

博士学位論文 2022（令和 4）年度

Paip2 による PABP 依存的翻訳抑制の分子メカニズムの解明

慶應義塾大学大学院薬学研究科

寒河江 彪流

略語

HSQC: Heteronuclear single quantum coherence

MLLE: Mademoiselle

NOESY: Nuclear Overhauser effect spectroscopy

PABC: PABP C-terminal domain

PABP: Poly(A) binding protein

Paip2: PABP-interacting protein 2

PAM: PABP-interacting motif

RRM: RNA recognition motif

SPR: Surface plasmon resonance

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy

TROSY: Transverse relaxation optimized spectroscopy

第1章	序論	3
1.1	Poly(A)結合タンパク質[Poly(A) binding protein C1 (PABPC1)]	3
1.2	PABP interacting protein 2 A (Paip2A)	3
1.3	PABPC1 と Paip2A のドメイン構成と機能	3
1.4	本研究の目的	4
1.5	研究の概要	5
第2章	方法	6
2.1	タンパク質の発現と精製	6
2.2	表面プラズモン共鳴法	6
2.3	NMR 解析	7
2.4	¹⁵ N 緩和実験	8
2.5	等温滴定カロリメトリー (ITC)	8
2.6	Poly(A)の定量	8
2.7	RRM3 のホモロジーモデル作成	9
第3章	結果	10
3.1	PABPC1 および Paip2A とそれらの各変異体の精製	10
3.2	Paip2A は PABPC1 を poly(A)から解離させる	11
3.3	Paip2A のアミノ酸残基番号 26-83 番の領域が RRM1/2/3/4 と相互作用する	12
3.4	Poly(A)は PABPC1 の RRM2 および RRM3 に結合する	16
3.5	Paip2A は PABPC1 の RRM2 および RRM3 に結合する	19
3.6	RRM2 および RRM3 の poly(A)結合界面	26
3.7	Paip2A は RRM2 および RRM3 の poly(A)結合界面に結合する	41
第4章	考察	46
第5章	総括	51
5.1	結論	51
5.2	今後の展望	51

第1章 序論

1.1 Poly(A)結合タンパク質[Poly(A) binding protein C1 (PABPC1)]

真核細胞で合成された mRNA は、5 末端に cap が、3 末端に poly(A)が付加された後、細胞質へ輸送される (1)。Poly(A)が mRNA に付加されると翻訳が促進され、この機構は、poly(A)依存的翻訳と呼ばれる (2)。Poly(A)には、Poly(A)結合タンパク質 C1 (PABPC1) が複数分子結合し、poly(A)上に一次元の配列を形成し、PABPC1 分子あたり 24-27 塩基を認識している (3,4)。Poly(A)に結合した PABPC1 は、翻訳開始因子 eIF4G (5) や翻訳終結因子 eRF3 (6) などの様々な因子をリクルートすることにより、poly(A)依存性な翻訳において重要な役割を担っている。

PABPC1 の発現は、細胞やウイルスの増殖と正の相関がある。例えば、ヒトやマウスの心臓の細胞は生後すぐに増殖し、その間に PABPC1 の発現が亢進する。細胞の成長後は、細胞増殖が抑制され、PABPC1 の発現は減少する (7)。また、細胞増殖が活発な大腸がん細胞では、PABPC1 の mRNA の量が上昇している (8)。デングウイルス等のウイルスは、宿主細胞内の PABPC1 を利用してウイルス由来の RNA を翻訳し、その結果、ウイルスが増殖する (9)。また、サイトメガロウイルス感染細胞では PABPC1 が蓄積していることも報告されている (10)。

1.2 PABP interacting protein 2 A (Paip2A)

PABPC1 結合して翻訳を調節するタンパク質のうち、Paip2A は PABPC1 を poly(A)から解離させることで poly(A)依存的な翻訳を抑制する (11)。Paip2A の発現により、恒常的にがん化した NIH3T3 細胞の増殖が抑制されることや (12)、Paip2A の細胞内濃度が上昇すると、デングウイルスやサイトメガロウイルスの複製が抑制されることが知られている (9, 13)。このような Paip2A の機能は、Paip2A が PABPC1 を poly(A)から解離させる機構により達成されるものと考えられ、Paip2A による poly(A)からの PABPC1 の解離の分子機構が解明されれば、新たな抗がん剤や抗ウイルス剤を開発に繋がることを期待できる。

1.3 PABPC1 と Paip2A のドメイン構成と機能

PABPC1 は 636 残基の塩基性タンパク質で、分子量は 71 kDa である (図 1)。N 末端には 4 つの RNA 認識モチーフ (RRM) があり、それぞれが約 90 残基からなる。C 末端には 75 残基の PABC ドメインがあり、RRM と PABC の間は 170 残基のリンカー領域でつながっている (14)。RRM 領域は PABPC1 の poly(A)結合能を担っており、4 つの RRM (残基 1-370、以降、RRM1/2/3/4 と表記する) の poly(A)との相互作用の解離定数 (K_d) は約 0.15 nM であり、PABPC1 全長の K_d (0.69 nM) と同程度である(15)。これまでに、PABPC1 の RRM1 と RRM2 (残基 1-190、以降、RRM1/2 と表記する) と 9 塩基の poly(A) (A_9) の複合体の結晶構造が報告されており (16)、各 RRM は 2 つの α -ヘリックスと 4 本鎖の β -シートから構成されている。2 本の α -ヘリックスは β -シートの側面に位置し、poly(A) は α -ヘリックスの反対側で β -シート表面に結合する (16)。

Paip2A は 127 残基からなる分子量 15 kDa の酸性タンパク質で (図 1)、N 末端と C 末端にそれぞれ PABP-interacting motif 1 (PAM1) と PABP-interacting motif 2 (PAM2) という 2 つの PABPC1 相互作用モチーフを持っている (17)。Paip2A と PABPC1 との相互作用の K_d は約 0.66 nM と報告されている。PAM1 は主に PABPC1 の RRM2-RRM3 領域に結合する (17)。一方、PAM2 は PABPC1 の C 末端の PABC ドメインに結合し、その K_d は 74-400 nM である (17, 18)。PAM2-PABC 相互作用は Paip2A の機能にも関与しているが (18)、PAM1 と PAM2 の PABPC1 に対する K_d 値が 100 倍以上も違うことから、PABPC1 と Paip2A の結合には RRM 領域と PAM1 の相互作用が大きな役割を担っていることが示唆される。特に、RRM 領域が PABPC1 の poly(A) 結合を担っていることから、Paip2A が PABPC1 を poly(A) から解離させる機能には、PAM1 の RRM 領域への結合が重要な役割を果たしている (17)。

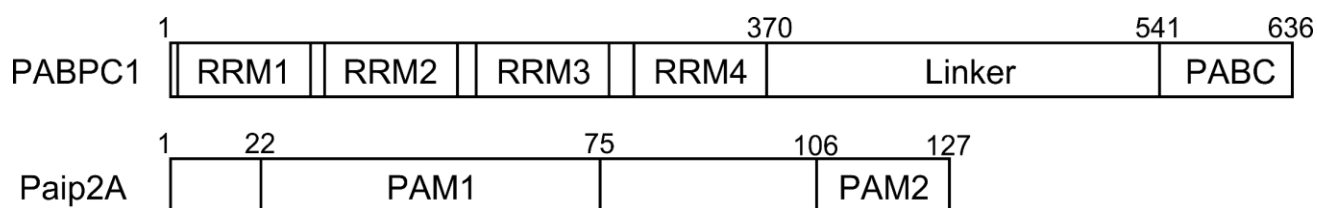


図 1. PABPC1 (14) と Paip2A (17) のドメイン構成

Poly(A) 結合タンパク質 (PABPC1) は 636 残基のタンパク質で、N 末端には 4 つの RNA 認識モチーフ (RRM) が存在する。11-89、99-175、191-268、294-370 番残基がそれぞれ RRM1、RRM2、RRM3、RRM4 である。C 末端にはリンカーと呼ばれる構造非形成領域と PABC (PABP C-terminal domain) がある。PABP-interacting protein 2A (Paip2A) は 127 残基のタンパク質であり、N 末に PABP-interacting motif 1 (PAM1) を、C 末に PABP-interacting motif 2 (PAM2) を持つ。

1.4 本研究の目的

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、Paip2A 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。

1.5 研究の概要

まず、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて、調製した Paip2A の活性確認を行った。24 塩基の poly(A) (A₂₄) [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 A₂₄ 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。

次に、核磁気共鳴分光法 (NMR) による Paip2A と RRM1/2/3/4 の相互作用解析を行った。[²H, ¹⁵N] Paip2A に対して RRM1/2/3/4 を滴定し、RRM1/2/3/4 の滴定に伴う [²H, ¹⁵N] Paip2A の ¹H-¹⁵N 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。

次に、等温滴定カロリーメトリー (ITC) による poly(A) と RRM と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。

次に、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。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。

次に、[¹⁵N] Paip2A(25-83) に対する RRM2 および RRM3 の NMR 滴定実験を行い、¹H-¹⁵N 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。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、Paip2A(25-83) の N 末端側が RRM3 に、C 末端側が RRM2 との相互作用に関与することが示唆された。

次に、NMR にて、poly(A) の添加に伴う RRM2/3 の ¹H-¹⁵N 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、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おり、RRM2/3 の各 RRM の β シート側に poly(A) が結合することが示唆された。

次に、NMR にて、Paip2A(25-83) の添加に伴う RRM2/3 の ¹H-¹⁵N 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、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おり、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) が結合することが示唆された。

最後に、本研究で得られた結果をもとに、Paip2A による poly(A) からの PABP 解離の構造メカニズムについて考察した。

第2章 方法

2.1 タンパク質の発現と精製

ヒトPABPC1全長(残基番号1-636)およびその変異体であるRRM1/2/3/4(残基番号1-370)、RRM1(残基番号1-99)、RRM4(残基番号290-371)をコードするDNA配列をpET-42b(+)ベクター(Novagen、Madison、WI、USA)に挿入した。ヒトPABPC1の変異体[RRM2/3(残基番号100-289)、RRM2(残基番号100-190)、RRM3(残基番号191-289)]をpGEX-6p-1ベクター(Cytiva, Little Chalfont, UK)に挿入した。また、ヒトPaip2A全長(残基1-127)およびその変異体であるPaip2A(25-83)をコードするDNA配列をpGEX-6p-1ベクター(Cytiva)に挿入した。

各タンパク質はGST融合タンパク質を大腸菌に発現させ、Glutathione-Sepharose 4 Bカラム(Cytiva)を用いて精製し、その後、Factor Xa(Novagen)、または、Precision Protease(Cytiva)でGSTタグを切断した。切断されたGSTと非切断の融合タンパク質をGlutathione-Sepharose 4 Bカラムで除去した。分解産物は陽イオン交換カラム(PABPC1およびRRM1/2/3/4はHiTrap SP HP、RRM2/3、RRM1、RRM2、RRM3、RRM4はMONO Sを使用して除去。Cytiva)または陰イオン交換カラム[Paip2AおよびPaip2A(25-83)はRESOURCE Q, Cytiva]を使用し、その後、ABPC1、RRM1/2/3/4、Paip2A、Paip2A(25-83)は、HiLoad 16/600 Superdex 75 pg(Cytiva)にてゲルろ過精製した。Paip2Aの分子量は、AXIMA-CFR Plus質量分析計(島津製作所)を用いたMALDI-TOF質量分析によって確認された。NMR実験用の均一¹⁵N標識、または、¹³C、¹⁵N標識タンパク質は、¹⁵NH₄Clまたは¹⁵NH₄Clと¹³C₆-グルコースを含むM9最小培地で大腸菌宿主細胞を培養することにより発現させた。²H、¹⁵N標識タンパク質は、¹⁵NH₄Clを含む²H₂OのM9最小培地中で大腸菌宿主細胞を増殖させることにより発現させた。²H、¹³C、¹⁵N標識タンパク質は、¹⁵NH₄Clと¹³C₆-グルコースを含む²H₂OのM9最小培地中で大腸菌宿主細胞を増殖させることにより発現させた。これらの同位体標識タンパク質は、非標識タンパク質に使用したのと同様の手順で精製した。

2.2 表面プラズモン共鳴法

SPR実験はBiacoreX 100(Cytiva)を用いて298Kで行った。ランニングバッファーには、10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 5% (v/v) グリセロール, (pH 7.4)を用いた。5'-ビオチン化したA₂₄をストレプトアビジンセンサーチップ上に30 μL/minの流速で固定化した。精製したPABPC1全長、RRM1/2/3/4、Paip2A(FL)をランニングバッファーに対してダイアライザーで透析した。次に、128 nMのPABPC1またはRRM1/2/3/4を5 μL/minの流速で180秒間注入し、同じ流速で300秒間センサーチップ上にランニングバッファーを流し、次に1、10、100、1000 nM Paip2Aを同じ流速で180秒間注入し、0.05% SDS溶液を用いて表面を再生した。すべてのサンプルはフローセルの非固定化表面上を流れ、その応答をリファレンスとして使用した。

2.3 NMR解析

データはBruker Avance 500, 600, 800 spectrometer (Billerica, MA, USA) で、三重共鳴測定またはクライオプローブを用いて収集した。各スペクトルはBruker TopSpin 4.0.8 ソフトウェアを使用して処理し、データはSparky (T. D. Goddard and D. G. Kneller, Sparky 3, University of California, San Francisco, CA) を使用して解析した。

^2H , ^{15}N 標識 Paip2A(FL) と非標識 RRM1/2/3/4の滴定実験、 ^2H , ^{15}N 標識 Paip2A(25-83) と非標識 RRM1/2/3/4またはRRM2/3 の滴定実験では ^1H - ^{15}N transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) を測定した。 ^{15}N 標識 Paip2A(25-83) と非標識 RRM2 と RRM3 の滴定実験では ^1H - ^{15}N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) スペクトルを測定した。 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識 Paip2A(25-83) と非標識 RRM2/3 の化学シフト摂動 (CSP) 解析には、 ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルを用いた。上記の実験はすべて、18 mM KH_2PO_4 (pH 6.0), 90 mM NaCl, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ を含む緩衝液中、298 Kで行われた。 ^{15}N 標識 RRM2/3 と非標識 Paip2A(25-83) および非標識 A_{12} の滴定実験では、18 mM NaH_2PO_4 (pH 6.5), 135 mM NaCl, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ を含むバッファーを用い、303Kで ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。また、化学シフトの変化は、以下の式で計算した。

$$\delta = \sqrt{\Delta_{1\text{H}}^2 + (\Delta_{15\text{N}}/6.5)^2} \quad (1)$$

ここで、 $\Delta_{1\text{H}}$ と $\Delta_{15\text{N}}$ はそれぞれ ^1H と ^{15}N の方向の化学シフト変化量である。

Paip2A(FL) の主鎖アミドシグナルはHNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCO, HNCA, HN(CO)CA を用い、Paip2A(25-83) の主鎖アミドシグナルは ^{15}N edited TOCSY-HSQC と ^{15}N edited NOESY-HSQC 実験を用いて帰属した。RRM2/3 に結合した Paip2A(25-83) の主鎖アミドシグナルの帰属は、TROSY タイプの HNCA と HN(CO)CA、および、 ^{13}C β 情報を得るための2次元版 (^{13}C - ^1H plane) HN(CA)CB と HN(COCA)CB 実験により行った。上記の実験はすべて、18 mM KH_2PO_4 (pH 6.0), 90 mM NaCl, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ を含むバッファー中、298 Kで行われた。RRM2 と RRM3 の主鎖連鎖帰属はHNCACB, CBCA(CO)NH, CC(CO)NH, ^{15}N -edited NOESY-HSQC, ^{15}N -edited NOESY-HSQC を用いて行った。RRM2/3 および A_{12} との複合体の主鎖アミドシグナルの帰属は、HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA, HN(CO)CA を用いて行った。RRM2/3 の主鎖アミドシグナルの帰属については Paip2A(25-83) と複合体になっているかどうかを、HNCA と HN(CO)CA のスペクトルを解析して判断しようとしたが、いくつかのシグナルの線幅が広がっており、連鎖帰属は不可能であることが分かった。上記の実験はすべて、18 mM NaH_2PO_4 (pH 6.5), 135 mM NaCl, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ を含むバッファーを用い、303 Kで行った。

なお、Paip2A, Paip2A(25-83), RRM2, RRM3, RRM2/3, RRM2/3- A_{12} , RRM2/3-Paip2A(25-83), Paip2A(25-83)-RRM2/3 の ^1H , ^{13}C , ^{15}N 化学シフト値は Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB ID) に登録した。Paip2A は 26314、Paip2A(25-83) は 26315、Paip2A(25-83)-RRM2/3 複合体は 26323、RRM2 は 26316、RRM3 は 26317、RRM2/3 は 26318、RRM2/3- A_{12} 複合体は 26319、RRM2/3-Paip2A(25-83) 複合体は 26320 の ID で、BMRB に登録されている。

2.4 ¹⁵N 緩和実験

A₁₂ 非存在下および A₁₂ 存在下での RRM2/3 の回転相関時間 (τ_c) は、以下の式により算出した (19)。

$$\tau_c = \frac{1}{2\omega_N} \times \sqrt{\frac{6T_1}{T_2} - 7}$$

ここで、 τ_c [ns] は回転相関時間、 ω_N [1/s] は ¹⁵N のラーモア周波数、 T_1 [ms] は ¹⁵N スピン-格子緩和時間、 T_2 [ms] は ¹⁵N スピン-スピン緩和時間である。さらに、 ω_N は以下の式で算出した。

$$\omega_N = \gamma_N \times B_0$$

ここで、 γ_N ($= -27.126188 \times 10^6$ [s⁻¹ T⁻¹]) は ¹⁵N の磁気回転比、 B_0 ($= 14.09$ T) は ¹H の共鳴周波数 600 MHz の装置を使用した場合の外部磁場である。 γ_N が負の値であるため、 ω_N も負の値である。従って、 τ_c の計算では、 ω_N の絶対値を用いた。

実験は、18 mM NaH₂PO₄ (pH 6.5), 135 mM NaCl, 10% ²H₂O のバッファー条件で、303 K で行った。スペクトルは Bruker TopSpin 4.0.8 ソフトウェアで処理し、データは Sparky で解析した。

2.5 等温滴定カロリメトリー (ITC)

Paip2A(25-83)または poly(A)の各 RRM への結合は、ITC (20) および MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Instruments, Malvern, UK) を用いて測定した。すべてのサンプルは、10 mM Na₂HPO₄ (pH7.4), 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl のバッファー条件で調製された。実験は 25 °Cで行った。RRM1 (9.2 μM)、RRM2 (211 μM)、RRM3 (50 μM)、RRM4 (26 μM)、および RRM2/3 (50 μM) に対し、poly(A) (A₇) (それぞれ 98 μM, 2.3 mM, 570 μM, 260 μM, 459 μM) を滴定した。Poly(A) (A₁₂) (349 μM, 27 μM, 0.99 μM) に対し、RRM2 (8.1 mM)、RRM3 (525 μM)、RRM2/3 (10.3 μM) を滴定した。Paip2A(25-83) (5、20、20、5、0.95 μM) に対しそれぞれ RRM1 (50 μM)、RRM2 (211 μM)、RRM3 (200 μM)、RRM4 (50 μM)、および RRM2/3 (9.7 μM) を滴定した。インジェクタントの希釈熱は、インジェクタントをバッファーに滴定し、その後、MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (Malvern) を使用して分析する前に、各滴定データから差し引いた。カーブフィッティングには、「One Set of Sites」モデルを適用した。各熱力学パラメータは、フィットしたデータから誤差値とともに算出された。

2.6 Poly(A)の定量

Poly(A)のモル濃度は、Lambert-Beer の法則に基づき、260 nm の紫外吸収を測定することで評価した。

$$c(A_n) = \text{Abs}_{260} / \epsilon_n l \quad (2)$$

ここで、 c (A_n) は A_n [n 塩基からなる poly(A)] のモル濃度、 Abs_{260} は波長 260 nm の紫外線の吸光度、 ϵ_n はモル吸光係数、 l は 1 cm の光路長であり、 ϵ_7 は最近接法により算出し、 ϵ_7 は 87100 (L/mol·cm)、 ϵ_{12} は 146900 (L/mol·cm)、 ϵ_{24} は 290420 (L/mol·cm) であった。

2.7 RRM3のホモロジーモデルの作成

RRM3 のホモロジーモデルは MODELLER (21) を用いて作成した。RRM2 配列に対応する PABPC1 のアミノ酸配列 (95-179番) を鋳型配列とし、RRM3 配列に対応する PABPC1 のアミノ酸配列 (187-272番) をターゲット配列とした。鋳型の原子座標には、RRM1/2-poly(A) [PDB code: 1CVJ (16)]の結晶構造を用いた。

第三章 結果

3.1 PABPC1 および Paip2A とそれらの各変異体の精製

本研究で用いた各タンパク質の発現・精製は、「第二章 方法」に記載の手法にて行った。ここでは、最終精製の結果を示す(図2)。収量は、LB 培地 1L あたり、(a) PABPC1 が 4 mg、(b) RRM1/2/3/4 が 4 mg、(c) RRM2/3 が 13 mg、(d) RRM1 が 4 mg、(e) RRM2 が 6 mg、(f) RRM3 が 3 mg、(g) RRM4 が 5 mg、(h) Paip2A が 1 mg、(i) Paip2A(25-83)が 0.4 mg であった。

