

研究報告書

「mRNP リモデリングによる mRNA の活性制御」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：松本 健

1. 研究のねらい

mRNA は真核細胞内ではつねに特定の蛋白質と mRNP を形成しているので、mRNA の翻訳活性や安定性の変化には、mRNP の構造変化 (mRNP リモデリングと呼ぶ) を伴う必要がある。本研究は、mRNA の代謝に重要な細胞質での mRNP のリモデリングが、どのような因子によって担われ、どのような機構でおきるのかを解明することをゴールとする。本研究ではこれまでに研究者がみいだした YBAP1 を mRNP リモデリング因子の候補と考え、細胞内でも mRNP の構造や活性を変化させる活性をもつかどうか調べた。また、mRNP 構成因子の量の調節や修飾による mRNP リモデリングを介した翻訳制御の機構解明をめざした。

2. 研究成果

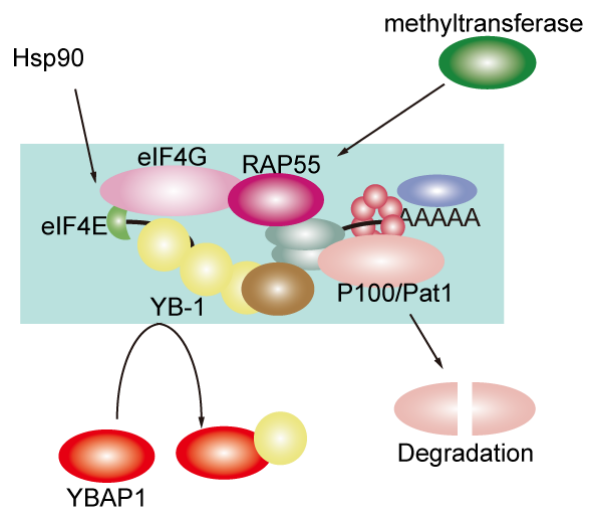
高等真核細胞の mRNP を構成している蛋白質は数多いが、我々のグループを含めたこれまでの研究の結果、翻訳が抑制された状態の mRNP には Y-box 蛋白質、poly(A)結合蛋白質(PABP)のほか、RAP55、RCK、Pat1、4E-T などの翻訳抑制因子が結合していることが示されている。これらの蛋白質の量や活性の調節が mRNP の構造変化を誘導し、mRNA 安定性や翻訳活性を調節すると考えられる。さらに特定の mRNA に親和性高く結合する RNA 結合蛋白質が mRNA 特異的に mRNA 代謝や翻訳活性調節に関わる。

そこで本研究では以下の課題に取り組んだ。

(1) Y-box 蛋白質の YBAP1 による活性調節

YBAP1 は Y-box 蛋白質 YB-1 に結合する酸性蛋白質である。以前の試験管内での実験より、YB-1 と mRNA だけからなるモデル mRNP から YB-1 を一部はがすことで、このモデル mRNP の翻訳活性を上昇させることがわかっていた。そこで細胞内でも同様の活性をもつかどうか検討した。細胞に YB-1 を高発現するとレポーター mRNA が安定化されるが、同時に YBAP1 を高発現することで、この mRNA 安定化(分解抑制)が一部阻害されることがわかった。しかし YB-1 高発現により同じレポーター mRNA の翻訳は抑制されたが、YBAP1 高発現によっても翻訳活性は回復しなかった。

次に、MS2 蛋白質の結合配列を付加したルシフェラーゼレポーター mRNA と、MS2-FLAG 蛋白質を共発現した細胞の抽出液から、抗 FLAG 抗体での免疫沈降によってレポーター



mRNAをもつ mRNP を調製した。この mRNP 画分には YB-1、PABP など既知の mRNP 構成因子が含まれており、ルシフェラーゼ mRNA を含む一方で GAPDH や β -アクチンなど細胞に豊富に存在する mRNA は殆ど含まなかった。このルシフェラーゼ mRNP と YBAP1 をインキュベートした後、ショ糖密度勾配遠心で分画すると、YB-1 が mRNP から外れて、軽い画分に移動した。この結果は、YB-1/ mRNA 複合体だけではなく、細胞から単離した mRNP においても YBAP1 が YB-1 を mRNA から外す活性を持つことを示す。

