

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687013

研究課題名(和文) 翻訳開始因子 eIF2 の機能発現の構造的基盤

研究課題名(英文) Structural basis for the functional mechanism of eukaryotic initiation factor eIF2

研究代表者

伊藤 拓宏 (Ito, Takuhiro)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・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) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳開始因子eIF2に特異的なグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)である翻訳開始因子eIF2Bの立体構造を決定し、eIF2BのeIF2の認識部位を決定した。eIF2BのeIF2認識様式は複数あることが明らかとなり、リン酸化eIF2によるeIF2BのGEF不活性化の構造的機構のモデルを提唱した。翻訳開始因子eIF2AのWD-リピートドメインの立体構造を決定し、9枚の羽根からなるプロペラフォールドの構造を明らかにした。TrmDと基質tRNA、およびメチル基供与体アナログであるシネフンジンの三者複合体の立体構造を決定し、基質認識の分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have determined the 3D structure of eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B), which functions as a guanine nucleotide exchange factor specific for eIF2. Furthermore, we determined the eIF2-recognition regions in eIF2B. We identified more than two interaction modes between eIF2 and eIF2, and successfully proposed the structural model how phosphorylated eIF2 inhibits the GEF activity of eIF2B. We determined the WD-repeat domain of eIF2A, which revealed that the domain possesses nine beta propellers. We also determined the ternary complex of TrmD, tRNA, and AdoMet analog, which revealed the detailed molecular mechanism of the substrate tRNA recognition.

研究分野：構造生物化学

キーワード：翻訳 翻訳開始因子 eIF2 eIF2B X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の翻訳開始因子 eIF2 は、リボソームへ開始メチオニル tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) を運搬する、翻訳開始の最初のステップを担う因子である。eIF2 はヘテロ 3 量体 (eIF2 $\alpha\beta\gamma$ ) であり、GTP 結合に依存して開始メチオニル tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) と結合し、eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub> 3 者複合体を形成して 40S リボソームへと運ばれる。3 つのサブユニットのうち eIF2 $\gamma$  が GDP/GTP 結合部位を持つ。

翻訳開始因子 eIF2B は eIF2 に特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である。eIF2B はヘテロ 5 量体 (eIF2B $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ ) と考えられていた。eIF2B $\epsilon$  の C 末端側に位置する HEAT ドメインが GEF 活性を担っている。eIF2B は eIF2 の GEF という比較的単純な活性を担う因子であるにも関わらず、ヘテロ 5 量体という複雑な構造をしている。その理由は、eIF2B が数多くのシグナルを受け取り、 $\epsilon$  サブユニットによる GEF 活性の制御を介して翻訳開始を調節する機能を担っているためと考えられる。eIF2B の重要な機能の一つとして、ストレス応答が挙げられる。ストレス環境下 (ウイルスの感染など) においては、防御機構として翻訳を急速に停止させるシステムが細胞内に存在する。まず、各ストレスにより活性化した eIF2 $\alpha$  キナーゼが eIF2 $\alpha$  の 51 番目のセリン残基をリン酸化し、このリン酸化 eIF2 $\alpha$  は eIF2B と強い親和性を持つ。すると、細胞内で機能する eIF2B が枯渇し、結果として活性型 GTP 結合 eIF2 が急激に減少し、翻訳サイクルが停止する。リン酸化 eIF2 $\alpha$  の認識は eIF2B $\alpha\beta\delta$  のサブコンプレックスによることが遺伝的および生化学的な解析から示唆されている。一方で eIF2B $\gamma\epsilon$  は活性サブコンプレックスを形成すると考えられている。

eIF2 に特異的な GTPase 活性化タンパク質 (GAP) である翻訳開始因子 eIF5 は、40S リボソーム上に ternary complex や mRNA と共に正しく配置されることによって GAP 活性を発揮し、eIF2 $\gamma$  上の GTP は GDP へと加水分解される。GDP 結合型 eIF2 はリボソームを離れ、次の翻訳サイクルへと向かう。eIF5 の GAP 活性を担っているのは N 末端サブドメインと亜鉛結合サブドメインからなる N 末端ドメインである。eIF5 の C 末端側には HEAT ドメインが存在し、リボソーム結合非依存的に eIF2 $\beta$  と相互作用することによって、eIF5 が eIF2 の近くで常に待ち構えているというモデルが提唱されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、eIF2 の立体構造、およびその相互作用因子の立体構造、それらと eIF2 の複合体の立体構造を X 線結晶構造解析法により決定し、立体構造に基づく生化学的な解析と併せて eIF2 の機能発現の分子機構を詳細に

明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

分裂酵母由来あるいはピキア酵母由来、ヒト由来の eIF2 あるいは eIF2B、eIF5、その他の翻訳に関連する因子について、結晶化に十分な質と量の試料を調製する。準備が整い次第、単体および複合体について結晶化条件の探索を順次行う。X 線回折実験に適した結晶が得られれば、放射光施設においてデータの収集を行う。モデルの構築が可能なデータセット (Native のデータセットと初期位相決定のためのデータセット) がそろえば、モデルの構築と精密化を行う。立体構造から見出された eIF2 とその相互作用因子の機能発現メカニズムについては、生化学的な手法により更に検証を行う。

