

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06325

研究課題名(和文)細胞増殖に関わるTOP mRNAの翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation mechanisms of TOP mRNA translation in proliferation

研究代表者

関山 直孝 (Sekiyama, Naotaka)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：50758810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は高ストレス下において、翻訳を抑制することで細胞増殖を停止させている。このとき翻訳を制御しているmTORC1は、基質蛋白質をリン酸化することで、結合因子との相互作用を変化させmRNAの翻訳を制御している。本研究では、mTORC1の基質蛋白質である4E-BP1とその結合因子eIF4Eの相互作用について、分子動力学シミュレーションを用いて、各リン酸化状態の構造変化を検証した。その結果、4E-BP1のpS65pT70において、4E-BP1のC末端tailの部分が大きく構造変化し、eIF4EのN末端、-2 helixおよび -2 strandとの相互作用が阻害されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Under stress conditions, since eukaryotic cell is necessary to minimize its energy consumption, novel protein synthesis, called translation, is limited. This process is engaged in mTORC1-mediated phosphorylation. Activated mTORC1 kinase phosphorylates its substrates such as LARP1 or 4E-BP1 and regulates translation efficiency of mRNAs through alteration of protein-protein interactions. In this study, we investigated how mTORC1-mediated phosphorylation changes the 4E-BP1/eIF4E interaction. We used MD simulations to calculate structural changes of unphospho- or phosphorylated-4E-BP1 complexed with eIF4E. The results showed that 4E-BP1 phosphorylation at S65 and T70 sites caused structural change in the C-terminal tail of 4E-BP1, and inhibited the interaction with the N-terminal tail, α -2 helix and β -2 strand of eIF4E. These results correspond to experimental data, and thus MD simulations provides atomic insights into phospho-4E-BP1/eIF4E complex structures.

研究分野：構造生物学

キーワード：翻訳 蛋白質 リン酸化 分子動力学シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

細胞は、栄養欠乏状態や低酸素状態などの高ストレス下において、mRNA から新規蛋白質を合成する「翻訳過程」を抑制することで、細胞増殖を停止させている。このとき翻訳を制御しているのが、mTORC1 経路である。mTORC1 経路による翻訳制御機構では、セリンスレオニンキナーゼである mTORC1 が基質蛋白質をリン酸化することで、結合因子との相互作用を変化させ、機能的に関連のある mRNA の翻訳効率を変化させる。

この mTORC1 経路が翻訳を制御する mRNA の中に、5' TOP (Terminal OligoPyrimidine) motif を持つ mRNA (TOP mRNA)がある。5' TOP motif とは、5' 末端キャップ構造の直後にシトシン、その後 4-15 個のピリミジン塩基が連続して現れるピリミジンストレッチを持ち、さらに GC rich 領域が続く RNA 配列のことである。TOP mRNA の配列は、リボソーム蛋白質や翻訳開始因子をコードする mRNA に多く見つかっており、哺乳類間で高度に保存されている。これまでに mTORC1 経路が、TOP mRNA の翻訳効率を変化させることで細胞増殖を制御していることは明らかになっているが、その制御機構については未解明のままであった。

ところが最近、mRNA の 5' 末端キャップ構造に結合する蛋白質の網羅的解析から、LARP1 という蛋白質が TOP mRNA に選択的に結合することが報告された (Tcherkezian *et al.*, 2014 *Genes Dev*)。LARP1 は、La and LARP (La-related protein) family に属する RNA 結合蛋白質で、mRNA の翻訳制御に関与していることが示唆されており、注目を集めている。つまり、LARP1 は TOP mRNA と複合体を形成することで、TOP mRNA の安定性や翻訳効率を制御していると考えられる。そこで本研究では、LARP1 と TOP mRNA との相互作用の構造学的解析により、TOP mRNA の機能活性化のメカニズムについて解明することを目的とする。

2. 研究の目的

細胞増殖に関わる TOP mRNA と、その制御因子である RNA 結合蛋白質 LARP1 との相互作用について構造学的解析を行い、TOP mRNA の翻訳制御機構について解明することを目的とした。LARP1 と TOP mRNA の相互作用は、mTORC1 による LARP1 のリン酸化により制御されていることが示唆されている。そこでまず初めに、mTORC1 のリン酸化により生じる蛋白質間相互作用の変化について検証することを目指した。

申請者はこれまで、mTORC1 の基質のひとつである 4E-BP1 について研究を行ってきた。4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) は、mRNA の 5' 末端に存在するキャップ構造 (5' -cap) を認識する eIF4E の結合蛋白質と

して同定された。細胞分裂の休止状態において、4E-BP1 は eIF4E に結合することで、翻訳を抑制している。ここで、外部刺激により mTORC1 経路が活性化されると、4E-BP1 が mTORC1 にリン酸化され eIF4E との結合能を失う。遊離した eIF4E は、足場蛋白質 eIF4G や、RNA ヘリカーゼ eIF4A と複合体を形成することで、highly-structured 5' UTR と呼ばれる mRNA の翻訳効率を上昇させる。本研究者は、この mTORC1 のリン酸化による 4E-BP1/eIF4E 相互作用変化について構造学的に明らかにすることにした。

