

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻

平成 21 年度博士課程入学

氏 名 尾添 淳文

指導教員名 高橋 伸一郎

論文題目 RNA を含むインスリン受容体基質複合体の翻訳制御における新機能の解明

インスリンやインスリン様成長因子 (IGF) は、物質代謝の同化を促進、異化を抑制し、また多くの細胞種の増殖や分化を誘導、細胞死を抑制することにより、動物の発達・成長・成熟・代謝・老化の制御に重要な役割を果たしているホルモンである。これらの生理活性は、生体の置かれた状況に応答して巧妙に調節されることにより、生体は環境の変化に適応し生命の維持が可能となっている。一般に、インスリンや IGF は、標的細胞の細胞膜に存在する特異的な受容体に結合すると、受容体に内蔵されているチロシンキナーゼが活性化、これがインスリン受容体基質 (IRS) をチロシンリン酸化する。このチロシンリン酸化 IRS を認識して相互作用する下流シグナル分子が下流情報伝達経路を活性化し、広範な生理活性が発現すると考えられている。我々の研究グループでは、種々の細胞外因子によってインスリンや IGF の生理活性が調節される機構を解析する過程で、IRS にチロシンリン酸化を介さずに多くのタンパク質が相互作用し巨大なシグナル複合体を形成しており、これらにより IRS のリガンド依存的なチロシンリン酸化や下流シグナル経路が修飾される結果、生理活性が調節されることを見出してきた。更に、IRS と共免疫沈降するタンパク質を質量分析法で、あるいは IRS と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を yeast two-hybrid 法で同定したところ、これらの中には、mRNA の poly(A) tail に結合する poly(A) binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1)、メチル化活性によって RNA のスプライシングを制御することが知られている protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)、methylosome protein 50 (MEP50)、スプライソソーム構成タンパク質など、RNA 代謝に関連する分子群が多数含まれていた。また、IRS は、RNA 自身とも相互作用し、RNA を含む複合体を形成していることも明らかとなった。そこで私は、IRS が RNA や RNA 代謝に関与するタンパク質と相互作用することにより、RNA の翻訳や成熟・安定性等が制御、その結果、インスリン/IGF のタンパク質合成促進などの生理活性発現が調節されるという作業仮説を構築し、この観点から IRS の新規機能を解明することを本研究の目的とした。

1. IRS と翻訳マシナリーの相互作用

これまでの研究で PABPC1 が IRS-1 と相互作用するタンパク質として同定されていることから、IRS-1 複合体には mRNA が構成因子として含まれ、これを介して翻訳開始因子も存在している可能性が考えられた。そこでまず、mRNA の cap 構造に結合する eIF4E や eIF4G、pioneer round of translation における mRNA の品質管理等に重要な役割を果たしている exon junction complex に含まれる eIF4A3 が、IRS-1 複合体内に存在するかを検討した。ヒト乳癌細胞 MCF-7 より抗 IRS-1 抗体で内在性の IRS-1 を免疫沈降し、沈降物を上記の分子に特異的な抗体を用いた immunoblotting に供した結果、IRS-1 複合体には PABPC1 に加えて、eIF4E や eIF4G、eIF4A3 も存在することが明らかとなった。続いて、IRS-1 を免疫沈降後、沈降物に RNase 処理を施したところ、これらのタンパク質が IRS-1 複合体から解離したことから、IRS-1 は RNA を介してこれらの因子と間接的に相互作用していることがわかった。また、MCF-7 細胞を IGF-I で刺激し、同様に共免疫沈降法で相互作用を検討した結果、IRS と翻訳開始因子との相互作用が増加しており、更に増殖期の MCF-7 細胞の細胞質抽出液をスクロース密度勾配遠心分画に供すると IRS-1 が polysome 画分に分画された。他の結果を併せ、IRS-1 は、増殖刺激の有無に関わらず mRNA-protein complex (mRNP) と相互作用しているが、増殖刺激に応答して起こる翻訳活性化状態では翻訳マシナリーの足場として機能し、翻訳促進に新しい機構で関与しているものと結論した。

