

194. Poliovirus の IRES 依存的翻訳機構と組織特異的増殖との相関

藤原 俊伸

*名古屋市立大学 大学院薬学研究科 衛生化学分野

Key words : 翻訳, ポリオウイルス

緒言

Internal Ribosome Entry Site (IRES) 依存的翻訳開始機構はポリオウイルスなどのピコルナウイルスにおいて初めて提唱された。特にポリオウイルスは強毒株と弱毒株において神経組織特異的な増殖性が異なっており、この原因が IRES に由来すると考えられている。従って、IRES による組織特異的翻訳開始機構の素過程を明らかにする上で、ポリオウイルスの IRES は優れたモデルである。また、各組織によって IRES に特異的に結合する宿主因子が異なることが、ポリオウイルス強毒株の組織特異性獲得のメカニズムであると考えられる。すなわち、ポリオウイルス強毒株の IRES に結合する神経特異的な宿主因子を網羅的に同定することで、組織特異的な翻訳開始機構の包括的な理解が得られると期待される。本研究は、ポリオウイルスの IRES 依存的翻訳開始機構を制御する宿主因子を同定し、機能解析を行うことで、ポリオウイルスの組織特異性に寄与する IRES 依存的翻訳開始機構の素過程を解明することを最終目的とする。

方法および結果

ポリオウイルスは、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されるウイルスで、ゲノム RNA がそのまま mRNA として機能するため、+鎖 RNA ウイルスに分類される。人に対して経口感染すると、咽頭部や腸管の粘膜上皮で増殖し、続いて血液を介して全身に伝播し、神経筋接合部から逆行性輸送されて中枢神経に到達する。また、血液脳関門を通過し、中枢神経に達する経路も知られている。運動神経でウイルスが増殖すると、ポリオ（急性灰白髄炎）を引き起こし、弛緩性の麻痺などの症状を呈する。ポリオウイルスには、主に神経毒性のある強毒株（Mahoney 株）とワクチンとして利用される弱毒株（Sabin 株）が存在する。どちらも消化管での増殖効率は同程度であるが、神経細胞では Mahoney 株の増殖効率が良く、その結果、神経毒性を発揮する。興味深いことに、この神経細胞での病原性の違いは IRES 配列中の変異が原因であると報告されている（図 1）。

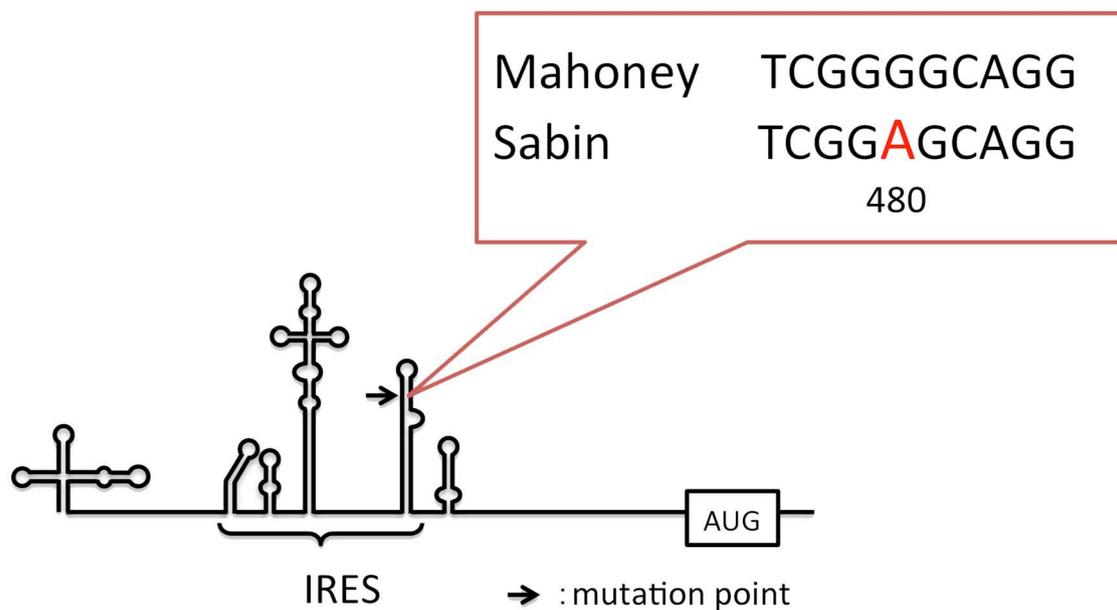


図1. 強毒株 (Mahoney) と弱毒株 (Sabin) 由来 IRES の相違

ポリオウイルスには、主に神経毒性のある Mahoney 株とワクチンとして利用される Sabin 株が存在する。どちらも消化管での増殖効率は同程度であるが、神経細胞では Mahoney 株の増殖効率が良く、その結果、神経毒性を発揮する。興味深いことに、この神経細胞での病原性の違いは IRES 配列中のたった1塩基の変異が原因であると報告されている。

