

翻訳開始過程を標的としたタンパク質合成のファインチューニング

藤原 俊伸

1. はじめに

一般的に、真核生物のmRNAの5'末端にはcap構造、そして3'末端にpoly(A)が存在する。翻訳は、cap構造が翻訳開始因子eIF4Eに認識されることで開始される。このとき、poly(A)に結合するタンパク質因子PABP (poly(A) binding protein) とeIF4Gとが結合し、mRNAは環状になっている(図1)。環状化により、翻訳の効率が上昇し、mRNAは分解から逃れて安定化していると考えられている。そして、この翻訳の開始こそ、タンパク質合成の可否を決定する重要なステップである。特に、翻訳開始因子によるcap構造の認識は最も重要であり、eIF4Fと呼ばれるタンパク質複合体がこの過程を担っている。eIF4Fは、cap構造を直接認識し結合するeIF4E、ヘリカーゼ活性を持つeIF4A、PABPと結合しmRNAの環状構造に寄与するeIF4Gから構成される¹⁾。真核生物において、このeIF4F複合体はタンパク質の鋳型となるすべてのmRNA上に形成される高次複合体である。eIF4Eによる5'末端のcap構造認識に始まるeIF4F複合体の形成は翻訳の律速状態であり、時間空間的にタンパク質合成を正あるいは負に調節する上でこの過程を制御することは効率がよい。したがって、その形態は翻訳の必要性に応じて動的に変化し、さまざまな細胞シグナルによって緻密に制御されている。

2. 翻訳開始複合体を標的とした翻訳開始制御機構

1) 4E-BPによる翻訳開始制御機構

eIF4F複合体形成を標的とした翻訳開始制御機構のうち、代表的な例が、4E-BP (eIF4E binding protein) による翻訳開始制御機構である。4E-BPはeIF4Gと競合してeIF4Eに結合し、eIF4F複合体の形成を阻害して翻訳開始を抑制する。4E-BPは活性化されたmTOR (mammalian tar-

get of rapamycin) によってリン酸化され、eIF4Eから解離し、翻訳開始が活性化される²⁾。mTORは真核生物に高度に保存されたセリン/トレオニンキナーゼであり、成長因子をはじめとするさまざまな細胞シグナルに応じて細胞内の代謝、細胞の生死などを制御している。つまり、細胞環境に応答してタンパク質合成の可否を決めるシステムが備わっている。

2) 「atypical翻訳開始複合体」による翻訳開始制御機構

近年、さまざまなRNA結合タンパク質およびmicroRNA (以下miRNA) などの制御因子がmRNAに結合することにより翻訳開始過程を制御し、時間空間的なタンパク質合成の制御を可能にしていることが明らかになってきた。特に、翻訳開始因子ではないRNA結合タンパク質が加わり形成する「atypical翻訳開始複合体」は、長期的な翻訳抑制状態の維持とその後のシグナルに即応したタンパク質合成を達成するためのmRNA上の制御記憶装置として、神経分化や初期発生の過程に寄与している。数多くの実例がこれまで報告され、優れた総説も執筆されているので詳細はそちらを参考されたい³⁻⁵⁾。本稿では、我々が研究対象としている神経特異的RNA結合タンパク質HuDについてその翻訳制御機構を3節で取り上げる。

3) microRNAによる翻訳開始制御機構

microRNA (miRNA) は約22塩基の小分子RNAであ

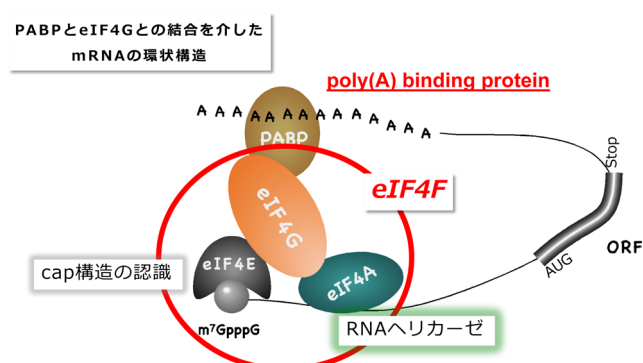


図1 真核生物における翻訳開始過程

真核生物における翻訳開始複合体モデル。翻訳はeIF4F (eIF4E, eIF4G, eIF4Aの複合体) によるcap構造 (m⁷GpppG) の認識から始まる。mRNAはpoly(A)鎖に結合するPABPとeIF4Gとの結合により環状構造をとる。

