

審査の結果の要旨

氏名 町山 麻子

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と題する本論文は、NMR 法および ITC 法を用いて、mRNA 環状化機構、ポリ A 分解酵素の活性制御機構、ならびに翻訳終結とポリ A 分解の共役における eRF3 の生物学的役割を解明したものである。本論文は全 5 章から構成されており、第 1 章において序論を述べ、第 2 章、第 3 章、および第 4 章にて、それぞれ翻訳開始因子複合体 eIF4G と poly(A)結合タンパク質 PABP の相互作用を介した mRNA 環状化の分子機構、Tob と PABP の相互作用の定量的解析による、翻訳終結と共役した脱アデニル化酵素の活性制御機構の熱力学的解明、eRF3 の重複した 2 つの PABP 結合モチーフ 2 (PAM2) の mRNA decay における生物学的役割について、実験結果および結果に対する考察を述べ、実験材料及び方法を記述している。第 5 章にて総括と今後の展望を述べている。

第 2 章においては、翻訳開始因子複合体 eIF4G と poly(A)結合タンパク質 PABP の相互作用を介した mRNA 環状化の分子機構を解析した研究成果を述べている。まず ITC 解析により、ヒト eIF4G と PABPC1 の相互作用部位が、eIF4G(175-207) と RRM2 に存在していること、また、両者の相互作用が poly(A)依存的事であることを示している。次に、RRM2 の化学シフト変化解析を行ったところ、eIF4G(175-207)の結合に伴い、顕著な化学シフト変化が観測された領域は、特に poly(A)結合部位近傍からその反対側の疎水性領域に広く分布している一方で、poly(A)の添加により顕著な化学シフト変化が観測された領域は、poly(A)近傍に局在していることを示した。

以上の結果の基づき、細胞内における PABP-eIF4G 相互作用による mRNA 環状化のメカニズムを考察している。Poly(A)非結合型 RRM12 と eIF4G(175-207) の解離定数、および PABP と eIF4G の細胞内濃度を考慮すると、eIF4G は poly(A)非結合型の PABP とはほとんど結合しないのに対し、3'-poly(A)上の PABP に対しては poly(A)依存性による親和性上昇効果と、PABP の多量体化、および同一 mRNA 上に結合した PABP と eIF4G の近接効果により、見かけの eIF4G-PABP の親和性は実際の解離定数 $3 \mu\text{M}$ よりもさらに上昇すると考察している。これにより、細胞内 eIF4G の多くは mRNA 上の poly(A)上に多量体化した PABP に対して選択的に結合し、mRNA の環状化が達成されることを提唱している。

第 3 章においては、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解析した研究成果を述べている。近年、翻訳終結反応が繰り返されるにつれて poly(A)分解が進行するといった、翻訳終結と poly(A)分解の共役が報告され、この共役には PABP に対する翻訳終結因子 eRF3 と Tob の競合が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。本章では、NMR 解析から、Tob は、N 末端側の BGT-Tob ドメインと、C 末端領域の非構造形成領域の 2 つの PAM2 により構成されていること、また ITC 解析から、BTG-Tob ドメインが Caf1 との結合に必須であり、C 末端領域の PAM2-C が主な PABC 結合部位であることを示した。

以上の結果に基づき、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考察している。eRF3はTobよりも20倍高い親和性を有し、Tobの15倍の細胞内濃度を有することから、TobよりもeRF3の方がPABPC1に結合する分子の割合が圧倒的に多いと考察している。一方、翻訳終結時にeRF3がリボソームへとリクルートされたとき、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を提唱している。このように、脱アデニル化反応に関連したこれらのタンパク質の親和性や細胞内濃度が絶妙な値になっているため、翻訳終結とmRNA decayの共役が達成されることを提唱している。

第4章においては、eRF3の重複した2つのPAM2のmRNA decayにおける生物学的役割を解析した研究成果を述べている。PAM2-NおよびPAM2-CのPABC結合親和性を不活性化させる変異体の過剰発現は、顕著に脱アデニル化およびmRNA decayの反応速度を低下させることが分かった。このことから、eRF3の両方のPAM2が翻訳終結に共役した脱アデニル化反応に必要であることを示唆している。またNMR解析より、PABCに一度に結合するのは1つのPAM2のみであり、PAM2-NとPABCの複合体とPAM2-CとPABCの複合体はおよそ 10 s^{-1} の速度で交換していることが分かった。また、交換状態にある2つの複合体の溶液構造より、eRF3aの重複した領域が、2つの複合体ごとに異なる役割を果たすことが示された。さらにITC解析より、PABPC1-eRF3(64-94)間の相互作用におけるpoly(A)依存性は、PAM2-Cの不活性化により減弱することから、poly(A)上に多量体化して結合するPABPへの再結合にPAM2-Cが寄与していることを示唆している。

以上の結果に基づき、eRF3の重複した2つのPABP結合モチーフ2(PAM2)のmRNA decayにおける生物学的役割を考察している。翻訳終結に伴い、PABPC1に結合した翻訳終結因子複合体の1つがリボソームにリクルートされると、eRF3は2つのPAM2モチーフを用いてPABPC1分子への再結合を繰り返し、poly(A)上に多量体化したPABP間を移動する結果、最も3'末端側のpoly(A)に結合したPABPC1分子がeRF3非結合状態になる確率が上昇し、脱アデニル化酵素複合体がpoly(A)へアクセスしやすくなるという、翻訳終結に共役した脱アデニル化酵素の酵素活性の上方制御の分子機構を提唱した。

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ている。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ている。さらに、eRF3の重複した2つのPAM2とPABCの相互作用解析、細胞内におけるeRF3のドミナントネガティブ実験より、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。

以上、本研究の成果は、結合親和性および立体構造の観点から、mRNA環状化およびpoly(A)分解と翻訳終結の共役においてPABPが担う役割の解明に対して新たな知見を与えるものであり、これを行った学位申請者は、博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。