

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：72801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870032

研究課題名(和文)ポリオウイルスの組織特異的増殖を制御するIRES依存的な翻訳機構の解明

研究課題名(英文)IRES-dependent translational mechanism regulating tissue-specific replication of poliovirus

研究代表者

佐藤 亮介(SATOH, Ryosuke)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員

研究者番号：00635592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：ポリオウイルス(PV)感染は中枢神経系特異的に病変を認めるというトロピズム(指向性)を有する。本研究は、PVのIRES(internal ribosome entry sites)依存の翻訳開始機構を制御する宿主因子を同定し、機能解析を行うことで、PVの中枢神経特異性に寄与するIRES依存の翻訳開始機構の素過程を解明することが目的である。本研究では、生化学的・分析化学的なスクリーニング系を駆使し、神経細胞特異的に発現・機能している宿主因子の候補をいくつか同定した。これらの候補宿主因子の機能解析を通じて、PVのIRES依存の翻訳を介した、中枢神経特異性獲得の分子基盤を明らかにできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Poliovirus (PV) infection occurs as a result of destruction of motor neurons in the central nervous system (CNS). The aim of this study is to elucidate the fundamental process of IRES-dependent translational initiation involved in PV tissue tropism, through the identification and functional analysis of the host factors that regulate PV IRES (internal ribosome entry sites)-dependent translational initiation. In this study, we identified some host factor candidates that are specifically expressing and acting in nerve cells, utilizing biochemical/analytical chemical screening systems. This study is valuable to reveal the molecular basis of acquiring the CNS-specificity of PV infection through IRES-dependent translation.

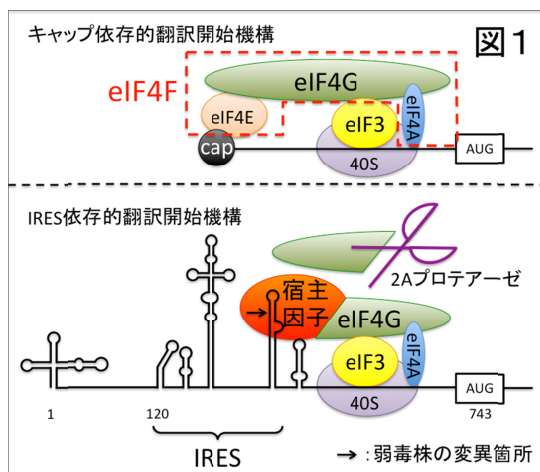
研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：IRES 翻訳開始機構 ポリオウイルス 組織特異性 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

一般的な真核生物の翻訳は、mRNA の 5' 末端に存在するキャップ構造が翻訳開始因子に認識されることで翻訳が開始される(図1)。この翻訳の開始こそ、タンパク質合成の可否を決定する非常に重要なステップであり、様々な翻訳因子群および RNA 結合タンパク質によって厳密に制御されている。特に、翻訳開始因子によるキャップ構造の認識は最重要であり、eIF4E, eIF4A, eIF4G から構成される eIF4F とよばれるタンパク質複合体がこの過程を担う。eIF4F 複合体の形成は翻訳の律速であり、タンパク質合成を正負に調節する上でこの過程を制御することは効率がよい。



一方、5' 末端にキャップ構造をもたないウイルス mRNA は、5' 非翻訳領域に存在する IRES (internal ribosome entry site) を介して 40S サブユニットに結合し、キャップ依存的翻訳機構をバイパスする。ポリオウイルスの場合、感染宿主細胞ではウイルス由来の 2A プロテアーゼが eIF4G を分断し、eIF4F の形成が阻害される。その結果、宿主のキャップ依存的翻訳は停止する。このとき、ポリオウイルス mRNA の翻訳は、分断された eIF4G が IRES に特異的に結合する PTB などの宿主因子を介してウイルス mRNA に結合できるため、40S サブユニットが結合し、ウイルスタンパク質の翻訳が開始する(図1)。これまでに、申請者が所属する微生物化学研究所所長である野本明男博士らによって、強毒株 (Mahoney 株) と弱毒株 (Sabin 株) の病原性決定に関わる遺伝子領域として、IRES が同定されている (J. Virol. 1989)。さらに、弱毒株は中枢神経系での増殖効率が著しく低下している。つまり、弱毒株の mRNA では IRES 領域の変異により、IRES 依存的翻訳が活性化せず、ウイルスタンパク質の翻訳活性が低下していると予想される。また興味深いことに、強毒株と弱毒株は、消化管での増殖効率や中枢神経系への進入効率は同程度であるのに対し、中枢神経系での増殖効率は弱毒株において顕著に低下している (J. Virol. 1987; 1989)。このことは、ポリオウイルス

