

## 神経RNA顆粒が制御する局所翻訳と長期記憶形成

大橋 りえ, 椎名 伸之

長期記憶をもたらすシナプス長期増強に不可欠な制御として、樹状突起の後シナプス周辺における局所的な翻訳があげられる。局所翻訳が起こるためには、mRNAが輸送装置へ取り込まれ、それが突起へと輸送され、シナプス入力に応答して翻訳活性が上昇するという一連の反応が時空間的にコントロールされる必要がある。これらの制御を担うのが、液-液相分離（LLPS）により形成される凝縮体（コンデンセート）「神経RNA顆粒」である。近年、さまざまな生命現象へのLLPSの関与に対して注目度が高まり、LLPSの観点からRNA顆粒の特性を解析した研究が多く報告されるようになった。そこから明らかにされつつあるRNA顆粒の構造や構成因子のダイナミクスに関する知見に基づき、RNA顆粒が局所翻訳、ひいては長期記憶という生命現象をもたらすメカニズムを考察する。

### 1. はじめに—神経細胞におけるRNA顆粒と翻訳制御

極性を持つ細胞において、mRNAの局在化とそれに伴う翻訳の制御は、その細胞特有の機能を発揮するために必要不可欠である。長い突起を持つ神経細胞も例外ではなく、細胞体に加えて樹状突起や軸索の神経突起にもmRNAが局在化し、局所的に翻訳が起こることが知られている<sup>1,2)</sup>。「局所翻訳」と呼ばれるこの制御は、神経特有の形態や機能を生み出す。たとえば軸索末端における局所翻訳は、成長円錐の伸展や前シナプスの構造変化をもたらす<sup>3,4)</sup>、また樹状突起における局所翻訳は、後シナプス構造であるスパインの成熟化やシナプス長期増強、ひいては長期記憶形成に必須である<sup>5-7)</sup>（図1）。特に後者の樹状突起においては、「RNA顆粒」と呼ばれる、膜で囲まれていないオル

ガネラ（非膜オルガネラ）が、mRNA局在化および局所翻訳制御の鍵となることが近年明らかにされてきた。本稿では、主に樹状突起における局所翻訳に焦点を当て、RNA顆粒がいかんしてこれらの制御に関与するのかを、神経RNA顆粒の形成（2.1節）、輸送（2.2節）、翻訳制御（2.3節）の3ステップに分けて概説する（図2）。さらに、RNA顆粒と長期記憶形成との関連について考察し（3章）、最後にRNA顆粒形成の駆動力となる液-液相分離（liquid-liquid phase separation：LLPS）のイメージング解析・光遺伝学的操作法を紹介する（4章）。

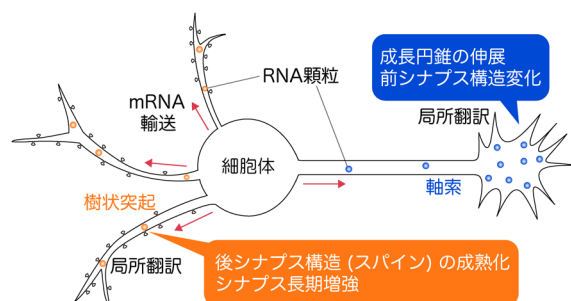


図1 神経細胞におけるmRNA輸送と局所翻訳  
神経細胞では特定のmRNAが細胞体から各突起（軸索・樹状突起）へと輸送され、突起内で局所翻訳制御を受ける。軸索先端における局所翻訳は成長円錐の進展や前シナプス構造変化をもたらす。樹状突起における局所翻訳は後シナプス構造（スパイン）の成熟化とシナプス長期増強をもたらす。

自然科学研究機構・基礎生物学研究所／自然科学研究機構・生命創成探究センター／総合研究大学院大学（〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38）

Local translation and long-term memory formation regulated by neuronal RNA granules

Rie Ohashi and Nobuyuki Shiina (National Institute for Basic Biology (NIBB), National Institutes of Natural Sciences (NINS)/Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), NINS/The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), 38 Nishigonaka, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940529

© 2022 公益社団法人日本生化学会

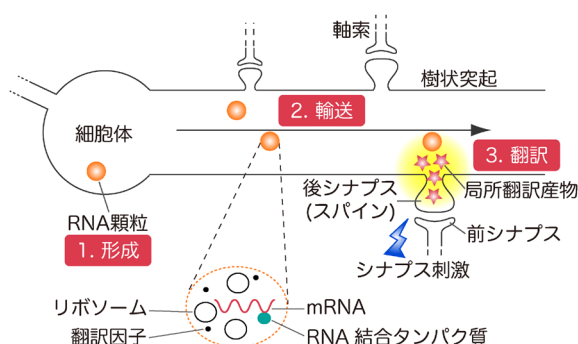


図2 樹状突起における局所翻訳—RNA 顆粒による制御— mRNAやRNA結合タンパク質からなる非膜オルガネラ「RNA 顆粒」により局所翻訳が制御される。細胞体でRNA顆粒が形成され、樹状突起へと輸送され、興奮性後シナプス構造のスパイン周辺で前シナプスからの入力依存的に翻訳が起こる。RNA 顆粒によるこれら一連の制御により局所翻訳が成立する。

