

氏名	さがえ たける 寒河江 彪流
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2022年9月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Paip2によるPABP依存的翻訳抑制の分子メカニズムの解明
論文審査委員	(主査) 教授 大澤 匡範 (博士(学術)) (副査) 教授 長谷 耕二 (博士(薬学)) 准教授 大江 知之 (博士(薬学))

論文内容の要旨

【背景・目的】

真核生物の核内で合成された mRNA は、5'末端に cap が、3'末端に poly(A)が付加された後、細胞質に輸送される。Poly(A)には Poly(A)結合タンパク質 (PABPC1) が結合し、PABPC1 は様々な翻訳因子と相互作用することで翻訳を調節する。この PABPC1 依存的な翻訳は、細胞やウイルスの増殖に関与している。例えば、心筋細胞においては PABPC1 の発現量と心筋細胞の増殖との間に正の相関がみられる。また、デングウイルスは宿主の PABPC1 を利用して自身の RNA の翻訳を促進する。PABP-interacting protein 2 A (Paip2A) は PABPC1 を poly(A)から解離させることで翻訳を抑制することが知られている。Paip2A は恒常的にがん化した NIH3T3 細胞の増殖を抑制することや、デングウイルスの増殖を抑制することが報告されている。そのため、Paip2A による PABPC1 の解離の分子メカニズムを解明することは、新たな抗がん剤・抗ウイルス薬の開発に繋がることが期待できる。PABPC1 は 636 残基からなるタンパク質であり、N 末端側にはタンデムに並ぶ 4 つの RNA 認識モチーフ (RRM) を、C 末端側には PABC と呼ばれるドメインを持ち、その間は約 170 残基の linker により繋がれている。RRM1/2/3/4 は poly(A)と結合し、その解離定数 (K_d) は 0.15 nM と、PABPC1 全長の poly(A)との結合の K_d (0.69 nM) とほぼ同等であり、RRM1/2/3/4 が poly(A)結合に主要な役割を果たしている。Paip2A は 127 残基からなるタンパク質であり、N 末端側には RRM と結合する PABP-interacting motif 1 (PAM1) を、C 末端側には PABC と結合する PABP-interacting motif 2 (PAM2) を持つ。PAM1 と RRM1/2/3/4 との結合の K_d は 0.66 nM、PAM2 と PABC の結合の K_d は 74–400 nM であり、PAM1 の方が PABP との結合親和性が著しく高い。以上のことから、Paip2A の PAM1 と RRM との相互作用が、Paip2A による poly(A)からの PABPC1 の解離に寄与していると考えられる。しかしながら、PABPC1 の poly(A)および Paip2A への結合親和性はどちらも約 0.7 nM とほぼ同等であるにもかかわらず、どのようにして Paip2A が効率的に PABPC1 を poly(A)から解離させているかは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、PABPC1 と poly(A)、および、Paip2A と PABPC1 との相互作用を解析することで、Paip2 による poly(A)からの PABP 解離のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

タンパク質の発現と精製

ヒトPABPC1全長およびその変異体であるRRM1/2/3/4、RRM2/3、RRM1、RRM2、RRM3、RRM4、ヒトPaip2A全長およびその変異体であるPaip2A(25-83)をコードするDNA配列を各種ベクターに挿入し、各タンパク質の発現プラスミドを作成した。各種プラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。大腸菌発現系を用いて各種タンパク質を発現させた後、大腸菌破砕液より、各種クロマトグラフィーを用いて目的タンパク質を精製した。

表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による Paip2A の活性確認

Poly(A)を固定化したセンサーチップに PABPC1 または RRM1/2/3/4 を添加して poly(A)に PABPC1 または RRM1/2/3/4 を結合させた後、さらに Paip2A を添加することで、SPR レスポンスの変化を評価した。

核磁気共鳴分光法 (NMR) による Paip2A と RRM1/2/3/4 の相互作用解析

^{13}C , ^{15}N 標識 ($[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$) Paip2A の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上に観測された主鎖アミドシグナルを帰属した後、 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ Paip2A に対して RRM1/2/3/4 を滴定し、RRM1/2/3/4 の滴定に伴う $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ Paip2A の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトル上に観測されたシグナルの変化を解析した。

等温滴定カロリメトリー (ITC) による poly(A)および Paip2A と RRM との相互作用解析

ITC にて、poly(A)および Paip2A(25-83)と、RRM2/3 および単独の各 RRM (RRM1、RRM2、RRM3、RRM4) との相互作用解析を行い、得られた K_d を比較した。

