

論文内容の要旨

論文題目「翻訳開始因子 eIF4E に結合する RNA アプタマーによる翻訳阻害機構
の解明とその医工学的応用への展開」

High affinity RNA for mammalian translation initiation factor 4E
; A novel inhibitor of translation.

氏名： 望 月 潔 隆

<序>

生物の遺伝子発現には様々な制御機構が存在する。中でも翻訳反応の制御は mRNA の転写反応と同様、遺伝子の発現量に直接影響するため、精密な制御機構のもとに成り立ち、細胞の増殖・分化に重要な役割を担っている。真核生物の翻訳制御では、翻訳開始因子 eIF4E による mRNA の 5' 末端の m⁷GpppN (キャップ構造) の認識と、幾つかの eIF の介在によってリボソーム 40S サブユニットが mRNA に誘導される過程が重要である (図 1)。eIF4E とキャップの結合はこの過程の第一段階であり、リン酸化や 4E-Binding Proteins による厳密な制御を受けている。また eIF4E は他の eIF の中でも細胞内でその分子数が最も少ない因子であり、この発現量の増減が細胞の状態に大きな影響を与えることが知られている。例えば、eIF4E を過剰発現した細胞は非協調的な分裂をくり返し腫瘍化する。生体内では eIF4E の発現量増加がヒト乳癌、肺癌、大腸癌細胞中に顕著にみられている。また、eIF4E の発現量の増加に伴って他の原癌遺伝子産物が過剰発現する。このように細胞の癌化と eIF4E の発現量の増加が密接に関わっていることが示唆されてきている。

DNA、RNA といった核酸は生物の遺伝子情報と伝達媒体として知られているが、分子間相互作用においても高い特異性・機能性をもつ分子である。近年、これらの生体分子を創薬をはじめとした臨床応用へと展開する新しい試みがなされている。In vitro selection 法により選択された、ある標的物質に対して特異的に結合する分子をアプタマーという。アプタマーは多くの場合、標的物質の強力なアンタゴニストとして機能するため、病気に関連したタンパク質をターゲットとすることにより、アプタマーの医薬品への応用が期待される。本研究では、癌細胞にみられる eIF4E の過剰発現による細胞の癌化の抑制を目的として、eIF4E に特異的に結合するアプタマーを選択し、その機能性の解析を行った。

＜方法と結果＞

RNA アプタマーの選択は Tuerk and Gold (Science 1990)、Ellington and Szostak (Nature 1990) の開発した *in vitro* selection 法により行なった。40nt のランダム配列を含む約 10^{15} 分子の RNA プールから His タグ付きマウス eIF4E と結合する RNA を、 Ni^{2+} -NTA resin で pull-down することにより選択し、逆転写 PCR により増幅した。この選択を 14 ラウンド行い、濃縮されてきた RNA の塩基配列を決定したところ、9 つの配列に収束していた。さらに、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析を行い、eIF4E とアプタマーの相互作用解析を試みたところ、aptamer 1 において eIF4E に対する特異的な結合が確認され、またその結合定数は $K_d = 11.2 \text{ nM}$ であった。次に、得られたアプタマーが eIF4E と結合することで、eIF4E のキャップ結合活性にどのような影響を与えるかを調べるため、cap analog である $m^7\text{GTP}$ -sepharose resin を用いた pull-down 実験を行った。その結果、aptamer 1 を加えたものは濃度依存的に eIF4E-cap 間の結合を阻害した。これらのことから aptamer 1 は eIF4E のキャップ結合阻害活性を有していることが示された。次に、この結合阻害が翻訳反応に与える影響をみるため、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* での翻訳反応にアプタマーを加え、その翻訳阻害効果を検証した (図 2)。CAT と LUC のリポーター遺伝子配列をタンデムに配置し、その間に HCV IRES (Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site) の配列を挿入した、5' 末端が capping された mRNA を翻訳の鋳型とした (図 2; 上)。HCV IRES は eIF3 と 40S リボソームサブユニットに直接結合して下流の ORF の翻訳が行われることが知られており、鋳型の mRNA の CAT 産物はキャップ依存的、LUC 産物はキャップ非依存的な反応により翻訳される。この mRNA を ^{35}S -Met を含むウサギ網状赤血球ライセートに加えて *in vitro* 翻訳させ、この系に aptamer 1 を 0.5–5.0 μM 濃度で加えたところ、LUC 産物の翻訳量に影響はみられなかったが、CAT の翻訳産物量は aptamer 1 の濃度に比例して減少した (図 2; 下)。また、同様の系にコントロールとして N40 random を加えた実験では CAT、LUC の翻訳産物量に影響はみられなかった。これらのことから aptamer 1 は eIF4E を必要とするキャップ依存的な翻訳反応を特異的に抑制することが判明した。

