

学位論文

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)

平成 25 年 12 月 博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

柏木 一宏

## Abstract

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 (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>)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 Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>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。セレノ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、ε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α, β, δ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γ-ε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 eIF2α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; *p*Bpa)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 *p*Bpa 置換残基の配置から、eIF2αの N 末端ドメインが eIF2B のα, β, δ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、eIF2α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 eIF2α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α, β, δ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α, β, δサブユニット間の相互作用面の変異は eIF2α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-eIF2α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．



## Abstract

The initiation of eukaryotic translation is a highly-regulated process, which is controlled mainly by eukaryotic translation initiation factors (eIFs). Among them, eIF2 and eIF2B are the key molecules for translational control of gene expression. GTP-bound eIF2 forms a ternary complex (TC) with aminoacylated initiator methionyl-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>), and TC is loaded onto the 40S ribosomal subunit. After the start codon recognition, eIF2 is released from the 40S ribosome as an inactive GDP-bound form. eIF2B is the guanine nucleotide exchange factor (GEF) specific for eIF2, and converts inactive GDP-bound eIF2 into active GTP-bound eIF2. The phosphorylation of the eIF2  $\alpha$  subunit at Ser51 inhibits this nucleotide exchange reaction, leading to the repression of general protein synthesis. Various stressors are known to induce the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , and this control contributes significantly to a rapid response of cells to stressful environments.

eIF2B is a multi-subunit factor comprising five subunits, eIF2B $\alpha$  to eIF2B $\epsilon$ . The regulatory subunits (the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\delta$  subunits) are considered to form a complex called “regulatory subcomplex”, which is responsible for the discrimination of the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$ , whereas the catalytic subunits (the  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits) are considered to form a complex called “catalytic subcomplex”, which is responsible for nucleotide exchange reactions. To date, genetic analyses have identified many residues in eIF2B subunits which are important in the nucleotide exchange reaction and its inhibition by the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ . However, the exact roles of these residues are still undefined due to the lack of the overall three-dimensional structure of eIF2B. Thus, I aimed for the establishment of an expression and purification method of eIF2B suitable for an X-ray crystallographic analysis.

Since it seems difficult to prepare endogenous eIF2B from eukaryotic cells due to low expression levels in various cell types, I constructed a recombinant expression system with *E. coli*. I

succeeded in a large scale preparation of recombinant eIF2B by the co-expression of all five subunits. The purified eIF2B eluted as a decamer on size-exclusion chromatography, judging from molecular weight markers. This eIF2B readily crystallized and the X-ray diffraction data from native and selenomethionine(SeMet)-substituted eIF2B crystals were collected. The initial phases were obtained by SeMet single wavelength anomalous dispersion (SAD), and the final molecular model of eIF2B was refined with the dataset from a native crystal at a 3.14 Å resolution. Almost all regions of eIF2B except the HEAT domain in the  $\epsilon$  subunit are assigned, and the structure forms a decamer containing two molecules of each subunit. In this structure, the regulatory subcomplex resides at the center of the structure, and two bodies of the catalytic subcomplex lie aside of it. This arrangement of subunits suggests this decameric structure, rather than a pentamer, is a functional unit for eIF2B.

For the identification of the interface for eIF2 $\alpha$ , I performed photo-cross-linking experiments by the site-specific replacement of residues by a photo-reactive non-natural amino acid, *p*-benzoyl-L-phenylalanine (*p*Bpa). These experiments revealed that the N-terminal domain of eIF2 $\alpha$ , which bears Ser51, is recognized at the cavity which is formed by  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\delta$  subunits. The position of cross-link-positive replacements was little changed by the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  Ser51 or the phosphomimetic Ser51Asp mutation. This suggests that eIF2 $\alpha$  is recognized in the similar manner regardless of its phosphorylation status, and the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  may be discriminated by the local change of interaction around Ser51.

Many mutations in the regulatory subcomplex lead to the abrogated translational control in budding yeast. The equivalent residues in this structure are clustered at the cavity or the interfaces among  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\delta$  subunits. These suggest that these mutations abrogate the eIF2B-eIF2 $\alpha$  interaction at this cavity directly (for the mutations at the cavity) or indirectly (for the mutations at the  $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$  interfaces). Mutations of human eIF2B genes are related to the neurodegenerative disease called leukoencephalopathy with vanishing white matter (VWM) or childhood ataxia with central

nervous system hypomyelination (CACH). Many of the equivalent residues to the VWM mutation residues are found at the periphery of the interface between the regulatory subcomplex and the catalytic subcomplex. This raises the possibility that one cause of this disease is the partial loss of the interplay of subcomplexes due to unstable inter-subcomplex interactions. Based on the photo-cross-linking experiments and the mapping of mutation residues, I proposed a model of the interaction between eIF2B and eIF2, and discussed the validity of this model.

# 目次

Abstract .....	i
略語表 .....	ix
第 1 章 序論 .....	1
1-1 真核生物の翻訳開始過程 .....	1
1-2 eIF2B を介した翻訳調節 .....	2
1-3 eIF2B および eIF2 の構造 .....	3
1-4 eIF2B の変異と疾患 .....	5
1-5 eIF2B を介した翻訳制御における未解決の課題 .....	6
1-6 本研究の概要 .....	8
第 2 章 eIF2B 発現系の構築・結晶化 .....	10
2-1 方法 .....	10
2-1-1 発現ベクターの構築と発現状況の検討 .....	10
2-1-2 eIF2B の大量調製 .....	10
2-1-3 eIF2B の結晶化 .....	11
2-1-4 eIF2B の結晶の X 線回折実験および回折データの処理 .....	12
2-2 大腸菌組換え発現系による eIF2B の調製 .....	12
2-3 eIF2B の結晶化 .....	14
2-4 eIF2B 結晶の X 線回折実験 .....	15
2-5 位相決定と分子モデルの構築 .....	16
第 3 章 eIF2B の構造の解析 .....	18
3-1 方法 .....	18
3-2 eIF2B の全体構造 .....	18
3-2-1 eIF2B の全体構造 .....	18
3-2-2 調節サブコンプレックスの構造 .....	19
3-2-3 触媒サブコンプレックスの構造 .....	20
3-2-4 調節サブコンプレックスと触媒サブコンプレックスの相互作用 .....	21
3-3 eIF2B 表面残基の保存性 .....	22
3-4 出芽酵母 Gcd <sup>-</sup> /Gcn <sup>-</sup> 変異の構造上へのマッピング .....	23
3-5 VWM の原因変異の構造上へのマッピング .....	24
第 4 章 光クロスリンクによる eIF2B-eIF2 $\alpha$ 相互作用面の探索 .....	28
4-1 方法 .....	28
4-1-1 eIF2B および eIF2 $\alpha$ サブユニット発現系の構築 .....	28
4-1-2 eIF2B および eIF2 $\alpha$ サブユニットの調製 .....	28
4-1-3 PKR の調製 .....	29

4-1-4 PKR による eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化 .....	30
4-1-5 pBpa 標識タンパク質の調製 .....	30
4-1-6 光クロスリンク .....	31
4-2 pBpa 標識 eIF2B と eIF2 $\alpha$ サブユニットの光クロスリンク .....	31
4-3 pBpa 標識 eIF2 $\alpha$ サブユニットと eIF2B の光クロスリンク .....	33
第 5 章 eIF2B と eIF2 の相互作用についての考察 .....	35
5-1 触媒サブコンプレックスと eIF2 の相互作用 .....	35
5-2 調節サブコンプレックスと eIF2 の相互作用 .....	37
5-3 eIF2B と eIF2 の相互作用 .....	38
5-4 VWM 発症のメカニズム .....	40
5-5 eIF2B-eIF2 間相互作用の進化的起源 .....	42
5-6 結論および展望 .....	44
謝辞 .....	46
引用文献 .....	47
図表 .....	56

## 略語表

### アミノ酸（残基）

略号（残基）	英語表記	日本語表記
Ala, A	alanine	アラニン
Cys, C	cysteine	システイン
Asp, D	aspartic acid	アスパラギン酸
Glu, E	glutamic acid	グルタミン酸
Phe, F	phenylalanine	フェニルアラニン
Gly, G	glycine	グリシン
His, H	histidine	ヒスチジン
Ile, I	isoleucine	イソロイシン
Lys, K	lysine	リジン
Leu, L	leucine	ロイシン
Met, M	methionine	メチオニン
Asn, N	asparagine	アスパラギン
Pro, P	proline	プロリン
Gln, Q	glutamine	グルタミン
Arg, R	arginine	アルギニン
Ser, S	serine	セリン
Thr, T	threonine	スレオニン
Val, V	valine	バリン
Trp, W	tryptophan	トリプトファン
Tyr, Y	tyrosine	チロシン

略号	英語表記	日本語表記
Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	methionylated initiator tRNA	メチオニル開始 tRNA
SeMet	selenomethionine	セレノメチオニン
<i>p</i> Bpa	<i>p</i> -benzoyl-L-phenylalanine	パラベンゾイルフェニルアラニン
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
SAD	single-wavelength anomalous dispersion	単波長異常分散
SIR	single isomorphous replacement	単一同型置換
SIRAS	SIR with anomalous scattering	
XAFS	X-ray absorption fine structure	X 線吸収微細構造
AA-box	acidic and aromatic amino acid box	
AGP	ADP-glucose pyrophosphorylase	
CACH	childhood ataxia with central nervous system hypomyelination	
eIF	eukaryotic initiation factor	翻訳開始因子
Gcd <sup>-</sup>	general control derepressed	
Gcn <sup>-</sup>	general control non-derepressible	
GEF	guanine-nucleotide exchange factor	グアニンヌクレオチド交換因子
K-box	lysine-rich box	
LβH	left-handed β-helix	左巻きβヘリックス
λPP	lambda protein phosphatase	
M1Pi	methylthioribose-1-phosphate isomerase	
MBP	maltose-binding protein	
ORF	open reading frame	
uORF	upstream ORF	
PIC	pre-initiation complex	開始前複合体
PLD	pyrophosphorylase-like domain	
R15Pi	ribose-1,5-bisphosphate isomerase	
TC	ternary complex	三者複合体
UTR	untaranslated region	非翻訳領域
VWM	leukoencephalopathy with vanishing white matter	

# 第 1 章 序論

## 1-1 真核生物の翻訳開始過程

翻訳開始過程は、ポリペプチド鎖伸長反応が可能な状態のリボソームを mRNA 上に組み立てる過程であり、mRNA 上の開始コドンがリボソーム P サイト上の開始 tRNA と正しく対合した状態を作り出すことが必要とされる。この翻訳開始過程は原核生物と真核生物とでは大きく様相が異なり、真核生物では多くの翻訳開始因子 (eukaryotic initiation factor; eIF) が必要とされる<sup>1-3</sup> (図 1-1)。翻訳開始因子 eIF2 は、GTP と共にメチオニル化された開始 tRNA ( $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ ) を結合し、三者複合体 (ternary complex; TC) を形成する。そして、他の翻訳開始因子と共にリボソーム 40S サブユニットに結合し、43S 開始前複合体 (pre-initiation complex; PIC) を形成する。PIC は、mRNA の 5'末端に結合した eIF4F 複合体によって mRNA 上へとリクルートされると、開始コドンを探して mRNA 上を移動する (スキヤニング)。開始コドンの認識が起これば、eIF2 は結合 GTP からリン酸を放出し、GDP 結合型となってリボソーム上から解離する。そして PIC には eIF5B などによってリボソーム 60S サブユニットの結合が起これば、翻訳開始過程は完了する。一方、GDP 結合型としてリボソームから解離した eIF2 は、eIF2 特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine-nucleotide exchange factor; GEF) である eIF2B によって GTP 結合型へと変換され、再び  $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$  を結合し翻訳開始過程に利用される。eIF2B を過剰発現することで細胞のタンパク質合成量が増大することが報告されており<sup>4</sup>、eIF2B によるヌクレオチド交換反応のステップはタンパク質合成における律速段階の一つであると考えられている。



## 1-2 eIF2B を介した翻訳調節

eIF2B による eIF2 のヌクレオチド交換反応は、タンパク質合成における律速段階の一つであると考えられており、この段階を標的としたタンパク質合成の調節機構がいくつか存在している。もっともよく知られているのは、eIF2 の $\alpha$ サブユニット Ser51 のリン酸化によるタンパク質合成の制御である<sup>5,6</sup>。哺乳類には 4 種類の eIF2 キナーゼが存在し (GCN2, PKR, PERK, HRI)、アミノ酸飢餓、ウイルス感染、小胞体ストレスといった細胞内外のさまざまなストレスに応答して活性化される<sup>7</sup> (図 1-2)。eIF2 キナーゼによってリン酸化を受けた eIF2 は eIF2B に対するアフィニティが変化し、より強固な結合によって eIF2B によるヌクレオチド交換反応を阻害すると考えられている<sup>8,9</sup>。そのほか、インスリン非存在下での GSK3 による eIF2B $\epsilon$ サブユニットのリン酸化<sup>10</sup>や、アミノ酸代謝の副産物として生成されるブタノールなどのアルコール類<sup>11</sup>が eIF2B の活性を低下させることが知られている。これらの経路によって eIF2B の活性が低下すると、細胞内の TC の存在量が低下する。その結果、リボソームへの Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> の供給が滞り、細胞内のタンパク質合成は全体的に翻訳開始の段階で抑制される。このグローバルな翻訳抑制の一方で、一部の mRNA はストレス環境下において選択的に翻訳されるようになることが知られており<sup>12</sup>、出芽酵母では GCN4 遺伝子<sup>13</sup>、哺乳類では ATF4 遺伝子<sup>14</sup>などがこのような例外的な応答を示すことが報告されている。これらの遺伝子の mRNA はタンパク質をコードする主要な ORF よりも上流に複数の短い ORF (upstream ORF; uORF) を有しており、最上流の uORF は、翻訳終結後もリボソーム 40 サブユニットが mRNA から解離せず、スキャニングが再開されるシグナルを有している (図 1-3)。通常時は、最上流の uORF1 の翻訳終結の後、直ちに TC が再供給され直下の uORF で翻訳が再開されるため、下流に位置する主要な ORF の翻訳は抑制されている。しかし、ストレス下で TC の供給が滞ると、uORF での翻訳再開を行うことができず、さらに下流の主要な ORF で翻訳が再開されることとなる。GCN4、ATF4 はともに転写因子

をコードしており，翻訳後は核に移行し，アミノ酸合成に関与する遺伝子群などの転写を活性化することが知られている．

### 1-3 eIF2B および eIF2 の構造

eIF2B は $\alpha$ から $\epsilon$ の 5 種類のサブユニットから構成され，それぞれのサブユニットはヒトでは *EIF2B1* から *EIF2B5* 遺伝子に，出芽酵母では *GCN3*, *GCD7*, *GCD2*, *GCD1*, *GCD6* 遺伝子にそれぞれコードされている<sup>15</sup>．

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットは互いに相同な配列を持っており，N 端のヘリカルドメイン，C 端の Rossmann-fold 様ドメインから構成される(図 1-4 A)． $\delta$ サブユニットにはさらに N 末端側に数百アミノ酸程度の保存性の低い，機能未知の配列が存在する．出芽酵母において，eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化による生育阻害効果が $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの共過剰発現によって抑制されることから，これら 3 つのサブユニットはサブコンプレックス (調節サブコンプレックス) を形成し，eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化の認識に関与していると考えられている<sup>16,17</sup>．また，これら 3 つのサブユニット上には上述の翻訳調節機構に異常をきたす変異残基が多数同定されている<sup>18-21</sup>．表現型としては二つのタイプがあり，一つは非ストレス状態でも *GCN4* mRNA が翻訳される *Gcd<sup>-</sup>* (general control derepressed) 変異，もう一つはストレスによる *GCN4* mRNA の翻訳抑制の解除が起こらない *Gcn<sup>-</sup>* (general control non-derepressible) 変異である<sup>12</sup>．*Gcd<sup>-</sup>*変異はその大部分が $\alpha$ サブユニット上に発見されていること<sup>18,20</sup>， $\alpha$ サブユニットが欠落した eIF2B の活性は eIF2 のリン酸化による影響を受けなくなること<sup>22</sup>から，eIF2 のリン酸化による eIF2B の活性制御において $\alpha$ サブユニットが主導的な役割を担っていると考えられている．

他方,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ サブユニットも互いに相同な配列を有しており, N 端のピロホスホリラーゼ様ドメイン (pyrophosphorylase-like domain; PLD), C 端の左巻き $\beta$ ヘリックス (left-handed  $\beta$ -helix; L $\beta$ H) ドメインから構成される (図 1-4 A).  $\epsilon$ サブユニットにはさらに C 末端に HEAT ドメインが存在する.  $\gamma$ ,  $\epsilon$ サブユニットは直接相互作用し, 主にヌクレオチド交換反応を担っていると考えられている (触媒サブコンプレックス)<sup>17</sup>. ヌクレオチド交換反応を担う最小単位は HEAT ドメインである<sup>23</sup>が, HEAT ドメインや $\epsilon$ サブユニット単独での活性は eIF2B 全体での活性と比較して低レベルであり<sup>17,22,24</sup>, 他のサブユニットとの複合体形成によって生育に十分な活性が発揮される.

eIF2 は $\alpha$ から $\gamma$ の 3 種類のサブユニットから構成され, それぞれのサブユニットはヒトでは *EIF2S1* から *EIF2S3* 遺伝子に, 出芽酵母では *SUI2*, *SUI3*, *GCD11* 遺伝子にそれぞれコードされている.

グアニンヌクレオチドの結合を担うのは $\gamma$ サブユニットであり,  $\alpha$ サブユニットは Ser51 残基のリン酸化によって上記の翻訳調節に重要である.  $\beta$ サブユニットはその N 末端にリジン残基に富む領域 (K-box) を持ち, この領域が eIF2B $\epsilon$ サブユニットの HEAT ドメインと結合することが知られている<sup>25</sup>.

eIF2 の立体構造は未だ明らかにされていないが, eIF2 の古細菌ホモログ aIF2 の結晶構造は明らかにされている<sup>26-29</sup>. aIF2 $\gamma$ サブユニットを中心として, その両側に $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットが存在する構造である (図 1-5 A). 基本的なサブユニットの配置は eIF2 と aIF2 では保存されていると考えられている一方, eIF2 $\beta$ の K-box に相当する配列は aIF2 $\beta$ には存在せず, aIF2 は eIF2B のようなヌクレオチド交換因子を必要としない. また, Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> の結合に対する各サブユニットの寄与の仕方<sup>30-32</sup>なども両者では異なっている.

## 1-4 eIF2B の変異と疾患

ヒトの eIF2B 遺伝子は, leukoencephalopathy with vanishing white matter (VWM) もしくは childhood ataxia with central nervous system hypomyelination (CACH)<sup>33</sup> と呼ばれる神経変性疾患 (OMIM: 603896) の原因遺伝子であることが知られている<sup>34,35</sup>.

VWM では, 小脳性の運動失調が主な臨床的な徴候としてみられ, VWM 患者の頭部 MRI 画像は, 大脳白質が脳脊髄液と似た信号強度を示すことにより, 大脳白質が消失したように見える<sup>36</sup> ことが VWM の病名の由来となっている. この疾患では大脳白質でのみ, きわめて深刻なダメージが現れ, 患者の大脳白質からはアストロサイトの産生異常<sup>37</sup> やオリゴデンドロサイトの形状異常<sup>38</sup>, そしてミエリン量の減少<sup>39</sup> などさまざまな異常が観察されることが報告されている. これまでに eIF2B のいずれのサブユニットの変異も VWM と関連づけられており, 同定された変異箇所は合計 100 箇所以上にも上る<sup>35</sup>. VWM 患者の細胞では, eIF2B の活性の低下<sup>40,41</sup> や小胞体ストレスへの応答の異常<sup>42</sup> がみられることが報告されており, また, VWM は軽微な頭部外傷や発熱の後に発症もしくは症状の劇的な悪化がみられることが多いため, eIF2B によるヌクレオチド交換反応や eIF2 のリン酸化による活性の調節異常がこの疾病と関係していると推測される. しかしながら, なぜ基本的な翻訳開始因子である eIF2B の変異が局所的に深刻な病変を引き起こすのか, その具体的な機序は明らかにされていない

## 1-5 eIF2B を介した翻訳制御における未解決の課題

eIF2B は翻訳段階での遺伝子発現制御における中核的因子であり，eIF2B を介した翻訳制御によって，細胞がストレス環境への迅速に適応することが可能となっている．また，この機構は，細胞レベルでのストレス応答のみならず，摂食行動<sup>43</sup>や記憶の形成<sup>44</sup>といった高次の現象にも関与している．さらに，eIF2 $\alpha$  Ser51Ala 変異のホモ接合体マウスは新生児致死である<sup>45</sup>ことから，正常な身体の発達においてもこの機構が不可欠であると考えられる．このように，eIF2B を介した翻訳制御は，真核生物における広汎な生命現象に関与している一方，eIF2 のリン酸化が eIF2B の活性を制御するメカニズムについては未だ明らかにされていない．以下に，この翻訳制御機構の理解のために解明されるべき課題について挙げる．

### 1. eIF2B はどのような構造をしているのか

eIF2B 各サブユニットの立体構造については，これまで $\alpha$ サブユニット<sup>46</sup>と， $\epsilon$ サブユニットの HEAT ドメイン<sup>47,48</sup>の結晶構造が解かれているのみであり (図 1-4 B-D)，その全体構造に関する情報は存在しない．それだけでなく， $\alpha$ ， $\beta$ ， $\delta$ サブユニットおよび $\gamma$ ， $\epsilon$ サブユニットがそれぞれサブコンプレックスを形成していることが示されているものの，サブユニット間の相互作用は同定されておらず，各サブユニットがどのように配置されているかさえも知られていないのが現状である．

### 2. eIF2B によるヌクレオチド交換反応機構

eIF2B は eIF2 に特異的な GEF であるが，その作用機構も不明点が多い．ヌクレオチド交換反応に最低限必要とされるのは $\epsilon$ サブユニットの HEAT ドメインであり，このドメインが eIF2 の $\beta$ および $\gamma$ サブユニットと直接相互作用することが示されている<sup>25,49,50</sup>．HEAT

ドメインは eIF2 $\gamma$ サブユニットの GTP/GDP を結合する G ドメインと直接相互作用し<sup>50</sup>, HEAT ドメインの N 末端領域が交換反応に重要である<sup>23,47</sup>. そして, eIF2 $\beta$ サブユニットとの相互作用に関しては HEAT ドメインの C 末端に存在する芳香族および酸性残基に富む領域 (AA-box) が eIF2 $\beta$ サブユニットの N 末端の K-box と直接相互作用することが知られている<sup>25</sup>. しかしながら, 結合の具体的な様式は知られておらず, また, 他の eIF2B の領域がどのようなかたちでこの反応に寄与しているかについても明らかではない.

