

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06533

研究課題名(和文) HCV IRESによるヒトリボソーム・ハイジャック新機構の構造生物学的解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for hijacking of human ribosome by Hepatitis C virus IRES

研究代表者

岩崎 わかな (Iwasaki, Wakana)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・専任研究員

研究者番号：00332289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)のIRESによる翻訳機構の全容はまだ明らかになっていない。報告者らは、HCV IRESが遊離状態の40Sリボソームサブユニットのみならず、cap依存性の翻訳反応中の80Sリボソームもハイジャックしうることを、1分子観察により明らかにした。

HCV IRESの翻訳には、翻訳開始因子eIF3が必要であるが、その役割は不明であった。クライオ電子顕微鏡により、HCV IRES依存性の翻訳中のリボソームにeIF3が結合した新規複合体の構造を明らかにした。この構造と質量分析により、eIF3が翻訳開始過程のみならず、翻訳サイクルの様々な段階で、多様な役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、HCV IRESが従来考えられてきた以上に巧妙に、宿主リボソームをハイジャックし、宿主の翻訳因子を利用していることが明らかにされた。この知見は、HCVのみならず、RNAウイルスに対する戦略を考える上で、新たな視点を加えるものである。

また、本研究で着目した翻訳開始因子eIF3は、多様な因子の足場となる巨大分子で、翻訳開始のみならず様々な役割を担うことが近年明らかにされており、癌との関わりも注目されている。本研究でeIF3の新規な構造が示唆されたことは、eIF3の多彩な機能を解明する上で基盤となる情報を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：The initiation process of translation mediated by IRES of Hepatitis C virus (HCV) has been widely studied so far, but the molecular mechanism of the whole process of translation has not been clarified yet. We revealed that HCV IRES can hijack not only free 40S ribosomal subunit but also cap-dependently translating 80S ribosome by single-molecule imaging.

Eukaryotic initiation factor (eIF3) is necessary for HCV IRES dependently translation, but its mechanistic role is unclear. The single particle cryo-EM analyses and the mass spectrometric analyses suggest that eIF3 plays diverse roles not only in the initiation but also in various stages in the translation cycle.

研究分野：構造生物学

キーワード：リボソーム 翻訳 クライオ電子顕微鏡 ウィルス

1. 研究開始当初の背景

真核生物においては、mRNA の 5' 末端に cap と呼ばれる修飾塩基が付加される。多数の翻訳因子群が cap を認識し、mRNA をリボソーム 40S サブユニット上へ導くことにより、翻訳が開始される。一方、HCV などの RNA ウィルスは、mRNA の翻訳領域の上流 (5' UTR) に internal ribosome entry site (IRES) という複雑な立体構造を持つ配列を有し、IRES の働きにより、cap 非依存的に宿主リボソームを利用してウィルスタンパク質を合成させることができる。IRES は、その立体構造を利用することにより、cap 依存性翻訳と比べて少数の翻訳開始因子を必要とするだけで、リボソームと結合して翻訳を開始することができる。

IRES はまず単独状態のリボソーム 40S サブユニットに結合して、開始メチオニル tRNA および eIF2、eIF1A、eIF5、eIF3 などの翻訳開始因子と共に開始前複合体を形成し、そこへ eIF5B によってリボソーム 60S サブユニットが導かれて 80S リボソームが完成し、翻訳が開始されるという経路が明らかにされている。IRES の中でも HCV IRES は特に盛んに研究されており、上記の翻訳開始経路が広く受け入れられてきた。しかし所属研究室では、HCV IRES が、単独のリボソーム 40S サブユニットのみならず、ヒトタンパク質を翻訳中の 80S リボソームにも結合し、翻訳反応の間解離することなく結合し続けられる可能性を示すクライオ電顕構造を得ていた。これは、従来考えられてきた上記の反応とは異なる経路の可能性を示唆するものである。

