

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03172

研究課題名（和文）複合体間の動的な相互作用による翻訳制御の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis of translation regulation by dynamic interactions between the complexes

研究代表者

伊藤 拓宏 (Ito, Takuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：70401164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：eIF2-eIF2B GEF活性型複合体とリン酸化eIF2（eIF2-P）-eIF2B GEF不活性型複合体の2つの立体構造を決定し、eIF2BによるeIF2の活性化機構とeIF2-PによるeIF2Bの不活性化機構を明らかにした。さらには、ISRを抑える小分子ISRIBの活性発現機構を明らかにした。また、eIF2Bに結合して機能するシチリア型サンショウバエ熱ウイルス NSsタンパク質のISR抑制機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりISR制御の核となるeIF2/eIF2-PとeIF2Bによるヌクレオチド交換活性制御の構造的機構が明らかとなった。さらには、これらを参照することによりISRIBやSFSV NSsによるeIF2Bの制御機構を立体構造の視点から明らかにした。今後、eIF2-PとeIF2Bの結合を制御することは神経変性疾患の新規治療法の開発につながる期待できる。

研究成果の概要（英文）：We determined two cryo-EM structures of the eIF2-eIF2B GEF-active productive complex and the phosphorylated eIF2 (eIF2-P)-eIF2B GEF-inactive nonproductive complex, and clarified the mechanism of eIF2 activation by eIF2B and eIF2B inactivation by eIF2-P. In addition, the mechanism of the action of ISRIB, a small molecule that suppresses ISR, was clarified. We also elucidated the mechanism of ISR suppression by Sandfly fever Sicilian virus NSs protein, which functions by binding to eIF2B.

研究分野：構造生物化学

キーワード：翻訳 翻訳開始因子 統合的ストレス応答 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

cryo-EM とその解析手法の技術革新により、X 線結晶構造解析では解析することが困難であった、動的な複合体間の相互作用を詳細に解析することが可能となってきた。

真核生物の翻訳開始因子 eIF2 は、GTP 結合依存的にリボソームへ開始メチオニル tRNA (Met-tRNA_i) を運搬する、翻訳開始の最初の段階を担う因子であり、ヘテロ 3 量体 (eIF2 α β γ) を形成している。別の翻訳開始因子 eIF2B は eIF2 特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) であり、eIF2B α β γ δ ϵ の 5 つのサブユニットが 2 組からなる 10 量体である。我々は世界に先駆けてその結晶構造を明らかにした (Kashiwagi, 2016, Nature)。各種ストレスに依存して活性化した PKR や HRI といった eIF2 α キナーゼは eIF2 α の 51 番目のセリンをリン酸化する。リン酸化 eIF2 (eIF2-P) は eIF2B と強い親和性を持ち、両者は不活性型の複合体を形成し、その結果 eIF2 に依存した通常の翻訳サイクルは停止する。様々なストレスが eIF2 α のセリン 51 番のリン酸化へと統合されて翻訳が制御されているため、この機構は統合的ストレス応答機構 (ISR) と呼ばれている。ISR の本質的な理解のためには、ISR 制御の鍵となる eIF2 あるいは eIF2-P と eIF2B による GEF 活性型と GEF 不活性型の複合体の立体構造を明らかにすることが急務であった。

ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) は本来の終始コドンよりも 5' 側上流の位置に存在する異常な早期終止コドン (premature termination codon, PTC) を持つ mRNA を積極的に分解、排除する mRNA 監視機構であり、これにより生体は PTC-mRNA が翻訳されて、異常な構造を持つタンパク質断片が蓄積するのを免れている。NMD には、初期翻訳するリボソームと翻訳終結因子、SMG タンパク質群、Upf タンパク質群、EJC 複合体といった、多種多様な因子が関わっていることが明らかになってきていたものの、立体構造に基づく NMD 発動の分子機構は不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では、複雑で動的なヒトの翻訳制御機構のうち、翻訳開始因子 eIF2 のリン酸化と eIF2 の GEF である eIF2B によって制御される統合的ストレス応答機構 (integrated stress response, ISR)、早期終止リボソームと SMG1 複合体、Upf 複合体、Exon-junction complex (EJC) によって形成される超複合体 decay-inducing complex (DECID) によるナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) の発動機構、の 2 つの機構を標的とした。通常を組み換えタンパク質を用いた複合体の再構成に加えて、再構成試験管内翻訳系を駆使して cryo-EM による立体構造解析を進め、生化学的・生物物理的な解析と併せてこれらの機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