## 2. RNA 顆粒による神経突起内局所翻訳の制御

### 1) RNA 顆粒の形成とmRNAの取り込み

RNA 顆粒は、mRNA、リボソーム、RNA 結合タンパク質等が凝縮した非膜オルガネラである。神経RNA 顆粒に含まれるRNA 結合タンパク質は多種にわたり、fragile X mental retardation protein (FMRP)、GTPase activating protein SH3 domain binding protein 1 (G3BP1)、cell cycle associated protein 1 (Caprin1, 別名 RNG105)、stau protein double-stranded RNA binding protein 1 (Stau1)、cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1 (CPEB1)、pumilio RNA-binding family member 2 (Pum2)、fused in sarcoma (FUS)、TAR DNA binding protein (Tardbp, 別名 TDP-43) 等が知られている<sup>8,9)</sup>。これらは三次元構造をとらない天然変性領域 (intrinsically disordered region: IDR) を持つ天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein: IDP) であり、これら IDP どうしの IDR を介した多価で弱い結合が LLPS の駆動力となり、凝縮体 (コンデンセート) 形成を引き起こす (図3)。IDR による LLPS は、翻訳後修飾によって制御されるケースが報告されている。たとえば、FMRP の IDR のリン酸化は LLPS を促進し、逆にメチル化は LLPS を抑制する<sup>10)</sup>。FMRP と Caprin1 の IDR どうしが相互作用して LLPS を起こすか否かも、各 IDR のリン酸化状態に依存する<sup>11)</sup>。また、IDP は特定の mRNA と相互作用して RNA 顆粒内部に mRNA を取り込むが、mRNA そのものもまた、IDP との相互作用により LLPS を駆動する要素であり、コンデンセート形成を制御することが知られている<sup>12,13)</sup>。mRNA の二次構造が LLPS のダイナミクスを変化させるという報告や<sup>14)</sup>、mRNA 上の複数か所の m<sup>6</sup>A 修飾が LLPS を促進するという報告もある<sup>15)</sup>。このように、LLPS の駆動力となる IDR や mRNA の相互作用は、さまざまな方法で制御される (図3)。RNA 顆粒は膜を持たないコンデンセートであり、それゆえに凝縮と分散のダイナミックな動態を示すが、そのダイナミクスが制御されるという特徴

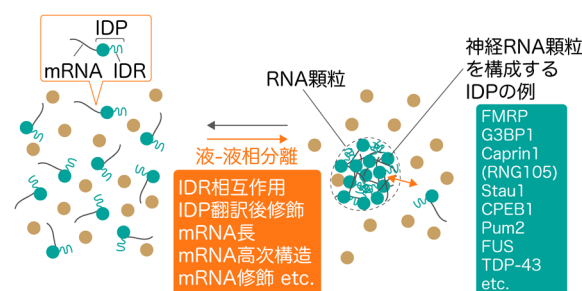


図3 RNA 顆粒の液-液相分離による形成

天然変性タンパク質 (IDP) の天然変性領域 (IDR) の相互作用が液-液相分離の駆動力となる。さらに、IDP の翻訳後修飾、mRNA 長、mRNA の高次構造、mRNA 修飾等も相分離の促進に寄与し、RNA 顆粒が形成される。

が、後述する局所翻訳の ON/OFF 制御の鍵になると考えられる。

シナプス近傍における局所翻訳を起こすためには、RNA 顆粒によって mRNA が樹状突起へ輸送されることが不可欠である (図2)。では、どのような種類の mRNA が選択的に RNA 顆粒に取り込まれるのだろうか。この問いを解明するための第一の方法として、RNA 顆粒構成因子の IDP と相互作用する mRNA の同定があげられる。これまでに多くの報告が蓄積されてきたが、それらは非体系的な知見として散在していたため、神経 RNA 顆粒構成因子のうち主要な IDP と相互作用する mRNA 群をカタログ化した<sup>16)</sup>。詳しくはそちらを参照されたいが、一例をあげると、樹状突起に輸送されてシナプス長期増強および記憶形成に関与することがよく知られている *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha* (*Camk2a*) mRNA は、FMRP, Caprin1, CPEB1, Stau1, Stau2 など複数の RNA 顆粒構成 IDP と相互作用することが明らかにされている<sup>17-21)</sup>。しかしながら、溶液中で同定されたタンパク質-mRNA の結合特異性は、その mRNA が RNA 顆粒に取り込まれる特異性とは必ずしも一致しない<sup>22)</sup>。さらに、タンパク質-mRNA の結合特異性は、LLPS を起こすと変化することも示された<sup>23)</sup>。ゆえに、RNA 顆粒によって樹状突起に輸送される mRNA の同定において、IDP との結合に着目した従来の方法に代わる新たなアプローチが必要であることがわかってきた。

その新規手法の一つとして、樹状突起を解剖学的に単離し、そこに局在する mRNA を網羅的に同定する方法があげられる<sup>24-26)</sup>。ラットやマウスの海馬には樹状突起が密集した放線状層と呼ばれる領域が存在し、その領域がよく用いられる。この方法を用いた複数の報告では、*Camk2a* mRNA 等、上記方法を用いた際と共通の mRNA が同定された一方、上記の同定結果には含まれない mRNA も多数同定された<sup>24-26)</sup>。この樹状突起単離法を用いた複数の報告を統合すると、樹状突起局在性 mRNA は、“シナプス”、“スパイン”、“グルタミン酸受容体”、“リボソーム”、“翻訳伸長因子”の遺伝子オントロジーカテゴリーに分類されるものが有意に多いことがわかってきた<sup>16)</sup>。このことは樹

状突起における局所翻訳がシナプス長期増強をもたらす<sup>5)</sup>という知見とよく一致する。また、同方法を用いることにより、選択的スプライシングバリエントmRNAのうち、3'UTRが長いものほど樹状突起領域に局在化する傾向にあることが示された<sup>27)</sup>。これは、コンデンセートへの取り込まれやすさがmRNAの長さに依存している可能性を示唆しており興味深い。短いmRNAの中にも樹状突起に局在化するものが一定数報告されている。よって、RNA顆粒に取り込まれるか否かの一要因としてmRNAの長さが示唆される一方で、一次構造のみではなく高次構造や修飾等、その他の要因も排除できない。樹状突起を単離する方法は、輸送されたmRNAを同定できるという大きな利点がある一方で、それらmRNAがRNA顆粒に取り込まれていることは保証されない。この問題点については、近年開発された、細胞内微細構造に局在するmRNAを近接ラベル<sup>28)</sup>や局所的光照射<sup>29)</sup>により同定する新手法によって、克服されることが期待される。

細胞体において、IDPやmRNAを含むRNA顆粒がLLPSにより形成されることが、樹状突起における局所翻訳を起こすための一つ目の重要な制御である。そこに取り込まれるmRNAの同定は、RNA顆粒がLLPSによって形成されるがゆえに従来の手法では問題があることがわかってきたが、それを克服する手法が急速に開発されつつある。

