

## 活性化と阻害のあいだ

## — 翻訳因子の二律背反 —

## 概要

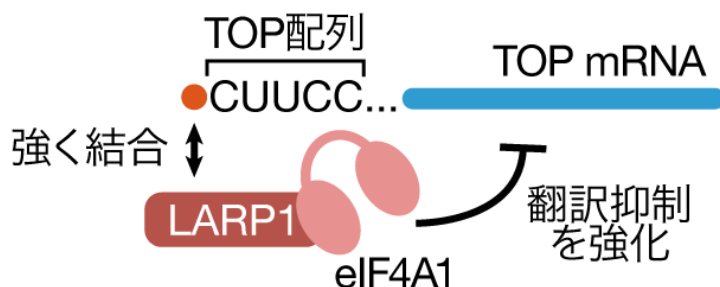
理化学研究所（理研）開拓研究本部岩崎 RNA システム生化学研究室の岩崎信太郎主任研究員、七野悠一研究員、生命機能科学研究センター翻訳構造解析研究チームの伊藤拓宏チームリーダー、柏木一宏研究員、九州大学大学院医学研究院薬理学分野の久場敬司教授、山口智和助教らの国際共同研究グループは、長年翻訳<sup>[1]</sup>を促進すると考えられてきた翻訳開始因子<sup>[1]</sup>eIF4A1 が、栄養飢餓時に翻訳に対して抑制的に働くという想定と逆の役割があることを発見しました。

本研究成果は、翻訳の制御機構に対する根本的な理解と、これらの機構が関与するがんなどの疾患の治療法の開発につながるものと期待されます。

メッセンジャーRNA (mRNA) <sup>[2]</sup>上の遺伝情報を読み取ってタンパク質を合成する翻訳過程で、その頻度を決定する翻訳開始は、多数の翻訳開始因子によって厳密に制御されており、特に重要です。翻訳開始因子の中で最も豊富に存在するのが eIF4A です。eIF4A は翻訳を阻害する mRNA 上の二次構造<sup>[3]</sup>を解消して翻訳を促進するために必要と考えられていました。一方、二次構造の解消以外の機能も示唆されていますが、その機能の全貌は不明でした。

国際共同研究グループは、eIF4A の一つである eIF4A1 が RNA 結合タンパク質 LARP1 を介して TOP mRNA<sup>[4]</sup>に強く結合することを発見しました。LARP1 は栄養飢餓時に TOP mRNA の翻訳を強く抑制するために必要な因子ですが、eIF4A1 は LARP1 と TOP mRNA の結合を強化することで、TOP mRNA に対する翻訳抑制を強めていることが分かりました。

本研究は、科学雑誌『*Nature Structural & Molecular Biology*』オンライン版（5月21日付：日本時間5月21日）に掲載されました。



eIF4A1 による TOP mRNA の翻訳抑制の増強機構

## 背景

mRNA 上の遺伝情報からタンパク質を合成する翻訳過程のうち、リボソーム<sup>[5]</sup>が mRNA に誘導されて翻訳開始点を探索する過程を翻訳開始と呼びます。この過程は翻訳をいつ、どの程度行うかを決定しており、翻訳開始因子と呼ばれる多数の因子によって厳密に制御されています。翻訳開始因子の中でも最も豊富に存在する因子が eIF4A です。eIF4A は 40 年以上前に発見され、翻訳開始を阻害する mRNA 上の二次構造を解消し、翻訳を促進すると考えられてきました。しかし、eIF4A には二次構造の解消以外の機能があることが近年報告され<sup>注1)</sup>、多面的な機能を持つ因子である可能性が示唆されてきました。

eIF4A はがんや感染症などの疾患と深く関係しており、eIF4A を標的とする薬剤<sup>注2)</sup>も多数開発されています。しかし、その機能には不明な点が多く残されています。そのため、eIF4A の機能を正確に理解することは疾患治療の観点からも重要な課題です。

注1) Sen, N. D., Zhou, F., Ingolia, N. T. & Hinnebusch, A. G. Genome-wide analysis of translational efficiency reveals distinct but overlapping functions of yeast DEAD-box RNA helicases Ded1 and eIF4A. *Genome Res.* 25, 1196–1205 (2015).