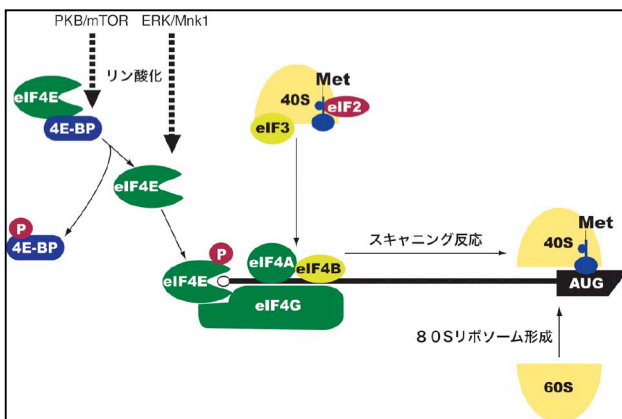


図 1. 翻訳開始因子 eIF4E

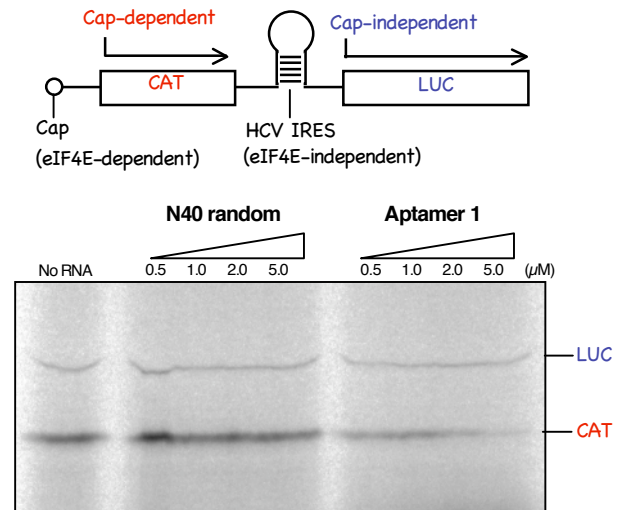


図 2. アプタマーによる *in vitro* 翻訳阻害

Aptamer 1 のキャップ結合阻害作用モデルとして、RNA aptamer 1 が自身の塩基の一部 (キャップの $m^7\text{G}$ 同様、グアニン塩基である可能性が高い) をキャップ構造に擬態して結合し、競合阻害作用を持つのではないかと推測した。もし aptamer 1 がキャップ構造を擬態してキャップ結合部位に結合するのであれば、eIF4E のキャップ結合に関与するアミノ酸に変異を導入することで、aptamer 1 は結合できなくなると考えられる。そこで、キャップ結合部位変異型 eIF4E と aptamer 1 の結合を SPR により解析した (図

3)。解析の結果、キャップ構造のリン酸基を認識する側鎖の変異体である R112A は aptamer 1 に対してほとんど結合活性を持たず、K206A においては全く結合活性がみられなかった (図 3)。これらの結果から、aptamer 1 と eIF4E の相互作用には Arg112 と Lys206 の塩基性アミノ酸側鎖の存在が重要であることが示され、また aptamer 1 はキャップ構造を擬態してキャップ結合部位に結合しているのではなく、キャップ結合部位の入り口に結合することで eIF4E のキャップ結合を妨げることが推察された。