また, 酵素反応速度論的な観点からは, eIF2B 全体による触媒の機構として 2 つの異なる機構が提唱されている (図 1-6)<sup>8,24,51,52</sup>. 一つの機構はピンポン機構であり, eIF2B は eIF2 に結合した GDP の解離を促進するというモデルである<sup>8,24</sup>. もう一方の機構は逐次機構であり, この機構では反応中間体として eIF2·GDP/eIF2B/GTP 複合体が形成され, ヌクレオチドが交換されるとするモデルである<sup>51,52</sup>. 先行研究からは互いに矛盾する実験結果が得られており, 統一的な見解は得られていない. また, 逐次機構の実現には eIF2B 上に GTP 結合部位が必要とされるが, eIF2B の GTP 結合はヌクレオチド結合モチーフの見つからない $\beta$ サブユニットによるものであり<sup>24</sup>, この結合が交換反応に利用されているのかどうかについても不明である.

### 3. eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化はどのようにヌクレオチド交換反応を阻害するのか

リン酸化された eIF2 $\alpha$ は eIF2B へ強固に結合すること<sup>9</sup>, そしてヌクレオチド交換反応を阻害すること<sup>8</sup>は示されているが, この 2 つの現象がどのように関係しているのかは不明である.

eIF2 のリン酸化による制御の機構としては 2 通りが考えられる (図 1-7). 一つは, eIF2B と eIF2 の結合には, 触媒サブコンプレックスによって主導されるヌクレオチド交換反応を促進する結合様式 (プロダクティブな結合) と, 調節サブコンプレックスによって主導される交換反応に不適当な結合様式 (アンプロダクティブな結合) が存在し, eIF2 $\alpha$ サブ

ユニットのリン酸化はアンプロダクティブな結合を強化することによって交換反応を阻害する, というものである (図 1-7 A). もう一方は, リン酸化されていない eIF2 に対して eIF2B はヌクレオチド交換反応を促進するプロダクティブな結合を行うが, eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化によって調節サブコンプレックスとの相互作用が変化し, 交換反応に不適當なアンプロダクティブな結合となる, というものである (図 1-7 B).

#### 4. eIF2B の変異と VWM はどのように関係しているか

VWM の患者においては脳白質の異常が共通して確認されるものの, その他の病状や病態の進行の速度は多様である. また, VWM を引き起こす変異は, 一般的に eIF2B によるヌクレオチド交換活性を低下させるが, その程度もさまざまであり病態の深刻さとの関連は必ずしも見いだされない. また, VWM を引き起こす変異は eIF2B のすべてのサブユニット上に同定されているが, これらの変異がいかにしてヌクレオチド交換活性の低下もしくはストレス応答の異常に関与しているのか明らかではない. いくつかの変異については, サブユニット間の相互作用の不安定化をもたらすことが知られているものの<sup>53,54</sup>, これが一般的に他の変異についても妥当するものであるかどうかは不明である.

## 1-6 本研究の概要

eIF2-eIF2B 間の相互作用は長年研究の対象となっており, 生化学的, 遺伝学的解析によって多くの知見が蓄積されている. しかしながら, eIF2 および eIF2B の立体構造情報の欠如は, 両者の相互作用を統合的に理解することを困難なものにしており, いまだ上記のような多くの不明点が残されている.

そこで、本研究では eIF2B の全体構造の解明、eIF2 との相互作用の理解を目標とした。まず、eIF2B の組換え発現系の構築を試み、X 線結晶構造解析によって eIF2B の構造を明らかにした。そして、この構造情報とパラベンゾイルフェニルアラニン (*p*-benzoyl-L-phenylalanine; *p*Bpa) を用いた光クロスリンク実験、そして先行研究による知見を組み合わせることで、eIF2-eIF2B 間の相互作用様式についてのモデルを提唱した。



## 第 2 章 eIF2B 発現系の構築・結晶化

### 2-1 方法

#### 2-1-1 発現ベクターの構築と発現状況の検討

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の eIF2B 各遺伝子は cDNA ライブラリからクローニングを行い, pET-22b (C 端 His タグ融合タンパク質, Novagen), pET-28c (N 端 His タグ融合タンパク質, Novagen), pGEX-6P-1 (N 端 GST 融合タンパク質, GE Healthcare), pMAL-c2X (N 端 MBP 融合タンパク質, New England BioLabs) の各ベクターに組み込んだ.  $\beta$ - $\delta$ サブユニット共発現系,  $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$ サブユニット共発現系の構築には pETDuet-1 (Novagen) を,  $\gamma$ - $\varepsilon$ サブユニット共発現系の構築には pCOLADuet-1 (Novagen) をそれぞれ用いた. 発現の検討には Rosetta2(DE3) 株 (Novagen) を用いた. LB 培地中, 37 °C で培養し, OD<sub>600</sub> が 0.5 に達した時点で 18 °C まで冷却し, 0.3 mM IPTG を加えさらに 18 時間培養を行った. 菌体を遠心分離によって集め, バッファ A (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 150 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM DTT) に懸濁して超音波破碎を行い, 遠心分離により沈殿を除いた. His タグ融合タンパク質の精製には Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) を, GST 融合タンパク質の精製には Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を, MBP 融合タンパク質の精製には Amylose resin (New England BioLabs) を用いた.

#### 2-1-2 eIF2B の大量調製

精製の簡略化のため, PrimeSTAR Max Mutagenesis Basal Kit (Takara) を用いて,  $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$ サブユニット共発現ベクター,  $\gamma$ - $\varepsilon$ サブユニット共発現ベクター上のプロテアーゼ認識配列をすべて HRV 3C プロテアーゼによる認識配列へと変更した. Rosetta2(DE3)株を,  $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$

サブユニット共発現ベクターと $\gamma$ - $\epsilon$ サブユニット共発現ベクターの 2 つのベクターで形質転換し、0.2% glucose を添加した LB 培地中 37 °C で培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 に達した時点で 18 °C まで冷却し、0.3 mM IPTG を加えさらに 18 時間培養を行った。菌体を遠心分離によって集め、PBS で洗浄の後-80 °C で保存した。室温で融解の後、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を加えたバッファ B (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 150 mM KCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) に懸濁して超音波破碎を行った。遠心分離により沈殿を除いた後、Amylose resin にロードした。バッファ B でカラムを洗浄し、10 mM maltose を加えたバッファ B で溶出した。そして、バッファ B で平衡化した HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) にロードし、バッファ B での洗浄の後、150 mM から 1 M の KCl の濃度勾配で溶出した。eIF2B を含む画分をバッファ B に対して透析しながら、HRV 3C プロテアーゼによる発現用タグの切断を 4 °C で一晩行った。さらに、バッファ B で平衡化したゲル濾過カラム(Superose 6 もしくは Sephacryl S-300, GE Healthcare) で精製し、限外ろ過法 (Amicon Ultra, Millipore) で 5–6 mg/ml に濃縮した後、4 °C で保存した。

セレノメチオニン置換体の作製には M9 培地を用いた。37 °C で培養し、OD<sub>600</sub> が 0.5 に達した時点で終濃度 60 mg/L のセレノメチオニン、終濃度 100 mg/L のスレオニン、リジン、フェニルアラニン、終濃度 50 mg/L のロイシン、イソロイシン、バリンを加え<sup>55</sup> 18 °C まで冷却し、30 分後に 0.5 mM IPTG を加えてさらに 24 時間培養を行った。セレノメチオニン置換体の精製はネイティブ体と同様に行ったが、バッファ中の DTT の濃度は 10 mM に変更した。

### 2-1-3 eIF2B の結晶化

結晶化条件のスクリーニングには結晶化キット Crystal Screen, Crystal Screen II, Natrix, MembFac, Index, SaltRX (Hampton Research), Wizard I, Wizard II (Emerald BioSystems), JCSG+ Suite, Protein Complex Suite (Qiagen) を用いた。結晶化はシッティングドロップ蒸気

拡散法を用いて 20 °C で行った．初期スクリーニングでは，サンプル 1  $\mu\text{l}$  とレザーバー 1  $\mu\text{l}$  を混合し，60  $\mu\text{l}$  のレザーバーに対して平衡化を行った．結晶化条件の最適化の際には，サンプル 2  $\mu\text{l}$  とレザーバー 2  $\mu\text{l}$  を混合し，240  $\mu\text{l}$  のレザーバーに対して平衡化を行った．

#### 2-1-4 eIF2B の結晶の X 線回折実験および回折データの処理

eIF2B の結晶の予備的な X 線回折実験は Spring-8 の BL32XU, BL41XU で行った．ネイティブ体結晶およびセレノメチオニン置換体結晶の最終的なデータセットの収集は BL41XU で行った．ネイティブ体結晶を用いた測定は，波長 1.0000 Å, ビームサイズ 50  $\mu\text{m}$   $\times$  50  $\mu\text{m}$ , カメラ長 320 mm, アッテネータ 750  $\mu\text{m}$  アルミニウム, 振動角 0.5°, 露光時間 1 秒の条件で行い，計 300 枚の回折像を収集した．セレノメチオニン置換体結晶を用いた測定は，波長 0.9792 Å, ビームサイズ 50  $\mu\text{m}$   $\times$  50  $\mu\text{m}$ , カメラ長 320 mm, アッテネータ 1200  $\mu\text{m}$  アルミニウム, 振動角 0.5°, 露光時間 2 秒の条件で行い，計 720 枚の回折像を収集した．セレノメチオニン置換体結晶の測定波長は結晶の XAFS を測定して決定した．回折データの処理には XDS<sup>56</sup> および SCALA<sup>57</sup> を用いた．SAD 法による位相決定には autoSHARP<sup>58</sup> を，構造モデルの構築には Buccaneer<sup>59</sup> を，構造モデルの精密化には PHENIX<sup>60</sup> と Cool<sup>61</sup> を用いた．構造の妥当性の検証には RAMPAGE<sup>62</sup> および MolProbity<sup>63</sup> を用いた．

## 2-2 大腸菌組換え発現系による eIF2B の調製

発現系の構築に用いる eIF2B の生物種として，分裂酵母 *Schizosaccharomyce pombe* を選択した．分裂酵母の eIF2B は分子量が比較的小さく，特に $\delta$ サブユニット N 末端の機能未知の保存性の低い領域が短いことが，結晶化の際に有利にはたらくと思われたためであ

る.

大腸菌発現系を用いた eIF2B の調製法として、まずはサブユニットごとに精製を行い、試験管内で複合体を再構成するという手法を試みた。各サブユニット C 末端に His タグを付加したコンストラクトで発現を行ったところ、 $\gamma$ および $\epsilon$ サブユニットは良好な発現と可溶化がみられ、 $\alpha$ および $\delta$ サブユニットについても発現は確認された (図 2-1)。しかし、 $\delta$ サブユニットについてはカラムからの溶出段階で既に凝集を開始していた。また、 $\beta$ サブユニットは発現・可溶化が確認できなかった。 $\beta$ 、 $\delta$ サブユニットについて、発現および可溶性の向上のため N 末端にタグを融合して発現させたところ、 $\beta$ サブユニットについては N 末端に MBP を付加することによって改善が見られた (図 2-2A)。しかし、 $\beta$ サブユニットには大腸菌内在性のシャペロニンと推測されるタンパク質と結合がみられ、さらに、プロテアーゼによるタグの切除で大部分が沈殿した。また、 $\delta$ サブユニットについてはタグの付加による改善は見られなかった。

出芽酵母において $\beta$ サブユニットの発現抑制によって $\delta$ サブユニットの発現レベルも低下するという報告<sup>21</sup>があったため、 $\beta$ 、 $\delta$ サブユニットは複合体形成によって安定化するのではないかと考えた。 $\delta$ サブユニットと、MBP を付加した $\beta$ サブユニットを共発現したところ、両者の複合体は良好な発現と可溶化がみられ、シャペロニンの結合もみられなかった。さらに $\alpha$ サブユニットとの共発現を行ったところ、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ サブユニットからなる複合体、つまり調節サブコンプレックスを得ることができた (図 2-2B)。しかし、このサブコンプレックスからは $\alpha$ サブユニットが解離しやすく、さらなる精製は困難であった。

$\gamma$ 、 $\epsilon$ サブユニットについても共発現によって触媒サブコンプレックスの再構成を試みたところ、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ サブユニットは安定に相互作用しており精製可能であった (図 2-2C)。そこで、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ サブユニットを発現している菌体と $\gamma$ 、 $\epsilon$ サブユニットを発現している菌体を混ぜて破碎を行い、破碎液中で eIF2B を再構成する手法を試みた。2種類の菌体を等量ずつ混合した後破碎し、アミロースレジンで精製を行った結果、等量以下ではあるが触媒サブ

コンプレックスが調節サブコンプレックスに結合していた(図 2-2D).

5 種類のサブユニットすべての共発現によって、両者の結合比はさらに改善された(図 2-2E). このようにして再構成された eIF2B は、調節サブコンプレックス単独での精製時とは異なり、ヘパリンカラムクロマトグラフィー精製による高塩濃度の条件下においてもサブユニットの解離を起こさず安定であった. MBP などの発現用タグの切断後、Sephacryl S-300 によるゲル濾過クロマトグラフィーを行い、良好なピークが確認された. そして、ピーク部分の SDS-PAGE によって各サブユニットを等量ずつ含む複合体を形成していることが確認された(図 2-3). このピーク部分の分子量の推定のため、ゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superose6 による分析を行った. eIF2B の溶出位置は、サイログロブリン (669 kDa) の溶出位置とフェリチン (440 kDa) 溶出位置の間であり (図 2-4), eIF2B はこの溶液中では五量体 (259 kDa) ではなく、各サブユニットを二分子ずつ含む十量体 (518 kDa) を形成していると推定された. また、Sephacryl S-300 による精製時には、低分子量側に調節サブコンプレックスのものと推定されるサブピークが存在したが、五量体に相当するピークは確認できなかった (図 2-3A).

LB 培地 1 L の培養液から、この最終精製段階の eIF2B を 2 mg 程度得ることができた. また、セレノメチオニン置換体も同様の方法で精製可能であり、こちらは M9 培地 1 L あたり 1 mg 程度の収量が得られた. これらの試料を結晶化に用いた.

## 2-3 eIF2B の結晶化

精製された eIF2B を 5–6 mg/ml まで濃縮し、20 °C で結晶化のスクリーニングを行った結果、いくつかの条件で結晶が得られた. 結晶化条件の最適化の結果、ネイティブ体、

セレノメチオニン置換体共に、タンパク質溶液とレザーバー溶液 (200 mM NaCl, 50.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 49.6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11–12% PEGMME 2000) を 1:1 で混合して平衡化を行うことで安定して良好な結晶が得られるようになった。結晶は、最終的に一週間で最大で 250 μm × 100 μm × 50 μm の大きさまで成長した (図 2-5)。

## 2-4 eIF2B 結晶の X 線回折実験

eIF2B 結晶の予備的な X 線回折実験は大型放射光施設 SPring8 のビームライン BL32XU および BL41XU で行った。クライオプロテクタントとしてレザーバー溶液に 30% glycerol を加えた溶液を用いて液体窒素中での冷却を行った結晶から、最高で 4 Å 程度の回折点が観察された。クライオプロテクタントの種類・濃度の検討を行い、15% glycerol と 10% DMSO をレザーバー溶液に加えた溶液をクライオプロテクタントとすることで、最も高分解能の回折点が得られることを確認した。しかし、この溶液に大きなサイズの結晶を浸すとひびが入りやすいという欠点があったため、小さな結晶しか回折実験に供することができず、完全なデータセットを単一の結晶から取得することが困難であった。そこで、クライオプロテクションの方法について検討を行い、一旦結晶を 180 mM NaCl, 50.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 49.6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12% PEGMME 2000, 5% glycerol の溶液へと移し、glycerol と DMSO の濃度がそれぞれ 2%ずつ高い溶液へと数分ごとに移していき、15% glycerol, 10% DMSO の濃度に達した時点で液体窒素中に移す、という方法を用いることで結晶が割れる割合を低下させることができた。

最終的なデータセットの収集は BL41XU で行い、ネイティブ体結晶からは 3.14 Å の分解能 (図 2-5A)、セレノメチオニン置換体結晶からはセレン原子のピークの波長で 3.38

Å の分解能 (図 2-5B) のデータセットを得た。これらの結晶の空間群はともに  $P2_12_12_1$  に属し、格子定数はネイティブ体結晶で  $a = 144.5 \text{ Å}$ ,  $b = 209.2 \text{ Å}$ ,  $c = 223.5 \text{ Å}$ , セレノメチオニン置換体結晶で  $a = 144.6 \text{ Å}$ ,  $b = 209.8 \text{ Å}$ ,  $c = 223.8 \text{ Å}$  であった。それぞれの回折データの統計値を表 2 に示す。

## 2-5 位相決定と分子モデルの構築

ネイティブ体とセレノメチオニン置換体の回折データをもとに, autoSHARP<sup>58</sup> を用いて位相の決定を行った。分裂酵母 eIF2B の各サブユニットにはメチオニン残基が合計で 46 箇所( $\alpha$ : 8,  $\beta$ : 11,  $\gamma$ : 9,  $\delta$ : 7,  $\epsilon$ : 11)存在するが, N 末端のセレノメチオニンなどいくつかの残基はディスオーダーしていると仮定し, セレン原子の数は 40 個と入力した。

以下の作業は autoSHARP によって行われた。Matthews 係数の計算の結果, 非対称単位当たり各サブユニットが 3 分子ずつ存在すると予測され, 120 箇所のセレン原子の位置の探索が行われた。SIRAS 法によって 46 箇所, SAD 法によって 59 箇所のセレン原子が見つかった。そして, より良いスコアが得られた, SAD 法によって決定されたセレン原子位置をもとに最適化と位相計算, 溶媒平滑化が行われた。ここまでの作業は autoSHARP によって行われた。最終的には 69 箇所のセレン原子の位置から位相計算が行われ, その結果, 明瞭な電子密度マップが得られた (図 2-6 A, B)。そして非対称単位中には各サブユニット 2 分子ずつ存在することが確認された。

分子モデルの構築はまず Buccaneer<sup>59</sup> によって行われた。複数回のサイクルの結果, eIF2B の 4674 残基のうち 3162 残基が正しく構築されていた (図 2-7 A)。モデルが構築されなかった領域については, セレン原子の位置を参考にしながら Coot<sup>61</sup> を用いて手動でモデ

ル構築を行った. PHENIX<sup>60</sup>によって, この分子モデルをネイティブ体の 3.14 Å 分解能の回折データに対して精密化を行い, 最終的に発現ベクターに由来する配列 12 残基を含む 3652 残基が構築され,  $R_{\text{work}} = 21.1\%$ ,  $R_{\text{free}} = 26.5\%$ まで精密化が行われた (図 2-6 C, 2-7 B). 精密化の統計値を表 2 に, Ramachandran plot を図 2-8 に示す.



## 第 3 章 eIF2B の構造の解析

### 3-1 方法

図の作成には Pymol (<http://www.pymol.org/>)を使用した。原子間の相互作用については、酸素、および窒素原子が 3.5 Å 以内の距離で相対し、適切な配向をとるとき水素結合を形成しているとみなした。そして、相対する原子が 5.0 Å 以内の距離に存在し、かつ両原子間の相互作用が水素結合とみなされない場合、van der Waals 相互作用を形成しているとみなした。

eIF2B の表面残基の保存性の計算は ConSurf<sup>64</sup> によって行われた。保存性の計算には、UniRef90 データベースから、 $\alpha$ サブユニットには 131 種、 $\beta$ サブユニットには 53 種、 $\gamma$ サブユニットには 70 種、 $\delta$ サブユニットには 150 種、 $\epsilon$ サブユニットには 150 種の類縁配列がそれぞれ用いられた。

### 3-2 eIF2B の全体構造

#### 3-2-1 eIF2B の全体構造

今回の eIF2B 結晶の非対称単位中では、各サブユニット 2 分子ずつ合計 10 分子が 1 つの構造体を形成していた。構造の中央部分には  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ サブユニット 2 分子ずつが存在し、六量体の調節サブコンプレックスを構成していた。そして、その両脇に  $\gamma$ - $\epsilon$ ヘテロダイマー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 (図

3-1, 3-2). 各サブユニットの 2 分子はほぼ同一の非結晶学的な 2 回回転軸によって関係づけられており, 全体としては dimer-of-pentamer 型の構造をしている (図 3-1B). しかしながら, 構造中心部の調節サブユニット間の密接な相互作用から考えて, eIF2B の最小単位は五量体ではなく, 十量体構造であるとするのが妥当である.