## 4. 研究成果

## (1) eIF2B の結晶構造解析

分裂酵母由来 eIF2B の組換え体は大腸菌に大量に発現させ、精製する系を構築した。更には良質な結晶を得ることに成功し、セレノメチオニン誘導体を用いた SAD 法によって初期位相を決定した。最終的に 3.2 Å の分解能で構造を決定した (図 1)。

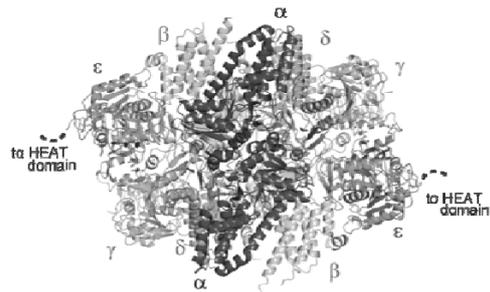


図 1 eIF2B の結晶構造

eIF2B は  $\alpha$  から  $\epsilon$  までの 5 つのサブユニットを 2 分子ずつ持つ 10 量体であった。1 つの  $\alpha$ - $\alpha$  2 量体と 2 つの  $\beta$ - $\delta$  2 量体が集まって 6 量体の構造を中央に形成し、その両側にそれぞれ  $\gamma$ - $\epsilon$  2 量体が結合していた。

GEF 活性を持つ  $\epsilon$  サブユニットの HEAT ドメインについては、ドメイン全体の電子密度を観察することが出来なかった。結晶中で一定の位置に存在せず、リンカーを介してある一定の範囲を自由に動くと考えられる (図 1 点線部分)。

## (2) 部位特異的クロスリンク法を用いた eIF2B の eIF2 相互作用部位の同定

eIF2B のどの領域で eIF2 と相互作用しているかを明らかにするために、光反応性クロスリンカーであるパラベンゾイルフェニルアラニンを部位特異的に導入した eIF2B 誘導体のシリーズを用意し、eIF2 とのクロスリンク能を調べた。

すると eIF2 $\gamma$  は eIF2B の  $\gamma$  および  $\epsilon$  サブユ

ニットの外側の面で認識されていることが明らかになった。一方、リン酸化 eIF2 $\alpha$  は eIF2B の  $\alpha$  および  $\beta$ ,  $\delta$  サブユニットから構成されるくぼみによって認識されていることが明らかになった。興味深いことに、これらの eIF2B の 2 つの eIF2 認識面は互いに離れており、1 つの eIF2 分子が同時に接することは不可能であった。

したがって eIF2B と eIF2 との相互作用様式は複数存在することが明らかになった。本研究で明らかになった eIF2B のくぼみによってリン酸化 eIF2 $\alpha$  を認識している様式は、GEF 活性を発揮できない相互作用様式であることを生化学的解析により明らかにした。一連の解析により、リン酸化 eIF2 による eIF2B の GEF 不活性化の構造的機構のモデルを提唱することができた。

### (3) eIF2A の結晶構造解析

翻訳開始因子 eIF2A は eIF2 と GTP に依存しない翻訳開始に必須の因子として同定されたが、その機能の詳細は明らかになっていない。我々は分裂酵母由来の eIF2A の N 末端側に存在する WD-repeat ドメインの結晶構造を 2.5 Å の分解能で決定した (図 2)。

eIF2A の WD-repeat ドメインは 9 枚の羽根からなる  $\beta$  プロペラフォールドの構造をとっていた。そのドーナツ型の構造の片面は生物種間の保存性が高く、正に帯電しているため、eIF2A はこの面で核酸、おそらくは RNA に結合する機能を持っていると推察される。本研究は eIF2A の機能を明らかにする転機になると考える。

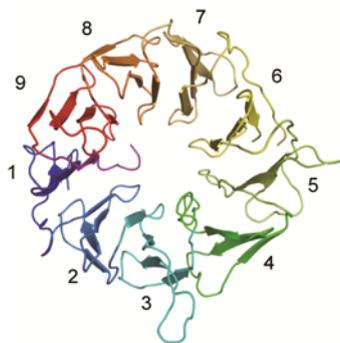


図 2 eIF2A の結晶構造

### (4) TrmD・sinefungin・tRNA 3 者複合体の結晶構造解析

翻訳の際アミノ酸を運搬する機能をもつ tRNA は転写後に多くの修飾を受けており、その機能発現と安定性に重要な役割を果たしている。特にアンチコドンの隣に位置する 37 位への修飾は数多く見出されており、翻訳の際に読み枠を正しく維持するのに重要である。37 位の修飾塩基の一つである 1 メチルグアノシン ( $m^1G37$ ) は細菌から真核生物までの全ての生物において普遍的に見出され

