

図 4-4. pBpa 標識 eIF2 α と eIF2B の光クロスリンク。

(A) 光クロスリンク実験の流れ。

eIF2B は α サブユニットに myc タグ, β サブユニットに HA タグ,
 δ サブユニットに strep タグがそれぞれ付加されており,
 クロスリンクによる各サブユニットの分子量の変化を
 ウェスタンブロットティングによって検出した。

(B) pBpa-eIF2 α と eIF2B α の間の光クロスリンク。抗 myc 抗体による検出。

(C) pBpa-eIF2 α と eIF2B β の間の光クロスリンク。抗 HA 抗体による検出。

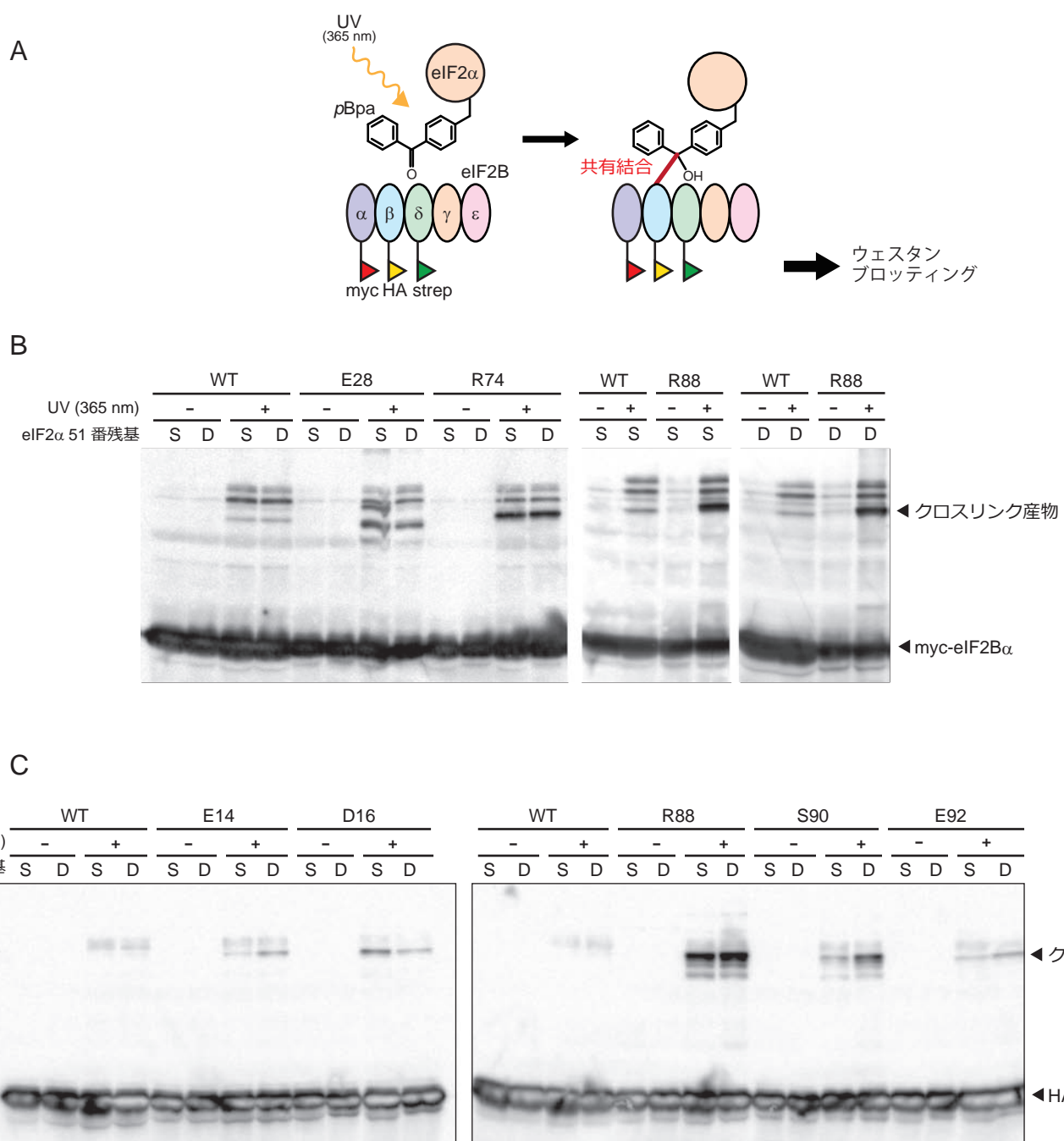


図 4-5. pBpa 標識 eIF2α と eIF2B の光クロスリンク。

(A) 光クロスリンク実験の流れ。

eIF2B は α サブユニットに myc タグ, β サブユニットに HA タグ, δ サブユニットに strep タグがそれぞれ付加されており, クロスリンクによる各サブユニットの分子量の変化を ウェスタンブロッティングによって検出した。

