

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291007

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質がファインチューニングする翻訳開始制御機構

研究課題名(英文) Fine-tuning of translation regulation system by RNA-binding proteins

研究代表者

藤原 俊伸 (FUJIWARA, Toshinobu)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：80362804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳開始段階を標的とし、翻訳を負に調節するmiRNAマシナリーの分子機構を生化学的手法で解析した。その結果、miRNAによる翻訳抑制機構がpoly(A)の短鎖化に依存しないことを2012年にPNAS誌上で発表した。次にmRNA pull-down法によりRNA-induced silencing complex(RISC)が形成されたmRNA上の翻訳因子の変化を詳細に調べた。その結果、miRNA機構がeIF4Aを標的として、翻訳開始を制御することを発見し、さらにHuDがmiRNAによる翻訳抑制を阻害することもつきとめ2014年にMolecular Cell誌上で発表した

研究成果の概要(英文)：We showed that miRNA inhibits translation of the target mRNA in a deadenylation- and PABP-independent manner at early time points (PNAS 2012). We next assessed the effect of miRISC on synergistic recruitment of translation initiation factors to target mRNAs by using direct biochemical assays. We show that miRISC promotes the release of both eIF4A1 and eIF4A11 but not eIF4E and eIF4G from target mRNAs and demonstrate that this is independent of deadenylation. Strikingly, both, the miRISC-induced release of eIF4A I and II from the cap binding complex (CBC) and the miRISC-induced inhibition of cap-dependent translation can be counteracted by the RNA binding protein HuD via a direct interaction of HuD with eIF4A. In summary, we propose that eIF4A I and II are key targets in the translation initiation control mechanisms by miRISC. These results were reported in Molecular Cell (2014).

研究分野：RNA生化学

キーワード：翻訳制御 microRNA RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

代表者は、独自の生化学実験系を駆使し、急速な mRNA の分解を規定する AU-rich element (ARE) および poly(A) に結合特異性を示す神経特異的 RNA 結合タンパク質 HuD が関与する翻訳制御機構の「素過程の解明に集中」して研究を行ってきた。その結果、独自の *in vitro* 翻訳系により、HuD が eIF4A、poly(A) 配列との結合を介して cap 構造依存的な翻訳を活性化する機能があることを 2009 年に証明した。RNA 結合タンパク質による eIF4A を介した翻訳開始促進機構に関する初めての例である。さらに、PC12 細胞の形態変化を指標とする細胞生物学的な解析により、HuD による翻訳活性化機能が分化誘導能に必須であることが明らかになった。次に、どのようにして翻訳活性化を行うのかという命題を設定のもと、RNA 結合タンパク質とシグナル伝達との翻訳開始段階における関係に着目し解析を進めた。その結果、HuD がシグナル伝達因子 Akt1 の活性型とのみ結合すること、活性型 Akt1 が HuD により翻訳開始複合体中にリクルートされることを 2011 年に証明した。一方で、cap 構造の認識から開始される翻訳開始複合体の形成は翻訳の律速段階であり、タンパク質合成を調節するうえでこの過程を制御することは効率がよく、翻訳開始因子群のリン酸化を担うシグナル伝達因子を中心に実例も数多くある。そしてこれまでに miRNA による翻訳抑制の標的は翻訳の律速段階である開始であることが強く示唆されていた。しかしながら、高等真核生物における miRNA による翻訳開始過程の抑制の素過程は、その詳細が明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は代表者が構築した翻訳開始反応を解析する独自の生化学実験系を用いて得られた研究成果と、分担者がこれまでに培った miRNA 研究の成果にもとづき以下の研究を

推進する。

- 1) 活性型 Akt1 を翻訳開始複合体へとリクルートする RNA 結合蛋白質 HuD を「探り針」に翻訳開始反応へのシグナル伝達の様式と制御メカニズムを解明する。
- 2) 構築した *in vitro* miRNA 機能評価系と mRNA pull-down 系を駆使して miRNA による翻訳開始抑制の素過程解明の基盤となる知見を集積する。
- 3) 翻訳開始反応において、翻訳開始促進と抑制メカニズムがどのように 'fine tuning' されているのかを明らかにするための *in vitro* 実験系を構築しそれぞれの素過程を詳細に解析する。

