

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14644

研究課題名（和文）ストレス環境における翻訳開始因子eIF2Bの活性阻害機構の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of the inhibition of eIF2B under stress

研究代表者

柏木 一宏（Kashiwagi, Kazuhiro）

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・研究員

研究者番号：60732980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：クライオ電子顕微鏡とX線結晶構造解析を用いて、翻訳開始因子eIF2Bとリン酸化・非リン酸化状態のeIF2との複合体の構造を解明した。eIF2のeIF2Bへの結合様式はリン酸化の有無によって全く異なるものとなっており、ストレス環境でリン酸化されたeIF2はeIF2Bに対して触媒反応に適さない様式で結合することによりeIF2Bの活性を阻害していることが明らかにされた。また、リン酸化eIF2の結合はeIF2Bのサブユニット配置の変化を伴っており、ストレス時のeIF2B活性阻害を緩和する低分子化合物ISRIBはこの配置変化を防ぐことで機能しているという新たな作用機序が提唱された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞がストレスを検知すると、ストレスに対処するためにタンパク質合成に変化が生じる。タンパク質合成の開始に参与する因子どうしが結合した構造をストレス時と非ストレス時とで解明し、ストレスの有無によって結合様式が全く異なるものとなることを明らかにした。また、この変化を防ぐISRIBと呼ばれる薬剤はさまざまな神経疾患に対する新規治療薬としての可能性が報告されており、我々が解明した構造をもとにこの薬剤が作用する機構について提唱した。

研究成果の概要（英文）：The structures of eIF2B complexed with the phosphorylated or unphosphorylated eIF2 were determined by cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. The binding mode of eIF2 to eIF2B is completely different depending on the phosphorylation state of eIF2, and the stress-induced phosphorylated eIF2 binds eIF2B in a manner that is unsuitable for catalytic reaction. Furthermore, the binding of the phosphorylated eIF2 involves the rearrangement of eIF2B subunits, and a novel mechanism was proposed that ISRIB, a small molecule that alleviates eIF2B inhibition under stress, prevents this rearrangement by the phosphorylated eIF2 as an allosteric antagonist.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 X線結晶構造解析 翻訳 翻訳開始 統合的ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物では、さまざまなストレスによって翻訳開始因子 eIF2 のリン酸化が誘導され、eIF2 特異的のグアニンヌクレオチド交換因子である eIF2B の活性が阻害される。その結果、翻訳の全体的な抑制と、ストレス応答性遺伝子の発現が行われる。この過程は統合的ストレス応答 (ISR) と呼ばれる。しかしながら、この翻訳調節機構の分子的詳細は明らかではなかった。

本研究に先立って、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来の eIF2B の大腸菌組み換え発現系による大量調製法が確立され、X 線結晶構造解析によってその十量体構造が解明された。この構造に基づいて、eIF2 のリン酸化による eIF2B の活性阻害機構についてのモデルが提唱されたものの、eIF2B によるヌクレオチド交換反応機構や、eIF2 のリン酸化による阻害機構の実証には eIF2-eIF2B 複合体の立体構造情報が必要とされていた。

さらに、ISR の活性化を阻害する低分子化合物 ISRIB が同定され、その標的分子が eIF2B であることも報告された。また、ISRIB の投与が外傷性脳損傷やプリオン病の進行の抑制に有効であることが報告され、eIF2B の活性制御機構や ISRIB による調節機構の分子レベルでの理解は医学的観点からも重要なものであった。

## 2. 研究の目的

### (1) eIF2B による eIF2 のリン酸化状態の識別機構の解明

ストレス時には、ストレスによって活性化される eIF2 キナーゼによって eIF2 の  $\alpha$  サブユニットのセリン 51 番残基がリン酸化される。eIF2B によるこのリン酸化の認識を契機として、eIF2B のヌクレオチド交換活性の阻害が引き起こされる。その分子的詳細を解明するため、eIF2B と eIF2 $\alpha$  サブユニットとの複合体について高分解能での構造解析を行う。

### (2) eIF2 のリン酸化による eIF2B のヌクレオチド交換活性の阻害機構の解明

eIF2B が eIF2 のリン酸化を認識した後、eIF2B と eIF2 の間の相互作用にどのような変化が生じることでヌクレオチド交換活性の阻害が引き起こされているのかを解明する。具体的には、eIF2B と eIF2 全体との複合体について構造解析を行い、非リン酸化状態では eIF2B によるヌクレオチド交換反応がどのように行われているのか、eIF2 のリン酸化によってその相互作用にどのような変化が報じるのかについて理解する。

