

論文の内容の要旨

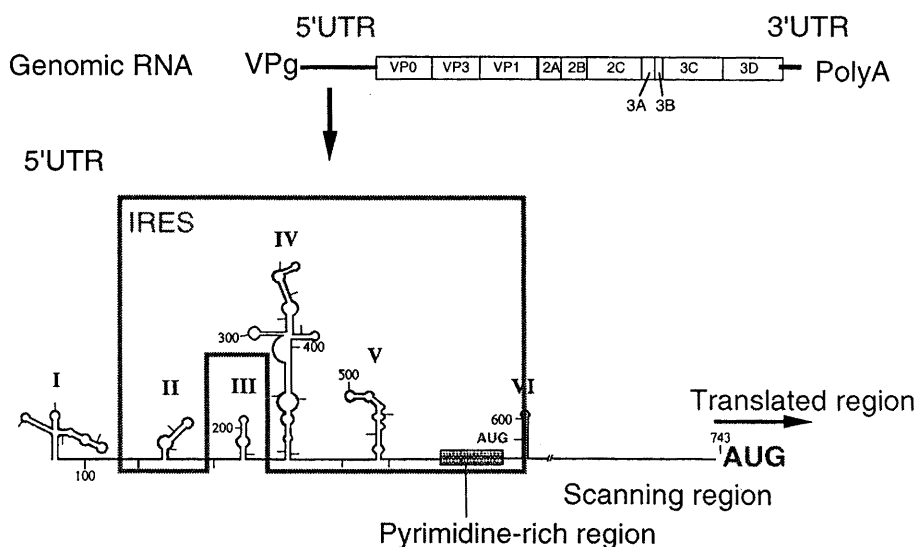
論文題目 ポリオウイルス翻訳開始における IRES
構造と IRES 関連分子の解析

氏 名 我妻 昭彦

ポリオウイルス (PV) はピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するウイルスであり、小児麻痺の病因となるウイルスである。ゲノムは約 7500 塩基からなるプラス鎖の RNA であり、mRNA としても働く。ゲノム RNA はウイルス蛋白をコードする領域の他、5'UTR (Untranslated region), 3'UTR, Poly A からなる (Fig.1)。PV 5'UTR は 742 塩基からなり、複雑な二次構造を持つと予測される。ゲノム RNA の 5' 末端には細胞

の mRNA とは異なり Cap 構造は存在しない。Cap 構造を持たない PV の翻訳は 5'UTR 中に存在する Internal ribosomal entry site (IRES) と呼ばれる領域 (Fig.1) にリボソームが Cap 構造非依存的にエンターする事により開始される。このようにして翻

Fig.1 Possible Secondary Structure of Poliovirus 5' UTR



訳されるウイルス蛋白は1本の長いポリペプチドとして合成され、ウイルスポテアーゼ(2A^{pro}, 3C^{pro})により切断され、機能のあるウイルス蛋白となる。

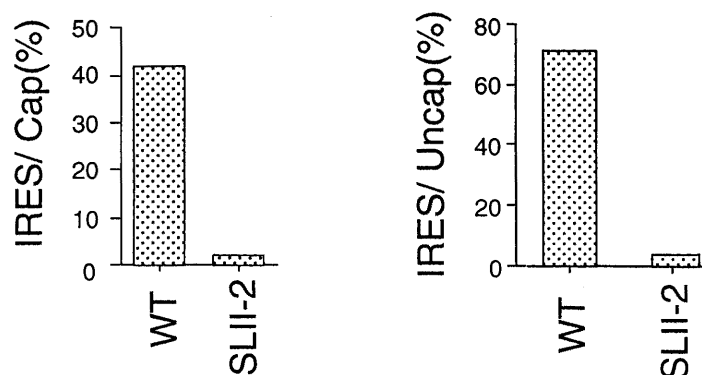
PVが細胞に感染すると宿主のCap構造依存的な翻訳は停止(Shut off)する。これはPV 2A^{pro}の働きにより翻訳開始因子eIF4Gが切断されるためと考えられている。切断されたeIF4GのC末端側(Δ eIF4G)はPV IERSからの翻訳開始にとっては依然として機能のある蛋白であると考えられ、このような条件下でもPV IERSからの翻訳は効率良く進行する。PV IERSからの翻訳開始は種特異性及び組織細胞特異性があるとされており、ウイルストロピズムの一端を担っていると考えられている。現在、ウイルスのRNAのみならず、宿主のmRNAにおいても数多くのIRESを持つmRNAが発見されており、発生の段階でのみ働くIRESや細胞周期特異的に働くIRESの存在が報告されている。IRESからの翻訳開始の特異性はその活性発現に必要な宿主因子の有無によって規定されると考えられる。しかし、現状ではそのような宿主因子がなぜ必要なのかなど、機能についてはほとんど理解されていない。また、未知の宿主因子が存在することも予想されている。

