

論文の内容の要旨

論文題目 翻訳の終結と mRNA 分解の開始を結ぶ分子機構の解析

氏名 打田 直行

【はじめに】

真核生物の mRNA は二つの大きな特徴をもつ。一つは 5'末端キャップ構造であり、もう一つは 3'末端 poly(A)鎖である。これら両構造は核内において mRNA に付加され、mRNA が細胞質に輸送された後は、翻訳及び mRNA の安定性に大きな影響を与える。

近年、真核細胞における翻訳のメカニズムとして、mRNA の環状化が示された。mRNA のキャップ構造と poly(A)鎖にはそれぞれ、翻訳開始因子群 eIF4E/eIF4G, poly(A)鎖結合蛋白質 PABP が相互作用する。eIF4G と PABP は相互作用し、mRNA は環状化する。その結果、翻訳を終えたリボソームは新たな翻訳開始へと効率よく再利用されると考えられている。

mRNA の分解時には、まず poly(A)鎖が分解され、その後にキャップ構造除去される。両構造を失った mRNA は速やかに分解される。したがって、poly(A)鎖分解が mRNA 分解過程の律速段階である。この poly(A)鎖分解は翻訳の進行に伴って起こるが、実際に翻訳と poly(A)鎖分解を結びつける分子機構は未だ不明であった。

私はこれまでに、翻訳終結因子 GSPT/eRF3 が PABP を介して翻訳開始因子と相互作用し、終止コドンからキャップ構造までが蛋白質のブリッジで結ばれ、翻訳が効率よく進行することを示してきたが(図 1)、この翻訳機構が働くと同時に mRNA の poly(A)鎖分解が進行するはずである。そこで、本研究において私は、

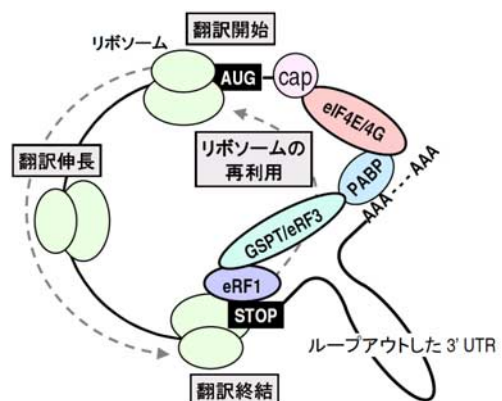


図1 環状化した mRNA 上ではリボソームが効率よく使われ翻訳が活性化される

翻訳と mRNA の poly(A)鎖分解とが共役するメカニズムの解明を目指した。この解析により、細胞内においてヘテロ二量体型で mRNA の poly(A)鎖分解を担うヒト RNA 分解酵素(hPAN; human PABP-activated nuclease)を同定し、この PAN が PABP によって活性化されることを示した。また、細胞内で PAN が mRNA の poly(A)鎖分解で機能すること、PAN が GSPT と PABP 上で入れ替わることを示唆する結果を得た。これらのことから、翻訳終結が poly(A)鎖分解と共役するメカニズムを提示したい。

【結果】

1. poly(A) RNA 特異的ヘテロ二量体型ヒト RNA 分解酵素 PAN の単離と生化学的解析

出芽酵母においては、二種類の poly(A)特異的 RNA 分解酵素が同定されている。一つは Ccr4 であり、他方は Pan2 及び Pan3 からなる PAN 複合体である。しかしながら、両者の poly(A)分解活性に対して PABP が与える影響は全く異なる。PABP が結合した poly(A)を Ccr4 は分解できないのに対して、逆に PAN は PABP 存在下のみ poly(A)を分解する。翻訳中の mRNA の poly(A)鎖には PABP が結合していることから、私は、細胞内において翻訳と共役した形で mRNA の poly(A)鎖を分解する RNA 分解酵素は PAN であると考えた。