### 3-2-2 調節サブコンプレックスの構造

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ 各サブユニットのドメイン構造は共通であり, 各サブユニットの基本的な構造はヒト eIF2B の $\alpha$ サブユニットの構造<sup>46</sup>と同じであった. これらのサブユニットは, N 端が疎水的に相互作用する 5 本の $\alpha$ ヘリックスからなるヘリカルドメイン, C 端が $\alpha$ ヘリックスに挟まれた 6 本の平行 $\beta$ ストランドに加えて 3 本の逆平行 $\beta$ ストランドからなる Rossmann-fold 様ドメインによって構成されている (図 3-3).  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット各 2 分子は,  $\alpha$ サブユニット2分子がホモ二量体構造を, そして $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットは 2 つの $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造を形成し, さらに 1 つの $\alpha$ - $\alpha$ ホモ二量体構造と 2 つの $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造が擬 3 回回転対称を形成するように三量体構造を形成する, という様式で調節サブコンプレックスを構築している. このアセンブリの結果, 調節サブコンプレックスには, 2 層の $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$ 三量体構造が形成されることとなる (図 3-1 B).

$\alpha$ - $\alpha$ ホモ二量体構造および $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造の形成は,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット間での保存性が高い, C 末端の Rossmann-fold 様ドメインによって担われている. C 末端ドメイン本体どうしの相互作用の様式は, ヒト eIF2B $\alpha$ サブユニットの結晶構造<sup>46</sup>および古細菌ホモログ aIF2B $\alpha$ <sup>65</sup>の結晶構造中でみられたものと同じ様式であり (図 3-4 A-C), 2 種類の二量体構造で酷似している (図 3-4 D, E). 今回の構造では, この C 末端ドメイン本体間の相互作用だけでなく, C 末端ドメインに存在する arm 領域と呼ばれる長いループ構造も, 二量体構造の形成に寄与していることが明らかになった (図 3-5). この arm 領域は各サブユニットに特有の構造をしており,  $\alpha$ - $\alpha$ ホモ二量体構造においては, arm 領域は互いに他方のサブ

ユニットの C 末端ドメイン上を伸びて行き、C 末端ドメインと N 末端ドメインとの間に存在する溝の中へと入り込んでいる (図 3-5 A). それに対し、 $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造においては、 $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの arm 領域は互いに他方のサブユニットの C 末端ドメインと連続的な $\beta$ シート構造を形成することで、 $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造の安定化に寄与している (図 3-5 B, C).

3 つの二量体構造は、それぞれ C 末端ヘリックスを含む面を内側にして、擬三回対称を形成するように三量体化する (図 3-6, 3-1 B; マゼンタ). この三量体構造の形成も主に C 末端ドメインによって担われており、特に $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの C 末端ヘリックスは、三者間で親水的な相互作用ネットワークを形成している (図 3-6).

上述したように、調節サブコンプレックス中でみられる二量体構造および三量体構造の形成は、いずれも C 末端ドメインが主要な役割を果たしているが、N 末端ドメインも調節サブコンプレックス中におけるサブユニット特異的な相互作用に関与している。 $\delta$ サブユニットの N 末端の領域は、さまざまな部位と相互作用しながら $\delta$ サブユニット上をトラバースし、三量体構造形成時に隣接する $\beta$ サブユニットまで伸びて補助的な相互作用を形成している (図 3-7A). また、 $\beta$ サブユニット N 末端ドメイン中に存在する挿入領域は、隣接する $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメイン中に差し込まれてヘリックス構造を形成し、 $\alpha$ サブユニットと疎水的な相互作用を形成している (図 3-7B, C). この挿入領域は生物種によって長さも配列もさまざまであるが、 $\alpha$ サブユニットに深く挿入されている $\beta$ Met140,  $\beta$ Leu143,  $\beta$ Leu144 の位置は疎水性残基で保存されており (図 3-2), この相互作用は生物種間で保存されていると考えられる.

### 3-2-3 触媒サブコンプレックスの構造

触媒サブコンプレックスは、 $\gamma$ サブユニットと $\varepsilon$ サブユニットのヘテロ二量体である。両サブユニットの PLD と L $\beta$ H ドメインの構造は互によく似ており、PLD は $\beta$ シートが $\alpha$

ヘリックスに挟まれた構造, L $\beta$ H ドメインは三角柱型の 6 層のコイルからなる左巻き $\beta$ ヘリックス構造である (図 3-8A, B). L $\beta$ H ドメインの三角柱構造の一面は PLD との疎水的に相互作用に利用されている. 既知の構造との比較では, 各ドメインの構造, そして 2 つのドメインの位置関係はジャガイモ塊茎由来の ADP-glucose 1-pyrophosphorylase (AGP) の構造<sup>66</sup> と類似していた (図 3-8C). AGP の PLD は ATP を結合するポケットを有しているが, これは $\gamma$ サブユニットと $\epsilon$ サブユニットには保存されていない.

$\gamma$ サブユニットと $\epsilon$ サブユニットとの相互作用は, 各サブユニットの PLD が連続的な $\beta$ シート構造を形成することで安定化されている (図 3-9 A). この相互作用領域周辺の構造は AGP とは大きく異なっており (図 3-8 D), 四次構造の形成は, AGP オリゴマーの形成面とは異なる, 触媒サブコンプレックスに特有の面で行われている (図 3-9 B).

今回の構造では, ヌクレオチド交換反応を担う $\epsilon$ サブユニット HEAT ドメインに相当する電子密度は観察されなかった. 結晶の SDS-PAGE による分析などを行わなかったため, 結晶化溶液中の分解などの要因を排除することはできないものの, L $\beta$ H ドメインと HEAT ドメインの間にはセリン残基と酸性残基に富む 50 から 60 アミノ酸程度の長さのフレキシブルな配列が存在しており, 結晶中で特定の位置を取っていないことが電子密度の観察されなかった理由であると思われる. L $\beta$ H ドメインの C 末端は十量体構造の外側へ向かって伸びており, その先にある HEAT ドメインは, 他の領域に拘束されず触媒サブコンプレックスの遠位面の近辺を動くと考えられる (図 3-1).

#### 3-2-4 調節サブコンプレックスと触媒サブコンプレックスの相互作用

触媒サブコンプレックスは, 調節サブコンプレックスへ $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造を介して結合している (図 3-10 A).  $\epsilon$ サブユニットは主に $\beta$ サブユニットによって,  $\gamma$ サブユニットは主に $\delta$ サブユニットによって認識されている.  $\epsilon$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットの構造,  $\beta$ サブユニットと $\delta$ サブユニットの構造は互いによく似ているものの,  $\epsilon$ サブユニット- $\beta$ サブ

ユニット間の相互作用と、 $\gamma$ サブユニット- $\delta$ サブユニット間の相互作用は大きく異なる (図 3-10 B, C).

$\beta$ サブユニットの N 末端のヘリックスと arm 領域は、 $\epsilon$ サブユニットの PLD ドメインと L $\beta$ H ドメインとの相互作用面を固定するような形で結合しており、 $\epsilon$ サブユニットはさらに $\alpha$ サブユニットや $\delta$ サブユニットとの相互作用によって支えられている。一方、 $\gamma$ サブユニットは、PLD ドメインが $\delta$ サブユニットと結合しているのみであり、L $\beta$ H ドメインに関しては他のサブユニットと全く相互作用していない。

### 3-3 eIF2B 表面残基の保存性

eIF2B の分子表面に露出している残基の保存性は全体として低い (図 3-11). しかしながら、高い残基の保存性を示す 2 つの表面領域が確認された。一つは $\epsilon$ サブユニット PLD の遠位の表面である。 $\epsilon$ サブユニットはヌクレオチド交換反応を担うサブユニットであり、この部位が交換反応に重要であることが示唆される。交換反応に最低限必要とされる領域が HEAT ドメインであることを考えると、この領域は基質である eIF2 を HEAT ドメインの近傍に固定する役割などを担っているのかもしれない。

保存性の高いもう一つの表面領域は、eIF2B の中央に存在するくぼんだ領域である。このくぼみの底面は $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの C 末端配列によって形成され、側壁は各サブユニットの N 末端ドメインによって形成されている。この保存性の高いくぼみを **central cavity** と名付けた。調節サブコンプレックス中で表面に露出した保存性の高い領域はこの **central cavity** のみであり、したがって、この領域が eIF2 $\alpha$ サブユニットの結合を担うのではないかと推測される。

### 3-4 出芽酵母 Gcd<sup>-</sup>/Gcn<sup>-</sup>変異の構造上へのマッピング

先行研究における遺伝学的な解析によって、多くの Gcd<sup>-</sup>および Gcn<sup>-</sup>変異残基が出芽酵母の $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット上に同定されている<sup>18-21</sup>。出芽酵母 eIF2B と分裂酵母 eIF2B は、一次配列の類似性から三次構造も相同であると考えられる。そこで今回の構造上へ、出芽酵母での Gcd<sup>-</sup>および Gcn<sup>-</sup>変異残基に相当する残基のマッピングを行った (図 3-12, 表 3-1)。

Gcd<sup>-</sup>変異残基および Gcn<sup>-</sup>変異残基の双方に共通して、大部分の残基は表面に露出しない部位に存在していた (図 3-12, 3-13 A)。その一方で、一部の Gcd<sup>-</sup>および Gcn<sup>-</sup>変異残基は表面に露出しており、それらは central cavity およびその周縁部に位置していた (図 3-12, 3-14)。このことは、前節において提示された central cavity が eIF2 $\alpha$ サブユニットの結合を担うという仮説を支持するものであり、これらの変異による eIF2 $\alpha$ サブユニットとの結合の直接的な変化が、Gcd<sup>-</sup>もしくは Gcn<sup>-</sup>の表現型の原因となっていると考えられる。

一方、表面に露出していない変異残基のうち、特に Gcn<sup>-</sup>変異残基に関しては、調節サブコンプレックスの中心部に多く存在し、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット間の相互作用面と重なるように多数の変異残基が分布していた (図 3-13)。その反面、 $\alpha$ - $\alpha$ ホモ二量体構造の溶媒に露出している面や、 $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造のサブコンプレックス間相互作用に用いられている面には、ほとんど変異残基は分布していなかった。 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット間の相互作用面への Gcn<sup>-</sup>変異残基の局在は、調節サブコンプレックス内でみられる緊密なサブユニット間相互作用の異常によって、eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化による eIF2B 活性の阻害が起こらなくなることを示している。これらの変異は不安定な central cavity の形成をもたらし、リン酸化 eIF2 との安定した強いアフィニティでの結合ができなくなっているものと考えられる。また、Gcn<sup>-</sup>変異は $\beta$ サブユニット N 末端ドメインの挿入ヘリックス (図 3-7 B) の周辺にも見られ (Leu117Ser, Ile118Thr, Ser119Pro; 分裂酵母では Met136, Tyr137, Ser138 に相当)、こ

これらの変異も $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットの N 末端ドメイン同士の相互作用を不安定化し, 強いアフィニティでの結合が妨げていると考えられる.

一方, 表面に露出していない Gcd 変異残基については, 先行研究で明らかにされている通り<sup>46</sup>,  $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインの疎水性のコアや $\alpha$ サブユニット N 末端ドメインと C 末端ドメインの境界付近に多くみられた. これらの変異が Gcd の表現型をもたらすメカニズムとして, 多くの Gcd 変異体の表現型が eIF2 $\alpha$ サブユニット側の Gcn の変異体との共発現で抑圧されること<sup>19,21</sup>を考えると, これらの変異体は eIF2B の活性自体を低下させるのではなく, リン酸化されていない eIF2 に対してもリン酸化 eIF2 と同様の相互作用をすることによって Gcd の表現型を示していると推測される. 具体的な機構として, Gcd が Gcn の逆の表現型であることから, eIF2 とのアフィニティが変異によって強化される可能性が考えられるが, そのメカニズムは必ずしも明らかであるとは言えない.

### 3-5 VWM の原因変異の構造上へのマッピング

これまでに VWM を引き起こす変異として,  $\alpha$ から $\epsilon$ のすべてのサブユニット上に合計 100 箇所以上の変異箇所が同定されている (表 3-2)<sup>35</sup>. 前節と同様に, ヒト eIF2B と分裂酵母 eIF2B の三次構造の相同性を仮定し, VWM 変異残基に相当する残基の構造上へのマッピングを行った. 一次構造上各サブユニットに散在している VWM 変異残基は, 立体構造上においても eIF2B の広汎な領域に散在していた (図 3-15). 一般的に VWM 変異によってヌクレオチド交換活性は低下するが, その程度はさまざまであることから考えると, 複合的な要因によって活性低下が引き起こされていると推測される. 以下に, VWM 変異残基の位置とそこから想定される活性低下のメカニズムについて示す.

## 1. 触媒サブコンプレックスの遠位面

VWM 変異残基のうち、分子表面に露出している残基は触媒サブコンプレックスの遠位の面 (図 3-16), 特に $\epsilon$ サブユニットの高保存性領域の近傍に多く位置していた。 $\epsilon$ サブユニットの高保存性領域の近傍に VWM 変異が多く存在することは、この領域周辺でヌクレオチド交換反応が遂行されるという 3-3 節での仮説を支持するものである (図 3-16 B). ヌクレオチド交換反応を担うのは HEAT ドメインであることを考えると、この領域は eIF2 のおそらく $\gamma$ サブユニットを、HEAT ドメインによる交換反応が効率的に起こるような配向に固定する役割があると考えられる。そして、周囲の VWM 変異はこの相互作用を妨げることによって活性を低下させていると考えられる。また、 $\gamma$ サブユニットの遠位の表面にも Arg263, Ile267 (ヒトの Arg225Gln, Ile229Met 変異にそれぞれ相当)といった変異残基が位置しており、ヌクレオチド交換反応時の eIF2 との相互作用は $\gamma$ サブユニットも関与する、触媒サブコンプレックス遠位面全体によるものであることが推測される。

## 2. 触媒サブコンプレックス-調節サブコンプレックス間の相互作用面

分子表面に露出していない領域では、サブユニット間の相互作用面に VWM 変異は見られた。触媒サブコンプレックスと調節サブコンプレックス間の相互作用面、つまり、 $\epsilon$ - $\beta$ サブユニット相互作用面と $\gamma$ - $\delta$ サブユニット相互作用面の近傍には多くの VWM 変異がみられ (図 3-17 A, B), これらの変異は調節サブコンプレックスと触媒サブコンプレックス間の相互作用に悪影響を与えていると考えられる。出芽酵母の eIF2B は触媒サブコンプレックスだけで eIF2B と同等の交換活性を持つが、ラット eIF2B の触媒サブコンプレックスによる活性は eIF2B 全体と比較して低いことが報告されている<sup>67</sup>。このことから、ヒトにおいても eIF2B が十分な活性を発揮するためには調節サブコンプレックスとの適切な相互作用が必要であり、これらの変異はこのサブコンプレックス間の連携関係を妨げることで活性の低下をもたらしていると考えられる。



### 3. $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造内の相互作用面

他の相互作用面では、 $\beta$ サブユニットと $\delta$ サブユニットのヘテロ二量体化の相互作用面の近傍にも VWM 変異は位置していた(図 3-18). この位置にある VWM 変異体は、 $\beta$ - $\delta$ ヘテロ二量体構造の形状を不安定化し、触媒サブコンプレックスとの 2 つの相互作用面の位置関係に影響を与えることで、**2.**の変異体と同様にサブコンプレックス間の関係を変化させて eIF2B の活性を低下させていると考えられる.

### 4. $\epsilon$ サブユニット PLD-L $\beta$ H ドメイン間の相互作用面

これまで構造の表面、サブユニット間相互作用面とみてきたが、各サブユニットの内部にも VWM 変異は位置している.  $\epsilon$ サブユニットの内部に多くの VWM 変異がみられるが、PLD と L $\beta$ H ドメインの境界面には非常に多くの VWM 変異が存在している (図 3-19 A). これらの変異は両ドメイン間の結合を不安定化すると思われるが、これらの変異が活性に与える影響としては 2 通り考えられる. 1 つは変異によって L $\beta$ H ドメインの配向が変化し、HEAT ドメインが交換反応に適した位置を取りにくくなること、もう一つは L $\beta$ H ドメインの位置の不安定化がサブコンプレックス間の相互作用を妨げることである. L $\beta$ H ドメインと HEAT ドメインは 50 アミノ酸程度の長いリンカーでつながれていることを考えると前者の可能性は考えにくく、むしろ、両ドメインの境界部に結合する  $\beta$ サブユニットとの相互作用 (図 3-10 B) が影響を受けることによって活性の低下がもたらされていると推測される.

### 5. $\beta$ , $\delta$ サブユニットのドメイン境界

$\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの N 末端ドメインと C 末端ドメインの境界にも、数は少ないものの VWM 変異が位置している. これらの変異は調節サブユニットのドメイン境界の、リガンドに由来すると思われる電子密度に向かって側鎖が伸びている (図 3-19 B). この電子

密度の由来は不明であるが、この電子密度を介して $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの両ドメインの位置関係は固定されており、周辺残基の変異はドメインの位置関係の不安定化させ、適切な相互作用を妨げていると考えられる。

このように、VWM 変異によってさまざまな部位のサブユニット間またはドメイン間の相互作用が変化していることが明らかにされた。一方で eIF2B の構造をみているだけでは変異がどのように活性に影響を与えているか理解できない変異もある。 $\gamma$ サブユニットの L $\beta$ H ドメインや $\epsilon$ サブユニットの L $\beta$ H ドメイン外側面に位置する変異残基などがその例である (図 3-20)。これらの残基が位置する領域は eIF2 との相互作用において補助的な相互作用をしているか、もしくは eIF2B のヌクレオチド交換活性以外の機能に重要な領域であるのかもしれない。eIF2B には eIF2 と結合している eIF5 を解離させる機能<sup>68</sup>, eIF2 への Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> の結合を促進する機能<sup>69</sup> などが報告されており、これらの過程への理解も VWM の発症機構の解明には必要とされると思われる。

## 第4章 光クロスリンクによる eIF2B-eIF2 $\alpha$ 相互作用面の探索

### 4-1 方法

#### 4-1-1 eIF2B および eIF2 $\alpha$ サブユニット発現系の構築

エピトープタグによる検出のため、 $\alpha$ サブユニットの N 末端に myc タグ配列 (EQKLISEEDL) を、 $\beta$ サブユニットの N 末端に HA タグ配列 (YPYDVPDYA) を、 $\delta$ サブユニットの C 末端に strep タグ II 配列 (WSHPQFEK) をそれぞれ導入し、ベクター上の終止コドンすべて TAA に置換した。配列の改変には PrimeSTAR Max Mutagenesis Basal Kit を用いた。

分裂酵母 eIF2 $\alpha$ 遺伝子は cDNA ライブラリからクローニングを行い、N 末端に GST または MBP を、C 末端に His タグと FLAG タグ配列 (DYKDDDDK) を付加した発現系を構築した。

#### 4-1-2 eIF2B および eIF2 $\alpha$ サブユニットの調製

エピトープタグ付き eIF2B の発現および精製は、eIF2B と同様に行った。

eIF2 $\alpha$ サブユニットの調製には、GST を付加した発現系を用いた。Rosetta2(DE3) 株を形質転換し、LB 培地中 37 °C で培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 に達した時点で 18 °C まで冷却し、0.3 mM IPTG を加えさらに 18 時間培養を行った。菌体を遠心分離によって集め、PBS で洗浄の後-80 °C で保存した。室温で融解の後、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を加えたバッファ B (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 150 mM KCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) に懸濁して超音波破碎を行った。遠心分離により沈殿を除いた後、Ni Sepharose 6 Fast Flow にロ

ードした. 30 mM imidazole を加えたバッファ B でカラムを洗浄し, 400 mM imidazole を加えたバッファ B で溶出した. そして, バッファ B で平衡化した HiTrap Heparin HP にロードし, バッファ B での洗浄の後, 150 mM から 1 M の KCl の濃度勾配で溶出した. eIF2 $\alpha$ を含む画分をバッファ B に対して透析しながら, HRV 3C プロテアーゼによる発現用タグの切断を 4 °C で一晩行った. さらに, バッファ B で平衡化した HiLoad16/60 Superdex200 pg (GE Healthcare) で精製した.