## 2) 神経突起へのmRNA輸送

細胞体で形成されたRNA顆粒は、モータータンパク質であるキネシンおよびダイニンによって微小管依存的に神経突起へ輸送される<sup>30)</sup>。軸索では、細胞体側から軸索先端にかけて微小管の配向がマイナス端からプラス端の一方であり、プラス端へ向かって移動するキネシンが主にRNA顆粒の輸送を担うため、顆粒は遠位方向へ一方に輸送される(図4)<sup>31-33)</sup>。一方、樹状突起では微小管のプラス端、マイナス端の配向がランダムであり、このためにRNA顆粒は遠位方向にも近位方向にも輸送され、突起全体への配置が可能になる<sup>31, 32, 34, 35)</sup>(図4)。では、膜を持たないRNA顆粒はモータータンパク質とどのように結合するのだろうか。これは、直接的あるいは間接的な相互作用のいずれも報告されている。前者の例としては、RNA顆粒構成IDPであるFMRPがキネシンと相互作用することが示されている(図4左下)<sup>36, 37)</sup>。一方、小胞を介した間接的な相互作用も知られている。RNA顆粒が、軸索ではリソソームに係留され、この小胞にモータータンパク質が結合することで輸送されるという報告がある(図4右下)<sup>38)</sup>。この場合、輸送後に翻訳産物がリソソームの機能とカップルしやすいという利点もあると考えられる。未解明の点も多いが、非膜オルガネラであるRNA顆粒も直接的あるいは間接的にモータータンパク質と相互作用することで、微小管依存的に突起へ輸送されている。さらに輸送後、樹状突起ではシナプス基部周辺にRNA顆粒に係留されることが、局所翻訳後に翻訳産物を目的のシナプス

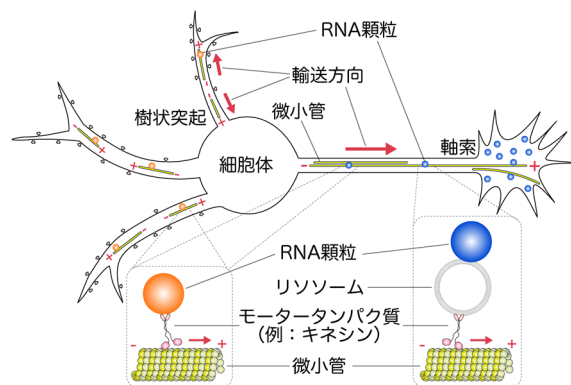


図4 RNA顆粒の輸送

RNA顆粒は微小管依存的に神経突起へと輸送される。軸索では細胞体側から軸索先端にかけて微小管の配向はマイナス端からプラス端への一方であり、RNA顆粒は主にキネシンによって先端へ向かって一方に輸送される。樹状突起ではプラス端・マイナス端の配向がランダムであり、RNA顆粒は両方向への輸送が可能となる。RNA顆粒はモータータンパク質と結合しているが（左下図）、リソソーム等によりその結合が仲介されるケースもある（右下図）。

へ供給するには効率的である。これに関しては、FMRPやStaufenがミオシンVaを介してシナプス基部のアクチン繊維に結合することが報告されており<sup>9, 39)</sup>、これらがRNA顆粒の係留を仲介すると考えられる。

次節で述べるように、シナプス入力を受けて初めてRNA顆粒内部のmRNAの翻訳がONになるが、そのためには輸送中および係留中は翻訳が停止した状態が維持される必要がある。では、翻訳はどのようなメカニズムで停止しているのだろうか。RNA顆粒には翻訳開始因子eIF4Eが存在しない一方で、翻訳開始によってmRNAから解離すべきCBP80が存在することから<sup>40)</sup>、顆粒内部では翻訳開始が抑制されていることが示唆されている。一方、樹状突起での翻訳は翻訳開始阻害剤に非感受性であることが報告されており<sup>41, 42)</sup>、この場合は、翻訳開始段階はすでに終了して翻訳伸長段階で停止した状態にあると考えられる。このように相異なるメカニズムが報告されているが、mRNAの種類によって、または、相互作用しているIDPにより、あるいはRNA顆粒ごとに異なる制御で翻訳が停止している可能性も示唆されている<sup>40)</sup>。また、以上のメカニズムとは別に、コンデンセート特有の制御が示唆されている。RNA顆粒は非常に高密度にパッキングされた構造であるため、翻訳開始・伸長因子等が物理的障害によりmRNAにアクセスできず、翻訳が停止しているというものである<sup>43)</sup>。RNA顆粒中で翻訳停止を維持するメカニズムの全容は未解明であるが、このように、RNA顆粒内部で翻訳が抑制された状態でmRNAが樹状突起に輸送されることが、局所翻訳に欠かせない二つ目の制御である。

## 3) シナプス入力に依存した翻訳スイッチング

樹状突起へ輸送され、シナプス基部に係留されたRNA顆粒はその後、シナプス入力依存的に翻訳がONになる。



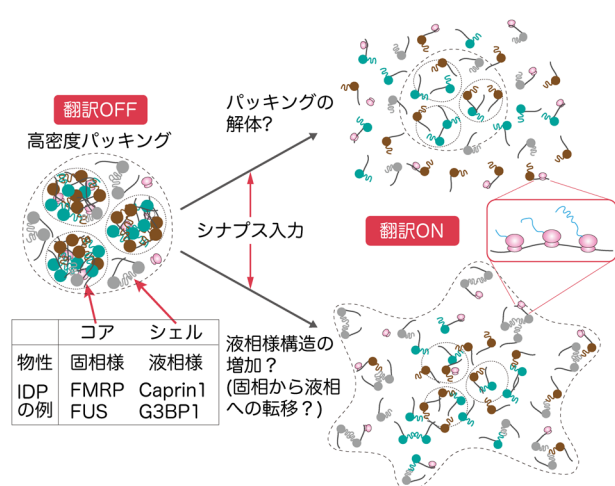


図5 RNA顆粒の二相性と翻訳制御

RNA顆粒の構造は一樣ではなく、固相様のコアと液相様のシェルからなる。輸送中は高密度にパッキングされた状態を保ち翻訳は起こらず、シナプス入力に反応して翻訳がONになる際にパッキングが解体し、リボソームや翻訳開始因子等がmRNAにアクセス可能になるとというのが通説である。近年の報告から、液相様構造の増加等により顆粒内で翻訳活性が上昇するという可能性も示唆される。

