

論文の内容の要旨

論文題目 **Molecular biological analysis for the antiproliferative protein Tob : Implication of Tob in translational control of messenger RNA**

和訳 **増殖抑制性蛋白質Tob の分子生物学的機能解析：
Tobによる mRNAの翻訳制御**

指導教官 山本 雅 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成六年四月入学
医学博士過程
病因病理学専攻
氏名 大河内 謙太郎

1. 研究の背景

受容体型チロシンキナーゼ ErbB-2 の細胞内領域に会合する分子として Far-western screening 法により新規遺伝子 *tob* (transducer of ErbB-2) がクローニングされた。Tobタンパク質はヒトB細胞リンパ腫細胞株より同定されていた Btg1(B cell translocated gene 1) 及び NGF刺激下で PC12 細胞にて発現誘導されるPC3の両者とN端側に高い相同性のある領域 (THD:Tob homology domain)を持ちファミリーを成している。Tobは他のファミリーと同様に過剰発現により細胞増殖抑制能を示し多細胞生物で広く保存されているが、その分子機能はほとんど不明であった。Tob、Btg1 及び PC3 は, yeast では転写に関与すると考えられている Caf1と結合する事が知られてはいたものの、Tobファミリーは主に細胞質に分布する為もありその解析は進展が見られなかった。Tobファミリーは非常に不安定なタンパク質であるが、多くのタンパク質群と共に巨大な複合体を形成する事は観察されていた。又、Btg1 及び PC3が protein arginine N-methyltransferase (RRMT)-1 との結合を介して mRNAの制御に関与する事も示唆されている。Tob は半減期が数分以内と不安定である為、内在性のタンパク質の検出は困難だが、T細胞では十分検出可能であった。

2. T細胞におけるTob 結合分子 iPABP/PABP の同定

Tob のヒトT細胞における分子生物学的な機能解析の手がかりとして、まず Tob に会合する分子の far-western screening 法による同定を試みた。プローブとして TobのN端側 (THD) を用いて、Jurkat human T cell leukemia cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、4つのポジティブクローンを得た。一つは poly(A)-binding protein (PABP)、そして他の3つはinducible poly(A)-binding protein (iPABP) をコードしていた。PABPは翻訳開始において、mRNAのcap結合タンパク質 eIF4Eに結合したeIF4Gとpoly(A) tailの両者を結ぶ事で mRNAのcircularizationを惹起して翻訳開始を促進する。又、これ以外にも、mRNAのmaturation、transport、stabilizationを促進するなど多様な機能を持っている。iPABPはT細胞活性化刺激により発現誘導されるPABPのホモログであるが、その機能は不明であった。

これらのTob 結合分子として同定された PABP 及び iPABP の相互作用を *in vitro* 及び *in vivo* で確認した結果、Tob は両者と結合するが、特に iPABP と強く結合する事を示した。さらに iPABP の C 端側の様々な deletion mutant を用いて iPABP の 580-605 番目のアミノ酸が Tob との結合に必要な事を明らかにした。

3. IL-2 mRNA の iPABP 及び Tob による *in vitro* での 翻訳制御

次に iPABP の C 端側と Tob が会合する現象の生理的意義を解析する手がかりとして、iPABP が細胞質に局在する為、まず poly(A) tail を持つ intron の除去された mRNA への iPABP タンパク質の影響を調べた。iPABP が T 細胞活性化に重要であると予想される事、さらに同時期に、抗リウマチ療法を研究する英国のグループが、ヒト末梢血 T 細胞へのアナジー誘導性 T 細胞受容体刺激による differential screening を行い、著明に発現が誘導される遺伝子として tob mRNA を同定していた事などから、T 細胞のオートクライン増殖因子である interleukin-2 (IL-2) mRNA に着目した。

ヒト IL-2 mRNA 及びコントロールの luciferase mRNA の翻訳効率に対する iPABP タンパク質 及び Tob タンパク質の影響を *in vitro* cell-free system を用いて調べた。その結果、iPABP が、コントロールの luciferase mRNA に比較して IL-2 mRNA の翻訳を選択的に促進する事を見出した。又、Tob がこれを量依存的に阻害する事を示した。さらに、先に明らかにした Tob との結合領域を欠いた iPABP の mutant (iPABP Δ) は、IL-2 mRNA の翻訳を顕著に促進はせず、Tob の影響による翻訳抑制も受けなかった。これらの結果から、iPABP タンパク質により促進される IL-2 mRNA の翻訳阻害には、iPABP と Tob の結合が重要である事が示唆された。さらにこの Tob 及び iPABP を介した IL-2 mRNA の翻訳制御には 3' 非翻訳領域 (3' UTR) から下流の RNA の配列が必要である事も明らかにした。

