

Title	Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factor and ribosomal protein
Author(s)	寺田, 直弘
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42876">https://hdl.handle.net/11094/42876</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	寺 田 直 弘 てら だ なお ひろ
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 15873 号
学位授与年月日	平成13年2月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factor and ribosomal protein (ラパマイシンはエロンゲーションファクターとリボソーム蛋白をコードする mRNA の翻訳を選択的に阻害する。)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田伸太郎  (副査) 教授 岡田 正 教授 高井 義美

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

免疫抑制剤ラパマイシンは Streptomyces が産生する Macrolide で、FK506 と共通構造を持ち、リンパ球の増殖を阻害し、移植臓器の拒絶を有効に抑制する。その細胞内における作用機序は FK506 と異なり、増殖関連シグナルのなかでは p70S6 キナーゼ (p70s6k) の活性を特異的に阻害することが示された。セリンスレオニンキナーゼのひとつである p70s6k は、リボソーム蛋白 S6 を磷酸化する酵素で、休止細胞では活性が低く、増殖刺激により速やかに活性化される。S6 蛋白の磷酸化は、以前から何らかの形で mRNA 翻訳の開始に関与する事が推定されていたが、その正確な機能は不明であった。本研究は、ラパマイシンの細胞増殖に与える影響を詳細に調べることにより、p70s6k (及び S6 磷酸化) の機能を明らかにすることを試みた。

#### 〔方法ならびに成績〕

(1) ラパマイシンは蛋白合成を阻害する。

増殖中のヒト B リンパ球系細胞株 Ramos 細胞にラパマイシン (10mg/ml) を添加すると、5 分以内に、p70s6k の活性が低下するが、細胞増殖や DNA 合成は 24 時間以内では変化がみられなかった。これに対し、蛋白合成を  $^3\text{H}$ -labeled amino acid mixture の取り込みで測ると、3 時間以内にコントロールに比し約 15% の低下が認められた。

(2) ラパマイシンは特定の蛋白の合成を阻害する。

次に、ラパマイシンがすべての蛋白の合成を一様に抑制するのか、ある特定の蛋白の合成を抑制するのかを調べる目的で、細胞を  $^{35}\text{S}$ -methionine で標識した後、一次元及び二次元電気泳動で標識蛋白を展開した。この結果、ラパマイシンは、限られた蛋白においてのみ  $^{35}\text{S}$ -methionine の取り込みを抑制することが判明した。

(3) ラパマイシン感受性蛋白の同定。

このうち、最も抑制が顕著に認められた分子量 97kDa、等電点 6.5-6.8 の蛋白の同定を試みた。二次元電気泳動 Data Base により、この蛋白が elongation factor 2 (EF2) である可能性が示され、特異抗体を用いた免疫沈降、Western Blot により確認された。

(4) ラパマイシンは mRNA の翻訳を阻害する。

次に、ラパマイシンがどのようにして EF2 の蛋白合成を阻害するのかを調べた。Northern Blot で mRNA の発現量に差がなく、また蛋白の分解速度にも差が認められないことから、mRNA の翻訳レベルでの阻害が疑われた。

これを確認するため、ラパマイシンの mRNA の polysomal association への影響を調べた。ラパマイシンを添加すると 2 時間以内に、EF2 mRNA は polysomal 分画から non-polysomal 分画に移行した。これに対しコントロール mRNA は影響されなかった。これらの実験により、ラパマイシンは EF2 mRNA の翻訳を特異的に阻害することが示された。

(5) ラパマイシンはリボゾーム蛋白をコードする mRNA の翻訳を特異的に阻害する。

ラパマイシンが EF2 mRNA の翻訳を特異的に阻害することから、次に、ラパマイシンによる他のリボゾーム蛋白 mRNA への影響を同様の方法で調べた。調べ得たすべてのリボゾーム蛋白 mRNA (EF1 $\alpha$ , rpS24, rpS3, rpS14, rpS6) の polysomal association が EF2 mRNA と同様にラパマイシンにより阻害された。これに対し、調べ得たすべてのコントロール蛋白 mRNA (GAPDH, PCNA, c-myc, DHFR, Ig $\mu$ , cdc2, cak2, cyclin A, cyclin E) の polysomal association は影響されなかった。以上の結果より、ラパマイシンはリボゾーム蛋白をコードする mRNA の翻訳を特異的に阻害することが判明した。さらに p70s6k 活性とこれらの mRNA の翻訳効率はさまざまな系でよく相関した。

〔総括〕

本報告により、p70s6k・S6 磷酸化の経路が、5' 端に特異構造を持つリボゾーム蛋白 mRNA の翻訳を選択的に制御している可能性が示唆された。リボゾーム蛋白をコードする mRNA は、増殖休止期でも、細胞内に豊富に存在するが、その翻訳は選択的に抑制されている。増殖刺激によりこの抑制が速やかに解除されることが知られていたが、p70s6k・S6 磷酸化の経路がこのシグナル伝達をつかさどる可能性が示された。リボゾーム蛋白 mRNA の選択的な翻訳制御機構は、原核細胞では詳細が明らかにされているのに対し、真核細胞では長い間謎であった。私達の研究は、このリボゾーム蛋白 mRNA の翻訳制御機構を、ある細胞内シグナル伝達経路（しかもリボゾーム蛋白のひとつである S6 のリン酸化酵素）と結びつけたことで意義深い。

#### 論文審査の結果の要旨

高等真核生物ではリボゾーム蛋白をコードする mRNA の 5' 端に共通した構造が認められる (C-pyrimidine stretch)。さらに、その翻訳は増殖休止期には選択的に抑制されており、増殖刺激とともに速やかに開始されるという特徴があるが、いったい何がこの特殊な翻訳機構を制御しているのかは長い間謎であった。本論文は、この特殊な翻訳制御の調節を司るシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。ヒトリンパ球における mRNA の polysomal association を調べることにより、p70S6キナーゼ (p70s6k) の特異的阻害剤ラパマイシンがリボゾーム蛋白 mRNA の翻訳を選択的に抑制することを発見した。さらに p70s6k 活性とこれらの mRNA の翻訳効率がさまざまな系でよく相関することが示された。セリンスレオニンキナーゼのひとつである p70s6k は、リボゾーム蛋白 S6 を磷酸化する酵素で休止細胞では活性が低く、増殖刺激により速やかに活性化される。S6 蛋白の磷酸化は、以前から何らかの形で mRNA の翻訳の開始に関与する事が推定されていた。本報告により、p70s6k・S6 磷酸化の経路が 5' 端に特異構造を持つリボゾーム蛋白 mRNA の翻訳を制御している可能性が初めて示唆された。また、この仕事に続く一連の仕事により、ラパマイシンがリボゾームの生合成 (Biosynthesis) を特異的に阻害することを発見し、その詳細な細胞内シグナル伝達経路を Gene Targeting などを用いて解明した。小児白血病の治療に臨床的に有効な L-asparaginase は、奇しくも、ラパマイシンと同一の細胞内シグナル伝達経路を阻害しており、私達の研究が白血病の病態解明、治療法改善につながるものと期待されている。以上より、本論文が博士 (医学) の学位授与に値する。