RNA 結合タンパク質と miRNA が織りなす 翻訳ネットワーク

青山 智彦¹⁾, 深尾亜喜良²⁾, 藤原 俊伸²⁾

要約:「翻訳」とは mRNA に書き込まれた遺伝情報がタンパク質へと変換される過程である。生体内においてタンパク質の供給量は、mRNA の転写量、mRNA の安定性、翻訳効率において規定されており、様々な因子がこれらの段階を制御することがわかっている。翻訳は開始・伸長・終結の3つのステップから成り、開始段階は翻訳の律速段階であることから、翻訳効率を調節するうえで効率がよい。真核生物の mRNA は 5' 非翻訳領域 (5' untranslated region : 5' UTR) に cap 構造 (m⁷GpppN)、3' 非翻訳領域 (3' untranslated region : 3' UTR) にアデニンが連続した poly(A) 鎖をもっており、これらを足場として様々な翻訳開始因子および RNA 結合タンパク質が mRNA 上に結合し、複雑なネットワークを形成することで翻訳の開始が巧妙に制御されている。神経特異的な RNA 結合タンパク質である HuD は、神経前駆細胞で発現して神経分化を誘導することが知られている。我々は、HuD が cap 構造・poly(A) 鎖依存的な翻訳を促進すること、シグナル伝達因子である Akt1 の活性型と特異的に結合することを報告している。そして、HuD による神経分化誘導は、翻訳促進能と活性型 Akt1 に依存する。さらに興味深いことに、HuD が microRNA (miRNA) による翻訳効率の抑制と拮抗することが、近年の研究で明らかになってきた。miRNA は AGO (Argonaute) に取り込まれることで miRISC (miRNA-induced silencing complex) を形成し、配列依存的に標的 mRNA の 3' UTR に結合して、タンパク質合成を抑制することが明らかになっている。そしてその分子機構は、mRNA の安定性を低下させること、そして翻訳効率を低下させることである。しかしながら、mRNA の安定性に対する制御は、広く研究されその詳細が紐解かれつつある一方で、翻

訳効率に対する制御については不明な点が多く、その素過程は長らく不明であった。そして我々の研究グループおよび東京大学の研究グループにより、miRISC が翻訳開始因子 eIF4A を翻訳開始複合体から解離させて、翻訳を「純粹」に抑制することが明らかにされた。これらのことは、翻訳制御において RNA 結合タンパク質と miRNA が相互に関与することで、遺伝子発現を制御していることを示唆する実例である。ここを糸口として、現在未知とされていた生命現象や疾患が解き明かされることが期待されるものである

1. はじめに

タンパク質の供給量は、主として mRNA の転写量、mRNA の安定性、翻訳効率において規定されている。なかでも、翻訳効率の制御は刺激に対して速やかに応答しうることから、遺伝子発現を時間的・空間的に制御するうえで効率がよい。そして、その制御の標的選択性を与えるのが、RNA 結合タンパク質や microRNA (miRNA) であり、mRNA の安定性に加え、翻訳効率に作用することでタンパク質の供給量を調節することが明らかになっている。

本稿では、mRNA からタンパク質へと遺伝情報が伝わる「翻訳」に焦点をあて、RNA 結合タンパク質、miRNA によって織りなされる、翻訳ネットワーク制御についての最新の知見に触れるとともに、これからの展望について議論したい。

2. 真核生物の翻訳制御

翻訳は開始、伸長、終結の3つのステップからなるが、開始は翻訳の律速段階であることから、多くの翻訳制御因子の標的となっている。真核生物において、翻訳

キーワード: 翻訳制御, RNA 結合タンパク質, microRNA

¹⁾ 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 (〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

²⁾ 近畿大学 薬学部 生化学研究室 (〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1)

E-mail: tosinobu@phar.kindai.ac.jp 原稿受領日: 2016 年 3 月 14 日, 依頼原稿

Title: Translational regulation is mediated by the cross-talk between the miRNA pathway and RNA binding proteins