4. Tob による IL-2 mRNA の *in vivo* における 翻訳制御機構

さらに、*in vivo* での IL-2 mRNA の翻訳への iPABP 及び Tob の作用を調べる為に iPABP の NIH3T3 安定発現株 (M-iPABP-NIH3T3) を樹立し、Tob 及びヒト IL-2 の発現ベクターをトランスフェクションした。IL-2 及びコントロールの GST mRNA の発現は、Tob の過剰発現の有無に関わらず同程度に検出された。しかし、ウエスタン解析でタンパク質の発現レベルを調べると、GST に比較して IL-2 の産生が Tob の過剰発現により阻害されていた。この結果より、Tob が IL-2 の産生を転写後調節のレベルで抑制する事が示唆された。新鮮なヒト末梢血 T 細胞では、アナジー誘導性刺激で IL-2 の転写は半減するだけであるが、IL-2 の産生はゼロになるというギャップが存在し、ここでは IL-2 mRNA 選択的な ribosomal-loading の障害が存在する事が既に報告されていた。真核生物では翻訳開始において、PABP がその N 端側の RRM (RNA recognition motif) 1 及び 2 で mRNA の poly(A) tail を認識し、RRM2 で eIF4G と結合して mRNA は closed-loop を形成する。これにより 40S ribosome の eIF4G への結合と PABP を介した 60S ribosomal-joining が促進され、開始コドンの運び込みが始まる。

そこでまず、IL-2 mRNA への ribosomal-loading を調べる為に、上記でトランスフェクションした M-iPABP-NIH3T3 のライセートを 15-45 % ショ糖密度遠心勾配で分画し、polysome fraction を分析した。各 20 分画を UV 吸光度計を用いて、A254 で polysome の分布をモニタリングした後、各分画ごとの total mRNA を抽出して slot-blot northern 解析を試みた。コントロールの GST mRNA の各分画における分布は、Tob の過剰発現の影響をほとんど受けなかった。これに対して、IL-2 mRNA の量は、Tob を同時に過剰発現した M-iPABP-NIH3T3 のライセートの polysome 分画において顕著な減少を認めた。さらに 60S 分画での著明な IL-2 mRNA の減少とは逆に 40S ribosome の分画ではむしろ集積を認めた。

5. ヒト末梢血 T 細胞アナジーにおける Tob の発現誘導

最後に、新鮮なヒト末梢血から T 細胞を採取して、T 細胞受容体刺激を行った。

プレートコートした抗CD3モノクローナル抗体単独でのアナジュー誘導性刺激では、刺激開始後6時間をピークに、著しいTobタンパク質の発現誘導が観察された。iPABPタンパク質は無刺激の時と同程度の弱い発現を呈し、IL-2タンパク質は全く発現が検出されなかった。一方、プレートコートした抗CD3モノクローナル抗体と共に抗CD28モノクローナル抗体によるcostimulationを加えたT細胞活性化刺激では、iPABP及びIL-2タンパク質の強い発現誘導が観察されたが、Tobタンパク質の発現は見られなかった。更に、このアナジックな刺激及び活性化刺激6時間後のライセートを抗Tobモノクローナル抗体で免疫沈降した結果、アナジュー誘導性刺激下の場合のみiPABPの共沈が認められた。これよりTobはT細胞アナジュー誘導性刺激下で発現誘導されかつ少量ながら存在するiPABPと結合する事が示された。

6. 結論と考察

以上の実験により、TobはiPABPのC端側と結合しiPABPによるIL-2 mRNAの選択的な翻訳効率の上昇をTobが阻害する事、又、このIL-2 mRNAの翻訳制御にはiPABPのTobとの結合領域及びIL-2 mRNAの3'UTRより下流の配列が必要である事を示した。またiPABP存在下でのTobの過剰発現によるIL-2 mRNAの転写後調節による蛋白生成阻害は主にの60S ribosomeのloadingの疎害による事を明らかにした。更にTobはアナジュー誘導性刺激下のヒト末梢血T細胞で強く発現誘導され、iPABPと結合する事を確認した。

