

令和元年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04756

研究課題名(和文) HCV IRESによるリボソーム・ハイジャックの分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of ribosome hijack by the HCV IRES

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・ユニットリーダー

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)：クライオ電子顕微鏡を用いて、HCV IRESが進行中のmRNAの翻訳反応を邪魔することなく、80Sリボソームの40Sサブユニットに結合している構造を捉えることに成功した。蛍光顕微鏡を用いた1分子観察により、IRESが翻訳反応中のリボソームに結合していることを確認した。HCV IRESに依存して翻訳を開始した場合についても、IRESが翻訳反応中のリボソームの40Sサブユニットに結合していることが分かった。生化学的な実験により、HCV IRESに依存した翻訳の開始は、キャップ構造を持つmRNAを翻訳中のリボソームを用いる方が、空のリボソームを用いるよりも、迅速に進むことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCV由来のIRESがこれまで想定されていなかった方法で反応中の翻訳装置リボソームを乗っ取っていることを示した点が画期的である。本研究により明らかになった機構は、HCV由来のIRESと同じような構造を持つ他のウイルスにも共通すると考えられる。従って、IRESとリボソームの40Sサブユニットとの相互作用を阻害する薬剤を開発できれば、効果的な抗ウイルス薬になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We determined the cryo-EM structure of the HCV IRES which binds to the 40S ribosomal subunit of the translating 80S ribosome without impeding the ongoing translation. Single-molecule measurements by fluorescence microscopy confirmed that the HCV IRES binds to the translating ribosome. Additional cryo-EM studies showed that the HCV IRES binds to the 40S subunit of the translating 80S ribosome even in the case of the HCV IRES-dependent translation. Biochemical experiments showed that the ribosome translating cap-dependently is a better substrate for the HCV IRES than a free ribosome.

研究分野：構造生物学

キーワード：ウイルス 生体分子 電子顕微鏡 翻訳 翻訳開始

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム mRNA には internal ribosome entry site (IRES) と呼ばれる部位が 5' UTR に存在し、これがリボソームに結合することによって宿主の翻訳開始因子 (eIF) に頼ることなく翻訳が始まる。しかしながら、その詳細なメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

低温電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いた単粒子解析という構造生物学的手法と、様々な生化学的手法および生物物理学的手法を併せて、HCV IRES によるリボソーム・ハイジャックの分子機構の全容を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Cap 依存的あるいは HCV IRES 依存的に翻訳開始した翻訳中のヒト由来 80S リボソームと HCV IRES との複合体の cryo-EM による立体構造解析を行った。全反射蛍光顕微鏡を用いた 1 分子観察により、HCV IRES と翻訳中の 80S リボソームとの相互作用を直接解析した。また、cryo-EM による立体構造解析によって見出された機構を生化学的手法によっても検証した。

4. 研究成果

HCV IRES がどのような状態のリボソームに結合しているかについて、ショ糖密度勾配を用いたポリソーム解析を行った。その結果、従来から唱えられていた通り、HCV IRES は 40S サブユニットに結合していたが、すでに他の mRNA を翻訳中である、ポリソーム画分のリボソームにも結合していることを見いだした。

本研究では、キャップ構造を持つ mRNA を翻訳中のリボソームを準備するために試験管内再構成型翻訳系を用いた。均一な翻訳中リボソームを調製するために、hCMV の uORF2 配列を用いて、新生ペプチド依存的に翻訳を一時停止させ、N 末端側に付加した PA 配列を用いてアフィニティ精製を行った。そこに HCV IRES を加えた試料について、クライオ電子顕微鏡による立体構造解析を行った。すると HCV IRES が、進行中の mRNA の翻訳反応を邪魔することなく、40S サブユニットに結合している構造を 4.5 Å 分解能で決定することに成功した (図 1)。さらに、蛍光顕微鏡を用いた 1 分子観察からも、HCV IRES が確かに翻訳反応中のリボソームに結合していることを確認した。これらの結果から、HCV IRES は 40S サブユニットに結合しながら、宿主の mRNA の翻訳反応が終結するのを待ち構え、その後リボソームを「乗っ取る」と考えられた。