これが局所翻訳において要となる三つ目の制御である。いかにして輸送・係留中は翻訳OFFを維持し、シナプス入力に反応して翻訳がONになるのだろうか。

シナプス入力依存的に起こる変化として、翻訳開始・伸長因子のリン酸化を担うmTORやMAPキナーゼの活性化が知られている<sup>44)</sup>。これにより局所翻訳がONになると考えられてきたが、そのためには、これらシグナル伝達分子がRNA顆粒内部の翻訳開始複合体あるいはポリソームにアクセスできなければならない。さらに、mRNA上をリボソームがスライドできるだけの可動性が必要である。これまで、RNA顆粒は高密度にパッキングされた構造であるというのが通説であったため、シナプス入力に反応してこのパッキングが緩むことで構成因子が放出され、翻訳開始因子やリボソーム等がmRNAに相互作用できるようになり、翻訳が顆粒の外部で活性化されると考えられてきた(図5)。これらの知見は、単離されたRNA顆粒の電子顕微鏡による観察<sup>43)</sup>や、IDPの顆粒からの離散<sup>18)</sup>に根拠を持つ。

しかし近年になり、RNA顆粒内部において翻訳活性がみられることが報告され始めた。Matejuらは、Sun-Tagと呼ばれる新規翻訳可視化法により、神経RNA顆粒と構造的に類似したストレス顆粒の内部で翻訳活性が上昇することを報告した<sup>45)</sup>。顆粒内部で翻訳が起こりうるということは、顆粒の構造は高密度一様ではなく、パッキングが一部緩むような動的な性質を持つことが示唆される(図5)。実際にJainらは、ストレス顆粒の構造は均一ではなく、コア様構造とシェル様構造の二相からなることを示している<sup>46)</sup>(図5)。コアは凝縮状態が維持される安定した構造であるのに対し、シェルは離散しやすいダイナミックな

動態を示す<sup>46)</sup>。また、Shiinaは複数種類のIDPについて、各IDPが形成する顆粒の動態を詳細に解析し、その結果、FMRPやFUSは固相様のコアの性質を示す顆粒を形成する一方で、Caprin1(RNG105)やG3BP1は液相様のシェルの性質を示す顆粒を形成することを明らかにした<sup>47)</sup>(図5)。さらに、固相様IDPによって形成された顆粒内での翻訳活性は低い、そこに液相様IDPによって形成されるシェルを共存させることによって、固相様IDPのダイナミクスを上昇させ、それに伴い顆粒内での翻訳活性が上昇することが示されている<sup>47)</sup>。このようなRNA顆粒の構造的不均一性とそれに伴うダイナミクスの多様性を持つ生物学的意義はまだ不明であるが、これらの視点から局所翻訳のON/OFFスイッチング制御のメカニズムに迫ることが可能かもしれない。

局所翻訳の活性化が、RNA顆粒の顆粒構造の解体またはシェル様構造の増加、あるいはさらに別の制御によるのかどうか、その全貌は未解明であるが、では、それらの引き金となるシグナルは何か、という疑問もまた未解明である。LLPSはイオン濃度やpH、ATP濃度、温度変化といった周囲の環境変化に反応して制御されることが知られている<sup>46, 48-50)</sup>。シナプス入力に伴う後シナプス周辺での環境変化、たとえば、 $\text{Na}^+$ や $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇にLLPSが影響を受けるとすれば、顆粒のダイナミクスが局所的に変化する可能性が考えられる。局所翻訳がシナプス入力に反応して起こるメカニズムの詳細が、今後、RNA顆粒動態制御の観点から明らかになっていくかもしれない。

### 3. RNA顆粒による制御と長期記憶形成

記憶はその持続時間から分類すると、数分間続く短期記憶と、数時間、数日、数か月、あるいはそれ以上にわたり維持される長期記憶に分類される。この長期記憶の形成には、シナプスの長期増強が必須であり、さらにその基盤として樹状突起における局所翻訳が重要であることが知られている。上述のように、RNA顆粒による制御が局所翻訳の各ステップに深く関与することが明らかにされてきたが、では、RNA顆粒は長期記憶の形成に実際影響を及ぼすのだろうか。

RNA顆粒によって輸送されるmRNAに注目した研究例として、マウスにおける*Camk2a* mRNAに関する報告があげられる。*Camk2a* mRNAは、3'UTR上に輸送責任cis領域が存在し、その領域を欠損させるとmRNAの樹状突起局在化が低下し、それに伴いシナプス長期増強および長期記憶が低下することが示されている<sup>51, 52)</sup>。しかし、このように特定のmRNAについて樹状突起局在の人為的操作を試みた研究は*Camk2a*のみにとどまっており、他のmRNAに関する知見の蓄積が求められている。

また、RNA顆粒を構成するIDPに注目した研究も進められている。ショウジョウバエを用いた研究では、Staufen, CPEB, FMRP, Pumilio等の欠損変異体で長期記憶

に障害がみられることが示されている。一方、マウスを用いた研究では、RNA顆粒構成因子を欠損させても長期記憶が低下するとは限らない。FMRPをコードする*FMRP translational regulator 1* (*Fmr1*) のノックアウトマウスでは、空間学習や恐怖条件づけ学習で長期記憶が低下するという報告と影響を受けないという報告とが混在しており、統一的知見が得られていない<sup>53-56</sup>。CPEB1やStau1のノックアウトマウスは空間学習や恐怖条件づけ学習において正常な記憶形成能を示し<sup>57,58</sup>、G3BP1ノックアウトマウスは作業記憶が低下するものの非空間学習の長期記憶は正常である<sup>59</sup>。Pum2ノックアウトマウスではむしろ空間学習の記憶が向上する傾向がみられている<sup>60</sup>。解析している記憶テストの種類が異なる場合もあり単純にこれらの結果を比較できない部分もあるが、RNA顆粒構成IDPが長期記憶形成に必ずしも影響を及ぼすわけではないことが示唆される。一方、Caprin1 (RNG105) はその欠損により、空間学習と恐怖条件づけ学習において、長期記憶が顕著に低下する<sup>24</sup>。

