

氏 名 山下 映

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2424 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 主 査 東島 眞一
基礎生物学専攻 教授
椎名 伸之
基礎生物学専攻 准教授
野中 茂紀
基礎生物学専攻 准教授
吉村 成弘
京都大学 大学院生命科学研究科 准教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 山下 映

論文題目 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

(ILF3 prion-like domain regulates gene expression and fear memory under chronic stress)

The prion-like domain (PrLD) is a class of intrinsically disordered protein regions that do not form stable three-dimensional structures. PrLD is characterized by low sequence complexity and richness in polar amino acids and glycine. This domain has attracted huge attention because its ability to form condensates associates to neurodegenerative diseases. However, most PrLD-containing proteins often do not form condensates in healthy conditions. Studies in yeast and plants have suggested that insertion of PrLDs into proteins confers evolutionary advantages in environmental responses and phenotypic diversities. However, in vertebrates, the focus has been on pathological aspects and little is known about the physiological significance of PrLDs.

In this study, I aimed to uncover the physiological role of PrLD in one of the PrLD-containing proteins, nuclear factor associated with dsRNA 2 (NFAR2), in mice. NFAR2, which possesses a long (>200 amino acids) C-terminal PrLD, has a PrLD-less splicing variant, NFAR1, generated from the same interleukin enhancer-binding factor 3 (*Ilf3*) gene. Through binding to DNA and RNA, both NFAR1 and NFAR2 (NFARs) regulate gene expression in multiple fashions. They reside primarily in the nucleus to promote and repress transcription, while a fraction of them shuttle between the nucleus and cytoplasm to export mRNAs for translation. To respond to environmental stresses such as virus infection and oxidative stress, NFARs either suppress or facilitate translation depending on their target mRNAs. In contrast to these common functions, NFAR1 and NFAR2 differ in subcellular and subnuclear localizations. NFAR2 is more prone to be

in the nucleus than NFAR1, due to the PrLD. Within the nucleus, both NFAR1 and NFAR2 localize to the nucleolus in common, while only NFAR2 is also enriched in the nucleoplasm. Given that the potential functional difference of subcellular localization originates from PrLD, further phenotypic studies of NFARs mutants will provide a better understanding of the physiological implications of PrLDs.

For that aim, I generated *Ilf3* mutant mice that lack the PrLD of NFAR2 (*Ilf3*^{ΔPrLD/ΔPrLD} mice) by introducing a stop codon at the beginning of the NFAR2-specific PrLD-coding exon using CRISPR/Cas9. *Ilf3* null mice have been reported to be perinatally lethal because of neuromuscular respiratory failure, whereas *Ilf3*^{ΔPrLD/ΔPrLD} mice were viable without a significant decrease in their survival rate. However, the effect of PrLD deletion could be more prevailing in tissues such as the brain, where NFAR2 expression predominates over NFAR1. Therefore, I investigated the effects of PrLD deletion in the brain on the subcellular localization of NFARs, mRNA expression and translational regulation, and mouse behavior, across chronic physical stress on mice.

First, I showed with immunostaining that PrLD of NFAR2 is responsible for the chronic stress-sensitive nucleoplasmic retention of NFARs in the amygdala (AMY). Second, I used RNA-seq and ribosome profiling to investigate the role of the PrLD in the regulation of mRNA expression and translation in AMY under chronic stress. NFAR2 PrLD deletion mimicked stress-induced transcriptome and translational alterations even in the absence of chronic stress and altered the chronic stress-responsive control of mRNA expression and translation in the AMY. Third, using comprehensive battery of behavioral tests, I found that *Ilf3*^{ΔPrLD/ΔPrLD} mice exhibit increased body temperature and activity, reduced anxiety-like behaviors, and impaired conditioned fear memory. Consistent with the deficit in fear memory, *Ilf3*^{ΔPrLD/ΔPrLD} mice showed lower fear-induced neural activity than wild-type mice, as judged by c-Fos immunostaining, in the ventral hippocampus (vHIP) that is structurally and functionally connected to AMY to encode emotion and fear. Finally, I investigated

chronic stress-associated behaviors in a passive avoidance test on various *Ilf3* mutant and wild-type mice. Although both NFAR1 and NFAR2 were involved in fear-conditioned memory formation regardless of PrLD, the presence of PrLD in NFAR2 was required specifically for tolerance of mice to chronic stress in the formation of conditioned fear memory.