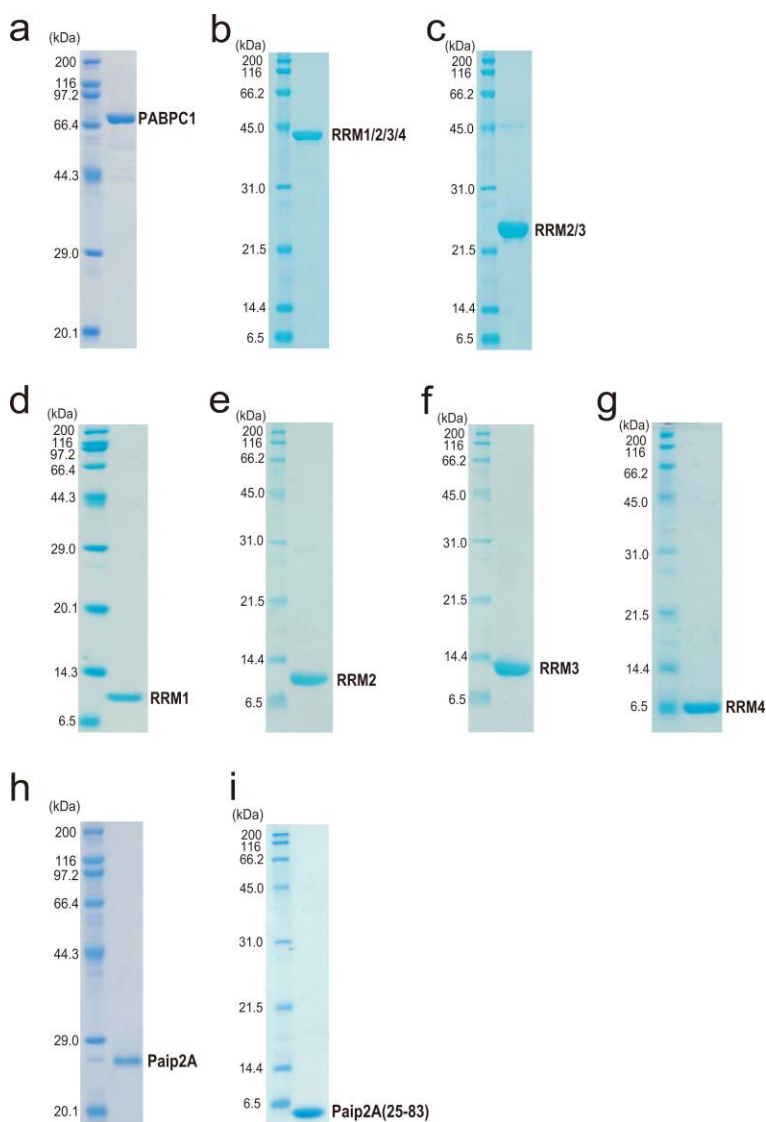


図2. 調製したタンパク質の SDS-PAGE

(a) PABPC1、(b) RRM1/2/3/4、(c) RRM2/3、(d) RRM1、(e) RRM2、(f) RRM3、(g) RRM4、(h) Paip2A、(i) Paip2A(25-83)。

3.2 Paip2A は PABPC1 を poly(A) から解離させる

ヒト PABPC1 と RRM1/2/3/4 の poly(A) に対する結合親和性は、当研究室の先行研究にて、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて、すでに明らかにされており、鎖長 24 塩基の poly(A) (A_{24}) に対する K_d は PABPC1 と RRM1/2/3/4 で、それぞれ 0.69 nM および 0.15 nM であった (15)。 K_d が同等であることから、PABPC1 の poly(A) への結合親和性は、主に RRM1 から RRM4 までの領域が担っていることがわかった。

ここでは、ヒト Paip2A 全長 [以下、Paip2A(FL) と表記する] を発現・精製し (図 2a, b, h)、SPR を用いて、調製した Paip2A が PABPC1 または RRM1/2/3/4 を A_{24} から解離させる活性を持つかどうかを検討した。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 (図 3a, b)。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 (図 3a, b)。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。

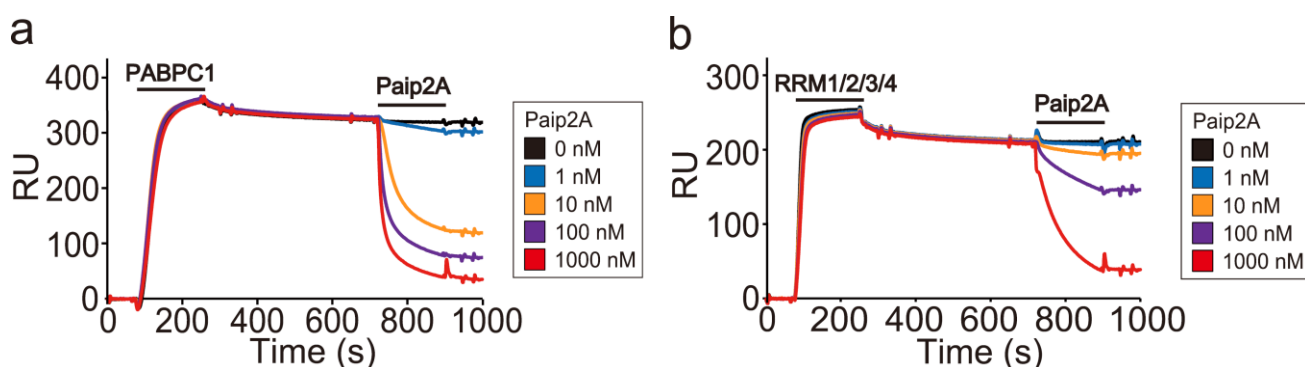


図 3. 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による、調製した Paip2A(FL) が PABPC1 と RRM1/2/3/4 を poly(A) から解離させる活性を持つことの確認。

5' 末端をビオチン化した A_{24} をストレプトアビジンセンサーチップに固定化した。128 nM PABPC1 (a) と RRM1/2/3/4 (b) (81–260 s) と Paip2A(FL) (721–900 s) の添加時間はセンサーグラムの上部に示した直線で表されている。

3.3 Paip2A のアミノ酸残基番号 26–83 番の領域が PABPC1 の RRM1/2/3/4 と相互作用する

PABPC1 の poly(A)結合能は RRM1/2/3/4 が担っていることから、溶液 NMR 法を用いて Paip2A(FL)と RRM1/2/3/4 の相互作用を解析した。まず、均一 ^{13}C , ^{15}N 標識した Paip2A(FL)の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを観測し、三重共鳴実験により、98 個の主鎖アミドシグナル（観測される主鎖アミドシグナルの理論値 123 個のうちの 80%）を帰属した（図 4a）。観測されているが帰属のつかないシグナルは 16 個であった。また、主鎖アミドシグナルの ^1H の化学シフト値が 7.8-8.6ppm と狭い範囲で分散していること、および、Paip2A(FL)のケミカルシフトインデックス（図 5）(22) から、Paip2A が天然変性タンパク質であることが強く示唆された。

次に、均一 ^2H , ^{15}N 標識 Paip2A(FL)に RRM1/2/3/4 を滴定して ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルを観測したところ、大きなスペクトル変化が見られた（図 4b, 図 6）。1.0-1.25 等量の RRM1/2/3/4 の添加時は、53 個の Paip2A(FL)のシグナルは強度が低下し、消失した。新たに 41 のシグナルが観測され、12 個のシグナルは未帰属であったが側鎖の ^1H と ^{13}C の化学シフト値からグルタミン酸由来であることがわかった。新たに観測された 51 個のシグナルは、 ^1H 軸方向の化学シフト値が 7.4 ppm より小さい、または、8.6 ppm より大きかった（図 4b, 図 6）。さらに、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 (Perturbed)」シグナルとみなした（図 4c）。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（図 4c）、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。

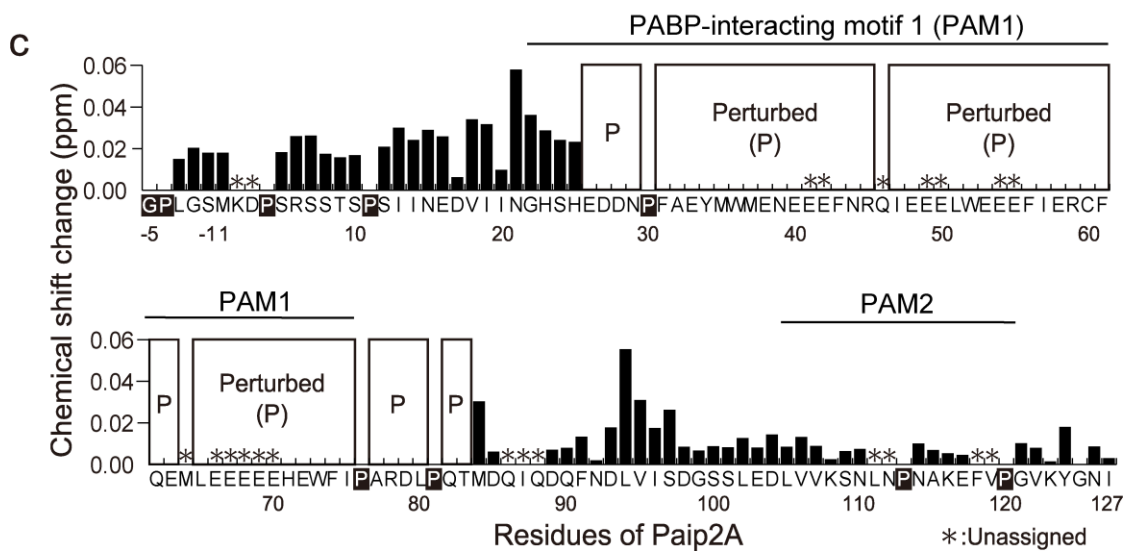
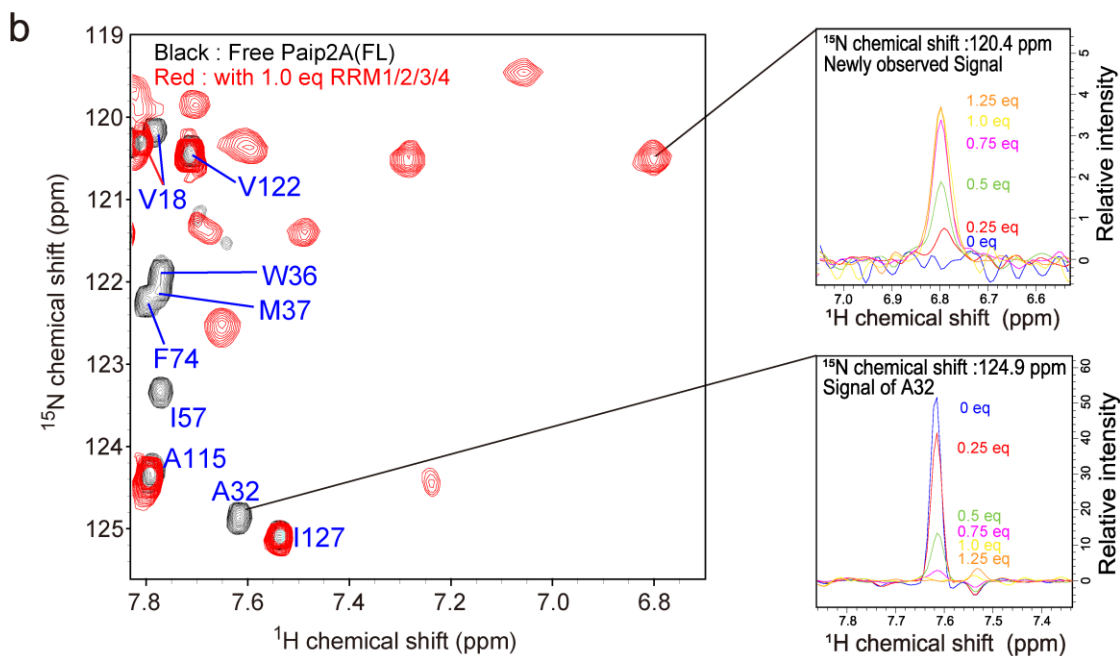
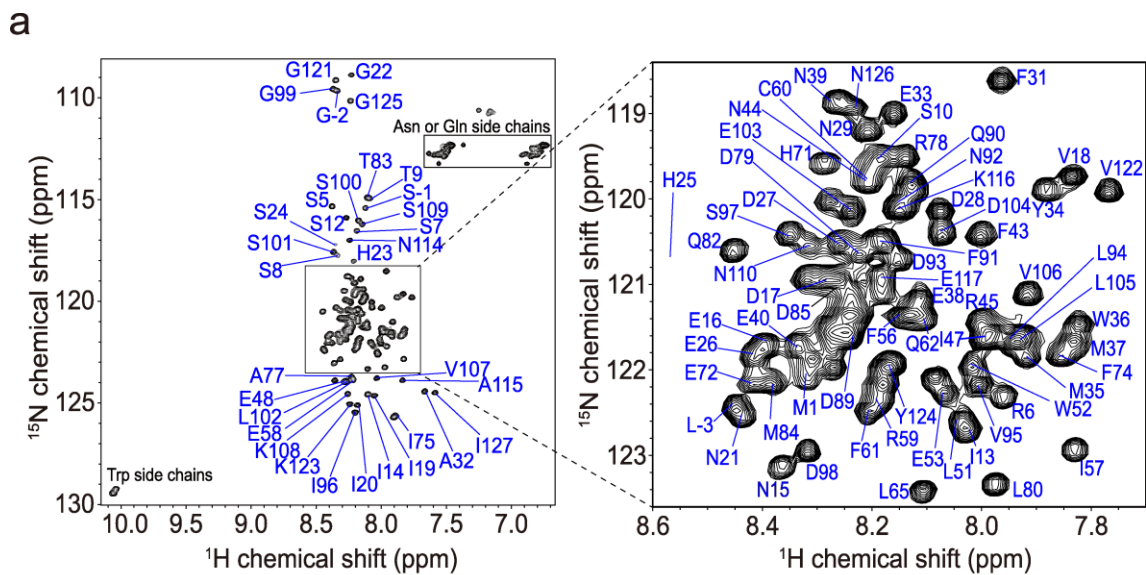


図 4. RRM1/2/3/4 添加による Paip2A(FL) の NMR スペクトルの変化

(a) ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上に観測された Paip2A(FL) の主鎖アミドシグナルの帰属。(b) 非標識 RRM1/2/3/4 の存在下 (赤) および非存在下 (黒) における ^2H , ^{15}N 標識 Paip2A(FL) の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルの重ね合わせ。左上の図は、各等量数 (eq) の RRM1/2/3/4 を添加した際の A32 のシグナルの断面図である。左下の図は、RRM1/2/3/4 の添加により現れた未帰属のシグナルを示す。RRM1/2/3/4 の当量番号は、各図に青 (0 当量)、赤 (0.25 当量)、緑 (0.5 当量)、紫 (0.75 当量)、黄 (1.0 当量)、オレンジ (1.25 当量) として色分けして示している。(c) Paip2A(FL) の各残基の化学シフト変化。「Perturbed (P)」は、RRM1/2/3/4 添加後にシグナルが消失し、異なる位置に出現した残基を示す。なお、化学シフトの変化量は、以下の式で算出した。

$$\delta = \sqrt{\Delta_{1\text{H}}^2 + (\Delta_{15\text{N}}/6.5)^2}$$

ここで、 $\Delta_{1\text{H}}$ と $\Delta_{15\text{N}}$ はそれぞれ ^1H と ^{15}N の方向での化学シフト変化量である。

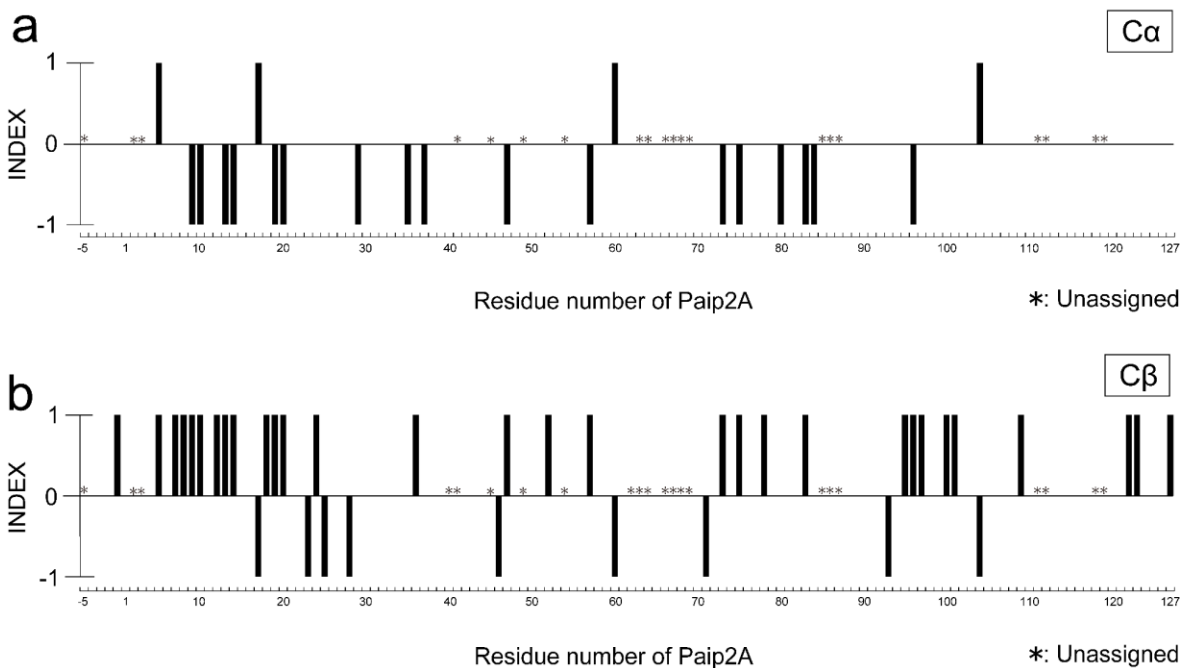


図 5. Paip2A(FL) の $\text{C}\alpha$ (a) と $\text{C}\beta$ (b) のケミカルシフトインデックス (22)

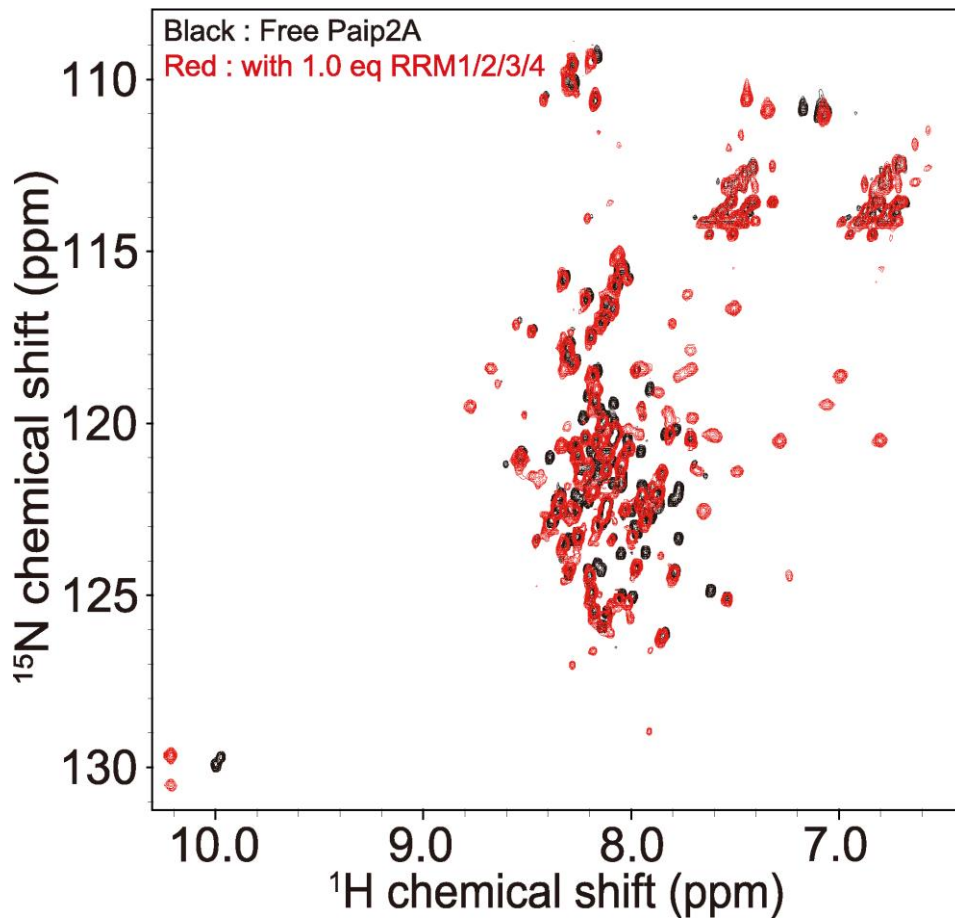


図 6. RRM1/2/3/4 の存在下 (赤) と非存在下 (黒) における ^2H , ^{15}N 標識 Paip2A(FL) の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルの重ね合わせ

3.4 Poly(A)は PABPC1 の RRM2 および RRM3 に結合する

Poly(A)と Paip2A の各 RRM との結合親和性を比較するために、単離した各 RRM を用いて ITC 解析を実施した。解析には、RRM1-2 リンカーを含む RRM1 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 1-99)、RRM2-3 リンカーを含む RRM2 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 100-190)、RRM3-4 リンカーを含む RRM3 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 191-289)、RRM4 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 290-371)、Paip2A(25-83) (Paip2A のアミノ酸残基番号 25-83) を用いた (図 2d-g, i)。また、Paip2A(25-83)のケミカルシフトインデックス (図 7) (22)から、Paip2A(25-83)が天然変性タンパク質であることが示唆された。

