

## 翻訳開始因子キナーゼ HRI の X 線結晶構造解析 Structural basis of heme-regulated inhibitor, HRI

五十嵐城太郎\*

福島県立医科大学, 〒960-1295 福島市光が丘 1

Jotaro Igarashi\*

Fukushima Medical University, 1 Hikarigaoka, Fukushima, 960-1295, Japan

### 1 はじめに

生物は環境からの様々なシグナルを受容し、細胞内部において情報変換を行い、適応する。これら一連のシグナル伝達過程においてタンパク質のリン酸化は非常に重要な役割を果たしている。HRI (heme-regulated inhibitor) は翻訳開始因子 2 の  $\alpha$  サブユニット (eIF2 $\alpha$ ) を基質とする eIF2 $\alpha$  キナーゼファミリーに属する。eIF2 $\alpha$  キナーゼファミリーはいずれもセンサードメインにおいて各種ストレス (アミノ酸不足, 変性タンパク質の蓄積, ウイルス感染, ヘム不足) を感知すると、キナーゼドメインが自己リン酸化され活性化する。その結果 eIF2 $\alpha$  をリン酸化することで、タンパク質合成を翻訳開始段階において停止させる。HRI は網状赤血球中に存在するヘムの量に応じてヘモグロビン  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖の合成を制御するキナーゼである。HRI によるヘモグロビンの合成を調節する機構は、ヘムが減少すると自己リン酸化によって活性化し、eIF2 $\alpha$  をリン酸化することで  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖の合成を停止させる。このようにして、ヘムと  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖のバランスを保っている。

しかしながら、HRI の分子レベルでの活性調節機構に関する研究は進んでいない。私たちは、大腸菌を用いて大量の活性型 HRI の発現・精製に成功し、一酸化窒素による HRI の活性化機構について明らかにした [1-3]。また、N 末端ドメインの His119/His120 及びキナーゼドメイン内の Cys409 がヘムに結合すること、ヘムの結合によって N 末端ドメインとキナーゼドメインとの間に相互作用が働くことを初めて報告した [4]。また、活性型 HRI のリン酸化部位を質量分析によって明らかにし、複数の自己リン酸化部位を同定した [5]。

本研究では、X 線結晶構造解析による HRI の立体構造決定を通じて、ヘム濃度認識機構と制御機構を明らかにする。

### 2 実験

マウス HRI の他、ヒト、ラット、ゼブラフィッシュ HRI について、大腸菌での発現ベクターを作製し、大腸菌を用いて各種 HRI の大量発現を行い、精製を行った。

HRI の立体構造を明らかにするために、ヘムを結合していないアポ型酵素について、市販のスクリーニングキットを用いて結晶化条件を約 700 種類検討した。

### 3 結果および考察

HRI の立体構造を明らかにするために、マウス、ヒトおよびゼブラフィッシュの HRI を用い、ヘムを含まないアポ型酵素について、700 種類の条件探索を行ったところ、微結晶が得られた (図 1)。この結晶を用いて回折データを収集した結果、分解能は 7.5 Å であった。分解能が低いため構造決定には至っていない。分解能向上に向けてタンパク質の脱リン酸化処理、全長型からドメインへの結晶化ターゲットの変更、結晶化条件の最適化等を行っている。



図 1 : HRI の結晶

### 4 まとめ

eIF2 $\alpha$  キナーゼは創薬のターゲットとして、様々な阻害剤もしくは活性化剤が設計・合成されている。

X 線結晶構造解析によって、HRI の立体構造が明らかになれば、構造既知の eIF2 $\alpha$  キナーゼ (PKR, PERK, GCN2) と比較することで、選択的薬剤の開発も期待される。

### 参考文献

- [1] J. Igarashi *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1650**, 99 (2003).
- [2] J. Igarashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279**, 15752 (2004).
- [3] M. Miksanova *et al.*, *Biochemistry* **45**, 9894 (2006).
- [4] J. Igarashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **283**, 18782, (2008).
- [5] J. Igarashi *et al.*, *FEBS J.* **278**, 918, (2011).

\* jotaro@fmu.ac.jp