注2) Zotatifin (eFT226) など。

## 研究手法と成果

まず、国際共同研究グループは RNA pulldown-Seq 法<sup>[6]</sup>と呼ばれる手法を使って、eIF4A と結合する RNA を次世代シーケンサー<sup>[7]</sup>により網羅的に解析しました。ヒト培養細胞 HEK293 は配列のよく似た 2 種類の eIF4A (eIF4A1 と eIF4A2) を持っていますが、そのうち量の多い eIF4A1 に着目して実験を行いました。その結果、eIF4A1 は TOP mRNA と特に強く結合することが分かりました (図 1A)。

次に、eIF4A1 が TOP mRNA と強く結合する機構を探りました。eIF4A1 はどのような配列の RNA にも結合するため、TOP mRNA との結合には何らかの選択的な RNA 結合タンパク質が介在していると考えられました。そこで、eIF4A1 に結合するタンパク質を質量分析<sup>[8]</sup>で網羅的に解析したところ、LARP1 という RNA 結合タンパク質を同定しました (図 1B)。LARP1 は mRNA のキャップ構造<sup>[9]</sup>と TOP 配列<sup>[4]</sup>に選択的に結合することが報告されていました。そこで、LARP1 の量を低下させたところ、eIF4A1 と TOP mRNA の結合が弱まりました (図 1C)。よって、eIF4A1 は LARP1 を介して TOP mRNA に結合していることが分かりました。

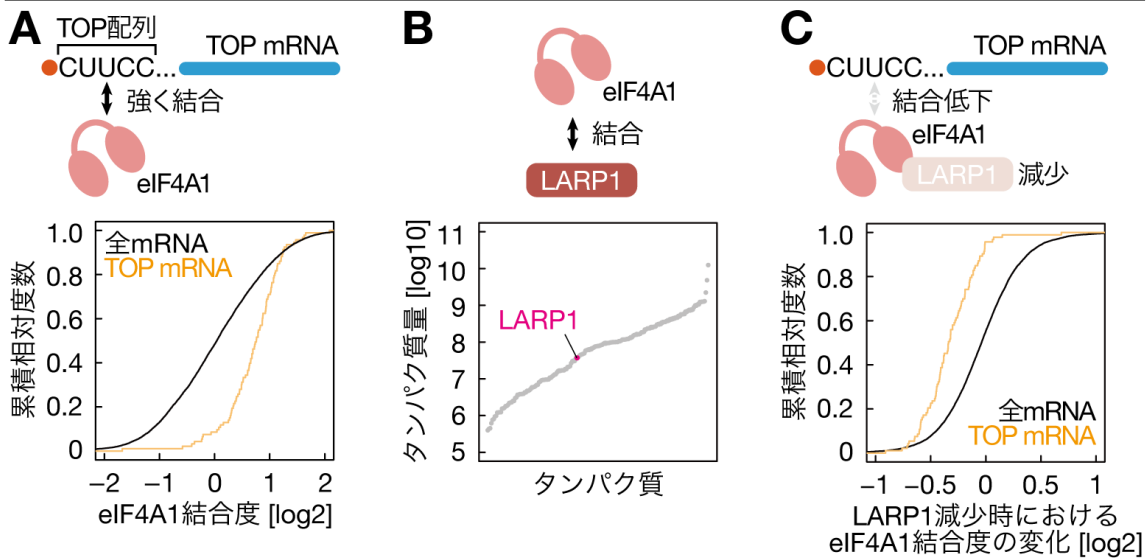


図1 LARP1を介したeIF4A1とTOP mRNAの結合

- (A) eIF4A1のTOP mRNAとの強い結合。RNA pull-down-Seq法により、eIF4A1と結合するRNAを網羅的に解析した。TOP mRNAは全mRNAに比べeIF4A1と強く結合する傾向にあった。
- (B) eIF4A1とLARP1の結合。質量分析によりeIF4A1と結合するタンパク質を網羅的に同定し、その中にLARP1を発見した。
- (C) LARP1を減少させた際のeIF4A1とTOP mRNAの結合変化。LARP1に対しsiRNA (small interfering RNA: RNA干渉をする低分子2本鎖RNA)を用いてその量を減少させ、RNA pull-down-Seq法によりeIF4A1と結合するRNAを網羅的に解析した。TOP mRNAはLARP1減少に応じてeIF4A1との結合度が顕著に低下した。

