

学位論文題名

Study on the binding mechanism of eIF2 β with its partner proteins eIF5 and eIF2B ϵ (翻訳開始因子 eIF2 β とそのパートナータンパク質 eIF5 及び eIF2B ϵ 結合機構の研究)

学位論文内容の要旨

Translation is a process of transforming the genetic information from mRNA into the functional proteins on ribosome. Translational control is critical for gene regulation under conditions of nutrient deprivation and stress, development and differentiation, aging and disease in eukaryote. This process consists of three steps: initiation, elongation and termination. Most regulation of translation are exerted at the translation initiation step, which is the most complicated among those steps.

The eukaryotic translation initiation is performed by initiation factors (eIFs) associated with Met-tRNA_i^{Met}, mRNA and ribosome. The initiation factor eIF2 consisting of α -, β -, and γ -subunits plays a pivotal role to deliver Met-tRNA_i^{Met} to ribosomal small subunit in GTP-bound form with other initiation factors such as eIF1, eIF1A, eIF3, and eIF5 (multi-factor complex, MFC). When MFC binds to 40S small subunit, the GTP bound on the eIF2 is hydrolyzed into GDP, which is stimulated by eIF5. Upon formation of start codon-anticodon base pairing between Met-tRNA_i^{Met} and mRNA, eIF2 dissociates together with eIF5 as an eIF5-eIF2-GDP complex from ribosome small subunit. Then, the small subunit of ribosome binds to 60S to form the 80S ribosome, and the elongation of protein synthesis is started. The released eIF5-eIF2-GDP is inactive, eIF5 should be replaced by eIF2B (a complex of α -, β -, γ -, δ -, and ϵ -subunits) to form eIF2B-eIF2-GDP complex, and eIF2-GDP is exchanged into eIF2-GTP by eIF2B for further initiation cycle. Previous research showed that three lysine-rich segments (K-boxes) N terminal domain of eIF2 β (eIF2 β -NTD) interact with two aromatic/acidic regions called AA boxes in the C terminal domain of eIF5 (eIF5-CTD) and eIF2B ϵ (eIF2B ϵ -CTD) in the different stage of translation initiation. eIF5-CTD (PDB ID: 2FUL) and eIF2B ϵ -CTD (PDB ID: 1PAQ) have very similar secondary structures and topologies but with different orientation in tertiary structure and the surfaces of AA-boxes region in eIF5-CTD and eIF2B ϵ -CTD are

also different. However, it still remains elucidated how eIF2 β interacts with different target proteins eIF5 and eIF2Be with the same binding site.

To address this problem, we studied the binding mechanism of eIF2 β -NTD with eIF5-CTD and eIF2Be-CTD by analyzing conformational changes and the binding affinity of those proteins.

We have reconstructed the complexes of (eIF5-CTD)-(eIF2 β -NTD) and (eIF2Be-CTD)-(eIF2 β -NTD) by using recombinant purified eIF2 β -NTD, eIF5-CTD and eIF2Be-CTD from *Saccharomyces cerevisiae*. The interaction of eIF2 β -NTD with eIF5-CTD and eIF2Be-CTD is studied by circular dichroism spectroscopy (CD) and small angle X-ray scattering (SAXS). The results showed that eIF2 β -NTD is unstructured in isolated state and the conformation was changed when bound to its partner proteins (eIF5-CTD or eIF2Be-CTD), whereas the structures of eIF5-CTD and eIF2Be-CTD were similar in both isolated and complex states. As an intrinsically disordered domain, the high flexibility of eIF2 β -NTD is an advantage for structural changes according to further recognizing and binding with different partner proteins. We propose the binding manner between eIF2 β and both eIF5 and eIF2Be.

Furthermore, when eIF2Be-CTD has the same concentration to (eIF5-CTD)-(eIF2 β -NTD), eIF2Be-CTD replaces eIF5-CTD in (eIF5-CTD)-(eIF2 β -NTD) complex for binding to eIF2 β -NTD, whereas eIF5-CTD cannot replace eIF2Be-CTD in the (eIF2Be-CTD)-eIF2 β -NTD complex according to result of gel filtration binding assay. This indicates eIF2B is able to replace eIF5 in eIF5-(eIF2-GDP) complex and exchanges GDP to GTP bound on eIF2 for the further round translation initiation. In this study, it is also shown that more eIF2Be-CTD is released from (eIF2Be-CTD)-(eIF2 β -NTD) complex with the increase of eIF5-CTD concentration, when eIF5-CTD concentration is higher than that of eIF2Be-CTD. So eIF5-CTD may antagonize the binding of eIF2Be-CTD for eIF2 β -NTD by ratio of eIF5-CTD/eIF2Be-CTD to regulate the GEF activity of eIF2B possibly.