次に HCV IRES に依存して翻訳を開始した場合についても試験管内で試料を調製し、クライオ電子顕微鏡を用いて立体構造を 3.9 Å で決定した。すると、やはり HCV IRES が翻訳反応中のリボソームの 40S サブユニットに結合していることが明らかとなった。

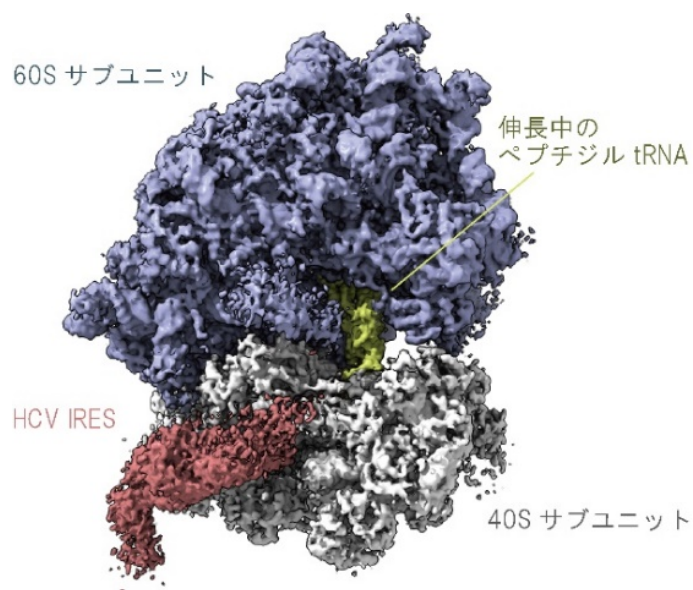


図 1 翻訳反応中のリボソームに結合する IRES を捉えたクライオ電子顕微鏡像

mRNA のキャップ構造に依存して宿主細胞の翻訳を開始したリボソームに結合した C 型肝炎ウイルス (HCV) の IRES (赤) と、合成途中のタンパク質 (ペプチド) を結合したペプチジル tRNA (緑) が同時に観察されたことから、IRES は進行中の mRNA の翻訳反応を邪魔することなく、40S サブユニットに結合しているのが分かる。HCV のゲノム RNA は 1 本鎖であるため、分子内の相補的な塩基同士が水素結合し、IRES の領域は特に複雑な立体構造をとる。

