

eIF4A 阻害の多様なメカニズム

岩崎 信太郎^{1,2}

1. はじめに

細胞内ではいわゆる「分子生物学のセントラルドグマ」に従い、ゲノムDNAからRNA, RNAからタンパク質へと遺伝情報が引き渡される。近年の研究からRNAは単なる情報の担い手として働くわけではなく、積極的に制御され、最終的に翻訳されるタンパク質量を絶妙にコントロールしていること、さらにそれらが多種多様な生命現象を引き起こすことが明らかになりつつある。また、翻訳の制御に異常をきたすことによってがんを含む疾患が生じることからもその重要性が示唆されている。それを逆にとり、異常になった翻訳を薬剤を用いて阻害することにより、がん細胞を標的として攻撃できることが明らかになりつつある¹⁻³⁾。

2. 翻訳開始因子 eIF4A

翻訳は多段階反応を経る非常に複雑な反応である。典型的には「開始」、「伸長」、「終結」の三つのステップに大別されるが、その中でも翻訳開始は全体の反応の律速段階であることが知られており、実際にさまざまなメカニズムで制御を受ける。翻訳の開始はeukaryotic translation initiation factor (eIF) と呼ばれる因子によって行われる。特にcap結合タンパク質であるeIF4E、足場タンパク質であるeIF4G、DEAD-boxタンパク質であるeIF4AからなるeIF4F複合体がmRNAのcap構造を認識することが翻訳開始の第一段階である(図1A)。

eIF4Aは下記で概観するように多様な種類の分子によって制御を受けることから、その重要性が広く認知されている。eIF4Aを含むDEAD-boxタンパク質は一般にN末端ド

メインとC末端ドメイン、またこれらをつなぐリンカーからなる。通常はこれら二つのドメインが離れたopen型の構造をとる。DEAD-boxタンパク質はATP依存的RNA結合タンパク質であると捉えることができ、N末端ドメインとC末端ドメインに挟まれる形でATPが結合し、それに伴ってRNA結合インターフェイスが形成される(これをclosed型と呼ぶ)。同時にDEAD-boxタンパク質はATP加水分解酵素としても働き、ATPをADPに加水分解することによって再びopen型に変化し、RNAから解離する。このATP依存的なRNAへの結合と解離のサイクルが翻訳に重要であることがわかっている(図1B)。

DEAD-boxタンパク質は二本鎖RNAを解くRNAヘリカーゼとしても働く。通常二本鎖RNAはA型ヘリックス

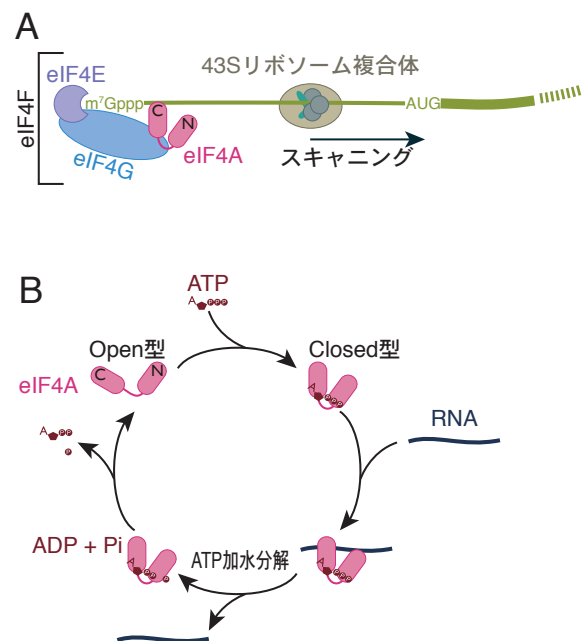


図1 eIF4Aの機能

(A) 翻訳開始におけるeIF4Aの機能。eIF4AはeIF4GおよびeIF4EとeIF4F複合体を形成し、mRNAのcap構造に結合する。その後、43Sリボソーム複合体をmRNA上にリクルートし、スキャニングの過程を促進する。(B) eIF4Aの生化学的活性。eIF4AはATPへの結合とともにRNAと結合する。eIF4AはATP加水分解酵素として働き、ATPの加水分解と共役してRNAから解離する。以上のATP依存的なRNAへの結合解離のサイクルが翻訳に重要であることがわかっている。

