

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22550158

研究課題名（和文） 新規抗ガン剤開発のための翻訳開始因子 4E の機能制御物質の探索

研究課題名（英文） Discovery of novel anti-cancer drug :The search for regulatory elements of eukaryotic initiation factor 4E.

研究代表者

友尾 幸司 (TOMOO KOJI)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70257898

研究成果の概要（和文）：生体内でのタンパク質合成開始に重要な働きを有すると同時に、ガン細胞の増殖にも関与することが知られている翻訳開始因子 4E(eIF4E)と、その内因性機能制御物質である 4E 結合タンパク質(4EBP)との相互作用様式について分光学的手法により解析を行い、4EBP 分子においてこれまで知られていた部位とは異なった領域に、eIF4E との結合に大きく関与する新たな相互作用部位の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The eukaryotic initiation factor 4E(eIF4E) serves as not only a master switch of translation reaction, but also the growth of cancer cell. In this work, we have examined the interaction mode between eIF4E and 4E-binding protein (4EBP) that is endogenous regulator of eIF4E by spectroscopic analysis. We reveal that the ⁷⁹PGVTS⁸³ sequence of 4EBP plays an important role as the second binding site in the tight binding with eIF4E.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：翻訳開始・翻訳制御・抗ガン剤・結晶構造解析・SPR・ITC・相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

真核生物の翻訳開始反応に関与する一連の開始因子(eIF)の中で、タンパク質合成開始因子 4E(eIF4E)は、mRNA のキャップ構造を特異的に認識してタンパク質合成の最初の反応を触媒/開始させる重要な働きを担っている。この eIF4E の機能発現制御機構には、eIF4E 自身のリン酸化による直接的な制御と、内因性 eIF4E 結合蛋白質(4EBP)によ

る間接的な制御があり、その機構は非常に複雑である。一方、細胞内での eIF4E の異常産生が、大腸ガンや乳ガン等の発症ならびにガン細胞の増殖などを引き起こす事が明らかとなり、eIF4E の機能調節が、新たなガン治療に繋がる事が示唆されている。この様に、多方面に渡り重要な働きを持つ eIF4E であるが、生体内での存在量が極めて少なく、更にその機能発現には他の多くのタンパク質制御因子が関与することから、eIF4E の詳細

な機能制御機構は未だ明らかでない。そこで、ヒト遺伝子由来の eIF4E の機能および機能制御機構を分子・原子レベルで構造化学的に解析することにより、eIF4E によるタンパク質生合成開始反応機構および発ガンメカニズムの解明を目指し、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、内因性 eIF4E 機能調節因子である 4E 結合タンパク質(4EBP)に着目し、4EBP による eIF4E の機能調節機構の解明と機能調節物質の開発を目的とした。

4EBP は eIF4E と複合体を形成することで、他の翻訳開始因子と eIF4E との複合体形成を阻害している。シグナル伝達により mTOR による 4EBP のリン酸化が行われると、eIF4E 複合体からの遊離が促進され、eIF4E が他の翻訳開始因子との複合体形成が可能となり、mRNA の翻訳が誘導される。4EBP には、3 つのサブタイプの存在が確認されているが、それらの働きについては未だ明らかでない。そこで、eIF4E と 3 種の 4EBP サブタイプとの相互作用様式について多くの構造化学的知見を得て、eIF4E の機能調節機構の解明と機能調節物質の開発を目的とし、以下の項目に焦点をおいて研究を計画した。

- (1) 4EBP サブタイプの部位変異体遺伝子の作成と大腸菌の系を用いた大量発現系を構築する。
- (2) 表面プラズモン共鳴法、等温型マイクロカロリメーターや分光学的手法を用いて、4EBP サブタイプと eIF4E との相互作用の差異について解析する。
- (3) eIF4E と 4EBP との複合体結晶を作成し、その立体構造を X 線結晶構造解析法により決定し、4EBP と eIF4E の複合体形成機構を解明する。
- (4) ペプチド性 eIF4E 機能制御物質の作成および eIF4E との相互作用を検討する。