NMR による Paip2A(25-83)と RRM2/3、RRM2、RRM3 の相互作用解析

$[^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ Paip2A(25-83)に対する RRM2/3 の NMR 滴定実験、および、 $[^{15}\text{N}]$ Paip2A(25-83)に対する RRM2 および RRM3 の NMR 滴定実験を行い、スペクトル上に観測された主鎖アミドシグナルの変化を解析した。

NMR による RRM2/3 と poly(A)の相互作用解析

NMR にて、poly(A)の添加に伴う RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上に観測された主鎖アミドシグナルの変化を解析した。Poly(A)の添加により大きな化学シフト変化が見られたシグナルに対応する残基を RRM2 および RRM3 の構造上にマッピングした。

NMR による RRM2/3 と Paip2A の相互作用解析

NMR にて、Paip2A(25-83)の添加に伴う RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上に観測された主鎖アミドシグナルの変化を解析した。Paip2A(25-83)の添加により大きな化学シフト変化が見られたシグナルに対応する残基を RRM2 および RRM3 の構造上にマッピングした。

【結果】

タンパク質の発現と精製

各種タンパク質を精製した。収量は、LB 培地 1 L あたり、PABPC1 が 4 mg、RRM1/2/3/4 が 4 mg、RRM2/3 が 13 mg、RRM1 が 4 mg、RRM2 が 6 mg、RRM3 が 3 mg、RRM4 が 5 mg、Paip2A が 1 mg、Paip2A(25-83)が 0.4 mg であった。

SPR による Paip2A の活性確認

24 塩基の poly(A) (A_{24}) [以降、n 塩基の poly(A)を A_n と表記する。] を固定化したセンサーチップに PABPC1 または RRM1/2/3/4 を添加して A_{24} に PABPC1 を結合させた後、さらに Paip2A を添加した。その結果、PABPC1 または RRM1/2/3/4 を、 A_{24} を固定化したセンサーチップに添加すると、レゾナンスユニット (RU) 値、すなわち、レスポンスが増大し、センサーグラムの最大値に近づいて飽和状態になった。そこへ、さらに Paip2A(FL)を添加すると、Paip2A(FL)の濃度依存的に RU 値が減少し、調製した Paip2A(FL)が PABPC1 および RRM1/2/3/4 を A_{24} から解離することが示された。特に、Paip2A はリンカーと PABC を持たない RRM1/2/3/4 よりも効率よく PABPC1 を解離させた。このことから、PABPC1 上の PABC と Paip2 上の PAM2 領域の相互作用も PABPC1 の poly(A)からの解離に寄与していることが示唆された。

NMR による Paip2A と RRM1/2/3/4 の相互作用解析

[^2H , ^{15}N] Paip2A に対して RRM1/2/3/4 を滴定し、RRM1/2/3/4 の滴定に伴う [^2H , ^{15}N] Paip2A の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトル上に観測された主鎖アミドシグナルの変化を解析した。その結果、1.0 等量の RRM1/2/3/4 の添加の時点でスペクトル変化は飽和しており、Paip2A が RRM1/2/3/4 に対して 1:1 のストイキオメトリーで直接結合していることが示唆された。これらの変化は、free の状態と RRM1/2/3/4 結合状態の化学シフトの差がそれらの交換速度よりもはるかに大きい、slow exchange での化学シフト変化を反映したものであった。そのため、free の Paip2A(FL)のシグナルの帰属を RRM1/2/3/4 結合状態のシグナルへ移行することはできなかったが、slow exchange で変化したシグナルを、摂動を受けたシグナルとみなした。一方、残基 1, 5-10, 12-25, 84, 85, 89-110, 114-117, 121-127 の化学シフト変化量は 0.06 ppm 以下と非常に小さく、これは摂動を受けたシグナルでないと見なした。Slow exchange で変化したシグナルは、Paip2A のアミノ酸残基番号 26-83 番の領域に位置しており、このことから、これらの残基が RRM1/2/3/4 との相互作用に関与していることが示唆された。