PABP及びiPABPはN端側に保存された4つのRNA認識モチーフ(RRM)をもつがC端側(PABC)も有核細胞生物間で保存されており、特にC末端(CTC)は非常に高い保存性を持つ。またPABCはPAIP、eRF3、hnRNP Eなど様々な因子と結合する他、3'-poly(A) organizingや60S ribosomal-joiningに貢献する、また意義は不明であるが、PABCを介してheterodimerを形成する。iPABPもPABPと同様に60S ribosomeのIL-2 mRNAへのloadingを促進すると仮定すると、Tobによって直接または間接的にこのribosomal-joiningが阻害された事が考えられる。

転写されたmRNAが安定に細胞質に搬送される過程では、mRNAの3'UTRやcoding region内の特定の領域(mCRD)に結合する蛋白質及び、PABPやPABPに結合する蛋白質によりマスクされた大きなmRNP複合体が形成されている。これによりdeadenylaseやribosomeのmRNAへのアクセスが阻害され、分解や翻訳開始などが不可能な状態が保たれる。特にサイトカインなどの増殖因子や癌原遺伝子のmRNAは3'UTRの不安定化シグナル(ARE)の存在によって急速に分解される為、通常はこの領域はマスクされた状態にある。このように蛋白合成が不要な状況下で迅速にmRNAの利用性(availability)を低下させる機構は、蛋白質の過剰産生による癌化などの異常を防ぐ為には不可欠である。TobとiPABPによるIL-2 mRNAの翻訳効率の制御にはIL-2 mRNAの3'UTRから下流の配列を必要としたが、この結果は3'UTRに結合するmRNAの制御因子群にTobやiPABPが含まれる事を示唆している。

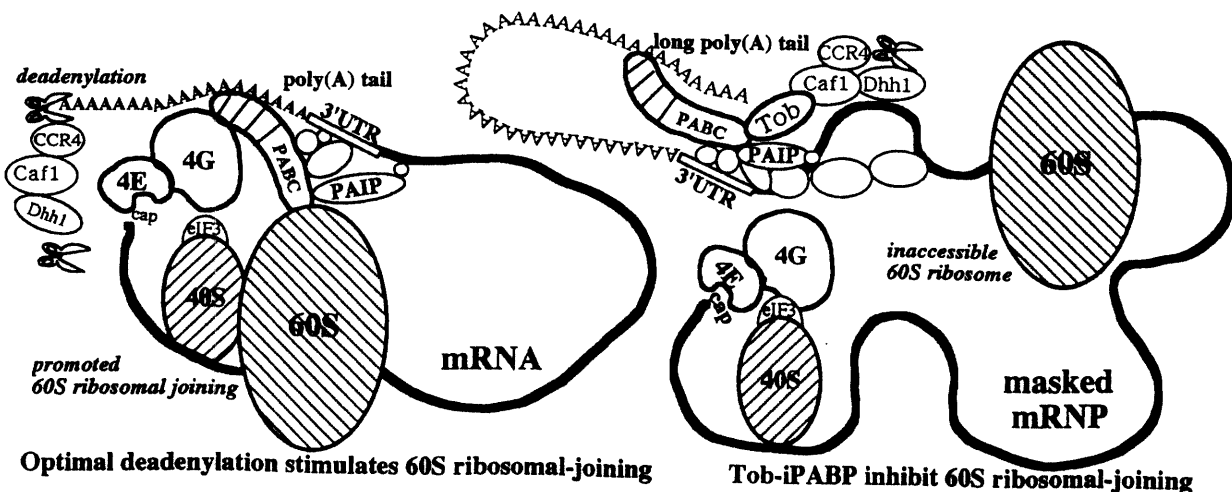
TobはBtg1やPC3等と共にファミリーを成し、いずれもCaf1(CCR4 associated factor 1)と結合することが知られていたが、その意義は全く不明である。Caf1自体も転写因子CCR4やdecapping component Dhh1と結合するが、その機能は未知であった。最近このCaf1/CCR4は細胞質で最終段階のmRNAのdeadenylaseとしても機能する事が報告された。核で合成されたpre-mRNAは転写の終結と同時進行してRNA polymerase IIのC端(CTD)上のいわゆるmRNA factoryに於てsplicingやcreavage-polyadenylationなどが始まる。長いpoly(A) tailはmRNAの細胞質への輸送過程で徐々にdeadenylaseによって削りこまれ、最適な長さでmRNAへの60S ribosomal-joiningを促進して翻訳開始へ向かわせ、更に短くなったpoly(A) tailはdecappingをも誘発してmRNAを壊してしまう。このdeadenylaseの活性はPABPをcofactorとして必要とする事は以前より知られており、Tobによる60S ribosome-