¹理化学研究所RNAシステム生化学研究室(〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1 生物科学研究棟S206)

²東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻
The diverse modes of eIF4A inhibition
Shintaro Iwasaki^{1,2} (¹RNA Systems Biochemistry Laboratory, RIKEN, S205 Bioscience Bldg. 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan, ²Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900211

© 2018 公益社団法人日本生化学会

を組む。これに対し、DEAD-boxタンパク質上に結合したRNAは折れ曲がった立体配置をとりA型ヘリックスを形成することができない。このことにより、DEAD-boxタンパク質はRNAの二次構造を解きほぐすことができると考えられている。翻訳の開始は一般に43Sリボソーム複合体が5' UTR (untranslated region, 非翻訳領域) 上を移動しつつAUG開始コドンを探すスキャニング (scanning) という過程を経る。eIF4AはRNAヘリカーゼ活性により5' UTR中に生じるRNA二次構造を解きほぐすことによって、スキャニングを促進していると長らく考えられてきた。しかしながら、最新の知見では必ずしもeIF4Aは5' UTR中の二次構造を解きほぐすだけではないことが示唆されており^{4,5)}、eIF4Aの真の機能を理解するにはより詳細な研究が必要であろう。

3. eIF4Aを介する翻訳阻害

翻訳開始因子は生物にとって必須な因子であるので、遺伝学的な解析が難しい側面がある。しかし、eIF4Aを標的にする小分子化合物が複数単離されており、それらはこの問題を克服することができる非常に有用なツールとして用いられている (表1)。また、それらのいくつかは抗がん作用を持つことも知られており、現在盛んに研究されている。

1) Hippuristanol

Hippuristanolはサンゴである *Isis hippuris* から単離された天然小分子化合物である⁶⁾。この阻害剤はeIF4AのC末端ドメインに結合し、N末端ドメインとの分子内相互作用を阻害することでclosed型構造の形成を抑制していると考えられている⁷⁾。これによりeIF4AはRNAと結合することができない。以上のような性質から、Hippuristanolは単純にeIF4Aの活性を不活化すると考えられており、広く翻訳研究に用いられている^{5,6)}。

2) Pateamine A

Pateamine Aも同様に海洋生物であるミカーレカイメン属 (*Mycale* sp.) の海綿から単離された天然小分子化合物である^{8,9)}。しかしながら、Pateamine Aの効果はHippuristanolと対照的である。Pateamine AはeIF4Aのリンカー配列に結合しつつclosed型の構造を促し、その結果eIF4AとRNAの結合を安定化させる¹⁰⁾。これにより、eIF4AはmRNAに非特異的に結合しトラップされてしまう。最終的に翻訳に参加することのできるeIF4Aの量が減少し、翻訳が阻害されると考えられている¹¹⁾。

以上のような小分子はもとより、eIF4Aは自身に結合するタンパク質からも制御を受ける。eIF4Aは内在のタンパク質に加え、外来病原体由来のタンパク質の標的にもなっている (表1)。

3) PDCD4 (programmed cell death 4)

PDCD4は腫瘍抑制因子として働くタンパク質であり、eIF4Aへの結合を通じて翻訳を阻害する。通常の細胞ではPDCD4がリン酸化やプロテオソーム系による分解を介して不活化され、翻訳は阻害されずにすみ、細胞が増殖する。PDCD4はMA3と呼ばれるドメインを二つ持つがこれらが協調して、2分子のeIF4Aと結合する。PDCD4に結合したeIF4Aはclosed型の構造をとることができず活性が阻害される¹²⁾。また、eIF4A上のPDCD4への結合領域はeIF4Gへの結合領域とオーバーラップしているため、競合阻害が生じさらに翻訳が阻害されると考えられる¹³⁾。