本研究はこのようなIRESからの翻訳開始のメカニズムを明らかにすることを目的とした。PV 5' UTR中の塩基番号120-165(SLII)の領域はPVの翻訳だけでなく、ゲノムRNA複製にも重要な領域である。しかし、どのようにSLII領域が翻訳に関与しているかはほとんど理解されていない。本研究ではSLII領域に変異を持ち翻訳活性を失ったSLII-2変異体を主に解析した。本研究のような解析方法はPVの翻訳開始に必要な因子が解析できる可能性とともに、PV IERSからの翻訳開始を負の方向に調節しているメカニズムを解析できる可能性もある。

まず、SLII-2の細胞内での翻訳活性を測定した。First cistronとしてCap, Second cistronとしてPV IERSからの翻訳活性を測定することが出来るDicistronic mRNAを発現するcDNAを持つプラスミド(Di-luc)を細胞にトランスフェクションすることによりPV IERSからの翻訳効率を測定した。この時、First cistronからの翻訳効率は

トランスフェクション効率などを補正する内部コントロールとして用いることができる。HeLa細胞にDi-lucをトランスフェクション後、18 hrのluciferase活性を測定したところ、補正後のIRESからの翻訳効率(IRES/Cap)はWTの翻訳活性に比べ、SLII-2の翻訳活性は著しく低かった(Fig.2 a)。続いて、*in vitro*

Fig.2 Translation activities in HeLa cells and HeLa S10
a) *in vivo* (HeLa cells) b) *in vitro* (HeLa S10)



translationにおける翻訳活性を測定した。HeLa細胞から調製したHeLa S10中での翻訳活性は細胞内での結果と同様にIRESからの翻訳効率 (IRES/Uncap)はWTの翻訳活性に比べ、SLII-2の翻訳活性は著しく低かった (Fig.2 b)。この結果から WTは細胞内においても、*in vitro* translation においても翻訳活性があるのに対して、SLII-2はどちらの条件でも翻訳活性がほとんど認められないことが明らかとなった。Cap依存的な翻訳において、Cap構造は細胞内における翻訳に重要であることが知られている。しかし、*in vitro* translation においては効率の違いこそあるものの、Capの有無に関係なく翻訳活性がある。これは、空間的な問題等を含め、*in vitro*での翻訳開始の制御が十分に行われていない結果と考えられる。SLII-2が*in vitro*においても翻訳活性が認められないということは翻訳開始の制御には関係なく根本的に翻訳開始に適さない構造であることが示唆

された。

翻訳開始は mRNA に 40S リボソームサブユニットがエントリーし、スキッピングを経て、48S 翻訳開始複合体を形成する段階、そしてそこに更に60S リボソームサブユニットが結

合し、80S 翻訳開始複合体を形成する段階がある。80S 翻訳開始複合体を形成後、ペプチド鎖伸長反応が起こる。そこで、WT RNA および SLII-2 RNA 上に翻訳開始複合体が形成できるかを調べた。その

Fig.3 Formation of 80S, 48S Initiation Complex on WT RNA and SLII-2 RNA

A: GMP-PNP (40 krpm, 4.5 hrs) B: Cycloheximide (40 krpm, 3 hrs)

