

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	寒河江 彪流
主 論 文 題 名 : Paip2 による PABP 依存的翻訳抑制の分子メカニズムの解明			
<p>【背景・目的】</p> <p>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。</p>			

【方法】

表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた Paip2A の活性確認

Poly(A)を固定化したセンサーチップにPABPC1を添加してpoly(A)にPABPC1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}C , ^{15}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、 ^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) と RRM との相互作用解析

ITC にて、poly(A)と単独の各 RRM (RRM1、RRM2、RRM3、RRM4) との相互作用解析を行った。

ITC および NMR による Paip2A と RRM との相互作用解析

ITC にて、Paip2A のアミノ酸残基番号 25-83 番から成る変異体である Paip2A(25-83)と単独の各 RRM との相互作用解析を行った。 ^{15}N Paip2A(25-83)に対する RRM2 および RRM3 の NMR 滴定実験を行い、 ^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。

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】

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 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、Paip2A の添加に伴い、濃度依存的に PABPC1 が poly(A)から解離し、Paip2A が PABPC1 を poly(A)から解離させる活性を持つことが示された。

^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、Paip2A のアミノ酸残基番号 26-83 番の残基に由来するシグナルに大きな化学シフト変化が見られ、Paip2A のアミノ酸残基番号 26-83 番の領域が RRM1/2/3/4 との相互作用に寄与していることが示唆された。

ITCにて、A₇と各 RRM の相互作用解析を行った。その結果、RRM2 および RRM3 は A₇との結合による熱量変化が観測され、K_dは、それぞれ、200 μM および 4.7 μM であった。RRM1 および RRM4 は A₇との結合による熱量変化は観測されなかった。

ITCにて、Paip2A(25-83)と各 RRM の相互作用解析を行った。その結果、RRM2 および RRM3 は Paip2A(25-83)との結合による熱量変化が観測され、K_dは、それぞれ、4.0 μM および 1.3 μM であった。RRM1 および RRM4 は Paip2A(25-83)との結合による熱量変化は観測されなかった。

[¹⁵N] Paip2A(25-83)に対する RRM2 および RRM3 の NMR 滴定実験を行った。その結果、RRM2 の添加では Paip2A(25-83)の C 末端側の残基である 44-70 および 74-79 番の領域に、RRM3 の添加では Paip2A(25-83)の N 末端側の残基である 27-70 番の領域に、化学シフト変化が見られた。このことは、Paip2A(25-83)の N 末端側が RRM3 に、C 末端側が RRM2 との相互作用に参与することを示唆している。

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、それらの残基は、RRM2/3 の各 RRM の β シート側に局在していた。このことは、RRM2/3 の各 RRM の β シート側に poly(A)が結合することを示唆している。

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、それらの残基は、RRM2/3 の各 RRM の β シート側に局在していた。このことは、RRM2/3 の各 RRM の β シート側、すなわち、RRM2/3 の poly(A)結合部位に Paip2A(25-83)が結合することを示唆している。

【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、Paip2 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。