(B) pBpa-eIF2α と eIF2Bα の間の光クロスリンク。抗 myc 抗体による検出。

(C) pBpa-eIF2α と eIF2Bβ の間の光クロスリンク。抗 HA 抗体による検出。

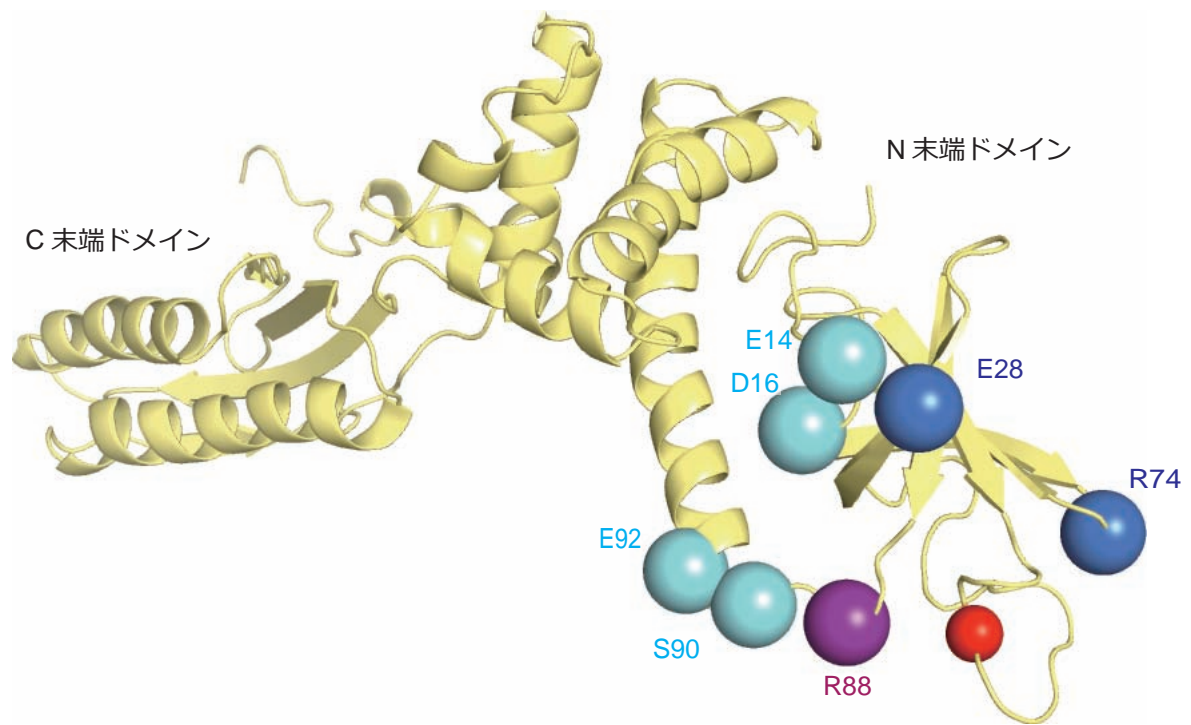


図 4-6. eIF2B と架橋される eIF2 α 上の *pBpa* 置換残基の構造上の位置 .
 ヒト eIF2 α の NMR 構造 (PDBID: 1Q8K) にマッピングを行った .
 eIF2B α サブユニットと架橋される置換残基の C α 原子の位置を青色で ,
 eIF2B β サブユニットと架橋されるの C α 原子の位置置換残基を水色で示されている .
 eIF2B α サブユニットと β サブユニットの双方と架橋される Arg88 が紫色で ,
 eIF2 キナーゼによるリン酸化残基 Ser51 が赤色で示されている .

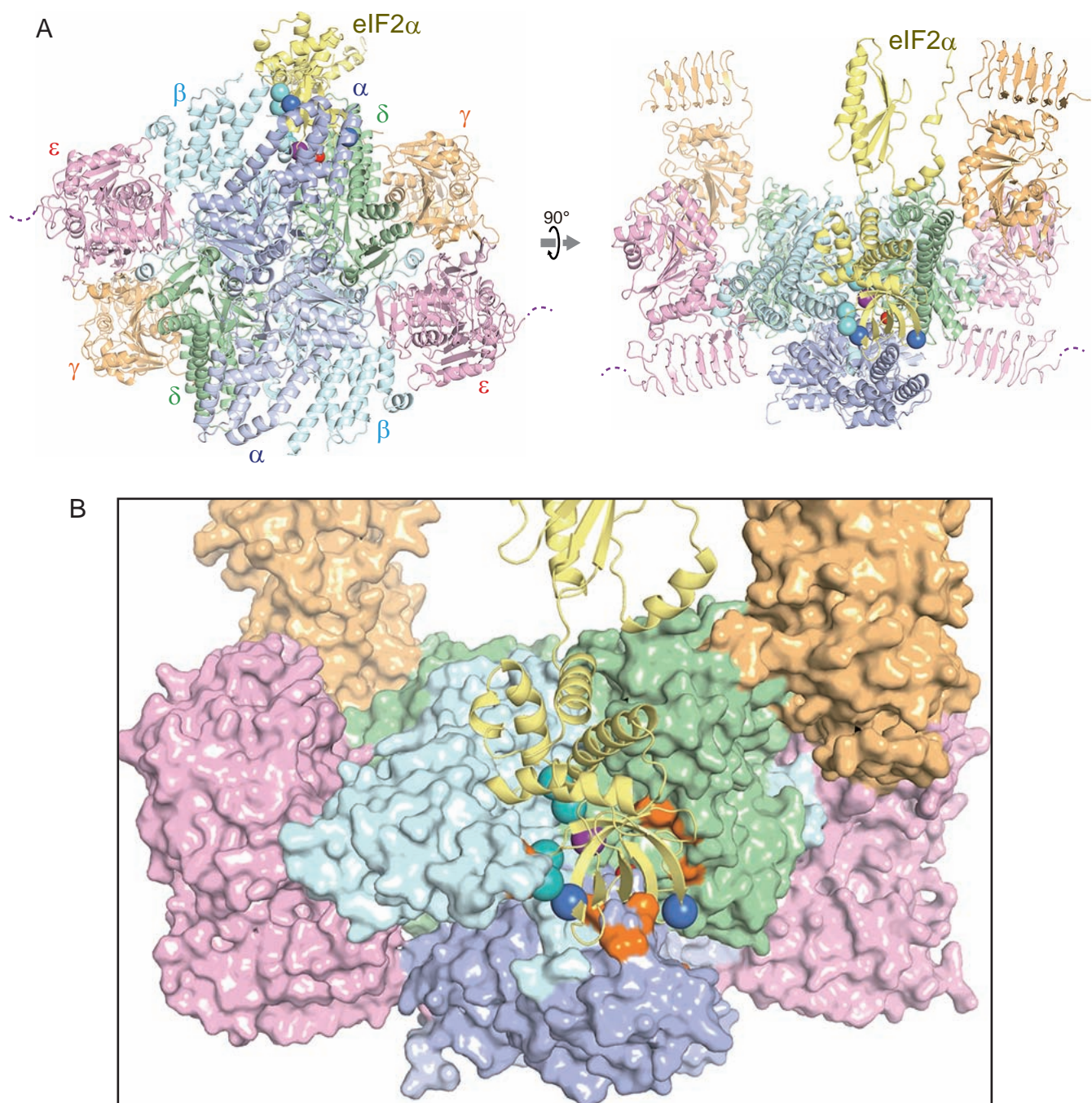


図 4-7. 光クロスリンク実験に基づく eIF2B と eIF2 α のドッキングモデル .