立体構造解析については X 線結晶構造解析と cryo-EM 構造解析を併用した。ISR 制御機構については、eIF2 \cdot eIF2B GEF 活性型複合体と eIF2-P \cdot eIF2B GEF 不活性型複合体の 2 つの複合体について、グリッドの調製方法を検討し、より良い分解能の cryo-EM データを得られる条件を探索し、モデルの構築が可能な 3 Å 台の分解能の立体構造を決定することを目指した。さらには、どのようにリン酸化一つの違いにより結合様式の大きな変化が引き起こされ、それによりどのように eIF2B の GEF 活性が制御されているのかという点について、変異体を用いた生化学的・物理化学的解析を行い、ISR 制御機構の原子レベルでの理解を目指した。NMD 発動機構については、まず、PTC 認識リボソームを模したリボソームについて、試験管内翻訳系を用いて準備することを目指した。DECID 超複合体の調製にはどの方法が適切かを複合体の形成などを指標に判断した。そして、SMG1 複合体と Upf 複合体、EJC-mRNA 複合体と混合し、DECID 超複合体の再構成を目指した。

4. 研究成果

ISR 制御機構については、eIF2 \cdot eIF2B GEF 活性型複合体と eIF2-P \cdot eIF2B GEF 不活性型複合体の 2 つの構造についてクライオ電子顕微鏡解析と X 線結晶構造解析を併用し立体構造を決定した。eIF2 \cdot eIF2B GEF 活性型複合体では、eIF2B の活性を担う HEAT ドメインが eIF2 γ に

結合しており、eIF2B による GDP/GTP 変換反応が行われている構造が捉えられた。一方、eIF2-P・eIF2B GEF 不活性型複合体では、HEAT ドメインは特定の位置に固定された状態として観察されず、活性化反応が阻害されている状態が捉えられた。このとき eIF2 γ は、eIF2B とは強く結合しておらず、代わりにリン酸化 eIF2 α が eIF2B の主要な結合領域となっていた。リン酸化 eIF2 が一つでも eIF2B に結合すると、その反対側の eIF2B の非リン酸化 eIF2 との相互作用領域まで覆ってしまうため、リン酸化 eIF2 はリン酸化された eIF2 自体の活性化を防ぐだけでなく、他の eIF2 の活性化をも防ぐ機構となっていることが明らかになった (Kashiwagi, 2019, Science)。

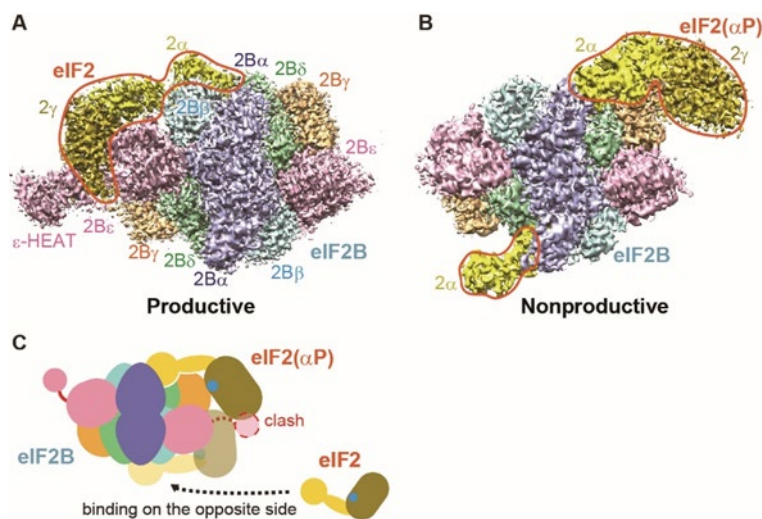


図 1 (A, B) ヒト由来 eIF2・eIF2B 複合体 (A) と eIF2-P・eIF2B 複合体 (B) の cryo-EM 密度マップ。(C) eIF2-P が eIF2 の eIF2B への結合を立体障害的に阻害する機構の模式図