Author: Tomohiko Aoyama, Akira Fukao, Toshinobu Fujiwara

の開始段階は翻訳開始因子 (eIFs : eukaryotic initiation factors) によって厳密に制御され、なかでも翻訳開始因子による 5' 末端の cap 構造の認識が非常に重要であり、eIF4F というタンパク質複合体がこの過程を担っている。eIF4F 複合体は、cap 構造を直接認識する eIF4E、RNA helicase 活性をもつ eIF4A、足場的な役割をもつ eIF4G の 3 種のタンパク質から構成される。また一方で、mRNA は 3' 末端に poly(A) 鎖をもっており、PABP (poly(A) binding protein) は poly(A) 鎖と eIF4G との双方に結合することによって mRNA を環状化させ、翻訳開始を効率化することが知られている (closed loop model)。eIF4F 複合体によって cap 構造が認識されると、そこを足場に 43S PIC (43S pre-initiation complex : 40S リボソーム、開始 tRNA、GTP、eIFs) がリクルートされる。その後、5' 非翻訳領域 (5' untranslated region : 5' UTR) におけるスキャニングを経て、開始コドンが認識されると、60S リボソームの会合により翻訳は開始する (1) (図 1)。

一方前述のように、種々の因子により翻訳開始の各段階が制御されることが分かっている。4E-BP (eIF4E binding protein) は eIF4E に結合することにより、eIF4E と eIF4G との結合を阻害し、eIF4F 複合体による cap 構造の認識を妨げる (2)。また、Paip2 (PABP interacting protein 2) は PABP に結合することで、PABP と poly(A) 鎖の結合を阻害し、mRNA の環状化を妨げる (3)。これらはいずれも翻訳抑制をもたらす、cap 構造の認識

の阻害、mRNA の環状構造の阻害は、一般的な翻訳抑制の様式として広く知られている。

このように mRNA の cap 構造と poly(A) 鎖が共奏的にはたらくことで、翻訳開始が効率化されている。しかし、cap 構造と poly(A) 鎖は mRNA の安定化の視点からも非常に重要であり、cap 構造の欠落や poly(A) 鎖の分解は、mRNA の急速な分解を促す。そして、mRNA の配列依存的に結合する RNA 結合タンパク質や miRNA によって、mRNA 分解が引き起こされることが分かっている。

3. RNA 結合タンパク質による翻訳制御

RNA 結合タンパク質は、mRNA 上の AU rich element (ARE) などに代表されるシス配列や、RNA 2 次構造であるステムループに特異的に結合する。mRNA の分解の起点となるのは poly(A) の短鎖化とされており、ARE 結合タンパク質 (ARE-BP : ARE binding protein) である TTP (tristetraprolin) や BRF1 (butyrate response factor 1) は、poly(A) 短鎖化酵素を mRNA 上にリクルートすることで、mRNA の分解を引き起こすことが報告されている。TTP は CCR4-NOT (carbon catabolite repression 4/negative on TATA-less) と呼ばれる、poly(A) 短鎖化を担う複合体の足場タンパク質である CNOT1 に直接結合することで、mRNA の分解を引き起こすことが示されている (4)。また興味深いことに、BRF1 は CCR4-NOT 複合体に依存して poly(A) 鎖の短鎖化を行

図 1 真核生物の翻訳開始機構

真核生物において翻訳の開始は種々の翻訳開始因子によって、cap 構造 (m⁷GpppN) と poly(A) 鎖を足場に制御されている。翻訳開始の律速となるのは、eIF4F 複合体 (eIF4E、eIF4A、eIF4G) による cap 構造の認識である。

うことに加えて、リン酸化を受けると RNA 結合能を失うことが報告されている(5)。これは、BRF1 がリン酸化経路を介した、刺激応答的な制御を行う可能性を示唆する。