(A) eIF2 α 上の架橋残基が架橋される eIF2B のサブユニットの近傍に位置するように ,
手動でドッキングを行った . β , δ サブユニットの間から central cavity へ入るように
eIF2 α を配置することで , 良好なモデルが得られた .

(B) 相互作用部位の拡大図 .

eIF2B 上の架橋残基の位置は橙色で ,

eIF2 α 上の架橋残基の位置は図 3-17 と同様の配色でそれぞれ示されている .

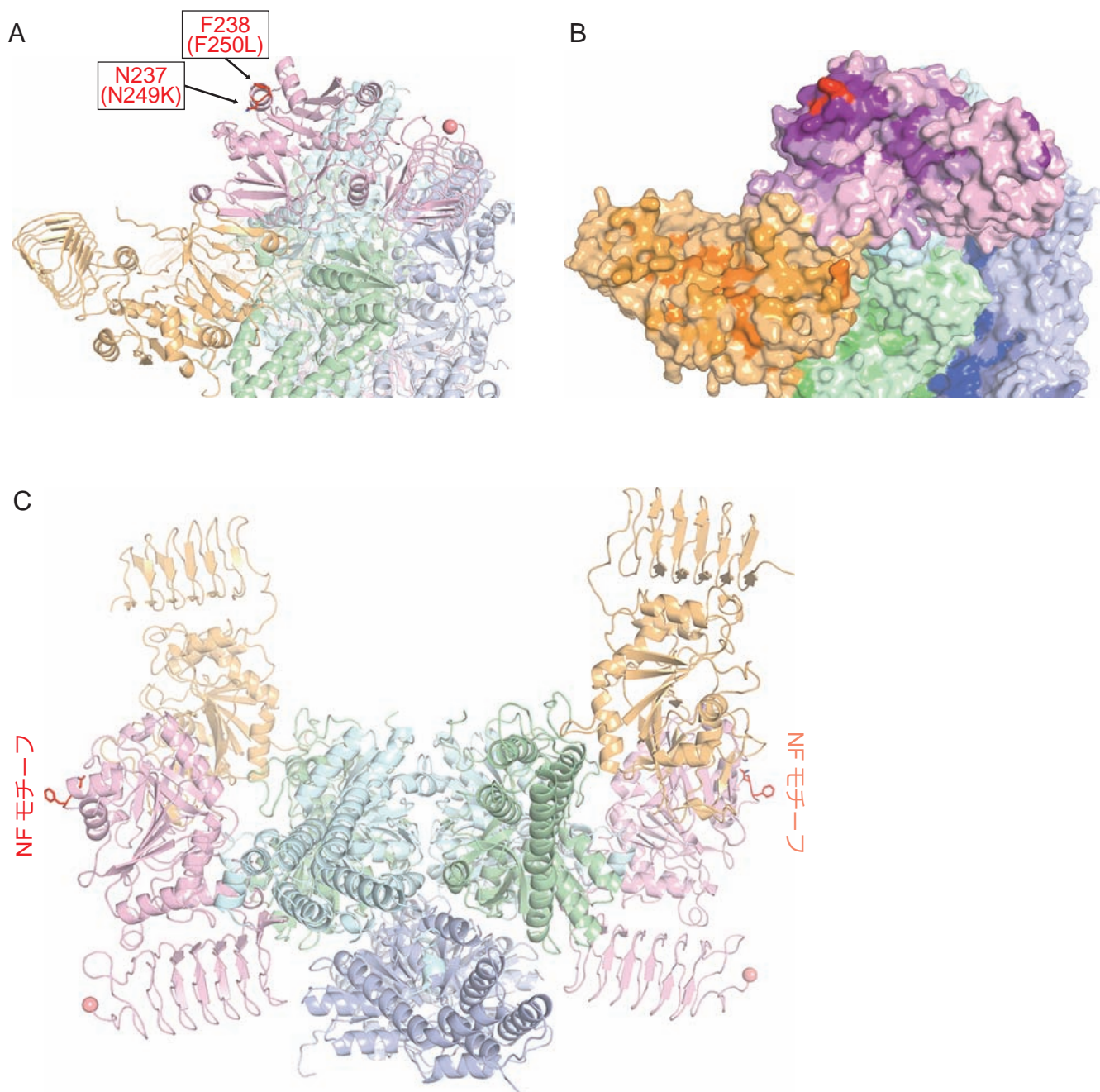


図 5-1. NF モチーフの位置 .

(A) 触媒サブコンプレックス遠位面に存在する NF モチーフ .

NF モチーフを構成する ϵ Asn237, Phe238 が赤色で示されている .

括弧内は出芽酵母においてヌクレオチド交換活性を著しく低下させる NF モチーフの変異 .

ϵ サブユニット L β H ドメインの C 末端が球で示されており ,

実際には , ここからさらに HEAT ドメインが伸びている .

(B) 保存性プロット . NF モチーフ周辺は高度に保存されている .

(C) NF モチーフと central cavity の位置関係 .