また、HCV IRES はヒトの翻訳開始因子 eIF3 を必要とすることが知られているが、eIF3 がどのような役割を担うのか不明であった。eIF3 は翻訳開始の際に、多くの開始因子の足場となって反応の調節に働く巨大分子である。HCV IRES および eIF3 は共にリボソーム 40S サブユニット上の同じ位置に結合することが知られている。すなわち、HCV IRES と eIF3 は 40S リボソーム上で競合する。HCV に似た IRES を持つ豚熱ウィルスの IRES と 40S リボソームサブユニットおよび eIF3 の複合体の低分解能 (9.3 Å) 電顕構造が明らかにされているが、豚熱ウィルスの IRES は、eIF3 が共存しない場合と同様に 40S 上に結合していた。一方 eIF3 は豚熱ウィルス IRES のみに結合し、リボソームとの相互作用はほぼ無かった (Hashem et al., Nature, 2013)。この構造から、IRES は宿主の cap 依存性翻訳を阻害するために eIF3 を 40S から隔離していると考えられてきた。しかし、生化学的アッセイからは、capped mRNA が存在しない条件においても、eIF3 が IRES 依存的翻訳を促進することが示された。従って、IRES は、eIF3 をリボソームから隔離することによって cap 依存的翻訳を抑制し、相対的に IRES 依存的翻訳を促進しているだけでなく、eIF3 が直接的にリボソーム/IRES に作用して IRES 翻訳に寄与すると考えられる。しかし、上記の Hashem らの論文以降今まで、IRES と eIF3 が共にリボソーム上に結合した複合体の報告は無く、IRES 翻訳における eIF3 の役割は長らく不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、HCV IRES が cap 依存的翻訳反応中の 80S リボソームもハイジャックしうることを、一分子蛍光観察イメージングにより明らかにすることを 1 つ目の目的とした。一分子観察法を用いれば、cap 依存的翻訳反応を止めることなく、稼働中のリボソームに HCV IRES が結合する様子を捕らえることができる。

また、HCV IRES 依存的翻訳における eIF3 の役割を、構造生物学的手法を用いて明らかにすることを 2 つ目の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 一分子蛍光イメージング

capped mRNA を翻訳している最中のリボソームを HCV IRES が捕らえることができるか、一分子イメージングにより明らかにすることを試みた。

5' 末端に cap を付加した mRNA (HA タグとルシフェラーゼをコードする配列を連続して含むもの) を用いて、リボソーム・翻訳開始因子・翻訳伸長因子等を加えて試験管内で翻訳反応を進行させた。これは、ヒト細胞内で、通常の cap 依存性翻訳反応が起きている状態を模倣したものである。この時、固定化用にビオチン付抗 HA 抗体を入れておく。これにより、HA タグが翻訳されたタイミングで、引き続きルシフェラーゼを翻訳中の 80S リボソームを、ビオチン付抗 HA 抗体を介してスライドガラス上に固定化した。そこへ Cys5 で蛍光標識した HCV IRES を添加し、ガラス上に固定化された IRES の輝点数を計測した (図 1)。

