

論文の内容の要旨

論文題目：エンテロウイルス 2A プロテアーゼによるキャップ構造依存性翻訳開始阻害の新しい分子メカニズム

氏 名：棟方 翼

[背景と目的]

ポリオウイルス (PV) は小児麻痺の原因ウイルスであり、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属し、約 7500 塩基のプラス鎖の RNA をゲノムとする。PV に代表されるエンテロウイルスに感染すると、細胞内ではウイルス由来のタンパク質合成が開始される一方で、宿主細胞由来の mRNA のキャップ構造 (m^7GpppX) 依存の翻訳 (図 1) が阻害され、宿主タンパク質の合成が低下する。エンテロウイルスの mRNA はキャップ構造非依存に翻訳が行われるため、阻害は受けない。この現象は、ウイルス由来の 2A プロテアーゼが宿主の翻訳開始因子である eIF4G を直接或いは間接的に切断することに起因すると考えられてきた。eIF4G は mRNA の 5' 末端のキャップ構造に結合する eIF4F 複合体のサブユニットであり、eIF4G の切断によりキャップ構造依存の翻訳開始複合体の形成が妨げられ、宿主のタンパク質合成の低下に繋がるというモデルが唱えられている (図 2)。

しかし、これまでに発表されたデータの中にはこのモデルに矛盾するものが存在する。PV 感染後に eIF4G の切断が生じる時間と、宿主タンパク質の合成阻害が起こる時間には、1 時間以上の時間差が存在する。また、細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系では、50%以上の eIF4G が切断されずに残っている条件でも、2A プロテアーゼ依存にキャップ構造依存性の翻訳が 5%以下に低下する現象が明らかになっている。従って、

eIF4G の切断以外に、2A プロテアーゼによる宿主の翻訳阻害メカニズムが存在する可能性が示唆されていた。我々は、そのメカニズムを解明する一端として、PV を例にとり、2A プロテアーゼの新しい機能を検討するため、以下の解析を行った。

図1. キャップ構造依存性のmRNAの翻訳開始のメカニズム

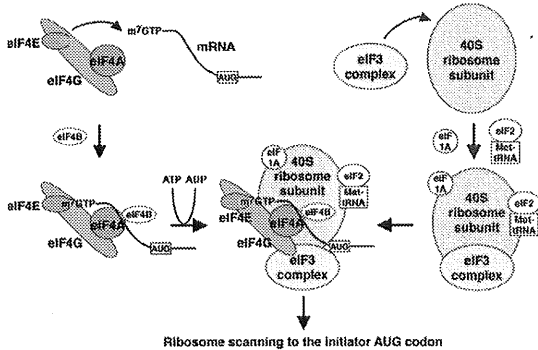
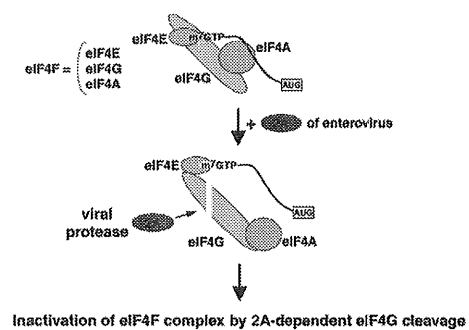


図2. エンテロウイルス感染時のキャップ構造依存性翻訳開始阻害の従来のモデル



[方法と結果]