### (3) ISRIB の eIF2B への作用機序の解明

eIF2B と ISRIB との複合体の構造解析を通じて、ISRIB の結合が eIF2B の構造と活性に及ぼす影響を理解する。

## 3. 研究の方法

上述の目的のために必要な各種複合体の調製法を確立し、X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を併用して研究を行った。

## 4. 研究成果

### (1) eIF2B による eIF2 のリン酸化状態の識別機構の解明

分裂酵母由来 eIF2B と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の eIF2 $\alpha$  サブユニットとの複合体の構造解析を試み、X 線結晶構造解析によってリン酸化型 eIF2 $\alpha$  複合体・非リン酸化型 eIF2 $\alpha$  複合体の双方の構造解析に成功した。両者の構造比較の結果、リン酸化された eIF2 $\alpha$  サブユニットのセリン 51 番残基は eIF2B によって直接認識されているのではなく、リン酸化に伴う eIF2 $\alpha$  サブユニット内の相互作用の変化が eIF2B によって認識されていることが明らかとなった (図 1)。また、リン酸化セリン 51 番残基との分子内相互作用に関与している残基に変異を導入することで、eIF2 $\alpha$  リン酸化に伴う eIF2B への親和性の増強がみられなくなることでマイクロスケール熱泳動 (MST) による解離定数の測定によって示された。

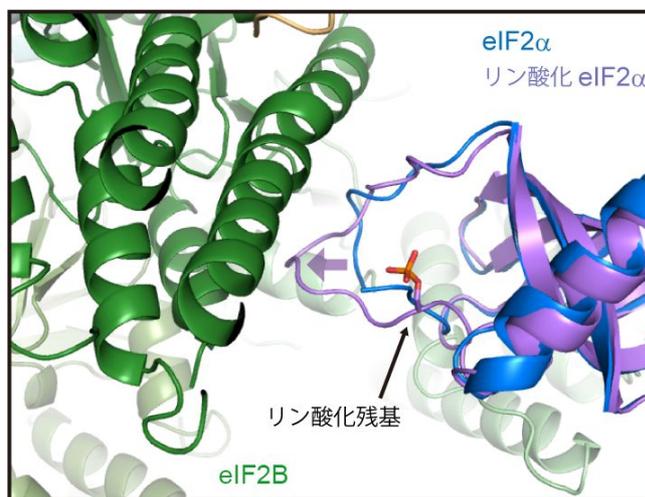


図 1. eIF2 $\alpha$  のリン酸化に伴う相互作用の変化

(2) eIF2 のリン酸化による eIF2B のヌクレオチド交換活性の阻害機構の解明

eIF2B と eIF2 全体との複合体の構造解析へ向けて、ヒト eIF2B の大腸菌組み換え発現系の構築を行い、大量発現系を確立した。eIF2 は、HEK293 細胞を用いた組み換え発現と精製を行った。ヒト eIF2B-eIF2 複合体に関してはクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行い、リン酸化型 eIF2 複合体と非リン酸化型 eIF2 複合体の双方の解明に成功した。これらの構造からは、eIF2 の eIF2B に対する結合様式が eIF2 のリン酸化の有無によって全く異なるものとなることが明らかにされた (図 2 上)。eIF2B によるヌクレオチド交換反応を担う領域である  $\epsilon$  サブユニットの HEAT ドメインは非リン酸化 eIF2 との複合体のみで観察され、eIF2 のヌクレオチド結合サブユニットである  $\gamma$  サブユニットと相互作用していた。複合体中では、eIF2 $\gamma$  サブユニットはヌクレオチドの結合を担うスイッチ 1 と呼ばれる領域が大きく開いたコンフォメーションとなっており、その結果ヌクレオチドの解離が促進されることが推測された。またリン酸化 eIF2 複合体では、リン酸化 eIF2 は非リン酸化 eIF2 の結合を妨げるように結合しており、阻害因子であるリン酸化 eIF2 は基質である非リン酸化 eIF2 の結合やヌクレオチド交換反応の際の物理的障壁となっていることが示唆された (図 2 下)。