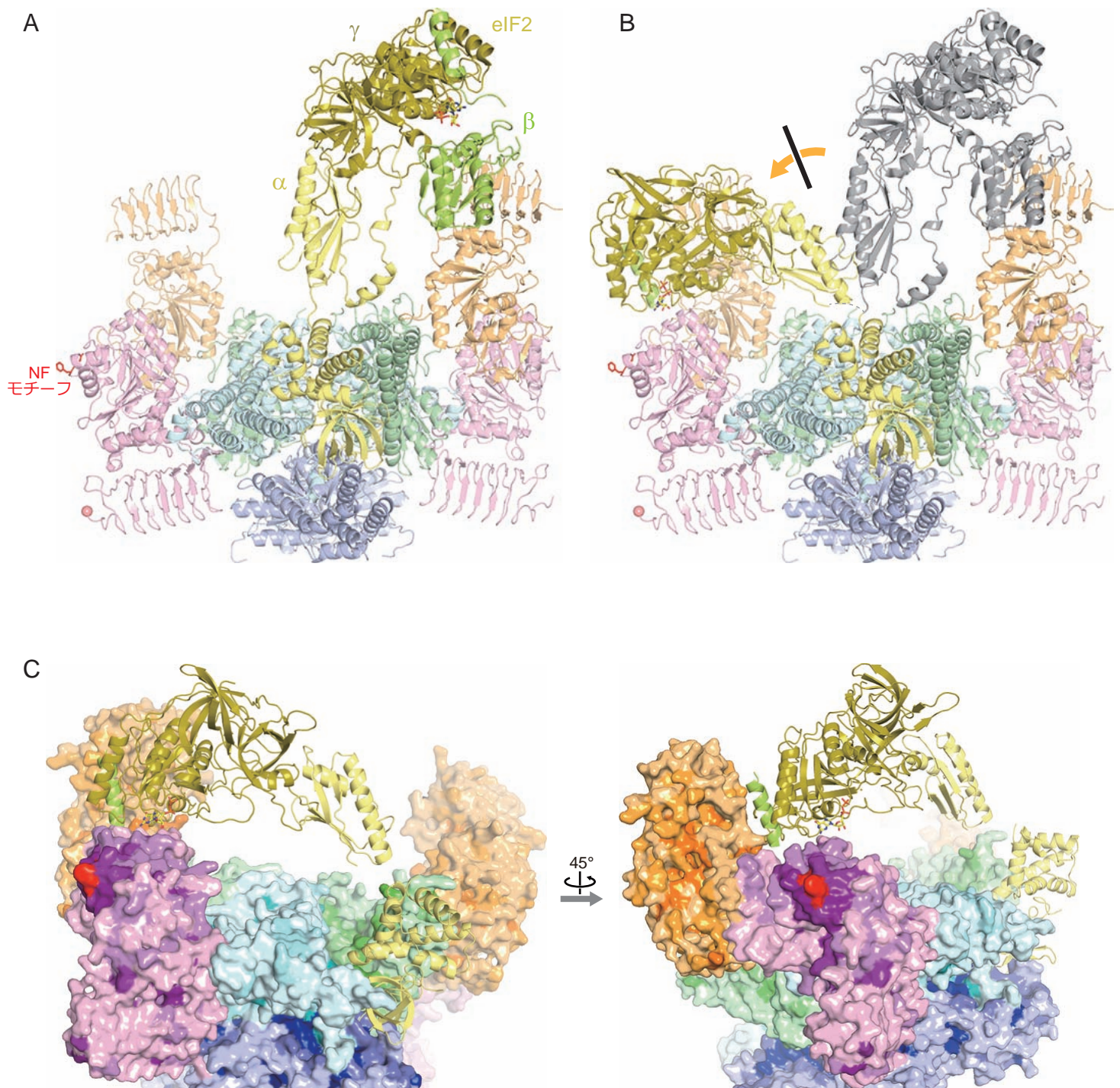


図 5-2. eIF2B-eIF2 のドッキングモデル .

(A) 図 3-18 の eIF2 α に古細菌ホモログ aIF2 の構造 (PDBID: 2QMU) を重ね合わせた .

(B) eIF2 α サブユニットのドメイン間部分を中心に回転させ ,

ε サブユニット近傍に a/eIF2 γ サブユニットを配置した .

この配置では a/eIF2 β サブユニット C 末端ドメインが ε サブユニットと衝突するため ,
描かれていない .

(C) eIF2B 側を保存性プロットで示した .

eIF2 γ サブユニットは NF モチーフ近傍に配置可能だが ,

遠位面の高度に保存された領域までは到達していない .