1. 翻訳開始因子 eIF4E は PV 2A^{pro} と結合する。

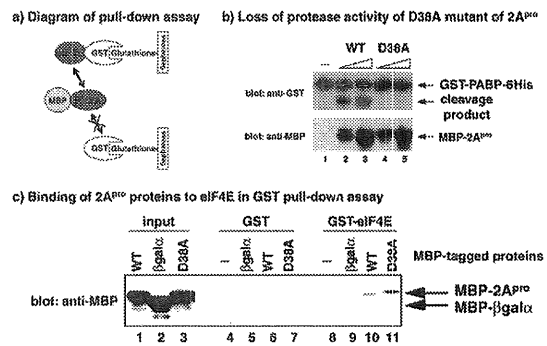
PV 感染時に、2A プロテアーゼ (2A^{pro}) がキャップ構造依存性の翻訳を新しい機能を用いて阻害するならば、その機能に必要なドメインやモチーフが一次構造上に存在すると考え、2A^{pro} のアミノ酸配列を調査したところ、全てのエンテロウイルスに「eIF4E 認識モチーフ」が存在することを見出した (図3)。「eIF4E 認識モチーフ」は、翻訳開始因子 eIF4E に直接結合する eIF4G や 4E-BP 等に共通に存在することが知られている。

そこで eIF4E と PV 2A^{pro} の組み換えタンパク質を大腸菌から調製して、両者が結合するか否かを GST pull-down 法にて解析した。その結果、*in vitro* で eIF4E と PV 2A^{pro} は結合することが明らかになった (図4)。また、2A^{pro} のプロテアーゼ活性が両者の結合に必要なかを、酵素活性中心に変異を導入した D38A 変異体を使って検討したところ、プロテアーゼ活性の有無に関係なく両者は結合した。従って、PV 2A^{pro} は eIF4E に直接作用することで、宿主の翻訳を制御する可能性が示唆された。

図3. エンテロウイルス2A^{pro}中のeIF4E認識配列の発見

Human eIF4G1	606	L E E K K R Y D R E F L L G P Q P I F A	625
Human eIF4GXX	618	T X G R K Q X D R E F L L D F Q S M F A	637
Human 4E-BP1	48	G G T R I I Y D R K F L E X C R N S P V	67
Human 4E-BP2	48	G G T R I I Y D R K F L L D R R N S F M	67
Mouse eIF4G	603	L S E K R R Y D R E F L L G P Q P I F A	622
Yeast TIF4631	446	S H V K X T X G P T T L Q Y K D K L N	465
Yeast CAP20	1	H I K Y T I D S L P Q L K P S L T	27
Consensus		Y X X X X L Φ	
(Φ: hydrophobic amino acid)			
Poliovirus_1M_2A	87	N Y Y P A R Y Q S H M L I G H G F A S P	106
Poliovirus_2L_2A	87	E Y Y P A R Y Q S H M L I G H G F A S P	106
Poliovirus_3J_2A	87	D Y Y P A R Y Q S H M L I G H G F A S P	106
Coxsackievirus_B13_2A	88	N Y Y P R A Y Q S H V L L A A G F S E P	107
Coxsackievirus_B3V_2A	88	E Y Y P R R Y Q S H V L L A A G F S E P	107
Coxsackievirus_B4E_2A	88	E I Y P R R Y Q S H V L L A A G F S E P	107
Coxsackievirus_B5P_2A	88	E Y Y P R R Y Q S H V L L A A G F S E P	107
Echovirus_11G_2A	88	E Y Y P R R Y Q S H V L L A A G F S E P	107
Human enterovirus_701_2A	85	D Y Y P A R Y Q T H T L L A N G P C Q P	104

図4. PV 2A^{pro}の翻訳開始因子eIF4Eへの結合



2. PV 2A^{pro} はキャップ構造から eIF4E を解離させる。

eIF4E は eIF4F 複合体のサブユニットで、mRNA 末端のキャップ構造 (m⁷GpppX) に結合する活性を担っているため、eIF4E のキャップ構造への結合が PV 2A^{pro} 存在下で変化するかを、キャップ構造を模した m⁷Gppp-Sepharose を用いて検討した。その結果、PV 2A^{pro} 依存に eIF4E がキャップ構造から解離することが判明した (図 5)。エンテロウイルス属のみならずピコルナウイルス科の 2A タンパク質において、eIF4E をキャップ構造から解離させる活性の発見は初めてである。