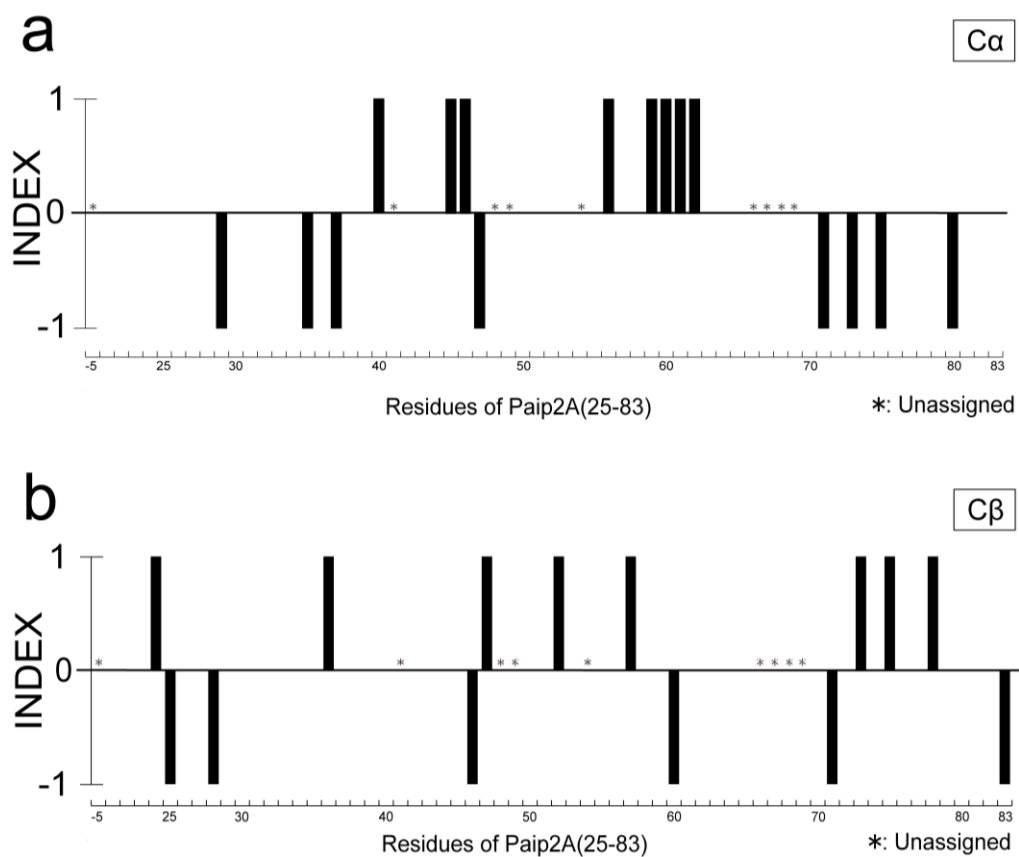


図 7. Paip2A(25-83)の C α (a)と C β (b)のケミカルシフトインデックス (22)

まず、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 (図 8a-d)。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 (図 8b, 8c、および、表 1)。さらに、PABPC1 の RRM2 から RRM3 までの領域 (RRM2/3 ; PABPC1 のアミノ酸残基番号 100-289、図 2c) の A_{12} 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 (図 8h および表 1)、これは PABPC1- A_{24} 相互作用の K_d (0.69 nM) (15) 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。

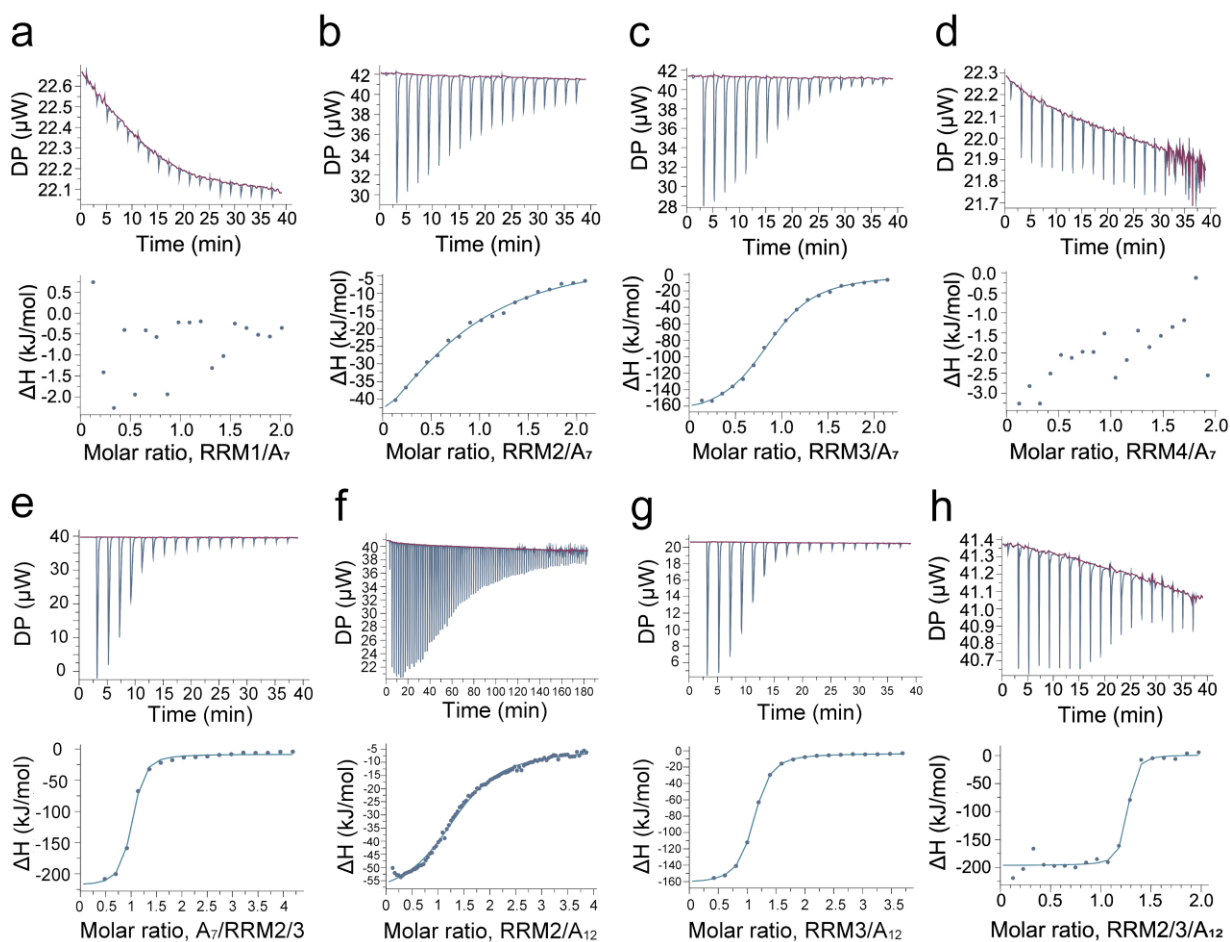


図 8. PABPC1 の RRM と poly(A) の相互作用の ITC 解析

各 RRM [(a) RRM1, (b) RRM2, (c) RRM3, (d) RRM4] と A_7 , (e) RRM2/3 と A_7 , (f) RRM2 と A_{12} , (g) RRM3 と A_{12} , (h) RRM2/3 と A_{12} との相互作用の ITC 解析。(上段) (a) - (e) RRM を含むセルへの A_7 の $2\text{-}\mu\text{L} \times 19$ 滴定の thermogram, (f) A_{12} を含むセルへの RRM2 の $0.4\text{-}\mu\text{L} \times 91$ 滴定の thermogram, (g) A_{12} を含むセルへの RRM3 の $2\text{-}\mu\text{L} \times 19$ 滴定の thermogram, および (h) A_{12} を含むセルへの RRM2/3 の $2\text{-}\mu\text{L} \times 19$ 滴定の thermogram。(下段) 実験から得られた結合等温線を、one Set of Sites モデルを用いて適合させた。ベストフィット (実線) から得られたパラメータと、フィットから計算された誤差の値を表 1 にまとめた。

表 1. ITC による単独の各 RRM および RRM2/3 の A₇ および A₁₂ との相互作用解析

N は poly(A) に対する RRM の結合比、*K_d* は解離定数、 ΔH はエンタルピー変化、 ΔG はギブズ自由エネルギー変化、 ΔS はエントロピー変化を表す。

Poly(A)	RRM	<i>N</i> *	<i>K_d</i> (M)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
A ₇	RRM1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	RRM2	1.4 ± 0.1	(2.0 ± 0.4) × 10 ⁻⁴	-6.0 × 10	-21	-0.13
	RRM3	1.2	(4.7 ± 0.3) × 10 ⁻⁶	-1.5 × 10 ²	-30	-0.41
	RRM4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	RRM2/3	0.92 ± 0.01	(7.1 ± 1) × 10 ⁻⁷	-2.1 × 10 ²	-35	-0.59
A ₁₂	RRM2	1.4	(7.0 ± 0.3) × 10 ⁻⁵	-6.0 × 10	-24	-0.11
	RRM3	1.0	(5.2 ± 3) × 10 ⁻⁷	-1.6 × 10 ²	-36	-0.41
	RRM2/3	1.1	(1.3 ± 0.6) × 10 ⁻⁹	-2.0 × 10 ²	-51	-0.49

3.5 Paip2A は PABPC1 の RRM2 および RRM3 に結合する

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 (図 9a-d)。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 値はそれぞれ $4.0 \mu\text{M}$ と $1.3 \mu\text{M}$ となり、ストイキオメトリーは 1:1 となった (図 9b, c, および表 2)。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 (図 9e, 表 2)、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 (17)。

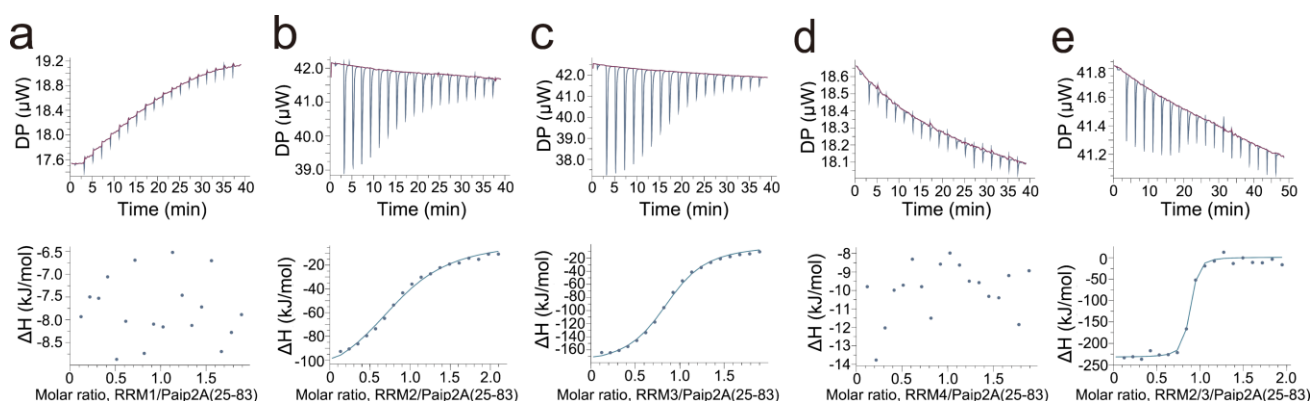


図 9. PABPC1 の RRM と Paip2A (25-83) の相互作用の ITC 解析

ITC による Paip2A (25-83) と (a) RRM1, (b) RRM2, (c) RRM3, (d) RRM4, (e) RRM2/3 の相互作用解析の結果。(上図) Paip2A (25-83) を含むセルへの RRM の $2\text{-}\mu\text{L} \times 19$ 回の滴定の thermogram。(下段) 実験から得られた統合結合等温線を、one Set of Sites モデルを用いてフィッティングした。ベストフィット (実線) から得られたパラメータを、フィッティングから算出した誤差値とともに表 2 にまとめた。

表 2. ITC による RRM と Paip2A (25-83) の相互作用解析

N は Paip2A (25-83) に対する RRM の結合比、 K_d は解離定数、 ΔH はエンタルピー変化、 ΔG はギブズ自由エネルギー変化、 ΔS はエントロピー変化を表す。

RRM	N^*	K_d (M)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
RRM1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RRM2	0.87 ± 0.03	$(4.0 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	-1.2×10^2	-31	-0.31
RRM3	0.87	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	-1.8×10^2	-34	-0.50
RRM4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RRM2/3	0.83	$(1.9 \pm 0.6) \times 10^{-9}$	-2.3×10^2	-50	-0.61

さらに、4つのRRMのうちPaip2との結合に主として関与するRRMがRRM2とRRM3で十分であるかを調べるために、1.1当量のRRM2/3を添加した ^2H , ^{15}N -Paip2A(25-83)の ^1H - ^{15}N TROSYスペクトルを、RRM1/2/3/4を添加したものと比較した(図10)。RRM2/3が結合したPaip2A(25-83)の主鎖アミドシグナルの帰属の結果、Paip2A(25-83)のN末端領域(残基番号25-29、31、32、34-41、43-48)のシグナルはよく重なっていたが、Paip2A(25-83)のC末端領域(残基番号49-52、57、58、60-65、73-75、77、78、80、82、83)のシグナルにはわずかに違いがあることがわかった。このわずかな違いは、RRM2の配列の違いによるものと考えられ、RRM2/3ではN末端にクローニングアーティファクト(GPLGS)が存在しているが、RRM1/2/3/4ではRRM1とRRM2の間にリンカーがある。しかし、全体的にスペクトルがよく重なることから、PABPC1のRRM2-RRM3領域が主にPaip2Aとの結合に関与していることが分かった。

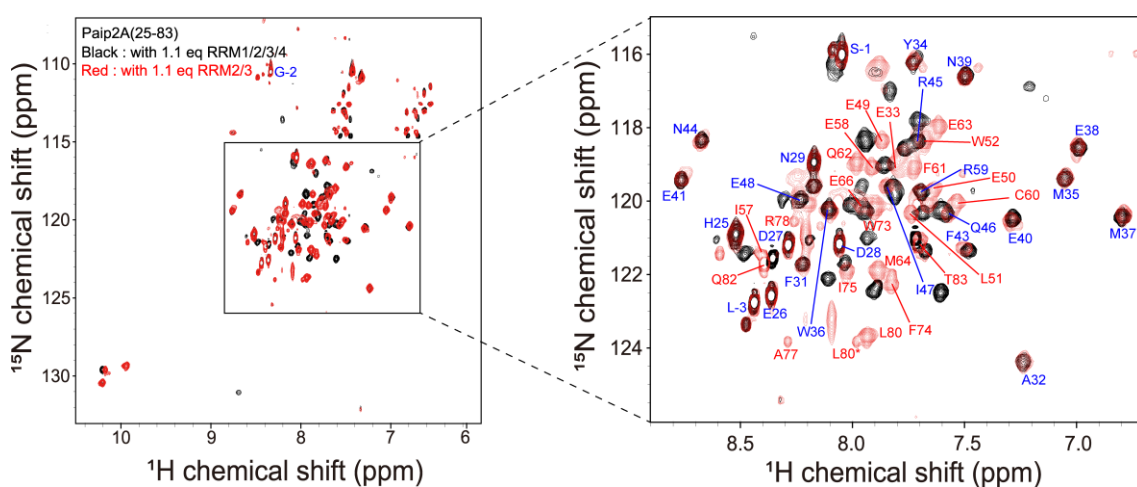


図10. RRM1/2/3/4(黒)とRRM2/3(赤)存在下でのPaip2A(25-83)の ^1H - ^{15}N TROSYスペクトルの重ね合わせ

この2つのスペクトル間でよく重なっているシグナルを青で、それ以外のシグナルを赤で表示している。

特に、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識した Paip2A(25-83)と RRM2/3 との複合体の三重共鳴スペクトルは線幅が広がっており、830 μM という高濃度のサンプルを用いても、HNCA と HN(CO)CA のスペクトルで広幅化した $^{13}\text{C}\alpha$ のシグナルを観測するには高感度クライオプローブを装備した 800 MHz の NMR 装置で、64 回もの積算が必要であった。このような広幅化による感度低下から、Paip2A(25-83)-RRM2/3 複合体内の局所的なコンフォメーション交換の存在が示唆された。

複合体の帰属の結果 (図 11a) を用いて、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たことが分かった。図 11b に示すように、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)のアミノ酸残基番号 31-79 に相当するシグナルがどちらの 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 ^{15}N 標識 Paip2A(25-83)の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。図 11c, 11d および図 12 はそれぞれ単独の RRM2 と RRM3 を加えた後のスペクトルの変化を示しており、単独の RRM2 と RRM3 の結合により Paip2A は異なる領域が摂動を受けるが、摂動を受けたシグナルに相当する残基は一部重複していることが示された。

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 (図 11e)。特に、RRM2 結合状態または RRM3 結合状態の Paip2A(25-83)の ^1H - ^{15}N 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 (図 13a および図 13b)。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。これは、Paip2A(25-83)結合 RRM2 と RRM3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを重ね合わせても、Paip2A(25-83)結合 RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを再現できなかったことに矛盾しない (図 13c)。このように、単離された RRM2 と RRM3 は、Paip2A の中央部 (残基番号 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。

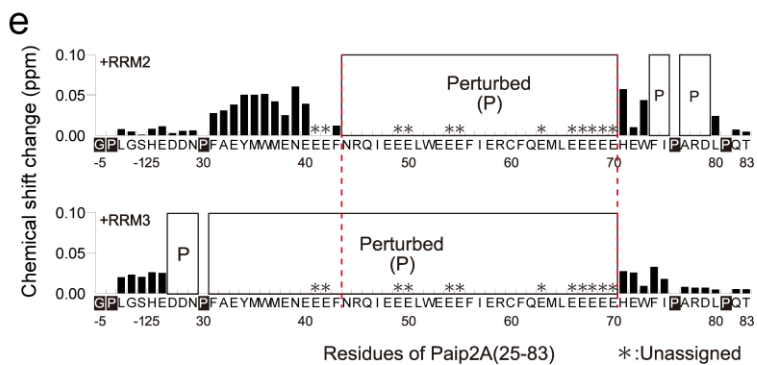
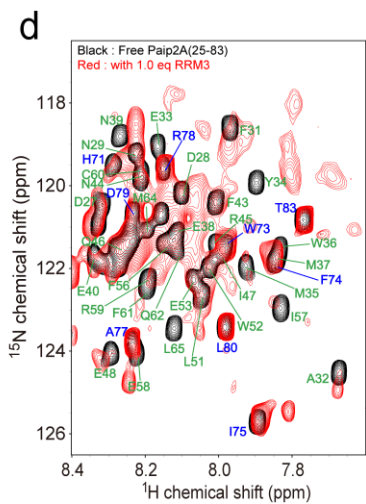
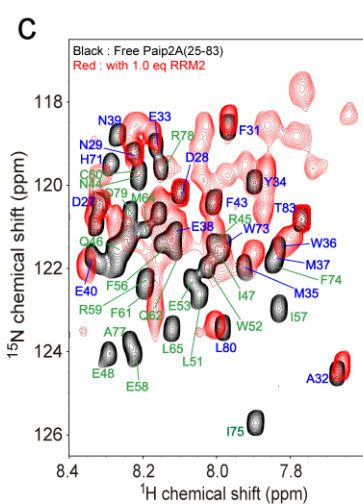
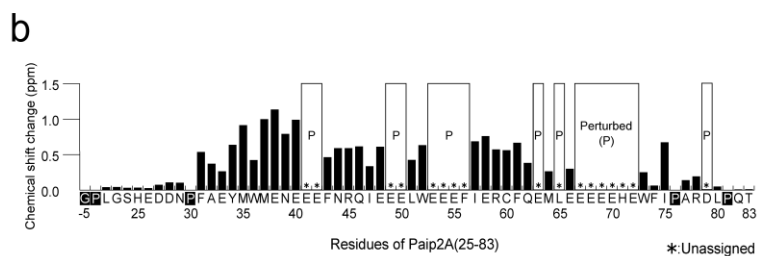
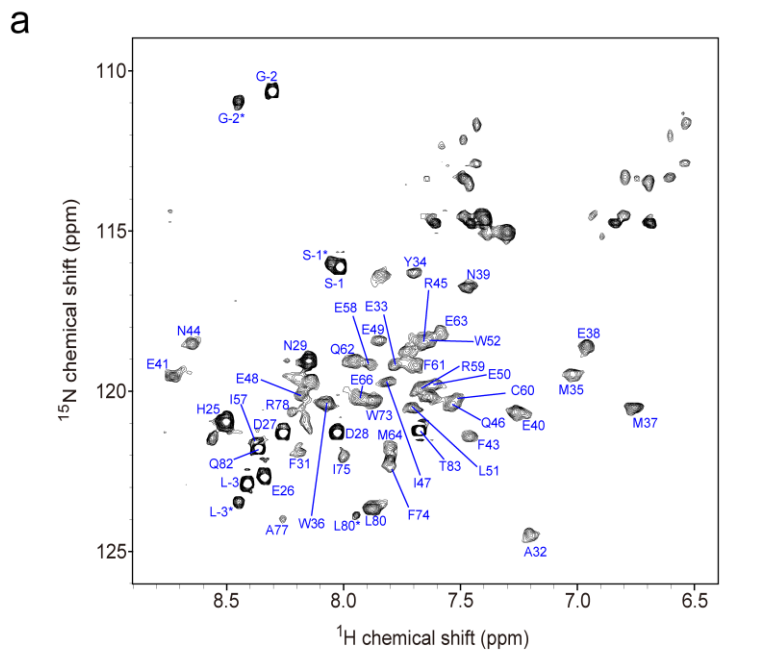


図 11. RRM2/3、RRM2、RRM3 滴定時の Paip2A (25-83) の化学シフト摂動 (CSP) 解析

(a) RRM2/3 に結合した [^2H , ^{13}C , ^{15}N] Paip2A (25-83) の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルの主鎖アミドシグナルを帰属した。L-3*, G-2*, S-1*, L80*はプロリンのシス異性体に由来する。(b) RRM2/3 に結合した Paip2A (25-83) の各残基の化学シフト変化。化学シフトの変化量は以下の式で計算した。

$$\delta = \sqrt{\Delta_{1\text{H}}^2 + (\Delta_{15\text{N}}/6.5)^2}$$

ここで、 $\Delta_{1\text{H}}$ と $\Delta_{15\text{N}}$ はそれぞれ ^1H と ^{15}N の方向での化学シフトの変化量である。アスタリスクは未帰属の残基を示す。Perturbed (P) で示した部分は、RRM2/3 添加後、その残基のシグナルが消失したことを示す。 ^{15}N 標識した Paip2A (25-83) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを、(c) RRM2、(d) RRM3 非存在下 (黒)、存在下 (赤) で重ね合わせた。変化したシグナルは緑、変化していないものは青で示されている。(e) RRM2 (上) または RRM3 (下) 添加後の Paip2A (25-83) の化学シフトの変化を残基番号に対してプロットしたものである。残基 44-70 と 74-79 からのシグナルは RRM2 を添加した後に摂動を受け、残基 27-70 からのシグナルは RRM3 を添加した後に摂動を受けた。残基 44-70 は RRM2 または RRM3 を添加した後に摂動を受けた。化学シフトの変化は以下の式で計算した。

$$\delta = \sqrt{\Delta_{1\text{H}}^2 + (\Delta_{15\text{N}}/6.5)^2}$$

ここで、 $\Delta_{1\text{H}}$ と $\Delta_{15\text{N}}$ はそれぞれ ^1H と ^{15}N の方向での化学シフト変化量である。

