in part regulated by tissue specific expression of ribosome components and accessory proteins. Among them, eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 2 (eEF1A2) mutant mouse demonstrates severe phenotype in neurological development and is dead before maturation. This phenotype is explained by different expression pattern of its isoforms. eEF1A1 expresses ubiquitously among tissues, whereas eEF1A2 expresses only in brain, muscles and lymphoid tissues. To date, regulatory mechanisms of eEF1A2 have not been reported. To examine the mechanism of eEF1A2 in neural tissues, I established reporter cells of eEF1A2 expression by introducing EGFP under the control of eEF1A2 in Neuro2a neuroblastoma. With these cells, I screened shRNA library targeting more than 4,000 genes. With this strategy, I obtained candidate transcriptional factors of eEF1A2, including YY1.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：リボソーム 翻訳

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は細胞種特異的な翻訳反応を可能とするために、開始因子(eIF)や伸長因子(eEF)などのリボソーム制御因子やリボソームタンパク質の発現を変化させ、リボソームヘテロジェネイティを作り出していることが明らかになってきた(文献1)。しかしながら、生化学的、遺伝学的、構造生物学的視点からリボソームの各構成因子の機能が明らかになってきたものの、各細胞がリボソームヘテロジェネイティを作り出す仕組みや、特に分化細胞の翻訳制御における意義については未だ明らかとなっていない。

申請者はマウスの組織から抽出した RNA を用いて開始因子 eIF1 と eIF5 の発現量比を qPCR で計測したところ、組織によって eIF1/eIF5 比が大きく異なることを発見した(図1)。この知見に基づき、開始コドンの認識に関わる開始因子(eIF)のヘテロジェネイティに着目した解析を研究当初の目的としていた。しかしながら、この差はタンパク質レベルでは顕著ではなく、研究対象を様々な開始因子、伸長因子に広げて解析を行なったところ、伸長因子 eEF1A2/eEF1A1 比が RNA レベル、タンパク質レベル(図2)で顕著な組織特異性を示すことを確認した。eEF1A2 の遺伝子変異は自閉症や拡張性心筋症の原因遺伝子であることが報告されており、組織のリボソームヘテロジェネイティが正常な脳・筋機能に重要であることが示唆される。その一方で、eEF1A2/eEF1A1 の発現比の翻訳調節への意義、生じるメカニズムが不明である。

図1) 開始因子eIF1・eIF5のRNA発現比

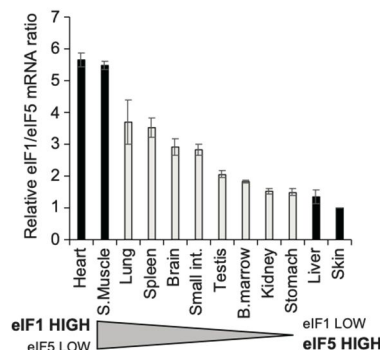
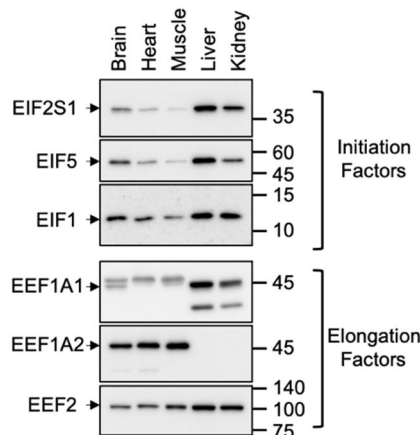


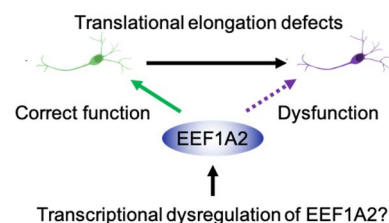
図2) 各マウス組織における開始・伸長因子のタンパク質発現量



### 2. 研究の目的

本研究では脳神経特異的な eEF1A2 発現誘導のメカニズムを明らかにするために、マウス神経芽細胞株 Neuro2A 細胞をモデルとして、eEF1A2 遺伝子の発現制御を担う転写制御因子を同定することを目的とした(図3)。

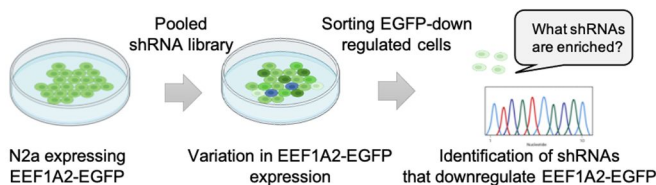
図3) 目的: eEF1A2の制御因子を同定



### 3. 研究の方法

Neuro2A 細胞において eEF1A2 遺伝子の終止コドン直前に eGFP-2A-BlastR を組み込み、eEF1A2 の発現を eGFP 蛍光を利用してフローサイトメーターで計測できるレポーター細胞

図4) eEF1A2制御因子のshRNAスクリーニングの概略



を作製した。このレポーター細胞に対して shRNA ライブラリを導入し、shRNA による各種転写制御因子ノックダウンによる eGFP シグナルの減少を指標に、Neuro2A 細胞において eEF1A2 遺伝子の発現制御を担う候補遺伝子を同定した(図4)。