#### 4-1-3 PKR の調製

PKR の調製は,  $\lambda$ ファージ protein phosphatase ( $\lambda$ PP) との共発現による精製法<sup>70</sup>をもとに改変を行った. ヒト PKR 遺伝子は Human Pancreas Marathon-Ready cDNA (Clontech) から,  $\lambda$ PP 遺伝子は  $\lambda$ DNA (Takara) からそれぞれクローニングを行った. N 末端に His タグを付加した PKR と  $\lambda$ PP との共発現系を作製し, Rosetta2(DE3) 株で発現を行った. LB 培地中 37 °C で培養し, OD<sub>600</sub> が 0.8 に達した時点で 20 °C まで冷却し, 0.5 mM IPTG を加えさらに 24 時間培養を行った. 菌体を遠心分離によって集め, PBS で洗浄の後 -80 °C で保存した. 室温で融解の後, バッファ R (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) に懸濁して超音波破碎を行った. 遠心分離により沈殿を除いた後, Heparin Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) にロードした. バッファ R でカラムを洗浄し, バッファ RH (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 1 M NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) で溶出した. そして, バッファ RH で平衡化した Ni Sepharose 6 Fast Flow にロードし, 30 mM imidazole を加えたバッファ RH での洗浄の後, 400 mM imidazole を加えたバッファ RH で溶出した. バッファ RK (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 50 mM KCl, 5% glycerol, 1 mM DTT) に対して一晩透析を行った後, バッファ RK で平衡化した HiTrap SP HP (GE Healthcare) にロードし, バッファ RK での洗浄の後, 50 mM から 500 mM の KCl の濃度勾配で溶出した. さらに, バッファ B で平衡化した HiLoad16/60 Superdex200 pg で精製した.

#### 4-1-4 PKR による eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化

PKR の活性化は二本鎖 RNA 非依存的な方法<sup>71</sup>で行った。精製された PKR および eIF2 $\alpha$ サブユニットをバッファ P (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT) に対して一晩透析を行い、限外ろ過法で PKR を 2 mg/ml 以上、eIF2 $\alpha$ サブユニットを 1 mg/ml 程度に濃縮した。PKR に終濃度 1 mM の ATP を加え、30 °C で 2 時間インキュベートすることで活性化を行った。そして、PKR と eIF2 $\alpha$ サブユニットを体積比1:9で混合し、終濃度 1 mM の ATP を加えて 25 °C で 1.5 時間インキュベートした。リン酸化状態は Phos-tag Acrylamide (Wako) を加えた SDS-PAGE によって確認を行った。そして、バッファ B で平衡化した HiLoad16/60 Superdex200 pg でさらに精製を行った。

#### 4-1-5 pBpa 標識タンパク質の調製

pBpa の導入のため、PrimeSTAR Max Mutagenesis Basal Kit を用いてベクター上の目的残基のコドンを TAG に置換した。ベクターは、eIF2B に関しては非標識 eIF2B の精製と同じものを、eIF2 $\alpha$ サブユニットに関しては N 末端に MBP を付加した発現系を用いた。pBpa 標識されたタンパク質の合成には TAG コドンが pBpa に再定義された、BL21(DE3) 由来の RFzero 株を用いた<sup>72,73</sup>。1 mM pBpa と 0.2% glucose を添加した LB 培地中 37 °C で培養し、OD<sub>600</sub> が 0.8 に達した時点で 20 °C まで冷却し、0.5 mM IPTG を加えさらに 24 時間培養を行った。菌体を遠心分離によって集め、-80 °C で保存した。室温で融解の後、バッファ B に懸濁して超音波破碎を行った。遠心分離により沈殿を除いた後、Amylose resin を上清に加えた。バッファ B でカラムを洗浄し、10 mM maltose を加えたバッファ B で溶出した。そして、バッファ B に対して透析しながら、HRV 3C プロテアーゼによる発現用タグの切断を 4 °C で一晩行った。

#### 4-1-6 光クロスリンク

*pBpa* 標識 eIF2B と eIF2 $\alpha$ サブユニットのクロスリンク実験には、50 mL 培養液から精製された eIF2B 100  $\mu$ L に対して 20  $\mu$ M の eIF2 $\alpha$ サブユニット 10  $\mu$ L を加えた試料を、*pBpa* 標識 eIF2 $\alpha$ サブユニットと eIF2B のクロスリンク実験には、25 mL 培養液から精製された eIF2 $\alpha$ サブユニット 100  $\mu$ L に対して 10  $\mu$ M の eIF2B 10  $\mu$ L を加えた試料を氷上で準備し、25 °C で 1 分間インキュベートした後、波長 365 nm の紫外線を氷上で 2 時間照射することによってクロスリンクを行った。クロスリンクの検出は、ウエスタンブロッティングと ECL prime (GE Healthcare) によって、通常のプロトコルで行った。

#### 4-2 *pBpa* 標識 eIF2B と eIF2 $\alpha$ サブユニットの光クロスリンク

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットからなる調節サブコンプレックスが eIF2 $\alpha$ サブユニットを結合するという先行研究の結果から、今回の構造上で表面に露出している $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの残基を 80 箇所選び (表 4-1), TAG コドンが *pBpa* に再定義された大腸菌 RFzero 株<sup>72</sup>を用いて各箇所に *pBpa* が導入された変異体をそれぞれ作製した。*pBpa* は光反応性の非天然型アミノ酸であり、365 nm の波長の光によって励起され、近接する C-H 結合を持つ炭素原子と反応して共有結合を形成する性質を持つ (図 4-1 A)<sup>73</sup>。80 種の変異体について eIF2 $\alpha$ サブユニットとの光クロスリンクを行った結果、 $\alpha$ サブユニットの置換体 5 種 ( $\alpha$ Gln63,  $\alpha$ Gln87,  $\alpha$ Arg92,  $\alpha$ His95,  $\alpha$ Val97),  $\beta$ サブユニットの置換体 3 種 ( $\beta$ Arg84,  $\beta$ Gln91,  $\beta$ Lys95),  $\delta$ サブユニットの置換体 3 種 ( $\delta$ Arg247,  $\delta$ Asp248,  $\delta$ Val256) の計 11 置換体でクロスリンクが確認された (図 4-1 B)。次に、このクロスリンクに関与する eIF2 $\alpha$  サブユニットの領域の特定のため、eIF2 $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメイン (1–179) のみを用いて同様の実験を行った。こ

の実験でも 11 の置換体すべてでクロスリンクが確認された (図 4-1 C).

クロスリンクがかかる置換体は 3 つのサブユニット上にまたがっていたが、すべて N 末端ドメインの残基の置換体であった。クロスリンクが確認された置換残基の位置を構造上にマッピングを行ったところ、これらの残基はすべて eIF2B の構造の中央に存在する central cavity へと露出する残基であり (図 4-2 A, B), central cavity の保存性の高い領域の外縁部に位置し (図 4-2 C), そして central cavity の表面に露出する Gcd<sup>-</sup>/Gcn<sup>-</sup>変異の近くに位置していた (図 4-2D). これらのことは, eIF2 $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインは, central cavity 底部の高保存性の領域において $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの N 末端ドメインによってつかまれるように認識されていることを示しており, また, central cavity での eIF2 $\alpha$ サブユニットの直接的な認識がリン酸化による翻訳調節に重要であることを示している.

続いて, eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化による調節サブコンプレックスへの結合様式の変化をみるため, リン酸化した eIF2 $\alpha$ サブユニットを用いることでクロスリンクのパターンに変化が生じるかを調べた. eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化は, eIF2 キナーゼであるヒト PKR を用いて行った. 活性化した PKR と eIF2 $\alpha$ サブユニットを ATP 存在下でインキュベートすることで, CBB 染色で確認する限り完全にリン酸化が施された eIF2 $\alpha$ サブユニットを調製することができた (図 4-3 A). このリン酸化 eIF2 $\alpha$ サブユニットを用いて 80 種の置換体とクロスリンク実験を行ったが, リン酸化 eIF2 $\alpha$ 特異的に架橋される置換体を得ることはできなかった. また, 非リン酸化 eIF2 $\alpha$ サブユニットと架橋される置換体の多くでもリン酸化 eIF2 $\alpha$ サブユニットとのクロスリンクが確認された (図 4-3 B). 一方で,  $\beta$ サブユニットの Arg84, Gln91 残基の置換体でのみ, クロスリンク強度の大幅な減弱がみられた (図 4-3 B, C). 立体構造上で離れた位置に存在している多くの残基でクロスリンクの変化が見られなかったということは, この実験系による限り, eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化に伴う central cavity への結合様式の大規模な変化の存在は確認できないことを示している. しかしながら,  $\beta$ サブユニットの central cavity 深部に位置する残基ではクロスリンク強度に変化が見られてい

ることは、eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化は、少なくとも局所的には、何らかの相互作用の変化をもたらしているといえる。

### 4-3 pBpa 標識 eIF2 $\alpha$ サブユニットと eIF2B の光クロスリンク

前節において、eIF2 $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインが eIF2B $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットから構成される central cavity に結合することが示された。そこで、eIF2 $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインがどのような配向で、この central cavity に結合するかを明らかにするため、既知の eIF2 $\alpha$ の構造<sup>74-76</sup>をもとに、分裂酵母 eIF2 $\alpha$ の N 末端ドメインで表面に露出していると推定される残基 30 箇所を選んで、前節と同様の方法を用いて pBpa 標識された eIF2 $\alpha$ を調製した (表 3-2)。そして、前節と同様に eIF2B と混合して紫外線を照射し、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットとのクロスリンク、そして eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化によるクロスリンクの変化の有無を調べることを試みた (図 4-4 A)。しかしながら、pBpa 標識された eIF2 $\alpha$ を PKR によって均一にリン酸化を施すことは困難であったため、リン酸化状態を模していると考えられる、Ser51 残基の Asp 変異体を作製し、リン酸化 eIF2 $\alpha$ の代用とすることを考えた。そのためにまず、前節において示されたリン酸化によるクロスリンクパターンの変化が Asp 変異によって再現されることを確認した。Asp 変異体の $\beta$ サブユニットの Arg84, Gln91 残基の pBpa 置換体とのクロスリンクは弱く、Asp 変異がリン酸化状態を再現できていると考えられる (図 4-5)。

引き続いて、eIF2 $\alpha$ サブユニット野生型置換体と Asp 変異型置換体を用いて、eIF2B $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットとのクロスリンクと、Asp 変異によるクロスリンクの変化の有無を調べた。その結果、eIF2B $\alpha$ サブユニットとクロスリンクする eIF2 $\alpha$ サブユニットの置換体が 3 種



(Glu28, Arg74, Arg88), eIF2B $\beta$ サブユニットとクロスリンクする置換体が4種 (Glu14, Asp16, Arg88, Ser90) 得られた (図 4-4 B, C). Arg88 残基の置換体は $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの両方にクロスリンクされた. そして, これらの置換体すべてについて, Ser51 の Asp 変異体でも同様にクロスリンクが確認された.  $\delta$ サブユニットとクロスリンクする置換体を見つけることはできなかった.

eIF2B に *pBpa* を導入した実験と同様に, eIF2 $\alpha$ サブユニットに *pBpa* を導入した実験によっても, リン酸化状態の変化によって引き起こされる **central cavity** への結合様式の大規模な変化は観察されなかった. 2つの異なる実験系のいずれにおいても大規模な相互作用様式の変化が確認されなかったことから, eIF2 $\alpha$ サブユニットはそのリン酸化状態に関わらず, **central cavity** においてほぼ同一の様式で結合していると考えられる.

ヒト eIF2 $\alpha$ サブユニットの構造上に, これらの置換残基に対応する残基のマッピングを行ったところ, eIF2B $\alpha$ サブユニットとクロスリンクする置換残基群と eIF2B $\beta$ サブユニットとクロスリンクする置換残基群は, それぞれ構造上のまとまった領域に存在し, 双方とクロスリンクする Arg88 残基はその中間的な位置に存在することが示された (図 4-6). そして, それぞれの置換残基がクロスリンク相手のサブユニットの近傍に配置されるように, 今回の eIF2B の構造上へヒト eIF2 $\alpha$ サブユニットの構造を, 手動でドッキングを行った. その結果,  $\beta$ サブユニットと $\delta$ サブユニットの間から eIF2 $\alpha$ サブユニットが **central cavity** へ入り込むように配置することで, 多くの置換残基を良好な位置関係に配置することができた (図 4-7). このドッキングモデルからは, リン酸化残基である Ser51 がどのように認識されているかは明らかではないが, Ser51 はこの様式での結合時には **central cavity** の底部に位置しており, このリン酸化残基周辺が直接的に認識されてアフィニティの変化を生み出していると考えられる.

## 第 5 章 eIF2B と eIF2 の相互作用についての考察

### 5-1 触媒サブコンプレックスと eIF2 の相互作用

$\epsilon$ サブユニットに、サブユニット間相互作用に関与していない、保存性の高い領域が存在すること、そしてその周囲に多くの VWM を引き起こす変異残基が位置していることは、この領域が他の因子との相互作用において重要な役割を果たすことを示唆している。実際に、この領域中心部に存在する Asn-Phe 配列 (NF モチーフ、分裂酵母では Asn237-Phe238 に相当する) は、ほぼすべての真核生物種において保存されており、これらの残基の変異は、サブユニット間の相互作用には影響を与えることなく、ヌクレオチド交換活性を大きく低下させることが知られている (図 5-1)<sup>77,78</sup>。この NF モチーフはどのような形で交換反応へ寄与しているのだろうか。

eIF2B によるヌクレオチド交換反応は、 $\epsilon$ サブユニットによって担われているものの、 $\epsilon$ サブユニット単独では eIF2B 全体と比較して低レベルの活性しか有しておらず、他のサブユニットの寄与が不可欠である。分裂酵母においては、 $\gamma$ サブユニットとの結合、つまり触媒サブコンプレックスの形成によって eIF2B 全体と同程度の交換活性が達成される<sup>17</sup>。NF モチーフの変異は、eIF2B 全体のヌクレオチド交換活性を大きく低下させる一方で、 $\epsilon$ サブユニットが単独で有する低レベルの交換活性に大きな影響を与えない<sup>77</sup>。このことは、NF モチーフによる交換反応の促進機能には、 $\gamma$ サブユニットをはじめとする他のサブユニットとの複合体の形成が必要とされることを示している。この NF モチーフの促進機能の発揮のメカニズムとして、触媒サブコンプレックスの形成によってはじめて NF モチーフを含む高保存性領域の構造が形成される、もしくは触媒サブコンプレックスの形成によってはじ

めて NF モチーフが機能を発揮できる様式で eIF2 が結合するようになる, といったことが考えられる. 高保存性領域はεサブユニット PLD の中心的な位置にあり (図 5-1), この領域の構造の形成が他のサブユニットの結合による影響を受けるとは考えにくいこと, そして, γサブユニット単独でも eIF2 を結合しうること<sup>68</sup>から考えて, 後者の機構がもっともらしく思われる. γサブユニットのどの領域が eIF2 の結合に利用されているかは明らかではないが, γサブユニットの遠位面の中央部にも, εサブユニットほど顕著ではないものの, 比較的保存された領域が存在し (図 5-1 B), この領域には VWM 変異も位置している (図 3-16 B). この領域とεサブユニットの高保存性領域とが協調的にはたらいで eIF2 と適切な相互作用を行うことで, εサブユニットの HEAT ドメインによる効率的なヌクレオチド交換反応が遂行されるようになると考えられる.

εサブユニットの HEAT ドメインや高保存性領域は eIF2 に対して, 具体的にどのような作用を行っているのだろうか. eIF2γサブユニットと相同性のある EF-Tu と, その GEF である EF-Ts の複合体構造<sup>79</sup>では, EF-Ts は EF-Tu の GTP 結合部位の側面に結合し, EF-Tu の全体構造を変化させることによって GDP 放出を行っている. 一方, 低分子量 G タンパク質に対する GEF は, G タンパク質の GDP 結合部位に直接的に作用し GDP を放出している<sup>80</sup>. これらの低分子量 G タンパク質に対する GEF には, グルタミンフィンガーと呼ばれる活性に重要なグルタミン酸残基が共通して存在するが, εサブユニットの HEAT ドメインにも, 交換反応に重要なグルタミン酸残基が同定されている<sup>49</sup>. これらのことから推測すると, HEAT ドメインは, 低分子量 G タンパク質に対する GEF と同様のメカニズムで交換反応を行うと考えられる. 一方で, aIF2 の構造では aIF2γサブユニットの GDP 結合部位の出口は, aIF2βサブユニットによって部分的に塞がれている (図 1-5 A). NF モチーフを含む高保存性領域は eIF2 との結合によって, eIF2βサブユニットを GDP 結合部位から排除するような構造の変化をもたらすことによって交換反応に寄与しているのかもしれない. このような構造変化によって HEAT ドメインがアクセスできるようになり, 交換反応が行われて

いるのではないかと推測される。またこの高保存性領域による構造変化は、eIF2B のヌクレオチド交換以外の機能、GTP や Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> の結合に関しても促進する効果を持っているのではないと思われる。その詳細について検討するためには、eIF2B-eIF2 複合体の構造解析を待たなければならないだろう。

## 5-2 調節サブコンプレックスと eIF2 の相互作用

今回の光クロスリンク実験によって調節サブコンプレックスと eIF2 $\alpha$ サブユニットの相互作用の様式が明らかにされ、eIF2B $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの N 末端ドメインによって形づくられる central cavity に、eIF2 $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインが $\beta$ サブユニットと $\delta$ サブユニットの間隙から入り込むという様式であることが示された。この相互作用では、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットすべてが直接的に eIF2 $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインの認識に関与していた。また、今回の実験系では、eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化やリン酸化を模した Asp 変異による、central cavity における相互作用様式の大規模な変化の存在を観察することはできなかった。このことから、central cavity における eIF2 $\alpha$ サブユニットの受容は、そのリン酸化状態に関わらず、ほぼ同様の様式で行われていると考えられる。

今回明らかにされた配向で eIF2 $\alpha$ サブユニットが central cavity に結合しているとき、そこへ古細菌ホモログ aIF2 の構造<sup>26</sup>を重ね合わせると、GTP/GDP 結合サブユニットである eIF2 $\gamma$ サブユニットは eIF2B から離れた方向へ展開していくこととなる (図 5-2 A)。しかし、既知の古細菌 aIF2 $\alpha$ サブユニットの構造において、N 末端ドメインと C 末端ドメインは互いにさまざまな向きで位置しており<sup>27,74,81</sup>、a/eIF2 $\alpha$ サブユニットの両ドメインの間にはほとんど相互作用が存在しない。eIF2 においてもこの柔軟性を仮定すれば、ドメイン間のリンカ

一部分で構造を回転させることによって、eIF2 $\gamma$ サブユニットを $\epsilon$ サブユニットの近傍に配置することは可能である (図 5-2 B). この配置では、 $\epsilon$ サブユニットの高保存性領域上に位置すると推定されるのは eIF2 $\beta$ サブユニットであり (図 5-2 C), 結合に伴う eIF2B や eIF2 の構造変化が起こらない限り、NF モチーフや高保存領域が eIF2 $\gamma$ サブユニットを直接認識するとは考えにくい.

### 5-3 eIF2B と eIF2 の相互作用

前節で提示された領域で eIF2B と eIF2 との相互作用が行われているとすると、2 つの central cavity, 2 つの触媒サブコンプレックスを利用して、eIF2B に同時に 2 分子の eIF2 が結合することが可能である. このことは、eIF2B と eIF2 がサブユニット量比で 1:1 の割合で結合するという先行研究とも矛盾しない<sup>82</sup>.

では、この相互作用様式は、ヌクレオチド交換反応に適したプロダクティブな結合時における central cavity での相互作用の状態を示しているのだろうか、それともヌクレオチド交換反応が起こらないアンプロダクティブな結合時における状態を示しているのだろうか.

この相互作用がプロダクティブな結合状態を表しているとする、リン酸化された eIF2 に対しても、eIF2B は同様のプロダクティブな結合をなしうることとなる. そのため、リン酸化 eIF2 による eIF2B のヌクレオチド交換反応の阻害は、eIF2 が強固に eIF2B に結合することによって、交換反応の回転数を低下させることによって行われていると考えられる. 一方、この相互作用がアンプロダクティブな結合状態を表しているとする、ヌクレオチド交換反応を行うためにはプロダクティブな結合状態への移行が必要とされる.