近畿大学薬学部医療薬学科生化学研究室 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江3-4-1)

Fine-tuning of translation initiation by RNA binding proteins

Toshinobu Fujiwara (Laboratory of Biochemistry, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880135

© 2016 公益社団法人日本生化学会

り、ゲノムにコードされている non-coding RNA (非コード RNA) である。miRNA は、miRNA 結合タンパク質である Ago (Argonaute) タンパク質と RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる RNA-タンパク質複合体を形成して機能する。miRNA はその配列に対して相補的な配列を有する標的 mRNA の分解経路への誘導、さらにはタンパク質合成の抑制 (翻訳抑制) をもたらす⁶⁾。近年の精力的な研究により miRNA による mRNA の分解機構については明らかになりつつあるが、どのような素過程で翻訳を抑制するのかについては不明なままであった。

ショウジョウバエでは、東京大学分子細胞生物学研究所・泊幸秀教授のグループにより、Argonaute 1 (Ago1) を含む RISC は、Ago1 結合タンパク質である GW182 との結合を介して脱アデニル化酵素複合体を標的 mRNA へと誘導して poly(A) 鎖の分解を引き起こすこと、さらに、RISC には poly(A) 鎖の分解が起因となる mRNA の不安定化とは独立して翻訳そのものを抑制する機能があることが明らかにされていた⁷⁾。さらに、この翻訳抑制には GW182 との結合に依存する機構と依存しない機構との少なくとも二つの異なる経路が存在することも明らかにされている⁸⁾。これらの翻訳抑制機構はともに標的 mRNA への 40S リボソーム小サブユニットの結合過程が阻害されていることが明らかになっているが、その素過程は不明なままであった。一方、ヒト培養細胞を用いた解析では、哺乳類では eIF4AI および eIF4AII の 2 種類が存在する eIF4A タンパク質のうち、miRNA による翻訳抑制機構には eIF4AII が必須であり、eIF4AII は脱アデニル化酵素複合体の構成因子と特異的に結合することが明らかにされた⁹⁾。そして、それまで eIF4AI と同様に eIF4F 複合体を形成する翻訳開始因子として翻訳を正に制御すると考えられていた eIF4AII が、miRNA によって誘導される翻訳抑制の中心因子として据えられるという衝撃的なモデルが提示された⁹⁾。しかしながら、eIF4A が有するヘリカーゼ活性や ATPase 活性の活性中心とは無関係な N 末端の数アミノ酸の違いを除き、ほぼ同一のアミノ酸配列を持つ eIF4AI と eIF4AII との機能の違いについて示された報告はない。また、ショウジョウバエに発現している eIF4A タンパク質は 1 種類のみであり¹⁰⁾、しかも哺乳類の eIF4AII との相同性が高い。また、eIF4AII をゲノム編集技術によりノックアウトした培養細胞においても miRNA による翻訳抑制が観察されている¹¹⁾。以上のような知見から、eIF4AII が翻訳の阻害因子として機能するというモデルについては否定的な意見が大勢を占めていた。

一方、我々は、これまでに哺乳細胞抽出物を用いて、cap-poly(A)mRNA の翻訳を厳密に評価できる *in vitro* 翻訳系を構築してきた¹²⁾。この系では、翻訳開始因子による cap 複合体形成過程を観察可能であり、mRNA の安定性も

