

## 論文の内容の要旨

氏名：田 中 融

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：イオンチャネルを介する神経刺激に応じた YB-1 タンパク質による迅速な翻訳調節機構の解析と  
ストレス応答における YB-1 タンパク質の役割

### 【目的】

遺伝子の発現は、細胞の状態に応じて転写レベルと翻訳レベルの両方で調節されている。転写調節については非常に多くの転写調節配列とそれらに結合する転写因子が同定されているが、翻訳調節に関する知見はとても少ない。遺伝子の発現において、翻訳反応は転写反応よりも下流に位置しており、翻訳を調節した方が外部からの刺激に対して速やかに応答することが出来る。YB-1 は動物の一生の間で組織毎に必要な時期に供給され、特異的な mRNA の翻訳に対して促進的あるいは抑制的に働く翻訳調節因子と考えられている。特に脳では胎生後期から 2 週目にかけて多く存在し、mRNP 顆粒に含まれて神経細胞の dendrite まで分布しており、神経活動依存的な翻訳調節を行っていることが予想される。しかしながら、神経細胞において YB-1 がどのような mRNA と相互作用し、どのようにその翻訳を調節しているかは明らかとなっておらず、それらを調べることは神経系の発達過程や神経疾患との関わりを分子レベルで理解するうえで大切である。

また、YB-1 は細胞がストレスを受けた際に形成するストレス顆粒 (stress granule: SG) の構成成分としても知られている。SG はヒートショックや酸化ストレスなどのストレスによって生じる異常なタンパク質の蓄積を防ぐために、多くの mRNA をその中に取り込み翻訳抑制の場として機能している。一方で、分子シャペロンである HSP70 の mRNA は既存のタンパク質の変性を防ぐために、SG から排除されて翻訳が活性化することが報告されている。YB-1 は SG の構成成分の一つでありマーカーとして用いられることもあるが、その機能は明らかではなく、また HSP70 の mRNA の翻訳活性化との関わりも調べられていない。SG は神経細胞でも形成されることから、それらにおける YB-1 の役割を調べることは、神経細胞のストレス応答の機構を知るうえで重要である。

本研究では、神経細胞において YB-1 が結合する mRNA を同定し、イオンチャネルを介する神経活動に応じた YB-1 による翻訳調節を解析した。さらに、ストレス下における SG の形成およびストレス応答タンパク質である HSP70 の mRNA の翻訳活性化に対する YB-1 の役割を調べた。

### 1. 神経活動に応じた YB-1 による翻訳調節機構の解析

#### 【方法】

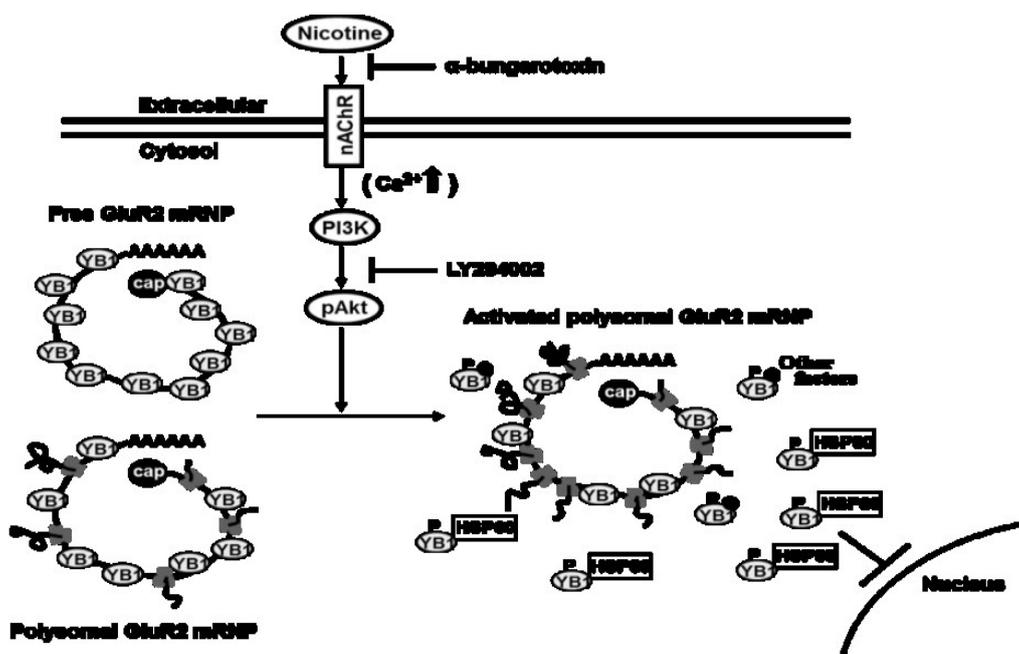
神経細胞における YB-1 のターゲット mRNA を同定するために、5 日齢のマウスの脳を 15~45%のショ糖勾配遠心にかけ、polysome 画分を用いて抗 YB-1 抗体による免疫沈殿を行い、得られた免疫複合体から RNA を抽出して、cDNA クローニングを行った。YB-1 ターゲット mRNA の翻訳に対する YB-1 の影響を調べるために、神経系培養細胞である NG108-15 細胞に YB-1 発現ベクター (pYB-1-GFP) や YB-1 に対する特異的な siRNA をトランスフェクションして YB-1 の細胞内存在量を変化させ、YB-1 ターゲット mRNA 量とその mRNA がコードするタンパク質の量的変化を調べた。神経活動に応じた YB-1 ターゲット mRNA の翻訳活性や YB-1 の polysome 結合性への影響を調べるために、NG108-15 細胞を 10  $\mu$ M の nicotine, 10  $\mu$ M の carbachol, 10  $\mu$ M の noradrenaline で処理して解析した。また、3 週齢のマウスの側脳室に、kainic acid (15  $\mu$ g/kg) を投与して、YB-1 の polysome 結合性の変化はショ糖勾配遠心を用いて解析し、YB-1 ターゲット mRNA の翻訳活性は Western blot と RT-PCR 法により解析した。