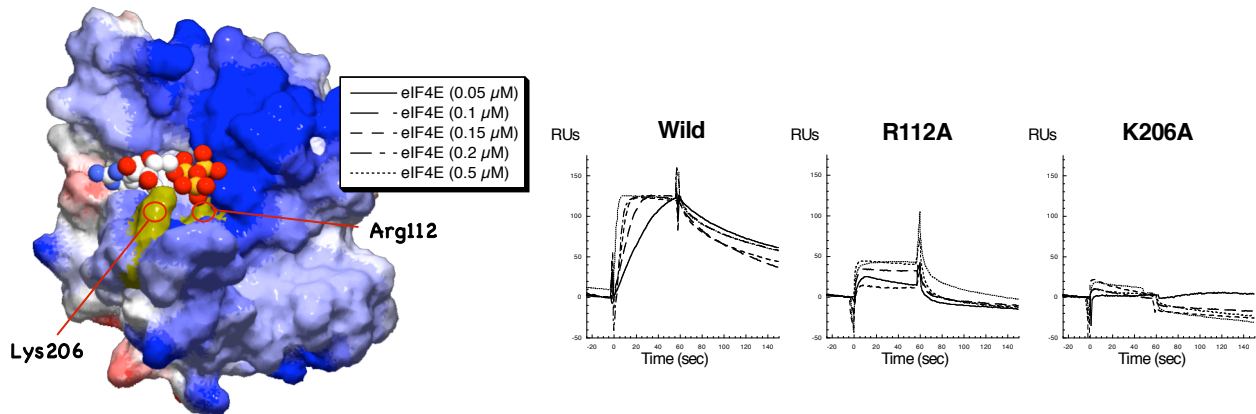


図 3. SPR 解析による eIF4E 上のアプタマー結合部位の特定

次に、アプタマーの反応阻害作用機序が明らかとなったので、アプタマーによる細胞内の eIF4E の抑制効果の検証を行なった。まずアプタマーの細胞内での効果を検証するにあたって、適切なモデルとなる細胞株の選択が必要となる。理想的なのは、eIF4E の機能阻害により細胞の成長・分化・形態変化などに表現型としてその効果が反映され、さらにその原因を還元しやすいモデル系を用いることである。そこで、最も単純な真核生物の一種であり、遺伝学的・分子生物学的手法が確立している酵母 *S. cerevisiae* をモデル細胞として用いることを考えた。そのため、酵母 eIF4E をヒト eIF4E に置き換えたヒト eIF4E キメラ酵母を作製し、これをほ乳類細胞の単純モデルとして aptamer 1 の発現を試みた (図 4)。ヒト eIF4E で生育する酵母株は、ヒト eIF4E の発現量に依存してその生育速度が変化することを確認した。この際、eIF4E 発現量が比較的少ない CYC プロモーターでの eIF4E 発現株 (BY4727, $\Delta Cdc33::His3$, p416CYC-h4E or y4E) 株をアプタマー発現のモデル生物とした。アプタマー発現に際しては、aptamer 1 は 86 mer と短く、また二次構造性をあまりとらないフレキシブルな RNA であるため、結合活性に影響をもたらす余分な付加配列が付かないような発現系が望ましい。そこで、RNA アプタマーを 2 つの hammerhead ribozyme で挟みこみ、86 mer の RNA として発現できるような切断位置を設けることで発現時の付加配列を切り捨てるように設計した (図 4)。また、mRNA が核外に輸送されるためにはある程度の長さが必要であるという報告があるため、リボザイムとアプタマーのユニット (RzAp1; 214 mer) をタンデムに配置し ((RzAp1) $_n$; $n = 1, 2, 4, 8$)、長い mRNA として発現されるように設計した。これらの (RzAp1) $_n$ を GAL プロモーターと CYC ターミネーターの間に挿入し、pRS424 ベクターに組み入れたプラスミドを作製してヒト eIF4E、および酵母 eIF4E 発現酵母株 (BY4727/ $\Delta cdc33::HIS3/p416CYC-helF4E$ or $yeIF4E$) に形質転換した (図 4)。その結果、得られた酵母株のうち、ヒト eIF4E 発現酵母に RzAp1 を 4 つ並べて mRNA として発現させた (RzAp1) $_4$ 酵母株のみに強い生育抑制効果が現れた (図 5)。