上記の実験では組み換えタンパク質の eIF4E を使用してきたが、細胞内では eIF4E は eIF4G と複合体を形成している。そこで HeLa 細胞より eIF4E/eIF4G 複合体を含む抽出液を調製して、eIF4E/eIF4G とキャップ構造との結合が PV 2A^{pro} により阻害されるか検討した。その結果、先の実験と同様に、PV 2A^{pro} 依存に eIF4E がキャップ構造から解離することが分かった (図 6)。この時、eIF4G のキャップ構造からの解離も観察された。また D38A 変異体の解析から、この解離活性はプロテアーゼ活性とは独立に存在することが示された。

図 5. PV 2A^{pro} 依存の eIF4E のキャップ構造からの解離

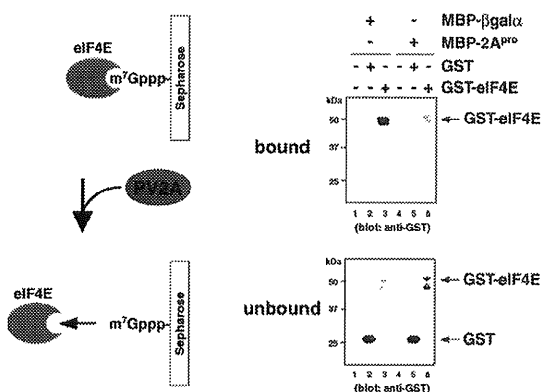
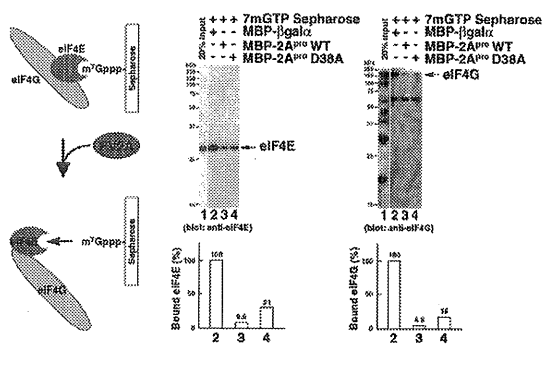


図 6. HeLa細胞抽出液中でのPV 2A^{pro}依存のeIF4E/eIF4Gのキャップ構造からの解離



3. PV 2A^{pro} 中の eIF4E 認識モチーフは eIF4E 解離活性に関与する。

次に、新しく PV 2A^{pro} に見出した eIF4E をキャップ構造から解離させる活性に、2A^{pro} 中の eIF4E 認識モチーフが関わっているか検討を行った。eIF4E 認識モチーフ (Y-X-X-X-X-L-Φ) のアミノ酸中で最も保存性の高いチロシンとロイシンをアラニンに置換した変異体を作製し、HeLa 細胞抽出液中で上記と同等の実験を行った結果、eIF4E 認識モチーフのチロシンとロイシンの両方をアラニンに置換した変異体は、eIF4E 解離活性を失うことが判明した (図 7)。従って、PV 2A^{pro} 中の eIF4E 認識モチーフは eIF4E 解離活性に関与することが示された。