ITC による poly(A)および Paip2A と RRM との相互作用解析

単独の各 RRM と 7 塩基の poly(A) (A_7) との相互作用を ITC にて解析した。RRM2 と RRM3 では A_7 との結合に伴う発熱が観測されたが、RRM1 と RRM4 では熱量変化は観測されなかった。結合等温線の積分により得られた各滴定時の発熱量を one Set of Sites モデルで最小二乗法によりフィッティングしたところ、RRM2 と RRM3 の K_d はそれぞれ 200 μM および 4.7 μM となり、ストイキオメトリーは 1:1 となった。さらに、RRM2/3

の A₁₂ に対する結合親和性を ITC にて解析した。その結果、ストイキオメトリーは 1:1 で、K_d は 1.3 nM であり、これは PABPC1-A₂₄ 相互作用の K_d (0.69 nM) とほぼ同じであった。これらの結果は、PABPC1 の RRM のうち、RRM2 から RRM3 までの領域が主に poly(A) との相互作用に寄与していることを示唆している。さらに、ITC を用いて、単独の各 RRM と Paip2A(25-83) との相互作用を ITC にて解析した。RRM2 と RRM3 では Paip2A(25-83) との結合に伴う発熱が観測されたが、RRM1 と RRM4 では熱量変化は観測されなかった。結合等温線の積分により得られた各滴定時の発熱量を one Set of Sites モデルで最小二乗法によりフィッティングしたところ、RRM2 と RRM3 の K_d はそれぞれ 4.0 μM と 1.3 μM となり、ストイキオメトリーは 1:1 となった。次に、RRM2/3 の Paip2A(25-83) に対する結合親和性を ITC にて解析した。その結果、ストイキオメトリーは 1:1 で、K_d は 1.9 nM であり、既に報告されている Paip2A と RRM2/3 の相互作用の K_d 0.85 nM と一致した。

NMR による Paip2A(25-83) と RRM2/3, RRM2, RRM3 の相互作用解析

Paip2A(25-83) と RRM2/3 間の相互作用を解析したところ、Paip2A(25-83) と RRM2/3 の相互作用では、大きな化学シフト変化を示し、Paip2A(25-83) のアミノ酸残番号 31-79 番に相当するシグナルは RRM2/3 の結合により化学シフトが変化または消失した。Paip2A(25-83) のアミノ酸残番号 31-79 に相当するシグナルが RRM2 と RRM3 のどちらの RRM によって摂動を受けたかを調べるために、RRM2 結合状態または RRM3 結合状態の ¹⁵N 標識 Paip2A(25-83) の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。その結果、RRM2 の結合によって摂動された Paip2A(25-83) の残基は 44-70 と 74-79 であり、RRM3 の結合によって摂動された残基は 27-70 で、44-70 番の残基は RRM2 と RRM3 の両方により摂動を受けた。特に、RRM2 結合状態または RRM3 結合状態の Paip2A(25-83) の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルは、RRM2/3 結合状態の Paip2A(25-83) の NMR スペクトルにおける対応するシグナルと重ならなかった。これらのことから、単独の RRM2 と RRM3 の Paip2A(25-83) 結合様式は、RRM2/3 の Paip2A(25-83) 結合様式とは異なることが示唆された。単離された RRM2 と RRM3 は、Paip2A のアミノ酸残番号 44-70 番に重複した領域を持ち、それぞれ、Paip2A の C 末端と N 末端に優先的に結合する。しかし、RRM の結合様式は RRM2/3 結合状態とはわずかに異なっていることがわかった。

NMR による RRM2/3 と poly(A) の相互作用解析

A₁₂ の添加に伴う RRM2/3 のシグナルの変化を解析し、A₁₂ の添加により摂動を受けたシグナルに対応する残基を RRM2 および RRM3 の構造上にマッピングした。その結果、それらの残基は、ほとんどが RRM2/3 の β ストランド領域に対応していた。RRM1/2-poly(A) 複合体の結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) code : 1CVJ] から得られた RRM2、および、相同性が高い RRM2 の構造を用いて作成した RRM3 の構造モデル上に A₁₂ に

より摂動を受けた残基をマッピングした。その結果、摂動を受けた残基は poly(A)結合界面およびその周辺に局在していることが示唆された。

NMRによる RRM2/3 と Paip2A の相互作用解析

Paip2A(25-83)添加に伴う RRM2/3 のシグナルの変化を解析し、Paip2A(25-83)の添加により大きな化学シフト変化が見られたシグナルに対応する残基を RRM2 および RRM3 の構造上にマッピングした。その結果、これらの残基は β シート表面に局在し、poly(A)結合表面と大きく重なっていることがわかった。これらの結果から、Paip2A は PABPC1 の RRM2 と RRM3 の poly(A)結合界面と競合的に結合することが示唆された。