翻訳はエネルギーを大量に消費するため、細胞は生育環境における栄養の量に応じて翻訳量を厳密に調節しています。TOP mRNAは翻訳制御に重要なタンパク質をコードしており、その翻訳は栄養、特にアミノ酸の飢餓時にLARP1によって急速に抑制されます。アミノ酸が豊富な場合は栄養源認識に重要な因子であるmTOR<sup>[10]</sup>がLARP1を不活性化するためTOP mRNAの翻訳は効率的に行われていますが、アミノ酸飢餓時にはmTORが不活性化するため、LARP1が活性化され、LARP1とTOP mRNAとが強固に結合して翻訳を抑制します(図2A)。このようにLARP1を介した翻訳抑制機構は細胞がアミノ酸飢餓に対応する上で重要です。しかし、LARP1が単独でTOP mRNAを翻訳抑制しているのかは不明でした。

そこで、翻訳抑制機構におけるeIF4A1の影響を調べるため、アミノ酸飢餓状態においてmTORの阻害剤をeIF4A1欠損細胞に与え、リボソームプロファイリング法<sup>[11]</sup>を用いて細胞内の翻訳状況を網羅的に解析しました。その結果、eIF4A1欠損細胞ではmTORの阻害時のTOP mRNAの翻訳抑制が弱くなることが分かりました(図2B)。

次に、精製タンパク質を用いてTOP mRNAとLARP1との結合を測定し、翻訳抑制に必要な結合強度を調べました。その結果、eIF4A1がLARP1とTOP mRNAとの結合を強めていることが判明しました(図2C)。

長期間 mTOR を阻害して TOP mRNA の翻訳を抑制し続けると、細胞の増殖に必要な翻訳が行えなくなり生存率が低下していきます。しかし、eIF4A1 欠損細胞では、mTOR を阻害してもあまり生存率が低下しませんでした (図 2D)。また、マウスの eIF4A1 欠損細胞でも同様の結果が見られ、種を超えて保存された機構であることも分かりました。