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	姚	関
副 査	特任教授	田 中	勲
副 査	教 授	小布施 力 史	
副 査	准教授	田 中 良 和	

学 位 論 文 題 名

Study on the binding mechanism of eIF2 β with its partner proteins eIF5 and eIF2B ϵ

(翻訳開始因子 eIF2 β とそのパートナータンパク質 eIF5 及び eIF2B ϵ 結合機構の研究)

博士學位論文審査等の結果について (報告)

翻訳反応は、リボソームが mRNA 上の遺伝情報から蛋白質を合成するプロセスであり、開始、伸長、終了段階の 3 段階からなる。真核生物の翻訳反応の制御は、栄養欠乏やストレス、発生や分化、老化や病気など状態での遺伝子調節に対してとても重要であり、ほとんど翻訳開始段階で行われている。

翻訳の 3 段階の中で最も複雑である真核生物の翻訳開始は、多くの翻訳開始因子(eIFs)が Met-tRNA_i^{Met} (開始 tRNA)、mRNA、リボソームと協調的に進行する。そのうち、eIF2 は、 α 、 β 、 γ サブユニットから構成され、他の翻訳開始因子 eIF1、eIF1A、eIF3、eIF5 と結合した MFC (multi-factor complex) を形成し、GTP 依存的に開始 tRNA を 40S サブユニットに運搬する中心的な役割を果たす。MFC が 40S サブユニットと結合してから、GAP (GTPase activating protein) である eIF5 が eIF2 に結合している GTP の加水分解を刺激し、開始 tRNA と mRNA の間で開始 codon-anticodon 塩基対が形成される際、eIF2 は eIF5-eIF2-GDP 複合体としてリボソーム 40S サブユニットから解離する。その後、リボソームの 40S が 60S サブユニットに結合し、80S リボソームが形成され、タンパク質合成の伸長段階が開始される。解離された eIF2-GDP は不活性型であり、翻訳反応に再利用されるには、GEF (guanine nucleotide exchange factor) である eIF2B (サブユニット α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ の複合体) によって eIF2-GTP へと変換す

る必要がある。そのときに、eIF2BがeIF5-eIF2-GDP複合体のeIF5を置換して、eIF2B-eIF2-GDP複合体を形成し、eIF2-GDPをeIF2-GTPへの変換反応を行う。これまでの研究により、eIF2βのN末端ドメイン(eIF2β-NTD)にK-box領域(3つのリジンリッチな領域)が、翻訳開始の異なる段階でeIF5のC末端ドメイン(eIF5-CTD)とeIF2BεのC末端ドメイン(eIF2Bε-CTD)のAA box領域(2つの芳香族/酸性残基リッチな領域)と相互作用することが知られている。また、既報のeIF5-CTD(PDB ID: 2FUL)とeIF2Bε-CTD(PDB ID: 1PAQ)の構造比較から、この二つのタンパク質はよく似た二次構造とトポロジーを持っているが、三次構造の配向やAA boxの領域の表面が異なっていることが分かった。よって、eIF5-CTDとeIF2Bε-CTDは、異なる結合様式でeIF2β-NTDのK-box領域に結合することが示唆される。しかし、異なる標的タンパク質eIF5もしくはeIF2BεはどのようにeIF2βの同じ結合部位と相互作用するかはまだ解明されていない。そこで、我々は*Saccharomyces cerevisiae*由来のこれらのタンパク質が複合体を形成する際の構造変化および結合親和性を調べることによってeIF2β-NTDがeIF5-CTDまたはeIF2Bε-CTDとの結合メカニズムを明らかにする。

まず、(eIF5-CTD)-(eIF2β-NTD)と(eIF2Bε-CTD)-(eIF2β-NTD)複合体は組み換えeIF2β-NTD、eIF5-CTD、eIF2Bε-CTDを混合して再構築した。そして、円偏光二色性分光法(CD)および小角X線散乱(SAXS)により、溶液中でのeIF2β-NTD、eIF5-CTD、eIF2Bε-CTDが単体および複合体の構造を調べた。その結果から、eIF5-CTDとeIF2Bε-CTDの構造は、単体の状態と複合体の状態で見られなかったのに対し、eIF2β-NTDは、単体の状態では構造をとっておらず、そのパートナー蛋白質(eIF5-CTDまたはeIF2Bε-CTD)に結合することによって構造が形成されたという事が分かった。つまり、eIF2β-NTDはIntrinsically disordered domainであり、同じ結合部位を用いて異なる反応段階で異なるタンパク質に結合することが示唆されている。

さらに、等温滴定カロリーメトリー(ITC)によって、eIF2Bε-CTDがeIF5-CTDよりeIF2β-NTDと高い親和性を持っていることが分かった。ゲルろ過クロマトグラフィー(アッセイ)解析により、eIF2Bε-CTDは、同じ濃度の(eIF5-CTD)-(eIF2β-NTD)中のeIF5-CTDと置き換わることができるが、逆にeIF5-CTDは、同じ濃度の(eIF2Bε-CTD)-(eIF2β-NTD)中のeIF2Bε-CTDを置換することができなかった。しかし、eIF5-CTDの濃度が(eIF2Bε-CTD)-(eIF2β-NTD)の過剰である場合には、eIF2Bε-CTDが(eIF2Bε-CTD)-(eIF2β-NTD)から解離した。この結果から、eIF5-CTDは濃度依存的にeIF2Bε-CTDとeIF2β-NTDの結合を阻害し、eIF2BのGEF活性を調節する可能性があると考えられる。

以上、本研究ではCD、SAXSにより、真核生物の翻訳開始因子eIF2β-NTDがeIF5-CTDまたはeIF2Bε-CTDと結合する際に構造変化が行うことを明らかにし、eIF2βはIntrinsically disorderedドメインとしてパートナー蛋白質eIF5とeIF2Bとの結合メカニズムを提案した。さらに結合実験によってeIF5は濃度依存的に翻訳開始を調節する可能性を示した。

本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格あるものと認めた。