

シンポジウム1 「新規マクロライド誘導体EM703の生物評価」

TOP mRNAs翻訳系に及ぼす影響について

懸川友人^{1,2)} 大内 希¹⁾ 砂塚敏明³⁾ 大村 智³⁾

はじめに

マクロライド系免疫抑制剤ラバマイシン(RPM)は、比較的低濃度では全mRNAの10~15%を占めるterminal oligopyrimidine (TOP) tract mRNAsの翻訳を特異的に抑制する¹⁾が、そのシグナル伝達機構は明らかでない^{2~4)}。我々は、これまでTOP tract mRNAsの翻訳調節機構を解明する目的で、human La autoantigenが無細胞タンパク合成系でTOP mRNAの翻訳を阻害すること⁵⁾、またRPMによりTOP結合因子がラット臓器の細胞質中に増加すること⁶⁾およびAUF1 p45がTOPエレメントへ結合し、そのmRNA翻訳調節に関与していることを報告した^{7~9)}。一方、赤川らはエリスロマイシン代謝産物誘導体EM201がTOP mRNA翻訳調節のシグナル伝達上流と理解されているp70 S6-Kinase 1を阻害することを報告し¹⁰⁾、また、新規マクロライド誘導体EM703は宿主側に対してEM201より強い生物作用を示すことを報告した(第10回マクロライド新作用研究会)。今回我々は、TOP mRNAの選択的翻訳抑制にEM201およびEM703が影響を与えるか否か検討した。

材料と方法

Fractionation of polysome, Northern blot analysis and RT-PCR analysis: BJAB細胞をRPM (40ng/ml), EM201 (50 or 30mM) あるいはEM703 (50 or 30mM) で2時間処理後、細胞質画分をシヨ糖密度勾配遠心法により分離後、254nmの吸光度をモニターしながら分画した。各フラクションよりRNAを抽出しNorthern blottingを行った。Ribosome protein L32 mRNAのプロープはPCR法 (forward ;5'-gAAgCCCAAgATCTCAAAA-3, reverse ; 5'-TTggggTTggTgACTCTgAT-3') により調製し、更

にrandom prime labeling kit (TAKARA) により³²Pで放射標識したものをを用い、続いてautoradiographyを行った。RT-PCRは抽出したRNAを非翻訳および翻訳中のフラクション毎に集めて鋳型として用いた。ribosome protein S19 mRNAのプロープはforward ;5'-AgACgTgAACCA gCAggAgT-3, reverse ;5'-TCCAg ATCTCTTgTCC CTgA-3', ribosome protein L13 mRNAのプロープはforward ;5'-AATgggCCACTTTTgCT AgA-3, reverse ;5'-gCCgATAATCTTCAGgTggA-3'を用いた。

結果

Polysome profilesの解析では、ラバマイシン(RPM, 40ng/ml)によりBJAB細胞中の全翻訳は僅かに抑制が観察されることが知られており、今回もその効果が認められた(Fig. 1, left panel)。一方、EM703 (50mM)は40S ribosomeおよび60S ribosomeと比較的重いpolysomeの減少により全翻訳の僅かな抑制が認められたが、EM201 (50mM)はBJAB細胞の翻訳効率に殆ど影響を与えなかった (Fig. 1, right panel)。

次に、Fig. 1の画分を9等分し、それぞれに含まれるribosome protein L32 mRNAをNorthern blotにより解析した(Fig. 2)。マクロライド無添加(NA)、EM (50mM) あるいはEM201 (50mM) では、L32 mRNAの翻訳効率に差は見られなかったが、RPM (40ng/ml) およびEM703 (50mM) ではpolysomeに存在するL32 mRNA量が減少し、非翻訳(UTL)領域にシフトした。

L32 mRNAの翻訳抑制が観察されたので、次に他のリボソームタンパク質のmRNAの翻訳効率をRT-PCR法で検討した。BJAB細胞を40ng/mlのRPM あるいは30mMのEM703で2時間処理した後、細

1) 城西国際大学薬学部 2) CREST 3) 北里大学北里生命科学研究所

Fig. 1. Effect of RPM, EM703 and EM201 on translational efficiency of BJAB cells.

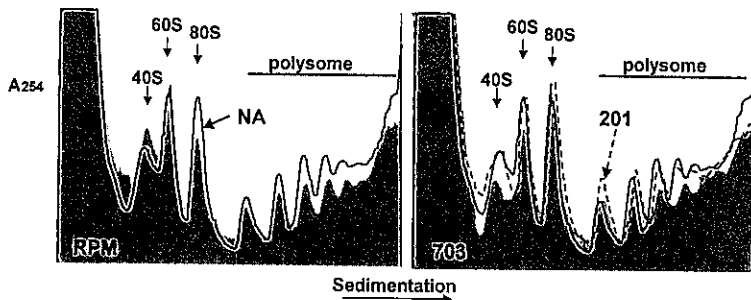
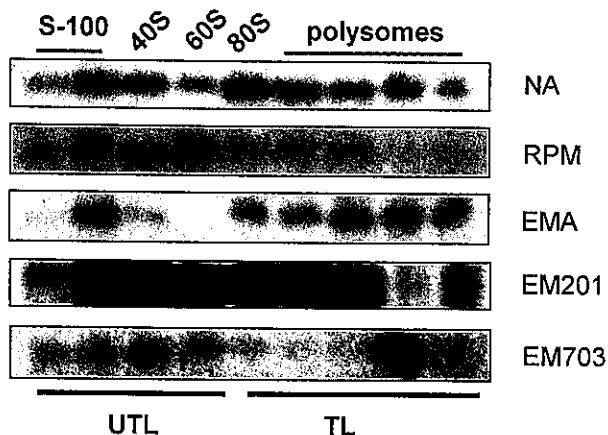


Fig. 2. Northern blot analysis of ribosomal protein L32 mRNA in sub-cellular fractions of RPM-, EM703- or EM201-treated BJAB cells.