この場合、リン酸化 eIF2 によって eIF2B のヌクレオチド交換反応が阻害されるのは、高いアフィニティでの central cavity への結合によって、このアンプロダクティブな結合状態を安定化し、プロダクティブな結合状態が妨げられているためであると推測される。

先行研究<sup>8</sup>は、4 分のタイムスケールにおいて、リン酸化 eIF2 によるヌクレオチド交換反応の阻害の効果は可逆的なものであること、また、リン酸化 eIF2 からは eIF2B の触媒による GDP の放出が観察されないことを報告している。このデータは反応の回転数を低下させることによって阻害を行う前者のモデルとは一致せず、プロダクティブな結合状態への移行を阻害する、という後者のモデルを支持する。このモデルに従うと、eIF2 と eIF2B との相互作用には 2 種類の様式が存在し、2 種類の相互作用様式が競合することによって eIF2B のヌクレオチド交換活性が制御されていると考えられる。また、eIF2 $\alpha$ サブユニットの喪失は、ヌクレオチド交換反応の  $K_m$  値を上昇させることによって eIF2B のヌクレオチド交換活性を低下させること<sup>83</sup>を考えると、アンプロダクティブな結合状態も eIF2-eIF2B 間のアフィニティを強化することで交換反応に寄与していると推測される。

この 2 種類の相互作用はどのように関係しているのだろうか。前節の相互作用モデルでは、eIF2 $\beta$ ,  $\gamma$ サブユニットを $\epsilon$ サブユニット近傍に位置させることは可能であった (図 5-2 C)。そこから、eIF2 $\alpha$ サブユニットと central cavity の相互作用によってアンプロダクティブな結合状態にある eIF2 は、eIF2 $\alpha$ サブユニットドメイン間での回転によって eIF2 $\beta$ ,  $\gamma$ サブユニットが $\epsilon$ サブユニット近傍に移動した際に、eIF2 $\beta$ の K-box と HEAT ドメイン間の相互作用によって捕捉され、プロダクティブな結合へと移行する、という機構が考えられる (図 5-3)。この移行に伴い、eIF2 $\alpha$ サブユニットの central cavity からの解離、もしくは eIF2B の構造の変化による central cavity の形状や開口方向の変化などが起こると想像される。その後、触媒サブコンプレックス遠位面において NF モチーフと HEAT ドメインによってヌクレオチド交換反応が遂行されるのだろう。

一方、eIF2 $\alpha$ サブユニットがリン酸化されている場合、central cavity との相互作用

が強固となるため、K-box と HEAT ドメインによるプロダクティブな結合状態への移行が妨げられると考えられる (図 5-4 B). eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化による翻訳調節が起こらない、Gcn<sup>-</sup>の表現型を生じる変異残基は、調節サブユニットどうしの相互作用面や、central cavity 表面残基の変異に集中していた。また、eIF2B からの $\alpha$ サブユニットの欠落によっても同様に Gcn<sup>-</sup>の表現型となる。これらの変異体では、central cavity での相互作用が不安定化なものであり、リン酸化された eIF2 であって強固な結合ができずにプロダクティブな結合状態へ移行してしまうため、この表現型が生じていると考えられる (図 5-4 C). 一方、 $\alpha$ サブユニットに多く存在する Gcd 変異は、反対に central cavity での相互作用を強固にしているのかもしれない (図 5-4 D). また他の可能性として、central cavity への eIF2  $\alpha$ サブユニットの結合配向を変化させ、2 種類の結合状態の間の連動性に影響を与えていることも考えられる。

## 5-4 VWM 発症のメカニズム

3-5 節に記述されているように、VWM を引き起こす変異残基のうち eIF2B の分子表面にあるものは、 $\epsilon$ サブユニットの遠位面に存在する高保存性領域の近傍に多く位置しており、この部位での eIF2 との相互作用に影響を与えて活性の低下をもたらしていると考えられる。一方、eIF2B の内部にある変異は、さまざまなサブユニット間およびドメイン間の相互作用面に位置していた。これらの変異は、eIF2B の構造を若干歪んだ、もしくは緩んだものにすると考えられる。前節に記述されているように、eIF2B と eIF2 と間では、空間的に離れた位置で複数の相互作用がなされていると考えられるため、eIF2B の構造が歪むことにより、central cavity に eIF2 $\alpha$ サブユニットが結合した状態から触媒サブコンプレックスで

のプロダクティブな結合状態への移行，といった段階がスムーズに推移しなくなり，eIF2Bの活性の穏やかな低下がもたらされていると推測される。

また，VWM 変異による eIF2B の活性の穏やかな低下が，大脳白質においてのみ深刻な傷害もたらすメカニズムとしては，次のようなことが考えられる．VWM は発熱や頭部の傷害を契機として発症する例が多く報告されていることから，ストレス応答機構が発症に関与していると推測される．ミエリンの主要な構成成分はスフィンゴミエリンであり，スフィンゴミエリンのようなセラミドの合成は小胞体で行われる．そのため，ミエリンの大量合成を行う大脳白質は他の組織よりも小胞体による処理能力の余裕が少なく，弱いストレスによるわずかな変性タンパク質の蓄積に対しても処理しきれなくなり，小胞体ストレス応答の経路が活性化されてしまうと考えられる．このとき PERK の活性化によって eIF2 のリン酸化がもたらされるが，eIF2B が通常の活性を有していれば一時的な TC 濃度の低下の後，迅速に TC 濃度は回復する．しかしながら，VWM 変異によって eIF2B の活性が低下している場合，TC 濃度を迅速に回復させることができず，TC 濃度が低下した状態が長く続き，アポトーシス経路が活性化され細胞死が誘導されてしまうと考えられる．具体的には，eIF2 のリン酸化によって ATF4 が誘導されるが，転写因子である ATF4 が転写を活性化する遺伝子の一つにアポトーシス経路を活性化することが知られている *CHOP* がある．*CHOP* の mRNA も *ATF4* と同様に uORF をもつため，TC 濃度が低下した状態が長く続いたときのみアポトーシス経路の活性化が起こると考えられる<sup>84,85</sup>．このような機構によって，大脳白質での局所的な傷害がもたらされるのではないかと推測される。



## 5-5 eIF2B-eIF2 間相互作用の進化的起源

ここまで、eIF2B と eIF2 との間でなされる相互作用の機構について考察を行ってきた。しかしながら、ヌクレオチド交換活性とその調節、という比較的単純な機能に対して eIF2B のような多くのサブユニットから構成される複雑な因子が必要とされるのはどういった理由であろうか。また、eIF2 には古細菌ホモログ aIF2 が存在するのに対し、eIF2B には明確な古細菌ホモログは存在していない。aIF2 は eIF2 と異なり、GDP と GTP に対して同程度のアフィニティを有している<sup>30</sup>ため、eIF2B のようなヌクレオチド交換因子を必要としていないと考えられるが、では、古細菌から真核生物への進化の過程で、eIF2B はどのようにして誕生したのだろうか。eIF2B の各サブコンプレックスは異なる機能を有しており、また、今回解かれた構造によって、触媒サブコンプレックスのヌクレオチド交換反応に重要な領域と、調節サブコンプレックスの交換反応の調節に重要な領域とが、空間的に離れた位置に存在していることが明らかにされた。そして、生化学的な解析は、2 種類の相互作用が緊密に連携した協調的過程とは言えないことを示唆している<sup>83</sup>。これらのことから、eIF2B の各サブコンプレックスの祖先は何らかの現在とは異なる機能をそれぞれ有しており、それらが融合して現在の eIF2B となったのではないかと推測される。

まずは調節サブコンプレックスの由来についてであるが、古細菌には配列の類似した aIF2B と呼ばれる機能未知因子が存在し、aIF2 の $\alpha$ サブユニットと結合することが報告されている<sup>86</sup>。また、調節サブユニットの配列および構造は 5-methylthioribose 1-phosphate isomerase (M1Pi) や ribose-1,5-bisphosphate isomerase (R15Pi) の構造と類似している。M1Pi の構造では調節サブユニットと同様の様式の高量体構造が<sup>87</sup>、また R15Pi の構造では調節サブコンプレックスと同様の様式の高量体構造が形成されている (図 5-5 A, B) ことから考えて<sup>88</sup>、祖先型 a/eIF2B も類似した、糖代謝に関する酵素活性を有していたと思われる。また、M1Pi や R15Pi では、N 末端ドメインと C 末端ドメインの位置関係の変化を伴う

酵素反応サイクルが遂行されることが知られている (図 5-5 C). この動きを eIF2B に当てはめると, central cavity が広がったり狭くなったりするような動きである. このことから, a/eIF2B も同様の構造変化を伴う酵素反応を行っており, a/eIF2B に対する a/eIF2 の結合は, この酵素反応に伴う運動を妨げることによって a/eIF2B の酵素反応を調節するという意義を持っていたのではないかと推測される. この結合の意義は必ずしも明らかではないが, 栄養源の枯渇などによって tRNA のアミノアシル化レベルが低下して Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> を結合していない a/eIF2 が蓄積すると, Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> を結合していない a/eIF2 による a/eIF2B への結合が起こり, その結果細胞内の代謝経路が調節されるというような調節機能が存在していたのではないかと想像される. そして, a/eIF2 のリン酸化がストレスシグナルとして利用されるようになると, (aIF2-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> 構造において  $\alpha$  サブユニットの Ser48 残基の周辺は tRNA と直接相互作用しうる位置にあること<sup>28</sup>, またリボソーム上において eIF2 $\alpha$  サブユニットは E サイトの近傍に位置すること<sup>89</sup>などを考えると, a/eIF2 のリン酸化の当初の役割は tRNA やリボソームへの結合を妨げる機能を持っていたものではないかと推測されるが), リン酸化された eIF2 への強い結合能を獲得したのではないかと考えられる. 一方, 触媒サブコンプレックスの由来については, ドメイン構成の類似した, 糖リン酸へのヌクレオチド転移酵素から進化したと考えられる<sup>90</sup>. NTP 結合能, おそらくは GTP 結合能を有していた酵素と HEAT ドメインとが融合することは, a/eIF2 に対するヌクレオチド交換にとって有利であったと考えられる. このような, a/eIF2 に対して異なる機能を有する 2 つの因子群が結合して eIF2B へと進化し, eIF5 の解離や Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> の結合の促進といった, eIF2 の再生に関する新たな機能を獲得しながら現在へ至っていると想像される.

## 5-6 結論および展望

本研究では、大腸菌組換え発現系による分裂酵母 eIF2B の簡便な大量調製法を確立し、その X 線結晶構造を決定した。この結晶構造によって、eIF2B の十量体構造が明らかとなった。そして、eIF2B の活性制御に重要な eIF2 $\alpha$ サブユニットの N 末端ドメインの結合は、eIF2B の中央に位置する、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニットの N 末端ドメインによって形づくられる central cavity によって担われており、一方、ヌクレオチド交換反応に大きな影響力を持つ HEAT ドメインや NF モチーフは eIF2B の遠位の面に位置していることが示された。

また、光クロスリンク実験による解析では、eIF2 $\alpha$ サブユニットと central cavity の間の相互作用について、eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化による大規模な結合様式の変化の存在は確認されなかった。このことから、リン酸化による central cavity への結合様式の変化よりも、むしろリン酸化による central cavity へのアフィニティの変化によって eIF2B の交換反応の活性が制御されていると推測される。また、リン酸化による eIF2B の制御ができなくなる Gcn 変異が central cavity の表面や  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ サブユニット間の相互作用面に局在していることも、central cavity での安定したリン酸化 eIF2 $\alpha$ サブユニットとの相互作用が活性制御に重要であることを示唆しており、この仮説を支持している。この仮説のさらなる検証には生化学的な手法での相互作用の解析が必要とされるが、今回開発された eIF2B の調製法を用いれば、高純度の変異体が迅速に調製可能である。また、この調製法は大腸菌発現系を利用したものであるため、eIF2B の活性を低下させるような、真核生物にとって有害な変異体であっても調製することができる。このことは、今回の構造からは必ずしも明らかではない Gcd 表現型のメカニズムや、VWM 変異体についての生化学的な解析を行う際に非常に有用であると考えられる。

また、eIF2 の古細菌ホモログ aIF2 の構造を利用した eIF2B と eIF2 のドッキングモデルからは、光クロス実験によって明らかにされた様式で eIF2 $\alpha$ サブユニットが central

cavity に結合しているとき、GDP を結合する eIF2 $\gamma$ サブユニットは、ヌクレオチド交換反応に重要な NF モチーフに到達することができないことが予測された。このことから、eIF2B と eIF2 の間の結合には、central cavity と eIF2 $\alpha$ サブユニットによって主導されるアンプロダクティブな結合と、触媒サブコンプレックスと eIF2 $\beta$ ,  $\gamma$ サブユニットによって主導されるプロダクティブな結合の 2 種類が存在するというモデルを立てた。eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化や、central cavity での相互作用の変化によって 2 種類の結合様式間の平衡が変化することで、eIF2B の交換活性が変化することがこのモデルからは推測される。このモデルの検証のためには、eIF2B と eIF2 の間のプロダクティブな結合がどのようなものであるか、また、eIF2 $\alpha$ サブユニットのリン酸化がどのように認識されてアフィニティを変化させているのか、といったことについて明らかにする必要がある、eIF2B-eIF2 複合体の構造解析が今後の課題となると思われる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり，横山茂之先生には適切なご指導とすばらしい研究環境を与えていただきました．心から感謝いたします．伊藤拓宏先生には研究全般に関して丁寧なご指導と議論をしていただきました．深く感謝いたします．坂本健作先生からは RFzero 株の提供と非天然型アミノ酸の取扱いについて教えていただきました．理化学研究所の皆様には実験設備や実験に関する討論など，大変お世話になりました．SPring-8 における X 線回折実験では，ビームラインのスタッフの方々にご助力いただきました．秘書の篠崎喜里子さん，中山朋子さんをはじめ，多くの方々に事務面でお世話になりました．深田吉孝先生そして深田研究室の皆様にはさまざまな面で便宜を図っていただきました．深く感謝いたします．

最後に，私の大学院生活を経済的および精神的に支えてくださった家族に深く感謝いたします．

平成 25 年 12 月 柏木 一宏

## 引用文献

1. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113–27 (2010).
2. Hinnebusch, A. G. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 434–67 (2011).
3. Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K. & Sperling-petersen, H. U. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 101–123 (2005).
4. Wang, X. & Proud, C. G. A novel mechanism for the control of translation initiation by amino acids, mediated by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2B. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1429–42 (2008).
5. Proud, C. G. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 3–12 (2005).
6. Baird, T. D. & Wek, R. C. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Adv. Nutr.* **3**, 307–321 (2012).
7. Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S. & Samali, A. The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3493–511 (2013).
8. Rowlands, A. G., Panniers, R. & Henshaw, E. C. The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J. Biol. Chem.* **263**, 5526–33 (1988).
9. Krishnamoorthy, T. *et al.* Tight binding of the phosphorylated  $\alpha$  subunit of initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5018–30 (2001).
10. Wang, X. *et al.* Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the  $\epsilon$ -subunit and their functions *in vivo*. *EMBO J.* **20**, 4349–4359 (2001).
11. Ashe, M. P., Slaven, J. W., De Long, S. K., Ibrahim, S. & Sachs, A. B. A novel eIF2B-dependent mechanism of translational control in yeast as a response to fusel alcohols. *EMBO J.* **20**, 6464–74 (2001).

12. Hinnebusch, A. G. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 407–50 (2005).
13. Hinnebusch, A. G. A hierarchy of *trans*-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2349–60 (1985).
14. Harding, H. P. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108 (2000).
15. Pavitt, G. D. eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1487–92 (2005).
16. Yang, W. & Hinnebusch, A. G. Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6603–16 (1996).
17. Pavitt, G. D., Ramaiah, K. V, Kimball, S. R. & Hinnebusch, A. G. eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev.* **12**, 514–26 (1998).
18. Hannig, E. M., Williams, N. P., Wek, R. C. & Hinnebusch, A. G. The translational activator GCN3 functions downstream from GCN1 and GCN2 in the regulatory pathway that couples *GCN4* expression to amino acid availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **562**, 549–562 (1990).
19. Vazquez de Aldana, C. R. & Hinnebusch, A. G. Mutations in the GCD7 subunit of yeast guanine nucleotide exchange factor eIF-2B overcome the inhibitory effects of phosphorylated eIF-2 on translation initiation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3208–22 (1994).
20. Pavitt, G. D., Yang, W. & Hinnebusch, A. G. Homologous segments in three subunits of the guanine nucleotide exchange factor eIF2B mediate translational regulation by phosphorylation of eIF2. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1298–313 (1997).
21. Dev, K. *et al.* The beta/Gcd7 subunit of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B), a guanine nucleotide exchange factor, is crucial for binding eIF2 *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5218–33 (2010).

22. Fabian, J. R., Kimball, S. R., Heinzinger, N. K. & Jefferson, L. S. Subunit assembly and guanine nucleotide exchange activity of eukaryotic initiation factor-2B expressed in Sf9 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 12359–12365 (1997).
23. Gomez, E., Mohammad, S. S. & Pavitt, G. D. Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *EMBO J.* **21**, 5292–301 (2002).
24. Williams, D. D., Price, N. T., Loughlin, A. J. & Proud, C. G. Characterization of the mammalian initiation factor eIF2B complex as a GDP dissociation stimulator protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 24697–703 (2001).
25. Asano, K., Krishnamoorthy, T., Phan, L., Pavitt, G. D. & Hinnebusch, A. G. Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2B $\epsilon$ , GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2. *EMBO J.* **18**, 1673–88 (1999).
26. Yatime, L., Mechulam, Y., Blanquet, S. & Schmitt, E. Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18445–50 (2007).
27. Stolboushkina, E. *et al.* Crystal structure of the intact archaeal translation initiation factor 2 demonstrates very high conformational flexibility in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. *J. Mol. Biol.* **382**, 680–91 (2008).
28. Schmitt, E. *et al.* Structure of the ternary initiation complex aIF2-GDPNP-methionylated initiator tRNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 450–4 (2012).
29. Stolboushkina, E. *et al.* Crystal structure of the archaeal translation initiation factor 2 in complex with a GTP analogue and Met-tRNA<sup>f</sup>(Met.). *J. Mol. Biol.* **425**, 989–98 (2013).
30. Pedullà, N. *et al.* The archaeal eIF2 homologue: functional properties of an ancient translation initiation factor. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1804–12 (2005).
31. Flynn, A., Oldfield, S. & Proud, C. G. The role of the  $\beta$ -subunit of initiation factor eIF-2 in initiation complex formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1174**, 117–21 (1993).



32. Naveau, M., Lazennec-Schurdevin, C., Panvert, M., Mechulam, Y. & Schmitt, E. tRNA binding properties of eukaryotic translation initiation factor 2 from *Encephalitozoon cuniculi*. *Biochemistry* **49**, 8680–8 (2010).
33. Schiffmann, R. *et al.* Childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination. *Ann. Neurol.* **35**, 331–340 (1994).
34. Scheper, G. C., Proud, C. G. & van der Knaap, M. S. Defective translation initiation causes vanishing of cerebral white matter. *Trends Mol. Med.* **12**, 159–66 (2006).
35. Pavitt, G. D. & Proud, C. G. Protein synthesis and its control in neuronal cells with a focus on vanishing white matter disease. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 1298–310 (2009).
36. Fogli, A. & Boespflug-Tanguy, O. The large spectrum of eIF2B-related diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 22–9 (2006).
37. Dietrich, J. *et al.* EIF2B5 mutations compromise GFAP<sup>+</sup> astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat. Med.* **11**, 277–83 (2005).
38. Wong, K. *et al.* Foamy cells with oligodendroglial phenotype in childhood ataxia with diffuse central nervous system hypomyelination syndrome. *Acta Neuropathol.* **100**, 635–46 (2000).
39. Rodriguez, D. *et al.* Increased density of oligodendrocytes in childhood ataxia with diffuse central hypomyelination (CACH) syndrome: neuropathological and biochemical study of two cases. *Acta Neuropathol.* **97**, 469–80 (1999).
40. Fogli, A. *et al.* Decreased guanine nucleotide exchange factor activity in eIF2B-mutated patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 561–6 (2004).
41. Horzinski, L. *et al.* Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) GEF activity as a diagnostic tool for EIF2B-related disorders. *PLoS One* **4**, e8318 (2009).
42. Kantor, L. *et al.* Heightened stress response in primary fibroblasts expressing mutant eIF2B genes from CACH/VWM leukodystrophy patients. *Hum. Genet.* **118**, 99–106 (2005).
43. Hao, S. *et al.* Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* **307**, 1776–8 (2005).

44. Costa-Mattioli, M. *et al.* eIF2 $\alpha$  phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **129**, 195–206 (2007).
45. Scheuner, D. *et al.* Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol. Cell* **7**, 1165–76 (2001).
46. Hiyama, T. B., Ito, T., Imataka, H. & Yokoyama, S. Crystal structure of the  $\alpha$  subunit of human translation initiation factor 2B. *J. Mol. Biol.* **392**, 937–51 (2009).
47. Boesen, T., Mohammad, S. S., Pavitt, G. D. & Andersen, G. R. Structure of the catalytic fragment of translation initiation factor 2B and identification of a critically important catalytic residue. *J. Biol. Chem.* **279**, 10584–92 (2004).
48. Wei, J. *et al.* Crystal structure of the C-terminal domain of the  $\epsilon$  subunit of human translation initiation factor eIF2B. *Protein Cell* **1**, 595–603 (2010).
49. Mohammad-Qureshi, S. S., Haddad, R., Hemingway, E. J., Richardson, J. P. & Pavitt, G. D. Critical contacts between the eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) catalytic domain and both eIF2 $\beta$  and -2 $\gamma$  mediate guanine nucleotide exchange. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5225–34 (2007).
50. Alone, P. V & Dever, T. E. Direct binding of translation initiation factor eIF2 $\gamma$ -G domain to its GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors eIF5 and eIF2B $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* **281**, 12636–44 (2006).
51. Nika, J., Yang, W., Pavitt, G. D., Hinnebusch, A. G. & Hannig, E. M. Purification and kinetic analysis of eIF2B from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 26011–7 (2000).
52. Manchester, K. L. Catalysis of guanine nucleotide exchange on eIF-2 by eIF-2B: is it a sequential or substituted enzyme mechanism? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 223–7 (1997).
53. Richardson, J. P., Mohammad, S. S. & Pavitt, G. D. Mutations causing childhood ataxia with central nervous system hypomyelination reduce eukaryotic initiation factor 2B complex formation and activity. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2352–2363 (2004).
54. Li, W., Wang, X., Knaap, M. S. Van Der & Proud, C. G. Mutations linked to leukoencephalopathy with vanishing white matter impair the function of the eukaryotic initiation factor 2B complex in diverse ways. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3295–3306 (2004).

55. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J. Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.* **229**, 105–124 (1993).
56. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125–32 (2010).
57. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82 (2006).
58. Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol. Biol.* **364**, 215–30 (2007).
59. Cowtan, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 1002–11 (2006).
60. Adams, P. D. *et al.* PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
61. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004). doi:10.1107/S0907444904019158
62. Lovell, S. C. *et al.* Structure validation by C $\alpha$  geometry :  $\phi$ ,  $\psi$  and C $\beta$  deviation. *Proteins* **50**, 437–450 (2003).
63. Davis, I. W., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Res.* **32**, W615–9 (2004).
64. Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T. & Ben-tal, N. ConSurf 2010 : calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **38**, 529–533 (2010).
65. Kakuta, Y. *et al.* Crystal structure of the regulatory subunit of archaeal initiation factor 2B (aIF2B) from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3: a proposed structure of the regulatory subcomplex of eukaryotic IF2B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 725–32 (2004).
66. Jin, X., Ballicora, M. A., Preiss, J. & Geiger, J. H. Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *EMBO J.* **24**, 694–704 (2005).

67. Fabian, J. R., Kimball, S. R. & Jefferson, L. S. Reconstitution and purification of eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) expressed in Sf21 insect cells. *Protein Expr. Purif.* **13**, 16–22 (1998).
68. Jennings, M. D., Zhou, Y., Mohammad-Qureshi, S. S., Bennett, D. & Pavitt, G. D. eIF2B promotes eIF5 dissociation from eIF2\*GDP to facilitate guanine nucleotide exchange for translation initiation. *Genes Dev.* **27**, 2696–707 (2013).
69. Salimans, M., Goumans, H., Ames, H., Benne, R. & Voorma, H. O. Regulation of protein synthesis in eukaryotes. Mode of action of eRF, an eIF-2-recycling factor from rabbit reticulocytes involved in GDP/GTP exchange. *Eur. J. Biochem.* **145**, 91–8 (1984).
70. Matsui, T., Tanihara, K. & Date, T. Expression of unphosphorylated form of human double-stranded RNA-activated protein kinase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 798–807 (2001).
71. Lemaire, P. a, Lary, J. & Cole, J. L. Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J. Mol. Biol.* **345**, 81–90 (2005).
72. Mukai, T. *et al.* Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code. *Nucleic Acids Res.* **38**, 8188–95 (2010).
73. Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. & Schultz, P. G. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11020–4 (2002).
74. Ito, T., Marintchev, A. & Wagner, G. Solution structure of human initiation factor eIF2 $\alpha$  reveals homology to the elongation factor eEF1B. *Structure* **12**, 1693–704 (2004).
75. Dhaliwal, S. & Hoffman, D. W. The crystal structure of the N-terminal region of the  $\alpha$  subunit of translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) from *Saccharomyces cerevisiae* provides a view of the loop containing serine 51, the target of the eIF2 $\alpha$ -specific kinases. *J. Mol. Biol.* **334**, 187–195 (2003).
76. Nonato, M. C., Widom, J. & Clardy, J. Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **277**, 17057–61 (2002).
77. Gomez, E. & Pavitt, G. D. Identification of domains and residues within the  $\epsilon$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B $\epsilon$ ) required for guanine nucleotide exchange

- reveals a novel activation function promoted by eIF2B complex formation. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3965-76 (2000).
78. Wang, X., Wortham, N. C., Liu, R. & Proud, C. G. Identification of residues that underpin interactions within the eukaryotic initiation factor (eIF2) 2B complex. *J. Biol. Chem.* **287**, 8263–74 (2012).
  79. Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. & Leberman, R. The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu· EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature* **379**, 511–518 (1996).
  80. Cherfils J. & Chardin, P. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biol. Sci.* **24**, 306–311 (1999).
  81. Yatime, L., Schmitt, E., Blanquet, S. & Mechulam, Y. Structure-function relationships of the intact aIF2 $\alpha$  Subunit from the archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Biochemistry* **44**, 8749–8756 (2005).
  82. Konieczny, A. & Safer, B. Purification of the eukaryotic initiation factor 2-eukaryotic initiation factor 2B complex and characterization of its guanine nucleotide exchange activity during protein synthesis initiation. *J. Biol. Chem.* **258**, 3402–3408 (1983).
  83. Nika, J., Rippel, S. & Hannig, E. M. Biochemical analysis of the eIF2 $\beta\gamma$  complex reveals a structural function for eIF2 $\alpha$  in catalyzed nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* **276**, 1051–6 (2001).
  84. Rutkowski, D. T. & Kaufman, R. J. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* **14**, 20–28 (2004).
  85. Palam, L. R., Baird, T. D. & Wek R. C. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J. Biol. Chem.* **286**, 10939–49 (2011).
  86. Dev, K. *et al.* Archaeal aIF2B interacts with eukaryotic translation initiation factors eIF2 $\alpha$  and eIF2B $\alpha$ : Implications for aIF2B function and eIF2B regulation. *J. Mol. Biol.* **392**, 701–22 (2009).
  87. Tamura, H. *et al.* Crystal structure of 5-methylthioribose 1-phosphate isomerase product complex from *Bacillus subtilis* : implications for catalytic mechanism. *Protein Sci.* **17**, 126–135 (2008).
  88. Nakamura, A. *et al.* Dynamic, ligand-dependent conformational change triggers reaction of ribose-1,5-bisphosphate isomerase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *J. Biol. Chem.* **287**, 20784–96 (2012).

89. Hashem, Y. *et al.* Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29. *Cell* **153**, 1108–19 (2013).
90. Koonin, E. V. Multidomain organization of eukaryotic guanine nucleotide exchange translation initiation factor eIF-2B subunits revealed by analysis of conserved sequence motifs. *Protein Sci.* **4**, 1608–17 (1995).

## 図表

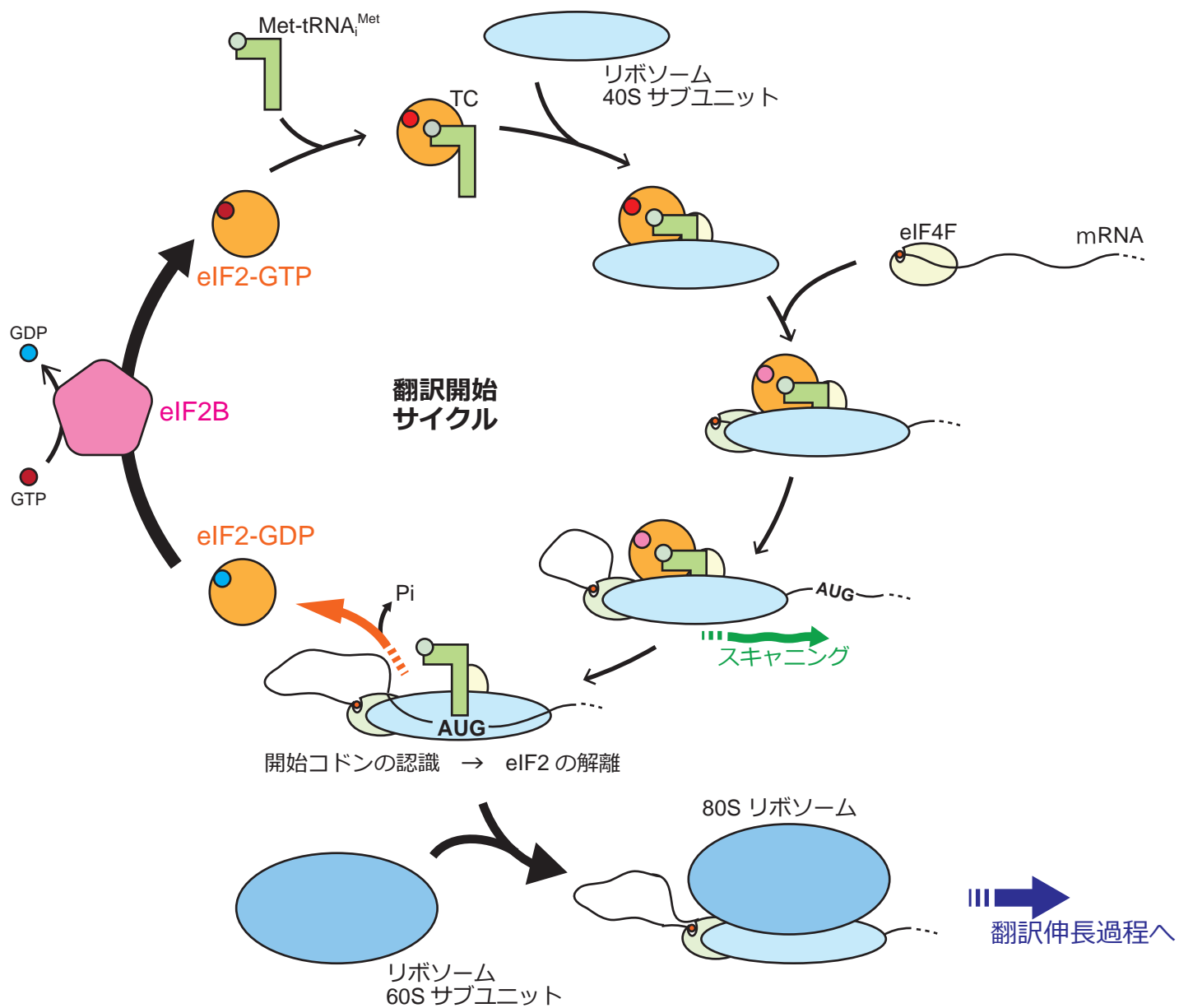


図 1-1. 真核生物の翻訳開始過程の概要 .



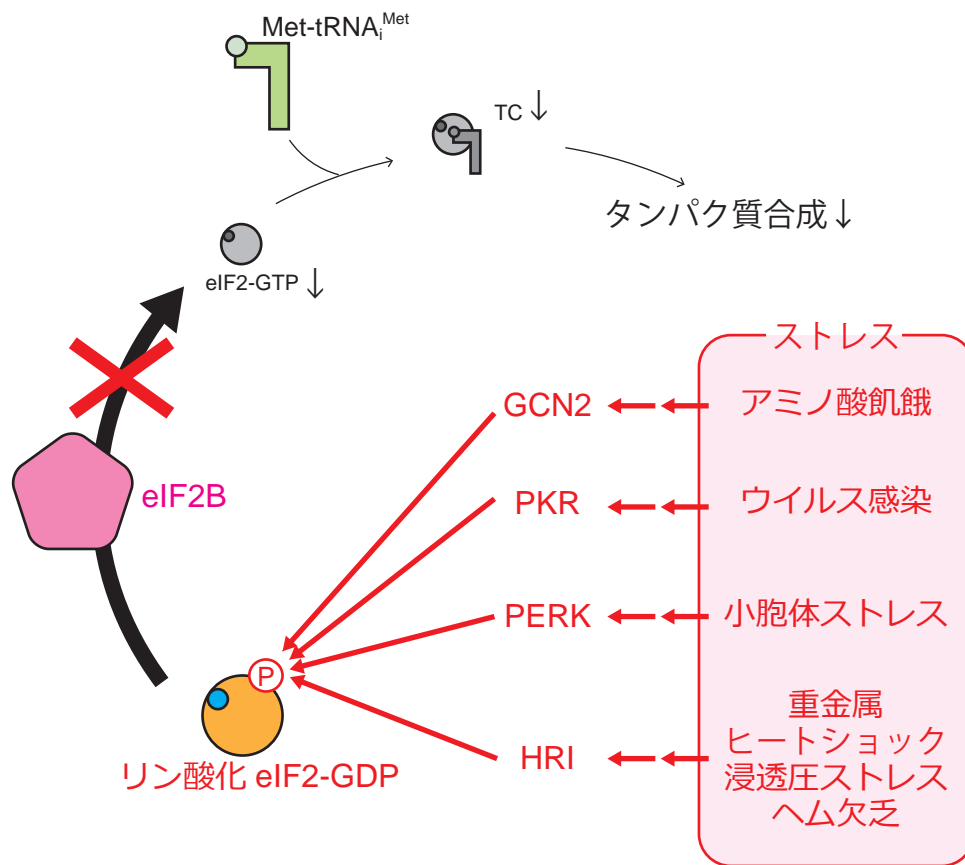


図 1-2. eIF2 のリン酸化によるタンパク質合成制御 .

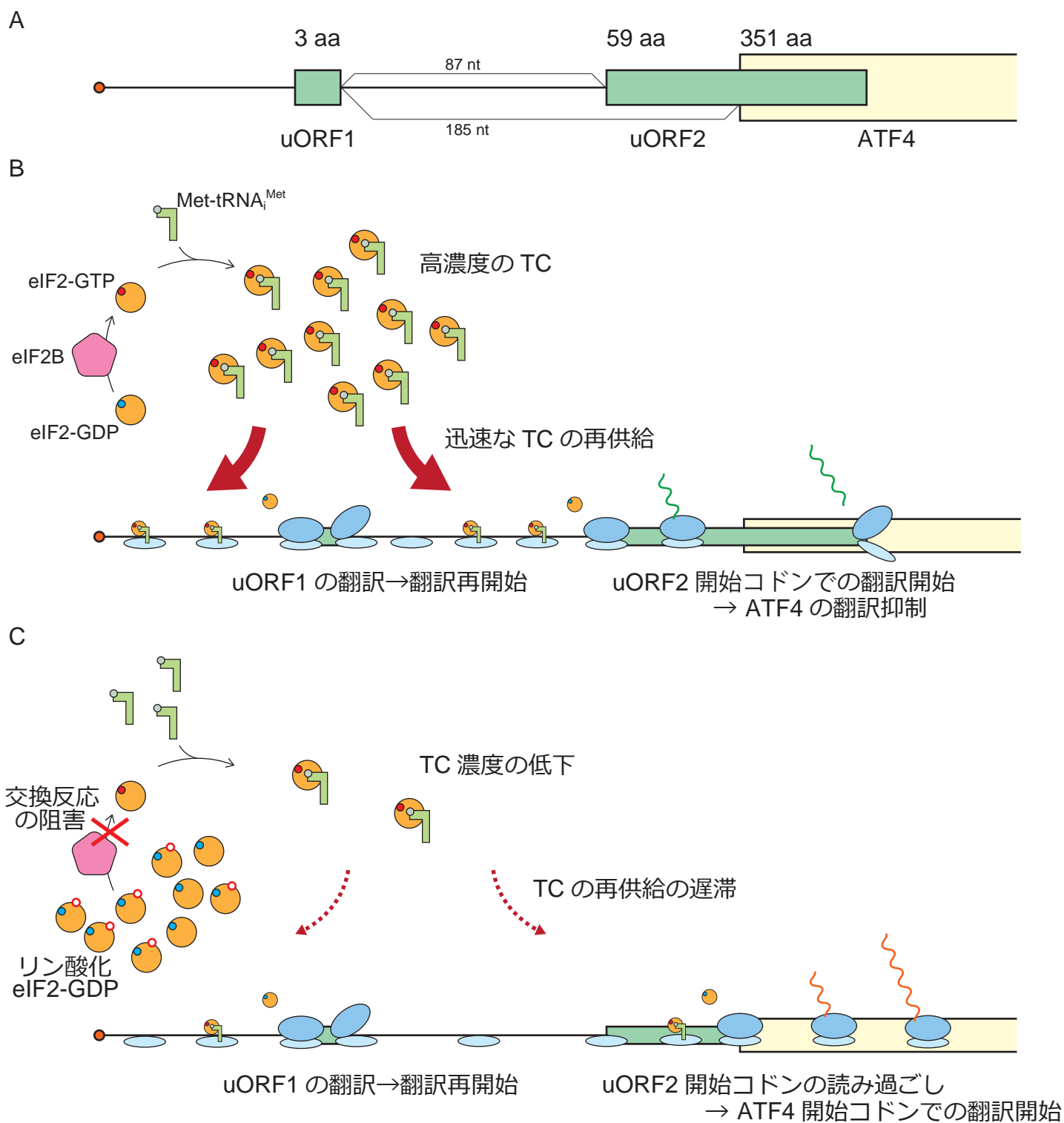


図 1-3. uORF による翻訳開始の制御。

(A) uORF を有する mRNA の例として、ヒト ATF4 mRNA を模式的に示す。

(B) 非ストレス条件下での ATF4 mRNA の翻訳。

uORF1 は翻訳再開始を可能にするシグナルを持っており、  
 uORF1 の翻訳終結後もリボソーム 40S サブユニットは mRNA から解離しない。  
 そして直ちに TC が再供給され、uORF2 で翻訳が開始される。  
 uORF2 の翻訳終結後はリボソームが解離するため、ATF4 の翻訳は抑制されている。

(C) ストレス条件下での mRNA の翻訳。

eIF2 のリン酸化によって eIF2B が阻害され、細胞内の TC 濃度が低下している。  
 そのため uORF1 の翻訳終結後の TC の供給が遅れ、uORF2 の開始コドンを読み過ぎてしまう。  
 その後、ATF4 の開始コドンへの到着までに TC が供給され、ATF4 が翻訳される。

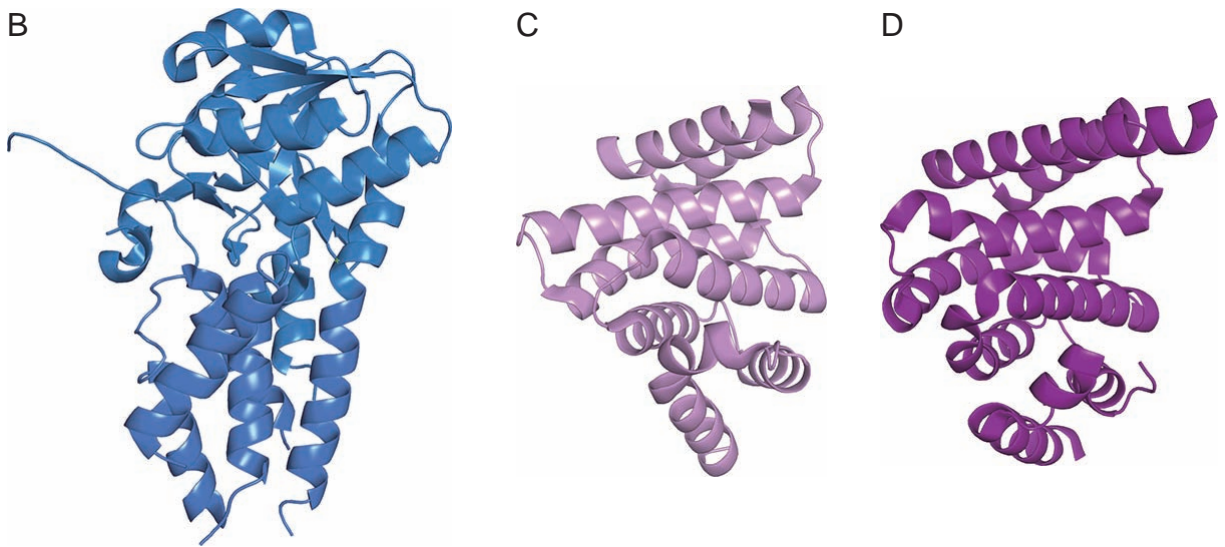
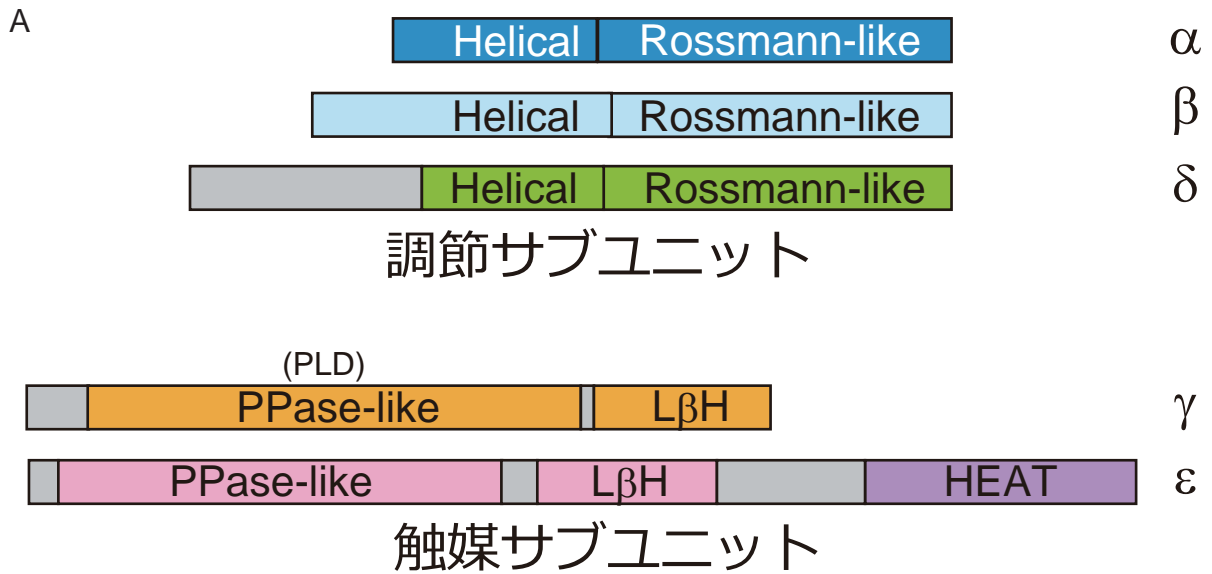
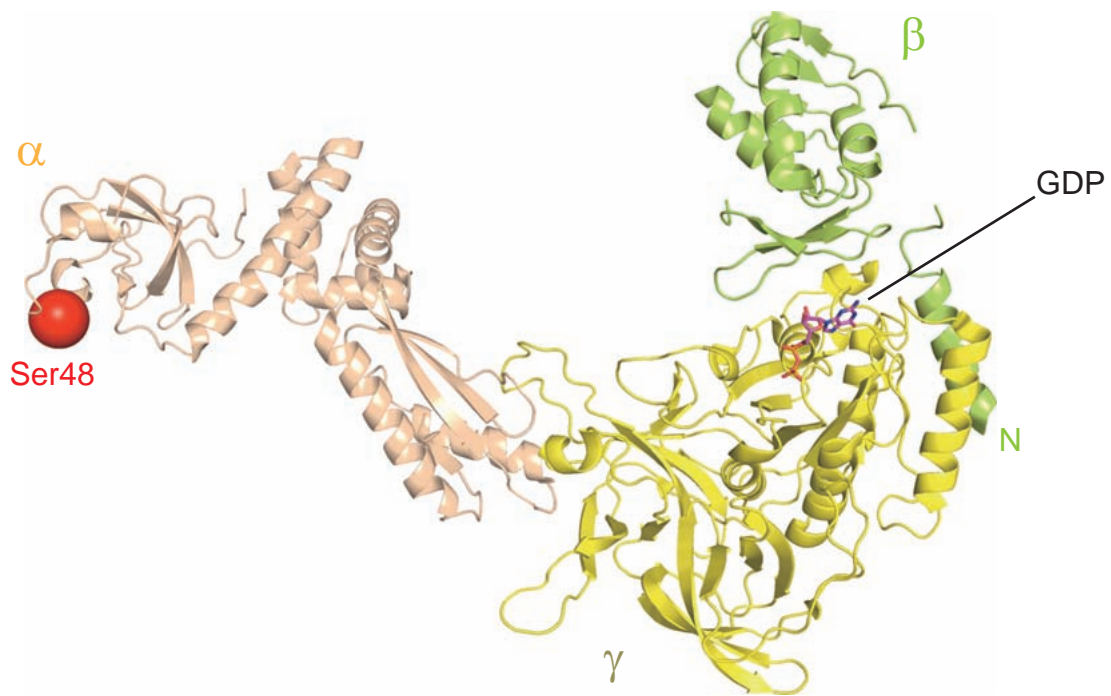


図 1-4. eIF2B 各サブユニットのドメイン構成と既知の立体構造 .