IRES はウイルス翻訳にとって重要な配列である。そのため、Sabin 株は IRES 配列中の変異により、神経での IRES 依存的翻訳が活性化しないために、神経毒性の低下をもたらしていると考えられる。そして、神経での IRES 依存的翻訳の活性化には神経特異的に関与する IRES trans-acting factors (ITAFs) の存在が示唆されている。しかしながら、今日までヒト神経細胞を用いた *in vitro* 翻訳系が存在せず、翻訳段階に関与する因子を厳密に見ることが可能な系が構築されていなかったことから、神経特異的に働く ITAFs は同定されていない。また、ポリオウイルス強毒株と弱毒株由来 IRES 依存的タンパク質合成を比較するためには、神経細胞由来抽出物と IRES レポーター mRNA を用いた *in vitro* 翻訳系の構築が必須である (図2)。

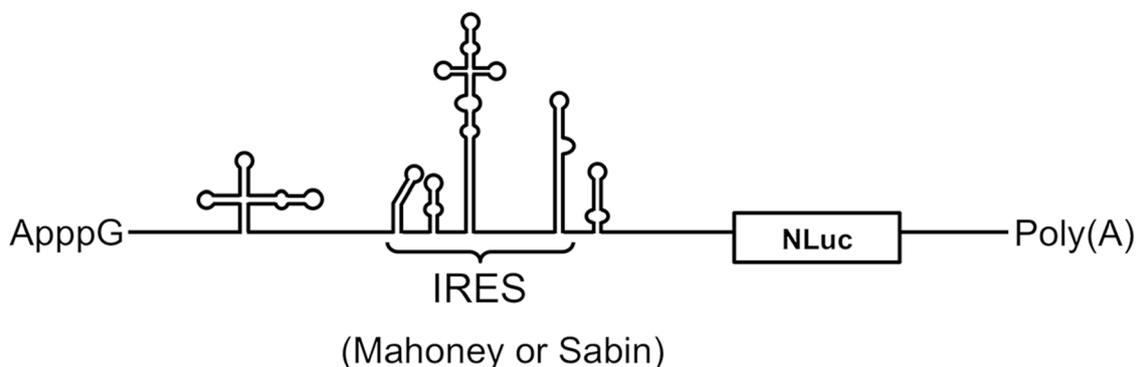


図2. IRES レポーター mRNA

5'末端に翻訳開始複合体に認識されない ApppG cap-analog (Acap) を、5'非翻訳領域に Mahoney 株または Sabin 株 IRES を付加させ、レポーター (Nluc) をコードしたもの。

我々はこれまでに cap および poly (A) 配列依存的な翻訳を厳密に評価できるヒト培養細胞を用いた *in vitro* 翻訳系を構築している^{1,2)}。また、C 型肝炎ウイルス (HCV) 由来 IRES の翻訳を評価できる実験系も構築済みである³⁾。そこで、この系を拡張し、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞抽出物を利用した *in vitro* 翻訳系の構築を行った。その結果、HeLa 細胞由来抽出物を用いた *in vitro* 翻訳系において、強毒株と弱毒株の IRES 依存的翻訳に有意な差が見られなかった。一方で、SK-N-SH 細胞由来抽出物を用いた *in vitro* 翻訳系において弱毒株 IRES からの翻訳が強毒株 IRES の翻訳に比べ、約 1/10 に低下していた (図 3 上段)。次に、観察された神経細胞中でのポリオウイルス弱毒株由来 IRES 依存的タンパク質合成の低下が、反応系におけるレポーター mRNA の安定性に起因するものかどうかを確認する目的で、反応液から RNA を抽出し、ノザンプロットングを行った。その結果、HeLa 細胞由来の翻訳系において、total RNA と系に加えたレポーター mRNA の安定性に差はなかった。さらに、SK-N-SH 細胞由来抽出物の翻訳系においても、レポーター mRNA の安定性に差はなかった (図 3 下段)。