そこで、Caprin1と上述の他のIDPの間の相違点を考えてみたい。前章2.3節でふれたように、Caprin1の特筆すべき性質として、形成する顆粒が強い液相性を示すことがあげられる。この液相性は同じく液相様IDPであるG3BP1よりも顕著に高く<sup>47</sup>、分子の出入りや翻訳活性の上昇が起りやすい場の形成に大きく寄与する可能性が考えられる。RNA顆粒は固相様の性質が増すと凝集化し、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia: FTD) といった神経変性疾患をもたらすリスクが高まると考えられるため、固相に極度に傾かないような、液相-固相バランスの維持が常に求められる。そのうえで、さらに翻訳という一連の生化学反応を顆粒内で起こさせるには、分子の出入りや運動が起りうる液相状態にバランスが傾くことが必要だと考えられる。このような顆粒の流動性制御が、局所翻訳を介した長期記憶形成に重要な役割を果たすのかもしれない。より詳細な顆粒の物性や局所翻訳との関わりを解析する必要があるが、「顆粒の流動性制御」という数年前にはなかった新たな視点が、局所翻訳を理解するための本質的な問いをひもとく鍵になることが期待される。

#### 4. 細胞内相分離の解析ツール

RNA顆粒のLLPSや流動性制御が長期記憶形成や神経変性疾患にいかに関わるかを研究するためには、LLPSや流動性を生体の脳神経で計測・操作する技術が必要になる。それらの技術はこれまで、*in vitro* および培養細胞で開発が行われてきた。今後それらの技術が*in vivo*にも適用されるべく改良が進むと期待されるが、特に、培養細胞で開発されてきた蛍光計測・操作技術が応用・適用されていくと考えられる。そこで、神経細胞に限らず、一般に細胞内でLLPSや流動性の計測・操作に用いられている代表的な方

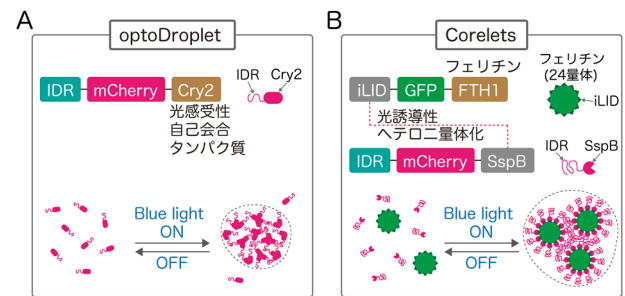


図6 細胞内相分離操作ツール

生細胞内で光照射により相分離を制御するツールとして報告された“optoDroplet”と“Corelets”の概略図。(A) optoDropletでは、光感受性自己会合タンパク質Cry2にIDRをつなぐことにより、青色光照射依存的にコンデンセートを形成することができる。(B) Coreletsでは、24量体を形成するフェリチンにiLIDと呼ばれる光活性化ドメインをつなげて発現させる。同時に、iLIDに光照射依存的に結合するSspB融合IDRを共発現させる。光照射によってIDRの多量体化(多価化)を誘導し、コンデンセートを形成することができる。

法について簡単に紹介する。

細胞内で特定のタンパク質がLLPSを起こしているか否かを評価する際に最もよく用いられている指標は、コンデンセートどうしが融合するか否かである<sup>61</sup>。コンデンセートが液相であれば表面張力によってできるだけ球体になろうとするため、融合後、融合点の径が増大していく。このとき、ライブイメージングでランダムに起こる融合を観察する方法もあれば、光ピンセット等を用いてコンデンセートどうしを近づけるように操作する方法もある。また、コンデンセートのダイナミクスを解析する際によく用いられるのが光退色後蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) である<sup>61</sup>。これは、解析対象となるタンパク質を蛍光でラベルし、LLPSにより形成されたコンデンセートに対してレーザー光を照射して蛍光を退色させ、その後、照射領域における蛍光の回復度を計測する方法である。コンデンセートへの分子の出入り速度およびコンデンセート内での分子の流動性が高ければ蛍光の回復度は高く、その逆であれば蛍光の回復度は低くなる。以上のような手法により、LLPSにより形成されたコンデンセートにおける分子のダイナミクスを評価することができる。

さらに、光照射により細胞内でのLLPSを操作するツールとして、“optoDroplet”<sup>62</sup>と“Core scaffolds to promote droplets (Corelets)”<sup>63</sup>が開発された(図6)。これらの方法は、「IDRの多量体化が相互作用の多価性を上昇させ、LLPSを促進する」という性質を利用したものである。この開発のヒントになったのは、生物に存在するIDPの多くが、構造を持った多量体化ドメインの結合を介してIDRの多価化およびLLPSを引き起こすという知見である。“optoDroplet”は多量体形成ドメインとして、青色光の照射により自己会合する光感受性タンパク質Cry2を用いる。Shinらは、特定のIDRにmCherryとCry2を融合させたタンパク質を培



養細胞内に発現させ、青色光照射依存的にコンデンセートを形成させることに成功した<sup>62)</sup> (図6A)。この方法では、青色光照射から数秒後にはコンデンセートの形成が認められ、光照射中は形成が維持され、光照射をOFFにするとコンデンセートの形成は解消される<sup>62)</sup>。よって、任意のIDPについて任意のタイミングで生細胞内で相分離を起こすことができる画期的なツールとして注目されている。

optoDropletをさらに改良した方法として報告されたのが“Corelets”である。optoDropletではCry2のホモ多量体化が直接LLPSを起こしてしまう可能性が排除できず、IDR依存的なLLPSの厳密な定量性に欠ける。また、光照射OFF後のCry2の不活性化時間に数分を要するため、光照射領域外に拡散したCry2がその数分間、活性化型として多量体を形成してしまい、厳密な局所での活性制御が難しい。そこでBrachaらは、IDRの多量体化を操作する方法として“Corelets”を開発した。GFPタグ化フェリチンに光活性化ドメインであるiLIDドメインをつなげたタンパク質と、iLIDとヘテロ二量体を形成するSspBに任意のmCherryタグ化IDRをつなげたタンパク質を培養細胞に共発現させる。フェリチンは24個のサブユニットが自己集合した球形の構造をとるため、IDR多量体化の核となるが、これ自体がLLPSを起こすことはない。青色光照射にตอบสนองしてiLIDとSspBがヘテロ二量体を形成するため、iLID-GFPフェリチン24量体とSspB-IDR-mCherryが結合してIDRが多価化し、それに依存してコンデンセートが形成される (図6B)。青色光照射開始の数秒後にはコンデンセートの形成が認められ、また、光照射OFF後1分程度で形成が解消される<sup>63)</sup>。細胞全体のみならず局所での制御、また、低濃度でのコンデンセート形成に成功しており、生体での相分離を模倣する系として報告されている。このような生細胞内でコンデンセート形成を操作する系を生体に適用することで、相分離の生理的意義の理解が進むことが期待される。