図7. eIF4E認識配列への変異導入による2A^{PRO}依存のeIF4Eのキャップ構造からの解離活性の抑制

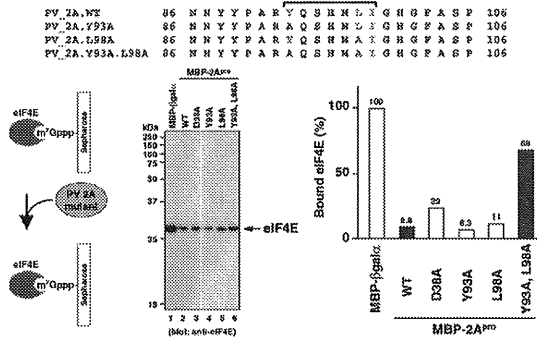
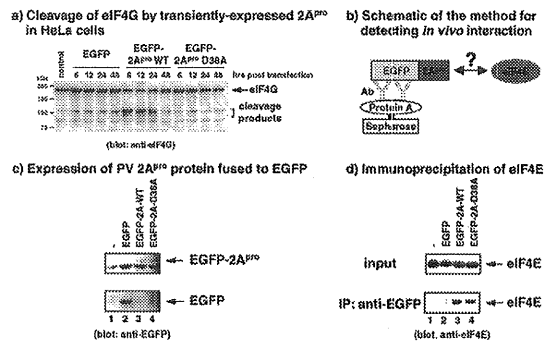


図8. PV 2A^{PRO}とeIF4Eの動物細胞内での相互作用



4. PV 2A^{PRO} はプロテアーゼ活性非依存にキャップ構造依存性の翻訳を抑制する。

ここまでの解析は全て *in vitro* であり、実際の細胞内での PV 2A^{PRO} の働きは不明である。そこで、まず HeLa 細胞で PV 2A^{PRO} を一過的に発現させ、内在性の eIF4E と結合できるか解析したところ、免疫沈降実験により両者はプロテアーゼ活性非依存に相互作用することが判明した (図8)。次に、細胞内での翻訳反応が PV 2A^{PRO} 発現時にどのように変化するかを、dicistronic mRNA 発現ベクターを co-transfection して解析した。その結果キャップ構造依存性の翻訳は PV 2A^{PRO} 依存に、かつそのプロテアーゼ活性非依存に抑制されることが判明した (図9)。

図9. キャップ構造依存性翻訳のPV 2Aタンパク質による抑制

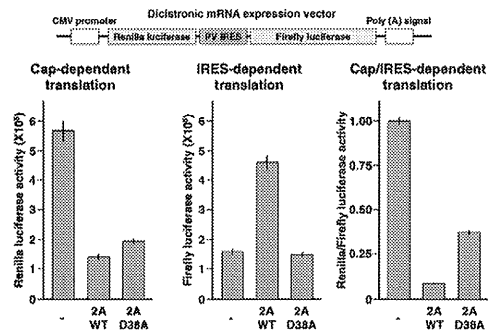
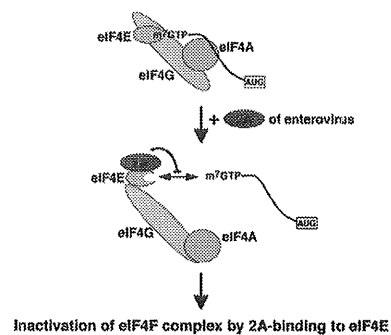


図10. エンテロウイルス感染時のキャップ構造依存性翻訳開始阻害の新規モデル



[まとめと考察]

今回我々は、2A^{PRO} が翻訳開始因子の eIF4E に直接結合することを新規に見出し、2A^{PRO} が eIF4E をキャップ構造から解離させることを始めて明らかにした。この活性には 2A のプロテアーゼ活性は不要であるが、eIF4E 認識モチーフは必要だった。また、2A^{PRO} によるキャップ構造依存性の翻訳阻害には、プロテアーゼ活性は必要なかった。これらの結果より、eIF4E が eIF4F 複合体のサブユニットとして、キャップ構造への結合活性を担う翻訳開始の律速段階にあることを考慮すると、2A^{PRO} がその過程を直接阻害してキャップ構造依存性の翻訳を低下させるという新しい経路を考えることが可能

になる (図 10)。

我々の解析より、エンテロウイルスの 2A は少なくとも二種類の異なる活性を有しており、プロテアーゼとして eIF4G 等の翻訳開始因子を切断する活性に加えて、eIF4E とキャップ構造の相互作用を直接阻害する活性を利用して、宿主細胞のタンパク質合成を抑えると推定できる。