

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19281

研究課題名（和文）eIF3aのポリアンフォライト天然変性領域による神経活動依存的翻訳制御の解析

研究課題名（英文）Neuronal activity-dependent translation regulation by the polyampholytic IDR of eIF3a

研究代表者

椎名 伸之（Shiina, Nobuyuki）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（機構直轄研究施設）・生命創成探究センター・准教授

研究者番号：30332175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の翻訳開始因子eIF3aは、進化の過程でC末端に約400アミノ酸からなる長い天然変性領域（vIDR）を獲得した。このvIDRは、神経RNA顆粒でのeIF3aの流動性を抑制し、神経活動に依存した流動性増加を介して、局所翻訳の制御に関与する。本研究では、vIDRの前半のリピート配列領域（vIDR1）と後半のランダム配列領域（vIDR2）の共通点と相違点を解析した。その結果、vIDRの機能にはアミノ酸組成と長さが重要であり、配列自体は関係ないという当初の仮説とは異なり、vIDR1とvIDR2のリピートとランダムな配列の違いが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然変性領域（IDR）は、弱い相互作用を介して液-液相分離し、非膜オルガネラの形成やダイナミクスを制御する。しかし、IDRのアミノ配列は種間で保存性が低く、その配列の重要性については未解明な部分が多い。eIF3aのvIDR1とvIDR2は、アミノ酸組成は類似しているが、リピートとランダムという配列上の相違点がある。本研究で得られたこの2つの領域の配列の違いがvIDRの機能において重要であるという知見は、IDRの配列ルールの解明に向けて重要なものであり、大きな学術的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：During evolution, the eukaryotic translation initiation factor 3a (eIF3a) in vertebrates has acquired a long intrinsically disordered region (vIDR) of approximately 400 amino acids at its C-terminus. This vIDR suppresses the mobility of eIF3a within neuronal RNA granules and is involved in the regulation of local translation through activity-dependent increases in mobility. In this study, we analyzed the similarities and differences between the repeat sequence region in the first half of the vIDR (vIDR1) and the random sequence region in the second half of the vIDR (vIDR2). Contrary to our initial hypothesis that the function of the vIDR depends solely on its amino acid composition and length, and not on its sequence, our findings suggest that the differences between the repeat and random sequences in vIDR1 and vIDR2 are crucial.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：RNA顆粒 天然変性領域 IDR eIF3a 神経活動 流動性 局所翻訳

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経 RNA 顆粒の役割と流動性の制御

RNA 顆粒は、液-液相分離により mRNA、RNA 結合タンパク質、リボソーム等が濃縮したコンデンセートであり、神経細胞では mRNA のシナプス近傍への輸送と神経活動依存的な局所翻訳活性化を担う。液-液相分離を駆動するのは、タンパク質の天然変性領域 (intrinsically disordered region, IDR) や mRNA の多価で弱い結合であり、これらの結合が強固になることで、流動性の低いゲル・固相に転移する (Patel *et al*, Cell, 2015)。神経活動に伴う局所翻訳活性化の際には、RNA 顆粒の流動性が上昇することが示唆されている (Buxbaum *et al*, Science, 2014)。そこで我々は、様々な RNA 顆粒構成タンパク質の流動性を神経初代培養細胞で計測・定量し、脱分極に伴って流動性が上昇するタンパク質を探索した。その結果、流動性の上昇が最も顕著なものとして、真核生物翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor 3a (eIF3a) を同定した。

