

論文の内容の要旨

論文題目： ポリ A 結合タンパク質 PABP を中心とした翻訳制御メカニズムの解明

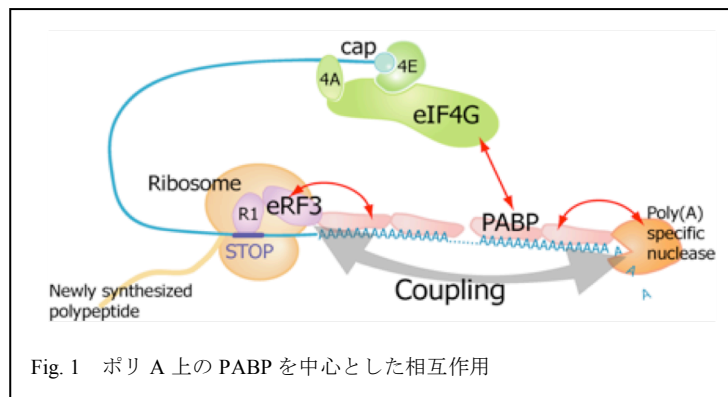
氏名 町山 麻子

【背景・目的】

ポリ A 結合タンパク質 (poly(A) binding protein, PABP) は、真核生物の細胞内に数 μM と豊富に存在し、mRNA の 3'-ポリ A に特異的に結合するタンパク質である。ポリ A に結合した PABP は、様々な因子と相互作用することにより (Fig. 1)、翻訳開始の促進や mRNA 分解など、遺伝子発現の最終段階である翻訳過程の調節に関わっている。

例えば、PABP は翻訳開始因子複合体の 1 つである eIF4G と相互作用し、mRNA を環状化する。mRNA の環状化は、翻訳終結後のリボソームの翻訳開始部位へのリサイクルを効率化し、翻訳を促進する。また、PABP は、ポリ A 分解酵素複合体と相互作用することにより、mRNA 分解の律速段階であるポリ A 分解を促進する。近年、翻訳終結反応が繰り返されるにつれてポリ A 分解が進行するといった、翻訳終結とポリ A 分解の共役が報告され、この共役には PABP と翻訳終結因子 eRF1-eRF3 複合体との相互作用が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。

PABP は、全長 636 残基からなり、N 末端側には約 90 残基の RNA 結合モチーフ (RRM) がタンデムに 4 個繋がり、C 末端には約 70 残基の PABC と呼ばれるドメインがある。4 番目の RRM と PABC は構造非形成領域と推測されるリンカーによって隔



てられている (Fig.2). これまでに, eIF4G の N 末端構造非形成領域が, PABP の RRM1 と RRM2 の領域に相互作用することが明らかとなっているが, eIF4G が

どのようにしてポリ A 結合型の PABP に選択的に結合し環状構造を形成するかのメカニズムは不明であった. また, 翻訳終結とポリ A 分解の共役については, 翻訳終結因子複合体のうちの eRF3, および, ポリ A 分解酵素複合体のうちの Tob や PAN3 に, PABP の PABC ドメインと結合する 12 残基程度の配列である「PABP 結合モチーフ 2 (PAM2)」が各分子内に複数存在しており, これらの PAM2 が共役過程に重要な役割を果たしていることが示唆されていた. しかし, eRF3 の 2 個の PAM2 は一部を重複した配列を取っており, 共役過程における個々の PAM2 の役割, PABC との相互作用様式は未解明であり, どのようにして翻訳終結とポリ A 分解が共役しているかのメカニズムは不明であった.

