

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570143

研究課題名(和文) 翻訳開始因子による情報伝達機構の構造生物学的研究

研究課題名(英文) structural studies of the mechanism of eukaryotic translation initiation

研究代表者

尾林 栄治 (OBAYASHI, EIJI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50321740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質翻訳開始因子複合体は、生物の基本的生命活動にとって重要なだけでなく、新規抗生物質・薬剤開発のターゲットとしても近年注目を集めている。本研究が特に注目しているのは、リボソームの翻訳開始地点の認識から、実際に翻訳が開始される間の情報伝達機構である。本研究ではその分子機構を明らかにするために、NMR法による翻訳開始因子eIF1の立体構造決定、及びeIF1におけるeIF3c、eIF2及びeIF5の相互作用部位の同定を行った。また酵母を用いた遺伝的解析及び生化学的解析による結果をもとに、これまで漠然と推定されていたeIFを中心とした翻訳開始機構の詳細を説明できるようになった。

研究成果の概要(英文)：The translation initiation complex is important for a fundamental biological process and it also attracts attention as a target for a new class of antibiotics and drug development. In this study, it has been focused on the molecular mechanism of the signal transduction how translation is really started in the recognition of the translation initiation codon on mRNA by ribosome. In this research period, the structure of eIF1 was determined and the interaction region of eIF1 with eIF2, eIF3c and eIF5 were identified. In addition, based on the results from yeast genetic and biochemical studies, we could explain in detail the molecular mechanism of the translation initiation process with ribosome and initiation factors.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質 立体構造解析 翻訳開始

1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成マシンであるリボソームは、それ自身ではタンパク質の設計図である mRNA を見つけることができず、何かがこのマシンを mRNA 設計図上の翻訳開始地点に運んでやらなくてはならない。この役割を担っているのが翻訳開始因子である。人間を含む高等生物の翻訳開始因子(以下 eIF)は、複数のタンパク質からなる超分子複合体であり、少なくとも 20 個以上のタンパク質が関与している。これらが互いに相互作用したり解離したりしながら、リボソームを mRNA 上の正しい翻訳開始地点へと運んで行く。一方で、細菌類のリボソームはそれ自身で直接 mRNA 上の翻訳開始地点を見つことができ、翻訳開始因子もわずか 3 つほどしかないため、この違いを利用した抗生物質の設計が可能となる。これまでに高熱菌や酵母のリボソームの立体構造が明らかにされ、そのせいかに対してノーベル賞が授与されるなど、その構造からの新規抗生物質開発が期待されているが、そのためには翻訳開始因子も含めた真核生物のタンパク質翻訳機構を明確に知る必要がある。また C 型肝炎などのウイルスのゲノム RNA は、ウイルスのタンパク質を宿主細胞に優先的に合成させるために eIF を直接リクルートする能力を持っている。そのため、eIF の働きの分子機構を正確に理解することで、新たな抗ウイルス薬設計の可能性も広がる。さらに近年、がん細胞では翻訳開始因子が過剰に発現され、タンパク質翻訳制御が効かなくなっていること、そして翻訳開始因子の阻害剤ががんによる腫瘍を縮小させることが報告されており、翻訳開始因子は抗がん剤のターゲットとしても注目され始めている。

2. 研究の目的

本研究では、eIF の各因子の立体構造や、リボソームや mRNA に結合した複合体の構造、さらには各因子の結合・解離のタイミングを解析することで、eIF によるリボソームガイド機構を原子レベルで理解することを目的とする。そして、その成果を新規抗生物質や新薬開発の足がかりとして世界に発信していきたい。しかしながら、eIF 複合体はリボソームも合わせると 44 個のタンパク質と rRNA 及び tRNA からなる巨大な複合体であり、その構造解析はおろか調製すらも困難を極める。そこでこの巨大複合体の調製を目指しながら、これをいくつかの複合体にわけて調製しその構造解析を行っていく。本研究で特に注目しているのは、eIF による mRNA 上の翻訳開始地点の認識から、実際に翻訳が開始される間の情報伝達機構である。翻訳開始機構において、複合体を形成する一つのタンパク質である eIF1 は、正確な翻訳開始地