私は、翻訳と mRNA の poly(A)鎖分解とが共役するメカニズムの解明を目指すにあたり、題材として哺乳類の細胞を用いることにしたが、出芽酵母以外の種においては PAN が未同定であったことから、まずヒト PAN の cDNA の単離を試みた。まず、出芽酵母の PAN を構成するサブユニットのうち RNaseドメインをもつ Pan2 のアミノ酸配列を元にデータベースを検索したところ、ヒト Pan2 (human Pan2; hPan2)の全長配列を見出し、その cDNA を得た。種々の生化学的解析の結果、hPan2 は 3'→5'方向に RNA を分解するエキソリボヌクレアーゼであった。

次に、出芽酵母の Pan3 のアミノ酸配列を元にデータベース検索したところ、ヒト Pan3 (human Pan3; hPan3)の 5'側を欠いた断片 cDNA を見出し、5'RACE 法により全長の cDNA を単離した。hPan2 と hPan3 は複合体(human PAN; hPAN)を形成し、さらにこの hPAN は PABP とも相互作用した。この際、hPan3 が hPan2 及び PABP の双方に同時に結合した。

また、hPAN が poly(A) RNA を分解するにあたっては PABP による活性化を受け、この活性化の際には hPan2 と PABP を物理的に結びつける hPan3 が必要であった(図 2)。このように PABP によって活性化した hPAN は基質として poly(A)に対して高い特異性を持ち、mRNA の poly(A)鎖を分解する酵素として目的に合致した特性を保持していた。

2. 細胞内において翻訳が進行している mRNA の poly(A)鎖分解過程で機能する hPAN

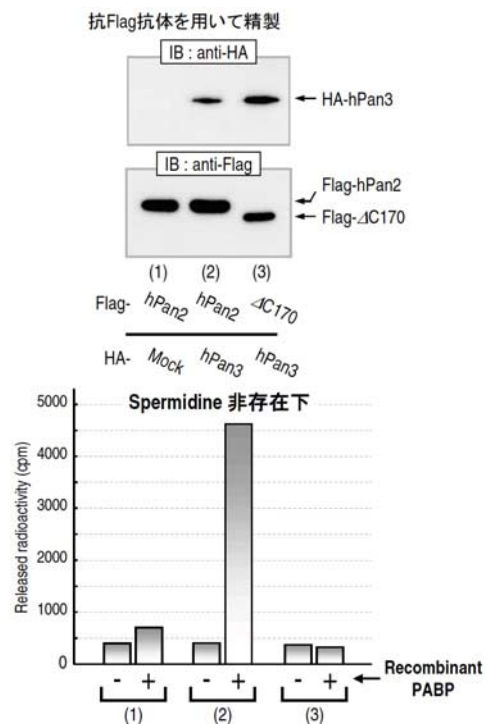


図2 PABP は hPan3 サブユニット依存的に hPAN の RNase 活性を刺激する。ΔC170 は RNaseドメインを欠くhPan2の変異体

翻訳及び mRNA の分解は細胞質で起こる。そこで、hPan2 及び hPan3 の細胞内における局在を検討した結果、両者ともに細胞質に分布することが明らかとなった。また、リボソームが結合し翻訳が進行している mRNA (ポリソーム) を精製したところ、ポリソーム画分に hPan2 及び hPan3 が検出された。

以上の結果より、hPAN は翻訳中の mRNA 上において poly(A) 鎖分解で機能している可能性が考えられた。そこで、点変異により RNA 分解活性を完全に失った hPan2 (D1083A) を細胞内に発現させ、mRNA の poly(A) 鎖が受ける影響を検討したところ、D1083A を導入した細胞では長い poly(A) 鎖を持つ mRNA が検出された(図 3)。したがって、hPAN が、細胞内においては翻訳が進行している mRNA 上において poly(A) 鎖の分解過程で機能することが示唆された。