3. 研究の方法

内因性 eIF4E 機能調節因子 4EBP は 3 種のサブタイプの存在が確認されているが、それらの機能の差については明らかでない。そこで本研究においては、4EBP サブタイプ(4EBP-1~3)に対して、各種変異体を作成し、大腸菌からの大量発現系を構築した。それらの試料を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)法や等温滴定型マイクロカロリメーター(ITC)により eIF4E と 3 種の 4EBP サブタイプ変異体との複合体形成に関するより定量的なデータ(会合定数や結合エネルギー等)を測定した。更に、X 線結晶構造解析法によ

り相互作用様式について多くの構造化学的知見を得るために、eIF4E-4EBP 複合体の結晶化を行い、これらの知見を基に、eIF4E に特異的に結合し機能を制御し得るペプチド性 eIF4E 機能制御物質の作製を試みる。以下に方法について記す。

- (1) 4EBP サブタイプの部位欠損変異体遺伝子の作成と大腸菌からの大量発現系の確立

これまでの研究から、4EBP は有意な二次構造を形成せずに溶液中に存在することが知られている。そこで、4EBP の wild 体と 4E 結合領域を含む N-末端側および C-末端側の各種欠損変異体遺伝子を作成し、発現および精製がより簡便になることを目的として、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)および His-tag 融合体として発現系の遺伝子構築を行った。それらの 4EBP 変異体を用いて、現在明らかにされている 4E 結合部の他に eIF4E との相互作用にはどのような領域が関与し相互作用を形成しているかについて詳細な解析を行った。作成した 4EBP 変異体を図 1 に示す。

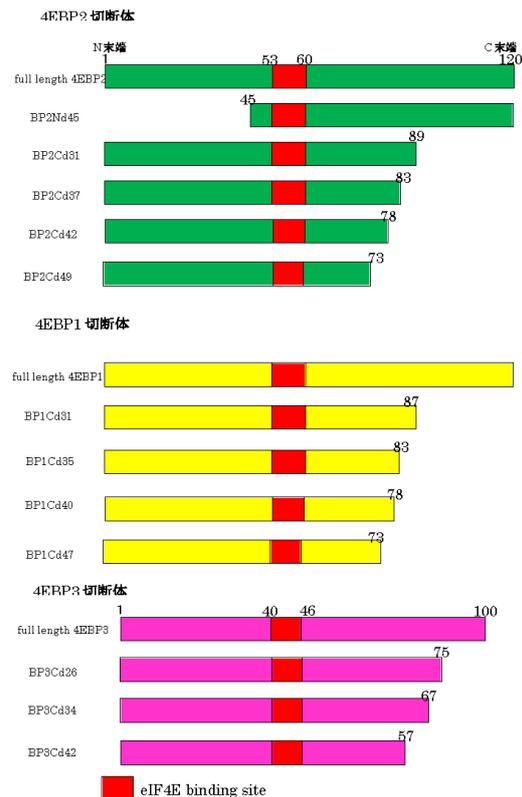


図 1 4EBP の各種変異体

(2) 分光学的手法による eIF4E と 4EBP サブタイプおよび変異体の相互作用解析

BIACORE-T100 を用いて、eIF4E と 3 種の 4EBP サブタイプ変異体との複合体形成に関するより定量的なデータ(会合定数や結合エネルギー等)を測定した。更に、等温滴定型マイクロカロリメーターにより、eIF4E と 4EBP との相互作用についての熱力学パラメーターを直接測定し解析を行った。

(3) eIF4E と 4EBP サブタイプおよび各種変異体の複合体の作成とその結晶化条件の確立

eIF4E-4EBP 複合体のような新規蛋白質の結晶化条件については、多くの関連要因について検討しなければならない。中でも目的蛋白質の溶液中での均一性は非常に重要な要因である。均一性の測定は、動的光散乱測定装置を用いて、結晶化に適したタンパク質試料の均一性と純度を確認しながら、eIF4E-4EBP 複合体の結晶化条件を検索した。