同時に評価できる。そこで我々は、独自に開発したヒト培養細胞を使った *in vitro* 翻訳システムを拡張し、*in vitro* miRNA 機能解析系を構築した。そしてヒトにおいても、ショウジョウバエやゼブラフィッシュと同様に、poly(A) 短鎖化とは独立した miRNA による翻訳抑制機構が存在することを明らかにした¹³⁾。さらに、我々は λ ファージの N タンパク質由来ペプチドとグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質、および N タンパク質によって認識されるヘアピン型 RNA である BoxB 配列を用いた mRNA pull-down 系を構築した。この実験系では翻訳の各ステップで mRNA 上に形成される mRNA-タンパク質複合体 (mRNP) を分離可能である。この実験系を用いて、miRNA が標的配列を有する mRNA 上に形成される翻訳開始複合体にどのような影響を与えているのかを詳細に調べた結果、RISC が誘導された標的 mRNA 上に形成される翻訳開始複合体では、eIF4AI および eIF4AII が欠如していることが明らかになった。そこで、eIF4A タンパク質を mRNA 上に固定したところ、miRNA による翻訳抑制効果は失われた。また、高度に精製した組換え eIF4AI および eIF4AII タンパク質の *in vitro* miRNA 解析系への添加により、miRNA による翻訳抑制効果は減じた。以上の結果より、miRISC を含む翻訳抑制複合体の標的因子は eIF4AI および eIF4AII であり、mRNA 上の eIF4F 形成の阻害もしくは eIF4F の破壊によって翻訳を抑制している可能性が強く示唆された (図 2)¹³⁾。また、これらの結果は、先の報告とは異なり、我々の *in vitro* 翻訳解析系においては eIF4AI および eIF4AII は翻訳を正に制御する活性を持つタンパク質であることが確認された。同様の結果は、泊教授のグループのショウジョウバエを用いた解析系でも得られており、同時に *Molecular Cell* 誌上に報告されている。

しかしながら、eIF4AI と eIF4AII の発現比率が組織によって異なるという報告¹⁴⁾ もあり、実際の細胞内において両者が異なる働きをしている可能性も否定できない。eIF4AI および eIF4AII の機能差異については今後さらなる解析および議論が必要である。

3. Hu タンパク質による翻訳制御

1) Hu タンパク質群

哺乳類 Hu タンパク質は、小細胞肺癌に伴う神経変性疾患の際に出現する自己抗体の抗原として発見された RNA 結合タンパク質であり、分子内に三つの RNA 結合ドメイン (RBD: RNA binding domain) が存在する。脊椎動物では 4 種類の Hu タンパク質 (HuR, HuB, HuC, HuD) が同定されており、そのうち 3 種 (HuB, HuC, HuD) は主として神経特異的に発現がみられる。さらに、HuB, HuC, HuD は神経幹細胞がニューロンに分化することが決定づ

けられた神経前駆細胞で発現し始め、成熟したニューロンにおいても持続的に発現がみられる¹⁵⁾。このような知見から、神経特異的Huタンパク質の機能に関し、神経細胞機能との関連性、特に神経細胞内のmRNAの転写後レベルの制御機構に寄与する可能性が示唆されてきた。そして、4種のHuタンパク質はすべてmRNAの急速な分解を規定する配列であるAU-rich element (ARE) に結合特異性を示すことが判明している。欠失変異体を用いた解析から、N末端側の二つのRBD (RBD1およびRBD2) がAREへの結合能に必要であること、C末端に存在するRBD3は、poly(A)配列への結合特異性を示すことが判明している¹⁵⁾。その後の生化学的な解析により、Huタンパク質はAREを持つmRNAの安定化に寄与することが判明し、加えて翻訳制御を行っている可能性も示唆されていた。しかしながら、Huタンパク質が関与する翻訳機構の素過程は長らく謎のままであった。本節では、Huタンパク質群のうち、神経特異的に発現がみられるHuDタンパク質の翻訳過程への寄与に焦点を当てる。

2) HuDタンパク質による翻訳制御機構

これまでにさまざまなRNA結合タンパク質が翻訳制御に関わっていることが報告されているが、その素過程までに迫っているものは実は少ない。我々は、HuDがpoly(A)に直接結合すること、そして翻訳が活発に行われているポリソーム画分にHuDが存在することから、「Huは翻訳機構に直接関わる」という仮説を立てた。ここで脳裏に浮かんだのがPABPである。PABPはpoly(A)および翻訳開始因子eIF4Gと同時に結合することでmRNAを環状化し、翻訳効率を上昇、mRNAを安定化させる。そこで、HuDの機能をPABPのアナロジーで考え、翻訳開始複合体と相互作用するかどうかを検証した。そして、その結果、HuDがpoly(A)および翻訳開始因子eIF4Aとの結合を介して、翻訳開始複合体と相互作用することを明らかにした。次に、培養細胞抽出液を用いたcap-poly(A)mRNAからの翻訳を試験管内で再現できる独自の実験系を構築し、HuDが翻訳を正に制御するのかあるいは負に制御するのかを検証した。そして、その結果、HuDがpoly(A)およびeIF4Aとの結合を介して、翻訳開始複合体と相互作用し、翻訳を正に制御することを発見した。次にPC12細胞を用いて翻訳活性化能と分化誘導能との関係を検証した。その結果、HuDの翻訳活性化機能が神経細胞への分化に必須であることが明らかとなった¹²⁾。HuDは、まさに機構に直接アクセスし、「atypical翻訳開始複合体」を形成し、タンパク質合成を活性化させる因子であったのである(図3)。