3. 研究の方法

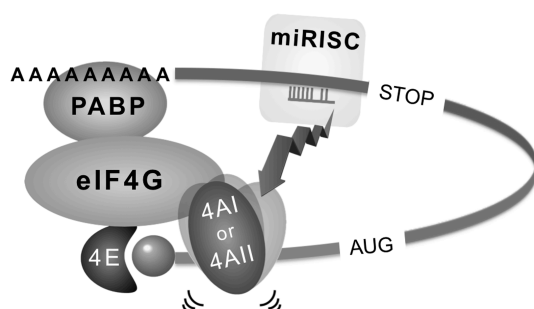
申請者がこれまでに構築した生化学実験系を駆使し、翻訳開始反応において RNA 結合蛋白質がシグナル伝達機構、そして miRNA 機構とどのように協調あるいは拮抗して働くかの基本原理を、神経特異的 RNA 結合蛋白質 HuD を「探り針」として明らかにする。具体的な計画を以下に示す。

- 1) HuD と結合することで翻訳開始複合体中に保持された活性型 Akt1 が、どのように翻訳開始反応に寄与するか、またそのシグナル標的分子が何であるかを、生化学的手法・細胞学的手法で明らかにする。
- 2) HuD による翻訳活性化と miRNA による翻訳抑制との関係を翻訳開始反応に着目し、生化学的手法で明らかにする。また、miRNA による翻訳抑制の分子基盤を分担者と共同で詳細に解析を進める。
- 3) (1) および (2) の計画が順調に進んだ場合、HuD が関与する翻訳制御ネットワークの統合的解析を実施する。具体的には、初代培養神経細胞を用いて、神経特異的 RNA 結合蛋白質 HuD が関与する翻訳調節ネットワークが神経細胞分化、すなわち極性獲得にどのように寄与するかの再現を試みる。

4. 研究成果

1) microRNA による翻訳抑制機構の解明：
Molecular Cell 56, 79-89 (2014)

翻訳と mRNA の安定性を同時に評価可能な *in vitro* miRNA 評価系の構築に成功した。次に、mRNA-タンパク質複合体 (mRNP) pull-down 法を開発し、miRNA 存在下においては翻訳開始複合体 eIF4F の構成因子である eIF4A が、eIF4F 複合体から除外されていることを直接的にはじめて証明した。また、eIF4A と、poly (A) との結合を介して cap 依存的翻訳を活性化する RNA 結合タンパク質 HuD 存在下では、miRNA による翻訳阻害が解除された。そしてこの HuD の効果は、HuD の eIF4A 結合性に依存する。これらの結果は、高等真核生物における miRNA による翻訳抑制の素過程を明らかにした初めての報告となった (図)。



miRNAによる翻訳開始複合体抑制モデル

2) RNA 分解酵素 Regnase-1 による mRNA 分解と翻訳との共役機構の発見：

Cell 161:1058-1073 (2015)

RNA 分解酵素 Regnase-1 および RNA 結合タンパク質 Roquin は炎症性サイトカインの mRNA を分解することで炎症のブレーキとして働き、さらに自己免疫疾患発症抑制にも重要である。興味深いことに、これら2つのタンパク質は同じ RNA 構造を認識し切断する。しかしながら、Regnase-1 の標的 mRNA の特異性や作用機構および Regnase-1 と Roquin の制御メカニズムの関係性は不明であった。申請者らは、これら炎症反応を制御する2つの

RNA 分解酵素が同じ RNA 構造を認識するが、その機能する空間・場、時期、メカニズムがそれぞれ異なることを初めて解明した。

3) HuD に結合した活性型 Akt1 の機能モデル
HuD 依存的に翻訳開始複合体にリクルートされる活性型 Akt1 が、eIF4B をリン酸化し翻訳を活性化させるというモデルは、eIF4B の変異体および eIF4B のノックダウン実験など、代表者のこれまでの研究でほぼ証明された (未発表・投稿準備中)。次に、HuD による神経細胞分化における eIF4B の寄与を検証する必要がある。eIF4B の発現を siRNA により抑制し、HuD による分化誘導能を指標に影響を検証する。また、eIF4B のリン酸化擬似変異体の導入により、Akt1 シグナルの阻害時においても HuD により細胞の分化が誘導されるかどうかを検証する予定でいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件) (全て査読有り)