3. 研究の方法

4E-BP1 のリン酸化は、初めに mTORC1 により T37/T46 がリン酸化され、続いて T70、そして S65 がリン酸化されることで eIF4E から解離する。これまでに行った等温滴定型カロリメトリー (ITC) と、核磁気共鳴法 (NMR) による実験から、T70 および S65 単独のリン酸化は、eIF4E の N 末端 tail さらに α -2 helix の一部の相互作用に影響を与え結合力を低下させることがわかった。さらに、S65/T70 が同時にリン酸化されると、影響を受ける残基は、eIF4E の N 末端 tail、 α -2 helix さらに β -2 strand にまで及び、結合力の低下も、S65 および T70 単独のときよりも大きかった。

そこで、S65 または T70 単独のリン酸化と、S65/T70 両方のリン酸化が 4E-BP1/eIF4E 複合体に与える影響を構造学的に解明するため、分子動力学シミュレーション (Molecular dynamics simulations) を行った。MD 計算のソフトウェアには、GROMACS を用いた。非リン酸化体 4E-BP1/eIF4E の初期構造には、4E-BP1/eIF4E 複合体の X 線結晶構造 (5BXV) を用いた (WT)。これを元に、4E-BP1 の S65 および T70 単独がリン酸化されているリン酸化体 (pS65, pT70)、さらに S65/T70 両方がリン酸化されているリン酸化体を作成した (pS65pT70)。蛋白質の力場には CHARMM27 を、水分子には Spc216.gro を用い、300ns の MD 計算を行った。

4. 研究成果

初めに、300nsのMD計算の中で、eIF4Eの構造は、二次構造を形成していないループ部分で変化はあるものの、大きな構造変化は起きなかった(図1A)。一方、4E-BP1の構造は、pS65およびpT70ではリン酸化された残基周辺の構造が局所的に変化したものの、全体的な変化は小さかった。しかし、pS65pT70は、S65からT70にかけての領域とそれに続くC末端tailの部分が大きく構造変化していた(図1B)。

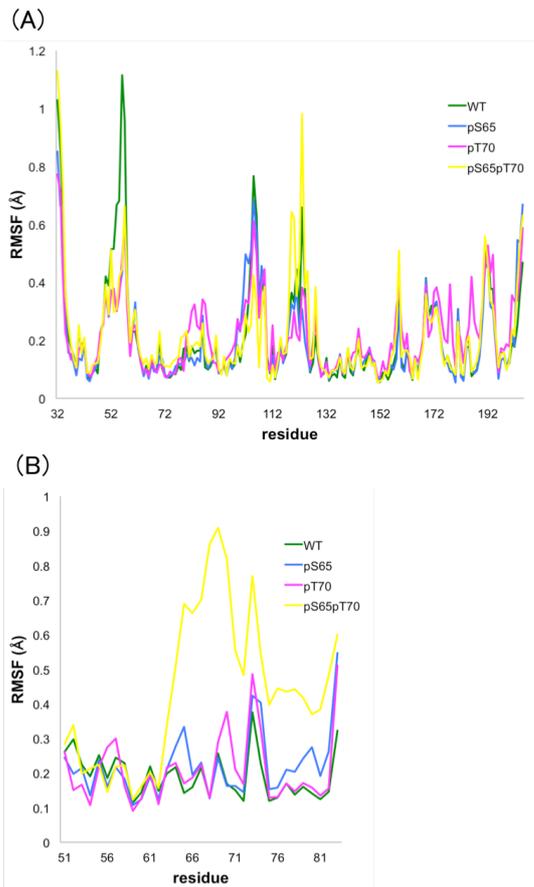


図1 300nsのMD計算における各残基のRMSF値

(A) eIF4E/4E-BP1複合体中のeIF4Eと
(B) eIF4E/4E-BP1複合体中の4E-BP1のRMSF値

緑: eIF4E/4E-BP1 WT複合体
青: eIF4E/4E-BP1 pS65複合体
ピンク: eIF4E/4E-BP1 pT70複合体
黄色: eIF4E/4E-BP1 pS65pT70複合体

次に、リン酸化による4E-BP1/eIF4Eの相互作用変化を調べるために、4E-BP1とeIF4Eのコンタクト数をeIF4Eの各残基においてカウントした。これには、4E-BP1の構造変化が安定していた最後の25nsのMDトラジェクトリを用いた。リン酸化による相互作用変化に注目するため、WTに対する各リン酸化状態のコンタクト数の変化を計算した(図2)。その結果、eIF4Eの(1) N末端tail (His33-Trp43)、(2) β -2 strandから α -2 helixにかけての領域 (Ile63-Leu93)、(3) α -4 helixから α -5 helixにかけての領域 (Thr133-Asp143)においてコンタクト数の増減が大きかったことがわかった。この領域は、NMRによる実験からもリン酸化による影響を強く受けることが観測されていたことから、MD計算とNMRの結果には相関があることが示唆された。