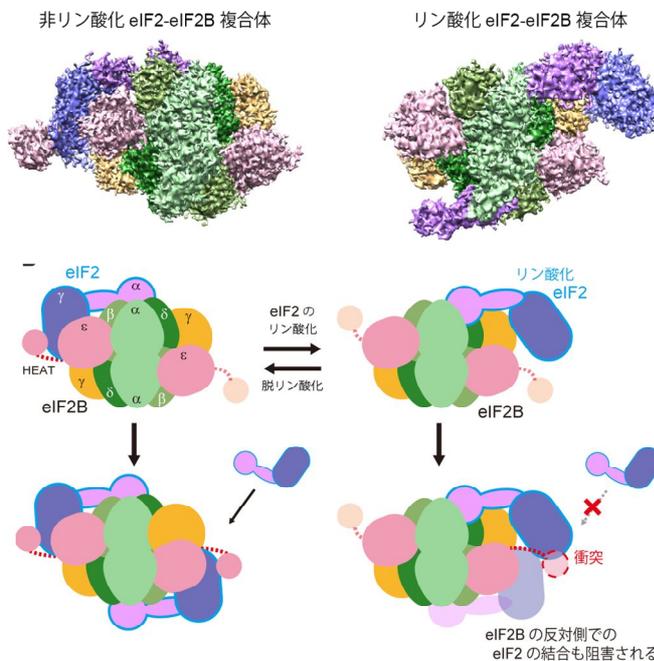


図 2. eIF2 のリン酸化に伴う eIF2B との相互作用様式の変化 (上) と推定される活性阻害機構 (下)。

(3) ISRIB の eIF2B への作用機序の解明

eIF2B と ISRIB との複合体は、他グループによってクライオ電子顕微鏡構造が報告された。その結合様式からは、ISRIB は eIF2B のサブユニット間の相互作用を強化して十量体の組み立てを促進し、細胞内の eIF2B の総活性を増加させることが示唆されていた。一方我々は、リン酸化 eIF2-eIF2B 複合体では eIF2B の各サブユニットの相対配置に変化が生じており、その変化が基質である非リン酸化 eIF2 との相互作用面や ISRIB の結合ポケットの形状に影響を及ぼしていることを発見した。また共同研究により、リン酸化 eIF2 の非存在下では ISRIB による eIF2B の活性促進効果はわずかなものであり、リン酸化 eIF2 の存在下でのみ大きな促進効果がみられること、また、リン酸化 eIF2 の結合と ISRIB の結合は拮抗的な関係にあり、一方の結合が他方の結合を阻害することが明らかにされた。これらのことから、ISRIB はリン酸化 eIF2 による eIF2B 活性阻害のアロステリックなアンタゴニストとして機能する、という新たな作用機序が提唱された (図 3)。

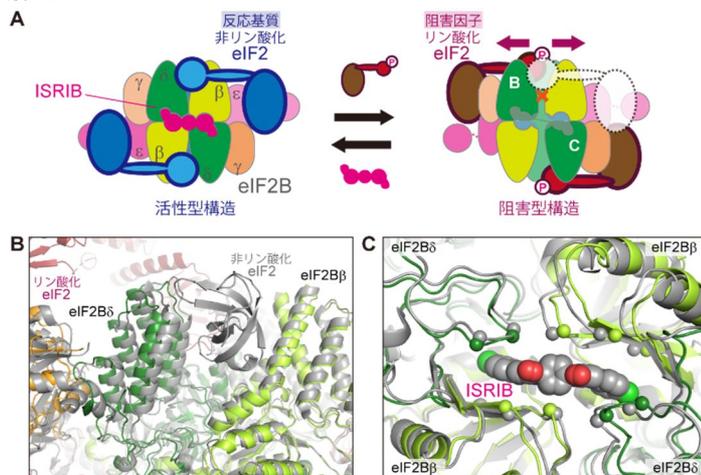


図 3. 提唱された ISRIB の新規作用機序。(A) リン酸化 eIF2 の結合は eIF2B のサブユニットの配置を変化させ、非リン酸化 eIF2 や ISRIB の結合を防ぐ。逆に、ISRIB の結合はリン酸化 eIF2 による構造変化を阻害する。(B) リン酸化 eIF2 の結合に伴って、非リン酸化 eIF2 と相互作用するサブユニットは互いに遠ざけられる (カラー: リン酸化 eIF2-eIF2B 複合体、グレー: 非リン酸化 eIF2-eIF2B 複合体)。(C) リン酸化 eIF2 の結合に伴う ISRIB 結合ポケットの形状の変化 (カラー: リン酸化 eIF2-eIF2B 複合体、グレー: eIF2B-ISRIB 複合体)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuhiro Kashiwagi, Takeshi Yokoyama, Madoka Nishimoto, Mari Takahashi, Ayako Sakamoto, Mayumi Yonemochi, Mikako Shirouzu, Takuhiro Ito	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 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.e6
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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhiro Kashiwagi, Takeshi Yokoyama, Madoka Nishimoto, Mari Takahashi, Ayako Sakamoto, Mayumi Yonemochi, Mikako Shirouzu, Takuhiro Ito
2. 発表標題 Inhibition of eIF2B activity by eIF2 phosphorylation
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Kashiwagi, Takeshi Yokoyama, Madoka Nishimoto, Mari Takahashi, Ayako Sakamoto, Mayumi Yonemochi, Mikako Shirouzu, Takuhiro Ito
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------