(2) P100 蛋白質の分解による翻訳活性制御

P100 蛋白質はアフリカツメガエル卵母細胞特異的な蛋白質で、出芽酵母の Pat1 と相同性を持つ。カエル卵母細胞抽出液で Y-box 蛋白質と同じ mRNP に含まれていたため、P100 の機能を調べた。P100 は卵母細胞の細胞質に卵母細胞成長初期から存在するが、卵成熟ホルモンの刺激後、核膜崩壊とともに消失した。脊椎動物には Pat1 のホモログが 2 種類 (Pat1a と Pat1b) 存在し、P100 は Pat1a に相当する。カエル Pat1b 蛋白質は卵母細胞成長後期から発現し、卵成熟過程、初期胚を通じて存在した。つまり卵成熟を境に Pat1a と Pat1b の置き換えが起きていた。レポーター mRNA を用いた実験から P100 は卵母細胞内で翻訳抑制因子として働き、卵成熟過程で翻訳が開始される必要がある *c-mos* やサイクリン B1 mRNA に結合していることがわかった。そこで P100 の消失がこれらの mRNA の翻訳を介して卵成熟の進行に必要なのではないかと予想した。大量の P100 mRNA を卵母細胞に注入し P100 蛋白質を増やした後に卵成熟ホルモンで刺激すると、卵成熟が顕著に遅延していた。このとき高発現した P100 は消失しなかった。卵成熟遅延の原因を探るため *c-Mos* やサイクリン B1 蛋白質の発現を調べると、P100 高発現した卵母細胞ではコントロールに比べ、これらの蛋白質の発現開始の遅れと発現量の低下が見られた。P100 に対するモルフォリノオリゴヌクレオチドを注入した後に卵成熟ホルモンで刺激すると、注入した mRNA から発現した P100 は内在の P100 と同様に速やかに消失した。つまりこれらの結果は、P100 が卵成熟ホルモン刺激によって速やかに分解・消失することが、卵成熟進行に必要な mRNA からの翻訳にとって必須であることを示している。

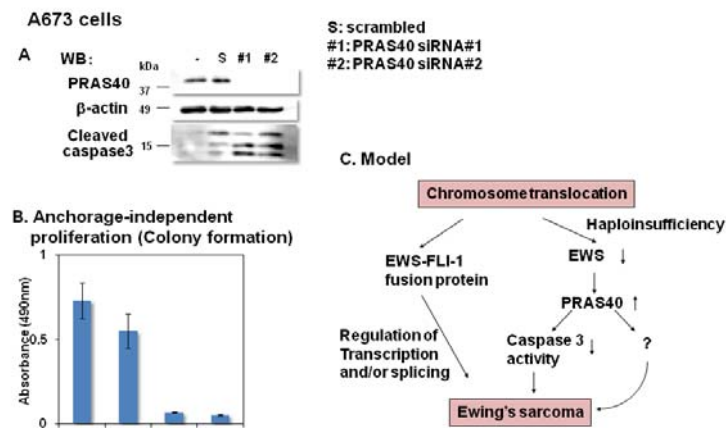
(3) Hsp90 の分子シャペロン機能による調節

過去の報告により、Argonaute2 (Ago2) が Hsp90 と結合すること、および Hsp90 阻害剤ゲルダナマイシン (GA) で細胞を処理すると Ago2 蛋白質が減少することが知られていた。また、Hsp90 β 遺伝子破壊株の解析より、Hsp90 が IgM の翻訳に関わる可能性が考えられた。そこで GA 処理により、翻訳開始因子の相互作用や局在に影響がみられるかを検討した。その結果、GA 処理あるいは別の Hsp90 阻害剤であるラディシコールの処理により、細胞質 mRNP 顆粒である P-body をもつ細胞が約 50% まで減少した。一方、熱ストレスによって生じるストレス顆粒をいくつかのマーカー蛋白質に対する抗体で観察すると、顆粒が小さくなり、核周縁部への局在が細胞質全体へと変化した。また eIF4E と 4E-T が特異的にストレス顆粒から消失したが、eIF4G のストレス顆粒への局在は変化なかった。GA 処理により、4E-T のリン酸化が減少した。これは 4E-T のリン酸化に関わるキナーゼが GA によりフォールディングに支障を来し、不活化したものと考えられた。さらに m7GTP レジンへの結合で調べたところ、GA 処理した細胞では eIF4G の eIF4E を介したキャップへの結合が減少していることがわかった。

(4)mRNA 結合蛋白質 による調節

EWS 遺伝子は、ユーイング肉腫患者の細胞で、染色体転座によって ETS ファミリー転写因子の FLI-1 遺伝子などと融合遺伝子となっていることから発見された。我々は、EWS 蛋白質の転写後調節に果た

