

所属	薬学部医療薬学科	氏名	藤原 俊伸
----	----------	----	-------

課題名	真核生物における翻訳制御機構の解析		
研究分担者	氏名	所属	職位
	船上 仁範	薬学部医療薬学科	准教授
	深尾 亜喜良	薬学部医療薬学科	講師

研究概要

真核生物の翻訳反応は通常、mRNAの5'末端に存在するcap構造上に翻訳開始複合体が形成されることから始まる。翻訳開始複合体はキャップ構造を認識し結合するeIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E)を中心に形成され、mRNA上にリボソームを効率よく動員するために必要である。eIF4Eのcap構造への結合は翻訳反応の律速段階であり、細胞内におけるeIF4Eの活性はPI3K/Akt/mTOR経路およびRas/MAPK/Mnk経路によるリン酸化を介して厳密に制御されている。一方、多くのがん細胞において、eIF4Eおよび他の翻訳開始因子の発現量やリン酸化による活性制御に異常がみられるということが明らかになりつつある。そして近年、cap構造依存的な翻訳機構を標的とした新規抗がん剤開発が注目されている。しかしながら、一般的なスクリーニング法においては「cap構造依存的な翻訳機構」について厳密に評価可能な生化学実験系は少なく、効率的ではない。そこで本研究では、当研究室独自のキャップ構造およびポリ(A)配列依存的翻訳活性を厳密に制御可能なヒト培養細胞由来無細胞 *in vitro* 翻訳システムおよび化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行う。

研究成果

ヒト由来培養細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系を構築し、cap-poly(A)依存的翻訳に対して影響を与える化合物のスクリーニングを実施した。これまでにリン酸化および脱リン酸化酵素に対するスクリーニングにより抗がん作用が認められた化合物ライブラリーを用いたところ、翻訳活性を上昇させる化合物が4種、翻訳活性を減少させる化合物を1種同定した。

一方、RNAウイルスのmRNAは、5'末端非翻訳領域(5'UTR)にIRES (Internal Ribosome Entry Site) と呼ばれる特徴的な構造を持ち、cap非依存的な翻訳を可能にしている。そこで、RNAウイルスが宿主となるヒトと異なる翻訳開始様式を有することに着目し、ヒト由来培養細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系と化合物ライブラリーを用いることで、ウイルス特異的な翻訳阻害剤を同定可能であると考えた。これまでのところ、C型肝炎ウイルス(HCV)および口蹄疫ウイルス(FMDV)が有するcap非依存的な翻訳機構(IRES依存的翻訳機構)について解析を行った。そして、cap依存的な翻訳機構は阻害せずに、HCV IRES依存的翻訳活性のみ低下させる化合物およびFMDV IRES依存的翻訳活性のみ低下させる化合物を得た。今後は、各化合物がどのような分子機構で翻訳を阻害しているかを解析する予定である。

また、同様にヒト由来培養細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系を用いて、タンパク質発現を転写後レベルで調節するRNA結合タンパク質(ZFP36L1)が、サイトカインの1種であるIL-6 mRNAの翻訳量を脱アデニル化によるmRNAの不安定化機構とは独立した機構で抑制していることを証明した。さらに、ZFP36L1による翻訳抑制機構が、cap非依存的な翻訳機構には作用しないこと、および既知の分子機構には当てはまらないことを報告した。

研究発表

①原著論文

- i) Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Takumi Tomohiro, Shungo Adachi, Toru Suzuki, Akinori Takahashi, Yoshinori Funakami, Toru Natsume, Tadashi Yamamoto, Kent E. Duncan, Toshinobu Fujiwara

ARE-binding protein ZFP36L1 interacts with CNOT1 to directly repress translation via a deadenylation-independent mechanism

Biochimie, 174:49-56, Apr 2020

ii) Yuki Kanda, Ryosuke Satoh, Teruaki Takasaki, Naofumi Tomimoto, Kiko Tsuchiya, Chun An Tsai, Taemi

Tanaka, Shu Kyomoto, Kozo Hamada, Toshinobu Fujiwara, Reiko Sugiura

Sequestration of the PKC ortholog Pck2 in stress granules as a feedback mechanism of MAPK signaling in

fission yeast

Journal of Cell Science, 134(2), Jan 2021

②学会発表

i) 血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA の cap 非依存的な翻訳開始機構

堀越 真緒、八木 瞳、船上 仁範、深尾 亜喜良、藤原 俊伸

第 43 回 日本分子生物学会年会

ii) 脊髄性筋萎縮症 (SMA) の病因タンパク質 SMN の細胞質における機能解析

松田莉沙、永野可菜、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸

第 43 回 日本分子生物学会年会

iii) miRNA による遺伝子サイレンシングにおける eIF4As の機能解析

Hyerim Choe、深尾 亜喜良、七野 悠一、岩崎 信太郎、藤原 俊伸

第 43 回 日本分子生物学会年会

iv) 翻訳開始因子 eIF4B および eIF4H による IRES 依存的翻訳開始機構の制御

友廣 拓生、深尾 亜喜良、町田 幸大、船上 仁範、今高 寛晃、藤原 俊伸

第 43 回 日本分子生物学会年会

vi) ARE 結合タンパク質 AUF1 による翻訳制御機構の解析

西阪皓理、友廣拓生、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸

第 15 回 長野ミーティング

vii) シグナル伝達因子 Akt と神経特異的 RNA 結合タンパク質 HuD による翻訳制御機構

仲栄真夕夏、友廣拓生、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸

第 15 回 長野ミーティング

viii) RNA 結合タンパク質 HuD と KSRP による神経細胞分化における拮抗的作用の解析

平河顕也、友廣拓生、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸

第 15 回 長野ミーティング

ix) 脊髄性筋萎縮症 (SMA) の病因タンパク質 SMN の細胞質における機能解析

松田莉沙、永野可菜、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸

第 15 回 長野ミーティング

x) 血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA の cap 非依存的な翻訳開始機構

堀越 真緒、八木 瞳、友廣拓生、船上 仁範、深尾 亜喜良、藤原 俊伸

第 15 回 長野ミーティング

xi) 口蹄疫ウイルスのタンパク質合成を特異的に阻害する化合物の探索

中屋美咲、合澤衣梨奈、友廣拓生、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸

第 15 回 長野ミーティング