その一方で、mRNA を安定化させる RNA 結合タンパク質として Hu タンパク質が知られている。Hu タンパク質は、その安定化のメカニズムに対しての直接的な知見は乏しいが、少なくとも mRNA 分解を促す RNA 結合タンパク質と競合して、mRNA の安定化に寄与することが考えられている。哺乳類において、4 種類の Hu タンパク質 (HuR, HuB, HuC, HuD) が確認されており、HuR は全組織に発現がみられ、HuB, HuC, HuD は神経特異的な発現がみられる。また、神経特異的に発現する Hu タンパク質は、神経幹細胞がニューロンに分化することを決定づけられた神経前駆細胞で発現を開始すること、さらに細胞分裂を抑制し神経分化誘導することが示されている(6, 7)。

我々は、HuD が翻訳開始複合体と相互作用して、cap 構造・polyA 鎖依存的な翻訳を、eIF4A 結合能に依存して促進することを報告している(8)。eIF4A は、cap 構造の認識を行う eIF4F 複合体の構成因子の ATP 依存的 RNA helicase であり、mRNA の 5' UTR の 2 次構造をほどくことで 43S PIC のリクルートを促進する(9)。また、eIF4A の RNA helicase 活性は eIF4B によって活性化されることがわかっており、これは eIF4B のリン酸化によることが明らかになっている(9, 10)。

さらに、神経成長因子 NGF により神経細胞様に分化するラット由来細胞である PC12 細胞を用いた解析によって、HuD による神経分化誘導が、翻訳促進能に依存することが報告されている(8)。また、HuD が活性型 Akt1 と直接結合し、神経分化誘導が活性型 Akt1 に依存することもわかっているが、面白いことに、HuD は自身がリン酸化の基質にならない(11)。これは、HuD によってリクルートされた活性型 Akt1 が、翻訳開始複合体のリン酸化経路を活性化することで、翻訳を促進する可能性を示唆している。そして、Akt1 による eIF4B のリン酸化が報告されていることから(12)、我々は HuD が活性型 Akt1 を翻訳開始複合体にリクルートし、eIF4B のリン酸化を介して eIF4A を活性化することで、翻訳を促進している仮説を考えている(図 2)。

このように、HuD は mRNA の安定性を向上させることに加え、積極的に翻訳を促進することが明らかとなっている。そして、最新の研究により HuD が miRNA 依存的な翻訳抑制に拮抗するということが分かってきた。

図2 RNA 結合タンパク質 HuD による翻訳活性化モデル
HuD と直接結合する活性型 Akt1 が、eIF4B のリン酸化を介して eIF4A の RNA helicase 活性を上昇させ、43S PIC (40S リボソーム、開始 tRNA、GTP、eIFs) のリクルートを効率化して翻訳を促進する。

4. miRNA による翻訳制御

miRNA は、植物からヒトまで保存されているタンパク質をコードしない、約 20 bp からなる小さな RNA である。miRNA は AGO (Argonaute) に取り込まれて miRISC (miRNA-induced silencing complex) を形成し、miRNA の配列依存的に標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region : 3' UTR) に結合して mRNA の分解を引き起こす。miRISC は TNRC6/GW182 と結合することで、mRNA 分解の活性本体である CCR4-NOT 複合体をリクルートすることがわかっており、これは TNRC6/GW182 と PABP の結合によって効率化されていることが言われている(13)。

miRISC が mRNA の安定性を負に制御することで遺伝子発現を低下させることは、広く研究されその詳細が分かりつつある。一方、miRNA が mRNA の安定性に依存せずに「純粹」に翻訳を抑制していることは、多くの研究者によって示唆されながらも、その実態はあまり明らかになっていなかった。そして、poly(A) 鎖をもたない mRNA、poly(A) 鎖の末端に非アデニン領域を約 10~40 塩基追加して poly(A) の短鎖化を阻害した mRNA において、miRNA による「純粹」な翻訳抑制がみられることが報告された(14-16)。さらに、ショ糖密度勾配遠心法による解析から、miRNA が翻訳の開始段階を抑制していること、また eIF4F 複合体の依存性の検証により、miRNA が cap 構造の認識を標的とすることが示された(17)。また、リボソームプロファイリング法を用いた解析で、miRNA が標的 mRNA