す機能を検討した。レポーター mRNA に強制的に結合させる系において、EWS はレポーター mRNA からの蛋白質合成を抑制することが明らかになった。ユーイング肉腫は若年者の骨に発生する未分化で悪性度の高い腫瘍で、EWS/FLI-1 融合蛋白質が強力な転写因子として働くことにより腫瘍が引き起こされる。しかし、EWS/FLI-1 は単独でヒトの培養細胞をトランスフォームすることはできず、むしろアポトーシスを引き起こすので、EWS/FLI-1 だけでは腫瘍形成に十分でないと考えられる。肉腫細胞では多くても一つの染色体からのみ EWS が発現するので、EWS 蛋白質の量が少ない。上記の実験結果に基づき、EWS が結合している mRNA からの蛋白質発現が減少することが腫瘍形成に関係する可能性を追求した。EWS 蛋白質が細胞内で結合している mRNA をマイクロアレイによって網羅的に同定し、細胞増殖や発がんに関係しうること、かつ EWS 高発現によって産物である蛋白質の量が減少することを規準として PRAS40 mRNA に着目した。解析の結果、EWS は PRAS40 3' UTR に結合することで PRAS40 蛋白質の発現を負に制御していることがわかった。さらに、ユーイング肉腫細胞において PRAS40 をノックダウンすると、細胞増殖、遊走、浸潤能の低下が認められた。これらの結果より、PRAS40 はユーイング肉腫治療に向けたターゲットの一つになり得ると考えられる。



3. 今後の展開

本研究により、高等真核細胞の mRNP の主要な構成因子である Y-box 蛋白質の RNA 結合が YBAP1 によって制御されることがわかったが、YBAP1 がどのような分子機構によって YB-1 の RNA 結合を制御し、YB-1 を RNA から引きはがしているのかは明らかでない。この点は、YB-1-YBAP1 結合部位の詳細な解析、YB-1-YBAP1 複合体の構造解析などによって明らかにできるものと考えている。YB-1 以外の mRNP 構成因子も、分子シャペロンの機能や翻訳後修飾、時期特異的な分解などによって調節されている。これらがどのように翻訳や mRNA 代謝の制御に関わるかについての解析を進めるために、今後無細胞系の確立を目指して研究を進めたい。EWS の解析については、EWS が、結合する mRNA からの蛋白質発現をどのような機構で抑制しているのか、が大きな課題である。また、PRAS40 は mTOR キナーゼの活性を調節することが知られているが、その機能とユーイング肉腫細胞の増殖や遊走等の関わりについても明らかにしていくことによって、ユーイング肉腫克服に向けての基盤となる知見を得るこ

とをめざす。

4. 自己評価

YBAP1 が単純なモデル mRNP だけでなく、(1)細胞内でのレポーターmRNP の mRNA 安定化調節に関わること、(2)細胞から調製した多種類の蛋白質を含む mRNP においても YB-1 を RNA からはがす活性を持つこと、がわかったので、YBAP1 が mRNP リモデリング因子として働くことを示すことができたと考えている。しかし、細胞抽出液を利用した mRNP リモデリングと翻訳、mRNA 安定化を観察する系を確立することはできていない。これは一つには、細胞から一種類の mRNP を安定に調製する事に非常に手間取ったためである。もう一つは、EWS 蛋白質の解析とその結合 mRNA の腫瘍細胞での機能解析に発展的に研究を展開したことによる。後者の研究では、RNA 結合蛋白質遺伝子の染色体転座に関わる腫瘍形成について新たな機構を提示し、結合 mRNA の網羅的同定によって肉腫細胞増殖にかかわる新たな因子を同定することができた。

5. 研究総括の見解

本研究は、mRNA の翻訳活性や安定性を制御する mRNP の構造変化 (mRNP リモデリング) に関わる因子を明らかにし、新たな翻訳活性制御の機構を明らかにすることを目的とした。また、この制御機構を疾患の治療に応用することも目的とした。実際に、YBAP1 が YB-1 に結合活性を持ち、YB-1 を mRNA からはがすための mRNP リモデリング因子として働いていることを明らかにし、翻訳活性制御の新しい方法の存在を示したことは評価出来る。応用研究としては、PRAS40 がユーイング肉腫治療に向けたターゲットの一つになる可能性を示した。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- 1) Suzuki, Y., Minami, M., Suzuki, M., Abe, K., Zenno, S., Tsujimoto, M., Matsumoto, K., and Minami, Y.: The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and 4E-T into stress granules and association of eIF4E with eIF4G. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35597-35604 (2009).
- 2) Nakamura, Y., Tanaka, K. J., Miyauchi, M., Huang, L., Tsujimoto, M., and Matsumoto, K.: Translational repression by the oocyte-specific protein P100 in *Xenopus*. *Dev. Biol.*, **344**, 272-283 (2010).
- 3) Huang, L., Nakai, Y., Kuwahara, I., and Matsumoto, K.: PRAS40 is a functionally critical target for EWS repression in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.*, Published Online First January 12, 2012; doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2254 (2012)

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

(招待講演)

- 1) 松本 健: 翻訳抑制因子の局在と活性調節、日本薬学会第 130 年会シンポジウム「RNA研究の最前線」、岡山、2010.3.

(総説)

- 1) 中村依子、松本 健(2009)カエル卵母細胞の貯蔵RNP複合体、蛋白質核酸酵素 増刊「mRNAプログラム」、54、2165-2170.