

## 論文の内容の要旨

論文題目 真核生物型翻訳開始因子の構造生物学的解析

(Structural analysis of the eukaryotic translation initiation factors)

氏名 柏木 一宏

真核生物における翻訳開始過程は、多数の翻訳開始因子(eukaryotic initiation factor; eIF)によって制御される複雑な過程である。中でも、eIF2 と eIF2B は翻訳段階での遺伝子発現の制御における中核的因子である。GTP を結合した eIF2 は、メチオニル開始 tRNA ( $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ )とともに三者複合体(ternary complex; TC)を形成し、40S リボソームへ結合する。開始コドン認識のプロセスの後、eIF2 は  $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ を残して不活性な GDP 結合型としてリボソーム上から放出される。eIF2B は eIF2 特異的グアニンヌクレオチド交換因子(guanine-nucleotide exchange factor; GEF)であり、eIF2 を活性型である GTP 結合型へと変換する。このヌクレオチド交換反応は eIF2 $\alpha$ サブユニット Ser51 残基のリン酸化によって阻害され、その結果、細胞のタンパク質合成は抑制される。さまざまなストレス因子が eIF2 $\alpha$ のリン酸化を引き起こすことが知られており、この制御機構はストレス環境への迅速な対応へ大きく寄与をしている。

eIF2B は $\alpha$ から $\epsilon$ の 5 種類のサブユニットから構成される因子であり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ サブ

ユニットが調節サブコンプレックスを形成して eIF2 $\alpha$  のリン酸化状態の識別に、 $\gamma$ ,  $\epsilon$  サブユニットが触媒サブコンプレックスを形成してヌクレオチド交換反応に関与していると考えられている。また、eIF2B によるヌクレオチド交換反応の機構、また eIF2 $\alpha$  のリン酸化による阻害の機構については、遺伝学的解析によって重要な残基が数多く eIF2B サブユニット上に同定されている。しかしながら、eIF2B の全体構造が未解明であるため、これらの残基の意義についての解釈を行うことは困難であった。そこで本研究では、eIF2B の大量発現系の構築および X 線結晶構造解析による eIF2B 全体構造の解明を目的とした。

eIF2B は細胞内の存在量が少なく、内在性の因子を構造解析に供することが困難であることが予想されたため、大腸菌を用いた組換え発現系の構築を試みた。種々の検討の結果、5 種類のサブユニットすべてを大腸菌内で共発現することによって、eIF2B を大量調製することに成功した。この組換え eIF2B は、十量体を形成していることがゲル濾過クロマトグラフィーの結果からは示唆された。さらに、この組換え eIF2B の結晶化に成功し、放射光施設で X 線回折データを収集した。セレンメチオニン置換体の結晶を用いて単波長異常分散法で初期位相を決定し、最終的にネイティブ結晶をもとに 3.14 Å の分解能で構造を決定した。電子密度マップには、 $\epsilon$  サブユニットの HEAT ドメインを除く eIF2B のほぼすべての領域の電子密度が観察された。この結晶構造中でも eIF2B は各サブユニットを 2 分子ずつ含む十量体構造を形成しており、中央に  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  サブユニットの二分子ずつから構成される六量体の調節サブコンプレックスが存在し、両端に  $\gamma$ - $\epsilon$  ヘテロ二量体からなる触媒サブコンプレックスが存在する、というサブユニットの配置であった。サブユニット間の相互作用の様式からは、この十量体構造が eIF2B の機能的な最小単位であると考えられる。

eIF2B と eIF2 $\alpha$  の相互作用面の同定のため、両タンパク質の表面残基を光反応性非天然アミノ酸であるパラベンゾイルフェニルアラニン(*p*-benzoyl-L-phenylalanine; pBpa)へ部位特異的に置換し、両者の光クロスリンクを試みた。架橋が形成される pBpa 置換残基の配置から、eIF2 $\alpha$  の N 末端ドメインが eIF2B の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  サブユニットによって形成されるくぼ

みにおいて認識されていることが明らかとなった。また、eIF2 $\alpha$ の Ser51 残基をリン酸化もしくはリン酸化状態を模した Asp 残基への変異を施すことによって、架橋が形成される置換残基の配置に大きな変化は見られないことが示された。このことから、このくぼみにおける eIF2 $\alpha$ の認識様式はリン酸化状態にかかわらず同様であり、両者は Ser51 残基周辺の局所的な相互作用の変化によって識別されていると推察される。

出芽酵母において eIF2B を介した翻訳調節に異常をもたらす変異残基に対応する残基は、構造上ではこのくぼみの近辺、そして $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット間の相互作用面に集中して存在していた。くぼみの残基の変異は直接的に、そして $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット間の相互作用面の変異は eIF2 $\alpha$ 相互作用面の形成を不安定化することによって間接的に、eIF2B-eIF2 $\alpha$ 間の相互作用に影響を与えていると考えられる。また、ヒトにおいて eIF2B 各遺伝子の変異は leukoencephalopathy with vanishing white matter (VWM)または childhood ataxia with central nervous system hypomyelination (CACH)と呼ばれる、神経変性疾患と関連づけられている。VWM 患者にみられる変異残基に対応する残基は、構造上は調節サブコンプレックスと触媒サブコンプレックスとの相互作用面近傍に多く位置しており、サブコンプレックス間の結合の不安定化による部分的な活性の低下が疾患の一因となっている可能性が示唆される。そして、光クロスリンク実験、変異残基の構造上へのマッピングの結果をもとに eIF2B-eIF2間の相互作用についてモデルを立て、検証を行った。