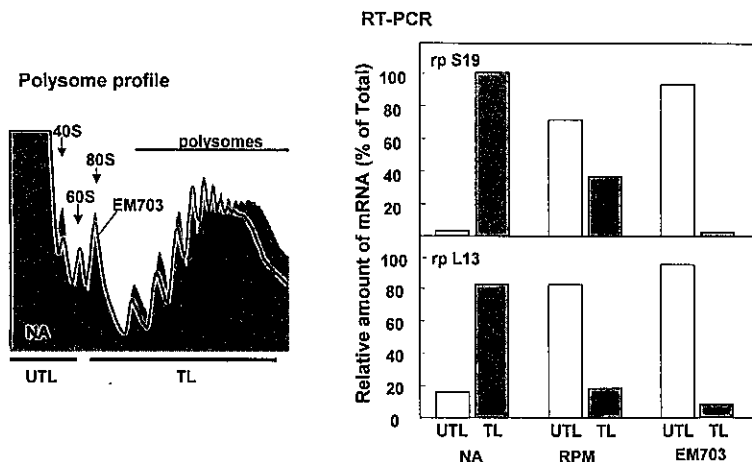
胞質中のmRNAをUTLと翻訳中 (TL) に分けた。この濃度のEM703処理においても重いpolysome領域の減少が認められたが、40S ribosomeおよび60S ribosomeの量には50mM添加時に比べ変化が認められなかった (Fig. 3, left panel)。UTLとTLに含まれるribosome protein S19およびL13のmRNA量をRT-PCR法により測定した。S19およびL13 mRNAの両方でEM703およびRPM処理による翻訳抑制が観察されたが、EM703のほうがRPMより強い抑制効果を示した。

考 察

赤川らはヒト抹消血単核球分画中より得たCD4⁺T細胞を用いてEM201がFKBP12 rapamycin-associated protein/mammalian target of rapamycin

(FRAP/mTOR) の下流のp70 S6 Kinase (S6K1) のリン酸化を抑制すること¹⁰⁾ 並びに同様に得た単球/マクロファージの誘導系でEM201とEM703が分化を誘導することを報告した¹¹⁾。これらの報告は、EM201およびEM703がFRAP/mTORおよびS6K1を介するシグナル伝達系を抑制することでterminal oligopyrimidine tract (TOP) mRNAsの翻訳をrapamycin (RPM) と同様に強弱の差はあっても抑制することを予想させた。今回の試みの結果、予想に反してEM201はTOP mRNAsの翻訳を抑制せず、また、我々がRPMの最終標的と予想しているAUF1 p45^{8,9)} も変化させなかった (data not shown)。一方、EM703はRPMより強くTOP mRNAsの翻訳を抑制した。従来、TOP mRNAsの翻訳抑制はFRAP/mTOR とS6K1を介するといわれてきた

Fig. 3. Effect of RPM and EM703 on translational efficiency of ribosomal protein S19 and L13 mRNAs.



が、近年の報告はこの伝達経路の関与について極めて懐疑的である^{4,11)}。また、FRAP/mTORシグナル伝達系を解明するためにRPMの対照として、その生物作用と構造上の類似点からFK506が用いられてきた。FK506はFKBP12との結合においてはRPMと拮抗することが、明らかであるが、生物作用はRPMの作用に拮抗的および協奏的に働くことが知られている⁹⁾。従って、FRAP/mTORとS6K1を介するシグナル伝達系を解明するためにEM201およびEM703はRPMおよびFK506と並んで極めて有用な試薬と考えられる。また、これらのマクロライドにEMを絡めて検討することが宿主側のEM標的を解明する突破口になると期待される。

参考文献

- 1) DUFNER A., THOMAS G.: Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell Res.* 253: 100~109, 1999
- 2) JEFFERIES, H. B. J., *et al.*: Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 16: 3693~3704, 1997
- 3) MEYUHAS O. and HORNSTEIN E.: In *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N. *et al.* Eds), 671~693, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000
- 4) PENDE M., *et al.*: S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-} mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24: 3112~3124, 2004
- 5) ZHU J., *et al.*: Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation *in vitro*. *Biochim. Biochem. Acta* 1521: 19~29, 2001
- 6) KAKEGAWA T., ITO M., *et al.*: Rapamycin induces binding activity to the terminal oligopyrimidine tract of ribosomal protein mRNA in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 402 (1): 77~83, 2002
- 7) 懸川友人, 早川晶子, 他: ラバマイシンによるhetero nuclear ribonucleoprotein C-like/unwinding protein 2の細胞質蓄積作用. *Jpn. J. Antibiotics* 54 Suppl. A: 93~95, 2000
- 8) 懸川友人, 早川晶子, 他: TOP結合因子の細胞質蓄積メカニズムの検討. *Jpn. J. Antibiotics* 54 Suppl. C: 94~96, 2001
- 9) 懸川友人, 小林 弘, 他: ラバマイシンによるmRNA選択的な翻訳抑制へのhnRNP Dの関与. *Jpn. J. Antibiotics* 57 Suppl. A: 88~91, 2004
- 10) 大塚瑞穂, 赤川清子, 他: エリスロマイシン (EM) 生体内代謝産物EM201のIL-2レセプターシグナル伝達への影響. *Jpn. J. Antibiotics* 57 Suppl. A: 92~94, 2004
- 11) TANG H., MEYUHAS O., *et al.*: Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 21: 8671~8683, 2001