(2) eIF3a の特性と vIDR の構造

eIF3a は真核生物に高度に保存されているが、C 末端の IDR が生物の複雑化と共に伸長している。脊椎動物で伸長した IDR (vIDR) は約 400 アミノ酸の長さを持ち、前半のリピート配列領域 (vIDR1) と後半のランダム配列領域 (vIDR2) に分けられる。vIDR1 と vIDR2 はアミノ酸組成と長さが類似し、酸性・塩基性アミノ酸を約 3 割ずつ含む。このような陽イオン・陰イオンの両モノマーから成るポリマーは一般的に「ポリアンフォライト」と呼ばれ、相互作用による複合体 (ゲル) 形成が起こることが知られている (Huang *et al*, Adv Funct Mater, 2017)。vIDR1 と vIDR2 はアミノ酸組成と長さが類似したポリアンフォライトである一方、配列が異なる。vIDR1 は 10 アミノ酸が 20 回程度リピートした配列を持ち、10 アミノ酸の中には酸性・塩基性アミノ酸がそれぞれ 3 個ずつ含まれている。一方、vIDR2 の配列はランダムである。

(3) vIDR の機能と流動性の変化

vIDR を欠損したマウス eIF3a は、神経細胞に発現させると RNA 顆粒を形成するが、神経の脱分極により流動性は変化しない。一方、vIDR を持った野生型 eIF3a は流動性の低い RNA 顆粒を形成し、その流動性が脱分極によって顕著に上昇する。このような vIDR による神経活動依存的な流動性の変換が、神経活動依存的な局所翻訳のスイッチングを行う可能性が考えられる。しかし、vIDR のどのような性質がこのようなスイッチングを担うかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、マウスの神経細胞を用いて、eIF3a の vIDR のリピート配列や長さを人為的に操作することで、神経活動依存的に eIF3a の流動性を制御する vIDR の特徴を探究する。特に、アミノ酸組成と長さが類似しながら配列が異なる vIDR1 と vIDR2 の共通性と相違性に焦点を当てる。さらに、vIDR の変異による eIF3a の流動性制御の変化が、RNA 顆粒における局所翻訳に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞の培養とトランスフェクション

胎生 16 日目のマウス胚から分離した大脳皮質ニューロンを初代培養した。ニューロンは、ポリ-D-リジンでコーティングされたガラスボトムディッシュに、B-27 サプリメント、0.5 mM グルタミン、25% ニューロン培養用培地 (富士フイルム和光純薬) を含む Neurobasal-A 培地を用いて、 1.6×10^6 cells/cm² の密度で播種した。培養は、37℃、5% CO₂ インキュベーターで行った。ニューロンは、リン酸カルシウム法を用いて培養 6-7 日目にプラスミドをトランスフェクションし、トランスフェクション後 1 日目に観察した。

(2) プラスミドの構築

pCAG-GFP ベクター (Addgene) を用いて、ニューロンにトランスフェクションするためのすべてのプラスミドを構築した。各プライマーセットを使用してマウス eIF3a cDNA から PCR で得た DNA 断片を、In-Fusion Cloning Kit (タカラバイオ) を使用して pCAG-GFP ベクターにクローニングした。

(3) 光褪色後蛍光回復 (FRAP) 解析

GFP がタグ付けされた eIF3a vIDR 変異体のニューロンにおけるタイムラプス蛍光画像を、A1 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Nikon) を用いて 5 秒間隔で取得した。光褪色前に 4 枚のコントロ

ール画像を撮影し、その後、樹状突起内の1つのRNA顆粒全体をカバーする楕円形のROIを、488nmレーザーを8秒間照射して褪色した。その後、5分間にわたり画像を取得した。ImageJを使用して蛍光画像の定量化を行い、光褪色後の蛍光回復曲線をグラフ化し、その曲線を最小二乗法で指数関数にフィッティングした (Horio *et al.*, Heliyon, 2023)。指数関数から、褪色後の蛍光最大回復値を抽出した。

(4) SunTag システムを用いた RNA 顆粒内の局所翻訳解析

mRFP1 がタグ付けされた eIF3a vIDR 変異体、および翻訳可視化 SunTag システムの scFv-sfGFP-GB1 と 24xV4-ODC-Arc 3'UTR を、ニューロンにトランスフェクションした。その1日後、ニューロンを PBS 中で 3.7%ホルムアルデヒドを用いて 10 分間固定し、PBS で洗浄した後、Mowiol で封入した。蛍光画像は、IX83 倒立顕微鏡 (Olympus) を使用して取得した。eIF3a-mRFP1 が局在する樹状突起顆粒内の GFP 蛍光を測定し、各ニューロン内で min-max 正規化を行い、顆粒内における局所翻訳を定量化した。