強毒株の神経組織特異的増殖と IRES 依存的な翻訳開始機構には密接な関係が存在することを示唆している。

以上の学術的背景から、申請者は、強毒株と弱毒株において、ポリオウイルスの IRES 依存的翻訳活性に差異が生じており、その差異がポリオウイルス強毒株の神経組織特異的増殖のメカニズムではないかという仮説を立てた。この仮説は、IRES に変異を有する弱毒株が中枢神経系において増殖効率が低いことに矛盾しない。本研究は、ポリオウイルスの IRES 依存的翻訳開始機構を制御する宿主因子を同定し、機能解析を行うことで、ポリオウイルスの組織特異性に寄与する IRES 依存的翻訳開始機構の素過程を解明することを最終目的とする。

また、真核生物の翻訳開始は多くのシグナル伝達分子によって複雑に制御されており、翻訳開始因子や RNA 結合タンパク質のリン酸化や脱リン酸化が、翻訳開始調節機構の重要な役割を果たしている。そのため、神経特異的な IRES による翻訳開始機構には、直接 IRES に結合する宿主因子のみならず、間接的に IRES に作用するシグナル伝達分子が宿主因子として存在する可能性が大いに考えられる。

2. 研究の目的

一般的に、真核生物の mRNA の 5' 末端にはキャップ構造が存在している。そして、キャップ構造が翻訳開始因子に認識されリボソームがエンタリーすることによって翻訳が開始される。一方、ピコルナウイルスの mRNA にはキャップ構造が存在しない。ピコルナウイルス科の一種であるポリオウイルスが宿主細胞に感染すると、ウイルスが産生する 2A プロテアーゼによる翻訳開始因子 eIF4G の分解により数時間で宿主のキャップ依存的翻訳は停止する。一方、ウイルス mRNA からのタンパク質合成は効率よく進行する。ウイルス mRNA の 5' 非翻訳領域には IRES と呼ばれる領域が存在し、開始コドン近くにリボソームが結合することで翻訳が進行する。これまでに、IRES 依存的翻訳開始機構には翻訳開始因子群に加えて、polypyrimidine tract binding protein (PTB) や La 抗原などの IRES に結合する宿主因子が必要であることが明らかにされている。また、ポリオウイルス強毒株は中枢神経系への組織特異性を有している。興味深いことに、弱毒株は消化管での増殖効率に変化は認められないものの、中枢神経系での増殖効率が著しく低下しており、この原因が IRES 中の塩基置換によるものと考えられている。すなわち、ウイルス株による組織特異性の違いは IRES に依存していると考えられる。従って、ポリオウイルスの IRES 依存的な翻訳開始機構は、IRES による組織特異的翻訳開始機構の素過程を明らかにする優れたモデルである。そこで本研究では、中枢神経系で増殖効率が高い強毒株と低

い弱毒株との差異を利用し、ポリオウイルスの組織特異性に寄与する IRES 依存的翻訳開始機構に関わる因子の同定を試み、その素過程を明らかにすることを最終目的とする。

3. 研究の方法

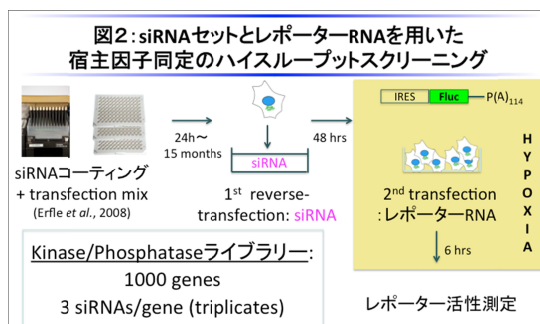
神経特異的なポリオウイルスの IRES による翻訳開始機構を解明する目的で以下の研究を行う。

(1) 強毒株と弱毒株の IRES を利用したポリソーム解析により、IRES に作用する神経特異的宿主因子を同定する。

(2) 神経細胞と非神経細胞を利用した *in vitro* 翻訳系を用いて、IRES に作用する神経特異的宿主因子を同定する。

(3) 強毒株と弱毒株の IRES を利用した RNA pull-down 法により、IRES に直接あるいは間接的に結合する神経特異的宿主因子を同定する。

(4) 真核生物の翻訳開始は多くのシグナル伝達分子によって複雑に制御されていることから、IRES 依存的な翻訳開始機構に関わるシグナル伝達分子が存在すると予想される。そこで、ヒトの Kinase や Phosphatase の siRNA を用いた遺伝子ノックダウンにより、IRES 依存的な翻訳活性に影響を与えるシグナル伝達分子を同定する (図 2)。