(4) 超高速 X 線回折装置を用いた各種複合体結晶の回折強度データの測定と構造解析

本学には、共同利用機器として高分子用超高輝度高速 X 線回折測定装置が導入されている。また、放射光施設 SPring-8 でのデータ測定も可能であり、得られた結晶が微細な物であっても、回折データの測定を行うことが出来ると思われる。一方、初期構造の決定においても、すでに解析した eIF4E の構造情報を用いた分子置換法を用いることが出来る。以上のことから、結晶作成後のデータ測定、初期構造の決定ならびに構造精密化は、円滑に進めることが出来ると思われる。本研究の様なタンパク質分子同士の複合体結晶の作成は多くの試行と時間を要する。そこで、結晶化実験の進行と共に以下のような分光学的な溶液実験も計画している。

(5) ペプチド性 eIF4E 機能制御物質の作成および eIF4E との相互作用の検討

これまでの eIF4E と 4EBP との相互作用解析、ならびにそれらの立体構造解析などの結果から得られた知見を基にして、eIF4E に特異的に結合し機能を制御し得るペプチド性化合物をデザインし合成を試みる。それらの化合物を用いて、eIF4E との相互作用について SPR 法や ITC を用いて解析すると共に、eIF4E との複合体結晶の作成や、溶液中での相互作用様式について NMR 法を用いて解析を行う。

4. 研究成果

(1) eIF4E-4EBP 相互作用の表面プラズモン (SPR) 解析

4EBP サブタイプの 4EBP1~3 について、その N または C 末端欠損体を作成し (Fig. 5)、それぞれの eIF4E への相互作用の差異を、表面プラズモン共鳴 (SPR) により速度論的に検討した。4EBP1 の C 末端側より 31, 35, 40, 47 残基を欠損させた変異体の各遺伝子を作成し、GST 融合タンパク質として大腸菌に組み込み発現させた。各欠損変異体は良好な発現が得られたためアフィニティクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて単離精製し、高純度の各欠損変異体を得ることができた。こうして調製した試料を用いて、表面プラズモン共鳴 (SPR) により、eIF4E に対する 4EBP の各欠損体の相互作用の差異について検討を行った。4EBP 欠損変異体をリガンドとして固定化させたセンサーチップに対して、アナライトとして eIF4E-m⁷GTP 複合体を用いて、相互作用を解析した結果、例えば、4EBP1 については Cd31BP1 および Cd35BP1 各欠損体は、対照としての完全長 4EBP1 との比較で優位な差がないのに対し、Cd40BP1 および Cd47BP1 欠損体においては、eIF4E との結合力が明らかに低下した (Table 1)。これらの結果は、4EBP2 と同様に 4EBP1 においても、Y54-L60 領域より C 末端側に存在する D74-S83 領域が、eIF4E との結合に極めて重要であることを示唆する結果となった。さらに関連残基の削除による結合の精密化を行った結果、Fig. 3 の赤で示した PGVTSn とりわけ V アミノ酸残基が結合に極めて重要であることを初めて明らかにすることが出来た。

Table 1 wild type BP1~3 と C 末端切断体の SPR 分析による解析結果の比較

リガンド	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
full length BP1	3.97×10^5	7.99×10^{-4}	2.01×10^{-9}
BP1Cd31	2.8×10^5	3.34×10^{-3}	1.79×10^{-9}
BP1Cd35	4.4×10^5	3.25×10^{-3}	7.38×10^{-9}
BP1Cd40			2.63×10^{-7}
BP1Cd47			2.32×10^{-7}
リガンド	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
full length BP2	2.42×10^5	6.63×10^{-4}	2.22×10^{-9}
BP2Cd32	1.57×10^5	4.86×10^{-4}	3.1×10^{-9}
BP2Cd37	3.55×10^5	1.81×10^{-3}	5.09×10^{-9}
BP2Cd42			2.63×10^{-7}
BP2Cd49			8.01×10^{-7}
リガンド	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
full length BP3	4.09×10^5	8.29×10^{-4}	2.03×10^{-9}
BP3C26	5.03×10^5	1.26×10^{-4}	2.49×10^{-9}
BP3C34			1.17×10^{-6}
BP3C42			2.4×10^{-6}