の翻訳領域への 80S リボソームの結合量を均一に減少させることが明らかになっている(18). これらの報告は、翻訳の開始段階こそが、miRNA による翻訳抑制の標的であるということを示唆している。

このような背景のなか、miRNA が翻訳を抑制している際に、翻訳開始複合体がどのような影響を受けているのか、最新の研究で明らかになってきた。具体的には、miRISC が 43S PIC の標的 mRNA へのリクルートを阻害することが示され、このことは miRISC が翻訳開始段階を阻害していることを裏付けた(19). そこで我々は、生化学的な手法を駆使することで、*in vitro* の翻訳反応系から、翻訳が行われている miRISC を含む mRNP (mRNA-protein complex) を取り出し、miRISC が翻訳開始複合体にどのような影響を与えているかを検証した。その結果、ヒトにおいて miRISC が「純粋」な翻訳抑制を呈しているときに、eIF4AI と eIF4AII の翻訳開始複合体からの解離がみられることが明らかとなった(20) (図 3). そして、この eIF4A の翻訳開始複合体からの解離が、miRISC による翻訳抑制に必須であることを確かめるために、silvestrol という eIF4A を RNA 上に固定する効果をもつ低分子化合物を利用した。silvestrol によって処理することで eIF4A を mRNA 上に固定した条件下では、miRISC 依存的な翻訳抑制がみられなかった。このことは eIF4A の翻訳開始複合体からの解離という現象が、miRNA による翻訳抑制に必須であることを示唆している(20). また、ショウジョウバエにおいてもこれとは異なるアプローチによって、miRISC 依存的に翻訳開始複合体から eIF4A が解離することが報告されている(21). つまり、

miRISC 依存的な eIF4A の翻訳開始複合体からの解離による翻訳抑制機構が、少なくともヒトとショウジョウバエにおいて保存されていると言える。

以上のことから、miRNA が翻訳を抑制するために、eIF4A の翻訳開始複合体からの解離が必須であることが明らかになった。では、eIF4A はどのように解離させられているのであろうか。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた実験で、poly(A)短鎖化酵素の Caf1/CNOT7 を mRNA に固定化したとき、cap 構造に依存して翻訳を抑制することが報告されている。この翻訳抑制は CAF1/CNOT7 の poly(A)短鎖化酵素活性をなくしてもみられ、純粋な翻訳抑制を示唆する(22). また、哺乳類において CAF1/CNOT7 が eIF4AI に結合せず、eIF4AII に結合することが示されており、このことから eIF4AII が CCR4-NOT 複合体を介して標的 mRNA にリクルートされることによる、miRISC の翻訳抑制モデルが提唱されている(23). このモデルでは、機能解析が進んでいる eIF4AI とは対照的に、eIF4AII が翻訳抑制因子としてはたらくことを主張している。しかしながら、eIF4AI と eIF4AII の機能の違いはいまだ分かっていないことが多く、ショウジョウバエは eIF4A を 1 種類しか持っていないこと(24)、さらに eIF4AII のノックアウトマウスを用いた解析において、miRNA の効果が確認できることから(25)、eIF4AII に依存した miRISC の翻訳抑制モデルについては疑問が残るところである。

5. 翻訳制御のパラダイムシフト

HuD は miRISC による eIF4A の翻訳開始複合体からの解離に拮抗することが明らかになった。さらに、我々はその拮抗様式は、HuD の eIF4A への結合能に依存することを明らかにしている。このことは HuD という RNA 結合タンパク質が様々な miRNA と拮抗関係を形成することで、翻訳制御ネットワークを形成していることを意味する(図 4). そして、翻訳開始複合体からの eIF4A の解離が、翻訳の抑制様式において一般的である可能性を内包している。実際に eIF4A を標的として翻訳が制御される例は報告されており、pdc4 (programmed cell death 4) は eIF4A に結合し、eIF4A の RNA 結合能を阻害することで、RNA helicase 活性を抑制することが明らかにされている(26). また eIF4A に結合することで、RNA helicase 活性を阻害する RNA アプタマーも分離されており、この RNA アプタマーは、eIF4A の ATPase 活性を阻害することが示されている(27). eIF4A の解離が、これらの eIF4A の機能阻害様式の結果であることは大いに考えられる。