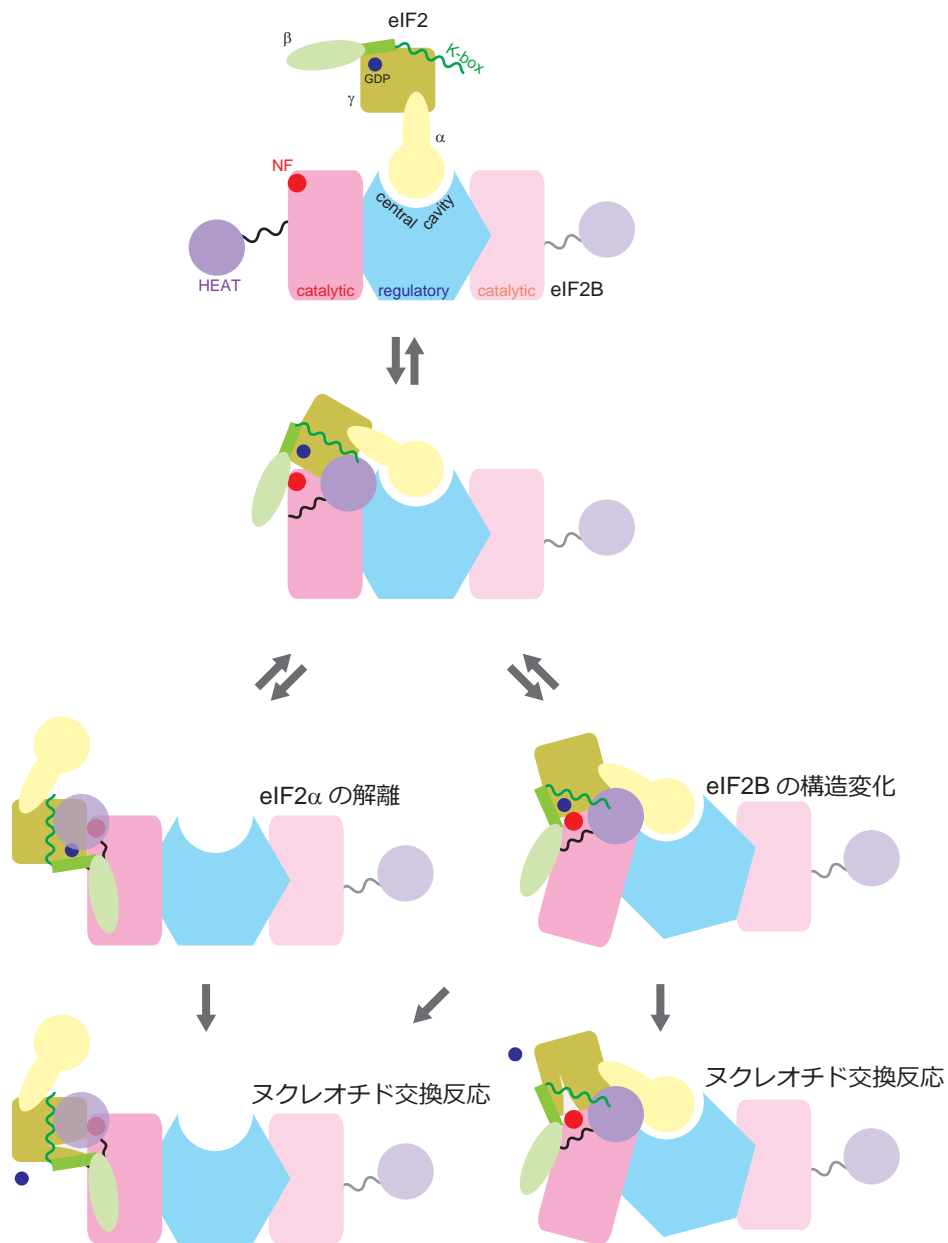


図 5-3. eIF2B-eIF2 間相互作用のモデル .

central cavity と eIF2 α サブユニットの相互作用によるアンプロダクティブな結合は , 触媒サブコンプレックスと eIF2 β , γ サブユニットの相互作用によって プロダクティブな結合へと移行する . この際に , eIF2 α サブユニットの central cavity からの解離 , もしくは eIF2B の構造の変化が起こると考えられる . その後 , HEAT ドメインと NF モチーフによってヌクレオチド交換反応が行われる .