ている修飾の 1 つである。細菌においては、TrmD という内部に三つ葉様の結び目構造をもつ酵素が、S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として tRNA<sup>37</sup> 位のグアノシンの N1 位をメチル化する。

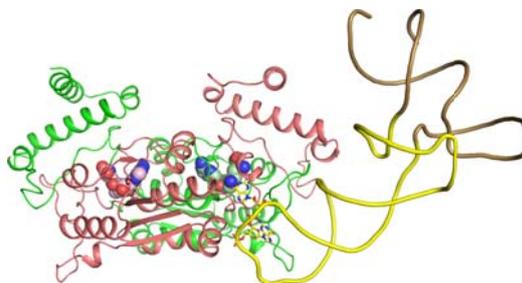


図 3 TrmD・sinefungin・tRNA 3 者複合体の結晶構造

我々はインフルエンザ菌由来の TrmD と基質 tRNA, およびメチル基供与体アナログであるシネフンジンの三者複合体の立体構造を結晶構造解析により明らかにした (図 3)。この結晶構造においては、二量体化した TrmD が一つの基質 tRNA を認識していた。また、活性部位の存在する溝においては、37 位のグアノシンともう一つの決定因子である 36 位のグアノシンが特異的に認識されていた。更に我々は 36 位の変異体との複合体の立体構造についても結晶構造解析に成功した。基質を含んでいない TrmD の構造とシネフンジンを結合した構造、今回決定した構造、各種の生化学的な実験の結果とを考慮合わせることにより、メチル基供与体認識から tRNA 認識、メチル基転移反応へと至る分子機構を詳細に理解することができた。

### 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 1 件)

- ① Kashiwagi, K., Ito, T. and Yokoyama, S. (2014) Crystal structure of the eukaryotic translation initiation factor 2A from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Struct Funct Genomics*, **15**, 125-130. 査読有  
DOI: 10.1007/s10969-014-9177-y

[学会発表] (計 10 件)

- ① Kazuhiro Kashiwagi, et al., Crystal structure of the eukaryotic translation initiation factor 2A from *Schizosaccharomyces pombe*. Translational Control 2014 in Cold Spring Harbor Laboratory, 2014.9.3, Cold Spring Harbor, USA.

- ② Kazuhiro Kashiwagi, et al., Structural insight

into the interaction between eIF2B and eIF2. Translational Control 2014 in Cold Spring Harbor Laboratory, 2014.9.2, Cold Spring Harbor, USA.

- ③ Kazuhiro Kashiwagi, et al., Structural insight into the eIF2-eIF2B interaction. 23<sup>rd</sup> Congress and general assembly of the International Union of Crystallography, 2014.8.11, Montreal, Canada.
- ④ Takuhiro Ito, et al., Structural basis of the sequence-specific methyltransfer reaction by bacterial tRNA methyltransferase TrmD, The 65<sup>th</sup> Fujihara seminar international symposium on synthetic biology of unnatural base pairs and amino acids, 2013.10.1, Grand Hotel New Oji (Tomakomai, Hokkaido).
- ⑤ Takuhiro Ito, et al., Structural mechanism of site-specific RNA modification by the bacterial tRNA(m<sup>1</sup>G37)-methyltransferase TrmD, 7<sup>th</sup> International conference on structural genomics 2013-Structural Life Science, 2013.7.29, Keio Plaza Hotel Sapporo (Sapporo, Hokkaido).
- ⑥ Takuhiro Ito, et al., Structural basis of sequence-specific RNA recognition by the bacterial tRNA(m<sup>1</sup>G37)-methyltransferase TrmD, XXIV tRNA conference, 2012.12.3, Olmue, Chile.
- ⑦ 伊藤拓宏 他、TrmD-tRNA 複合体の結晶構造により明らかとなった基質認識機構とメチル基転移反応機構、第14回日本RNA学会年会、2012年7月19日、東北大学川内萩ホール（宮城県仙台市）
- ⑧ Takuhiro Ito, et al., Structural basis of the substrate selection by the bacterial tRNA(m<sup>1</sup>G37)-methyltransferase TrmD、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑨ 伊藤拓宏 他、細菌型 tRNA<sup>37</sup> 位グアノシン m<sup>1</sup>メチル基転移酵素と基質 tRNA-メチル基供与体アナログの複合体の結晶構造、第49回生物物理学会年会、2011年9月18日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス（兵庫県姫路市）
- ⑩ Takuya B Hiyama, et al., Crystal structure of the a subunit of human eukaryotic initiation factor 2B, RNA2011 (16<sup>th</sup> Annual meeting of the RNA society), 2011.6.17, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Kyoto).

[その他]

ホームページ等

<http://www.clst.riken.jp/ja/science/labs/ssb/struc/tfsb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 拓宏 (ITO, Takuhiro)

理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：70401164