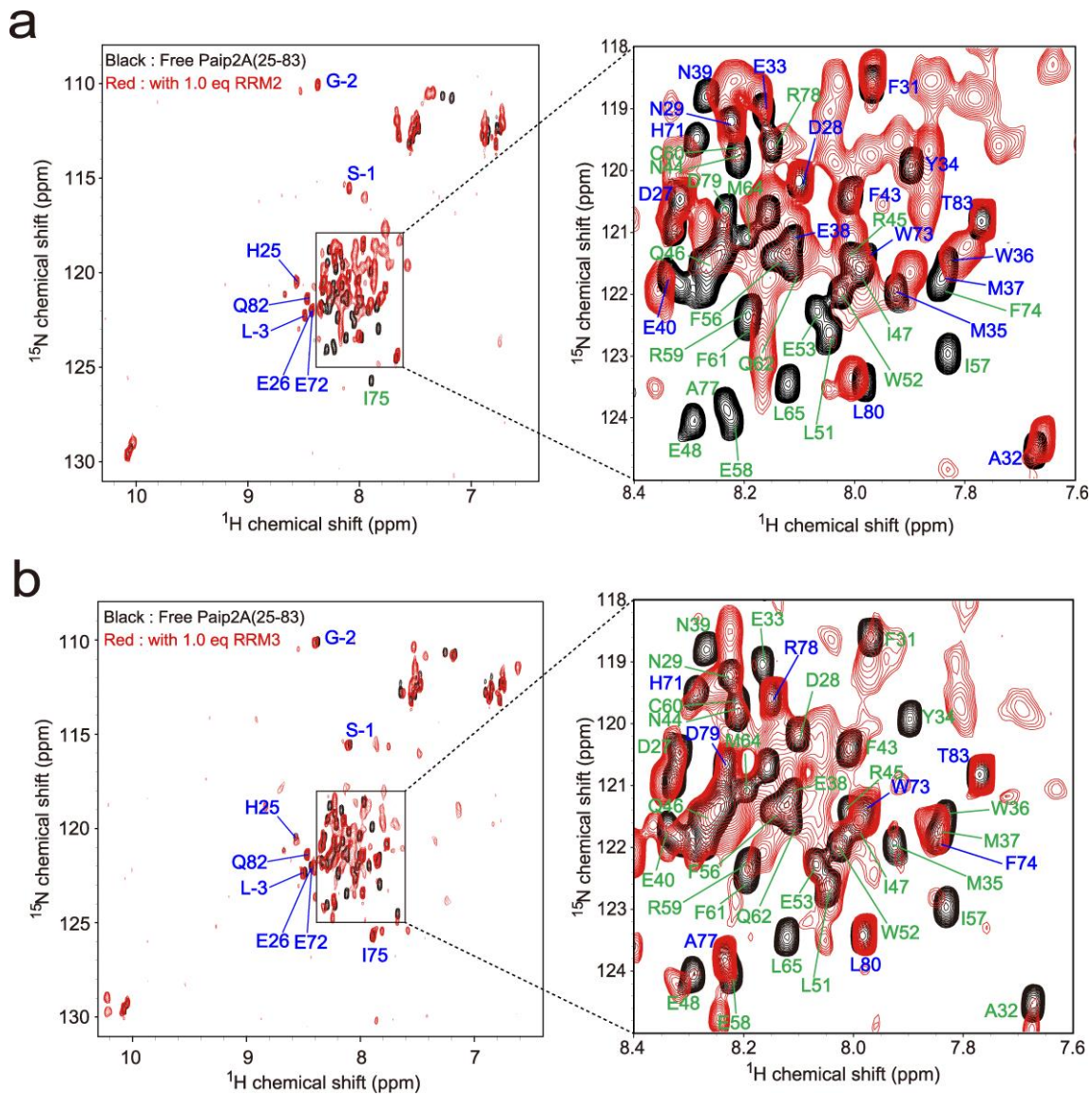


図 12. ^{15}N 標識した Paip2A(25-83) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを、(a) RRM2、(b) RRM3 非存在下 (黒)、存在下 (赤) で重ね合わせた。変化したシグナルは緑、変化していないものは青で示されている。

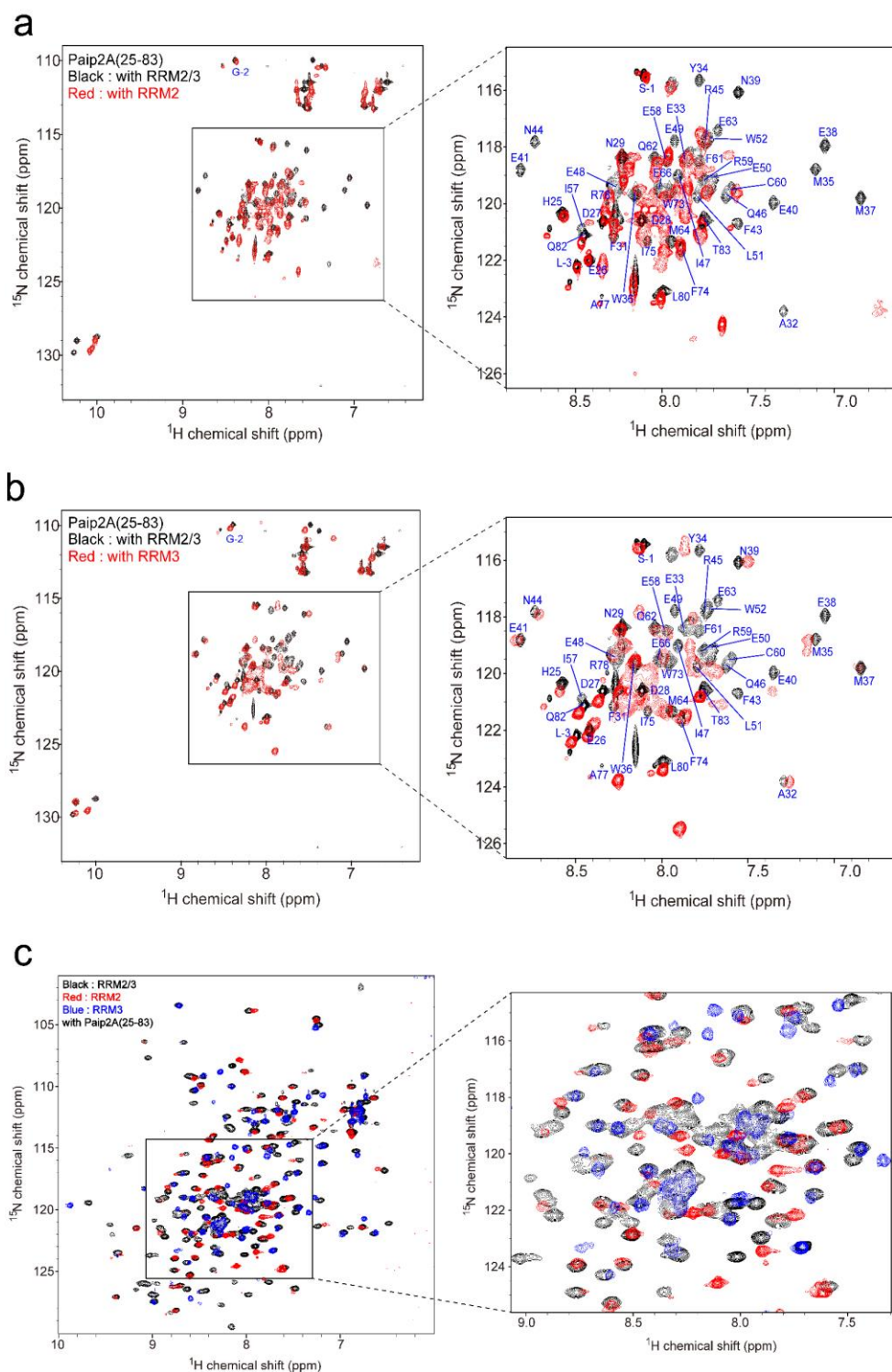


図 13. ^{15}N 標識 Paip2A(25-83) と RRM2/3、RRM2、RRM3 との複合体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの比較。Paip2A(25-83) と RRM2/3 (黒) または RRM2 (a) および RRM3 (b) (赤) との複合体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ。(c) Paip2A(25-83) 存在下の RRM2/3 (黒)、RRM2 (赤)、RRM3 (青) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ。

3.6 RRM2 および RRM3 の poly(A)結合界面の同定

Poly(A)との相互作用に関わる RRM2/3 の残基を特定するため、A₁₂を加えた後の RRM2/3 の NMR スペクトルの変化を解析した。まず、均一-¹³C, ¹⁵N 標識 RRM2/3 を用いた三重共鳴実験を行い、¹H-¹⁵N HSQC スペクトル上に観測されるシグナルの理論値 189 個のうち 177 個 (94%) 主鎖アミドシグナルを帰属した (図 14)。

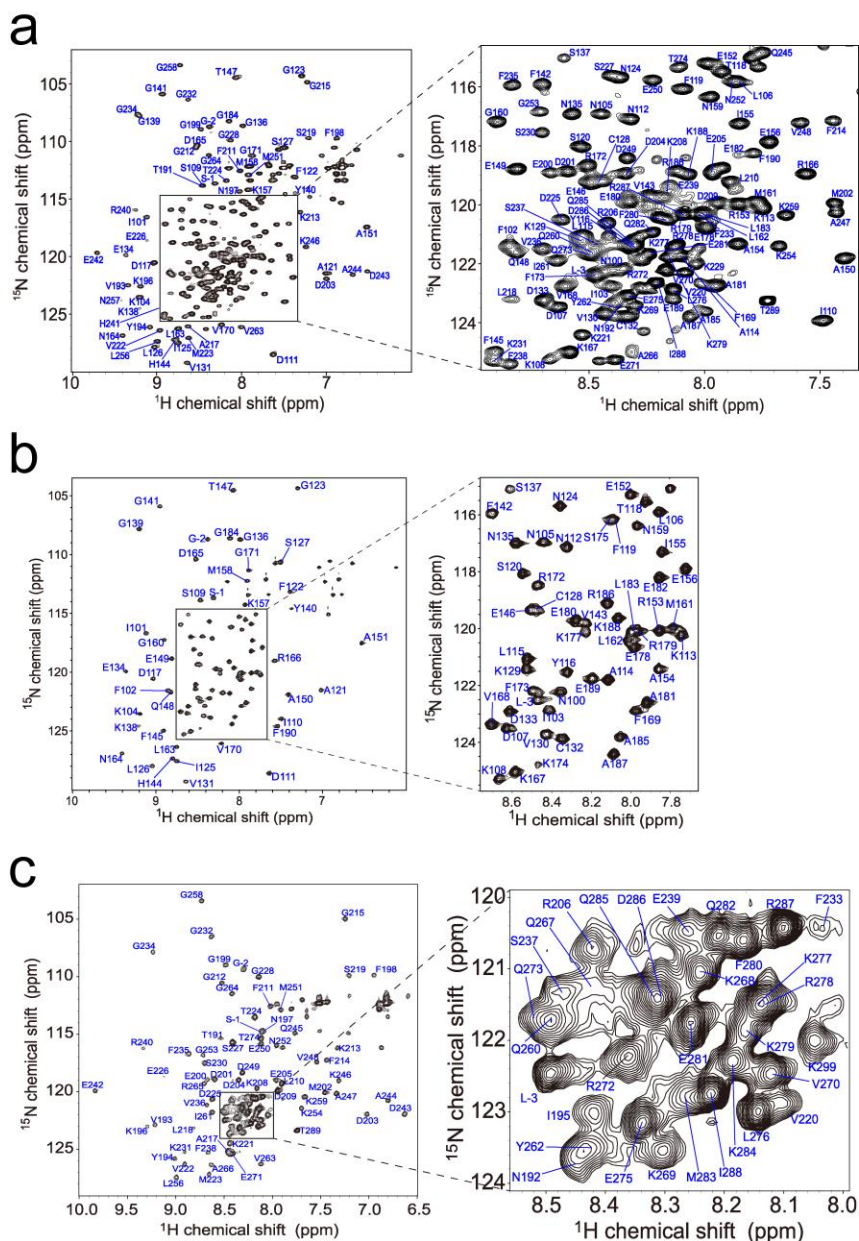


図 14. RRM2/3、RRM2、RRM3 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの主鎖アミドシグナルの帰属

(a) RRM2/3 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの主鎖アミドシグナルは、三重共鳴スペクトル [HNCA と HN(CO)CA] を用いて帰属した。(b) RRM2 と (c) RRM3 の主鎖アミドシグナルは、三重共鳴スペクトル [HNCACB, CBCA(CO)NH, CCONH], TOCSY, NOESY スペクトルにより帰属した。

次に、均一 ^{15}N 標識 RRM2/3 に対して A_{12} を滴定し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した (図 15a)。RRM2 領域由来のシグナルと RRM3 領域由来のシグナルで、滴定によるシグナルの変化のしかたに違いが見られた。(図 15b、16a および 16b)。図 16a に示すように、0.25 等量の A_{12} を添加すると、主に RRM3 由来の残基に強度減少が見られた (図 16a)。RRM3 の残基に由来する 20 個のシグナル (V193, K196-G199, A217-S219, M223, E226, G232, F235, V236, R240, H241, N257, I261, V263, G264, A266) および、RRM2 の残基に由来する 4 個のシグナル (I103, K138, G171, E189) に変化が見られた。0.25-0.50 等量の A_{12} を添加すると、RRM2 由来の 26 個のシグナル (N100-F102, K104, N105, C128, V130, V131, E134, G139-V143, E152, K157, N159, V168-V170, E182.1, E153, E154, V168, V170, E168, V170, E169, E169, E169, E169, G184-A187, F190) の強度が減少し、RRM3 由来の 24 個のシグナル (N192, Y194, M202-D204, F211, V220, V222, T224, S230, K231, G234, F238, E242-A244, G253, L256, I261, V270, E271, Q273-E275) の強度が減少した(図 16b)。0.75-1.0 当量の A_{12} を添加すると、いくつかのシグナルが異なる化学シフトを示した (図 17d, e)。最後に、1.25 当量の A_{12} を添加すると、スペクトル変化は飽和した (図 17f, 図 18)。RRM2/3 の RRM2 領域と RRM3 領域の poly(A)結合親和性をそれぞれ単独の RRM2 ($K_d=200\ \mu\text{M}$) と RRM3 ($K_d=4.7\ \mu\text{M}$) と同等であると仮定すると、RRM2/3 においても RRM3 領域が優先的に poly(A)に結合することが想定され、今回観測されたスペクトル変化が説明できる。すなわち、0.25 当量の A_{12} の存在下では、ほとんどの A_{12} 分子は 2 つの RRM2/3 分子に結合し、RRM2/3 の RRM3 領域は直接 poly(A)に結合し、RRM2 領域は A_{12} に結合しない状態になる (図 15c)。RRM2/3 と A_{12} の K_d は 1.9 nM であるため、RRM2/3 が A_{12} と 1:1 で結合した複合体は十分に安定であるが、今回観測された NMR スペクトル変化は、 A_{12} に結合した RRM2/3 の RRM2 が、別の RRM2/3 分子の RRM3 と置き換わっていることを示している。

この相互作用様式は、今回の NMR 実験に用いた試料濃度において、RRM2/3 の RRM2 と RRM3 の A_{12} への結合比に関する数値シミュレーションの結果 (図 19) とよく一致した。

図 19a-c は、それぞれ、250 μM , 10 μM , 1.0 mM の RRM2/3 に対して A_{12} を滴定した際の、全ての RRM2 および RRM3 に対する A_{12} に結合した RRM2 および RRM3 の割合をシミュレーションしたものである。RRM2/3 に対する A_{12} の滴定実験のサンプル濃度 250 μM (図 19a) でシミュレーションした結果、RRM2/3 に対して A_{12} の添加量が少ない条件、例えば、0.25 等量の A_{12} の添加では、RRM2 は 1 割、RRM3 は 4 割が A_{12} 結合型になっていることが示された。このことは、0.25 等量の A_{12} を添加すると、主に RRM3 由来の残基に強度減少が見られ、RRM2 由来の残基にほとんど変化がなかったという実際の実験結果と一致する。さらに、もし RRM2/3 のサンプル濃度が 10 μM と低い場合に RRM2 と RRM3 が A_{12} に対してどのような結合を示すのかをシミュレーションした (図 19b)。その結果、 A_{12} への RRM2 と RRM3 の結合状態の割合にほとんど差は見られなかった。一方、RRM2/3 のサンプル濃度が 1.0 mM と高い場合には、 A_{12} への RRM2 と RRM3 の結合状態の割合に大きな差が見られた (図 19c)。これらの結果は、RRM2 より RRM3 の方が poly(A)に対する結合親和性が強いいため、RRM2/3 のサンプル濃度が濃くなると、ほとんどの A_{12} 分子は 2 つの RRM2/3 分子の RRM3 が結合し、RRM2 領域は A_{12} に結合しない状態 (図 19d) になるという考えをサポートする。

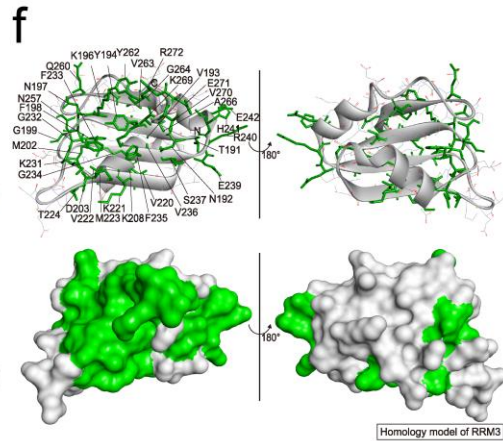
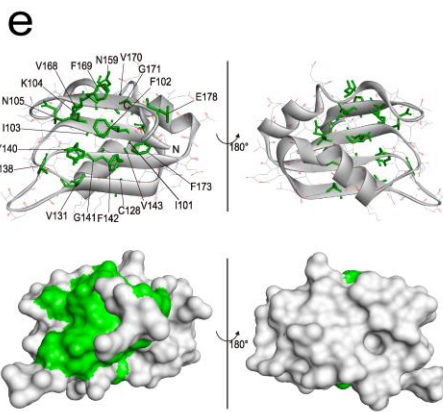
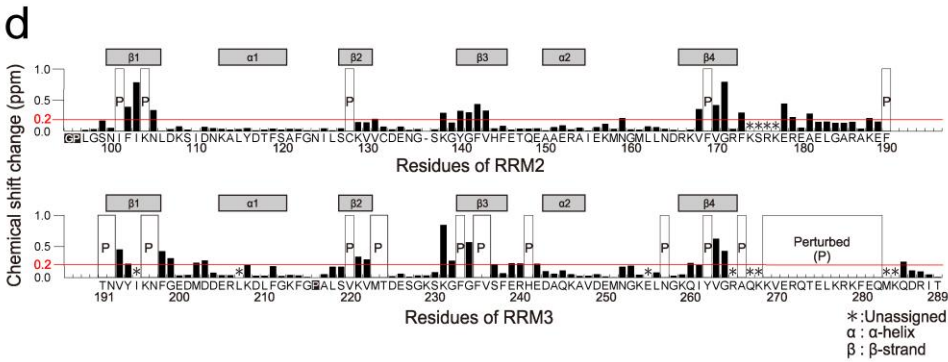
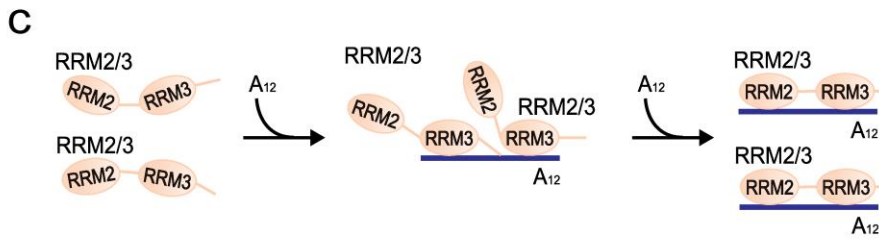
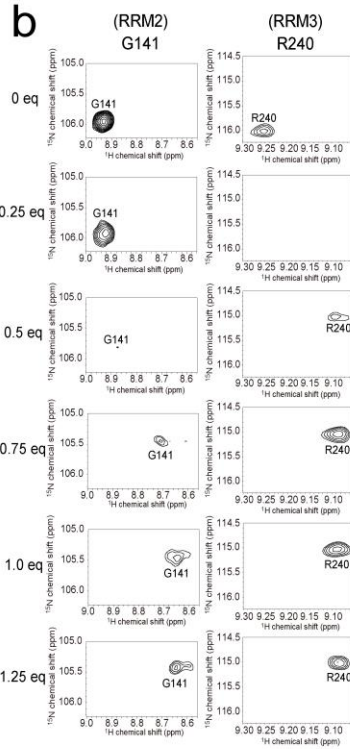
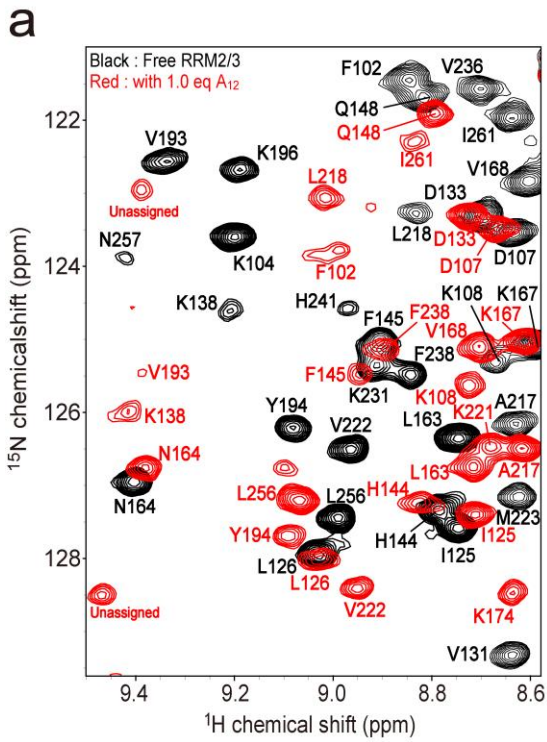