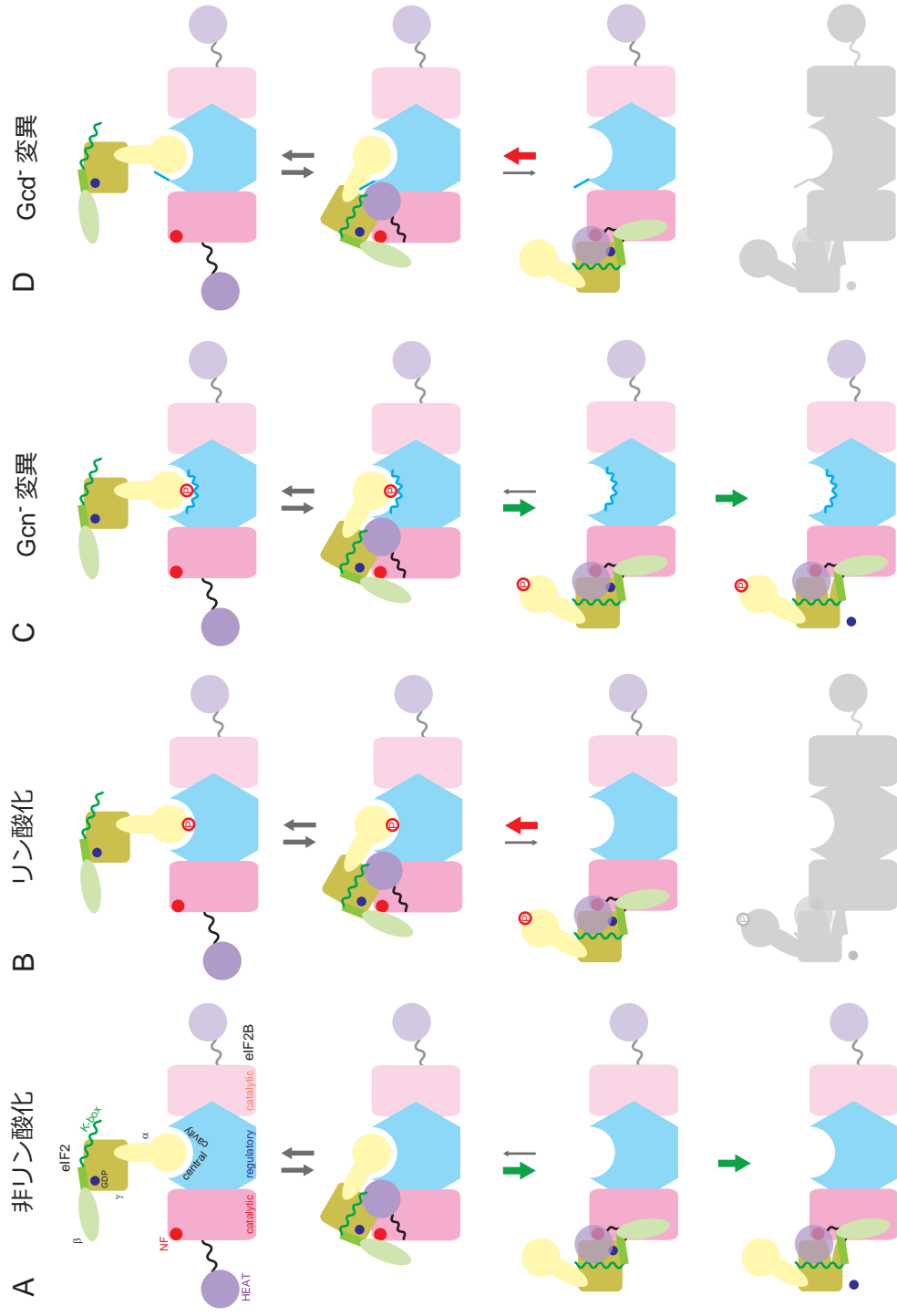


図 5-4. eIF2B-eIF2 間相互作用のモデル (2).

簡略化のため、eIF2 α 解離モデルのみを示す。

eIF2 α サブユニットのリン酸化によって central cavity へのアフィニティが上昇し、

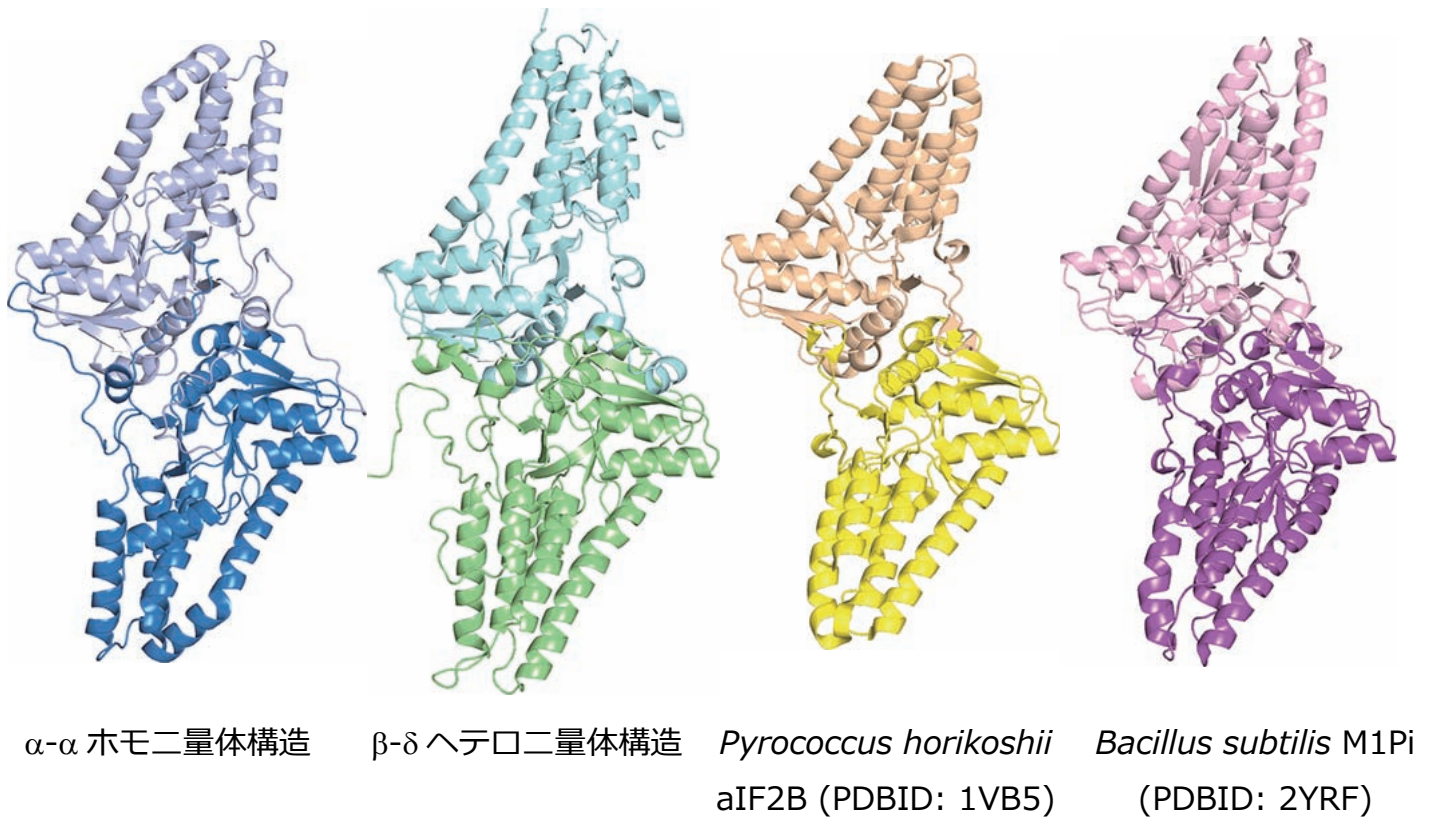
アンプロダクティブな相互作用への移行が起こりやすくなり交換反応が阻害される (B).

Gcn⁻ 変異は central cavity での相互作用を不安定化し、プロダクティブな相互作用への移行が起こりやすくなる (C).