1. Fukao, A., Aoyama, T. and Fujiwara, T.:
The molecular mechanism of translational control via the communication between the microRNA pathway and RNA-binding proteins. *RNA Biology* 12 922-926. (2015) DOI: 10.1080/15476286.2015.1073436.
2. Lupberger J., Casanova C., Fischer B., Weiss A., Fofana I., Fontaine N., Fujiwara T., Renaud M., Kopp A., Schuster C., Brino L., Baumert TF., Thoma C.: PI4K-beta and MKNK1 are regulators of hepatitis C virus IRES-dependent translation. *Sci Rep.* 5 13344. (2015) DOI: 10.1038/srep13344.
3. Mino T, Fukao A, Vandenbon A, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Standley DM, Fujiwara T and Takeuchi O. : Regnase-1 and Roquin regulate common inflammation-related

- mRNAs in translation-dependent and independent manners.
Cell 161:1058-1073 (2015) DOI: 10.1016/j.cell.2015.04.029.
4. Iwakawa HO, *Tomari Y. : The functions of microRNAs: mRNA Decay and translational repression. : *Trends Cell Biol.* 2015 Nov;25(11):651-65. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.011.
 5. Kobayashi H, *Tomari Y. : RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan;1859(1):71-81. doi: 10.1016/j.bbagrm.2015.08.007.
 6. Betancur JG, *Tomari Y. : Cryptic RNA-binding by PRC2 components EZH2 and SUZ12. *RNA Biol.* 2015;12(9):959-65. doi: 10.1080/15476286.2015.1069463.
 7. Yao C, Sasaki HM, Ueda T, *Tomari Y, *Tadakuma H. : Single-molecule analysis of the target cleavage reaction by the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Mol Cell.* 2015 July 2;59(1):125-32. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.015.
 8. Iwasaki S, Sasaki HM (equal contribution), Sakaguchi Y, Suzuki T, *Tadakuma H, *Tomari Y. : Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature.* 2015 May 28;521(7553):533-6. doi: 10.1038/nature14254.
 9. Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, Oka S, Imataka H, Pelletier J, Sonenberg N, Thoma C and Fujiwara T. : microRNAs trigger dissociation of eIF4AI and II from target mRNAs in humans. *Molecular Cell* 56, 79-89 (2014) doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.005.
 10. Maesaki R, Satoh R, Taoka M, Kanaba T, Asano T, Fujita C, Fujiwara T, Ito Y, Isobe T, Hakoshima T, Maenaka K, Mishima M. : Efficient and cost effective production of active-form human PKB using silkworm larvae. *Sci Rep* 4, 6016 (2014) doi: 10.1038/srep06016.
 11. Mikami S, Kanaba T, Takizawa N, Kobayashi A, Maesaki R, Fujiwara T, Ito Y, and Mishima M. : Structural insights into the recruitment of SMRT by the co-repressor SHARP under phosphorylative regulation. *Structure* 7, 35-46 (2014) doi: 10.1016/j.str.2013.10.007.
 12. Ishii J, Oda A, Togawa S, Fukao A, Fujiwara T, Ogino C, Kondo A. : Microbial fluorescence sensing for human neurotensin receptor type 1 using G α -engineered yeast cells. *Anal Biochem.* 446, 37-43 (2014) doi: 10.1016/j.ab.2013.10.016.
 13. Wang W, Yoshikawa M (equal contribution), Han BW, Izumi N, *Tomari Y, *Weng Z, *Zamore PD. : The initial uridine of primary piRNAs does not create the tenth adenine that is the hallmark of secondary piRNAs. *Mol Cell.* 2014 Dec 4;56(5):708-16. doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.016.
 14. Fukaya T, Iwakawa HO (equal contribution), *Tomari Y. : MicroRNAs Block Assembly of eIF4F Translation Initiation Complex in *Drosophila*. *Mol Cell.* 2014 56(1):67-78. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.004.
 15. Takizawa N, Fujiwara T, Yamasaki M, Saito A, Fukao A, Nomoto A, Mizumoto K. : The essential role for the RNA

triphosphatase Ceglp in nuclear import of the mRNA capping enzyme Ceglp-Ceglp complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 8, e78000.