#### 【結果・考察】

脳において YB-1 は生後の脳の発達と機能維持に必要なタンパク質をコードする mRNA と相互作用していることが分かった。dendrite では局所的な翻訳が起こることが知られており、YB-1 は dendritic mRNP の構成要素であることから、得られたクローンの内 dendritic mRNA として知られている GluR2 mRNA と calmodulin1 (CaM1) mRNA に着目して、これらの mRNA に対する YB-1 による翻訳調節について解析した。NG108-15 細胞に pYB-1-GFP や YB-1 特異的 siRNA をトランスフェクションした実験から、YB-1 の量的変化が GluR2 mRNA や CaM1 mRNA の翻訳活性に影響を与えることがわかった。また、NG108-15 細胞を神経作用薬

である nicotine あるいは carbachol で処理したところ、GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の翻訳が短時間で一過的に増加した。イオンチャンネル内蔵の nAChR に対する特異的な阻害剤である  $\alpha$ -bungarotoxin を処理した場合にはそのような翻訳の活性化は観察されなくなり、また、YB-1 をノックダウンした細胞でも神経作用薬によるこのような翻訳の活性化は起こらなくなった。これらのことから、GluR2 mRNA や CaM1 mRNA は nAChR 刺激に応じて、YB-1 による翻訳の活性化を受けることが示された。動物における神経活動依存的な翻訳活性の変化を調べるために、nicotine と同様にイオンチャンネルを介した刺激を引き起こす kainic acid をマウスの側脳室に投与したところ、30min という短時間の間に YB-1 を含む polysome の一過的な高分子画分へのシフトが見られ、それと一致して GluR2 mRNA と CaM1 mRNA の一過的な翻訳の活性化が観察された。

神経活動に応じた YB-1 による翻訳調節の分子機構を明らかにするために、nAChR 刺激を介した GluR2 mRNA の翻訳活性化に焦点を当てて解析を進めた。当研究室では、細胞質タンパク質である HSP60 が YB-1 と相互作用し、YB-1 の polysome 結合性に影響を与えることを報告している。nicotine 処理した時の YB-1 と HSP60 との相互作用を調べたところ、その相互作用は GluR2 mRNA の翻訳活性化と同様に 3hr 後に一過的に増加していた。また、YB-1 は Akt によるリン酸化を受けて RNA から解離することが知られているが、nicotine によって活性化 Akt の増加が観察された。このことから、nicotine による GluR2 mRNA の翻訳活性化には、YB-1 と HSP60 の相互作用の増加と Akt による YB-1 のリン酸化の関与が示唆された。YB-1 はターゲット mRNA に対する結合比率に依存して、翻訳を活性化したり反対に抑制したりするので、nicotine による GluR2 mRNA に対する YB-1 の結合比率の変化を調べた。シヨ糖勾配遠心を行ったところ、YB-1 の分布はより高分子の polysome 画分にシフトし、GluR2 mRNA に対する結合比率が減少していた。一方、HSP60 は non-polysomal 画分にのみ分布しているのが観察され、この画分における HSP60 と YB-1 の相互作用が nicotine 処理によって増加していた。以上の結果から、神経活動に応じた YB-1 による翻訳調節機構として以下のモデルが考えられる。① nicotine によるイオンチャンネルを介した刺激によって Akt のリン酸化が起こる (pAkt)。② pAkt によるリン酸化を受けた YB-1 は GluR2 mRNA から解離し、それにより mRNA の立体構造に変化が生じて、リボソームのリクルートが活発になり GluR2 mRNA の翻訳活性が増大する。③ mRNA から解離した YB-1 は HSP60 などの細胞質タンパク質と相互作用し、核に移行しないように細胞質に留められている (Fig. 1)。本研究は、YB-1 が神経系の発達や機能維持に重要な mRNA の翻訳を神経刺激に応じ、迅速に調節していることを示した初めての報告である。また、nAChR を介する刺激は高 Ca ストレスによる神経細胞死を抑制するという報告があり、YB-1 が nicotine によって GluR2 mRNA や CaM1 mRNA の翻訳を迅速に増加させることが関与しているのかもしれない。