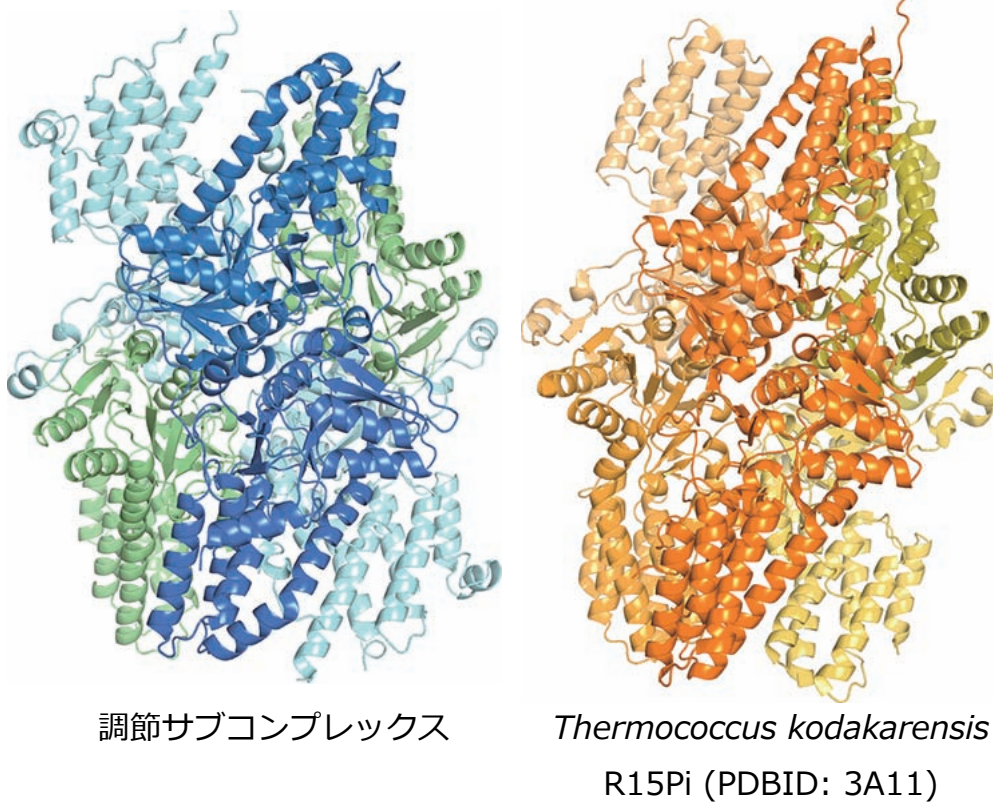
Gcd⁻ 変異がどのようにして eIF2B の活性を低下させるのかははっきりしないが、

central cavity での相互作用を安定化するか、プロダクティブな相互作用への移行を阻害すると考えられる (D).

A



B



C

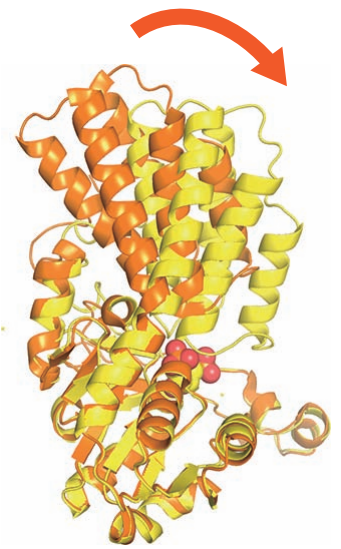


図 5-5. eIF2B 調節サブユニットと類似構造の比較。

(A) eIF2B 調節サブユニット二量体構造と類似構造の比較。

(B) eIF2B 調節サブコンプレックスと R15Pi ホモ六量体構造の比較。

(C) 基質の結合による R15Pi の構造変化。

基質なしの構造 (橙 :3A11) と基質が結合した構造 (黄 :3VM6) の C 末端ドメインによる重ね合わせ

表 2. eIF2B の X 線回折データ測定と構造精密化の統計値.

	Native	SeMet
Data collection		
Beam line	SPring-8 BL41XU	SPring-8 BL41XU
Wave length (Å)	1.0000	0.9792
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions (Å)	$a = 144.5, b = 209.2, c = 223.5$	$a = 144.6, b = 209.8, c = 223.8$
Resolution (Å)	44.23–3.14 (3.31–3.14)	44.25–3.38 (3.57–3.38)
Unique reflections	117777 (16637)	95155 (13575)
Completeness (%)	99.6 (97.5)	99.8 (98.9)
Redundancy	6.3 (6.3)	14.9 (14.7)
R_{sym}^a	0.121 (0.990)	0.137 (0.803)
$I/\sigma(I)$	15.0 (2.0)	20.7 (3.7)
Structure refinement		
Resolution (Å)	44.23–3.14	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}^b$	0.212 / 0.262	
RMSD values		
Bond lengths (Å)	0.007	
Bond angles (°)	1.44	
Ramachandran distribution		
favoured / allowed / disallowed (%)	94.5 / 5.1 / 0.4	
Number of protein atoms	28539	
Number of ions	45	
Number of water molecules	0	
Average B-factor (Å ²)	84.60	

The statistics for the highest-resolution shell are given in parentheses.

^a $R_{\text{sym}} = \sum_{hkl} \sum_i [|I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|] / \sum_{hkl} \sum_i [I_i(hkl)]$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of the i th measurement of hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average value of $I_i(hkl)$ for all i th measurements.

^b $R_{\text{work, free}} = \sum_{hkl} (||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|) / \sum_{hkl} (|F_{\text{obs}}|)$, where R_{work} and R_{free} are calculated using the working-set and test-set reflections (5% of the total reflections), respectively.

表 3-1. マッピングに用いた出芽酵母 **Gcd⁻/Gcn⁻** 変異残基と分裂酵母およびヒト **eIF2B** における対応残基の一覧.