(A) eIF2B 各サブユニットのドメイン構成

(B-D) 既知の eIF2B の部分構造 . ヒト  $\alpha$  サブユニット (PDBID: 3ECS) (B),  
出芽酵母  $\varepsilon$  サブユニット HEAT ドメイン (PDBID: 1PAQ) (C),  
ヒト  $\varepsilon$  サブユニット HEAT ドメイン (PDBID: 3JUI) (D).

A



B

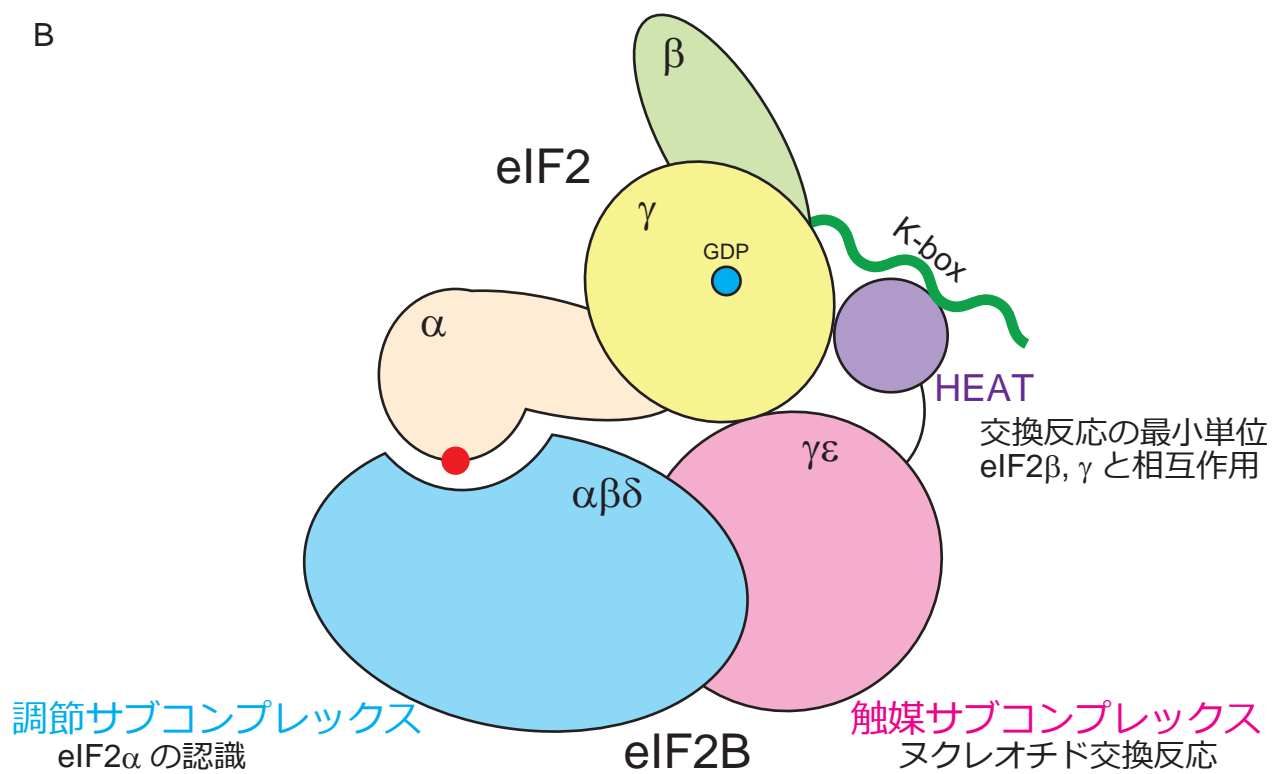


図 1-5. eIF2B と eIF2 の相互作用 .

(A) eIF2 の古細菌ホモログ aIF2 の構造 .

*Sulfolobus solfataricus* aIF2 の構造 . PDBID: 2QMU, 3CW2 から作成 .

aIF2 $\alpha$  Ser48 が eIF2 $\alpha$  Ser51 に相当する .

(B) eIF2B と eIF2 の相互作用のモデル .

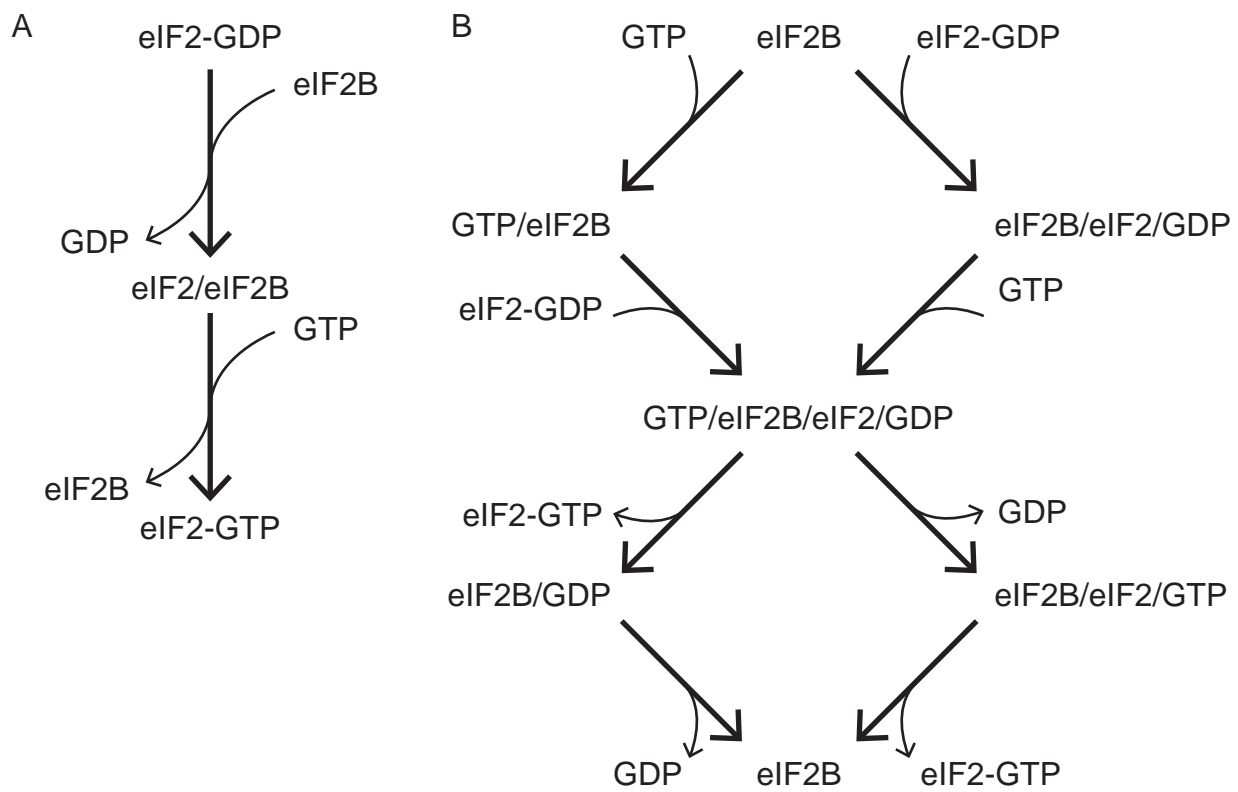


図 1-6. 提唱されているヌクレオチド交換反応機構の 2 つのモデル。

(A) ピンポン機構。

GDP 結合型 eIF2 は eIF2B への結合によって GDP を解離し，  
GTP の結合によって GTP 結合型 eIF2 となって eIF2B から解離する。

(B) 逐次機構。

eIF2B は GDP 結合型 eIF2 と GTP を共に結合して四者複合体を形成した後，  
ヌクレオチド交換反応を触媒し GTP 結合型 eIF2 と GDP を放出する。

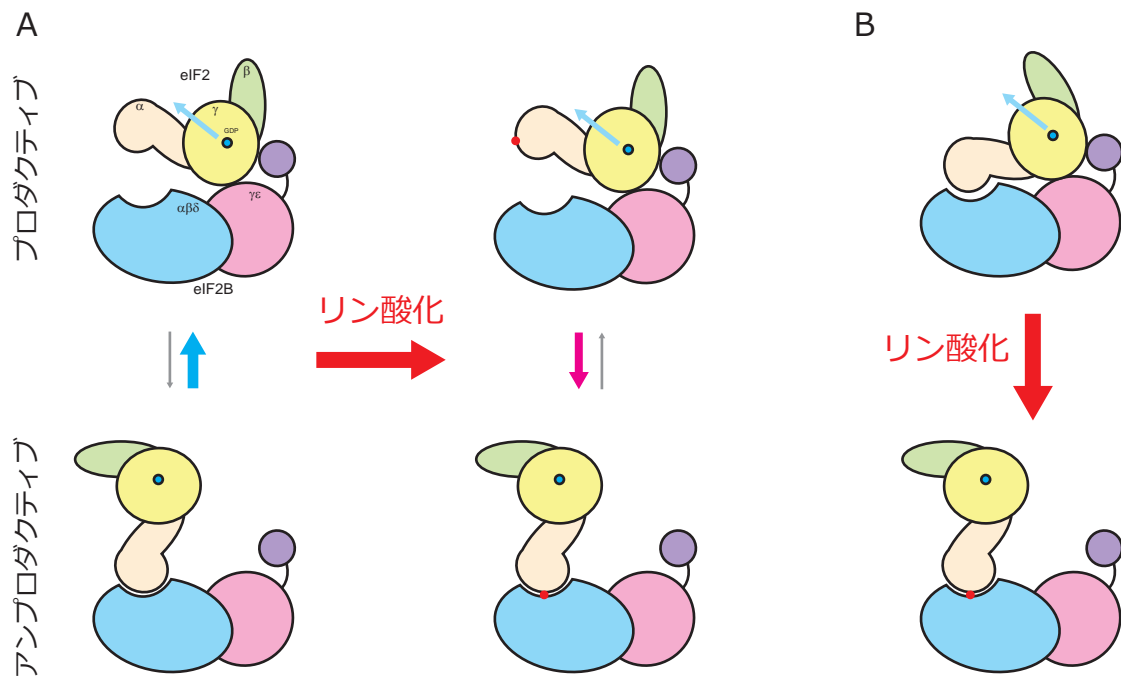


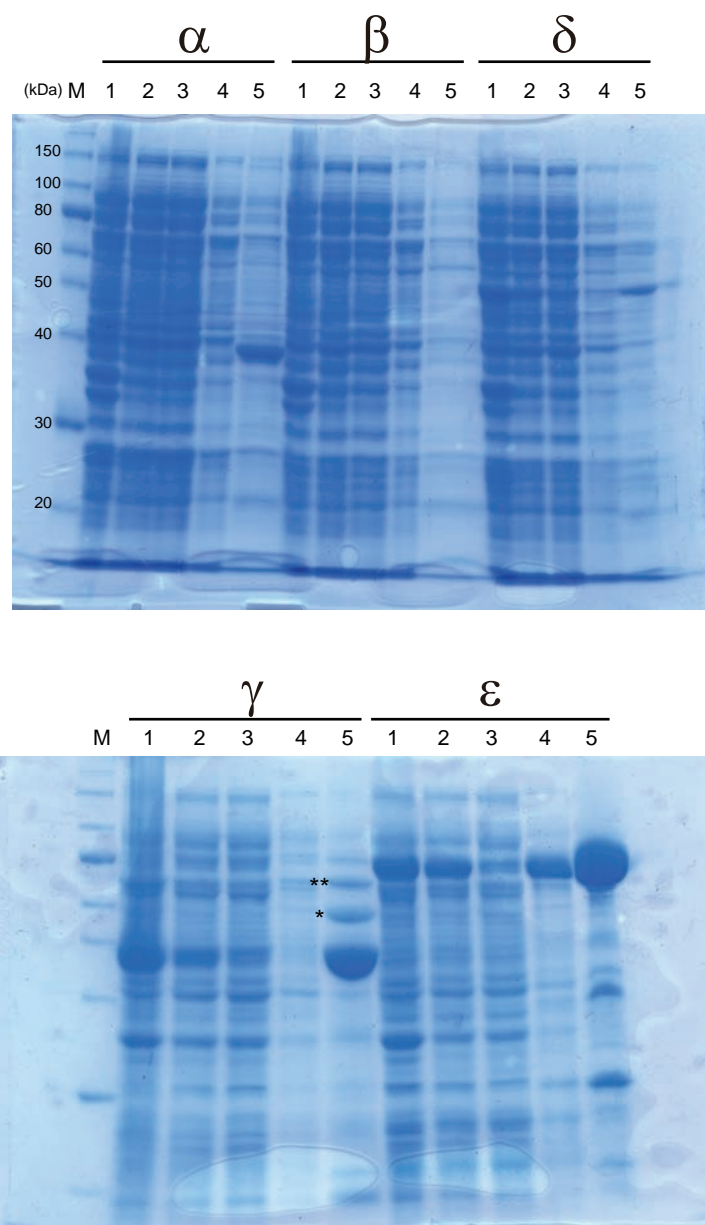
図 1-7. eIF2 のリン酸化による eIF2B 制御機構についての仮説 .

(A) eIF2B と eIF2 の相互作用には 2 つの様式が存在し ,

非リン酸化 eIF2 に対してはヌクレオチド交換反応に適した様式での結合が安定だが ,  
eIF2 のリン酸化によって交換反応に適さない様式での結合が安定化される .

(B) 非リン酸化 eIF2 は交換反応に適した様式での結合を行うが ,

eIF2 のリン酸化によって交換反応に適さない様式での結合が誘導される .



M: 分子量マーカー  
 1: 総画分  
 2: 上清画分  
 3: 素通り画分  
 4: + 20 mM imidazole  
 5: + 400 mM imidazole

図 2-1. eIF2B 各サブユニットの発現の検討 .

各サブユニット単独の発現 . Ni-Sepharose による精製 .

GroEL と推定されるバンドの左側を \* で , DnaK と推定されるバンドの左側を \*\* で示した .

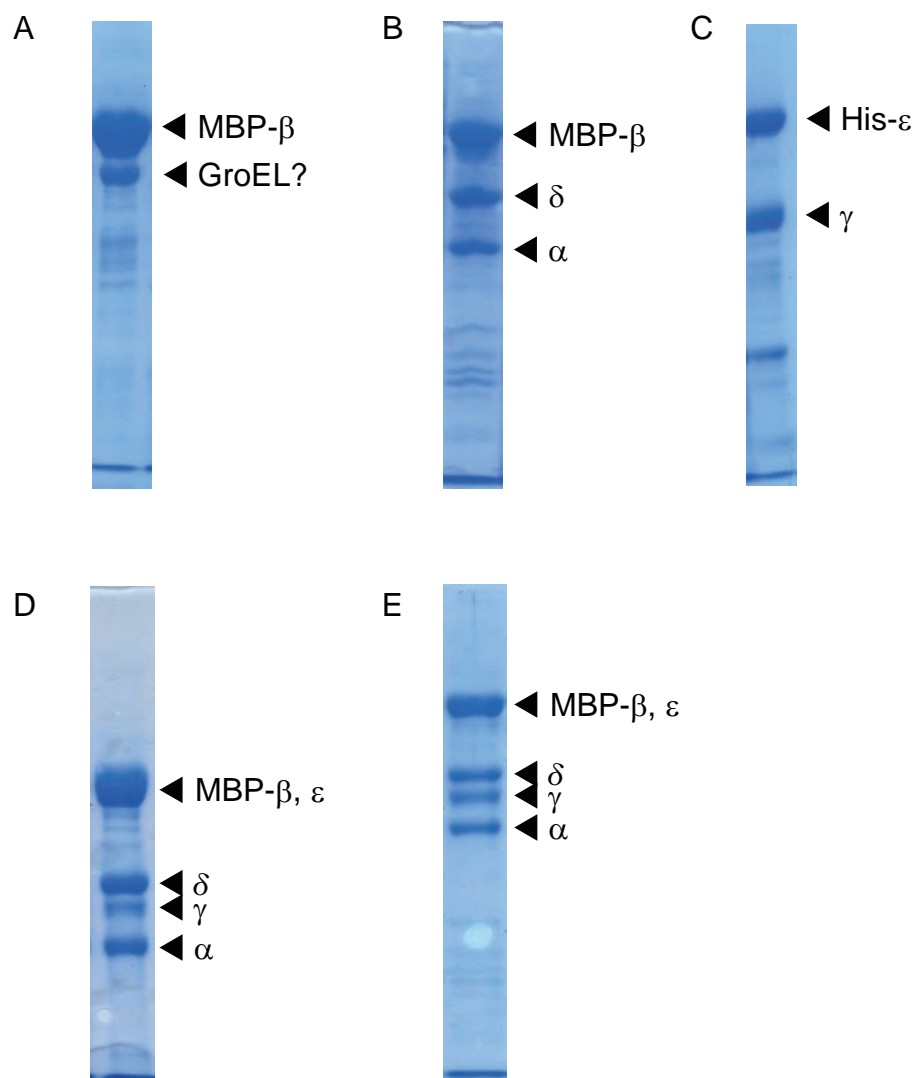
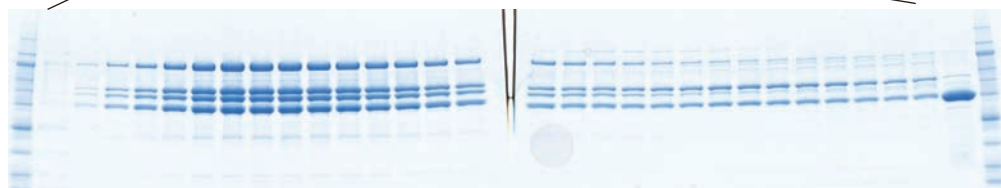
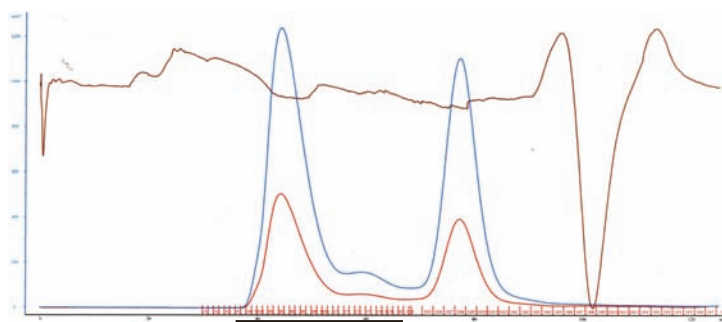
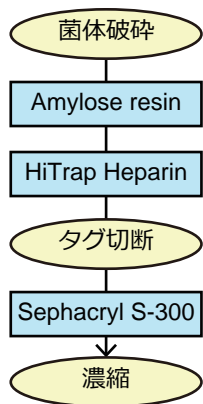


図 2-2. タグ付加・共発現による eIF2B 再構成法の検討 .