loading の阻害は、この Caf1 による適切な poly(A) の削り込みが阻害された結果としてもたらされた可能性もある。

IL-2 mRNA は、細胞外の刺激に対応して発現を制御する様々な転写後調節が存在する。アナジー誘導性刺激での転写後調節以外にも、T細胞の活性化刺激過剰では pre-mRNA が核に停滞し、翻訳を CHX で抑制すると maturation の加速により細胞質 mRNA が超急速誘導される。本論文では、Tob がアナジー誘導性の T細胞刺激によって発現誘導される事も示した。アナジー誘導性の初回刺激では、basal-level で存在する iPABP により IL-2 mRNA の翻訳が促進されてしまう。Tob は初回 アナジー誘導性刺激後の迅速な IL-2 タンパク質産生の抑制に関与すると考えられる。又、Tob の不安定性は、2 回目以降の刺激の後アナジー或いは増殖のいずれの状態へも円滑に移行する為には合理的な性質である。アナジー誘導性刺激で発現誘導される Tob は、ヒト T細胞アナジーにおける IL-2 mRNA の翻訳レベルでの制御因子の一つである可能性が示唆された。IL-2 などのサイトカインの mRNA は、CD28 刺激により安定化されるが、先に示したように iPABP の発現誘導には CD28 共刺激が必要であり、iPABP がこの CD28 刺激下でのサイトカイン mRNA の安定化にも関与している可能性がある。

他の Tob ファミリーメンバーである PC3 は NGF 以外にも EGF、FGF や IL-6 の刺激で発現が誘導される。Btg1 は PGE₂ 刺激下の不応答状態のマクロファージ、FSH 刺激下の Sertoli 細胞、そしてアンドロゲン依存性の前立腺癌細胞株に於て高く発現が誘導される。不応答に陥ったマクロファージでは、TNF- α の産生が転写後調節により抑制され、リボゾームのエントリー障害が観察されているが、T細胞における Tob と同様に Btg1 により制御されている事も予想される。これらの事から、Tob ファミリーは、多細胞生物で細胞への様々な過剰な刺激に応答して発現誘導され、細胞内の恒常性維持の為に、核から細胞質に輸送される過程での mRNA の運命を調節する抑制因子群としてのエンジンプレーキ様の機能を持つと考えられる。

さらに Tob ファミリーはある刺激下では核に移行する事も観察されているが、この意義も不明である。PABP が転写抑制下で核移行し splicing factor S35 と共に斑状に局在する事や、pre-mRNA の cleavage factor と結合する事、さらに Caf1/CCR4 複合体が RNA polymerase II のホロ酵素に含まれる事が明らかになりつつある。このように Tob との結合分子達は mRNA factory から蛋白質産生管理に渡る広範囲な役割を担うと考えられるが、これらの生理機能の解明が Tob ファミリーの核移行の意義を理解する手がかりもたらずであろう。少なくとも mRNA の制御因子として Tob が合成直後の pre-mRNA を核内で待ち伏せする事は効率的ではある。IL-2 では先に示したように、mRNA の生成・成熟・移送・利用性という核と細胞質に介在する蛋白質の需要と mRNA の供給のバランスを律速する監視機構の存在を仮定したが、多細胞生物で展開される Tob ファミリーの生理的な存在意義は、この監視機構の一端を担う mRNP 3'-end の制御因子群として、各種の細胞外からの刺激に応答して迅速に発現誘導されて、増殖因子などの適切な蛋白生成を維持する事であろう。



Optimal deadenylation stimulates 60S ribosomal-joining

Tob-iPABP inhibit 60S ribosomal-joining