

## 14-3-3 たんぱく質間相互作用の安定化による mRNA 翻訳抑制機構の解明

(信州大農<sup>1</sup>・理研 CSRS<sup>2</sup>) ○荻野 菜々美<sup>1</sup>・室井 誠<sup>2</sup>・長田 裕之<sup>2</sup>・松本 健<sup>2</sup>・吉田 稔<sup>2</sup>・喜井 勲<sup>1</sup>・大神田 淳子<sup>1</sup>

Elucidation of the mRNA translational repression machinery by stabilizing 14-3-3-mediated protein-protein interactions (<sup>1</sup>*Institution of Agriculture, Shinsu University*, <sup>2</sup>*RIKEN Center for Sustainable Resource Science, RIKEN*) ○Nanami Ogino<sup>1</sup>, Makoto Muroi<sup>2</sup>, Hiroyuki Osada<sup>2</sup>, Ken Matsumoto<sup>2</sup>, Minoru Yoshida<sup>2</sup>, Isao Kii<sup>1</sup>, Junko ohkanda<sup>1</sup>

Fusicoccin (FC) is a diterpene glycoside that stabilizes 14-3-3-mediated protein-protein interactions (PPIs) with Ser/Thr phosphoproteins. We previously developed a semi-synthetic derivative of FC, ISIR-042, which exhibits antiproliferative activity under hypoxia conditions. Nonbiased target-ID study revealed that ISIR-042 stabilizes PPI between 14-3-3 and GIGYF2 protein, a scaffold protein of a mRNA translational repression complex, however, the details of the mechanism of interaction remain unclear. In this study, we aimed to identify the binding site of 14-3-3 to GIGYF2 that is specifically upregulated by ISIR-042. The results of co-immunoprecipitations using wild-type, mutated, and the deletion mutants of GIGYF2 indicated that S438 and S546 are the potential target sites of ISIR-042. Fluorescence polarization titrations using phosphopeptides showed that ISIR-042 significantly upregulates the interaction between 14-3-3 and KGVpS<sub>546</sub>IP, suggesting that ISIR-042 stabilizes binding of 14-3-3 to the mode-1 consensus motif containing pS546 of GIGYF2.

*Keywords* : Protein-protein interaction; 14-3-3 proteins; Fusicoccin; mRNA translation repression complex, Antiproliferative activity

フシコクシン(FC)は 14-3-3 たんぱく質と Ser/Thr リン酸化たんぱく質とのたんぱく質間相互作用(PPIs)を安定化するジテルペン配糖体である。これまでに我々は低酸素環境下で特に顕著な抗がん活性を示す FC の半合成誘導体 ISIR-042 を創製し、この化合物が 14-3-3 と GIGYF2 の PPI を亢進し mRNA 翻訳抑制複合体を安定化してたんぱく質合成を阻害することを見出してきた。しかし、14-3-3 と GIGYF2 との相互作用位置を含め詳細は判っていない。本研究では、ISIR-042 が変調する 14-3-3/GIGYF2 相互作用点の特定を目的とし、Halo タグ付き GIGYF2 欠損変異体を用いた共免疫沈降により ISIR-042 が亢進する 14-3-3 の結合領域を推定した。予想された領域中の 2 つの 14-3-3 結合コンセンサス配列を Ala に変異させると ISIR-042 の安定化効果が消失した。また、リン酸化ペプチド MENpS<sub>438</sub>LP と KGVpS<sub>546</sub>IP を用いた蛍光偏光滴定試験の結果、ISIR-042 は 14-3-3 と KGVpS<sub>546</sub>IP との相互作用をより増強することが分かり、ISIR-042 は 14-3-3 と GIGYF2 の pS546 周辺配列への結合を安定化することが明らかになった。この配列は RNA 結合たんぱく質 TTP の結合領域に隣接することから、14-3-3 がリン酸化依存的に GIGYF2 に TTP を誘導することを示唆している。以上のように 14-3-3 が介在する mRNA 翻訳抑制機構の一端を明らかにすることに成功した。