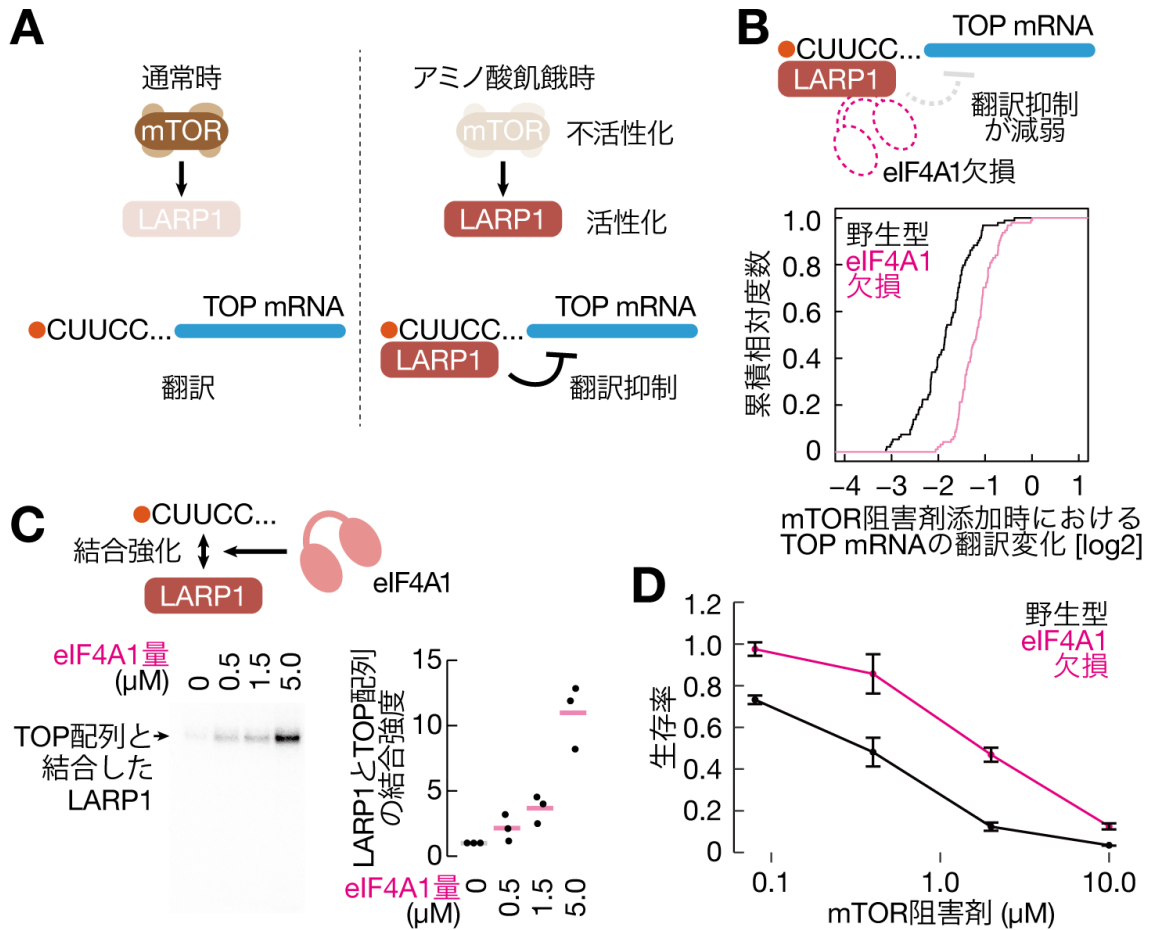


図 2 TOP mRNA 翻訳抑制機構における eIF4A1 の影響

- (A) 通常時では mTOR が LARP1 を不活性化するため、TOP mRNA の翻訳は効率的に行われている。アミノ酸飢餓時では mTOR が不活性化するため、LARP1 が活性化して TOP mRNA と結合し翻訳を抑制する。
- (B) eIF4A1 欠損細胞における TOP mRNA の翻訳抑制。細胞に mTOR 阻害剤を与え、リボソームプロファイリング法により TOP mRNA の翻訳変化を網羅的に解析した。eIF4A1 の欠損により TOP mRNA の翻訳抑制は減弱した。
- (C) TOP 配列と LARP1 の試験管内結合実験。eIF4A1 と LARP1 の精製タンパク質と放射線標識した TOP 配列の合成 RNA を混合し、紫外線により強固に結合させた後、電気泳動により LARP1 と eIF4A1 を分離させた。タンパク質と結合した TOP 配列の量は対応するバンド強度に反映される。eIF4A1 を加えると添加量依存的にバンド強度が強くなり、eIF4A1 が LARP1 と TOP 配列の結合を強化していることが分かった。
- (D) mTOR 阻害剤を加えた際の生存率。野生型と eIF4A1 欠損細胞に対して mTOR 阻害剤を添加して生存率を測定した。eIF4A1 を欠損すると mTOR 阻害剤に対して耐性を持つようになった。
- (C) (D) にある  $\mu\text{M}$  は  $\mu\text{mol/L}$ 。

最後に、eIF4A1 とよく似た配列を持つ因子である eIF4A2 の影響も調べました。eIF4A2 は TOP mRNA とあまり強く結合せず、LARP1 との結合も eIF4A1 と比べて弱いことが分かりました。また、eIF4A2 欠損細胞では TOP mRNA の翻訳抑制が弱まる効果が見られず、eIF4A2 は LARP1 による TOP mRNA の翻訳抑制機構には必要ないことが分かりました。

以上から、eIF4A1 は mTOR 阻害時において LARP1 の持つ翻訳抑制能力を高めている、つまり翻訳に対して抑制的に働くという、これまでの想定とは逆の機能を持つことが明らかになりました (図 3)。

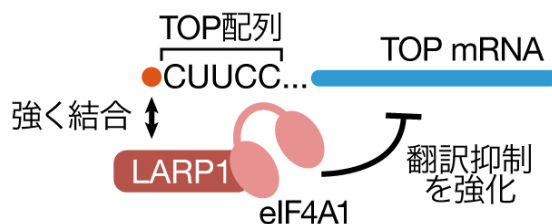


図 3 eIF4A1 による翻訳抑制の増強

アミノ酸飢餓によって mTOR が阻害された際、LARP1 が活性化され TOP mRNA の翻訳が抑制される。eIF4A1 は LARP1 と結合し、その後 TOP mRNA との結合および翻訳抑制能を強化する。