In conclusion, this study demonstrated that PrLD deletion in NFAR2 reduces the stress-sensitive nuclear retention of NFARs in AMY, where it alters stress-induced gene expression changes, and reduces the tolerance of mice to chronic stress in the formation of fear-associated memories. These results suggest that the insertion of PrLD into NFAR2 confers molecular interactions for nuclear retention which may impact the chronic stress-responsive spatiotemporal regulation of mRNA expression and translation by NFARs. These controls by the PrLD may increase the tolerance of AMY and its associated nervous system to chronic stress and, consequently, the tolerance of mice to chronic stress in conditioned fear memory formation. These results provide a novel insight into the evolutionary advantages of PrLDs in vertebrates for environmental adaptation.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 山下 映

Title
論文題目 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

タンパク質のプリオン様ドメイン (Prion-like domain, PrLD) は特定の構造をとらない天然変性領域の一種である。液-液相分離を介して凝集化しやすいというその性質は、脊椎動物における神経変性疾患の原因の一つとして注目されている。しかし、PrLD が本来担う生理的意義については未解明の点が多い。出願者の山下映さんは、PrLD をコードするエクソンが選択的スプライシングされる *Ilf3* 遺伝子に着目し、そのスプライシングを受けると PrLD を欠損したマウスを作製・解析することによって PrLD の生理的役割を調べた。*Ilf3* 遺伝子から産生される NFAR1 (PrLD なし) および NFAR2 (PrLD あり) は RNA 結合タンパク質であり、酸化ストレス依存的に核から細胞質へ移行してストレス応答性の転写・翻訳を制御する。また、NFAR1 に対する NFAR2 の発現比は脳で高い。このような背景から出願者は、脳内で特に酸化ストレス感受性の高い扁桃体におけるストレス応答性転写・翻訳、並びにストレス下での行動に対する PrLD 欠損の影響を解析した。

出願者はまず、扁桃体での酸化ストレスを亢進させることが知られている慢性ストレス (マウスの拘束水浸ストレス) により、野生型マウスの扁桃体において NFAR1/2 が核から細胞質へ移行することを確認した。PrLD 欠損マウスではストレスなしでも NFAR1/2 の核局在化が既に低下し、慢性ストレス依存的な細胞質移行も失われた。次に扁桃体の RNA-seq およびリボソームプロファイリングを行った結果、野生型マウスにおいて慢性ストレスにより引き起こされる mRNA 発現・翻訳プロファイル変化と同様の変化が、PrLD 欠損マウスではストレスなしでも既に起きていることを見出した。そして PrLD 欠損マウスで慢性ストレス曝露時に起こる mRNA 発現・翻訳プロファイル変化は、野生型マウスのそれとは相関が認められないほどに異なっていた。さらに出願者は、扁桃体が関与する恐怖条件付けテストをマウスで行った。野生型マウスや *Ilf3* ヘテロ欠損マウスでは恐怖記憶の形成は慢性ストレスに対して耐性を示したのに対し、PrLD 欠損マウスでは恐怖記憶形成が慢性ストレスによって悪化することを明らかにした。

以上の研究により出願者は、NFAR2 の PrLD が扁桃体において慢性ストレス感受性の核局在化およびそれに伴う慢性ストレス応答性の転写・翻訳制御を担い、これらの制御が恐怖記憶形成に慢性ストレス耐性を付与するという新たなモデルを提唱した。このことは、PrLD のスプライシング (挿入) による慢性ストレスへの適応という環境適応・多様化を示唆し、凝集化しやすいというデメリットとのトレードオフが存在するという洞察を与えるものである。よって審査委員会は、本論文が同分野に重要な貢献をするものであり、学位の授与に相応しいものであると判断した。