4. 研究成果

(1) 野生型 eIF3a と eIF3a- vIDR の流動性の比較

まず、ニューロン樹状突起の RNA 顆粒における野生型 eIF3a (eIF3a-WT) と vIDR を欠損した eIF3a (eIF3a-ΔvIDR) の流動性を測定した。具体的には、FRAP 解析を行い、褪色後の蛍光最大回復値を定量化した。その結果、eIF3a-ΔvIDR は eIF3a-WT よりも高い回復値を示し、これは eIF3a-ΔvIDR の流動性が eIF3a-WT よりも高いことを示した。また、ニューロンの培地に KCl を添加して脱分極を誘導し、FRAP 解析を行った結果、eIF3a-WT の流動性は有意に上昇した。一方で、eIF3a-ΔvIDR の流動性は上昇しなかった。以上の結果は、野生型 eIF3a はニューロンが静止状態の時は流動性が低く、活動状態では高くなるという変換が起きることを示した。このような変換には vIDR が必要であり、vIDR が欠損すると静止状態でも流動性が高くなり、神経活動依存的な変換が起こらなくなることを示した。

(2) vIDR1 と vIDR2 の流動性への影響

次に、vIDR1 と vIDR2 のそれぞれを欠損した eIF3a 変異体の流動性を FRAP を用いて解析した。vIDR1 または vIDR2 を欠損した場合、どちらも神経静止状態での流動性が eIF3a-ΔvIDR の場合の約半分まで高くなり、その流動性は神経活動状態でも変化しなかった。したがって、神経活動依存的な流動性制御には、vIDR1 と vIDR2 の両方が関与し、両領域が相加的に関与することが示唆された。このことから、特にアミノ酸配列は重要ではなく、これらのアミノ酸組成で構成される IDR が 400 アミノ酸程度の長さを有することが、eIF3a の神経活動依存的な流動性制御に必要であるとの仮説を立てた。

(3) リピート配列の影響の検証

その検証のために、vIDR2 を vIDR1 に置換してリピート配列のみを2倍にした eIF3a-(vIDR1)_{x2} を作成し、ニューロンに発現させて FRAP を行った。仮説が正しければ、eIF3a-WT と似た流動性に回復すると予想されるが、結果は逆で、eIF3a-ΔvIDR と似た流動性を示した。すなわち、静止状態でも eIF3a-(vIDR1)_{x2} の流動性は高く、神経活動により上昇することはなかった。この結果は、リピート配列領域のみを伸長させてもむしろ逆効果であり、vIDR1 と vIDR2 の配列の違いの組み合わせが重要であることを示唆した。

(4) 局所翻訳への影響

eIF3a vIDR 変異体の RNA 顆粒における局所翻訳への影響を、SunTag システムを用いて測定した。eIF3a-WT が局在する顆粒での局所翻訳は、神経静止状態では低く、活動状態で上昇傾向が見られた。一方、eIF3a-ΔvIDR が局在する顆粒では、神経静止状態でも局所翻訳が高く、活動状態での上昇が認められなかった。このような局所翻訳への影響は、内在性の局所翻訳制御に対して eIF3a-ΔvIDR がドミナントな影響を及ぼしたと考えられる。これに対し、vIDR1 と vIDR2 のそれぞれを欠損した eIF3a 変異体は、eIF3a-WT の場合と同様の局所翻訳を示したことから、ドミナントな影響を及ぼさないと推測された。eIF3a-(vIDR1)_{x2} の場合は、やはり eIF3a-WT と似た局所翻訳を示すわけではなく、むしろ神経活動依存的な局所翻訳の上昇を示さないという点で、eIF3a-ΔvIDR と似た局所翻訳を示した。以上の局所翻訳に対する eIF3a vIDR 変異体の影響は、流動性への影響と対応していると考えられた。