(2) 4EBP-eIF4E 分子間相互作用の熱力学的解析

4EBP と eIF4E の結合において、eIF4E 結合部位 (first binding site) 以外にも、4EBP C 末端側に新規結合領域 (second binding site) が存在することを初めて明らかにした。ここでは、eIF4E-4EBP 間の結合におけるこの second binding site の役割について等温滴定カロリーメトリー (ITC) を用いて熱力学的解析を行った。測定結果より、すべてのリガンドは wild type eIF4E-m7GTP 複合体に対して、1 段階反応で結合することが明らかとなった。

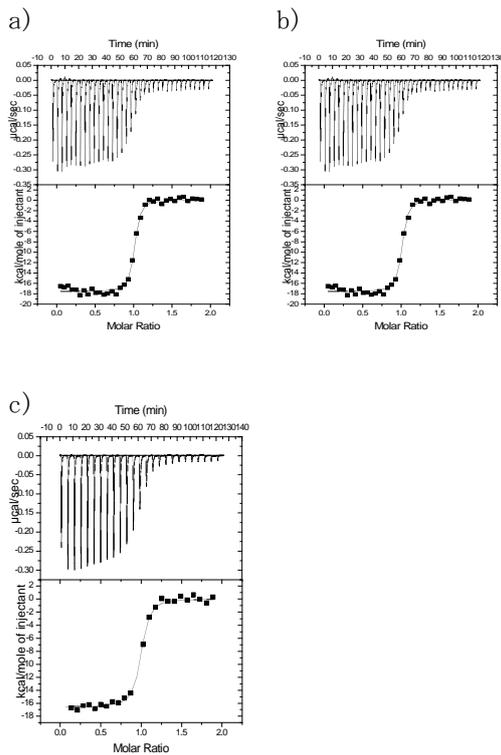


図2 wild type eIF4E-m7GTP 複合体-full length BP1 (a), -BP1Cd35 (b), -BP1Cd40 (c) の測定結果

ITC 測定の結果より、4EBP1-eIF4E の結合はエンタルピー駆動型ということが明らかになった。すなわち、4EBP-eIF4E 間の結合において、ファンデルワールス相互作用の関与が考えられる。更に得られた結合定数を見ると、BP1Cd40 が最も小さくなり、second binding site を持たないと eIF4E との結合が低下するという SPR 分析の結果と一致した。しかし、エントロピー変化量やエンタルピー変化量に各リガンドで大きな変化がないことから、一定の立体構造間でのかぎとかぎ穴のようなタイプの結合ではなく、induced-fit type の結合を示していると推測された。

(3) eIF4E の 4EBP first および second binding region への直接結合

eIF4E が 4EBP の first binding region と second binding region への直接結合する場合の N-末端および C-末端のフレキシブルな領域の影響を調べることは、4EBP による eIF4E の制御機構におけるこれら領域の役割を解明する上で重要である。4EBP(52-83)は、52 残基目から 89 残基目までの配列をもとに合成した。両ペプチドと eIF4E との相互作用について、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法および等温滴定カロリーメトリー (ITC) 法を用いて、eIF4E と 2 種の合成ペプチド間における相互作用の差異について解析した。