図 15. 均一 ^{15}N 標識 RRM2/3 の A_{12} 添加による化学シフト変化

(a) 1.0当量の A_{12} 非存在下（黒）または存在下（赤）における ^{15}N 標識RRM2/3の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルの重ね合わせ。(b) 0から1.25当量の A_{12} の滴定によるRRM2およびRRM3由来のシグナルの化学シフトの変化。G141とR240はそれぞれRRM2とRRM3内の残基である。(c) RRM2/3と A_{12} との相互作用の模式図。 A_{12} に比べて過剰なRRM2/3の存在下では、RRM2/3のRRM3は A_{12} に結合し、RRM2はほとんど結合しない（中央）。等モルの A_{12} が存在する場合、1分子のRRM2/3のRRM2とRRM3が同時に A_{12} に結合する（右）。(d) 1.25当量の A_{12} を添加した後の化学シフトの変化を示すプロット。上の棒グラフはRRM2由来のシグナルの化学シフト変化を、下の棒グラフはRRM3由来のシグナルの化学シフト変化を示す。上下のグラフの残基はRRM2とRRM3間のアラインメントに基づいて配置し、グラフにはこれらのドメインの二次構造を示している。 A_{12} 結合状態での対応するシグナルは、一連の三重共鳴実験によって帰属され、その化学シフト変化は(d)にプロットされている。いくつかのシグナルは A_{12} を添加した後に摂動を受け、三重共鳴シグナルが観測されなかったため、 A_{12} 結合状態での対応するシグナルを帰属することができなかった。これらの残基はパネル(d)に“Perturbed (P)”として示されている。化学シフトの変化は、以下の式で計算した。

$$\delta = \sqrt{\Delta_{1\text{H}}^2 + (\Delta_{15\text{N}}/6.5)^2}$$

ここで、 $\Delta_{1\text{H}}$ と $\Delta_{15\text{N}}$ はそれぞれ ^1H と ^{15}N の方向での化学シフト変化量である。グラフ中の α と β は、それぞれRRM1/2-poly(A)複合体の結晶構造[PDBコード:1CVJ(16)]で観測された α -helixと β -strandを表している。0.2ppmの赤線は、図15eと図15fでマッピングされた残基の閾値を表している。(e) 大きな化学シフト変化(>0.2ppm)を示し、「Perturbed」とラベル付けされたRRM2残基を、RRM2の結晶構造[PDBコード:1CVJ(16)]上に緑でマッピングした。上段はリボンモデル、下段は表面表示モデルである。(f) 大きな化学シフト変化(0.2ppm以上)を示す「Perturbed」とラベル付けされたRRM3残基を、RRM3のホモロジーモデル上に緑色でマッピングした。

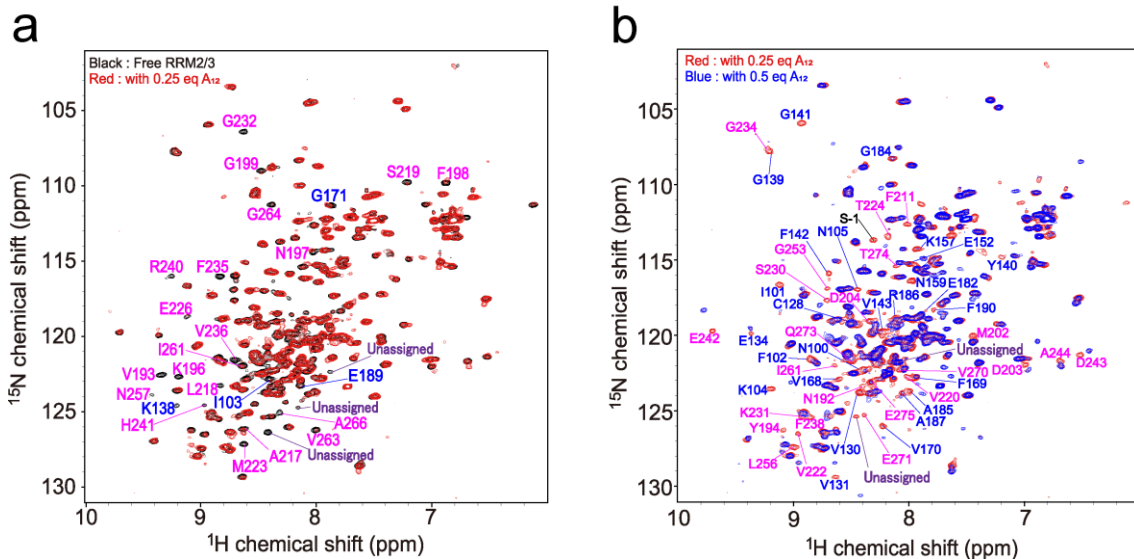


図 16. 滴定中の NMR スペクトル変化では、RRM2 領域と RRM3 領域の間で異なるシグナルが見られた (a) 0.25 当量の A_{12} 非存在下 (黒) または存在下 (赤) における ^{15}N 標識 RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ。0.25 当量の A_{12} を添加した後に強度が著しく減少した、または、化学シフト変化したシグナルは、RRM2 および RRM3 残基について、それぞれ青 (4 個) およびマゼンタ (20 個) でラベルし、未帰属のシグナルは紫で「Unassigned」とラベルした。(b) 0.25 当量の A_{12} (赤) および 0.5 当量の A_{12} (青) 存在下での ^{15}N 標識 RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ。0.25-0.5 当量の A_{12} を添加した後に強度が著しく減少した、または、化学シフト変化したシグナルは、RRM2 および RRM3 の残基をそれぞれ、青 (26 個) およびマゼンタ (24 個) でラベルし、未帰属のシグナルは「Unassigned」と紫でラベル付した。

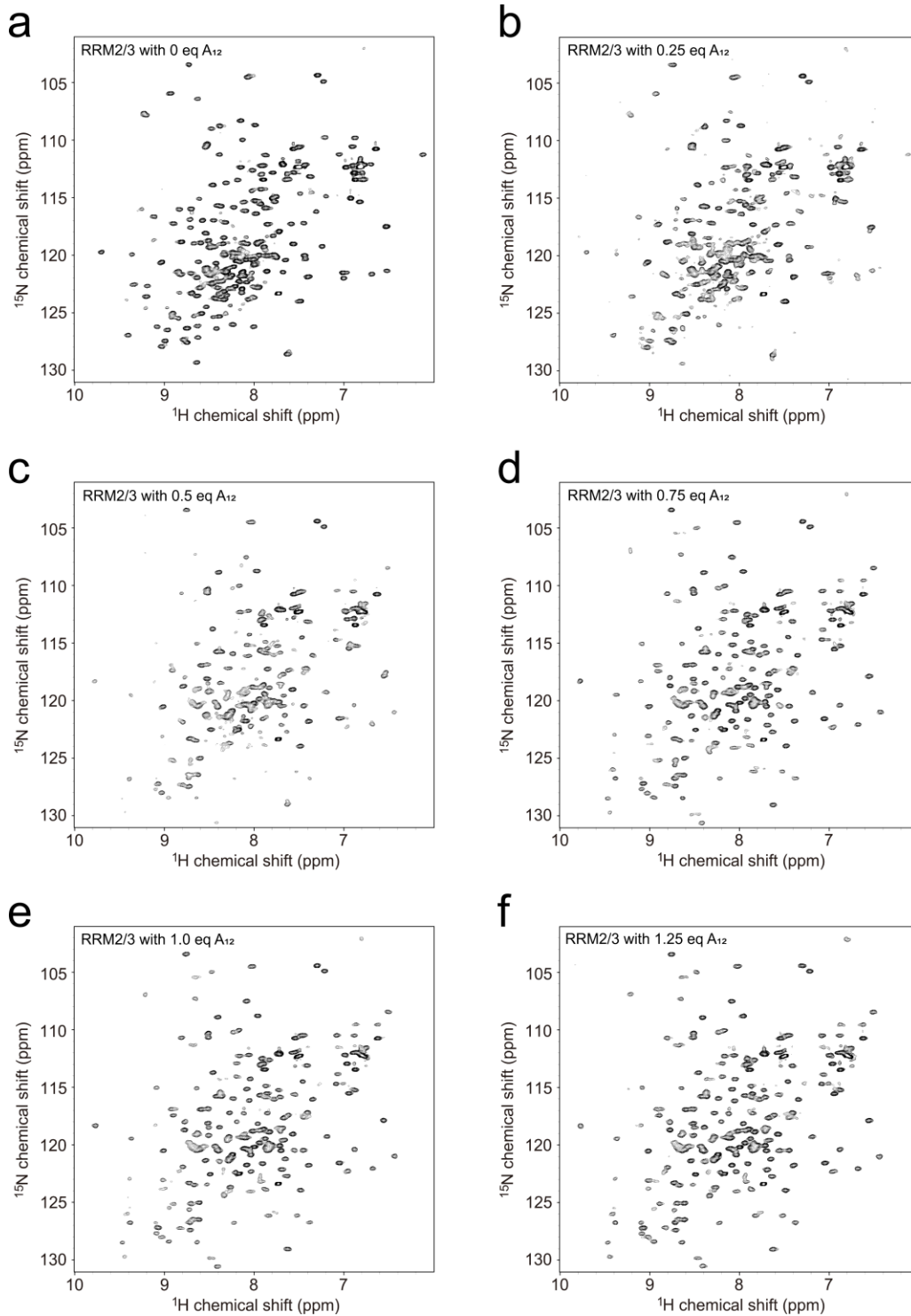


図17. A_{12} の滴定に伴う ^{15}N 標識RRM2/3の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル

A_{12} の非存在下 (a) 、および、0.25 (b) , 0.5 (c) , 0.75 (d) , 1.0 (e) , および 1.25 (f) 等量の A_{12} 存在下での ^{15}N 標識 RRM2/3の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを示した。

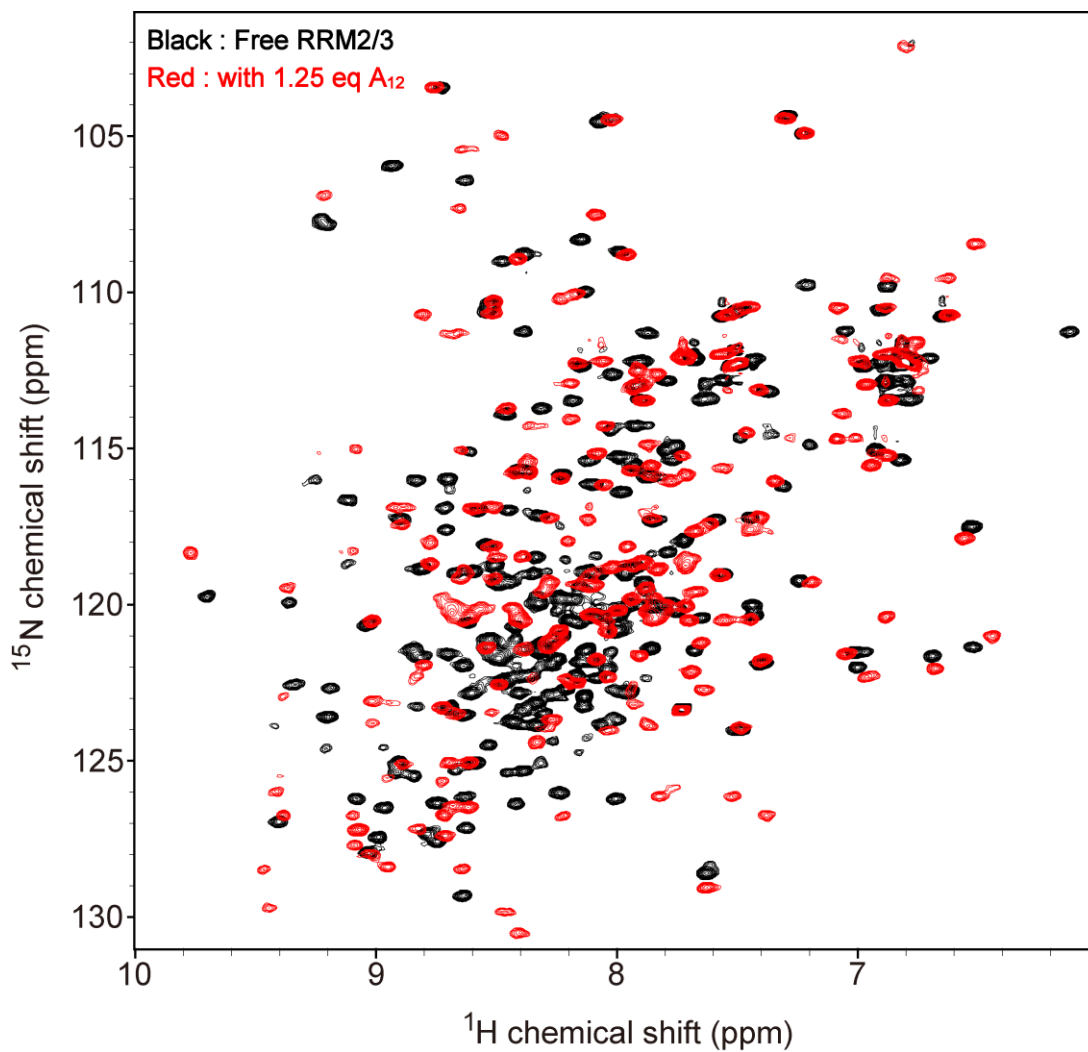


図18. FreeのRRM2/3（黒）と1.25等量のA₁₂存在下でのRRM2/3（赤）の¹H-¹⁵N HSQCスペクトルの重ね合わせ

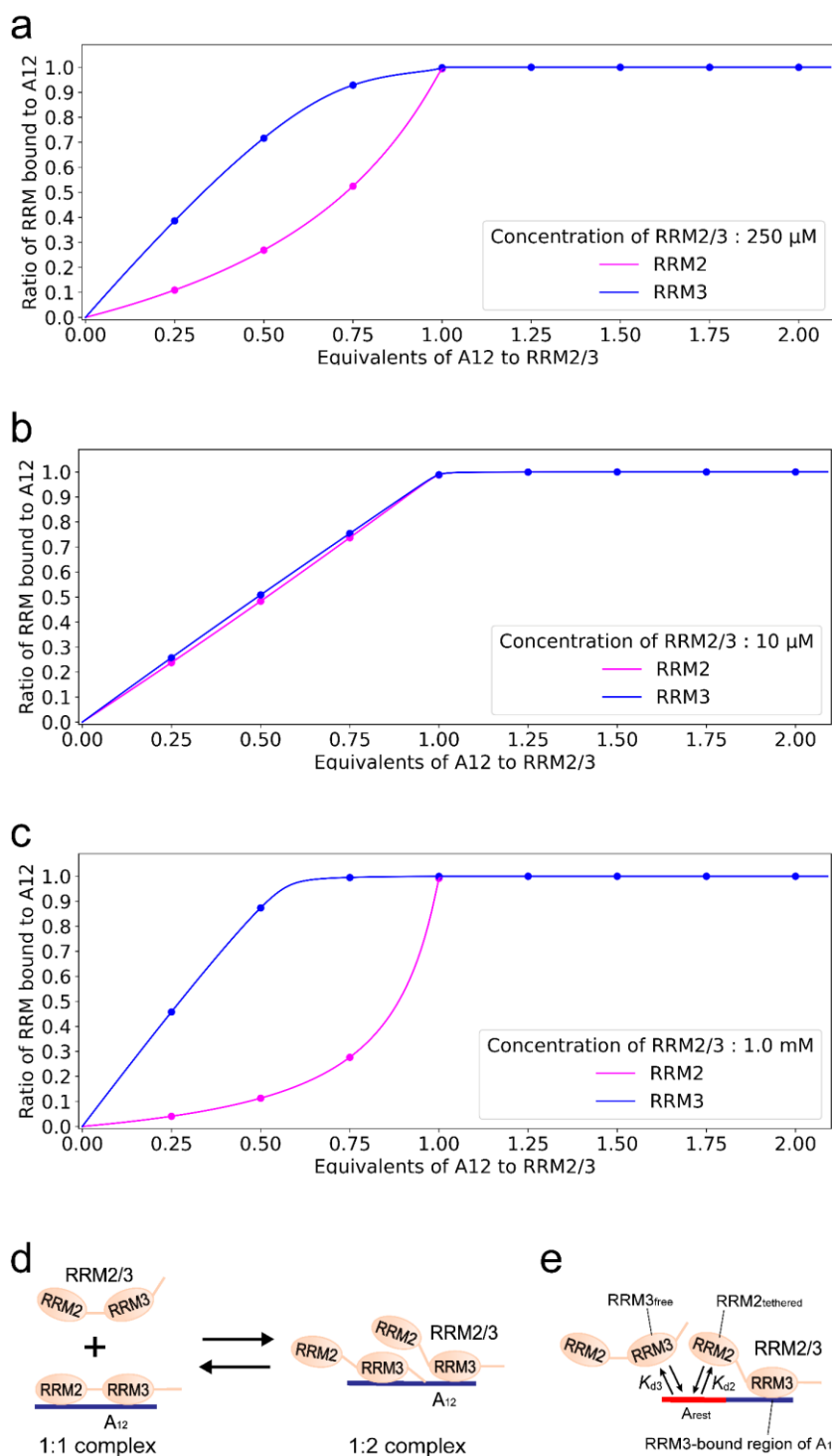


図 19. A₁₂に結合した RRM の比率に関する数値シミュレーション

A₁₂に結合した各 RRM 領域の比率を、A₁₂と RRM2/3 の等量数に対してプロットした。RRM2/3 の初期濃度 (x) を、(a) 250 μ M、(b) 10 μ M、(c) 1.0mM としてシミュレーションした。(d) 1 : 1 複合体と 1 : 2 複合体の間のスイッチングの模式図。(e) RRM2/3 の RRM3 結合領域が結合した A₁₂の残りの部分 (A_{rest}) に対する RRM2_{tethered} と RRM3_{free} の間の競合の模式図。

シミュレーションの詳細

RRM2/3 の RRM2、RRM3、RRM2/3 の poly(A) に対する K_d (それぞれ、 K_{d2} , K_{d3} , K_{d23} と表記する) は、ITC を用いて観測した結果、それぞれ 200 μM 、4.7 μM 、1.3 nM であったことから (表 1)、まず x M の RRM2/3 に A_{12} を加えると c M RRM2/3- A_{12} 複合体 (図 20d, 1 : 1 complex) ができると予測された。ここで、 A_{12} と結合した RRM2/3 の RRM2 領域 ($\text{RRM2}_{\text{tethered}}$ と表記する) は、図 20e に示すように、 A_{12} と結合していない RRM2/3 分子の RRM3 領域 ($\text{RRM3}_{\text{free}}$ と表記する) と競合し、一過性に形成されるだろう ($K_{d23} = 1.3$ nM) と予測した。

目的の 2 分子の競合する RRM2 および RRM3 領域が標的とする残りの A_{12} 領域 (A_{rest} と表記する) の濃度に相当する 1 : 1 複合体の初期濃度は、以下のように計算した。

$$c = \frac{x + y + z - \sqrt{(x + y + z)^2 - 4xy}}{2}$$

ここで、 x と y はそれぞれ RRM2/3 の初期濃度 (250 μM) と A_{12} の濃度 (例えば 0.25 等量 の RRM2/3 では 62.5 μM)、 z は K_{d23} を示す。RRM3_{free} の初期濃度 ($[\text{RRM3}_{\text{free}}]$) は $x - c$ で計算した。

RRM3_{free} と RRM2_{tethered} の間の A_{rest} に対する競合の結果、RRM2_{tethered}- A_{rest} 間の結合と RRM3_{free}- A_{rest} 間の結合の比 (R) は、以下ようになる。

$$R = \left(\frac{[\text{RRM2}_{\text{tethered}}][A_{\text{rest}}]}{K_{d2}} \right) / \left(\frac{[\text{RRM3}_{\text{free}}][A_{\text{rest}}]}{K_{d3}} \right) = \frac{K_{d3}}{K_{d2}} \times \frac{[\text{RRM2}_{\text{tethered}}]}{[\text{RRM3}_{\text{free}}]}$$

ここで、 $[\text{RRM3}_{\text{free}}]$ は $x - c$ で表すことができる。また、 $[\text{RRM2}_{\text{tethered}}]$ は、以下のように計算できる。各 RRM が半径約 13Å の球体であるとみなし、RRM2 と RRM3 の間の 14 残基の構造非形成リンカーの平均長は約 14Å と見積もれる (23) とすると、RRM2 の中心から RRM3 の中心までの半径は約 40Å (=13×2+14) である。したがって、 $[\text{RRM2}_{\text{tethered}}]$ は以下のように計算できる。

$$[\text{RRM2}_{\text{tethered}}] = \frac{\frac{1 \text{ molecule}}{6.02 \times 10^{23}}}{\frac{4}{3}\pi \times (40 \times 10^{-10})^3 \times 10^3} = 6.2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

したがって、 R は、

$$R = \frac{K_{d3}}{K_{d2}} \times \frac{[\text{RRM2}_{\text{tethered}}]}{[\text{RRM3}_{\text{free}}]} = \frac{4.7}{200} \times \frac{6.2 \times 10^{-3}}{x - c} = \frac{1.46 \times 10^{-4}}{x - c}$$

と算出できる。

したがって、RRM2_{tethered} は濃度が c である A_{rest} を $\frac{R}{1+R}$ の割合で占有し、 A_{rest} に結合した RRM2_{tethered} の

濃度は $\frac{Rc}{1+R}$ となる。 A_{12} に結合した RRM2 は A_{rest} に結合した RRM2_{tethered} だけなので、 A_{rest} に結合した