(2013) doi:

10.1371/journal.pone.0078000.

[学会発表] (計 14 件)

1. 藤原俊伸 : in vitro翻訳系を用いた新規創薬ターゲット同定法
BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会
2015年12月1日～4日 神戸国際会議場(神戸)
2. 貞廣暁利、深尾亜喜良、滝沢直己、竹内理、藤原俊伸 : ポリオウイルスの細胞種特異的なIRES依存的翻訳の解析
BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会
2015年12月1日～4日 神戸国際会議場(神戸)
3. Sadahiro, A., Fukao, A., Takizawa, N., Takeuchi, O., Fujiwara, T. : Analysis of cell type specific translation from IRES mRNA derived from two different poliovirus strains
第63回日本ウイルス学会学術集会 2015年11月22日～24日 福岡国際会議場 (博多)
4. Aoyama T, Fukao A, Sonenberg N, Yanagiya A, Fujiwara T : Analyses of the molecular function of PABP interacting protein 1 (PAIP1) in translational activation
Protein Synthesis and Translational Control EMBO CONFERENCE
2015年9月9日～2015年9月13日
Heidelberg, Germany
5. 藤原俊伸 : microRNAは標的mRNAから翻訳開始因子eIF4A1およびeIF4AIIを解離させる
第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日～27日 パシフィコ横浜 (横浜)
6. Fujiwara, T. : The RNA binding protein HuD can attenuate the miRISC-mediated translation repression
Joint Australia and Japan RNA Meeting (招待講演) 2014年11月2日～5日 シドニー (オーストラリア)
7. Yano Y., Fukao A., Fujiwara T. : Effect of eIF4B phosphorylation by active Akt1 recruited into cap binding complex by HuD on translation.
Joint Australia and Japan RNA Meeting 2014年11月2日～5日 シドニー (オーストラリア)
8. 青山智彦、深尾亜喜良、藤原俊伸 : Paip1はPABP依存的に翻訳を抑制する
RNAフロンティアミーティング2014 2014年9月16日～18日 ラフォーレ白浜 (和歌山)
9. 矢野雄暉、深尾亜喜良、藤原俊伸 : 活性型Akt1によるeIF4Bのリン酸化を介したRNA結合タンパク質HuDのcap依存的翻訳の促進
RNAフロンティアミーティング2014 2014年9月16日～18日 ラフォーレ白浜 (和歌山)
10. Fujiwara T. : microRNAs trigger dissociation of eIF4As from target mRNAs
Cold Spring Harbor Laboratory Translational Control 2014年9月2日～7日 Cold Spring Harbor Laboratory (アメリカ)
11. 矢野雄暉、深尾亜喜良、藤原俊伸 : 活性型Akt1によるeIF4Bのリン酸化を介したRNA結合タンパク質HuDのcap依存的翻訳の促進
第16回日本RNA学会 2014年7月23日～25日 ウィンク愛知 (名古屋)

12. Satoh, R., Fukao, A., Nomoto, A. and Fujiwara, T. : The RNA-binding protein HuD regulates cap-dependent translation by binding to the mRNA nuclear export receptor TAP/NXF1
第36回日本分子生物学会 2013年12月3日
～6日 神戸国際会議場 (神戸)
13. Yano Y., Fukao A., Fujiwara T. : HuD accelerates cap-dependent translation through eIF4B phosphorylation by active Akt1
第36回日本分子生物学会 2013年12月3日
～6日 神戸国際会議場 (神戸)
14. Fukao, A., Sonenberg, N., Thoma, T. and Fujiwara, T. : The mechanism of translational control which targets a translation initiation complex
2013 RiboClub Annual Meeting 2013年9月23日～25日 ケベック (カナダ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/biochemist/ry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 俊伸 (FUJIWARA, Toshinobu)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号 : 80362804

(2) 研究分担者

泊 幸秀 (TOMARI, Yukihide)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号 : 90447368

(3) 連携研究者

滝沢 直己 (TAKIZAWA, Naoki)

(公財) 微生物化学研究会 微生物化学研究所・研究員

研究者番号 : 50448502