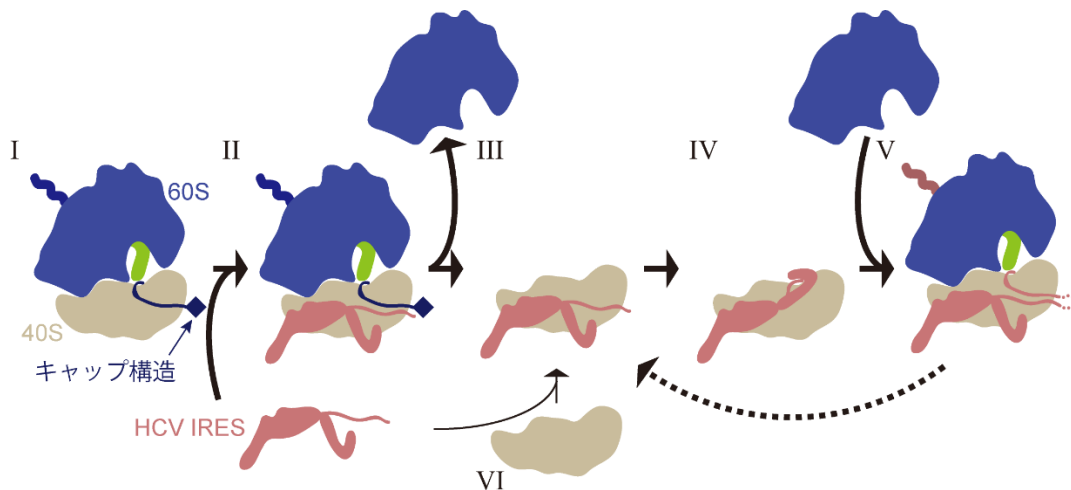


図 2 HCV の IRES が翻訳装置リボソームを乗っ取る過程の模式図

翻訳中のリボソームを構成する 60S サブユニット (青)、40S サブユニット (灰)、ペプチジル tRNA (緑) および翻訳される mRNA を模式的に示す。mRNA のキャップ構造依存的に翻訳中のリボソーム (I) の 40S サブユニットに HCV の IRES が結合し (II)、翻訳が終了すると (III)、結合していた IRES は下流のウイルス RNA の翻訳を誘導し (IV)、ウイルスタンパク質の合成が開始する (V)。同じ HCV の IRES と 40S サブユニットのペアが、次のラウンドの翻訳をもう一度担っているかもしれない (V→III)。翻訳に使われていないリボソームに、HCV の IRES が結合する場合もある (VI)。

生化学的な実験により、HCV IRES に依存した翻訳の開始は、キャップ構造を持つ mRNA を翻訳中のリボソームを用いた方が、翻訳反応に使われていない空のリボソームを用いるよりも、迅速に進むことが明らかとなった。この結果とクライオ電子顕微鏡による観察結果と併せると、従来の「使われていない 40S サブユニットに HCV の IRES が結合して、HCV のタンパク質合成が開始される」モデル (図 2 の VI→III→IV→V の流れ) よりも、「細胞の mRNA を翻訳中のリボソームに HCV の IRES が結合し乗っ取る」(図 2 の I→II→III→IV→V) 場合の方が、より効率よく頻りに起こると考えられる。さらに、HCV ゲノムの翻訳に使われている 40S サブユニットを、次のラウンドの翻訳の際にもう一度使う (図 2 の V→III) といったシステムも存在しうると考えられる。

このほかに、翻訳開始に機能する翻訳開始因子 eIF4A について、翻訳阻害剤 RocA と連続プリン配列、ATP アナログ AMPPNP の 4 者複合体の結晶構造解析を明らかにした。さらには、翻訳開始因子 eIF2 のリン酸化のある場合とない場合の両方について、他の翻訳開始因子 eIF2B との複合体の cryo-EM 構造を決定し、eIF2 のリン酸化の有無に応じて、eIF2B との結合様式を大きく変化させることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Yokoyama, T.[#], Machida, K.[#], Iwasaki, W.[#], Shigeta, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Harada, Y., Shigematsu, H., Shirouzu, M., Tadakuma, H.^{*}, Imataka, H.^{*} and **Ito, T.^{*}** HCV IRES captures an actively translating 80S ribosome. *Mol Cell*, published online. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.04.022 (Epub 2019 May 9) ([#] equally contributed) (^{*} co-corresponding authors) (査読有)
2. Kashiwagi, K., Yokoyama, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Shirouzu, M. and **Ito, T.** (2019) Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response. *Science*, **364**, 495-499. DOI: 10.1126/science.aaw4104 (査読有)
3. Iwasaki, S.^{*}, Iwasaki, W.[#], Takahashi, M.[#], Sakamoto, A., Watanabe, C., Shichino, Y., Floor, S.N., Fujiwara, K., Mito, M., Dodo, K., Sodeoka, M., Imataka, H., Honma, T., Fukuzawa, K., **Ito, T.^{*}** and Ingolia, N.T.^{*} (2019) The translation inhibitor Rocaglamide targets a bimolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA. *Mol Cell*, **73**, 738-748. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.11.026. ([#] equally contributed) (^{*} co-corresponding authors) (査読有)