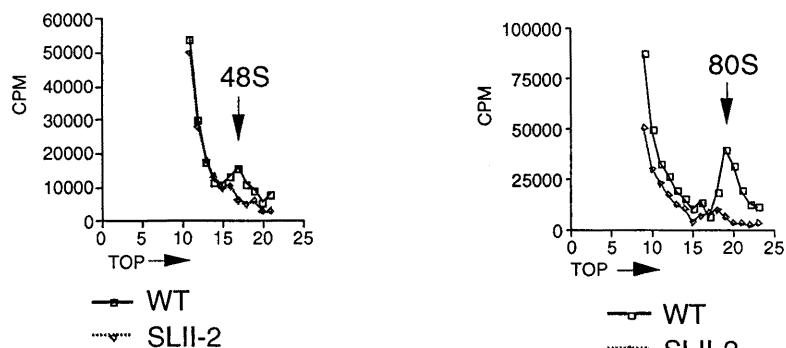
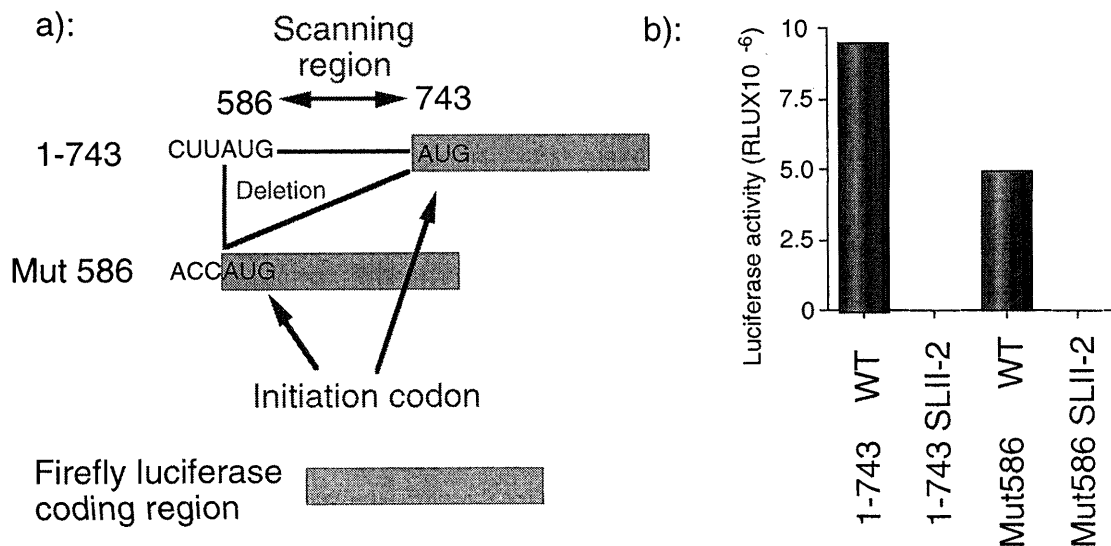


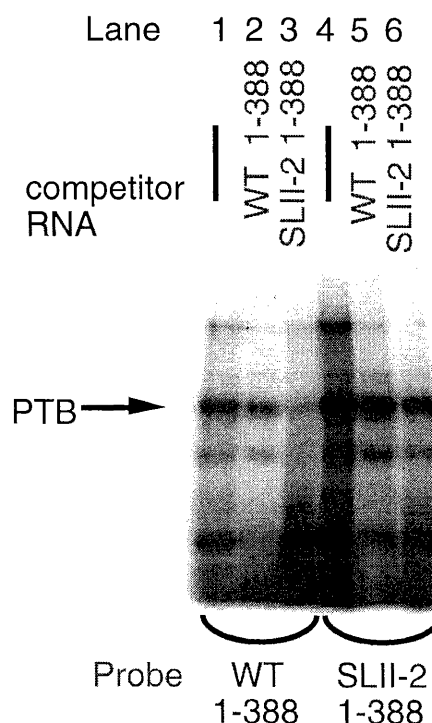
Fig.4 Effect of Deletion of Scanning Region on Translation Activity



結果、WTは48S、80S 翻訳開始複合体が形成されるのに対してSLII-2は80S および48S 翻訳開始複合体の形成は観察されなかった (Fig.3)。この結果から SLII-2 の変異は RNA にリボソームがエントリーする段階、またはスキャンニングする段階で影響していることが考えられた。そこで、スキャンニングの段階を解析するために、スキャンニング領域を削ったMutant (Fig.4 a)を作製し、*in vitro* translation における翻訳効率を測定した。この様な mRNA からの翻訳はスキャンニングを伴わないと考えられ、この時、SLII-2の翻訳活性が回復すれば、スキャンニングの段階でSLII-2の変異が影響していると考えられる。このような、mRNAを用いて *in vitro* translation を行ったところ、翻訳活性は WT の翻訳活性に比べ、SLII-2の翻訳活性は著しく低かった(Fig.4 b)。この結果から、SLII-2の変異はスキャンニングの段階には関与しないこと、すなわち、リボソームエントリーに影響していることが示唆された。