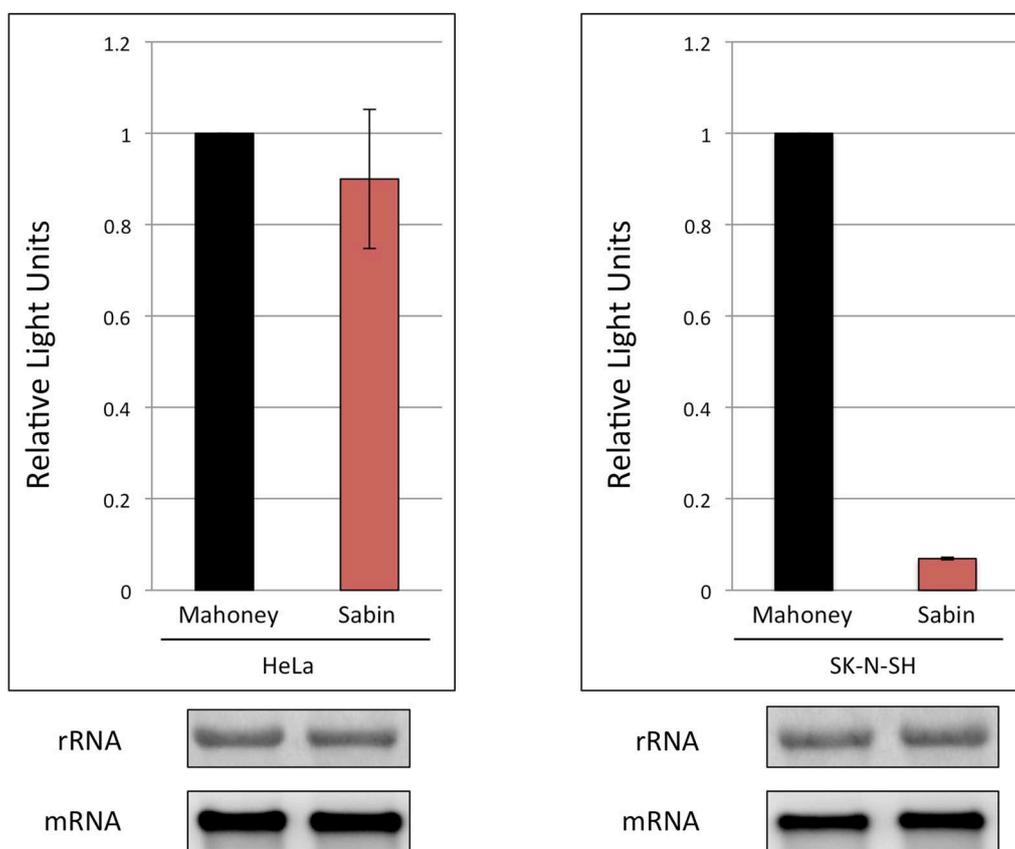


図 3. *In vitro* 翻訳解析

(上段) *in vitro* 翻訳活性解析の結果を上図に示す。HeLa 細胞抽出液での *in vitro* 翻訳活性の結果が左のグラフ、SK-N-SH 細胞抽出液での *in vitro* 翻訳活性の結果が右のグラフである。

(下段) 上：コントロールの rRNA、下：翻訳反応後のレポーター mRNA のノザンプロットング。

以上より、神経細胞中におけるポリオウイルス弱毒株 IRES 依存的タンパク質合成が強毒株 IRES 依存的タンパク質合成と比較して優位に低下していることが明らかになった。強毒株と弱毒株のゲノムの違いは IRES 中に存在する 1 塩基の違いである。従って、強毒株と弱毒株の神経細胞中の IRES 依存的翻訳開始における開始複合体の構成には違いがあることが強く予想される。そこで、これら IRES 依存的翻訳時における mRNP 構成因子を確認して ITAFs を同定するために、mRNA プルダウン法を実施した。mRNP プルダウン法とは、3'非翻訳領域に boxB 配列を付加させたレポーター RNA とそれに結合する λN タンパク質の相互作用を利用したプルダウン法である (図 4)。