【考察】

本研究より、poly(A)と Paip2A に対する RRM2 の結合の K_d はそれぞれ 200 μM および 4.0 μM であり、poly(A)に対する結合親和性に比べ、Paip2A に対する結合親和性が 50 倍大きいことが明らかとなった。このことから、Paip2A は poly(A)より優先的に RRM2 に結合可能であると考えた。また、Paip2A(25-83)は、poly(A)と同様に、RRM2/3 の β シート側に結合した。このことから、Paip2A は PABPC1 の RRM と poly(A)との結合を競合的に阻害すると考えた。以上の結果から、Paip2A による poly(A)からの PABP 解離のメカニズムについて、次のモデルを提唱した。まず、PABPC1 は 4 つの RRM の中でも特に poly(A)に対して親和性の高い RRM2 および RRM3 を主として poly(A)に結合する。そこに Paip2A が存在すると、Paip2A は RRM2 に対する結合親和性が poly(A)より高いため、poly(A)よりも優先的に RRM2 に結合し、RRM2 の poly(A)への結合を競合的に阻害する。さらに、Paip2A は RRM2 にテザリングされることで RRM3 の poly(A)結合部位を効率的に阻害することができる。それにより、PABPC1 が poly(A)から解離する。

【結論】

Paip2A のアミノ酸残基番号 26-83 の領域が PABPC1 の RRM1/2/3/4 との相互作用に関与することを明らかにした。また、4 つの RRM のうち、poly(A)および Paip2A との結合に主として関与するのは RRM2 および RRM3 であり、特に、Paip2A の RRM2 に対する結合親和性が poly(A)の RRM2 に対する結合親和性より著しく大きいことを明らかにした。そして、Paip2A は RRM 結合領域のうちの C 末端で RRM2 と、N 末端側で RRM3 と相互作用することを明らかにした。さらに、PABPC1 の RRM2 および RRM3 の poly(A)の結合部位を同定し、かつ、Paip2A が RRM2 および RRM3 の poly(A)結合部位と同じ部位に結合することを明らかにした。これらのことから、Paip2A は、まず poly(A)結合型の PABPC1 の RRM2 に対して poly(A)に競合して結合し、それに続いて、RRM2 にテザリングされた効果により、効率的に RRM3 に結合し、poly(A)と置換することで、PABPC1 を poly(A)から解離させると考えた。

【今後の展望】

PABPC1 の 4 つの RRM は互いに高い配列相同性を持ち、なぜ各 RRM 間で poly(A) に対する結合親和性に大きな差が生まれるかは依然として不明なままである。それを明らかにするには、RRM のアミノ酸配列を比較するだけでなく、タンパク質と核酸との複合体の立体構造の観点から、すなわち、poly(A) との相互作用に直接関与する RRM のアミノ酸残基の原子レベルでのアプローチが必要である。これまでに、ヒトの PABPC1 の RRM においては RRM1/2-poly(A) 複合体の結晶構造が明らかになっているが、RRM3 および RRM4 の立体構造は未だ明らかになっていない。これまでは、アフリカツメガエルの PABPC1 を用いた研究により PABPC1 の poly(A) 認識には RRM1/2 が最も重要であると考えられてきたが、今回私が行った研究より、ヒトの PABPC1 における RRM3 の重要性が明確になった。今後、RRM3-poly(A) 複合体または RRM3/4-poly(A) 複合体の X 結晶構造解析等により、未だ明らかになっていない PABPC1 の RRM3 および RRM4 と poly(A) との複合体の立体構造を決定することで、RRM の poly(A) 認識メカニズムについての原子レベルでの考察が可能となり、PABPC1 が関与するがんやウイルス感染症の新たな創薬基盤が構築されることが期待できる。