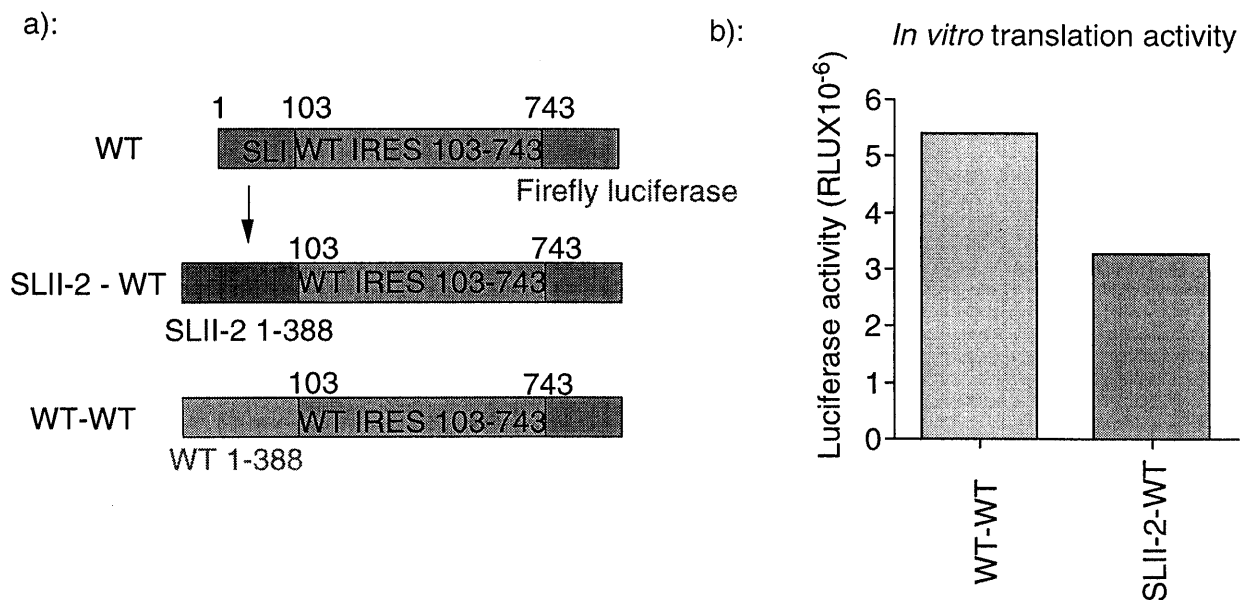
リボソームエントリーにはそのために必要な因子の有無が重要である。PV IRESからの翻訳には翻訳開始因子、および翻訳開始因子以外に PTB, La, PCBP-2が必要であると考えられている。そこで、これらの因子の WT および SLII-2 への結合性を比較した。まず、翻訳開始に重要であると考えられる翻訳開始因子 eIF4A, ΔeIF4G の PV IRES への結合性を調べたが、WT および SLII-2 への結合性の差異は観察されなかった。このことから翻訳開始因子以外の因子の結合性に差異があることが考えられた。そこで、次に PV IRES からの翻訳に必要であると考えられている PTB の WT および SLII-2 への結合性を調べた。PV IRES の塩基番号 1-388 部分を ³²P-UTP 存在下、合成し、UV crosslink 法を行った結果、WT に比較して SLII-2 により強く PTB の結合が観察された (Fig.5 lane 1, 4)。また、競合体 RNA を存在させた実験によっても SLII-2 により強く PTB が結合することが支持された (Fig.5 lane 2, 5 および 3, 6)。つまり、SLII-2 の塩基番号 1-388 部分に新たな PTB 結合サイトが出来ていることが示唆された。同様な実験を La, PCBP-2 について行ったが、WT, SLII-2 に対する結合性の差異は観察されなかった。このことから新たな PTB 結合サイトの出現が PV IRES からの翻訳を抑制しているという可能性が考えられた。そこで、IRES 領域は完全である RNA に PTB 結合サイトを導入した RNA、つまり IRES 領域内に含まれていない PV IRES の SLI の領域を新たな PTB 結合サイトのできた SLII-2 の

Fig.5 UV Crosslinking of PTB to WT RNA and SLII-2 RNA



1-388 部分に置き換えた変異体を作成した(Fig.6 a)。このとき、コントロールは WT の 1-388 部分を置き換えたものを用いた。このような変異体は IRES 領域である 103-743 は正常であることから現在までの考えでは、両 IRES からの翻訳活性は変わらないと考えられる。このような Mutant を用いて、*in vitro* translation を行ったところ、SLII-2 の 1-388 部分を置き換えた変異体の方が翻訳活性が低いことが明らかとなった (Fig.6 b)。以上の結果より RNA 上に新たな PTB 結合サイトが出来ると本来のサイトへのリボソームのエントリーを阻害する可能性を示唆することができた。

Fig.6 Effect of New PTB Binding Site on Activity of Translation Driven by PV IRES



以上の結果をまとめる。SLII-2 RNA 上では翻訳開始複合体が形成されないことが明らかとなった。また、リボソームの RNA へのエントリー過程に SLII-2 の変異が影響していることが示唆された。SLII-2 の塩基番号 1-388 の領域に新たな強い PTB 結合サイトが生じている。また、新たな PTB 結合サイトの IRES 上流への導入は IRES 活性を阻害することを示唆された。このことは IRES 上流へ導入される配列によっては IRES からの翻訳活性が阻害される場合があることを示している。また、新たな PTB 結合サイトの出現が SLII-2 の不活性の一因であることが示唆できたと考えられる。