## 5. おわりに—RNA顆粒：コンデンセートの特性が生み出す生命現象と疾患リスク

樹状突起における局所翻訳の現象が報告されたのは今から約半世紀前、そして長期記憶をもたらすシナプス長期増強への関与が示唆されたのが四半世紀前であり、その後も局所翻訳に関わる多くの知見が蓄積されてきた。しかし、局所翻訳と長期記憶をつなぐメカニズムはいまだブラックボックスが多く残っており、あいまいな記述が書き換えられていない部分が多々ある。制御の鍵となるRNA顆粒が非膜オルガネラであることは以前から知られていたが、コンデンセートだからこそ可能となった制御機構という視点での報告は数年前まではほぼなかった。近年になり、LLPSの生命現象への関与が急速に注目され始めたことと相まって、RNA顆粒という構造体が持つ特性が捉え直されている。本稿で紹介したような特定の分子の凝縮や離

散、翻訳の場の時空間的なコントロールなど、局所翻訳を成立させる上でコンデンセート特有の制御様式が明らかにされ始めた。特に、顆粒の二相性、そして構成因子のダイナミクスの多様さは、液相と固相の巧妙なバランスによって生み出される生命現象、さらにその基盤となるメカニズムとして興味深い。他の細胞種でストレス応答時のみに形成されるストレス顆粒と異なり、神経細胞においては常にRNA顆粒が存在することで局所翻訳制御が行われているが、RNA顆粒は固相に傾きすぎてしまえば神経変性疾患につながるという大きなリスクを併せ持つ。このようにリスクとベネフィットが表裏一体のRNA顆粒という構造体を、LLPSの観点から解明していくことは、仮説にとどまっていた局所翻訳制御機構に具体性を与えるとともに、疾患の理解にも貢献する可能性を秘めている。

## 文 献

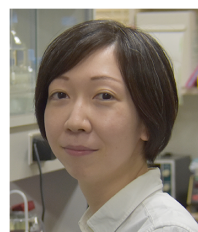
- 1) Martin, K.C. & Ephrussi, A. (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*, **136**, 719–730.
- 2) Holt, C.E. & Schuman, E.M. (2013) The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron*, **80**, 648–657.
- 3) Lin, A.C. & Holt, C.E. (2007) Local translation and directional steering in axons. *EMBO J.*, **26**, 3729–3736.
- 4) Jung, H., Yoon, B.C., & Holt, C.E. (2012) Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 308–324.
- 5) Kang, H. & Schuman, E.M. (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*, **273**, 1402–1406.
- 6) Sutton, M.A. & Schuman, E.M. (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell*, **127**, 49–58.
- 7) Costa-Mattioli, M., Sossin, W.S., Klann, E., & Sonenberg, N. (2009) Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, **61**, 10–26.
- 8) Kiebler, M.A. & Bassell, G.J. (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron*, **51**, 685–690.
- 9) El Fatimy, R., Davidovic, L., Tremblay, S., Jaglin, X., Dury, A., Robert, C., De Koninck, P., & Khandjian, E.W. (2016) Tracking the fragile X mental retardation protein in a highly ordered neuronal ribonucleoparticles population: A link between stalled polyribosomes and RNA granules. *PLoS Genet.*, **12**, e1006192.
- 10) Tsang, B., Arsenault, J., Vernon, R.M., Lin, H., Sonenberg, N., Wang, L.-Y., Bah, A., & Forman-Kay, J.D. (2019) Phosphoregulated FMRP phase separation models activity-dependent translation through bidirectional control of mRNA granule formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 4218–4227.
- 11) Kim, T.H., Tsang, B., Vernon, R.M., Sonenberg, N., Kay, L.E., & Forman-Kay, J.D. (2019) Phospho-dependent phase separation of FMRP and CAPRIN1 recapitulates regulation of translation and deadenylation. *Science*, **365**, 825–829.
- 12) Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D.K., Richter, D., Pozniakovsky, A., Poser, I., Bickle, M., Rizk, S., Guillén-Boixet, J., Franzmann, T.M., et al. (2018) RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science*, **360**, 918–921.
- 13) Guillén-Boixet, J., Kopach, A., Holehouse, A.S., Wittmann, S., Jahnel, M., Schlüßler, R., Kim, K., Trussina, I.R.E.A., Wang, J., Mateju, D., et al. (2020) RNA-induced conformational switching

