

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 我妻昭彦

本論文は、ポリオウイルス (PV) の翻訳開始のシスエレメントである IRES (internal ribosome entry site) の構造と機能を、IRES 結合性蛋白分子との相互作用の側面から、解析したものである。

PV RNA の 5'末端にはキャップ構造は存在せず、翻訳開始機構は IRES 依存性である。リボソームは、PV RNA の 5'非翻訳領域に存在する IRES (塩基番号 100 近辺から塩基番号 600 近辺) にエントリーし、開始コドン AUG まで RNA 上を移動 (スキヤニング; 塩基番号 600 近辺から塩基番号 743) した後、塩基番号 743 からはじまる開始コドン AUG 上で翻訳開始複合体となり、蛋白合成を開始する。

IRES 依存性翻訳開始には、キャップ構造依存性翻訳開始に必要とされる宿主因子の他に、いくつかの宿主因子が必要であることが知られている。PV IRES の場合、PTB (polypyrimidine tract binding protein)、La 蛋白、および PCBP (poly ribo(C) binding protein)-2 が少なくとも必要であると考えられている。

本論文では、PV IRES 領域内の stem-loop 構造 II (SL-II) (塩基番号 120-165) に欠損変異を持ち、活性を全く示さない変異 IRES である SLII-2 に主に着目し、その不活化のメカニズムの解析を行った。まず 80S および 48S 翻訳開始複合体形成が SLII-2 においては観察されないことを明らかにし、その不活性化の過程は、リボソームのエントリー又はリボソームのスキヤニング過程にあることを証明した。次にリボソームがスキヤニングする領域を欠損させ、リボソームのエントリー部位と考えられている塩基番号 586 からはじまる AUG 配列を開始コドンとして利用できる変異 RNA を作製した。この変異を野性型 (WT) IRES に導入した場合、IRES 活性が認められたが、SLII-2 に導入した場合には活性が認められなかった。したがって、SLII-2 において不

活化している過程は、スキヤニング過程ではなく、リボソームのエントリー過程であることが示唆された。

リボソームの RNA へのエントリーに必要な宿主分子が SLII-2 には結合できなくなっている可能性を考え、eIF4A、eIF4G、PTB、La、PCBP-2 などの WT IRES および SLII-2 IRES への結合性の比較検討を行った。競合的 UV クロスリンク法を含む UV クロスリンク実験を詳細に行った結果、SLII-2 に結合できなくなった宿主分子は存在しなかったが、意外なことに SLII-2 への PTB の結合力が上昇していることを見出した。さらに IRES 各領域への PTB 結合性を検討したところ、本来の PTB 結合部位（塩基番号 570 近辺）と考えられる部位以外に、SLII-2 の塩基番号 1-388 に新たに強い PTB 結合部位が生じていることを明らかにした。以上のことから、新たに生じた強い PTB 結合部位により、リボソームは本来の部位にエントリーできなくなっている可能性が考えられた。

そこで、本論文では、IRES 領域の上流に PTB 結合性を持つ RNA フラグメントを導入し、その IRES 活性への影響を検討した。RNA フラグメントとして、SLII-2 の塩基番号 1-388、および強力な PTB 結合性を持つことで知られる encephalomyocarditis virus (EMCV) RNA の E ループを用いた。その結果、これら RNA フラグメントの IRES 上流への導入は、IRES 活性に阻害的に働くことを示した。また、その阻害活性は、PTB への結合力と相関しているという結果を得た。

以上の研究は、変異 IRES SLII-2 の不活化メカニズムの一つの可能性を示すものであるが、より一般的に IRES 活性発現調節機構の解明に貢献するものである。IRES を利用した発現ベクター構築に当たっての留意点を与えたという側面からも評価でき、博士（薬学）号の授与に値するものと判定した。