(5) 結論

以上の結果から、マウス eIF3a の vIDR による eIF3a の RNA 顆粒内での神経活動依存的な流動性制御および局所翻訳には、vIDR1 と vIDR2 の両方が必要であることが示唆された。しかしながら、この両者は等価ではなく、リピートおよびランダムなアミノ酸配列の組み合わせが必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tomoyo Horio, Yui Ishikura, Rie Ohashi, Nobuyuki Shiina	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of RNG105/caprin1 dynamics by pathogenic cytoplasmic FUS and TDP-43 in neuronal RNA granules modulates synaptic loss	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e17065 ~ e17065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e17065	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 Deepak Khare, Kei Nakayama, Nobuyuki Shiina, Kenichi Kakimoto, Kumar Dubey Ashutosh	4. 巻 2
2. 論文標題 Piezoelectrically induced augmented functionality of primary cultured hippocampal neurons on electrospun PVDF-(Na, K) NbO3 composite fibers	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Next Materials	6. 最初と最後の頁 100070 ~ 100070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nxmate.2023.100070	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 Hideo Hagihara 他、Nobuyuki Shiina: 138名中117番目	4. 巻 12
2. 論文標題 Large-scale animal model study uncovers altered brain pH and lactate levels as a transdiagnostic endophenotype of neuropsychiatric disorders involving cognitive impairment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP89376 ~ RP89376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.89376	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 椎名 伸之	4. 巻 35
2. 論文標題 水晶体における蛋白質合成制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本白内障学会誌	6. 最初と最後の頁 65 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14938/cataract.35-014	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 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 中沢 香織、椎名 伸之	4. 巻 34
2. 論文標題 マウスの水晶体分化におけるRNG140 (caprin2) による翻訳制御機構の解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本白内障学会誌	6. 最初と最後の頁 83 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14938/cataract.34-018	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 大橋 りえ、椎名 伸之	4. 巻 94
2. 論文標題 神経RNA顆粒が制御する局所翻訳と長期記憶形成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 529 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940529	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 椎名 伸之、奥野 浩行	4. 巻 94
2. 論文標題 今、解き明かされつつある液-液相分離による生体機能制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 483 ~ 484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940483	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 椎名伸之
2. 発表標題 細胞質FUS/TLSとTDP-43による神経RNA顆粒RNG105の動態変化とシナプス損失
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大橋りえ, 藤井一希, 高雄啓三, 椎名伸之
2. 発表標題 Arf GEF mRNAの神経樹状突起局在制御がスパイン形成・成熟に与える影響
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下映, 七野悠一, 藤井一希, 腰高由美恵, 安達真由美, 笹川恵理, 水戸麻里, 中川真一, 岩崎信太郎, 高雄啓三, 椎名伸之
2. 発表標題 ILF3のプリオン様ドメインは慢性ストレス下で遺伝子発現と恐怖記憶を制御する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 椎名伸之
2. 発表標題 水晶体分化におけるタンパク質合成制御
3. 学会等名 第61回日本白内障学会総会・第48回水晶体研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋りえ, 藤井一希, 高雄啓三, 椎名伸之
2. 発表標題 Arf GEF, GAPファミリー-mRNAの神経樹状突起局在制御がシナプス形成に与える影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nobuyuki Shiina (担当:分担執筆, 範囲:Regulation of Neuronal RNA Granule Dynamics Through Phase Separation in Memory Formation and Disease)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 303
3. 書名 Phase Separation in Living Cells -Benefits and Risks-	

〔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.nibb.ac.jp/pressroom/news/2023/03/30.html</p> <p>神経変性疾患におけるシナプス損失の一因：RNA顆粒からのRNG105の解離 https://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2023/07/07.html</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
---------	---------