4) RISC (RNA-induced silencing complex)

小分子RNAの一種であるmicro RNA (miRNA) はArgonauteタンパク質に直接取り込まれ、RISCと呼ばれる複合体を形成する。RISCはmiRNAをガイドに、その配列と相補的な配列を持つmRNAからの翻訳を阻害することが知られている。そのメカニズムの詳細については未知の部分が多いが、eIF4Aを標的mRNAから乖離させ、翻訳を阻害

表1 eIF4Aを介する翻訳阻害の概要

	RNA結合	ATP結合	Unwinding	ATPase	eIF4F 複合体形成	特殊な効果	標的部位	構造状態
Hippuristanol	減少	影響なし	減少	減少	—	—	CTD	Open型
Pateamine A	上昇	上昇	上昇	上昇	解離	実効濃度の減少	リンカー	Closed型
PDCD4	減少	—	減少	—	解離	eIF4Gと競合阻害	両ドメイン	中間状態
RISC	—	—	—	—	解離	—	—	—
BLF1	影響なし	影響なし	減少	影響なし	より強く結合	Q339脱アミド	CTD	—
FMDV 3C proteinase	—	—	—	—	—	切断 (E143~V144)	NTD	—
人工RNA アプタマー	—	—	—	減少	影響なし	—	両ドメイン	Dead-end型
BC1 RNA	—	—	減少	上昇	影響なし	—	—	—
Rocaglates (RocA, Silvestrol)	ポリプリン配列のみ上昇	上昇	上昇	上昇	解離	mRNA 選択的翻訳抑制	NTD	—

することが報告されている^{14,15)}。

5) BLF1 (*Burkholderia lethal factor 1*)

類鼻疽菌 *Burkholderia pseudomallei* は類鼻疽 (Meliodiosis) を引き起こす病原菌である。 *Burkholderia* が持つ毒素として単離されたのが BLF1 と呼ばれるタンパク質である。このタンパク質は eIF4A C 末端ドメインの ATP 結合サイト上、Q339 残基の脱アミドを引き起こす。これにより二本鎖 RNA を解消する活性が阻害され、翻訳阻害を誘導する¹⁶⁾。

6) FMDV (foot-and-mouth disease virus) 3C protease

一般的にウイルスは宿主に感染すると、自身の複製に都合のよいように宿主のシステムをハイジャックする。その戦略の一つとして宿主の mRNA の翻訳のみを阻害し、ウイルスタンパク質の合成だけを行わせることがあげられる。口蹄疫ウイルス (FMDV) は 3C protease と呼ばれる酵素を持っており、eIF4A タンパク質を E143 と V144 残基の間で切断することにより¹⁷⁾、内在の翻訳系を阻害する。ウイルス自身のタンパク質は、internal ribosome entry site (IRES) と呼ばれる配列を利用した翻訳開始因子の必要のないシステムにより効率よく合成される。

また小分子やタンパク質のみならず RNA 分子として eIF4A の阻害を行うものが知られている (表1)。

7) 人工 RNA アプタマー

SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法を用いて人工的に単離された RNA アプタマー¹⁸⁾ は、詳細なメカニズムはよくわかっていないが、通常の eIF4A-RNA の結合様式とは独立して、eIF4A に結合し、eIF4A を不活性な構造に変化させると考えられている。最終的に ATPase などの生化学的活性を押さえ込み翻訳を阻害することが示唆されている。

8) BC1 (brain cytoplasmic 1) RNA

eIF4A は内在の RNA、特に non-coding RNA によっても制御を受ける。BC1 は神経細胞の特に樹状突起に強く発現する 150 塩基長程度の non-coding RNA であり、eIF4A の二本鎖 RNA を解消する活性を阻害しつつ翻訳を阻害することが示されている¹⁹⁾。神経細胞の樹状突起は局所翻訳が起こる場としてよく研究されており、学習や長期記憶に重要であることが知られている。BC1 による eIF4A を介した翻訳制御がその一端を担っている可能性がある。