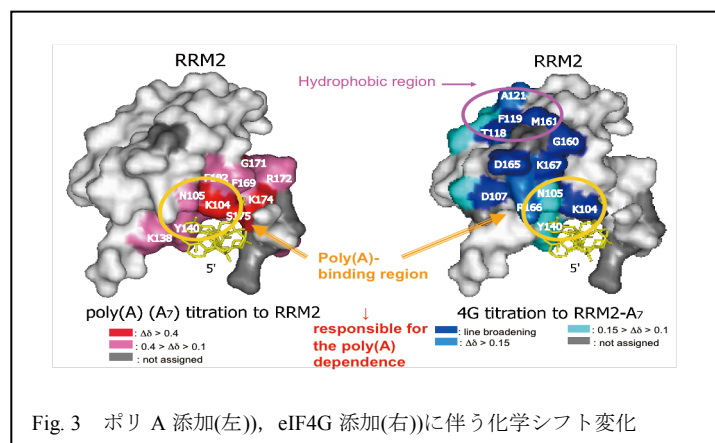
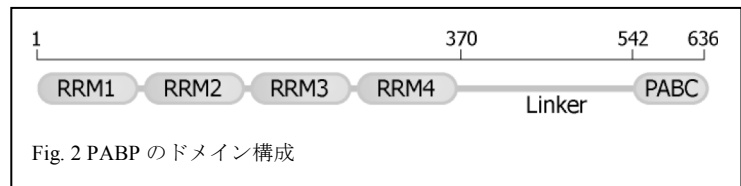
そこで本研究では, mRNA 環状化, および, 翻訳終結とポリ A 分解の共役のメカニズムを明らかにすることを目的として, ① eIF4G と PABP のポリ A 依存的な相互作用, ② ポリ A 分解酵素複合体の一部を形成する Tob-Caf1 と PABC との相互作用, ③ eRF3 の重複した 2 個の PABP 結合モチーフ 2 (PAM2) と PABC との相互作用について熱力学的・構造生物学的解析を行った.

【方法・結果】

① eIF4G と PABP の相互作用を介した mRNA 環状化の分子機構

まず, eIF4G の N 末端領域 (残基番号 41-244 と 175-207) および PABP の RRM 領域 (RRM1-4, RRM1-2, RRM3-4, RRM1, RRM2) についての発現系を構築し, ITC による結合親和性解析を行ったところ, 主要な相互作用領域は, eIF4G の残基番号 175-207 と PABP の RRM2 に含まれることが分かった. eIF4G(175-207)-RRM1-2 の相互作用は, poly(A)存在下では, 非存在下に比べて結合親和性が 12 倍上昇することが分かった. このことは, 生体内では eIF4G は遊離の PABP よりも, ポリ A に結合した PABP に選択的に結合することを示しており, その結果として mRNA 環状化を促進していることを示唆している.

さらに, eIF4G(175-207)と RRM2 の主鎖 NMR シグナルを帰属し, eIF4G (175-207)添加時のポリ A 結合型 RRM2 の化学シフト変化を解析したところ, eIF4G は RRM2 上のポリ A 結合



部位とは分子の反対側に主に結合するものの、eIF4G 結合とポリ A 結合の両方に関与する領域が存在することが示唆された (Fig. 3). この領域において、ポリ A と eIF4G の直接的に相互作用するか、もしくは PABP のポリ A 結合部位において eIF4G との相互作用することで、eIF4G-PABP の相互作用のポリ A 依存性に寄与することが示唆された。

② Tob の相互作用の定量的解析によるポリ A 分解酵素の活性制御機構

Tob に存在する 2 個の PAM2 モチーフ, PAM2-N (残基番号 130-141) と PAM2-C (残基番号 265-276) のうち、両者を含む発現系と PAM2-C を欠失させた発現系をそれぞれ構築し、PABC との ITC 解析を行ったところ、主要な PABC 結合部位は PAM2-C であり、Tob は Caf1 および PABC と独立的に結合することが分かった。このことは、Caf1-Tob-PABC の三者複合体が形成されることを示唆している。しかしながら、PABC の Tob に対する解離定数は、eRF3 に対する解離定数の 100 倍程度であり、さらに、eRF3 の細胞内濃度は数 μM であるのに対し、Tob/Caf1 はその 1/50 程度しか存在しないことから、PABP の PABC にはすべて eRF3 が結合しており、この状態では Tob/Caf1 が PABC から eRF3 を排除できず、そのため、ポリ A にアクセスできないことが強く示唆された (Fig. 5A). 一方、翻訳終結時に eRF3 がリボソームへとリクルートされるとき、Tob は PABPC1 の PABC と、Tob と結合した Caf1 は poly(A)と、それぞれ同時に結合することで、脱アデニル化酵素複合体 Tob-Caf1 と PABC-poly(A)間の親和性は相乗的に増加し、脱アデニル化反応が活性化されることが示唆される (Fig. 6).