それではどのようにしてHuDは翻訳を活性化しているのでしょうか。我々は、これまでにシグナル伝達因子である活性型Akt1がHuDと直接かつ特異的に結合することを

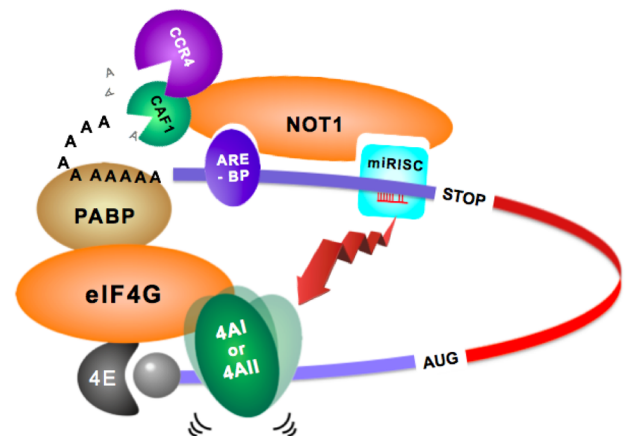


図2 microRNA (miRNA) の機能モデル

Agoタンパク質などに取り込まれ、RISCを形成したmiRNA (miRISC) は、標的配列上に脱アデニル化酵素複合体 (CCR4-CAF1-NOT1 複合体) を呼び寄せ、poly(A)の短鎖化を誘導する。一方、miRISCは何らかの方法でeIF4F複合体からeIF4A (eIF4AIおよびeIF4AII) を解離させる。STOP: 終止コドン。

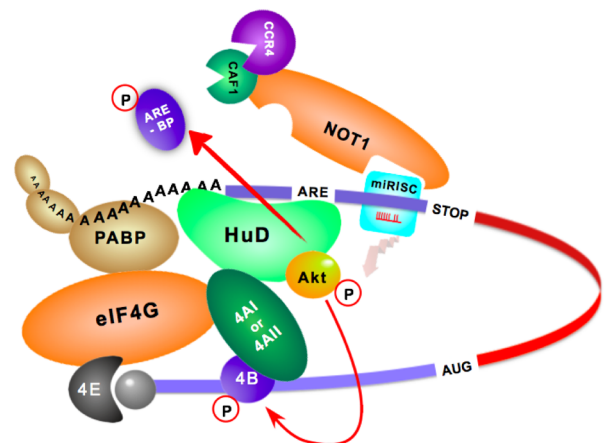


図3 「atypical翻訳開始複合体」を形成し翻訳を正に制御するHuDの機能モデル

eIF4Aタンパク質およびpoly(A)鎖との結合を介して「atypical翻訳開始複合体」を形成したHuDは、翻訳開始複合体中にシグナル伝達因子Akt1の活性化型を呼び込み、eIF4A活性化因子であるeIF4Bをリン酸化する。一方、mRNAを不安定化させる配列であるAREおよびその結合タンパク質はAkt1によりリン酸化され、mRNAより解離する。さらに、miRISCによるeIF4Aへの攻撃はHuD-eIF4A相互作用により相殺される。

見いだしている¹⁶⁾。そして、非常に興味深いことに、HuDは活性型Akt1の基質ではなく、活性型のAkt1はHuD依存的に翻訳開始複合体に含まれることを明らかにした。一方、Akt1はmTORを介さず翻訳開始因子eIF4Bを直接リン酸化することができる。リン酸化eIF4BはeIF4Aのヘリカーゼ活性を上昇させ、翻訳開始効率を上昇させることが知られている。また、AREに結合してmRNAの分解を誘導するARE結合タンパク質 (ARE-BP) もやはりAkt1

によりリン酸化され、標的mRNAから解離することが知られている。これらの知見および我々の研究成果から、「HuDの標的mRNA上に形成される翻訳開始複合体にリクルートされた活性型Akt1がeIF4Bをリン酸化し、局所翻訳に寄与している」という仮説をたてている（図3）。