さらに、ISR を抑えることにより、神経変性疾患を抑える機能が知られている医薬性小分子 ISRIB の活性発現機構を明らかにした。生化学的な解析の結果、ISRIB が eIF2B の活性を高める効果は ISRIB 単独ではほとんど見られず、阻害因子であるリン酸化 eIF2 により eIF2B の活性が阻害されるときにだけ、その効果があることが判明した。決定した構造とこれまでに報告されている構造との比較を行ったところ、一つの eIF2B に対し 2 分子のリン酸化 eIF2 が結合した構造でのみ、eIF2B のサブユニットの位置関係に変化が生じていることが分かった。eIF2B に対し 2 分子のリン酸化 eIF2 が結合した構造では、非リン酸化 eIF2 が eIF2B に結合しにくい阻害状態になっていると考えられた。またリン酸化 eIF2 の結合時には ISRIB は eIF2B に結合しにくいことが示唆された。構造解析と生化学解析を総合すると、ISRIB は eIF2B のサブユニット間相互作用の安定化だけでなく、リン酸化 eIF2 との結合を阻害することで eIF2B の活性低下を防ぎ、その結果 ISR 経路を抑制するという新たな機構を提唱することができた (Zyryanova, Kashiwagi, 2021, Mol Cell)。

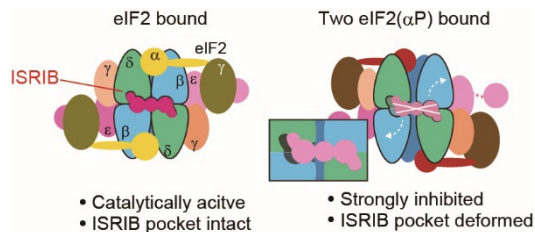


図 2 eIF2B に対する ISRIB の結合と eIF2 および eIF2-P の結合の構造的関係の模式図。

さらに ISR に関して、クライオ電子顕微鏡法を用いて、宿主細胞であるヒト由来 eIF2B とシチリア型サシチョウバエ熱ウイルス (SFSV) NSs タンパク質 (以下 NSs タンパク質) の複合体の構造を解析した。その結果、NSs タンパク質の eIF2B への結合部位は、リン酸化 eIF2 が結合する部位と部分的に重なっていることが判明した。これは、リン酸化 eIF2 と NSs タンパク質は eIF2B に同時に結合できないことを示していた。すなわち、NSs タンパク質はリン酸化 eIF2 が eIF2B に結合するのを立体障害的に阻害し、eIF2B の活性阻害によるストレス応答を防いでいる可能性が示された。生化学的手法により、NSs タンパク質がリン酸化 eIF2 による eIF2B の活性阻害を抑制していることを確認した。その効果は医薬品候補分子である ISRIB よりも高かった。ISR 経路において、eIF2B はストレスの種類に関係なく共通して阻害されるため、eIF2B を標的とする NSs タンパク質はウイルス感染時に限らず、さまざまなストレスに対する応答を抑制する能力があると考えられる。実際に、薬剤によって小胞体ストレスを引き起こしたところ、NSs タンパク質を発現している細胞では、翻訳の全体的抑制とストレス応答因子の選択的合成という、ISR の二つの主要な効果がともに抑制されていた。また、ラット海馬神経細胞やヒト iPS 細胞から作製された運動神経細胞で NSs タンパク質を発現させ、小胞体ストレスに対する影響を調べたところ、どちらの神経細胞でも神経突起の変性などの影響が緩和されることが判明した (Kashiwagi, Shichino, Osaki, 2021, Nat Commun)。