また、PABPC1 が関与するがんやウイルス感染症には、PABPC1 の活性増大による翻訳促進が大きく関わっているが、Paip2A は PABPC1 による翻訳を抑制する働きがある。この働きは Paip2A が PABPC1 を poly(A) から解離させることによると考えられてきたが、その分子メカニズムは明らかになっていなかった。しかし、本研究により、Paip2A が RRM2 および RRM3 の poly(A) 結合を競合的に阻害することが示された。特に、poly(A) と PABPC1 の結合を阻害する薬等を開発する場合には、poly(A) との結合親和性が低い RRM2 は良いターゲットになり得る。また、本研究では RRM2 および RRM3 と相互作用する Paip2A の残基を同定したが、各 RRM との相互作用に関与する領域のみからなる Paip2A の欠失変異体を用いれば、RRM との共結晶化や、溶液 NMR 法による構造決定を行うことが容易になる。今後、RRM2 および RRM3 と Paip2A の各 RRM の結合領域との複合体の立体構造を明らかにすることで、structure-based drug design (SBDD) 等により Paip2A を模倣するような低分子薬もしくはペプチド薬を作成することが可能となり、新たな抗がん剤、抗ウイルス薬の開発に繋がることを期待できる。

論文審査結果の要旨

翻訳抑制因子である Paip2 は、mRNA の 3' - poly(A) に結合して翻訳を促進する poly(A) 結合タンパク質(PABP)を poly(A) から解離させることにより翻訳を抑制するタンパク質である。本研究は、「Paip2-PABP の解離定数は、poly(A)-PABP の解離定数が同等であるにもかかわらず、Paip2 がいかにして効率よく PABP を poly(A) から解離させるのか」と

いう research question に対して、主に等温滴定型カロリメトリー(ITC)と NMR を用いてその分子機構を明らかにした。主な実験的エビデンスは、以下のとおりである。

- ・ ITC により、PABP の 4 個の RRM のうち RRM2~RRM3 の領域 (RRM2/3) は、poly(A)と Paip2 に対して同等の K_d を示した
- ・ ITC により、RRM2 と RRM3 が poly(A)および Paip2 との結合に主要な寄与をしていることが分かった
- ・ ITC により、RRM3 は poly(A)と Paip2 に対して同等の K_d を示したが、RRM2 の Paip2 に対する K_d は、poly(A)に対する K_d の 1/50 であった
- ・ NMR により、poly(A)と Paip2 はいずれも RRM の同一表面に結合し、互いに競合する関係にあることが分かった
- ・ NMR により、Paip2 の N 末端側は RRM3 と結合していることが分かった

以上の実験結果に基づき、Paip2 が PABP を poly(A)から解離する、以下のようなメカニズムを提唱した。

「Paip2 は RRM2 に対する結合親和性が poly(A)より 50 倍高いため、poly(A)と競合的に RRM2 に結合する。Paip2 は RRM2 との結合を介して PABP に tethering されることにより、Paip2 の N 末端側にある RRM3 結合領域の局所濃度が上昇するため、poly(A)と競合的に RRM3 に結合し、その結果として PABP を poly(A)から解離させる。」

審査会に先立ち 2022 年 7 月 14 日行われた主査・副査 2 名による事前審査においては、副査から発表をより分かりやすくするよう改善を求められた。論文内容についての質疑では、概ね的を射た回答を行った。その後の主査・副査での意見交換では、「実験量は十分であり、歴史ある journal に掲載されている」、「質疑応答も概ねよくできていた」という意見が出され、総合評価として、申請者である寒河江彪流が学位審査会に進んでよいと結論した。

2022 年 7 月 26 日に実施された論文発表会では、上記の事前審査での指摘事項に対応し、プレゼンテーションに改善が見られた。解離定数に対する熱力学的な解釈を求められた際には、物理化学の理論に基づく説明を行うことができた。引き続き審査会においては、主査・副査より以下の評価が報告された。

- ・ NMR・ITC の重厚なデータを取得しそれらを丁寧に解析しており、すべてのデータを的確に考察し結論を導いている
- ・ 質疑応答に時間がかかる場面があったが、最終的には適切な回答ができていた
- ・ 論文投稿の際に、revision をやりきったことは評価できる
- ・ 課程博士として半年遅れたが、学位論文の完成度は高い

以上を総合し、審査会において、博士(薬学)を授与するにふさわしい研究であると結論された。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

著者名 : Takeru Sagae, Mariko Yokogawa, Ryoichi Sawazaki, Yuichiro Ishii, Nao Hosoda, Shin-ichi Hoshino, Shunsuke Imai, Ichio Shimada, and Masanori Osawa

論文題名 : Paip2A inhibits translation by competitively binding to the RNA recognition motifs of PABPC1 and promoting its dissociation from the poly(A) tail

雑誌名 : Journal of Biological Chemistry

巻 (号) : 298 (5)

頁 : 101844

出版年 : 2022