RRM2_{tethered} と全 RRM2 の比は $\frac{Rc}{(1+R)x}$ となる。

一方、 A_{rest} に結合する RRM3_{free} の濃度 c' は、以下のように計算できる。

$$c' = \frac{X + Y + Z - \sqrt{(X + Y + Z)^2 - 4XY}}{2}$$

ここで、 X と Y はそれぞれ RRM3_{free} の初期濃度 $x - c$ と RRM2 が結合していない A_{rest} の初期濃度

$\frac{c}{1+R}$ であり、 Z は K_{d3} である。したがって、 A_{12} 結合 RRM3 の濃度は、RRM2 が A_{rest} に結合した 1 : 1 複合体の濃度 ($\frac{Rc}{1+R}$)、RRM2 が A_{rest} に結合していない 1 : 1 複合体の濃度 ($\frac{c}{1+R}$)、および 1 : 2 複合体の濃度 (c') の和であり、 $c+c'$ として計算される。したがって、 A_{12} に結合した RRM3 と全 RRM3 の比は、 $\frac{c+c'}{x}$ となる。

次に、 A_{12} の滴定により RRM2/3 中の RRM2 領域と RRM3 領域の NMR スペクトルの変化に関連すると予想される RRM2 と RRM3 の A_{12} 結合比率、 $\frac{Rc}{(1+R)x}$ と $\frac{c+c'}{x}$ をそれぞれ RRM に対する A_{12} の等量数に対してプロットした (図 19a-c)。

A₁₂ 添加後の RRM2/3 の化学シフト摂動 (CSP) を調べるため、A₁₂ 添加時の均一 ¹³C, ¹⁵N 標識 RRM2/3 の三重共鳴実験を行い、A₁₂ 結合状態の RRM2/3 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル上に観測された 152 個の主鎖アミドシグナルを帰属した (それぞれ、観測される RRM2、RRM3 由来のシグナルの理論値の 96.7%、65.3%) (図 20)。

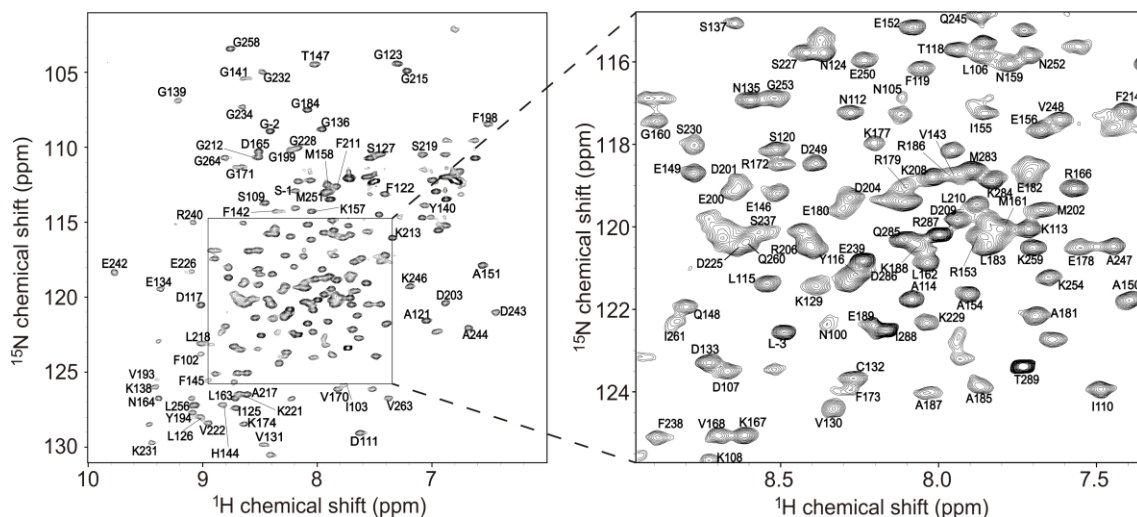


図 20 A₁₂ 結合型の RRM2/3 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルにおける主鎖アミドシグナルの帰属

A₁₂ 結合型 RRM2/3 の主鎖アミドシグナルの帰属の結果を、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルに示した。均一 ¹³C, ¹⁵N 標識 RRM2/3-A₁₂ 複合体を用いた三重共鳴実験にて、¹H-¹⁵N HSQC スペクトル上に観測されるシグナルの理論値 189 のうち 152 個 (80%) を帰属した。

化学シフトの摂動は図 15d に示す通りである。化学シフト変化量が 0.20 ppm 以上で、slow exchange で化学シフトが変化したものは、A₁₂ の添加により摂動を受けた残基由来のものとみなした。そのような残基を以下に示す。RRM2 では I101-N105, C128, V131, K138, Y140-V143, N159, V168-G171, F173, E178, R179, A181, K188, F190, T191-Y194, RRM3 では I181, K188, F190, T191-Y194、RRM3 では K196-G199, M202, D203, K208, V220-T224, K231-S237, E239-E242, N257, Q260, Y262-G264, A266, K269-Q282, Q285 であった。これらの残基は、ほとんどが RRM2/3 の β ストランド領域に対応していた (図 15d)。RRM1/2-poly(A)複合体の結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) code : 1CVJ (16)] 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 (図 15e、15f)。

さらに、RRM2 と RRM3 の間のリンカーの役割を調べるために、¹⁵N 緩和実験を行った。A₁₂ 非存在下または存在下での RRM2/3 のスピン-格子緩和時間 (T_1)、スピン-スピン緩和時間 (T_2)、回転相関時間 (τ_c) の値を表 3、表 4、図 21、図 22 にまとめた。

A₁₂ 非存在下では、RRM2 と RRM3 の τ_c 平均値はそれぞれ 10.8 ns と 10.2 ns であり、これは独立して運動する RRM や単一の RRM における典型的な τ_c の観測値 (8-10 ns) に相当し、タンデムで相互作用する RRM で通常得られる τ_c 値 (15-17 ns) (24, 25) よりかなり低く、RRM2/3 の RRM2 および RRM3 が独立して運動していることが示唆された。RRM2 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 100-

190番)と RRM3 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 191-289 番) のスペクトルの重ね合わせは、全体として RRM2/3 (残基 100-289) のスペクトルをよく再現した (図 23、※後述する)。リンカー領域の τ_c の平均値 8.6 ns は、RRM2 領域や RRM3 領域のそれよりも小さく、リンカー領域が高い可動性と柔軟性を持っていることが示唆された。

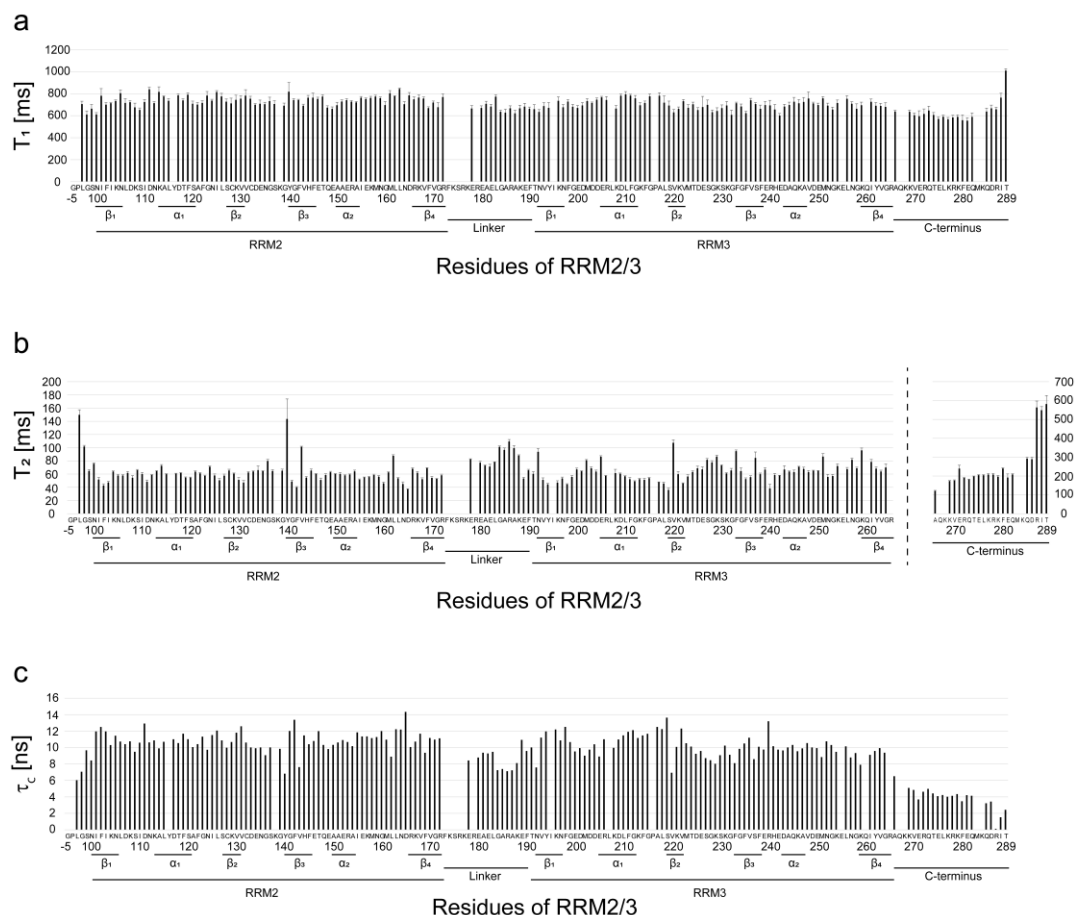


図 21 RRM2/3 の各残基の T_1 (a)、 T_2 (b)、 τ_c (c) の値のグラフ

表 3. RRM2/3 の各領域の T_1 , T_2 , τ_c の平均値

RRM2 は PABPC1 の 100-172 残基、RRM2 と RRM3 の間のリンカーは PABPC1 の 173-190 残基、RRM3 は PABPC1 の 191-265 残基、RRM2/3 の C 末端は 266-289 残基から構成される。

T_1 : スピン-格子緩和時間

T_2 : スピン-スピン緩和時間

τ_c : 回転相関時間

Region	T_1 [ms]	T_2 [ms]	τ_c [ns]
RRM2	740 ± 45	60.5 ± 14.0	10.8 ± 1.2
Linker	672 ± 39	83.0 ± 15.8	8.6 ± 1.2
RRM3	700 ± 42	64.4 ± 14.0	10.2 ± 1.2

A_{12} 存在下、RRM2/3- A_{12} 複合体における RRM2 および RRM3 の平均 τ_c 値はそれぞれ 15.3 および 16.3 ns であり、これはタンデムで相互作用する RRM で通常観測される τ_c 値 (15~17 ns) に相当した (24,25)。リンカー領域の平均 τ_c は 14.3 ns であり、これは RRM2 および RRM3 の τ_c と誤差の範囲内で一致する。従って、リンカー領域の移動度は A_{12} 結合により減少した。

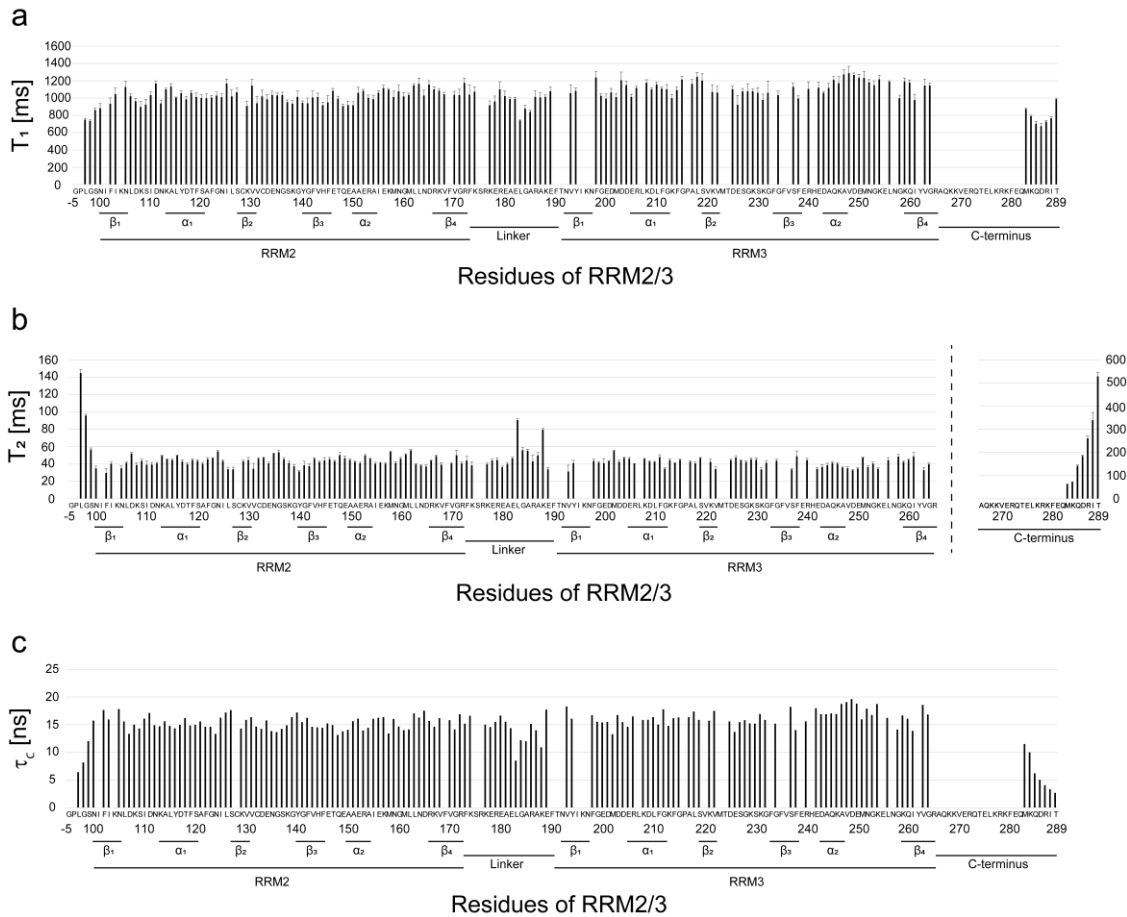


図 22 A_{12} 結合型 RRM2/3 の各残基の T_1 (a)、 T_2 (b)、 τ_c (c) の値のグラフ

表 4. A_{12} 結合型 RRM2/3 の各領域の T_1 , T_2 , τ_c の平均値。

RRM2 は PABPC1 の 100–172 残基、RRM2 と RRM3 の間のリンカーは PABPC1 の 173–190 残基、RRM3 は PABPC1 の 191–265 残基、RRM2/3 の C 末端は 266–289 残基から構成される。

T_1 : スピン-格子緩和時間

T_2 : スピン-スピン緩和時間

τ_c : 回転相関時間

Region	T_1 [ms]	T_2 [ms]	τ_c [ns]
RRM2	1024 ± 74	43.2 ± 5.5	15.3 ± 1.2
Linker	977 ± 94	49.5 ± 15.3	14.3 ± 2.3
RRM3	1118 ± 71	41.6 ± 5.5	16.3 ± 1.2

※RRM2/3、RRM2、RRM3 のスペクトルの比較

図 23a に、リガンドがない場合の RRM2/3 (黒)、RRM2 (赤)、RRM3 (青) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせを示した。RRM2 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 100-190 番) と RRM3 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 191-289 番) のスペクトルを重ね合わせると、全体的によく再現されたが、対応する 35 組のシグナルが重ならなかった。それらのシグナルはラベルが付けられている。35 組のシグナルのうち、9 組と 26 組はそれぞれ RRM2 と RRM3 残基のシグナルであった(図 23b)。RRM2/3 の対応するシグナルと重ならない RRM2 の 9 つのシグナルは C 末端領域(R172, E180, G184-F190) であり、C 末端より下流の RRM3 の有無によって化学シフトの違いが生じたことが示唆される。一方、RRM3 の 26 個のシグナルは RRM2/3 の対応するシグナルと重ならなかった (T191, V193, Y194, K196, N197, L218, K221, V222, F235, V236, F238, R240, E242-A244, K246-E250, N252, V263, G264, A266, V270, E271)。これらの残基を RRM3 構造上にマッピングしたところ、これらは RRM3 の N 末端付近にあることがわかった(図 23c)。RRM2/3 では、RRM3 の N 末端より上流に RRM2 が直接結合しているが、単独の RRM3 はその N 末端にクローニングアーティファクト (GPLGS) が付加している。したがって、これらのシグナルの化学シフトの違いは、おそらく RRM3 の N-末端のアミノ酸配列の違いを反映したものである。以上より、スペクトルの違いは RRM2/3 における RRM2 と RRM3 の間の相互作用によるものではなく、RRM2 と RRM3 の C 末端と N 末端にそれぞれ付加した配列の違いに起因するものであると結論した。

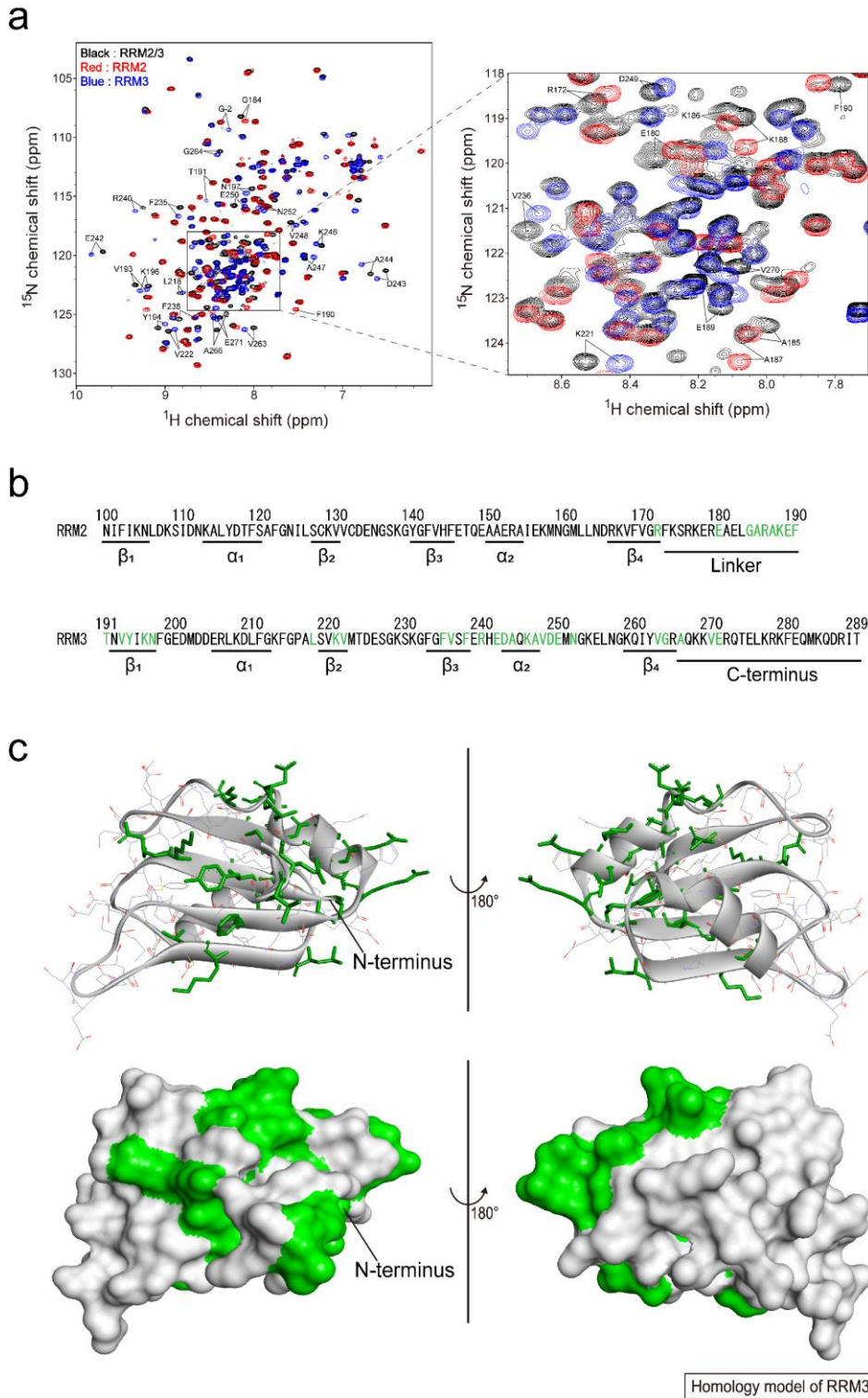


図 23. ^{15}N 標識 RRM2/3、RRM2 および RRM3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの比較

(a) RRM2/3 (黒)、RRM2 (赤)、RRM3 (青) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを重ね合わせた。タンデムな RRM2/3 ドメインと単独の RRM2 または RRM3 の間で重複しないシグナルをラベルしている。(b) (a) で重複しないシグナルを持つ残基を緑色で表示した。(c) RRM3 の構造上に (b) で表示した残基をマッピングしている。

3.7 Paip2A は RRM2 および RRM3 の poly(A)結合界面に結合する

均一 ^{15}N 標識 RRM2/3 に対して Paip2A(25-83)を添加し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。その結果、ほとんどのシグナルが slow exchange で変化し、大きなスペクトル変化を示した (図 24a および図 25)。Paip2A(25-83)結合型の RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上に観測されたシグナルを三重共鳴実験により帰属しようと試みたが、線広幅化の影響で、連鎖帰属はできなかった。Paip2A(25-83)と結合型の RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC シグナルのうち帰属のついていないものは 79 個あり、そのうち $^{13}\text{C}\alpha$ のシグナルは 45 個観測されたが、 $^{13}\text{C}\beta$ のシグナルは一つも観測されなかった。

Paip2A(25-83)結合状態の RRM2/3 帰属は完全には達成されなかったが、slow exchange で変化するシグナルは、化学シフトの摂動が大きいものとして扱った。これらの変化を図 24b にまとめた。RRM2 において、摂動を受けて大きな化学シフト変化を示した残基は、I101-K108, F119, L126-E134, K138, Y140-E146, F169-F173, E178, R179, R186-F190 であり、RRM3 においては、T191-Y194, K196-F198, L218-E226, F233-H241, Y262-G264, A266 および K269-E281 (図 24c) であった。

Paip2A(25-83)の添加により影響を受けたこれらの残基を RRM2 の結晶構造および RRM3 のホモロジーモデルにマッピングした (図 24d および図 24e)。その結果、これらの残基は β シート表面の、2つの α ヘリックス (図 24d および図 24e) の反対側に局在し、poly(A)結合表面と大きく重なっていることがわかった (図 26)。特に、ラベルが四角で囲まれている残基 (F102, K104, N105, S127, F142) は、poly(A)と直接相互作用している残基である (図 24d)。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。