点(AUG)の認識に必須であり、eIF1 を介した開始地点の認識は、その後 eIF5 を通して eIF2 に伝えられる。これにより、AUG に結合したメチオニン tRNA が eIF2 から解離し、翻訳が開始される。eIF2 は、及び からなる 3 量体であり、メチオニン tRNA と直接結合する eIF2 は eIF2 と、また eIF2 は eIF5 と相互作用する。さらに、eIF1 と eIF5 は共に eIF3c に結合することが知られている。そのため、eIF3c を足場にした eIF1-eIF5-eIF2 -eIF2 という相互作用を通じた情報伝達が AUG の認識から実際の開始に至る際の引き金になると考えられる。しかしながら、各 eIF 間の結合部位は、それ自身では 2 次構造を持たない天然変性状態であり、eIF 同士がどのように結合しているのかを予想することは非常に困難である。すなわち、それら eIF 単体の立体構造からだけでは、eIF 間のどのような相互作用・配置及びそれらの変化が翻訳開始の引き金になっているのかを説明することはできず、それら eIF による複合体での立体構造を知る必要がある。本研究では、eIF1-eIF3c、eIF3c-eIF5、eIF5-eIF2 のタンパク質間相互作用を、その立体構造解析により明らかにし、eIF1 による開始地点の認識という情報が、eIF3c 及び eIF5 と共に、どのように eIF2 に伝えられるのか、その分子機構について議論して行く。

3. 研究の方法

(1) 立体構造解析を行うのに十分な量の eIF タンパク質を得るために、大腸菌を用いた発現系を構築した。また、直接相互作用する eIF の場合は、共発現による複合体としての精製も試みた。

(2) eIF1、eIF1-eIF3c 複合体、eIF5-eIF2 複合体の X 線結晶構造解析法及び NMR 法による立体構造解析を試みた。

(3) eIF1 における eIF3c、eIF5 及び eIF2 相互作用部位を、部位特異的変異体を用いた免疫沈降法及び NMR 法により同定した。また、それらの相互作用が、他の eIF 存在下でどのように変化するのかを NMR 法により追跡した。

(4) eIF 間の相互作用の有無が、酵母の生育がどのように変化するのか、また実際のタンパク質翻訳にどのように影響するのかを、遺伝的・生化学的手法で解析した。

4. 研究成果

(1) eIF1、eIF2、eIF3c 及び eIF5 の大腸菌による発現を試みた結果、全てのサブユニットの発現に成功した。さらに、eIF1 と eIF3c に

ついては、お互いが相互作用した eIF1-eIF3c 複合体としての発現・精製にも成功した。この複合体の発現系を利用して、eIF3c のどの部位に eIF1 が結合するのかを調べた結果、N 末から 36-86 番目までのペプチドが eIF1 への結合に強く結合していることが明らかになった。

(2) eIF1 の立体構造を NMR 法により決定した。その構造はこれまでに報告されたものとはほぼ同じであったが、リボソームと結合すると予想される部位にわずかな違いが見られた。リボソームと結合したモデルを比較することで、本研究で得られた立体構造が翻訳開始機構においてより正確な構造を表していることが示唆された。

(3) NMR 法により、eIF1 上での eIF3c、eIF2 及び eIF2 結合部位の同定を行った。その結果、eIF3c は eIF1 の複数箇所と相互作用している可能性が示唆された。そのために eIF1-eIF3c 複合体の均一性が崩れ、X 線結晶構造解析が進まなかったことが予想された。しかし、eIF5 存在下では、結合部位が収束しているように観測されることから、この eIF3c の eIF1 への結合安定化が、翻訳開始のスイッチとなっているのではないかということが考えられた。また、eIF5 と eIF2 の eIF1 上の結合部位がほぼ同じであることが eIF1 の部位特異的変異体を用いた NMR 法により明らかになった。さらに、(1)で見られた eIF3c における eIF1 結合部位は 36-86 であったが、86-163 部位も弱いながら相互作用すること、また eIF5 結合時には結合様式が変化することもあわせて確認できた。これらの結果から、eIF1 と他のサブユニットとの相互作用の変化が情報伝達機構の鍵となっていることが明らかになった。

(4) eIF1、eIF2、eIF3c 及び eIF5 のサブユニット間相互作用の有無が、タンパク質翻訳開始及び酵母の生育に与える影響を調べたところ、eIF1-eIF3c 間の相互作用が弱まると、eIF1 による厳密な翻訳開始位置の認識がなくなることが明らかになった。

これらの結果を基に、新たな eIF 複体内での情報伝達機構を提唱し、今後その検証を行い、論文投稿を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1 H. Yoshida, F. Kawai, E. Obayashi, S. Akashi, D. I. Roper, J. R. H. Tame, and S.-Y. Park
Crystal structure of penicillin-binding protein 3

(PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms, *Journal of Molecular Biology*, 査読有, Vol.423, 2012, 351-364

2 R. Makino, S.-Y. Park, E. Obayashi, T. Iizuka, H. Hori and Y. Shiro

Oxygen binding and redox properties of the heme in soluble guanylate cyclase: Implications for the mechanism of ligand discrimination
Journal of Biological Chemistry, 査読有、Vol.286, 2011, 15678-15687

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾林 栄治 (OBAYASHI EIJI)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：50321740

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