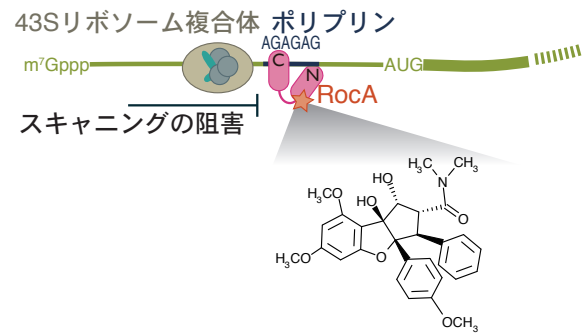


図2 RocAによる mRNA 選択的な翻訳抑制機構

RocA は標的である eIF4A に結合すると、eIF4A を ATP 非依存的かつポリプリン配列選択的な mRNA へと変化させる。eIF4A/RocA 複合体が 5' UTR 上のポリプリン配列に安定的に形成されることにより、43S リボソーム複合体によるスキャニングの立体障害となってしまうことで、mRNA 選択的に翻訳の抑制が生じる。

4. RocA による mRNA 選択的翻訳抑制のメカニズム

以上のように、eIF4A はさまざまな種類の分子によって標的にされ、多様な生物学的現象を制御することが明らかになりつつある。我々の研究グループはさらにその一端を明らかにすべく、eIF4A を標的とする翻訳阻害剤である rocaglamide A (RocA) の分子機構について研究してきた⁵⁾。RocA はもともと *Aglaia* と呼ばれる東南アジア原産の植物から単離された天然化合物である。*Aglaia* 自身はこの化合物を天然の殺虫剤として使っていると考えられている。また、*Aglaia* は漢方薬として用いられている他、観葉植物としても広く流通している。

RocA は抗がん作用を持つ化合物のスクリーニングで同定されてきた^{1,3)}。特にがん細胞を特異的に死滅させ、通常の細胞には影響が少ないという、非常に有用な活性が報告されたことにより、現在広く注目を集めている。

RocA を抗がん剤として利用あるいはさらに改良するためには、その分子メカニズムの理解が必須である。しかしながら、RocA がどのようなメカニズムによって翻訳を抑制するかについては不明であった。そこで我々は RocA による翻訳抑制のメカニズムを理解するため、網羅的解析と生化学的解析を組み合わせて研究を行った⁵⁾。

その結果、RocA は本来配列非特異的な翻訳開始因子である eIF4A を配列特異的な翻訳阻害因子に変化させてしまうという、非常にユニークな機構を持っていることが明らかになった (図2)。RocA は eIF4A に結合すると、A や G が連続したポリプリン配列を持つ RNA との結合を特異的に促進する。また、eIF4A 自身は通常 ATP 加水分解とともに RNA から解離するが、RocA が作用すると eIF4A は ATP 加水分解後であってもポリプリン RNA から乖離せずに結

合し続ける。たとえば通常はeIF4AとRNAの結合の半減期は2分以内であるのに対して、RocAを作用させた場合は30分程度と非常に安定化する。

さらにポリプリンRNA上に安定的に結合したeIF4Aは翻訳の立体障壁となる。eIF4A/RocAが5' UTR中のポリプリン配列に結合し、安定して複合体が形成されてしまうと、5' UTR上をスキッピングするリボソーム小サブユニット動きを阻害してしまう。これによってポリプリンを5' UTR中に持つmRNAを選択的に翻訳抑制する。その一方、正常なeIF4AはATPの加水分解とともに結合と解離を繰り返すので、そのような効果は引き起こさない。