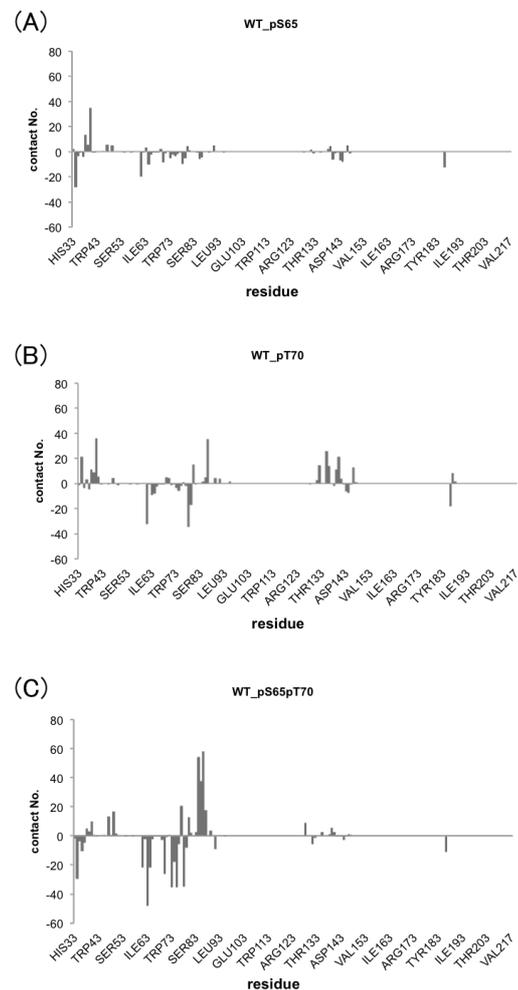


図2 最終25ns MDトラジェクトリにおけるeIF4Eの4E-BP1とのコンタクト数の変化

eIF4E/4E-BP1 WT複合体と、
(A) eIF4E/4E-BP1 pS65複合体、
(B) eIF4E/4E-BP1 pT70複合体、
(C) eIF4E/4E-BP1 pS65pT70複合体との比較

最後に、MD 計算から得られた各リン酸化状態における複合体構造について検討した。pS65 および pT70 単独のリン酸化状態では、WT に比べて、それほど大きな変化は見られなかった。一方、pS65pT70 のリン酸化状態では、4E-BP1 の C 末端 tail が、eIF4E の α -2 helix や β -2 strand の領域から離れ、3¹⁰ helix (Ser82-Leu85) の領域に結合していた。このような S65 と T70 が同時にリン酸化された場合の協調的な働きは、NMR 実験の結果ともよく一致していた。以上の結果より、300ns の MD 計算から得られた pS65、pT70 および pS65pT70 の最終構造は、実際のリン酸化 4E-BP1/eIF4E 複合体の構造を反映していると考えられる (図 3A-D)。

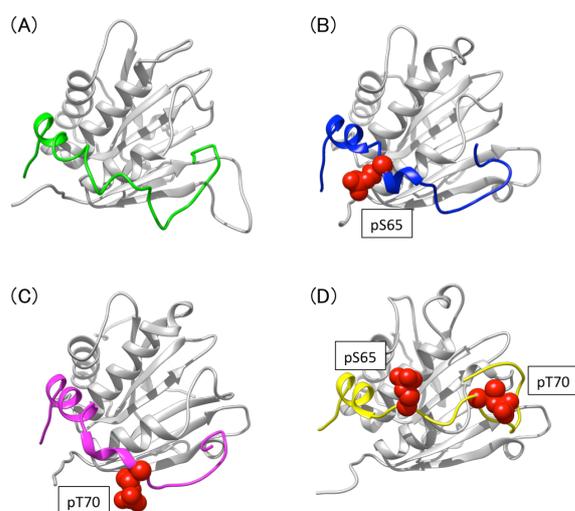


図 3 各リン酸化状態における MD 計算の最終複合体構造

- (A) eIF4E/4E-BP1 WT 複合体
- (B) eIF4E/4E-BP1 pS65 複合体
- (C) eIF4E/4E-BP1 pT70 複合体
- (D) eIF4E/4E-BP1 pS65pT70 複合体

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

1. Naotaka Sekiyama, Haribabu Arthanari, Ricard A. Rodriguez-Mias, Mélissa Léger-Abraham, Gerhard Wagner 「Structural Analysis of eIF4E and 4E-BP1 Interactions」 27th ICMRBS 2016, Kyoto, Japan, August 21 - August 26, 2016
2. Naotaka Sekiyama, Haribabu Arthanari, Evangelos Papadopoulos, Ricard A. Rodriguez Mias, Gerhard Wagner & Mélissa Léger-Abraham 「Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: Dissociating eIF4G but stabilizing the unphosphorylated form of 4E-BP1」 第 42 回内藤コンファレンス「生命科学に革命をもたらす最先端構造生物学」2016 年 10 月 4 日(火) ~ 7 日(金)、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関山 直孝 (SEKIYAMA NAOTAKA)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：50758810

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし