

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
	友廣 拓生	薬学部医療薬学科	助教

## 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 cap 構造および poly(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

当研究室で構築したヒト培養細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系により、cap 構造および poly(A)配列を有するレポーター mRNA の翻訳に対して影響を与える有機化合物のスクリーニングを実施した。その結果、レポーター mRNA の翻訳活性を著しく減少させる化合物を 2 種発見した。また、各化合物に共通する側鎖を改変し、翻訳活性を減少させるために重要な構造を特定した。さらに、必要とする翻訳開始因子が異なる様々なレポーター mRNA を用いた同様の実験により、化合物の標的となる翻訳開始因子を突き止めた。

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* 翻訳系と上記の有機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。これまでに、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、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。

## 研究発表

## ①原著論文

- i) Toru Suzuki, Miyuki Hoshina, Saori Nishijima, Naosuke Hoshina, Chisato Kikuguchi, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Toshinobu Fujiwara, Tadashi Yamamoto  
Regulation of CCR4-NOT complex deadenylase activity and cellular responses by MK2-dependent phosphorylation of CNOT2.  
*RNA biology* 19(1) 234-246 2022 年 2 月
- ii) Akira Fukao, Takumi Tomohiro, Toshinobu Fujiwara  
Translation Initiation Regulated by RNA-Binding Protein in Mammals: The Modulation of Translation Initiation

Complex by Trans-Acting Factors.

*Cells* 10(7) 2021 年 7 月

②学会発表

1. Takumi Tomohiro, Toru Suzuki, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Tadashi Yamamoto, and Toshinobu Fujiwara: The underlying molecular mechanism of the CCR4-NOT deadenylase complex-mediated mRNA decay and translation 【第 8 回 CCR4-NOT 研究会、2021 年 12 月 5-6 日】
2. Aika Terashita, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto, and Toshinobu Fujiwara: CNOT9, a component of the CCR4-NOT deadenylase complex, is a pivotal player in translation repression and deadenylation mediated by miRISC 【第 8 回 CCR4-NOT 研究会、2021 年 12 月 5-6 日】
3. Mai Miyao, Yurika Sakamura, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto and Toshinobu Fujiwara: Functional analysis of novel factors affecting miRNA-induced translation repression 【第 8 回 CCR4-NOT 研究会、2021 年 12 月 5-6 日】
4. Kanae Miyazaki, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto, and Toshinobu Fujiwara: mRNA decay and translation control mediated by CNOT-interacting factors, Tob1/2 【第 8 回 CCR4-NOT 研究会、2021 年 12 月 5-6 日】
5. 堀越 真緒、友廣 拓生、深尾 亜喜良、船上 仁範、片岡 直行、藤原 俊伸: 細胞性 IRES による cap 非依存的な翻訳開始機構 【第 44 回日本分子生物学会年会(横浜)、2021 年 12 月 1-3 日】
6. 鈴木 亨、友廣 拓生、菊口 千智、深尾 亜喜良、藤原 俊伸、山本 雅: CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体に複数存在する活性因子の多様な役割 【第 44 回日本分子生物学会年会(横浜)、2021 年 12 月 1-3 日】
7. 平河 顕也、友廣 拓生、深尾 亜喜良、船上 仁範、藤原 俊伸: 神経特異的 RNA 結合タンパク質による翻訳開始制御機構の解明 【第 44 回日本分子生物学会年会(横浜)、2021 年 12 月 1-3 日】
8. 西阪 皓理、友廣 拓生、深尾 亜喜良、船上 仁範、藤原 俊伸: ARE 結合タンパク質 AUF1 による翻訳制御機構の解析 【第 44 回日本分子生物学会年会(横浜)、2021 年 12 月 1-3 日】
9. Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yuka Nakaema, Yoshinori Funakami, Kodai Machida, Hiroaki Imataka and Toshinobu Fujiwara: Eukaryotic translation initiation factors 4B and 4H contribute differentially to translation stimulation 【EMBL Conference: Protein Synthesis and Translational Control、2021 年 9 月 7-10 日】
10. Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yuka Nakaema, Yoshinori Funakami, Kodai Machida, Hiroaki Imataka and Toshinobu Fujiwara: Eukaryotic translation initiation factors 4B and 4H contribute differentially to translation stimulation 【第 22 回日本 RNA 学会年会 (オンライン)、2021 年 7 月 7-9 日】
11. Aika Terashita, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto, and Toshinobu Fujiwara: CNOT9, a component of the CCR4-NOT deadenylase complex, is a pivotal player in translation repression and deadenylation mediated by miRISC 【第 22 回日本 RNA 学会年会 (オンライン)、2021 年 7 月 7-9 日】
12. Mai Miyao, Yurika Sakamura, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto and Toshinobu Fujiwara: Functional analysis of novel factors affecting miRNA-induced translation repression 【第 22 回日本 RNA 学会年会 (オンライン)、2021 年 7 月 7-9 日】
13. Mao Horikoshi, Hitomi Yagi, Takumi Tomohiro, Yoshinori Funakami, Akira Fukao, Toshinobu Fujiwara: The mechanism of cap-independent translation from VEGF mRNA 【第 22 回日本 RNA 学会年会 (オンライン)、2021 年 7 月 7-9 日】
14. Kako Fukuzumi, Yuka Nakaema, Akira Fukao, Yoshinori Funakami and Toshinobu Fujiwara: Functional interaction between the neuronal RNA-binding protein HuD and active Akt1 【第 22 回日本 RNA 学会年会 (オンライン)、2021 年 7 月 7-9 日】
15. Hikari Nishisaka, Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toshinobu Fujiwara: Analysis of translation regulation mechanisms by ARE-binding protein, AUF1 【第 22 回日本 RNA 学会年会 (オンライン)、2021 年 7 月 7-9 日】