4. Machida, K., Shigeta, T., Yamamoto, Y., **Ito, T.**, Svitkin, Y., Sonenberg, N. and Imataka, H. (2018) Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. *Sci Rep*, **8**, 17435. DOI: 10.1038/s41598-018-35753-1. (Epub 2018 Nov 28) (査読有)
5. Matsuda, T.#, **Ito, T.#**, Takemoto, C., Katsura, K., Ikeda, M., Wakiyama, M., Kukimoto-Niino, M., Yokoayama, S., Kurosawa, Y. and Shirouzu, M. (2018) Cell-free synthesis of functional antibody fragments to provide a structural basis for antibody–antigen interaction. *PLoS One*, **13**, e0193158. DOI: 10.1371/journal.pone.0193158. (Epub 2018 Feb 20) (# equally contributed) (査読有)
6. Kuwasako, K., Nameki, N., Tsuda, K., Takahashi, M., Sato, A., Tochio, N., Inoue, M., Terada, T., Kigawa, T., Kobayashi, N., Shirouzu, M., **Ito, T.**, Sakamoto, T., Wakamatsu, K., Güntert, P., Takahashi, S., Yokoyama, S. and Muto, Y. (2017) Solution structure of the first RNA recognition motif domain of human spliceosomal protein SF3b49 and its mode of interaction with a SF3b145 fragment. *Protein Sci*, **26**, 280-291. DOI: 10.1002/pro.3080. (査読有)
7. Christian, T., Sakaguchi, R., Perlinska, A.P., Lahoud, G., **Ito, T.**, Taylor, E.A., Yokoyama, S., Sulkowska, J.I. and Hou, Y.-M. (2016) Methyl transfer by substrate signaling from a knotted protein fold. *Nat Struct Mol Biol*, **23**, 941-948. DOI:10.1038/nsmb.3282. (Epub 2016 Aug 29) (査読有)
8. Goto-Ito, S., **Ito, T.*** and Yokoyama, S.* (2017) Trm5 and TrmD: two enzymes from distinct origins catalyze the identical tRNA modification, m¹G37. *Biomolecules*, **7**, E32. DOI:10.3390/biom7010032. (Epub 2017 Mar 21) (* co-corresponding authors) (査読有)
9. Kashiwagi, K., **Ito, T.*** and Yokoyama, S.* (2017) Crystal structure of eIF2B and insights into eIF2-eIF2B interactions. *FEBS J*, **284**, 868-874. DOI:10.1111/febs.13896. (Epub 2016 Sep 14) (* co-corresponding authors) (査読有)
10. 柏木一宏、**伊藤拓宏**、横山茂之 (2017) 翻訳開始因子eIF2Bの立体構造 - CATH/VWM型白質脳症の発症機構解明への手がかりとして. *BRAIN and NERVE—神経研究の進歩*, 69(1), 45-50. DOI: 10.11477/mf.1416200635. (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

1. Takeshi Yokoyama、HCV IRES captures a translating 80S ribosome to hijack host translational machinery、Translational Control、2018年
2. **Takuhiro Ito**、Structural basis for sequence-specific translation inhibition by Rocaglamide A、Translational Control、2018年
3. **Takuhiro Ito**、HCV IRES captures a translating 80S ribosome to hijack host translational machinery、Proteins: from the Cradle to the Grave、2018年
4. **伊藤拓宏**、Rocaglamide Aによる配列特異的な翻訳阻害の構造基盤、第20回日本RNA学会年会、2018年
5. 横山武司、C型肝炎IRESは翻訳中80Sリボソームに結合し、宿主の翻訳系をハイジャックする、第20回日本RNA学会年会、2018年
6. **Takuhiro Ito**、Structural basis for sequence-specific translation repression by eIF4A and Rocaglamide、ConBio2017、2017年
7. Kazuhiro Kashiwagi、Crystal structure of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B)、The RNA Society/The RNA Society of Japan、2016年
8. **Takuhiro Ito**、Crystal structure of eukaryotic translation initiation factor 2B、Nascent Chain

Biology Meeting 2016、2016年

9. 柏木一宏、翻訳開始因子eIF2Bの結晶構造、日本蛋白質科学会、2016年

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ: <http://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/ito-t/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：今高 寛晃

ローマ字氏名：(IMATAKA, hiroaki)

研究協力者氏名：重松 秀樹

ローマ字氏名：(SHIGEMATSU, hideki)

研究協力者氏名：横山 武司

ローマ字氏名：(YOKOYAMA, takeshi)

研究協力者氏名：柏木 一宏

ローマ字氏名：(KASHIWAGI, kazuhiko)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。