[eIF4E-4EBP(46-70)] についての測定した SPR 結果は、アナライト濃度に依存的な結合を示すセンサーグラムが得られたが、結合領域及び解離領域が極めて短く、特徴的な箱型のセンサーグラムが得られた。これは結合・解離速度が非常に速く、結合・解離反応が極めて速く平衡状態に移行するためである (図 3-a)。一方、[eIF4E-4EBP(52-83)] についての測定した結果は、アナライト濃度に依存的な結合を示すセンサーグラムが得られた。図 3-b に示すように、0 (sec) の立ち上がりからアナライトの結合量が最大となる RU 値まではアナライトがリガンドに対して結合し (結合領域)、その後アナライト分子が除去されると、時間とともに RU 値は緩やかに減少して行く。この時にアナライトがリガンドから解離する様子が経時的に観察できる (解離領域)。これらの結果は 4EBP 変換体の結果と一致している。

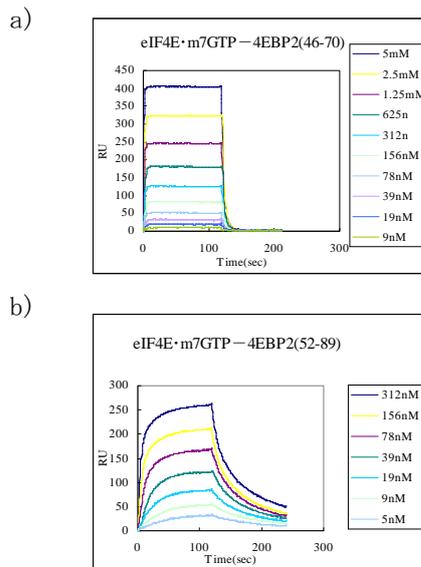


図3 eIF4E と 4EBP peptide との相互作用

一方、ITC 測定はこれまでと異なる結果を与えた。first binding region のみを含む 4EBP2(46-70)では、これまでに見られたのと同じ、one site binding model のプロファイルを示したのに対して、両結合部位を含む 4EBP2(52-89)では二つの結合部位の存在を示す two site binding profile を示した。これらの結果は、second-binding region 単独では殆ど結合力はないものの、first-binding site が共存する場合、second-binding region の結合力は極めて強くなることを示している。

4) m⁷GTP-eIF4E-4EBP2(46 - 70) ペプチド三元複合体の X線結晶構造解析

4EBP 各サブタイプ間で eIF4E に対する相互作用力に差があり、中でも 4EBP2 が最も eIF4E に対して最も高い親和性を持つことを明らかにしている。一方、eIF4E-m⁷GpppA-4EBP1 ペプチド三元複合体の X線構造解析を報告しているが、4EBP2 についての解析はない。そこで、4EBP1 と 4EBP2 の eIF4E への結合力の差異を原子レベルで解析する目的で、eIF4E-m⁷GpppA-4EBP2 ペプチド三元複合体の X線構造解析を行った。結晶化の方法として、ハンギングドロップ蒸気拡散法 (Hanging drop vapor diffusion 法) を用いた。複合体は針状結晶として得られた。その X 線回折像(図 4)と結晶学的データ (Table 2) を以下に示す。

Table 2 結晶学的データ

Space group	<i>P</i> 4 ₃
Cell dimensions(Å)	a=b=88.59 c=38.24 α=β=γ=90
No. of unique reflections	17290
Average redundancy	6.90
completeness(%)	97.5
R _{merge}	0.078

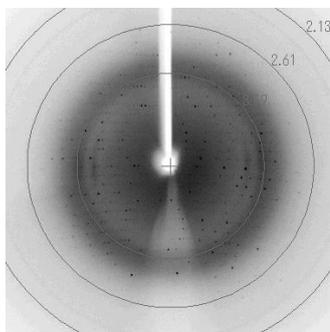


図 4 X 線回折像

初期構造の決定は、eIF4E-m⁷GpppA-4EBP1 ペプチド三元複合体の座標を用いた分子置換法で行った。構造精密化後の最終的な結果を Table.3 にまとめた。R 値および free R 値はそれぞれ 22.4%、22.7%になり、水分子は 76 個拾得した。eIF4E の全 217 残基中、N 末端側、および C 末端側の電子密度が部分的に途切れていたが、この他はきれいに電子密度図とモデル分子とを重ね合わせることができた。