2. IRS と mRNA の相互作用

続いて IRS-1 と相互作用する mRNA の同定を試みた。IRS-1 の共免疫沈降物に含まれるタンパク質を質量分析法により、RNA 結合ドメインを有するタンパク質、Ras-GAP SH3-domain-binding protein (G3BP1) が同定された。そこで RNase 非存在下あるいは存在下で IRS-1 を免疫沈降後、G3BP1 との相互作用を immunoblotting により検討した結果、RNase 処理の有無に関わらず G3BP1 と IRS-1 の相互作用が維持された。この結果は、G3BP1 と IRS-1 の相互作用は、RNA を介さないタンパク質-タンパク質間相互作用であることを示しており、G3BP1 が自身の RNA 結合ドメインを介して結合する mRNA が IRS-1 複合体中に含まれている可能性が考えられた。G3BP1 は、DNA 損傷など様々なストレスが負荷された細胞において cap 構造非依存的に誘導されるタンパク質合成が誘導される mRNA の 5'末端の非翻訳領域に存在する internal ribosome entry site (IRES) と相互作用することが報告されている。そこで mRNA に IRES を有し、DNA 損傷により IRES 依存性タンパク質合成が誘導される *bcl-2* mRNA と IRS-1 が相互作用するかを調べることにした。MCF-7 細胞から抗 IRS-1 抗体を用いて調製した免疫沈降物中より RNA を抽出、*bcl-2* mRNA に特異的な primer を用いて RT-PCR を行い、*bcl-2* mRNA 由来の PCR 産物の検出に成功した。続いて MCF-7 細胞に IRS-1 または G3BP1 に対する siRNA を導入し、それぞれのタンパク質発現を抑制したところ、どちらの細胞においても Bcl-2 のタンパク質量が減少した。他の結果も併せると、IRS-1-G3BP1 複合体が *bcl-2* mRNA と相互作用し、これらが *bcl-2* の IRES 依存的な翻訳を促進していると推定された。そこで、IRS-1 が *bcl-2* 5'UTR の IRES 活性に及ぼす影響を検討した。まず *bcl-2* の 5'UTR 全長をクローニングし、これを用いて cap 依存的に翻訳開始される RFP 遺伝子と IRES 依存的に翻訳開始される GFP 遺伝子を含んだ bicistronic reporter plasmid を作成した。IRS-1 を発現抑制した MCF-7 細胞にこの plasmid を導入し、フローサイトメーターにより GFP タンパク質の陽性細胞を計数した。その結果、IRS-1 発現抑制細胞では対照細胞と比較して IRES 活性が低下していることが明らかとなった。これらを併せ、IRS-1 は G3BP1 との相互作用により *bcl-2* mRNA の cap 非依存的な翻訳を制御していると結論した。Bcl-2 は抗アポトーシス活性を有するタンパク質であることから、今後、今回明らかとなった IRS の新たな機能が、IGF の細胞生存活性発現に果たす役割を明らかにしたいと考えている。

3. IRS と snoRNA の相互作用

IRS-1は既知のRNA結合ドメインは有していないが、RNAと直接結合する可能性も考えられた。そこで、*in vivo* UV-crosslinking and immunoprecipitation (CLIP) 法により IRS-1 と直接相互作用する RNA の同定を試みた。CLIP 法により同定された RNA には、mRNA の他、non-coding RNA や rRNA も含まれていた。今回、同定された non-coding RNA の中で核小体小分子 RNA (snoRNA) の一つ、U96A snoRNA (U96A) に注目して研究を進めた。U96A は、Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) 遺伝子の intron 2 内にコードされているが、RACK1 のスプライシングと共役して産生された後、部位特異的転写された 5.8S rRNA にメチル化修飾を引き起こす酵素をガイドする。まず IRS と U96A の相互作用をゲルシフト法や免疫沈降法により検討したところ、IRS が U96A と直接相互作用することが明らかとなった。更に、免疫沈降法により U96A は RACK1 の intron 2 のみがスプライシングされずに残った pre-mRNA や切り出された intron 2 とも相互作用することを見出した。この結果は、U96A が RACK1 のイントロンから切り出され、核小体で機能するまでの過程に、IRS-1 が何らかの機能を果たしている可能性を示している。IRS は既に核内に移行することが報告されているが、核内での IRS の局在や意義についてはほとんど不明である。そこで核内での IRS-1 の局在を解析するため、IRS-1 に SV40 の核内移行シグナル (NLS) を付加した変異体 (IRS-1-NLS) を作成し、これを種々の核内オルガネラマーカータンパク質と GFP の融合タンパク質と HeLa 細胞に共発現し、共焦点顕微鏡により局在部位を検討した。その結果、snoRNA 生合成の場でもある Cajal body に IRS-1-NLS が局在することがわかった。更に、IRS-1 ノックアウトマウスの胎児から調製した線維芽細胞 (MEF) で U96A 量を解析したところ、野生型 MEF と比較して、その量が有意に減少していることも見出した。これらの一連の結果は、IRS が、rRNA の転写後メチル化修飾および成熟に必要な snoRNA の産生を正に制御し、リボソーム生合成のマシナリーの成熟を促進する結果、全タンパク質合成活性が上昇するという新規機構の存在を示していた。

本研究の成果より私は、インスリン・IGF シグナルのアダプター分子としての機能が注目されてきた IRS が RNA および RNA 代謝関連タンパク質と相互作用することで、これまでに報告のない新しい機構により種々のタンパク質の翻訳が制御されていると結論した。本研究で検討を加えた RNA 以外にも IRS は多くの他の RNA とも相互作用し、その機能制御に関与している可能性が考えられる。今後、このような IRS-associating RNA を更に同定し、これらの機能を総合的に解析することでインスリン/IGF の生理活性発現の調節における IRS-1-RNA 複合体の新しい生理的意義を解明できるものと期待している。