(2) クライオ電子顕微鏡による構造解析

HCV IRES が下流の遺伝子を宿主リボソームに翻訳させる過程において、翻訳開始因子 eIF3

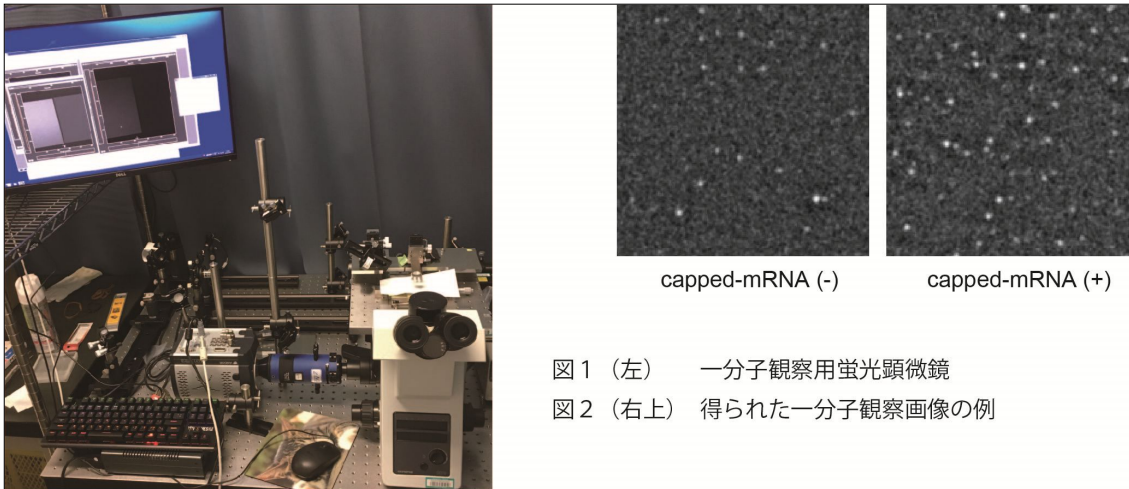


図1 (左) 一分子観察用蛍光顕微鏡

図2 (右上) 得られた一分子観察画像の例

が担う役割を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡により機能複合体の構造解析を試みた。

まず、翻訳開始段階における eIF3 の役割について知見を得るため、HCV IRES とヒトリボソーム 40S サブユニットおよび翻訳開始因子群を混合して翻訳開始複合体を調製し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行った。

また、HCV IRES により翻訳開始し、伸長過程で stall させた 80S リボソームを調製し、eIF3 をはじめとした翻訳開始因子を追加して複合体作成も試みた。これは、リボソームが翻訳伸長反応中の状態においても eIF3 が相互作用し、翻訳に寄与することが可能か調べるためである。

上記の構造解析後、電顕構造では見えない柔軟なサブユニットの相互作用を明らかにするため、複合体に架橋剤を加えて反応させた後、質量分析も行った。

4. 研究成果

(1) 一分子蛍光イメージング

スライドガラス上に固定化された翻訳反応中のリボソームに対して、蛍光標識した HCV IRES を添加し、結合した IRES の輝点数を蛍光顕微鏡により調べた。スライドガラスは PEG でコーティングしているが、非特異的な吸着を完全に抑えることはできないので、capped mRNA を入れずにインキュベートしたリボソーム溶液を negative control として用いた。capped mRNA を入れた試料で観察された HCV IRES の輝点数は、negative control に比べて有意に多数であった(図2)。これは、蛍光標識した IRES が、ガラス上に固定化された cap 翻訳反応継続中の 80S リボソームに結合していることを示唆する。