	<i>Sce</i>	<i>Spo</i>	<i>Hsa</i>		<i>Sce</i>	<i>Spo</i>	<i>Hsa</i>
α				β			
Gcd ⁻	F13I	F26	Q13	Gcn ⁻	F82L	F73	T76
	A25V	A38	A25		L117S	M136	Q105
	A26V/T	A39	A26		I118T	Y137	Q106
	A29V	A42	T29		S119P	S138	E107
	S59F	G72	V59		D178Y	D197	E157
	S65F	S78	A64		G218R	G234	E193
	D71N	D84	E70		R254C	R270	R228
	H82Y	H95	E82		P291S	P306	P264
	R104K	R117	R103		V292A	V307	L265
	E199K	E212	E198		Y305C	Y320	F278
	A202T	V215	V201		P306L	P321	P279
	E203K	E216	E202		K329E	S346	E304
	V295F	V332	V296		I348V	L365	L323
	Δ 303-305	Δ 340-341	Δ 304-305		N357I	P374	A332
					S359G	S376	S334
Gcn ⁻	T41A	T54	T41	δ			
	E44K/V	E57	G44	Gcn ⁻	E377K	D248	E310
	F73L	F86	F72		L381Q	I252	L314
	N80D	S93	S80		F523I	Y392	S454
	F240I/L	F253	F239		I625F	I440	V497
	T291P	D327	T292		K627T	V442	L499
	S293R	S330	S294		T630S	C445	T502
β					A634D	L449	M506
Gcd ⁻	E164A	E183	E143		P636T	P451	P508
	I165A	L184	L144		P637L	S452	C509
	L214S	I230	V189		P641F	P456	P513
	A295V	C310	C268				
	I346T	V363	I321				
	N368K	T385	L343				

表 3-2. マッピングに用いたヒト VWM 変異残基と分裂酵母および出芽酵母 eIF2B における対応残基の一覧.

	<i>Hsa</i>	<i>Spo</i>	<i>Sce</i>		<i>Hsa</i>	<i>Spo</i>	<i>Sce</i>
α	V183F	V197	V184	δ	R209Q	R147	L276
	N208Y	N222	N209		A228V	D166	A295
	Y275C	V310	Y274		P243L	P181	P310
	P278R	P313	Q277		L269R	L207	L336
β					R357Q/W	R295	K425
	S171F	S211	S193		R364Q	R302	R432
	P196S	N237	N221		R374C	K312	E442
	G200A/V	G241	N225		A391D	L329	L459
	E213G	D255	E239		C465R	N403	N534
	T218I	S260	P244		R467W	G405	D536
	K273R	K315	K300		R483W	K426	N611
	P291S	P333	S318		Y489H	Y432	Y617
	V316D	I358	V341	ϵ	A16D	-	-
γ	G329V	G371	G354		R54P	Y29	T38
	G11V	F47	L49		F56V/C	F31	F40
	V46I	A83	A87		D62V	D37	V46
	G47E	G84	D88		L68S	L43	L52
	A87V	A129	G152		V73G	T48	V57
	Q136P	P176	N203		A74T	P49	P58
	R225Q	R263	A299		Y78S	Y53	Y62
	I229M	I267	D303		T79I	T54	T63
	H341Q	L345	F417		E81K	E56	E65
	I346T	V350	Q422		T91A	V66	V75
	S373L	S377	S449		L106F	I81	I90
	I375S	I379	L451		W111R	W86	W95
					R113C/H	L88	L97
					L127P	E102	E111
					R136C/H	R111	R120
					I156M	V131	L140
					T182M	T156	T165

表 3-2. マッピングに用いたヒト VWM 変異残基と分裂酵母および出芽酵母 eIF2B における対応残基の一覧. (続き)

	<i>Hsa</i>	<i>Spo</i>	<i>Sce</i>	
ϵ	R195C/H	R169	R178	
	E198K	T172	I180	
	S253Y	S227	T239	
	R269G/Q/L	I243	L257	
	R299H	R273	R284	
	H304P	Q278	Q289	
	V309L	I283	I294	
	C310F	S284	S295	
	D312G	D286	D297	
	R315G/C/H	S289	G300	
	V318I	V292	C302	
	P323S	P297	L308	
	C335R/S	F306	Y318	
	R339W/P/Q	R310	S322	
	Y343C	Y314	Y326	
	N376D	N347	N359	
	I385V	I356	I368	
	G386V	G357	G369	
	D387G	S358	E370	
	A403V	G374	G386	
	D415G	N386	S398	
	L425R	I396	L408	
	P427L	D398	D410	
	V430A	I401	I413	
	S447L	K418	T430	
	P454S	S425	L437	
	E487K	G456	D485	not visible
	Y495C	L464	E493	not visible
	P604S	I565	V596	not visible
	W628R	W583	W618	not visible
	I649T	L604	I639	not visible
	E650K	Q605	M640	not visible

表 4-1. 作製した eIF2B-*p*Bpa 置換体置換残基の一覧.

置換残基					
α	Q21	α	E101	β	V33
	Q28		E109		R40
	E32		K112		D52
	Q45		Q123		K67
	R49		R124		R84 crosslinked
	Q51		K157		E88
	K53		K163		Q91 crosslinked
	S56		S172		E92
	E57		R180		K95 crosslinked
	Q63 crosslinked		R203		N100
	N64		R251		T148
	K70		D259		T164
	E71		R264		V172
	S80		E268		S175
	Q87 crosslinked		N298		D179
	R92 crosslinked		R303		S185
	H95 crosslinked		K338		T189
	V97 crosslinked		L341		V193
					D197
					K223
					L370
					D384
					S389
					I392

表 4-1. 作製した eIF2B-*p*Bpa 置換体置換残基の一覧. (続き)

置換残基	
δ	R216
	L220
	D226
	E240
	K241
	R247 crosslinked
	D248 crosslinked
	R249
	Q255
	V256 crosslinked
	Q259
	E263
	D267
	N289
	E316
	E320
	E383
	M447
	E461
	F462

表 4-2. 作製した eIF2 α -pBpa 置換体置換残基の一覧.

置換残基	
R11	
E14	crosslink with β
D16	crosslink with β
Q25	
E28	crosslink with α
Y38	
E42	
K60	
R63	
V64	
E68	
R74	crosslink with α
E78	
K79	
R88	crosslink with α and β
S90	crosslink with β
E92	crosslink with β
K96	
E98	
N102	
K105	
H113	
K117	
T128	
Y141	
L148	
D152	
E156	
E159	
R175	