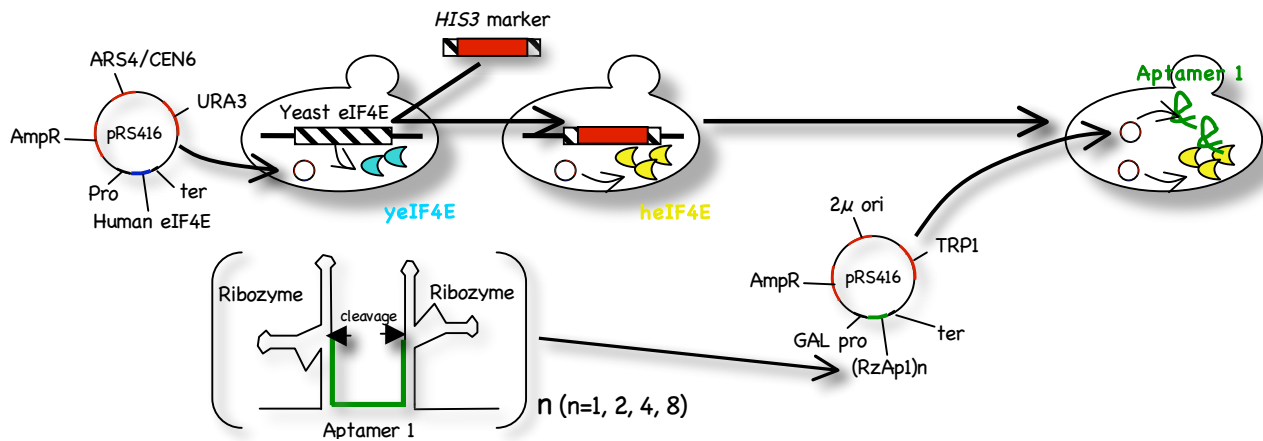


図4. ヒト eIF4E で生育する酵母株の作製と、アプタマーのリボザイム発現系

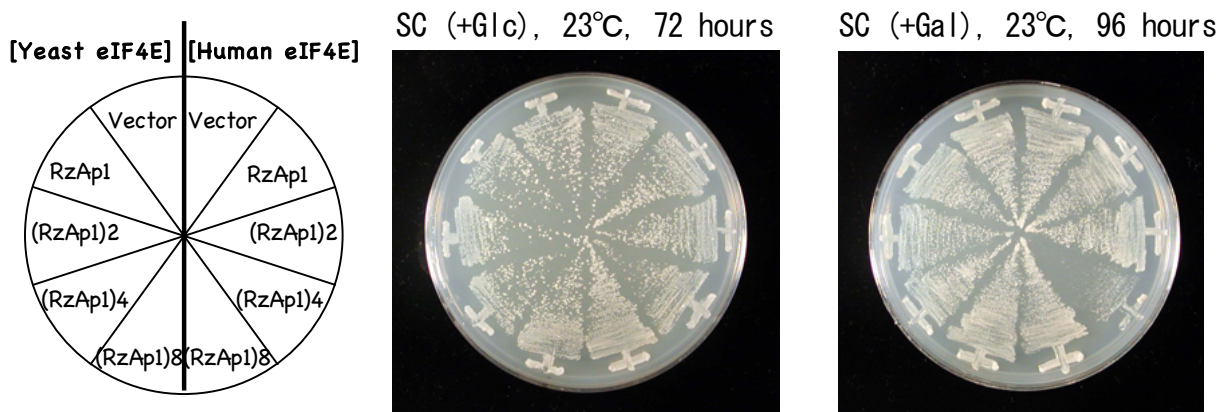


図5. アプタマー発現酵母株の生育

<考察>

本研究により、ほ乳類 eIF4E に特異的に結合する RNA アプタマー、「eIF4E aptamer 1」が選択された。この aptamer 1 と eIF4E の相互作用には Arg112・Lys206 の塩基性アミノ酸側鎖が関与していた。eIF4E のキャップ結合部位付近は塩基性アミノ酸に富んだ正電荷に帯電した領域であり、RNA 分子の負電荷と相補した静電的相互作用が *in vitro* selection 法において重要な要素であることを示している。また、近年の X 線結晶構造解析の報告 (Tomoo et al. *J. Mol. Biol.* 2003) では、m⁷GpppA の二番目のヌクレオチドである A と eIF4E の Thr205-Lys206-Ser207 アミノ酸側鎖が相互作用しており、Lys206 はキャップ構造の二番目のヌクレオチドとの相互作用部位である可能性がある。すなわち、Thr205-Lys206-Ser207 側鎖がキャップ構造以降のヌクレオチドと相互作用して潜在的な mRNA の安定化部位として機能しており、この潜在的 RNA 結合構造により RNA アプタマーが選択されたと考えられる。

Aptamer 1 はキャップ結合阻害活性を持ち、翻訳開始反応を抑制した。また、ヒト eIF4E を発現させた酵母細胞中で aptamer 1 を発現させた実験では、(RzAp1)4 発現株において、ヒト eIF4E 特異的に生育の抑制効果が観察された。これらのことから、aptamer 1 は細胞中の環境においても機能し、ヒト eIF4E 依存的な翻訳反応を抑制できることが推察された。さらに、(RzAp1)*n* mRNA の適度な長さが細胞質側に存在する eIF4E の阻害に重要であることから、mRNA の核外輸送が aptamer 1 が細胞質側で機能する上で必須であることが考察された。

本研究では、アプタマーを用いた RNA 工学技術を生細胞に活用するための新規 RNA 発現系の構築に成功した。今後はアプタマー発現の際に生じる問題点を考察し、RNA 医工学的応用への可能性を検討していく。