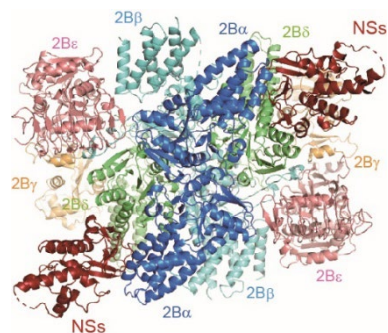


図 3 eIF2B・NSs 複合体の cryo-EM 構造。NSs (赤) が eIF2-P 結合部位をふさいでいる。

NMD 発動機構については、PTC 認識リボソームを模したリボソームについて、試験管内翻訳系を用いて準備を進めた。ペプチド終結反応が起こらない変異型 **eRF1** を用いて終結直前の状態で停止したリボソームを調製する方法について調製方法を検討した。それにより、停止リボソームの調製方法を確立させ、DECID 超複合体の調製の土台とすることが可能であることを確認した。Upf 複合体、EJC-mRNA 複合体については安定して調製する方法を確立した。しかしながら、cryo-EM の測定に適した SMG1 複合体の調製が難しく、結果として DECID 超複合体の調製が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Zyryanova Alisa F., Kashiwagi Kazuhiro, Rato Claudia, Harding Heather P., Crespiello-Casado Ana, Perera Luke A., Sakamoto Ayako, Nishimoto Madoka, Yonemochi Mayumi, Shirouzu Mikako, Ito Takuhiro, Ron David | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 ISRIB Blunts the Integrated Stress Response by Allosterically Antagonising the Inhibitory Effect of Phosphorylated eIF2 on eIF2B | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Cell | 6. 最初と最後の頁 88 ~ 103 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.10.031 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Chen Mingming, Asanuma Miwako, Takahashi Mari, Shichino Yuichi, Mito Mari, Fujiwara Koichi, Saito Hironori, Floor Stephen N., Ingolia Nicholas T., Sodeoka Mikiko, Dodo Kosuke, Ito Takuhiro, Iwasaki Shintaro | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Dual targeting of DDX3 and eIF4A by the translation inhibitor rocaglamide A | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 475 ~ 486 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.11.008 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Yokoyama Takeshi, Machida Kodai, Iwasaki Wakana, Shigeta Tomoaki, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Sakamoto Ayako, Yonemochi Mayumi, Harada Yoshie, Shigematsu Hideki, Shirouzu Mikako, Tadakuma Hisashi, Imataka Hiroaki, Ito Takuhiro | 4. 巻 74 |
| 2. 論文標題 HCV IRES Captures an Actively Translating 80S Ribosome | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Cell | 6. 最初と最後の頁 1205 ~ 1214 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.04.022 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kashiwagi Kazuhiro, Yokoyama Takeshi, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Sakamoto Ayako, Yonemochi Mayumi, Shirouzu Mikako, Ito Takuhiro | 4. 巻 364 |
| 2. 論文標題 Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Science | 6. 最初と最後の頁 495 ~ 499 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw4104 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Marintchev Assen, Ito Takuhiro | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 eIF2B and the Integrated Stress Response: A Structural and Mechanistic View | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 1299 ~ 1308 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00132 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kashiwagi Kazuhiro, Shichino Yuichi, Osaki Tatsuya, Sakamoto Ayako, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Mito Mari, Weber Friedemann, Ikeuchi Yoshiho, Iwasaki Shintaro, Ito Takuhiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 eIF2B-capturing viral protein NSs suppresses the integrated stress response | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 7102 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27337-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 伊藤拓宏 |
| 2. 発表標題 統合的ストレス応答阻害剤ISRIBの作用機序 |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤拓宏 |
| 2. 発表標題 ストレス応答による翻訳開始停止機構の構造基盤 - X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡 |
| 3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柏木一宏 |
| 2. 発表標題 eIF2 のリン酸化による eIF2B 活性の阻害機構 |
| 3. 学会等名 第 2 1 回日本RNA学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kashiwagi Kazuhiro |
| 2. 発表標題 Structural basis of eIF2B regulation by eIF2 phosphorylation |
| 3. 学会等名 EMBO Workshop, Protein Synthesis and Translational Control (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ito Takuhiro |
| 2. 発表標題 HCV IRES captures an actively translating 80S ribosome to hijack the host translational machinery |
| 3. 学会等名 EMBO Workshop, Protein Synthesis and Translational Control (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤拓宏 |
| 2. 発表標題 eIF2のリン酸化によるeIF2BのGEF活性制御の構造基盤 |
| 3. 学会等名 第 4 2 回日本分子生物学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤拓宏 |
| 2. 発表標題 翻訳の構造生物学～cryo-EMによる単粒子解析およびX線結晶構造解析、FMO法による解析例～ |
| 3. 学会等名 CBI学会第411回講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤拓宏 |
| 2. 発表標題 eIF2B結合性ウイルスタンパク質NSsによる統合的ストレス応答抑制 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤拓宏 |
| 2. 発表標題 eIF2Bに結合するウイルスタンパク質NSsは統合的ストレス応答を抑制する |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>翻訳構造解析研究チーム https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/ito-t/index.html</p> |
|---|

6. 研究組織

| | | | |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|--------------------------|--|--|--|
| 英国 | University of Cambridge | | | |
| ドイツ | Justus-Liebig University | | | |