- (A) MBP タグを付加した  $\beta$  サブユニット . Amylose resin による精製 .
- (B)  $\alpha$  サブユニット ,  $\beta$  サブユニット ,  $\delta$  サブユニットの共発現 . Amylose resin による精製 .
- (C)  $\gamma$  サブユニット ,  $\varepsilon$  サブユニットの共発現 . Ni-Sepharose による精製 .
- (D)  $\alpha$  サブユニット ,  $\beta$  サブユニット ,  $\delta$  サブユニットを共発現した菌体と  
 $\gamma$  サブユニット ,  $\varepsilon$  サブユニットを共発現した菌体の混合 . Amylose resin による精製 .
- (E) 5 サブユニットすべての共発現 . Amylose resin による精製 .



A



B

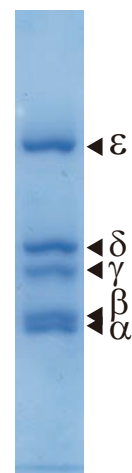


図 2-3. eIF2B の大量調製 .

(A) eIF2B 大量調製の流れと

Sephacryl S-300 による精製時のクロマトグラム , SDS-PAGE. 10–20% 濃度勾配ゲル .

(B) 結晶化に用いた試料の SDS-PAGE. 10% ゲル .

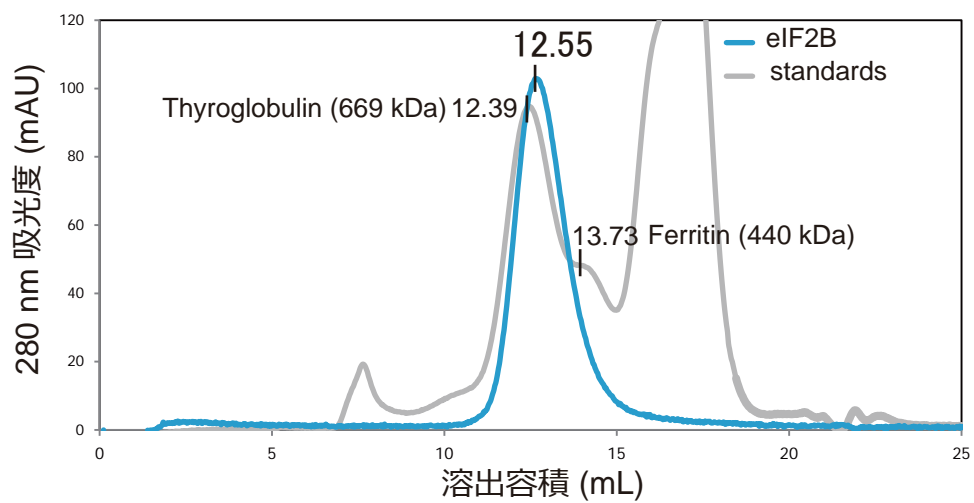


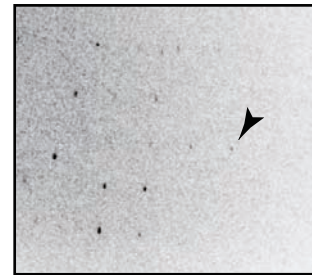
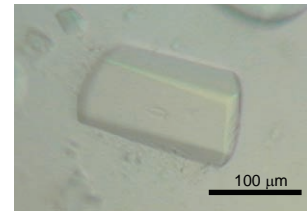
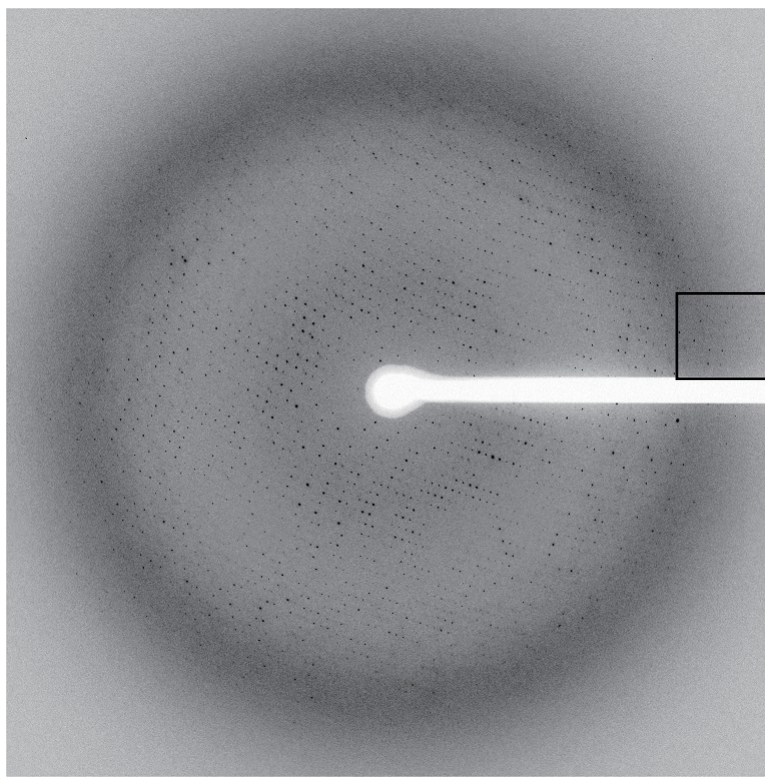
図 2-4. Superose 6 による eIF2B の分子量の分析 .

eIF2B 添加時のクロマトグラムを水色で , 標準タンパク質添加時を灰色で示す .

eIF2B は 12.55 mL で溶出したのに対し ,

サイログロブリンは 12.39 mL , フェリチンは 13.73 mL でそれぞれ溶出した .

A



B

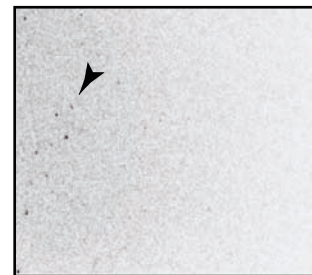
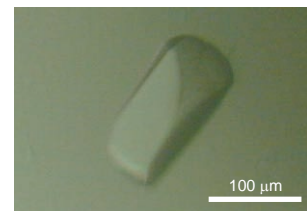
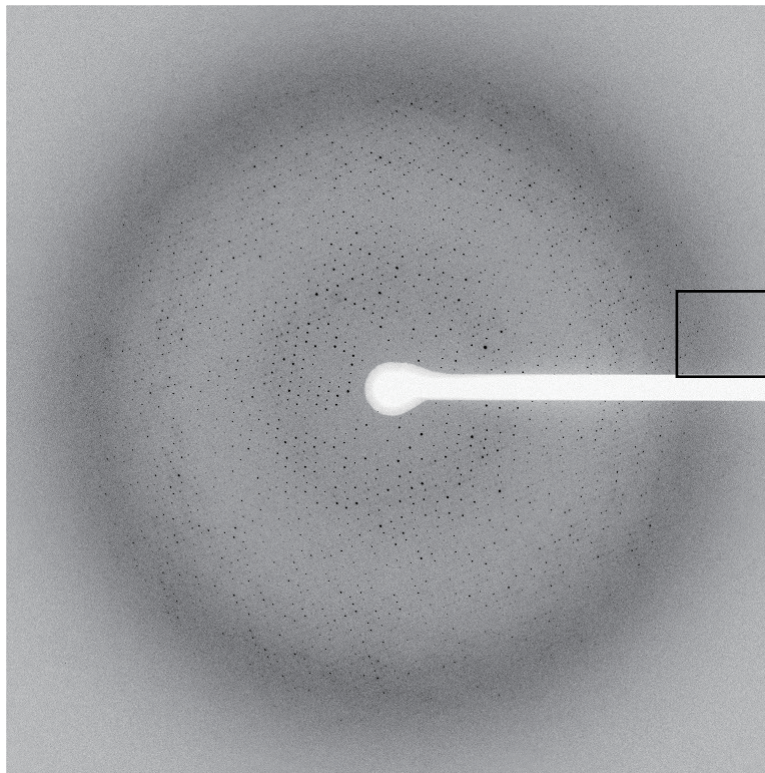


図 2-5. eIF2B 結晶とその X 線回折像。

(A) ネイティブ体結晶と回折像。矢じりで示された回折点が  $3.14 \text{ \AA}$  分解能に対応する。

(B) SeMet 置換体結晶と回折像。矢じりで示された回折点が  $3.38 \text{ \AA}$  分解能に対応する。



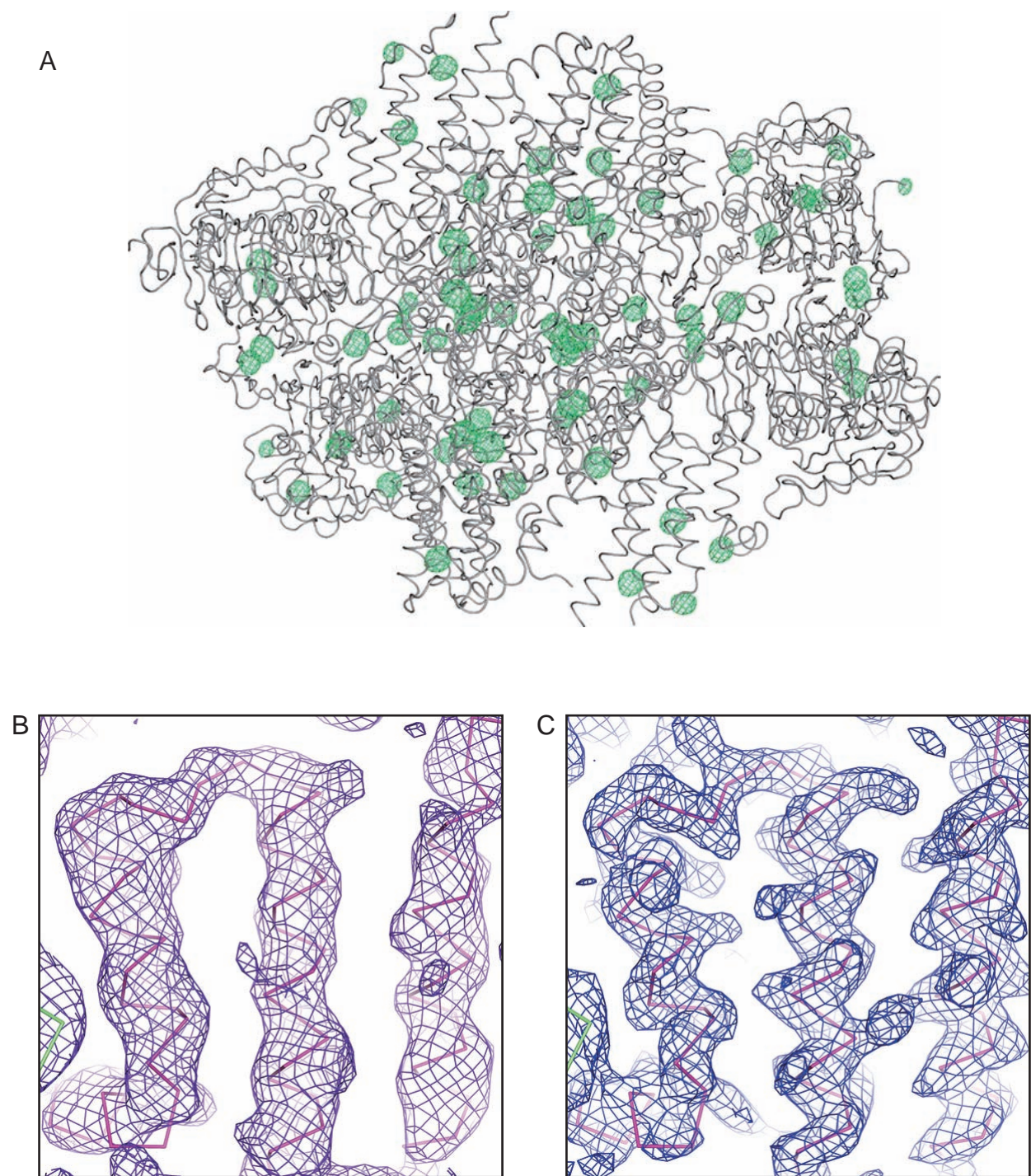


図 2-6. eIF2B の電子密度図 .

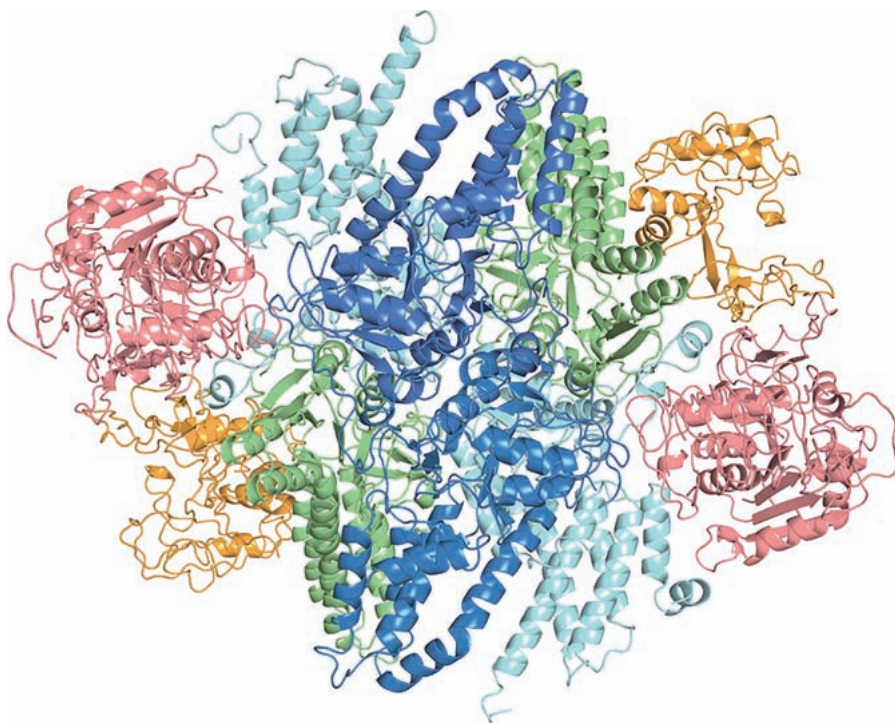
(A) セレノメチオニン置換体結晶のピーク波長における異常分散差フーリエマップ (5.0 $\sigma$  レベル) .

$D_o(=|F_o(+)| - |F_o(-)|)$  と SAD による位相計算の結果得られた  $\varphi_o$  を用いて計算した .

(B) 溶媒平滑化後の位相を用いて計算されたセレノメチオニン置換体の電子密度マップ (1.0 $\sigma$  レベル) .

(C) 構造精密化最終モデルにおけるネイティブ体の  $2|F_o| - |F_c|$  マップ (1.0 $\sigma$  レベル) .

A



B

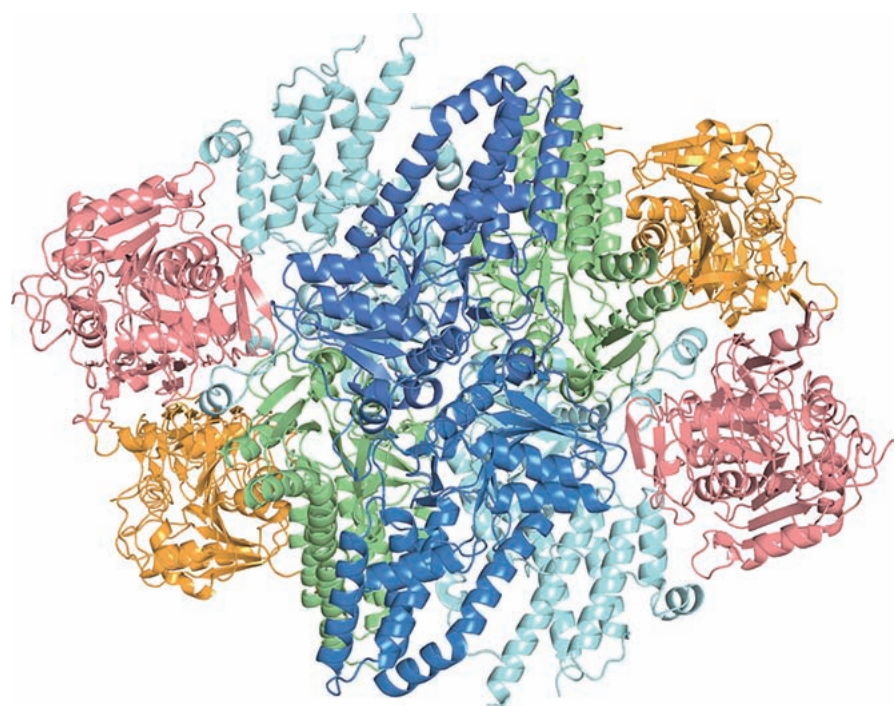
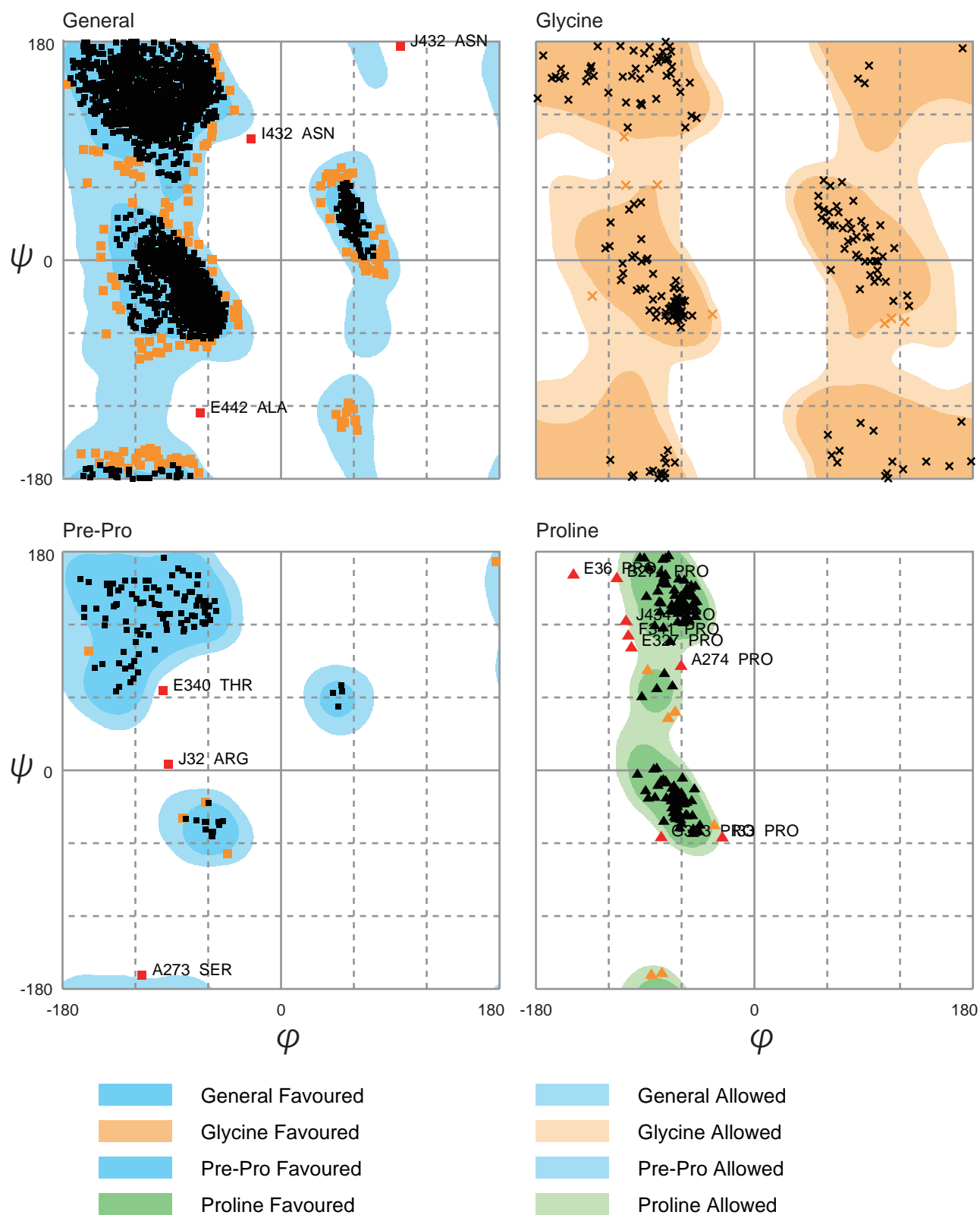


図 2-7. eIF2B 分子モデルの構築 .  
(A) Buccaneer によって自動的に構築されたモデル .  
(B) 構造精密化最終段階のモデル .





Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 3415 (94.5%)  
 Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 183 (5.1%)  
 Number of residues in outlier region : 14 (0.4%)

図 2-8. eIF2B 構造の Ramachandran plot.  
 RAMPAGE を使用して計算した .