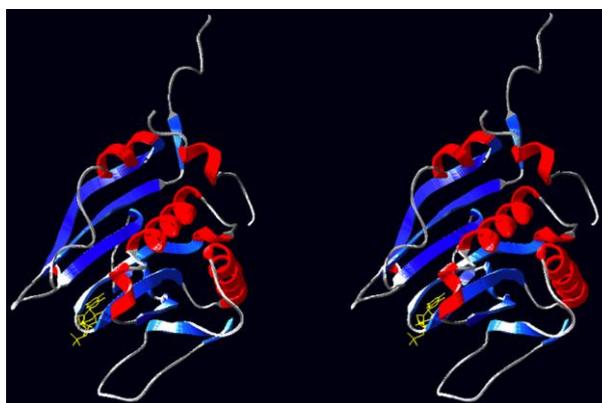
Table 3 構造精密化

Resolution range(Å)	87.71~2.10
No. of reflections	15698
R-factor	0.224
R _{free}	0.227

得られた m⁷GTP-eIF4E-4EBP2(46 - 70) ペプチド三元複合体の立体構造を図 5 に示す。今回得られた三元複合体の立体構造と、モデルに用いた eIF4E-m⁷GTP-4EBP1 フラグメント三元複合体の立体構造と比較すると、全体構造においては顕著な差は見られなかった。本研究では、25 残基の 4EBP2 フラグメントを用いたが、その N 末端及び C 末端は揺らぎが大きく、明確な電子密度図を得ることは出来なかった。しかし 54~60 の領域は α helix の 2 次構造を形成していた。eIF4E の部分的に保存された疎水性の Pro38 の酸素原子と 4EBP2 の Tyr54 のフェノール性水酸基の酸素原子間に水素結合が確認された。また、eIF4E の Trp73 の窒素原子と Leu59 のカルボキシル炭素の酸素原子間に水素結合が観察された。

今回得られた構造化学的知見を基に、eIF4E 特異的結合ペプチドの設計に取り組む。

図 5 m⁷GTP-eIF4E-4EBP2(46 - 70) ペプチド



三元複合体の立体構造

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3件)

① Fukuyo A., In Y., Ishida T. and Tomoo K. Structural scaffold for eIF4E binding selectivity of 4E-BP isoforms: crystal structure of eIF4E binding region of 4E-BP2 and its comparison with that of 4E-BP1. *J. Pept. Sci.*, 査読有、17, 2011, pp. 650-657

DOI: 10.1002/psc.1384

② Umenaga Y. Paku KS, In Y., Ishida T. and Tomoo K. Identification and function of the second eIF4E-binding region in N-terminal domain of eIF4G: comparison with eIF4E-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有、414, 2011, pp. 462-467

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.084.

③ Paku KS., Umenaga Y., Usui T., Fukuyo A., Mizuno A., Ishida T. and Tomoo K. A conserved motif within the flexible C-terminus of the translational regulator 4E-BP is required for tight binding to the mRNA cap-binding protein eIF4E. *Biochem. J.* 査読有、441, 2012, pp. 237-245

DOI: 10.1042/BJ20101481.

〔学会発表〕(計2件)

① 梅永 優、朴 琴順、尹 康子、友尾幸司、石田寿昌、ヒト由来タンパク質合成開始因子 eIF4E と内因性制御因子 4EBP サブタイプ及び eIF4G の相互作用研究、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010 年 10 月、大阪

② 梅永 優、朴 琴順、尹 康子、友尾幸司、石田寿昌、ヒト由来タンパク質合成開始因子 eIF4E と eIF4G 及び内因性制御因子 4EBP サブタイプの相互作用研究、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡

〔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

友尾 幸司 (TOMOO KOJI)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：70257898

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

尹 康子 (IN YASUKO)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50257896
箕浦 克彦 (MINOURA KATUHIKO)
大阪薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：10278591