#### 4. 研究成果

Neuro2A (N2a) 細胞において CRISPR/Cas9 システムと Microhomology-mediated end joining (MHEJ) を用いて eEF1A2 遺伝子の終止コドン直前に eGFP-2A-BlastR を組み込んだ (文献 2)。Blasticidin 耐性細胞の選別と eGFP 陽性細胞のシングルセルクローニングにより得られた細胞 (M36 クローン) に対して、Sanger シーケンスを行い正確に組み換えが起きていることを確認した。また、M36 細胞の eGFP シグナルが eEF1A2-eGFP 融合タンパク質に依存していることを eEF1A2 に特異的な shRNA を導入し、eGFP シグナルが減少することを FACS 解析で検出することで確認した (図 5)。

この細胞に対して shRNA ライブラリ (Cellecta DECIPHER, DMPAC-M1-P) をレンチウイルスベクターを利用して導入し、ライブラリ導入後 2 日目の細胞群に対し eGFP シグナルの低い細胞群 (P6) を FACS aria II (BD) でソートし、ソート前の細胞集団に対して P6 群に濃縮された shRNA を次世代シーケンサー HiSeq2500 (Illumina) を用いて検出した (図 6)。この解析の結果 eEF1A2 遺伝子の発現制御を担う候補遺伝子が 13 個同定され、shRNA を用いた再現実験で eEF1A2 の遺伝子発現がこれらの遺伝子に依存していることが確認された (図 7)。今回のスクリーニングでは一つの遺伝子あたり 4~6 の shRNA が設計されている shRNA ライブラリを利用したが、今回同定された候補遺伝子において複数の shRNA は同定されなかった。そのため、一つの shRNA によるオフターゲット

効果の可能性が危惧される。そこで、独立した確認実験の系として siRNA の導入実験系を確立し、少なくとも YY1 遺伝子は shRNA 実験系、siRNA 実験系の両者において eEF1A2 の発現を正に制御していることが確かめられた。今後はこれらの転写因子が eEF1A2 プロモーター領域に結合して、直接的に転写を制御するかどうか、Neuro2A での知見がマウスやヒトの脳組織での eEF1A2 の転写制御に応用できるか調べる必要があると考えている。

YY1 転写因子は神経系の発達過程においてタンパク質翻訳制御を行うことが知られている (文献 3)。YY1 をはじめとした今回同定された候補遺伝子の働きを詳細に解析することで、eEF1A2 の神経・筋特異的な遺伝子発現と組織間のリボソームヘテロジェネイティを作り出す仕組みを解明する一助になり、最終的にリボソーム制御の異常に起因する疾患発症メカニズムの理解につながることを期待される。

YY1 転写因子は神経系の発達過程においてタンパク質翻訳制御を行うことが知られている (文献 3)。YY1 をはじめとした今回同定された候補遺伝子の働きを詳細に解析することで、eEF1A2 の神経・筋特異的な遺伝子発現と組織間のリボソームヘテロジェネイティを作り出す仕組みを解明する一助になり、最終的にリボソーム制御の異常に起因する疾患発症メカニズムの理解につながることを期待される。

文献 1 Trends Biochem Sci. 2019 May;44(5):478-479.

文献 2 <https://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/PITChdesigner/about.html>

文献 3 Nat Commun. 2019 May 16;10(1):2192.

図 5) eEF1A2-eGFP発現Neuro2A細胞の樹立

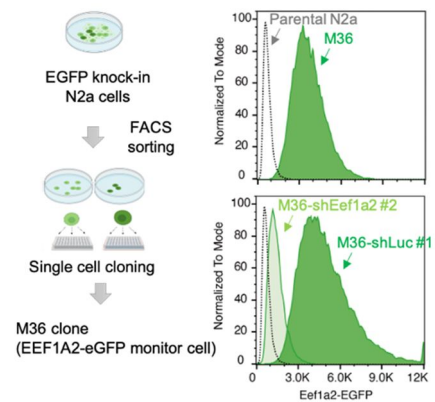


図 6) P6画分に濃縮したshRNAの同定

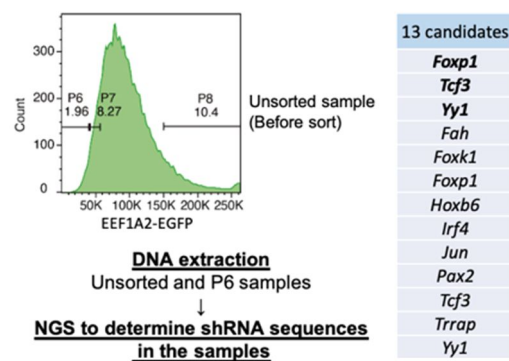
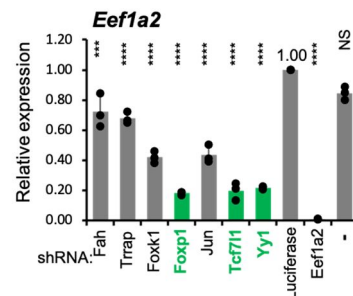


図 7) 13個のeEF1A2制御候補因子の再現実験



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 築地巧人、細金正樹、中山啓子
2. 発表標題 Analysis of translational regulator EEF1A isoform in cancer cells
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------