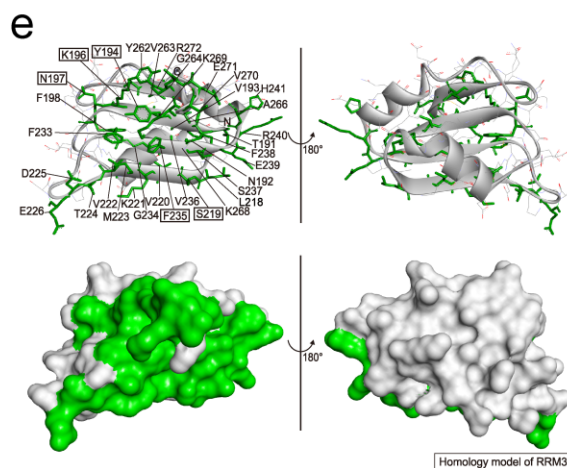
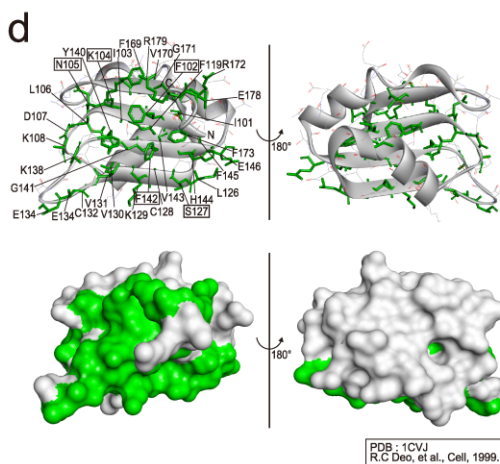
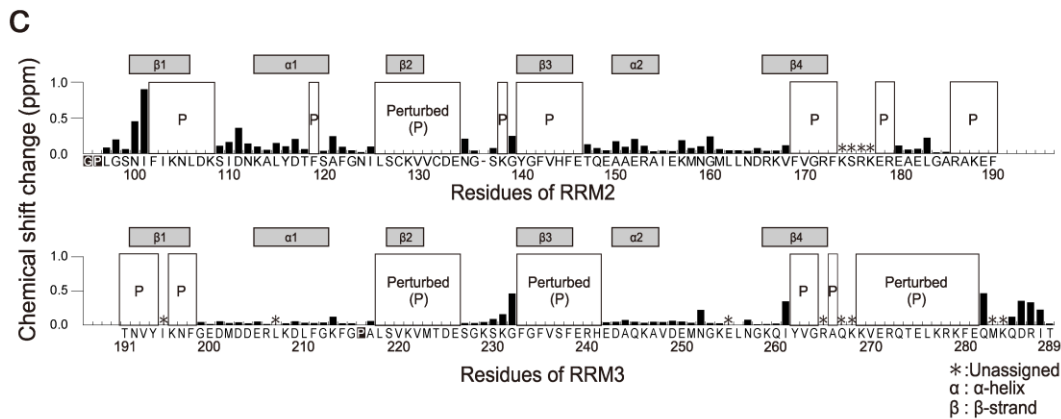
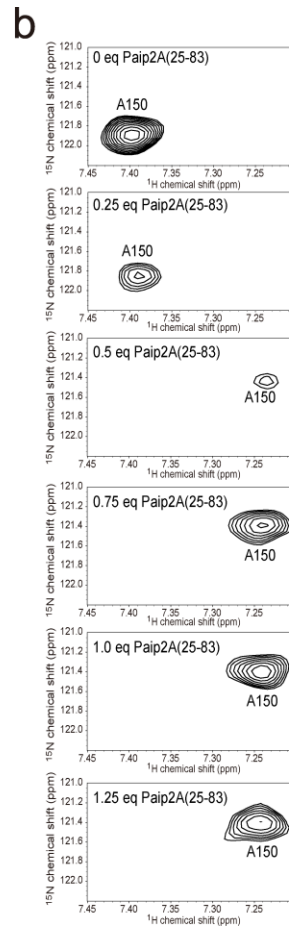
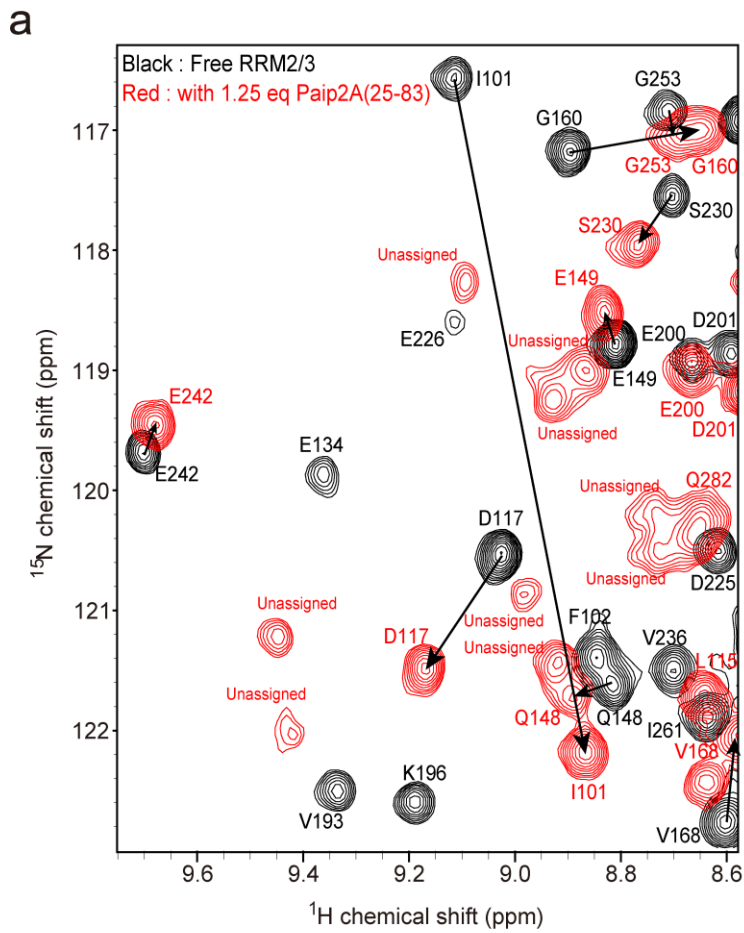


図 24. Paip2A(25-83)の添加による均一¹⁵N 標識 RRM2/3 の化学シフト変化

(a) 1.25 等量の Paip2A(25-83) 非存在下 (黒) と存在下 (赤) の¹⁵N 標識 RRM2/3 の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの重ね合わせ。(b) Paip2A(25-83)の滴定に伴う RRM2/3 の A150 シグナルの変化。(c) 上の棒グラフは RRM2 由来のシグナルの化学シフト変化を、下の棒グラフは RRM3 由来のシグナルの化学シフト変化を示す。化学シフト変化は以下の式で算出される。

$$\delta = \sqrt{\Delta_{1H}^2 + (\Delta_{15N}/6.5)^2}$$

ここで、 Δ_{1H} と Δ_{15N} はそれぞれ ¹H と ¹⁵N の方向での化学シフト変化量である。上下のグラフの残基は、RRM2 と RRM3 のアライメントに基づいて配置され、グラフにはこれらのドメインの二次構造が示されている。緑色のラベルを付けたシグナルは、Paip2A(25-83) 添加後に摂動が起こり、Paip2A(25-83) 結合状態でのシグナルは三重共鳴測定においてシグナルが広幅化したため、対応するシグナルを帰属することができなかった。これらの残基はパネル(c)で「Perturbed (P)」と表示されている。グラフ中の α と β の記号は、それぞれ RRM1/2-poly(A) 複合体の結晶構造 [PDB コード: 1CVJ (16)] で観察された α -helix と β -strand を表している。(d) I101 ($\delta > 0.5$ ppm) および、「Perturbed」とラベルされた大きな化学シフト変化を示す RRM2 残基を、RRM2 の結晶構造 [PDB code: 1CVJ (16)] 上に緑でマッピングした。上段はリボンモデル、下段は表面表示モデルである。四角いラベルは、結晶構造上で poly(A) と直接相互作用する残基であることを示す。(e) 「Perturbed」とラベルされた大きな化学シフト変化を示す RRM3 残基を RRM3 のホモロジーモデル上に緑でマッピングした。四角は、結晶構造中で poly(A) と直接相互作用する RRM2 残基と相同である RRM3 の残基を表している。

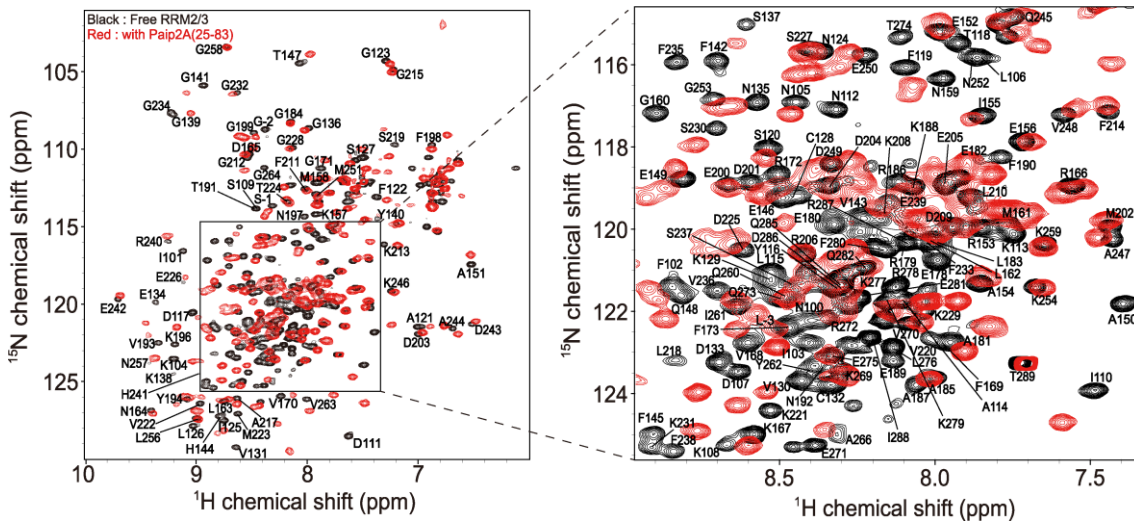
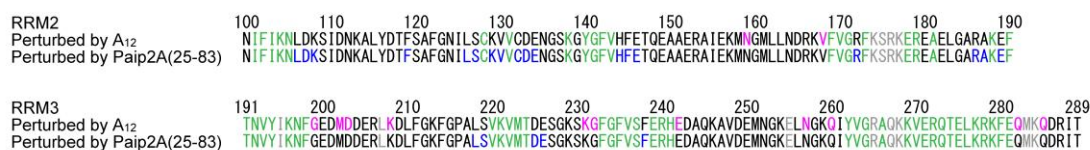
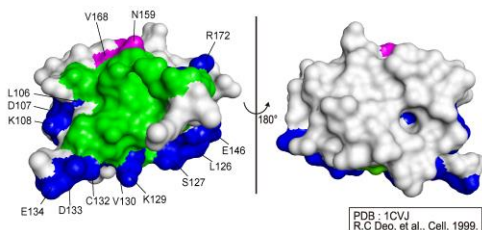


図 25. 1.25 等量の Paip2A(25-83) 非存在下 (黒) と存在下 (赤) における¹⁵N 標識 RRM2/3 の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの重ね合わせ

a



b



c

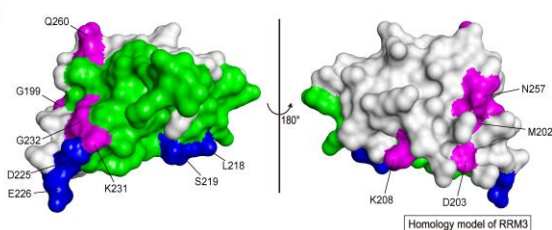


図 26. A₁₂ と Paip2A(25-83) の結合に関与する RRM2/3 残基の比較、および、これらの残基の RRM2 および RRM3 の構造へのマッピング

(a) A₁₂ と Paip2A(25-83) の結合に関与する RRM2/3 残基の比較。図 15d で 0.2ppm 以上の化学シフト変化を示す残基をマゼンタ、図 14c で「Perturbed」と表示された残基を青、A₁₂ と Paip2A(25-83) の両方で摂動を受けた残基を緑で色分けした。(b) A₁₂ と Paip2A(25-83) が相互作用する残基を RRM2 の構造にマッピングしたものの、および、(c) RRM3 の構造上にマッピングしたものの。A₁₂ と Paip2A(25-83) の両方によって摂動された残基は緑で、A₁₂ のみによって摂動されたものはマゼンタで、Paip2A(25-83) のみによって摂動されたものは青で示した。

さらに、A₁₂ 結合型の均一 ¹⁵N 標識 RRM2/3 に対して Paip2A(25-83) を滴定し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトル測定することで、Paip2A(25-83) の添加に伴う A₁₂ 結合型の均一 ¹⁵N 標識 RRM2/3 のスペクトルの変化を調べた。図 27 には、等モル量の Paip2A(25-83) を添加すると、A₁₂ 結合型 RRM2/3 の HSQC スペクトル (図 27a 黒) が、Paip2A(25-83) 結合型 (図 27b 青, 赤) に変化することを明瞭に示している。この結果は、RRM2/3 に対する Paip2A(25-83) と A₁₂ の結合親和性は同等であったのに対し (K_d=1.3-1.9 nM, 表 1,2)、Paip2A(25-83) が A₁₂ に対して競合的に RRM2/3 に結合し、RRM2/3 から A₁₂ を解離させることを示唆している。

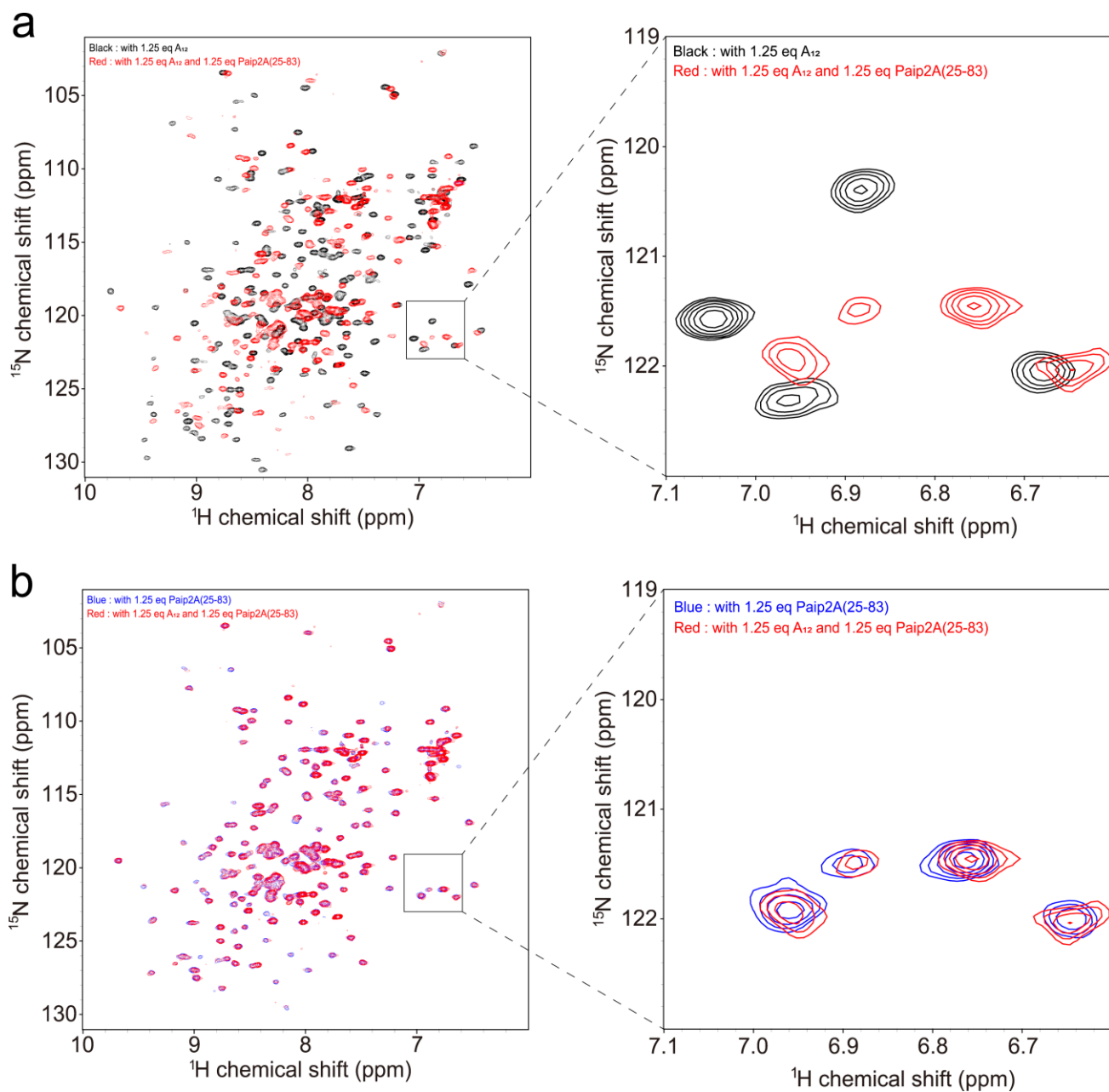


図 27. 等モル量の A_{12} と Paip2A(25-83) の存在下での RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル
 (a) 1.25 等量の A_{12} 存在下 (黒) および 1.25 等量の A_{12} と Paip2A(25-83) の両方の存在下 (赤) での ^{15}N 標識 RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ。(b) 1.25 当量の Paip2A(25-83) 存在下 (青) および 1.25 当量の A_{12} と Paip2A(25-83) の両方の存在下 (赤) での ^{15}N 標識 RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ。

第4章 考察

PABPC1 と相互作用する因子としていくつか同定されている中で、翻訳抑制因子である Paip2 は、PABPC1 を poly(A) から解離させることで細胞やウイルスの増殖を抑制することから注目されている(9, 12, 13)。しかし、Paip2A(FL)-PABPC1 と poly(A)-PABPC1 の相互作用では K_d 値が同程度であることから、Paip2 がどのようにして PABPC1 を効率的に poly(A) から解離させるかは不明であった。

本研究にて行われた Paip2A と RRM との相互作用解析の結果は、これまでの報告されてきた知見 (17) と一致し、Paip2A は主に PABPC1 の RRM2-RRM3 領域と相互作用することが示された。また、PABPC1 の RRM 領域に対する Paip2A の最小相互作用領域は Paip2A のアミノ酸残基番号 26-83 番の領域であり、このことは、RRM2/3 と Paip2A(FL) および Paip2A(25-83) の複合体のスペクトルを重ね合わせによっても確認された (図 28)。

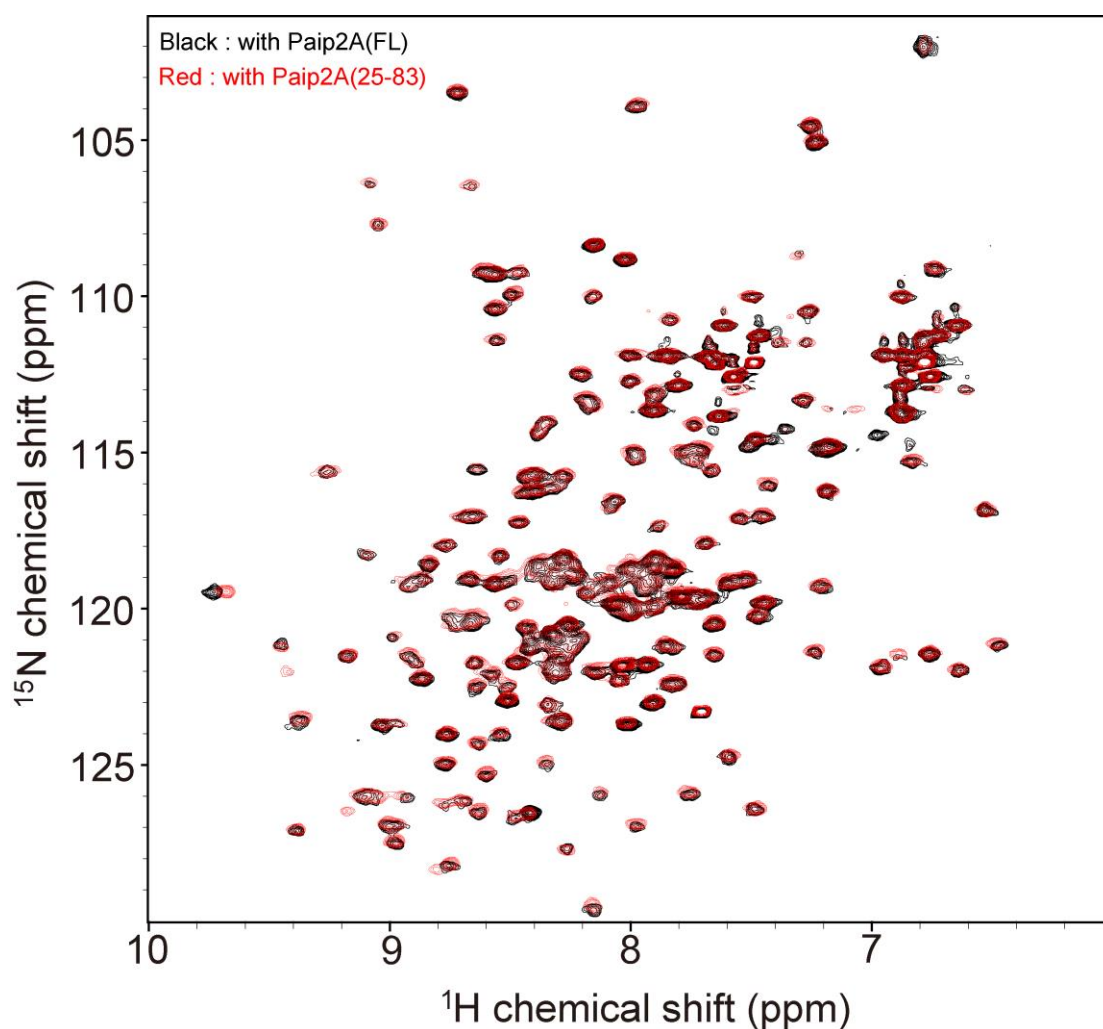


図 28. Paip2A(FL) 存在下 (黒) および Paip2A(25-83) 存在下 (赤) での RRM2/3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの比較

しかしながら、ヒト PABPC1 の各 RRM 領域が poly(A) 結合にどのように寄与しているかは、十分に解明されていなかった。これまでに行われた、アフリカツメガエルの PABPC1 を用いた研究では、RRM4 が最も poly(A) に対する結合親和性が高く、次いで RRM2、RRM3 であり、RRM1 はほとんど結合親和性がなかったと報告されている (26)。本研究において、ITC を用いてヒト PABPC1 の各 RRM と poly(A) との結合親和性を定量的に解析したところ、RRM3 と RRM2 が A₇ に対して最も高い結合親和性 ($K_d = 4.7 \mu\text{M}$ および $200 \mu\text{M}$) を持ち、RRM1 と RRM4 では結合が検出されなかった。各 RRM のアミノ酸配列は非常に類似しているが (図 29)、poly(A) に対する親和性には大きな違いがあった。

RRM	Residue number	Sequence
RRM1	1-99	MNPSAPSYPMASLYVGLDHPDVTEAMLYEKFSPAGPILSIRVCRDMI TRRSLGYAYVNFQOPADAERALDTMNFVDV IKGKPVRI MWSQRPDLRKSQVGVG-----
RRM2	100-190	-----NIFIKNLDKSIDNKALYDTFSAFGNILSCKVVCDE-NG-SKGYGFVHFETQEAAERAIEKMGMLLNDKRVFVGRFKSRKER-EAELGARAKEF-----
RRM3	191-289	-----TNVYIKNFGEWDDELRKDLFGKFGPALSVKVMTDE-SGKSKGFGFVSFERHEDAQKAVDEMNGKELNGKQIYVGRAGKQVER-OTELKRKFEQMKQDRIT
RRM4	290-371	-----RYQGVNLYVKNLDDGIDDERLRKEFSPFGTITSKAVMM-E-GGRSKGFGFVCFSSPEEATKAVTEMNGRIVATKPLYYVALAQRK-----

"*": Conserved in all domains

"." : Amino acids have the same properties.