## 今後の期待

本研究は翻訳に対して促進的に働くと考えられてきた eIF4A1 が、LARP1 という結合因子を介して抑制的に働くという新しい機能を明らかにしました。岩崎主任研究員らの研究グループは、eIF4A1 がロカグレートという薬剤と結合した際に翻訳を抑制することを発見していましたが<sup>注3)</sup>、今回の結果は薬剤処理のない生理的な条件でも翻訳阻害効果を示すという初めての発見となります。

mTOR はがん細胞の増殖にも必要なためその阻害剤は抗がん剤として期待されていますが、一部のがん細胞は耐性を持つため治療における障害となっています。今回得られた eIF4A1 を欠損すると mTOR 阻害剤に対して耐性を示すという結果は、がん細胞の mTOR 阻害剤耐性を予測するための指標となる可能性があり、mTOR 阻害剤を用いたより良いがん治療へつながることが期待されます。

注3) 2018年12月28日プレスリリース「植物由来抗がん剤の仕組み」  
[https://www.riken.jp/press/2018/20181228\\_1/](https://www.riken.jp/press/2018/20181228_1/)

## 論文情報

<タイトル>

eIF4A1 enhances LARP1-mediated translational repression during mTORC1 inhibition

<著者名>

Yuichi Shichino, Tomokazu Yamaguchi, Kazuhiro Kashiwagi, Mari Mito, Mari

---

Takahashi, Takuhiro Ito, Nicholas T. Ingolia, Keiji Kuba, and Shintaro Iwasaki

<雑誌>

*Nature Structural & Molecular Biology*

<DOI>

10.1038/s41594-024-01321-7

## 補足説明

### [1] 翻訳、翻訳開始因子

翻訳とは、mRNA へコピーされた塩基配列をアミノ酸配列へ変換して、リボソームでアミノ酸を順番につなげてタンパク質を合成すること。翻訳開始因子とは、細胞内でタンパク質の合成（翻訳）を行うリボソームが、合成を開始する際に協調的に働くタンパク質群。真核生物の翻訳開始因子は真核生物型開始因子 (eIF : eukaryotic Initiation Factor) と呼ばれる。

### [2] メッセンジャーRNA (mRNA)

タンパク質のアミノ酸の並び方の情報（コドン）を持つ RNA のこと。リボソームによってそのコドンが読み取られ、タンパク質が合成される。

### [3] 二次構造

1 本鎖 RNA 内の塩基が結合することにより部分的に形成された 2 本鎖構造。翻訳開始においては障害となるため、塩基間の結合を解消する必要がある。RNA の塩基配列によって結合の強弱が異なるため、二次構造が翻訳開始を阻害する強さも RNA ごとに異なる。

### [4] TOP mRNA、TOP 配列

TOP 配列とは、末端のキャップ構造の直後にシトシン (C : Cytosine) 塩基とウラシル (U : Uracil) 塩基が連続する Tandem Oligo Pyrimidine (TOP) と呼ばれる配列のこと。TOP mRNA とは、TOP 配列を持つ mRNA のこと。

### [5] リボソーム

リボソーム RNA (rRNA) とリボソームタンパク質から構成される超巨大複合体。リボソームはメッセンジャーRNA (mRNA) にコードされているコドンを読み取り、タンパク質を合成する。

### [6] RNA pulldown-Seq 法

細胞の破碎液から目的タンパク質をプルダウンし、結合している RNA 配列を次世代シーケンサーにより同定する解析法。

### [7] 次世代シーケンサー

DNA の塩基配列を決定するための装置。複数の DNA 断片の塩基配列を同時並行で、高速・高精度に決定できる。

### [8] 質量分析

物質を原子・分子レベルの微細なイオンにし、その質量数と数を測定することで物質

の同定や定量を行う。

#### [9] キャップ構造

真核生物の mRNA の 5'末端に特徴的な構造。核酸の重合は通常 5'→3'で結合が進むが、mRNA の 5'末端は修飾反応によりグアノシンが 5'-5'結合となっている。mRNA の 5'末端の保護や、翻訳開始因子と mRNA の結合に関わっている。

#### [10] mTOR

細胞外から入力されるさまざまなシグナルに応じて、細胞増殖やオートファジーなどを制御しているセリン/スレオニンキナーゼ。mTOR は mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin の略。