**Fig. 1 A model for the mechanism of YB-1-mediated translational activation of GluR2 mRNA in response to neural activity through nAChR**

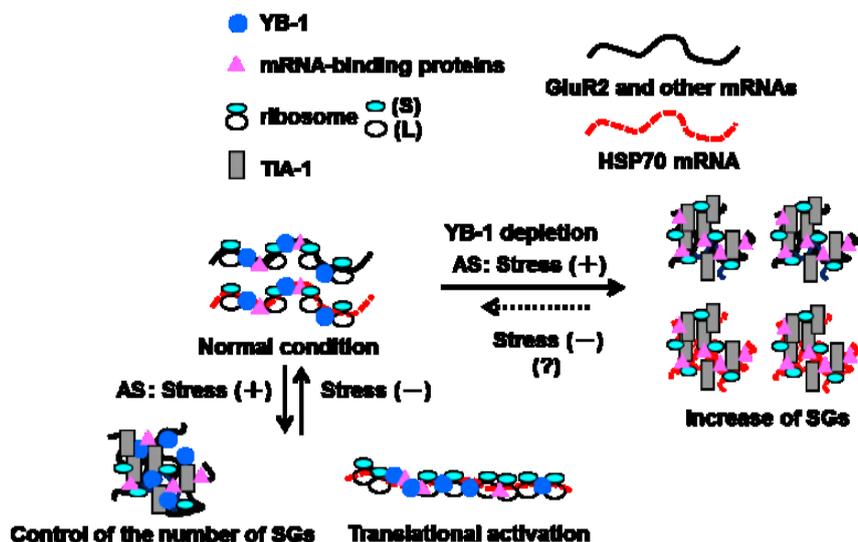
## 2. ストレス応答における YB-1 タンパク質の役割

### 【方法】

神経系培養細胞である NG108-15 細胞を 1mM の亜ヒ酸で 30min 処理して SG を形成させた。GluR2 mRNA と同様に YB-1 が HSP70 mRNA と相互作用しているかを免疫沈殿により調べた。亜ヒ酸処理条件下における HSP70 mRNA と GluR2 mRNA の翻訳活性の変化を調べ、それらの mRNA が SG またはポリソームのどちらに分布するのかをショ糖勾配遠心により解析した。翻訳調節における YB-1 の関与について知るために YB-1 を siRNA でノックダウンし、これらの mRNA の SG への取り込みの変化を SG タンパク質である TIA-1 に対する抗体を用いて免疫沈殿により解析した。YB-1 をノックダウンさせた細胞と過剰発現させた細胞における SG の形成具合を TIA-1 に対する抗体を用いて細胞免疫染色し、YB-1 が SG 形成にどのように関与しているかを解析した。タンパク質量は Western blot、mRNA 量は RT-PCR 法により解析した。

### 【結果・考察】

YB-1 は神経細胞におけるターゲット mRNA である GluR2 mRNA だけでなく HSP70 mRNA とも相互作用していた。亜ヒ酸による酸化ストレスを与えると GluR2 mRNA の翻訳は抑制されたが、YB-1 と HSP70 mRNA の相互作用は増加しその翻訳が促進された。ショ糖勾配遠心による解析から、ストレス下では GluR2 mRNA の分布は polysome 画分から SG を含む non-polysomal 画分にシフトし、反対に、HSP70 mRNA は non-polysomal から polysome 画分にシフトすることが分かった。この結果は上述の亜ヒ酸処理による GluR2 mRNA と HSP70 mRNA の翻訳活性の変化と一致しており、YB-1 は相反する翻訳調節複合体への mRNA の仕分けに関わっていることを示唆している。YB-1 ノックダウン細胞に亜ヒ酸を処理して行った解析から、ストレス下において YB-1 は HSP70 mRNA の SG への取り込みに対して阻害的に働き、HSP70 mRNA を含む polysome 形成を促進することが示唆された。さらに YB-1 の細胞内存在量を変化させて SG の形成に対する影響を調べると、YB-1 を減少させた場合でも SG は形成されその数が増加し、YB-1 を過剰発現させると逆に減少することが分かった。これらのことから、YB-1 は亜ヒ酸による HSP70 mRNA の翻訳の活性化に関与し、SG の形成に阻害的に働くことによってその数を調節していることが分かった (Fig. 2)。本研究により、細胞のストレス応答反応として重要であるが、その機構の詳細が不明であった SG の形成と HSP70 mRNA の翻訳活性化における YB-1 の役割が明らかとなった。



**Fig. 2 YB-1 modulates SG assembly and translation of HSP70 mRNA.**