"." : Amino acids have similar properties.

図 29. 各 RRM ドメインの配列のアラインメント

配列のアラインメントは、Clustal Omega を用いて行った。RRM1、RRM2、RRM3、RRM4 の配列は、それぞれ PABPC1 の残基番号 1-99、100-190、191-289、290-371 に相当する。

注目すべきは、ヒト PABPC1 の RRM1/2 と poly(A) との結晶構造において、RRM1 が poly(A) と結合した状態で観察されたことである(16)。本研究における ITC 解析では poly(A) に対する RRM1 の結合親和性は RRM2 の結合親和性よりもはるかに低かった。RRM1 が結合親和性が低いにも関わらず結晶構造において poly(A) と結合していたことは、RRM1 が poly(A) に結合した RRM2 にリンカーを介してつながっていることにより、poly(A) 近傍の RRM1 の局所濃度が高まる「テザリング効果」が一因であると考えている。

PABPC1 の RRM2 から RRM3 までの領域に対応する欠失変異体である RRM2/3 の A₁₂ に対する結合親和性 ($K_d = 1.3 \text{ nM}$) は、当研究室にて以前に報告された PABPC1-A24 相互作用の結合親和性 ($K_d = 0.69 \text{ nM}$) (15) と同等であった。これらの結果は、PABPC1 の RRM2-RRM3 の領域が Paip2A だけでなく poly(A) との結合においても最も重要な役割を担っていることを明確に示している。

また、NMR 緩和実験の結果、RRM2/3 の 2 つの RRM 領域は、A₁₂ 非存在下では柔軟なリンカーとともに独立してタンブリングするのに対し (表 3)、A₁₂ との結合により RRM とリンカーのタンブリング運動が抑制されることが明らかになった。リンカー領域は A₁₂ との結合により CSP を示したことから、リンカーが A₁₂ との相互作用に参与している可能性が高い。しかし、リンカー領域 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 173-190 番) が本研究に用いた単独の RRM2 (PABPC1 のアミノ酸残基番号 100-190 番) に含まれていることから、単独の RRM に比べて RRM2/3 の親和性が 1000 倍高いのはリンカー相互作用ではなく、「テザリング効果」、つまり、poly(A) に別の RRM が結合するとその RRM と連結した RRM 領域の局所濃度が増加することが強く示唆される (16)。

K_d は以下の関係を満たすことから、RRM2/3 の 2 つの RRM 領域は見かけ上、独立して poly(A) 結合に寄与している。

$$K_d (\text{RRM2/3-A}_{12}) \cong K_d (\text{RRM2-A}_7) \times K_d (\text{RRM3-A}_7).$$

このように、リンカーによるテザリング効果や、poly(A)の塩基配列の繰り返し性により、RRM2/3は単独のRRMと比較して、極めて高い親和性を示す。

RRM2/3に対するA₁₂のNMR滴定実験の結果、RRM2/3はRRM2とRRM3のβシートの表面でpoly(A)に結合することが示唆された。この結合様式はPABPC1のRRM1/2のpoly(A)結合領域(16)と一致する。また、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) (27) や Musashi-1 (28, 29) などの他の多くの核酸結合タンパク質においてもRRMのβシートの表面でRNAに結合することが報告されている。今回のRRM2/3のpoly(A)結合も、核酸結合タンパク質の典型的なRNA結合様式であった。

一方、Paip2AもPABPC1のRRM2-RRM3領域相互作用し、RRM上のPaip2A結合部位はpoly(A)結合部位と重なっていた(図15e、15f、24d、24e)ことから、Paip2AがPABPC1から競合的にpoly(A)を解離させることが強く示唆された。しかし、RRM2とRRM3のPaip2A結合における役割は、poly(A)結合における役割とは異なっていた。Paip2A(25-83)はRRM2、RRM3に対してそれぞれ4.0 μM、1.3 μMとほぼ同じ結合親和性を示したが、Paip2A(25-83)-RRM2/3のK_d(1.9 nM)はPaip2A(25-83)-RRM2のK_d(4.0 μM)とPaip2A(25-83)-RRM3のK_d(1.3 μM)の積(4.0×10⁻⁶×1.3×10⁻⁶=5.2×10⁻¹²)より約400倍大きいことが明らかになった。これらの結果は、RRM2/3に対するPaip2A(25-83)の結合によるギブズ自由エネルギー変化量が、RRM2とRRM3に対するPaip2Aの結合によるギブズ自由エネルギー変化量の和で表せないこと、すなわち、単離されたRRMドメインとPaip2Aの相互作用が、RRM2/3とPaip2Aの相互作用では再現されないことを示しており、このことは、図13cにおいて、Paip2A(25-83)結合RRM2とRRM3の¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを重ね合わせても、Paip2A(25-83)結合RRM2/3の¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを再現できなかったことと整合する。上記のように、poly(A)とPaip2AはPABPC1のRRM2-RRM3領域の同じ界面に、見かけ上同等のK_d値で結合する。しかし、本研究におけるNMR実験のデータは、Paip2A(25-83)がA₁₂からRRM2/3を解離させ、Paip2A(25-83)-RRM2/3複合体を形成することを明確に示している(図27)。

また、Paip2AがどのようにしてPABPC1をpoly(A)から効率的に解離させるかを考察するにあたり、RRM2のpoly(A)への結合親和性がRRM3のpoly(A)への結合親和性に比べて40倍も低いことに注目した。均一¹⁵N標識RRM2/3に対するA₁₂のNMR滴定実験において、A₁₂よりも非常に多いRRM2/3の存在下で、RRM2/3のRRM3領域はRRM2よりも優先的にpoly(A)に結合した(図15b、15c、16a)。このことは、RRM2/3のRRM2領域(RRM2-A₇のK_d=200 μM)が、poly(A)に結合したRRM3領域(RRM3-A₇のK_d=4.7 μM)を介してpoly(A)に繋がれ、RRM2とpoly(A)との相互作用を増強しているにもかかわらず、他のRRM2/3のRRM3領域がRRM2とpoly(A)との相互作用を阻害していることを示唆している。このことは、Paip2AがRRM2に対してRRM3とpoly(A)との相互作用の親和性と同程度の結合親和性[RRM2-Paip2A(25-83)のK_d=4.0 μM]を持っているため、PABPC1のRRM2領域のpoly(A)に対する相互作用をPaip2Aが阻害できることを示唆している。

これらのITCとNMRのデータから、Paip2AがPABPC1をpoly(A)から解離させる、以下の機構を提唱する。Poly(A)に結合したPABPC1では、RRM2-RRM3領域がpoly(A)との結合に主に寄与している(図30a)。PABPC1のRRM2領域のpoly(A)に対する結合親和性(K_d=200 μM)はPaip2A(25-83)に対する結合親和性(K_d=4.0 μM)より50倍弱いため、RRM2領域にPaip2Aが近づくと、RRM2はpoly(A)からPaip2Aへと移行する。さらに、Paip2AはRRM2結合状態においてもRRM3に対して結合可能な領域(Paip2Aのアミノ酸残基番号27-44番)が存在し、かつ、Paip2Aがpoly(A)に結合し

た PABPC1 の RRM2 領域に結合することでテザリング効果を発揮し、また、RRM3 に対する poly(A) 結合親和性 ($K_d=4.7 \mu\text{M}$) と比較して、Paip2A(25-83)の結合親和性 ($K_d=1.3 \mu\text{M}$) は 3.6 倍高いため、Paip2A は RRM3 から poly(A)を取り除くことができる (図 30b)。それにより、PABPC1 が poly(A)から解離する。

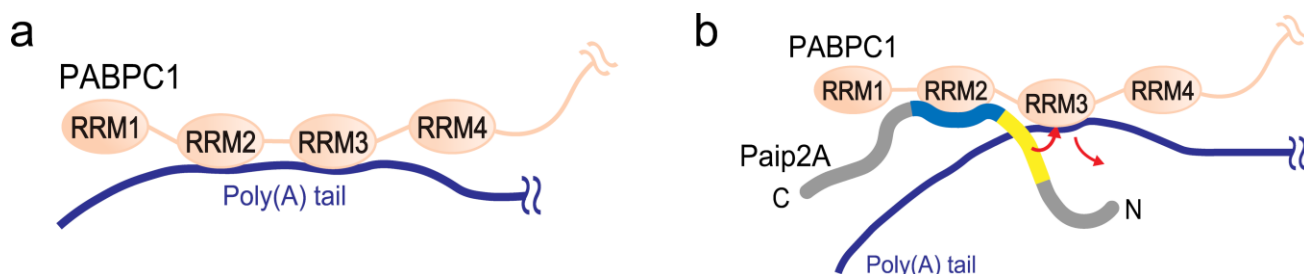


図 30. Paip2A による PABPC1 の poly(A)からの解離の模式図。

(a) Poly(A)に結合した PABPC1 においては、RRM2-RRM3 領域が主に poly(A)との結合に寄与している。(b) RRM2 領域の poly(A)に対する親和性 ($K_d = 200 \mu\text{M}$ 、表 1) は Paip2A に対する親和性 ($K_d = 4.0 \mu\text{M}$ 、表 2) より 50 倍弱いので、RRM2 は poly(A)から Paip2A の RRM2 結合領域 (青)に移行する。次に、Paip2A の RRM3 結合領域 (黄色)が RRM3 に近づくと、RRM3 の poly(A)に対する結合親和性 ($K_d = 4.7 \mu\text{M}$ 、表 1) に比べ、RRM3 への Paip2A の結合親和性 ($K_d = 1.3 \mu\text{M}$ 、表 2) は 3 倍高いため、RRM3 から poly(A)を除去する。

本研究では、Paip2A と poly(A)は PABPC1 に対して同程度の親和性を持つのに対し、Paip2A がどのようにして PABPC1 を競合的に poly(A)から解離させるのか、その分子機構を提唱している。この分子機構と同様の機構が報告されており(30)、それによると、HIF-1 α と CITED2 が CBP の TAZ1 ドメインに対して競合し、TAZ1 結合した HIF-1 α が CITED2 によって効果的に置換される。HIF-1 α と CITED2 の TAZ1 に対する親和性は同等である ($K_d = 10$ nM) にもかかわらず、¹⁵N 標識 TAZ1 と等モル量の HIF-1 α と CITED2 の NMR スペクトルは、¹⁵N 標識 TAZ1 と CITED2 の複合体のものとして一致し、TAZ1 は HIF-1 α と比較して CITED2 に優先的に結合することが示された。また、HIF-1 α の α_A (α_A -helix) は HIF-1 α が TAZ1 と複合体を形成しても高い運動性を示し、CITED2 の α_A は CITED2 が TAZ1 と複合体を形成しても低い運動性を示したことから、TAZ1 に対する結合親和性が HIF-1 α と比較して高く、HIF-1 α と結合した TAZ1 を置き換えることが示唆された。さらに、TAZ1 に結合した HIF-1 α の LPQL 領域が CITED2 の LPEL 領域に置き換わり三者複合体を形成し、次いで HIF-1 α の α_B と α_C が CITED2 に置き換わることがわかった。

Paip2A による PABPC1 の poly(A)からの解離においても、まず Paip2A が poly(A)に対して 50 倍低い結合親和性を示す RRM2 に結合して一過性の三者複合体を形成し、次に RRM3 に結合して poly(A)を RRM3 から置換する。この 2 段階のメカニズムは、上述の CITED2 による HIF-1 α の TAZ1 からの解離によく類似している。一方で、先行研究においては、同等の親和性を持つにもかかわらず効率的な分子の置換が起こるといふ現象が、タンパク質とタンパク質との間の競合において報告(26)されていたが、本研究は、同様の現象がタンパク質と核酸との間においても起こることを示した最初の例である。

本研究により、RRM と poly(A)の結合が Paip2A によって競合的に阻害されることが示唆され、さらに、Paip2A と RRM2 の相互作用が PABPC1 の poly(A)からの解離の起点になっている可能性があることが示された。しかし、RRM2 と RRM3 は高い相同性を持ち、Paip2A を認識する能力があるにもかかわらず、なぜ poly(A)に対する結合親和性が 40 倍も違うのかは不明なままである。そのため、RRM2/3-poly(A)複合体、RRM2-Paip2A 複合体、RRM3-Paip2A 複合体の原子レベルでの立体構造解析は、PABPC1 の分子認識機構の解明や抗がん剤・抗ウイルス剤の開発にさらに貢献する可能性がある。

第5章 総括

5.1 結論

本研究において私は、Paip2A のアミノ酸残基番号 26-83 の領域が PABPC1 の RRM1/2/3/4 との相互作用に参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参与するのは 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。

5.2 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 (16)、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、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、今回私が行った研究により、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 との相互作用に参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が期待できる。

参考文献

1. Hocine, S., Singer, R. H., and Grünwald, D. (2010) RNA processing and export. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–21
2. Svitkin, Y. V., and Sonenberg, N. (2004) An efficient system for cap- and poly(A)-dependent translation in vitro. *Methods Mol. Biol.* **257**, 155–170
3. Melo, E. O., Dhalia, R., De Sa, C. M., Standart, N., and De Melo Neto, O. P. (2003) Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: Role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. *J. Biol. Chem.* **278**, 46357–46368
4. Baer, B. W., and Kornberg, R. D. (1983) The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J. Cell Biol.* **96**, 717–721
5. Safaee, N., Kozlov, G., Noronha, A. M., Xie, J., Wilds, C. J., and Gehring, K. (2012) Interdomain allostery promotes assembly of the poly(A) mRNA complex with PABP and eIF4G. *Mol. Cell.* **48**, 375–386
6. Hoshino, S. I., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., and Katada, T. (1999) The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA. Direct association of eRF3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 16677–16680
7. Chorghade, S., Seimetz, J., Emmons, R., Yang, J., Bresson, S. M., de Lisio, M., Parise, G., Conrad, N. K., and Kalsotra, A. (2017) Poly(A) tail length regulates PABPC1 expression to tune translation in the heart. *Elife.* **6**, 1–19
8. Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1997) Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science.* **276**, 1268–1272
9. Polacek, C., Friebe, P., and Harris, E. (2009) Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J. Gen. Virol.* **90**, 687–692
10. Perez, C., McKinney, C., Chulunbaatar, U., and Mohr, I. (2011) Translational control of the abundance of cytoplasmic poly(A) binding protein in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* **85**, 156–164
11. Khaleghpour, K., Svitkin, Y. V., Craig, A. W., DeMaria, C. T., Deo, R. C., Burley, S. K., and Sonenberg, N. (2001) Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol. Cell.* **7**, 205–216
12. Rosenfeld, A. B. (2011) Suppression of cellular transformation by poly (A) binding protein interacting protein 2 (Paip2). *PLoS One.* **6**, 2–6
13. McKinney, C., Yu, D., and Mohr, I. (2013) A new role for the cellular PABP repressor Paip2 as an innate restriction factor capable of limiting productive cytomegalovirus replication. *Genes Dev.* **27**, 1809–1820
14. Eliseeva, I. A., Lyabin, D. N., and Ovchinnikov, L. P. (2013) Poly(A)-binding proteins: Structure, domain organization, and activity regulation. *Biochem.* **78**, 1377–1391
15. Sawazaki, R., Imai, S., Yokogawa, M., Hosoda, N., Hoshino, S. I., Mio, M., Mio, K., Shimada, I., and Osawa, M. (2018) Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A)

tail. *Sci. Rep.* **8**, 1–13

16. Deo, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1999) Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell*. **98**, 835–845
17. Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y. V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001) Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5200–5213
18. Kozlov, G., Ménade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L., and Gehring, K. (2010) Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *J. Mol. Biol.* **397**, 397–407
19. Gryk, M. R., Abseher, R., Simon, B., Nilges, M., and Oschkinat, H. (1998) Heteronuclear relaxation study of the PH domain of β -spectrin: Restriction of loop motions upon binding inositol trisphosphate. *J. Mol. Biol.* **280**, 879–896
20. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137
21. Webb, B., and Sali, A. (2017) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* **1654**, 39–54.
22. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) The ^{13}C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR.* **4**, 171–180
23. Aznauryan, M., Delgado, L., Soranno, A., Nettels, D., Huang, J. R., Labhardt, A. M., Grzesiek, S., and Schuler, B. (2016) Comprehensive structural and dynamical view of an unfolded protein from the combination of single-molecule FRET, NMR, and SAXS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E5389–E5398
24. Dominguez, C., Schubert, M., Duss, O., Ravindranathan, S., and Allain, F. H. T. (2011) Structure determination and dynamics of protein-RNA complexes by NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **58**, 1–61
25. Barraud, P., and Allain, F. H. T. (2013) Solution structure of the two RNA recognition motifs of hnRNP A1 using segmental isotope labeling: How the relative orientation between RRM s influences the nucleic acid binding topology. *J. Biomol. NMR.* **55**, 119–138
26. Nietfeld, W., Mentzel, H., and Pieler, T. (1990) The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *EMBO J.* **9**, 3699–3705
27. Lukavsky, P. J., Daujotyte, D., Tollervey, J. R., Ule, J., Stuani, C., Buratti, E., Baralle, F. E., Damberger, F. F., and Allain, F. H. T. (2013) Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the human splicing factor TDP-43. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1443–1449
28. Ohyama, T., Nagata, T., Tsuda, K., Kobayashi, N., Imai, T., Okano, H., Yamazaki, T., and Katahira, M. (2012) Structure of Musashi1 in a complex with target RNA: The role of aromatic stacking interactions. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3218–3231
29. Iwaoka, R., Nagata, T., Tsuda, K., Imai, T., Okano, H., Kobayashi, N., and Katahira, M. (2017) Structural insight into the recognition of r(UAG) by Musashi-1 RBD2, and construction of a model of Musashi-1 RBD1-2 bound to the minimum target RNA. *Molecules.* **22**, 1–16

30. Berlow, R. B., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2017) Hypersensitive termination of the hypoxic response by a disordered protein switch. *Nature*. **543**, 447–451

謝辞

本研究の機会を与えてくださり、日々の熱心なご指導、ご配慮を賜りました慶應義塾大学薬学部 生命機能物理学講座の大澤匡範教授に心より深くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究の進め方、文章の書き方、発表の仕方等、常に熱心にご指導してくださいました、慶應義塾大学薬学部生命機能物理学講座の横川真梨子専任講師に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、研究の進め方や実験手技に関して有益な助言をくださいました、慶應義塾大学薬学部生命機能物理学講座の沢崎綾一博士に感謝いたします。

翻訳調節因子プラスミドを恵与くださいました、名古屋市立大学大学院薬学系研究科の星野真一教授ならびに細田直准教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、PABPC1 の発現プラスミドをご恵与くださり、NMR の装置を使用させてくださった、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の嶋田一夫教授、および、東京大学大学院薬学研究科に心より御礼申し上げます。

本研究で使用した PABPC1 の発現・精製系を構築して頂きました、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室の今井駿輔博士に心より感謝します。

研究内容に関して貴重なご助言とご助力を頂きました、慶應義塾大学薬学部生命機能物理学講座、秋元まどか助教、福田昌弘助教、原田彩佳助教に深く感謝します。

セミナー等を通じ、異なる分野の視点から本研究に助言をくださいました、慶應義塾大学薬学部生命機能物理学講座の池田和由特任准教授、清水祐吾特任助教、米澤朋起特任助教に深く感謝いたします。

日々の研究生生活を共に過ごし、多くのことを学ばせてくださいました、慶應義塾大学薬学部生命機能物理学講座の皆様感謝いたします。特に、私の稚拙な指導にも関わらず共に研究に取り組んでくれた高嶋大翔学士、城えりか学士、石井裕一郎君、小島行人君、西村錬君、西田優理華さんに感謝します。

研究を行なうにあたり、資金を給付していただいた佐藤製薬株式会社に心より御礼申し上げます。

最後に、私の研究生生活を常に温かく支援してくれた家族、および、長津星華学士に感謝します。