図3 miRNA による翻訳抑制モデル
miRNA は eIF4A を翻訳開始複合体から解離させることで翻訳を抑制する。

図4 HuDを起点とした翻訳制御ネットワーク仮説

HuDによってリクルートされた活性型Akt1が、翻訳開始複合体のリン酸化経路を活性化することが示唆されている。そして、Akt1がeIF4Bを直接リン酸化して、eIF4AのRNA helicase活性を上昇させることで、一般に翻訳を促進することに加え、Akt1がBRFなどのARE-BPをリン酸化して、mRNAの分解を抑えるといったことも考えられる。また、HuDがmiRNAによる翻訳抑制に拮抗することからも、RNA結合タンパク質やmiRNAが密接に関わることで制御される、生命現象の可能性は大いに考えられる。

以上のように、miRNAによる翻訳抑制機構の素過程を生化学的に解析した結果、miRNAはeIF4Aを翻訳開始複合体から解離させることが明らかになった。今後は、eIF4AをmRNA上から解離させる因子の同定およびその素過程に焦点が集まってくる。そう遠くない将来に、eIF4Aを標的とした翻訳制御様式を足がかりにして、その全貌が解き明かされていくであろう。

6. おわりに

miRNAに関連した研究が行われている分野は多岐にわたり、様々な生命現象に密接に関わることが報告されている。そしてmiRNAの作用メカニズムの解析が進められることで、miRNAの抑制機構として、mRNAの不安定化に加えて、純粋な翻訳抑制の実態も明らかになってきた。翻訳効率の制御はタンパク質の供給量を速やかに調節することができ、これは高度な生命現象を可能とする。今後のさらなる研究により、miRNAの作用メカニズムの素過程が明らかになることで、その原因が未知とされている疾患の詳細が紐解かれることを期待する。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Sonenberg N, et al. Cell. 2009;136:731-745.
- 2) Marcotrigiano J, et al. Mol Cell. 1999;3:707-716.
- 3) Khaleghpour K, et al. Mol Cell. 2001;7:205-216.
- 4) Fabian MR, et al. Nat Struct Mol Biol. 2013;20:735-739.
- 5) Schmidlin M, et al. EMBO J. 2004;23:4760-4769.
- 6) Kasashima K, et al. Genes Cells. 1999;4:667-683.
- 7) Akamatsu W, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:9885-9890.
- 8) Fukao A, et al. Mol Cell. 2009;36:1007-1017.
- 9) Andreou AZ, et al. RNA Biol. 2013;10:19-32.
- 10) Raught B, et al. EMBO J. 2004;23:1761-1769.
- 11) Fujiwara T, et al. Nucleic Acids Res. 2012;40:1944-1953.
- 12) van Gorp AG, et al. Oncogene. 2009;28:95-106.
- 13) Fabian MR, et al. Nat Struct Mol Biol. 2012;19:586-593.
- 14) Wu L, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:4034-4039.
- 15) Fukaya T, et al. EMBO J. 2011;30:4998-5009.
- 16) Mishima Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:1104-1109.
- 17) Mathonnet G, et al. Science. 2007;317:1764-1767.
- 18) Bazzini AA, et al. Science. 2012;336:233-237.
- 19) Fukaya T, et al. Mol Cell. 2012;48:825-836.
- 20) Fukao A, et al. Mol Cell. 2014;56:79-89.
- 21) Fukaya T, et al. Mol Cell. 2014;56:67-78.
- 22) Cooke A, et al. J Biol Cell. 2010;285:28506-28513.
- 23) Meijer HA, et al. Science. 2013;340:82-85.
- 24) Dorn R, et al. Mol Gen Genet. 1993;237:233-240.
- 25) Galicia-Vázquez G, et al. RNA. 2015;21:1826-1833.
- 26) Chang JH, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:3148-3153.
- 27) Oguro A, et al. RNA. 2003;9:394-407.