- and clustering of G3BP drive stress granule assembly by condensation. *Cell*, **181**, 346–361.e17.
- 14) Langdon, E.M., Qiu, Y., Niaki, A.G., McLaughlin, G.A., Weidmann, C.A., Gerbich, T.M., Smith, J.A., Crutchley, J.M., Termini, C.M., Weeks, K.M., et al. (2018) mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation. *Science*, **360**, 922–927.
  - 15) Ries, R.J., Zaccara, S., Klein, P., Olarerin-George, A., Namkoong, S., Pickering, B.F., Patil, D.P., Kwak, H., Lee, J.H., & Jaffrey, S.R. (2019) m<sup>6</sup>A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*, **571**, 424–428.
  - 16) Ohashi, R. & Shiina, N. (2020) Cataloguing and selection of mRNAs localized to dendrites in neurons and regulated by RNA-binding proteins in RNA granules. *Biomolecules*, **10**, 167.
  - 17) Darnell, J.C., Van Driesche, S.J., Zhang, C., Hung, K.Y.S., Mele, A., Fraser, C.E., Stone, E.F., Chen, C., Fak, J.J., Chi, S.W., et al. (2011) FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, **146**, 247–261.
  - 18) Shiina, N., Shinkura, K., & Tokunaga, M. (2005) A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation. *J. Neurosci.*, **25**, 4420–4434.
  - 19) Udagawa, T., Farny, N.G., Jakovcevski, M., Kaphzan, H., Alarcon, J.M., Anilkumar, S., Ivshina, M., Hurt, J.A., Nagaoka, K., Nalavadi, V.C., et al. (2013) Genetic and acute CPEB1 depletion ameliorate fragile X pathophysiology. *Nat. Med.*, **19**, 1473–1477.
  - 20) Lucas, B.A., Lavi, E., Shiue, L., Cho, H., Katzman, S., Miyoshi, K., Siomi, M.C., Carmel, L., Ares, M. Jr., & Maquat, L.E. (2018) Evidence for convergent evolution of SINE-directed Staufen-mediated mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 968–973.
  - 21) Heraud-Farlow, J.E., Sharangdhar, T., Li, X., Pfeifer, P., Tauber, S., Orozco, D., Hörmann, A., Thomas, S., Bakosova, A., Farlow, A.R., et al. (2013) Staufen2 regulates neuronal target RNAs. *Cell Rep.*, **5**, 1511–1518.
  - 22) Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S.F., Wheeler, J.R., & Parker, R. (2017) The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules. *Mol. Cell*, **68**, 808–820.e5.
  - 23) Hallegger, M., Chakrabarti, A.M., Lee, F.C.Y., Lee, B.L., Amaliotti, A.G., Odeh, H.M., Copley, K.E., Rubien, J.D., Portz, B., Kuret, K., et al. (2021) TDP-43 condensation properties specify its RNA-binding and regulatory repertoire. *Cell*, **184**, 4680–4696.e22.
  - 24) Nakayama, K., Ohashi, R., Shinoda, Y., Yamazaki, M., Abe, M., Fujikawa, A., Shigenobu, S., Futatsugi, A., Noda, M., Mikoshiba, K., et al. (2017) RNG105/caprin1, an RNA granule protein for dendritic mRNA localization, is essential for long-term memory formation. *eLife*, **6**, e29677.
  - 25) Cajigas, I.J., Tushev, G., Will, T.J., tom Dieck, S., Fuerst, N., & Schuman, E.M. (2012) The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron*, **74**, 453–466.
  - 26) Ainsley, J.A., Drane, L., Jacobs, J., Kittelberger, K.A., & Reijmers, L.G. (2014) Functionally diverse dendritic mRNAs rapidly associate with ribosomes following a novel experience. *Nat. Commun.*, **5**, 4510.
  - 27) Tushev, G., Glock, C., Heumüller, M., Biever, A., Jovanovic, M., & Schuman, E.M. (2018) Alternative 3' UTRs modify the localization, regulatory potential, stability, and plasticity of mRNAs in neuronal compartments. *Neuron*, **98**, 495–511.e6.
  - 28) Padrón, A., Iwasaki, S., & Ingolia, N.T. (2019) Proximity RNA labeling by APEX-seq reveals the organization of translation initiation complexes and repressive RNA granules. *Mol. Cell*, **75**, 875–887.e5.
  - 29) Honda, M., Oki, S., Kimura, R., Harada, A., Machara, K., Tanaka, K., Meno, C., & Ohkawa, Y. (2021) High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nat. Commun.*, **12**, 4416.
  - 30) Bramham, C.R. & Wells, D.G. (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 776–789.
  - 31) Hirokawa, N. (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J. Neurosci.*, **26**, 7139–7142.
  - 32) Conde, C. & Cáceres, A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 319–332.
  - 33) Guillaud, L., El-Agamy, S.E., Otsuki, M., & Terenzio, M. (2020) Anterograde axonal transport in neuronal homeostasis and disease. *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 556175.
  - 34) Akhmanova, A. & Hoogenraad, C.C. (2015) Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr. Biol.*, **25**, R162–R171.
  - 35) van de Willige, D., Hoogenraad, C.C., & Akhmanova, A. (2016) Microtubule plus-end tracking proteins in neuronal development. *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 2053–2077.
  - 36) Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, **43**, 513–525.
  - 37) Dictenberg, J.B., Swanger, S.A., Antar, L.N., Singer, R.H., & Bassell, G.J. (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev. Cell*, **14**, 926–939.
  - 38) Liao, Y.-C., Fernandopulle, M.S., Wang, G., Choi, H., Hao, L., Drerup, C.M., Patel, R., Qamar, S., Nixon-Abell, J., Shen, Y., et al. (2019) RNA granules hitchhike on lysosomes for long-distance transport, using annexin A11 as a molecular tether. *Cell*, **179**, 147–164.e20.
  - 39) Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T.-A., & Anzai, K. (2002) Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 37804–37810.
  - 40) Fritzsche, R., Karra, D., Bennett, K.L., Ang, F.Y., Heraud-Farlow, J.E., Tolino, M., Doyle, M., Bauer, K.E., Thomas, S., Planavsky, M., et al. (2013) Interactome of two diverse RNA granules links mRNA localization to translational repression in neurons. *Cell Rep.*, **5**, 1749–1762.
  - 41) Na, Y., Park, S., Lee, C., Kim, D.-K., Park, J.M., Sockanathan, S., Haganir, R.L., & Worley, P.F. (2016) Real-time imaging reveals properties of glutamate-induced Arc/Arg 3.1 translation in neuronal dendrites. *Neuron*, **91**, 561–573.
  - 42) Langille, J.J., Ginzberg, K., & Sossin, W.S. (2019) Polysomes identified by live imaging of nascent peptides are stalled in hippocampal and cortical neurites. *Learn. Mem.*, **26**, 351–362.
  - 43) Krichevsky, A.M. & Kosik, K.S. (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron*, **32**, 683–696.
  - 44) Klann, E. & Dever, T.E. (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 931–942.
  - 45) Mateju, D., Eichenberger, B., Voigt, F., Eglinger, J., Roth, G., & Chao, J.A. (2020) Single-molecule imaging reveals translation of mRNAs localized to stress granules. *Cell*, **183**, 1801–1812.e13.
  - 46) Jain, S., Wheeler, J.R., Walters, R.W., Agrawal, A., Barsic, A., & Parker, R. (2016) ATPase-modulated stress granules contain a