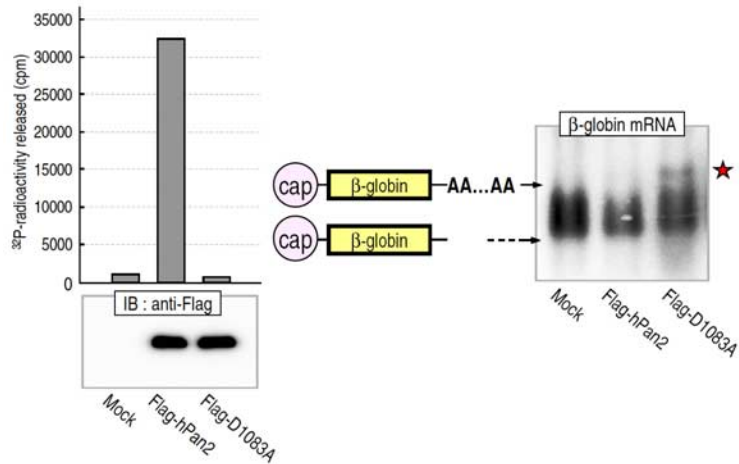


図3 hPan2 の不活性型を細胞内に過剰発現することにより poly(A) 鎖の長くなった mRNA が検出される

3. hPAN と PABP 及び翻訳終結因子 GSPT/eRF3 の相互関係

翻訳中の PABP は翻訳開始因子 eIF4G 及び翻訳終結因子 GSPT/eRF3 と結合し機能する。これら両因子と hPAN が同時に PABP と相互作用するかを検討したところ、eIF4G と hPan3 が PABP に同時に結合している状態は確認できたが、GSPT は hPan3 と共に PABP に結合している状態は検出できなかった。そこで、hPan3 と PABP が相互作用している状態に対して GSPT を添加したところ、hPan3 と PABP の解離が確認された。すなわち、PABP 上で hPan3 と GSPT は競合すると考えられた。そこで、細胞内においても hPan3 と GSPT が PABP 上で排他的な関係にあるのかを検討した。翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドで細胞を処理したところ、未処理の場合と比較して GSPT と PABP の結合量が増大するとともに、hPan3 と PABP の結合量が減少することが確認された(図 4)。したがって、細胞内において、翻訳状況の変化に応じて GSPT と hPAN が PABP 上で入れ替わることが示唆された。

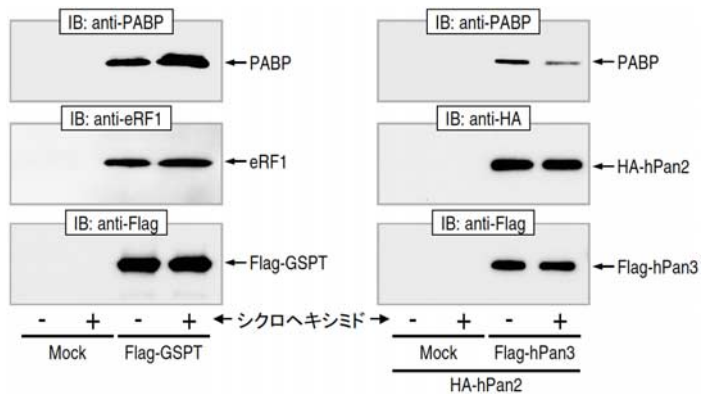


図4 シクロヘキシミド処理によりPABP 上で逆の挙動を示す hPAN と GSPT/eRF3
～抗Flag抗体による免疫沈降実験より～

4. mRNA の poly(A)鎖分解過程で機能する PABP と GSPT/eRF3 の相互作用

以上の結果より、GSPT と PABP の相互作用が mRNA の poly(A)鎖分解過程で機能する可能性が考えられたので、次にその検討を行った。図 5 に示すように、Tet-off システムにより転写のオン・オフが調節できるプロモーターにつないだ β -globin の mRNA をパルスで転写し、すぐに転写を抑制して、その後の

mRNA の動態を観察すると、時間経過と共に poly(A)鎖が次第に短くなっていく様子が観察される。このような中で、RNA 分解活性をもたない Pan2 の変異体 D1083A を発現させると、poly(A)鎖の分解が全く進行しない mRNA が生じた。このような実験系において、PABP との結合部位である N 末端領域を欠いた GSPT の変異体 Δ N を発現させると Pan2 の変異体 D1083A と同様に、poly(A)鎖の分解が全く進行しない mRNA が生じた。したがって、正常な poly(A)鎖の分解が進行するには PABP と GSPT の結合が重要であると考えられる。