3) HuD タンパク質と miRNA との関係

分化したPC12細胞およびP19細胞において、HuDがP-body構成因子の一つであるDcp1と共局在することが報告されている¹⁷⁾。さらに、全組織で発現がみられるHuRとmiRNAとの関係に関する相反する二つの報告がある。一方は塩基性アミノ酸トランスポーターCAT-1 mRNAのmicroRNAによる翻訳抑制をHuRが解除するというもの¹⁵⁾、他方はc-Myc mRNA上にHuRがmiRNAとRISCをリクルートし、その翻訳を抑制するというものである¹⁸⁾。以上のような背景から、Huタンパク質群による遺伝子発現制御機構とmiRNAによる遺伝子発現制御との間に密接な関係があることが予想された。すでに、答えは述べているのだが、miRNA、HuDともにその翻訳制御の標的が翻訳開始である。さらに、HuDはeIF4Aと結合することで翻訳を活性化し、miRNAはeIF4Aを開始複合体から解離させることで翻訳を抑制する。このような状況下、我々がHuD存在下および非存在下におけるmiRNAの翻訳抑制を検証することはごく自然な流れであった。検証の結果、HuD存在下ではmiRNAによる翻訳抑制効果はみられず、さらにこのときいずれのeIF4Aも翻訳開始複合体から解離されることなく存在していた¹³⁾。現在、我々は図3のようなモデルをたてている。今後、神経系での部位特異的翻訳の活性化とmiRNAによる翻訳抑制との拮抗関係が明らかになることを期待している。

文 献

- 1) Hinnebusch, A.G. & Lorsch, J.R. (2012) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011544.
- 2) Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., & Sonenberg, N. (2006) *Oncogene*, **25**, 6416–6422.
- 3) 藤原俊伸, 坂本博 (2007) RNAと生命 (中村義一編), pp. 2609–2616, 共立出版.
- 4) 深尾亜喜良, 藤原俊伸 (2011) 医学のあゆみ, 238, pp. 418–425.
- 5) 藤原俊伸 (2012) 細胞工学, 31, pp. 646–654.
- 6) Fabian, M.R. & Sonenberg, N. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 586–593.
- 7) Fukaya, T. & Tomari, Y. (2011) *EMBO J.*, **30**, 4998–5009.
- 8) Fukaya, T. & Tomari, Y. (2012) *Mol. Cell*, **48**, 825–836.
- 9) Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., & Bushell, M. (2013) *Science*, **340**, 82–85.
- 10) Dorn, R., Morawietz, H., Reuter, G., & Saumweber, H. (1993) *Mol. Gen. Genet.*, **237**, 233–240.
- 11) Galicia-Vazquez, G., Chu, J., & Pelletier, J. (2015) *RNA*, **21**, 1826–1833.
- 12) Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., Thoma, C., & Fujiwara, T. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 1007–1017.
- 13) Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., & Fujiwara, T. (2014) *Mol. Cell*, **56**, 79–89.
- 14) Galicia-Vazquez, G., Cencic, R., Robert, F., Agenor, A.Q., & Pelletier, J. (2012) *RNA*, **18**, 1373–1384.
- 15) Hinman, M.N. & Lou, H. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3168–3181.
- 16) Fujiwara, T., Fukao, A., Sasano, Y., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Imataka, H., Inoue, K., Endo, S., Sonenberg, N., Thoma, C., & Sakamoto, H. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1944–1953.
- 17) Blumenthal, J. & Ginzburg, I. (2008) *J. Cell Sci.*, **121**, 3253–3260.
- 18) Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., & Gorospe, M. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 1743–1748.

著者寸描

●藤原 俊伸 (ふじわら としのぶ)

近畿大学薬学部生化学研究室教授。博士（医学）。

■略歴 2002年東京大学大学院医学系研究科博士課程修了（博士（医学））。03年神戸大学大学院自然科学研究科生命機構科学専攻助手。06年科学技術振興機構さきがけ「RNAと生体機能」研究者兼任（～10年3月）。07年神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻准教授。11年公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所主席研究員。13年名古屋市立大学薬学部教授。15年現職。

■ウェブサイト <http://www.phar.kindai.ac.jp/biochemistry/>