5. おわりに

以上のように我々の行った研究によってRocAが持つ非常にユニークな活性が明らかになった。RocAは基本骨格が共通であるrocaglateという分子群に大別されるが、同じrocaglateである翻訳阻害剤silvestrolに関して同様のメカニズムで翻訳抑制を行っていると考えられる。ではrocaglateはどうしてeIF4Aに新規RNA特異性を付与することができるのであろうか？一般的にDEAD-boxタンパク質はRNAのリン酸-リボースバックボーンのみを認識し、塩基には触れないことがこれまでの結晶構造解析から示唆されている。このことを踏まえると、1) rocaglateによってeIF4A自体の構造が変化し、塩基配列を認識する構造が新たに生み出される可能性、あるいは2) rocaglate自体がRNAの塩基に直接結合し、塩基特異性が生じる可能性の二つが考えられる。これまでに報告されている*in silico* modelingではeIF4A上のRNA結合インターフェイス上にRocAが結合することが予想されていることから²⁰⁾、筆者は後者の可能性が高いのではないかと推察する。いずれの仮説が正しいか、RocAと標的ポリプリン配列の両者を含んだeIF4Aの結晶構造解析が待たれる。

本研究ではHEK293T細胞を主に使用したが、ここで明らかになったメカニズムはがん細胞でも同様であると考えられるのが、最も単純な考え方である。ではなぜ選択翻訳の抑制によってがん細胞を標的にすることができるのだろうか。この点に関して明確なメカニズムは明らかになっておらず、さらなる詳細な解析が期待される。

謝辞

本研究はUC Berkeley, Nick Ingolia准教授, Stephen Floor (現UCSF准教授) 博士研究員のご協力のもと行われました。深く御礼を申し上げます。また、理化学研究所RNAシステム生化学研究室のメンバーの皆さんには本稿に対するコメントをはじめ、日ごろのサポートに深く感謝いたします。本稿を執筆するにあたりHFSP, 日本学術振興会, 理

化学研究所, 武田科学振興財団の助成を受けました。

文 献

- 1) Santagata, S., Mendillo, M.L., Tang, Y.C., Subramanian, A., Perley, C.C., Roche, S.P., Wong, B., Narayan, R., Kwon, H., Koeva, M., Amon, A., Golub, T.R., Porco, J.A.J. Jr., Whitesell, L., & Lindquist, S. (2013) *Science*, **341**, 1238303.
- 2) Wolfé, A.L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V.K., Sanghvi, V.R., Mavrikakis, K.J., Jiang, M., Roderick, J.E., Van der Meulen, J., Schatz, J.H., Rodrigo, C.M., Zhao, C., Rondou, P., de Stanchina, E., Teruya-Feldstein, J., Kelliher, M.A., Speleman, F., Porco, J.A. Jr., Pelletier, J., Ratsch, G., & Wendel, H.G. (2014) *Nature*, **513**, 65–70.
- 3) Manier, S., Huynh, D., Shen, Y.J., Zhou, J., Yusufzai, T., Salem, K.Z., Ebright, R.Y., Shi, J., Park, J., Glavey, S.V., Devine, W.G., Liu, C.J., Leleu, X., Quesnel, B., Roche-Lestienne, C., Snyder, J.K., Brown, L.E., Gray, N., Bradner, J., Whitesell, L., Porco, J.A. Jr., & Ghobrial, I.M. (2017) *Sci. Transl. Med.*, **9**.
- 4) Sen, N.D., Zhou, F., Ingolia, N.T., & Hinnebusch, A.G. (2015) *Genome Res.*, **25**, 1196–1205.
- 5) Iwasaki, S., Floor, S.N., & Ingolia, N.T. (2016) *Nature*, **534**, 558–561.
- 6) Bordeleau, M.E., Mori, A., Oberer, M., Lindqvist, L., Chard, L.S., Higa, T., Belsham, G.J., Wagner, G., Tanaka, J., & Pelletier, J. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 213–220.
- 7) Lindqvist, L., Oberer, M., Reibarkh, M., Cencic, R., Bordeleau, M.E., Vogt, E., Marintchev, A., Tanaka, J., Fagotto, F., Altmann, M., Wagner, G., & Pelletier, J. (2008) *PLoS One*, **3**, e1583.
- 8) Bordeleau, M.E., Matthews, J., Wojnar, J.M., Lindqvist, L., Novac, O., Jankowsky, E., Sonenberg, N., Northcote, P., Teesdale-Spittle, P., & Pelletier, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10460–10465.
- 9) Low, W.K., Dang, Y., Schneider-Poetsch, T., Shi, Z., Choi, N.S., Merrick, W.C., Romo, D., & Liu, J.O. (2005) *Mol. Cell*, **20**, 709–722.
- 10) Low, W.K., Dang, Y., Bhat, S., Romo, D., & Liu, J.O. (2007) *Chem. Biol.*, **14**, 715–727.
- 11) Bordeleau, M.E., Cencic, R., Lindqvist, L., Oberer, M., Northcote, P., Wagner, G., & Pelletier, J. (2006) *Chem. Biol.*, **13**, 1287–1295.
- 12) Chang, J.H., Cho, Y.H., Sohn, S.Y., Choi, J.M., Kim, A., Kim, Y.C., Jang, S.K., & Cho, Y. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3148–3153.
- 13) Suzuki, C., Garces, R.G., Edmonds, K.A., Hiller, S., Hyberts, S.G., Marintchev, A., & Wagner, G. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3274–3279.
- 14) Fukaya, T., Iwakawa, H.O., & Tomari, Y. (2014) *Mol. Cell*, **56**, 67–78.
- 15) Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., & Fujiwara, T. (2014) *Mol. Cell*, **56**, 79–89.
- 16) Cruz-Migoni, A., Hautbergue, G.M., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Bokori-Brown, M., Chang, C.T., Dickman, M.J., Essex-Lopresti, A., Harding, S.V., Mahadi, N.M., Marshall, L.E., Mobbs, G.W., Mohamed, R., Nathan, S., Ngugi, S.A., Ong, C., Ooi, W.F., Partridge, L.J., Phillips, H.L., Raih, M.F., Ruzheinikov, S., Sarkar-Tyson, M., Sedelnikova, S.E., Smither, S.J., Tan, P., Titball,