- diverse proteome and substructure. *Cell*, **164**, 487–498.
- 47) Shiina, N. (2019) Liquid- and solid-like RNA granules form through specific scaffold proteins and combine into biphasic granules. *J. Biol. Chem.*, **294**, 3532–3548.
  - 48) Krainer, G., Welsh, T.J., Joseph, J.A., Espinosa, J.R., Wittmann, S., de Csilléry, E., Sridhar, A., Toprakcioglu, Z., Gudískytė, G., Czekalska, M.A., et al. (2021) Reentrant liquid condensate phase of proteins is stabilized by hydrophobic and non-ionic interactions. *Nat. Commun.*, **12**, 1085.
  - 49) Hong, K., Song, D., & Jung, Y. (2020) Behavior control of membrane-less protein liquid condensates with metal ion-induced phase separation. *Nat. Commun.*, **11**, 5554.
  - 50) Ismail, H., Liu, X., Yang, F., Li, J., Zahid, A., Dou, Z., Liu, X., & Yao, X. (2021) Mechanisms and regulation underlying membraneless organelle plasticity control. *J. Mol. Cell Biol.*, **13**, 239–258.
  - 51) Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K., & Kandel, E.R. (1996) The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13250–13255.
  - 52) Miller, S., Yasuda, M., Coats, J.K., Jones, Y., Martone, M.E., & Mayford, M. (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*, **36**, 507–519.
  - 53) Ding, Q., Sethna, F., & Wang, H. (2014) Behavioral analysis of male and female Fmr1 knockout mice on C57BL/6 background. *Behav. Brain Res.*, **271**, 72–78.
  - 54) Uutela, M., Lindholm, J., Louhivuori, V., Wei, H., Louhivuori, L.M., Pertovaara, A., Akerman, K., Castrén, E., & Castrén, M.L. (2012) Reduction of BDNF expression in Fmr1 knockout mice worsens cognitive deficits but improves hyperactivity and sensorimotor deficits. *Genes Brain Behav.*, **11**, 513–523.
  - 55) Baker, K.B., Wray, S.P., Ritter, R., Mason, S., Lanthorn, T.H., & Savelieva, K.V. (2010) Male and female Fmr1 knockout mice on C57 albino background exhibit spatial learning and memory impairments. *Genes Brain Behav.*, **9**, 562–574.
  - 56) D'Hooge, R., Nagels, G., Franck, F., Bakker, C.E., Reyniers, E., Storm, K., Kooy, R.F., Oostra, B.A., Willems, P.J., & De Deyn, P.P. (1997) Mildly impaired water maze performance in male Fmr1 knockout mice. *Neuroscience*, **76**, 367–376.
  - 57) Berger-Sweeney, J., Zearfoss, N.R., & Richter, J.D. (2006) Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn. Mem.*, **13**, 4–7.
  - 58) Vessey, J.P., Macchi, P., Stein, J.M., Mikl, M., Hawker, K.N., Vogelsang, P., Wicczorek, K., Vendra, G., Riefler, J., Tübing, F., et al. (2008) A loss of function allele for murine Stauf1 leads to impairment of dendritic Stauf1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16374–16379.
  - 59) Martin, S., Zekri, L., Metz, A., Maurice, T., Chebli, K., Vignes, M., & Tazi, J. (2013) Deficiency of G3BP1, the stress granules assembly factor, results in abnormal synaptic plasticity and calcium homeostasis in neurons. *J. Neurochem.*, **125**, 175–184.
  - 60) Siemen, H., Colas, D., Heller, H.C., Brüstle, O., & Pera, R.A.R. (2011) Pumilio-2 function in the mouse nervous system. *PLoS One*, **6**, e25932.
  - 61) Mitrea, D.M., Chandra, B., Ferrolino, M.C., Gibbs, E.B., Tolbert, M., White, M.R., & Kriwacki, R.W. (2018) Methods for physical characterization of phase-separated bodies and membraneless organelles. *J. Mol. Biol.*, **430**, 4773–4805.
  - 62) Shin, Y., Berry, J., Pannucci, N., Haataja, M.P., Toettcher, J.E., & Brangwynne, C.P. (2017) Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optoDroplets. *Cell*, **168**, 159–171.e14.
  - 63) Bracha, D., Walls, M.T., Wei, M.-T., Zhu, L., Kurian, M., Avalos, J.L., Toettcher, J.E., & Brangwynne, C.P. (2018) Mapping local and global liquid phase behavior in living cells using photo-oligomerizable seeds. *Cell*, **175**, 1467–1480.e13.

## 著者寸描

### ●大橋 りえ (おおはし りえ)



自然科学研究機構生命創成探究センター神経分子動態生物学研究グループ、自然科学研究機構基礎生物学研究所神経細胞生物学研究室、総合研究大学院大学助教。博士（理学）。

■略歴 2014年東京理科大学理工学部応用生物科学科卒業。19年総合研究大学院大学生命科学研究科基礎生物学専攻修了。日本学術振興会特別研究員PD（富山大学）を経て、21年より現職。

■研究テーマと抱負 mRNA局在制御を介した長期記憶形成機構の解明。局所翻訳の *in vivo* イメージングに挑戦中。“記憶”—その人をその人たらしめる要素であり、人間の「生」の根幹—その制御機構を解く1ピースを生み出したい。

■ウェブサイト <https://www.nibb.ac.jp/sections/laboratory/shiina/>

■趣味 筋トレ。

### ●椎名 伸之 (しいな のぶゆき)



自然科学研究機構生命創成探究センター神経分子動態生物学研究グループ、自然科学研究機構基礎生物学研究所神経細胞生物学研究室、総合研究大学院大学准教授。博士（理学）。

■略歴 1991年東京大学理学部生物化学科卒業。96年同大学院理学系研究科生物化学専攻修了。日本学術振興会特別研究員PD、ERATO月田細胞軸プロジェクト

グループリーダー、国立遺伝学研究所助教、東京工業大学助教を経て、2009年より現職。

■研究テーマと抱負 神経細胞におけるmRNA輸送・局所的翻訳による学習・記憶制御機構の解明を目指す。液-液相分離研究はその一環である。

■ウェブサイト <https://www.nibb.ac.jp/sections/laboratory/shiina/>