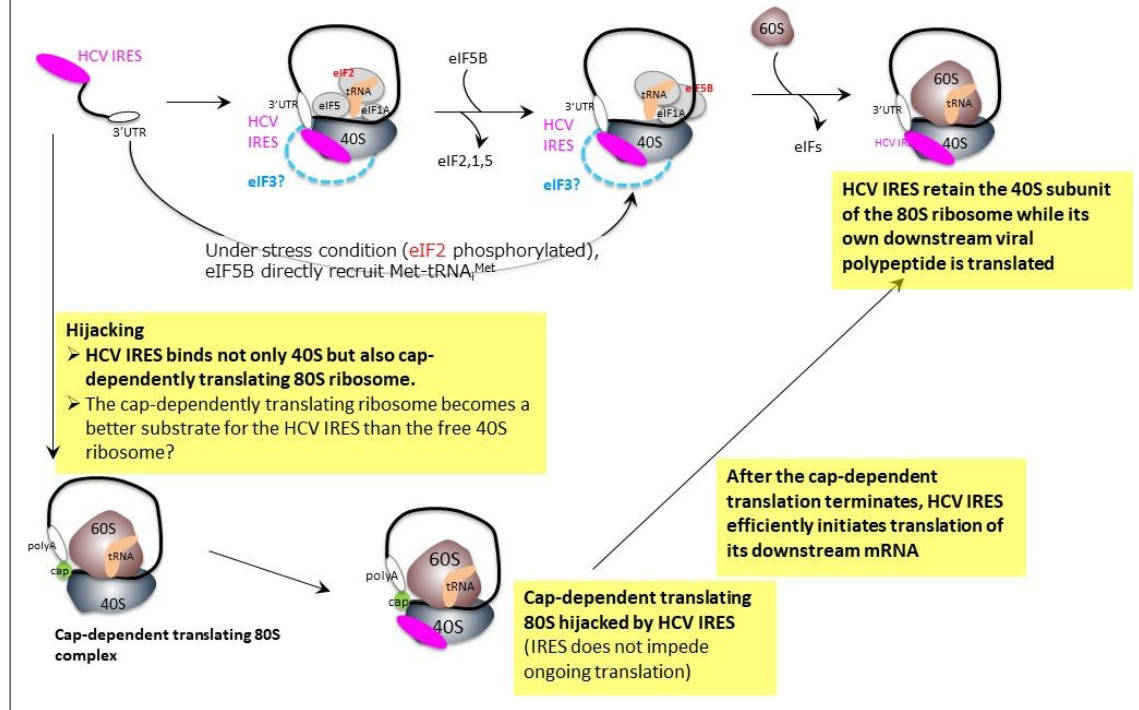
IRES が単独の 40S リボソームサブユニットに結合する様子を一分子観察した報告例は既にあるが、本研究により初めて、capped mRNA を翻訳途中の 80S リボソームに IRES が結合する様子を一分子観察することができた。この結果と、所属研究室によるクライオ電子顕微鏡による構造解析の結果から、「HCV IRES はヒトの capped mRNA を翻訳反応中のリボソームに結合し、結合したままの状態で行進中の cap 依存的翻訳反応が終結するのを待ち構え、その後速やかにウィルス RNA の翻訳を開始する」という新たなリボソームハイジャック経路が存在することが示された。(図3)

本研究成果は、2019年に Molecular Cell 誌上で発表し、理化学研究所プレスリリースにも公開した。

(2) クライオ電子顕微鏡による構造解析

翻訳開始複合体の電顕データからは、40S / HCV IRES / Met-tRNA / eIF2 / eIF5 複合体のマップは得られたが、eIF3 に相当するマップは、架橋しても見られなかった。一方、翻訳伸長段階で停止させたリボソームの複合体の電顕マップからは、HCV IRES に結合した eIF3 のコアが観察された。伸長段階のリボソームに eIF3 が結合した構造は我々の知る限り今までに報告例がなく、本構造が初めてである。構造解析の結果、HCV IRES および eIF3 コアの原子モデルの構築に成功した。eIF3 のコア以外のサブユニットは、電顕マップとして観察することはできなかったが、質量分析によって複合体におけるおおよその位置を推定することができた。これらの結果から、HCV IRES 翻訳において、eIF3 は翻訳開始のみならず、HCV IRES による翻訳サイクルの様々な段階で、多様な役割を担うことが示唆された。

図3 HCV IRES による翻訳反応の新しい反応経路 (黄色)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoyama Takeshi, Machida Kodai, Iwasaki Wakana, Shigeta Tomoaki, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Sakamoto Ayako, Yonemochi Mayumi, Harada Yoshie, Shigematsu Hideki, Shirouzu Mikako, Tadakuma Hisashi, Imataka Hiroaki, Ito Takuhiro	4. 巻 74
2. 論文標題 HCV IRES Captures an Actively Translating 80S Ribosome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1205 ~ 1214.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.04.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Wakana Iwasaki, Kazushige Katsura, Kenji Ogawa, Soichi Kojima, Hideyuki Matsunami, Tomomi Uchikubo, Takeshi Yokoyama, Hideki Shigematsu, Yuri Tomabechi, Mikako Shirouzu
2. 発表標題 Crystal structure of the Hepatitis B virus core protein complexed with a novel drug candidate
3. 学会等名 情報計算化学生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所プレスリリース https://www.riken.jp/press/2019/20190514_1/index.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------