

## 溶液中での翻訳開始因子の相互作用の研究 Studies on the interaction of translation initiation factors in solution

姚閔<sup>1,2,\*</sup>, Zouqi Gai<sup>2</sup>, 田中 良和<sup>1,2</sup>, 清水 伸隆

<sup>1</sup>北海道大学大学院先端生命科学研究所、<sup>2</sup>北海道大学大学院生命科学研究所  
〒060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8

<sup>3</sup>物質構造科学研究所 大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構

Min Yao<sup>1,2,\*</sup>, Zouqi Gai<sup>2</sup>, Tanaka Yoshikazu<sup>1,2</sup>, Nobutaka Shimizu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Advanced Life Science, <sup>2</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Kita-ku,  
Kita-10, Nishi-8, Sapporo 060-0810, Japan

<sup>3</sup>Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK),  
Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan

### 1 はじめに

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、老化や病気などの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<sup>[1][2]</sup>。

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<sub>i</sub><sup>Met</sup> (開始 tRNA)、mRNA、リボソームと協調的に進行する。そのうち、eIF2 は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  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<sup>[3]</sup>。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  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  の複合体) によって eIF2-GTP へと変換する必要がある<sup>[4]</sup>。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、eIF2 $\beta$  の N 末端ドメイン (eIF2 $\beta$ -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 eIF2B $\epsilon$  の C 末端ドメイン (eIF2B $\epsilon$ -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<sup>[5]</sup>。また、既報の eIF5-CTD (PDB ID: 2FUL) と eIF2B $\epsilon$ -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 eIF2B $\epsilon$ -CTD は、異なる結合様式で eIF2 $\beta$ -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 eIF2B $\epsilon$  はどのように eIF2 $\beta$  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溶液中に複合体を形成する状態を小角 X 線散乱により解析した。

### 2 実験

まず、大腸菌を用いてそれぞれのタンパク質の単体 eIF5-CTD、eIF2B $\epsilon$ -CTD、eIF2 $\beta$ -NTD) を発現し、各種クロマトグラフィーにより高純度に精製した。そして、精製した eIF2 $\beta$ -NTD、eIF5-CTD、eIF2B $\epsilon$ -CTD を混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーで精製して eIF5-CTD-(eIF2 $\beta$ -NTD) と (eIF2B $\epsilon$ -CTD)-(eIF2 $\beta$ -NTD) 複合体を再構築した。小角 X 線散乱 (SAXS) 実験を行うため、各サンプル eIF2 $\beta$ -NTD、eIF5-CTD、eIF2B $\epsilon$ -CTD、(eIF5-CTD)-(eIF2 $\beta$ -NTD)、(eIF2B $\epsilon$ -CTD)-(eIF2 $\beta$ -NTD) を測定用の緩衝液 (20 mM HEPES (pH 7.5), 30 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT) に透析した。SAXS の測定を PF の BL10C にて行い、20°C で X 線損

傷による凝集を生じない測定条件を検討した上で、eIF2 $\beta$ -NTD、eIF5-CTD、eIF2B $\epsilon$ -CTD、(eIF5-CTD)-(eIF2 $\beta$ -NTD)、(eIF2B $\epsilon$ -CTD)-(eIF2 $\beta$ -NTD)のそれぞれの溶液中の回折データを得た。また、 $I(0)_{\text{ref}}/c_{\text{ref}}$ の見積りに標準サンプル Ovalbumin を用いた。それらのデータから Kratky プロットを計算した<sup>[6][7]</sup>。

### 3 結果および考察

タンパク質のフォールディング状態を反映する Kratky プロットは図 1 に示している。eIF5-CTD、eIF2B $\epsilon$ -CTD、(eIF5-CTD)-(eIF2 $\beta$ -NTD)、(eIF2B $\epsilon$ -CTD)-(eIF2 $\beta$ -NTD)の Kratky プロットは  $Q=0.05-0.1$  の辺りにピークがある（フォールディング状態）ことに対して、eIF2 $\beta$ -NTD の Kratky プロットは  $Q>0.08$  の領域に水平状態となり、unfolding 状態を示している。また、eIF5-CTD と eIF2B $\epsilon$ -CTD のプロットは(eIF2 $\beta$ -NTD)との複合体と似ている形となっている。よって、eIF5-CTD と eIF2B $\epsilon$ -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、eIF2 $\beta$ -NTD は、単体の状態では構造をとっておらず、そのパートナータンパク質（eIF5-CTD または eIF2B $\epsilon$ -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、eIF2 $\beta$ -NTD は Intrinsicly 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。

### 4 まとめ

我々は、溶液中の SAXS 小角 X 線散乱により、翻訳開始因子 eIF2 $\beta$ -NTD が同じ結合部位を用いて異なるパートナータンパク質 eIF5 もしくは eIF2B $\epsilon$ と相互作用するメカニズムを明らかにし、今後の翻訳開始メカニズムの研究に新たな知見を提供することができた<sup>[8]</sup>。

### 謝辞

本研究は、北海道大学の北川弓枝さん、薦田圭介博士、田中勲教授の協力によりこの場を借りてお礼申し上げます。

### 参考文献

- [1] G.Hernandez, *et. al*, *Trends Biochem Sci*, 35,63 (2009)
- [2] N. Sonenberg, A.G.Hinnebusch, *Cell*, 136,731 (2009).
- [3] K. Asano, *et. al*, *Genes Dev*, 14, 2534 (2000).
- [4] S.S. Mohammad-Qureshi, *et. al*, *Biochem Soc Trans*, 36, 658 (2008).
- [5] P.V. Alone, T.E. Dever, *J Biol. Chem*, 281, 12636 (2006).
- [6] M. Kataoka, *et. al*, *J Mol Biol*, 249, 215 (1995).
- [7] O. Glatter, O. Kratky, *Academic Press, New York*
- [8] Z-q, Gai, *et. al*, *BBRC* 423, 515 (2012).

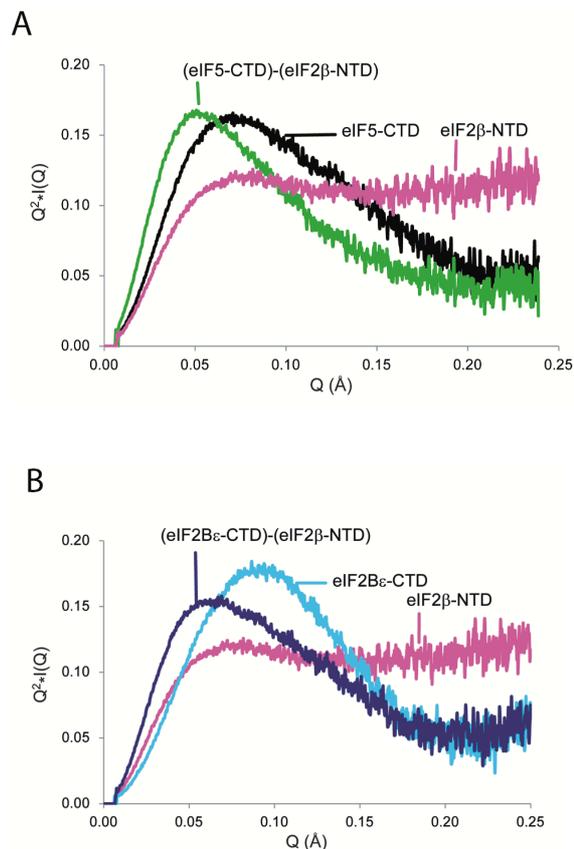


図 1 .SAXS データにより計算した Kratky プロット

\* yao@castor.sci.hokudai.ac.jp