#### [11] リボソームプロファイリング法

組織や細胞から翻訳装置であるリボソームを抽出し、リボソームと結合している RNA 配列を同定することで、どの遺伝子がどの程度の効率で翻訳されているかを解析する。リボソームは大きな複合体であるため、一定の mRNA 領域を覆うように結合する。これらのリボソームと mRNA の複合体を RNA 分解酵素で処理すると、リボソームが保護する mRNA 断片だけが分解されずに回収される。

### 国際共同研究グループ

#### 理化学研究所

開拓研究本部 岩崎 RNA システム生化学研究室

主任研究員 岩崎信太郎 (イワサキ・シントロウ)

研究員 七野悠一 (シチノ・ユウイチ)

テクニカルスタッフ I 水戸麻理 (ミト・マリ)

生命機能科学研究センター 翻訳構造解析研究チーム

チームリーダー 伊藤拓宏 (イトウ・タクヒロ)

研究員 柏木一宏 (カシワギ・カズヒロ)

テクニカルスタッフ I 高橋真梨 (タカハシ・マリ)

九州大学大学院 医学研究院 基礎医学部門 生体情報科学講座

教授 久場敬司 (クバ・ケイジ)

助教 山口智和 (ヤマグチ・トモカズ)

カリフォルニア大学バークレー校 (米国) Department of Molecular and Cell Biology

助教授 ニコラス・インゴリア (Nicholas T. Ingolia)

### 研究支援

本研究は、理化学研究所運営費交付金組織横断連携プロジェクト「ライフサイエンスの横断的取組による超高齢社会課題解決への貢献(研究分担者:岩崎信太郎、伊藤拓宏)」、RIKEN Pioneering Projects「Biology of Intracellular Environments (研究分担者:岩崎信太郎、伊藤拓宏)」、Dynamic Structural Biology Project (伊藤拓宏)、奨励課題(七野悠一)、基礎科学特別研究員制度(七野悠一)で実施し、日本学術振興会(JSPS)科学研究費助成事業学術変革領域研究(A)「APEX-Ribo-Seq:近傍標識による非典型局所翻訳の網羅解析(研究代表者:七野悠一)」、同学術変革領域研究(B)「新規 Disome-Seq 法:パラメトリックなりボソーム渋滞の網羅的探索(研究代表者:岩崎信太郎)」、同若手研

究 (A)「翻訳開始因子パラログによる選択的翻訳の網羅的解析 (研究代表者: 岩崎信太郎)」、同基盤研究 (B)「複合体間の動的な相互作用による翻訳制御の構造基盤 (研究代表者: 伊藤拓宏)」「循環代謝病における RNA 時空間制御機構の解明 (研究代表者: 久場敬司)」、同挑戦的研究 (萌芽)「癌の転移・再発における細胞外 Galectin-X を介した免疫抑制機構の解明 (研究代表者: 久場敬司)」、同若手研究「翻訳開始因子 eIF4A1 とグルタミン代謝による協調的な発現制御機構 (研究代表者: 七野悠一)」「ストレス環境における翻訳開始因子 eIF2B の活性阻害機構の解明 (研究代表者: 柏木一宏)」による助成、および理化学研究所脳神経科学研究センター生体物質分析支援ユニットの支援を受けて行われました。

## 発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所

開拓研究本部 岩崎 RNA システム生化学研究室

主任研究員

岩崎信太郎 (イワサキ・シンタロウ)

研究員

七野悠一 (シチノ・ユウイチ)

生命機能科学研究センター 翻訳構造解析研究チーム

チームリーダー

伊藤拓宏 (イトウ・タクヒロ)

研究員

柏木一宏 (カシワギ・カズヒロ)

九州大学 大学院医学研究院 薬理学分野

教授

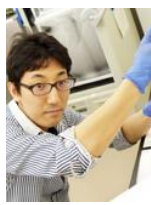
久場敬司 (クバ・ケイジ)

助教

山口智和 (ヤマグチ・トモカズ)



岩崎信太郎



七野悠一



伊藤拓宏



柏木一宏



久場敬司



山口智和

<機関窓口>

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel: 050-3495-0247

Email: ex-press [at] ml.riken.jp

九州大学 広報課

Tel: 092-802-2130

Email: koho [at] jimukyushu-u.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。