

論文内容の要旨

論文題目: ヒト翻訳開始因子 eIF2B α の X 線結晶構造解析

“Crystal structure of the α subunit of human eukaryotic translation initiation factor 2B”

氏名: 檜山 卓也

要旨

真核生物におけるタンパク質翻訳の開始段階は、12 以上の真核生物翻訳開始因子 (eukaryotic initiation factor: eIF) を中心とした多数の因子により、協調的に執り行われている。ヘテロ五量体タンパク質である eIF2B (α - ϵ サブユニット) は、開始 tRNA である Met-tRNA_i^{Met} をリボソームへ運ぶ働きをする三量体タンパク質 eIF2 (α - γ サブユニット) 特異的グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF) である。eIF2 γ は GTP または GDP と結合し、GTP 結合時に Met-tRNA_i^{Met} と安定した三量体複合体 (ternary complex: TC) を形成する。eIF2 は eIF2B によって GDP 結合型から GTP 結合活性型へと変換される。

細胞がウイルス感染、変性タンパク質の蓄積、アミノ酸欠乏、ヒートショック等のストレスを受けると、シグナルを通じて PKR, PERK, GCN2, HRI から種々のキナーゼが活性化され eIF2 α Ser51 がリン酸化される。eIF2 がリン酸化されると、eIF2B と強く結合し、eIF2B のグアニンヌクレオチド交換反応を低下させる。結果、GTP 結合型 eIF2 が不足し、TC が減少して、細胞全般における翻訳抑制が行われる。

eIF2B α - ϵ のうち、 γ , ϵ サブユニットは配列相同性を有する。 ϵ サブユニットの C 末端の HEAT ドメインだけでグアニンヌクレオチド交換活性 (GEF 活性) を持つが、これは eIF2B γ • ϵ 二量体の GEF 活性よりも低い。一方、 α , β , δ サブユニットはこれら三つのサブユニット間で配列相同性を有し、リン酸化された eIF2 [eIF2 (α P)] の認識を担って、基本的に GEF 活性には関与しない。 α , β , δ サブユニットのそれぞれ単独では eIF2 (α P) と結

合できず、さらにマウスやショウジョウバエ eIF2B において、五量体から α サブユニットが欠損した eIF2B β - ϵ では eIF2 と eIF2 (α P) を区別できずに GEF 反応を行うことが報告されている。これまでに、出芽酵母に強制発現させることで、リン酸化されていない eIF2 と強く結合してしまう eIF2B 変異 (GCN4 翻訳促進変異) が α サブユニットのみから、また逆に eIF2 (α P) との結合が低下するような変異 (GCN4 翻訳抑制変異) が α , β , δ サブユニットそれぞれから複数発見されている。しかし、遺伝子全体に渡って散在するこれら変異がどのようなメカニズムで eIF2 α のリン酸化の認識に関与しているのか明らかにされていない。

2001 年、Leukoencephalopathy with vanishing white matter (VWM) もしくは childhood ataxia with central nervous system hypomyelination (CACH) と呼ばれるミエリン形成不全を認める白質脳症が eIF2B の常染色体劣性変異によって引き起こされている疾患であることが明らかにされた。eIF2B の変異は α - ϵ の各サブユニットそれぞれで発見され、現在までに疾患の原因とされる 70 以上の変異が確認されている。これらは ϵ サブユニットに多く存在するものの、各サブユニットに散らばっており、これら変異の影響がどのようなメカニズムで疾患へとつながっているのか不明である。

構造解析の面では、eIF2B はリコンビナントによる調製が困難であることから、これまでに ϵ サブユニット HEAT ドメインの三次構造のみ報告されていた。古細菌においては、eIF2B α , β , δ サブユニットと配列相同性を持つ遺伝子が 3 つ見つかったが、GEF 活性を担う eIF2B γ , ϵ サブユニットに対応する相同遺伝子は存在しないため、その機能は不明である。これまでに、eIF2B α , β , δ サブユニットと配列相同性を有する 5-methylthioribose 1-phosphate isomerase (M1Pi) や、古細菌の eIF2B-like protein について構造解析が為されており、これらは一見機能的に無関係のタンパク質が相同的な構造ファミリーを形成していると考えられ、それら構造ホモログから eIF2B の機能を推測することは困難であった。

本研究では、ヒトの eIF2B α の結晶構造を分解能 2.65 Å で明らかにした。eIF2B α は 5 本のヘリックスで構成された N 端ドメインと Rossmann-fold 様 C 端ドメインによって構成されていた。N 端ドメインと C 端ドメインの間には塩基性に偏った大きなポケットが口を開けた状態で固定されており、その底部に硫酸イオンが結合していた。

全体構造をこれまでに解かれた M1Pi/eIF2B-like protein と比較してみると、Z-score は 25.7-30 と高い数値を示したが、eIF2B α 特有の特徴があることが明らかになった。一点目として、eIF2B はその構造ホモログと比べて、ヘリックス $\alpha 5$ - $\alpha 6$ 間が折れ曲がっており、それによってポケットの入り口の直径は約 15 Å × 17 Å と大きく口を開いた状態で固定されている。二点目として、硫酸イオンが結合している他の構造ホモログと比較すると、硫酸イオンがより深い、入り口から約 16 Å の位置に結合していた。また、硫酸イオンの認識をしている残基はヒト以外の構造ホモログでは保存されておらず、これら構造的特徴が eIF2B α 特有のものであることが強く示唆された。

ヒト eIF2B α と出芽酵母 eIF2B α の一次配列類似性は高く、三次構造に相同性がある可能性が高い。さらに、eIF2B α , β , δ サブユニット間の配列類似性も非常に高いことから本研

究で得られた三次構造は β , δ サブユニットについても示唆を与えるものと考えられる。出芽酵母における研究で同定されていた, GCN4 翻訳促進変異を eIF2B α の構造にマッピングしたところ, ポケットの周囲に集まっていた。ここから, ポケット周辺部に変異が入り, ポケットの構造が変化することで, eIF2 α との結合が強くなることが予想される。続いて, 同様に出芽酵母で同定されていた GCN4 翻訳抑制変異を対応する eIF2B α のアミノ酸残基にマッピングしたところ, ポケットの反対面に集まっていた。さらに, VWM/CACH の変異箇所をそれぞれのサブユニットに対してマッピングしたところ, それらはポケットの側に集まっていた。これらの変異が eIF2B 複合体の安定性, および eIF2 との相互作用にどのように影響しているか考察した。

本研究で得られた三次構造並びに配列解析, 生化学実験との照らし合わせにより, ポケット部位が eIF2 (α P) のリン酸基を認識している可能性が示唆された。そこで, 最後に eIF2B α と eIF2 (α P) の結合モデル作成を試み, その可能性について議論した。さらに, 総合討論として, eIF2B α ・ β ・ δ の四次相互作用について, また eIF2B と eIF2 の相互作用についてこれまでに蓄積された生化学的データと照らし合わせながら検証した。