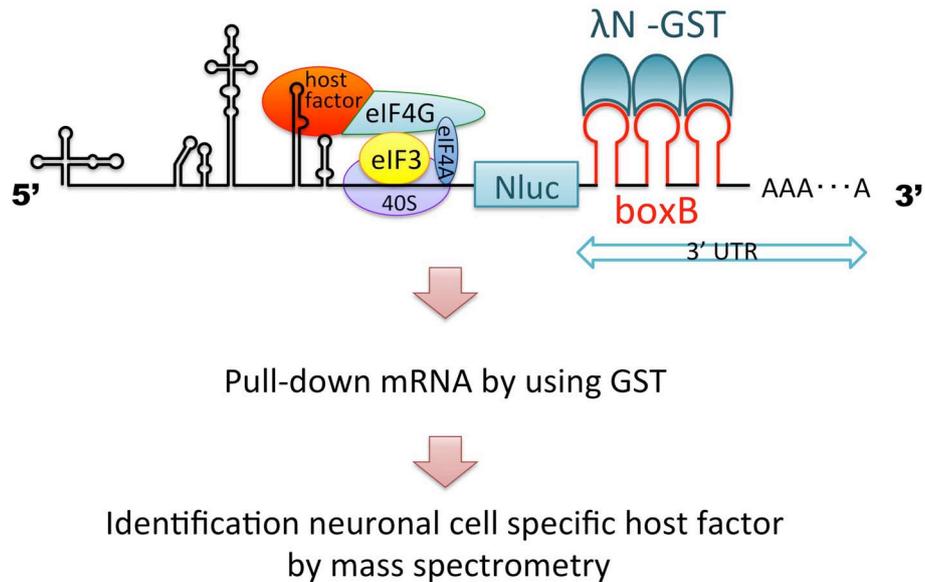


図4. mRNP pull-down 法

mRNA プルダウン法とは、3'非翻訳領域に boxB 配列を付加させたレポーター RNA とそれに結合する λN タンパク質の相互作用を利用したプルダウン法である。λN タンパク質には GST が結合させてあるため、グルタチオンビーズにより GST プルダウンを行うことで、レポーター RNA とそれに結合する mRNP をプルダウンすることができる。

λN タンパク質には GST が結合させてあるため、グルタチオンビーズにより GST プルダウンを行うことで、レポーター RNA とそれに結合する mRNP をプルダウンすることができる。現在、質量分析を実施中であり、pull-down 産物にどのような差が出るのかを期待している。

考 察

ポリオウイルスの *in vitro* 翻訳解析では、これまで Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL) に HeLa 細胞や SK-N-SH 細胞抽出液を加えた翻訳系を用いて行われた報告のみであった。しかし、ポリオウイルスはヒトにしか感染しないことが知られているため、純粋なヒト由来培養細胞を使った *in vitro* 翻訳系を用いた実験が望まれる。そこで、我々が独自に構築した HeLa 細胞と SK-N-SH 細胞を用いた *in vitro* 翻訳系により、翻訳活性を確認することにした。

結果にも示した通り、HeLa 細胞での Sabin 株 IRES 依存的翻訳活性と Mahoney 株 IRES 依存的翻訳活性に有意な差は認められなかったが、SK-N-SH 細胞での Sabin 株 IRES 依存的翻訳活性は Mahoney 株 IRES 依存的翻訳活性に比べ、明らかに低くなっていた。これにより、神経細胞での Mahoney 株と Sabin 株の増殖効率の差が翻訳効率の差に起因することが示唆された。

文 献

- 1) Fukao A, Aoyama T, Fujiwara T. The molecular mechanism of translational control via the communication between the microRNA pathway and RNA-binding proteins. *RNA Biol.* 2015;12(9):922-6. doi: 10.1080/15476286.2015.1073436.
- 2) Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, Oka S, Imataka H, Pelletier J, Sonenberg N, Thoma C, Fujiwara T. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Mol Cell.* 2014 Oct 2;56(1):79-89. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.005.
- 3) Lupberger J, Casanova C, Fischer B, Weiss A, Fofana I, Fontaine N, Fujiwara T, Renaud M, Kopp A, Schuster C, Brino L, Baumert TF, Thoma C. PI4K-beta and MKNK1 are regulators of hepatitis C virus IRES-dependent translation. *Sci Rep.* 2015 Sep 1;5:13344. doi: 10.1038/srep13344.