(5) 同定してきた因子が神経細胞特異的な真の宿主因子であるか否かについて、*in vivo* 翻訳系を用いて再評価する。最終的に宿主因子が IRES のどの領域に結合するのか、あるいはシグナル伝達因子がどのように IRES を制御するのかについて、生化学的に検証する。

4. 研究成果

神経特異的に存在すると考えられるポリオウイルス IRES の宿主因子を、効率的かつ網羅的に同定するためには、複数の手段でアプローチすることが最も有効な手段であると考えられた。本研究により確立した生化学的・分析化学的なスクリーニング系を駆使し、神経細胞特異的に発現・機能している宿主因子の候補をいくつか同定した。

(1) ポリオウイルスの強毒株と弱毒株の差異を利用し、強毒株由来の IRES 依存的翻訳に必要な宿主因子について、*in vitro* 翻訳系を用いた同定を試みた。

(2) 非神経細胞 (HeLa) と神経細胞 (SK-N-SH) の細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系を駆

使し、神経特異的宿主因子の同定を試みた。(3) RNA pull-down 法により、強毒株由来 IRES mRNA に特異的に結合する神経特異的宿主因子の同定を試みた。

(4) シグナル伝達分子の siRNA ライブラリを用いたハイスループットスクリーニング (図 2) により、IRES 依存的な翻訳開始に関わる Kinase や Phosphatase の同定を試みた。

最終的に、上記スクリーニングにより同定した宿主因子群が、真の神経特異的宿主因子であるのかについて、ポリオウイルス感染神経細胞 (SK-N-SH) の細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系により再評価した。現在は、絞り込んだ宿主因子が IRES のどの領域に結合するのか、あるいは IRES 依存的な翻訳開始のどのステージで働くのかについて、生化学的アプローチにより評価を行っている。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ayaho Kobayashi, Teppei Kanaba, Ryosuke Satoh, Toshinobu Fujiwara, Yutaka Ito, Reiko Sugiura, Masaki Mishima, Structure of the second RRM domain of Nrd1, a fission yeast MAPK target RNA binding protein, and implication for its RNA recognition and regulation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(1), 2013, 12-17, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.008

〔学会発表〕(計 7 件)

Ryosuke Satoh, Reiko Sugiura, Role of RNA-binding protein in MAPK signaling and cell fate regulation, *Anti-Aging International Mini-Symposium 2014* (招待講演) 2014 年 6 月 7 日、近畿大学 (東大阪市)

佐藤亮介、深尾亜喜良、野本明男、藤原俊伸, RNA 結合蛋白質 HuD と mRNA 核外輸送因子 TAP/NXF1 による cap 依存的翻訳活性化機構、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド (神戸市)

Ryosuke Satoh, Reiko Sugiura, Role of RNA-binding protein in MAPK signaling, *The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatase* (招待講演), 2013 年 11 月 28 日、National Health Research Institutes (台湾)

Ayaho Kobayashi, Ryosuke Satoh, Toshinobu Fujiwara, Reiko Sugiura, Yutaka Ito, Masaki Mishima, 分裂酵母由来の MAP キナーゼによりリン酸化される RNA 結合タンパク質 Nrd1 の構造解析、第 51 回日本生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日、国立京都国際会館 (京都市)

佐藤亮介、深尾亜喜良、野本明男、藤原俊伸、神経特異的 RNA 結合蛋白質 HuD の細胞内局在と cap 依存的翻訳活性化能との関係、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 25 日、県民文化会館・ひめぎんホール愛媛（松山市）

Ryosuke Sato, Aki ra Fukao, Aki o Nomoto, Toshinobu Fujiwara, Analyses of underlying relationship between the subcellular localization and stimulatory activity on cap-dependent translation of RNA-binding protein HuD、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡市）

Ryosuke Sato, Aki ra Fukao, Aki o Nomoto, Toshinobu Fujiwara, Analyses of underlying relationship between the subcellular localization and stimulatory activity on cap-dependent translation of RNA-binding protein HuD, The EMBO/EMBL Symposium "Complex Life of mRNA", 2012 年 10 月 7 日、EMBL Heidelberg (Germany)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/laboratories/virus/summary.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 亮介 (SATOH, Ryosuke)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員

研究者番号：00635592