- R.W., Wilson, S.A., & Rice, D.W. (2011) *Science*, **334**, 821–824.
- 17) Li, W., Ross-Smith, N., Proud, C.G., & Belsham, G.J. (2001) *FEBS Lett.*, **507**, 1–5.
- 18) Oguro, A., Ohtsu, T., Svitkin, Y.V., Sonenberg, N., & Nakamura, Y. (2003) *RNA*, **9**, 394–407.
- 19) Lin, D., Pestova, T.V., Hellen, C.U., & Tiedge, H. (2008) *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 3008–3019.
- 20) Sadlish, H., Galicia-Vazquez, G., Paris, C.G., Aust, T., Bhullar, B., Chang, L., Helliwell, S.B., Hoepfner, D., Knapp, B., Riedl, R., Roggo, S., Schuierer, S., Studer, C., Porco, J.A.J. Jr., Pelletier, J., & Movva, N.R. (2013) *ACS Chem. Biol.*, **8**, 1519–1527.

著者寸描

●岩崎 信太郎 (いわさき しんたろう)



理化学研究所RNAシステム生化学研究室主任研究員。東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻客員准教授。博士（生命科学）。

■略歴 2006年東京大学教養学部卒業。11年同大学院新領域創成科学研究科博士課程修了。同年東京大学分子細胞生物学研究所助教。13年より米国Carnegie Institution for Scienceを経て、米国California

大学Berkeley校ポスドクフェロー。16年より理化学研究所RNAシステム生化学研究室准主任研究員。17年改組により主任研究員。また17年より東京大学新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻客員准教授。

■研究テーマと抱負 RNAのかかわる現象を網羅的かつ生化学的な手法により理解する。

■ウェブサイト http://www.riken.jp/research/labs/chief/rna_sys_biochem/

<http://iwasakirna.com/ja/>

■趣味 コンソールゲーム。