③ eRF3 の重複した 2 個の PAM2 のポリ A 分解における生物学的役割

eRF3 の部分的に重複した 2 個の PAM2 配列、および、個々の PAM2 配列のペプチドを調製し、ITC により PABC との相互作用を解析したところ、いずれも PABC と 1:1 のモル比で同等の解離定数 ($0.2 \mu\text{M}$) で結合することが分かった。NMR により eRF3 と PABC の相互作用を解析したところ、一度に PABC に結合するのはいずれかの PAM2 のみであるが、2 つの PAM2 の間を交換するように結合しているという、ユニークな分子認識様式が明らかとなった (Fig. 4). また、1000 塩基程度の長鎖ポリ A に PABP が多数結合した状態で、PABP に対する PAM2 の結合を評価したところ、2 個重複した PAM2 では、ポリ A 非存在下に比

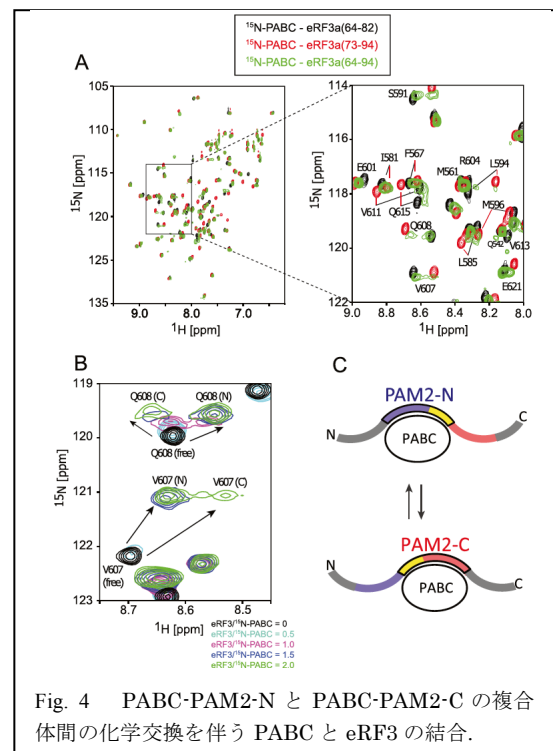


Fig. 4 PABC-PAM2-N と PABC-PAM2-C の複合体間の化学交換を伴う PABC と eRF3 の結合。

べて解離定数が 1/100 となったのに対し、単独の PAM2 では 1/10 程度であった。このことは、ポリ A 上に PABP が局所的に高密度に存在している環境では、2 個重複した PAM2 のうち一方が PABP に結合した状態から解離する際に、他方の PAM2 が別の PABP に効率よくアクセスできるため、単独の PAM2 に比較し解離・再結合の効率が亢進していることが示唆された。

【考察】

mRNA 環状化については、ポリ A 依存性的な親和性上昇の分子機構について、PABP が eIF4G とポリ A との直接の相互作用を介在する、あるいは、eIF4G がポリ A によって構造変化した部位に結合することによることが示唆された。

翻訳終結とポリ A 分解の共役機構については、今回得られた実験結果に基づき、以下のように考察した。翻訳終結が起こっていない状態では eRF3 がすべての PABP と結合し、ポリ A 分解酵素をポリ A の 3' 末端に結合する PABP にアクセスすることを阻害している (Fig. 5A) ため、ポリ A 分解が起こらない。ひとたび翻訳終結が起こると、eRF1/eRF3 がリボソームにリクルートされ (Fig. 5C)、残りの PABP 上の eRF1/eRF3 は解離と再結合を繰り返すことにより、いずれ 3'-末端の PABP から解離する (Fig. 5B) ことがある。この際に、ポリ A 分解酵素は、Tob-PABC, Caf1-ポリ A の両者同時の相互作用 (Fig. 6) により、基質であるポリ A にアクセスし、分解を行う。

【総括】

本研究では、eIF4G と PABP の相互作用を、NMR および ITC を用いて解析し、mRNA 環状化機構を提唱した。また、Tob と PABP の相互作用の定量的解析に基づいて、翻訳終結と共役した脱アデニル化酵素の活性制御機構を提唱した。さらに、eRF3 の重複した 2 つの PAM2 と PABC の相互作用解析より、eRF3 の重複した 2 つの PAM2 の mRNA decay における生物学的役割を提示した。