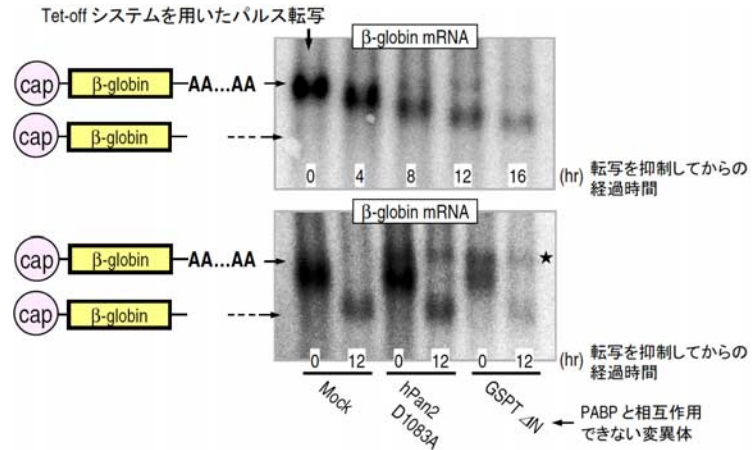


図5 GSPT と PABP の相互作用は mRNA の poly(A)鎖分解過程で機能する

[まとめ]

本研究により、次のような「翻訳終結反応と共役した poly(A)鎖分解メカニズム」が考えられる(図 6)。まず、翻訳終結因子 GSPT が終止コドン上でもう1つの翻訳終結因子 eRF1 とともに翻訳終結反応において機能し、PABP を介した GSPT/eRF3 と翻訳開始因子との相互作用によりリボソームは新たな翻訳開始へと再利用される。その後、PABP 上で GSPT/eRF3 と hPAN が入れ替わり、mRNA の poly(A)鎖が分解される。以上のように、これまで不明であった翻訳過程と mRNA の分解過程の連続性が分子的に説明されることは、遺伝子発現機構の全容解明の観点から意義深いと考えられる。

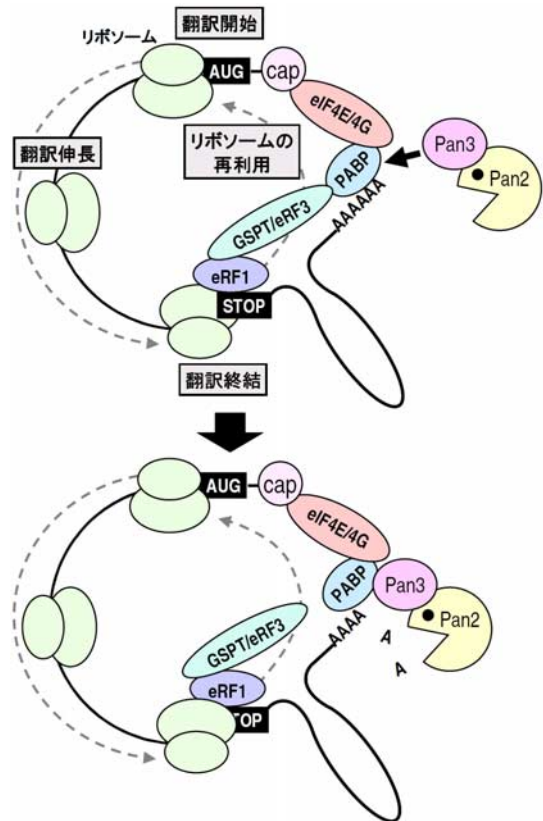


図6 翻訳終結反応と共役して進行する mRNA の poly(A)鎖分解反応

[参考文献]

- 1) Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N. and Katada, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 50286-50292.
- 2) Uchida, N., Hoshino, S. and Katada, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 1383-1391.