

学 位 論 文 題 名

Structure Analysis of Eukaryotic Translation Initiation
Factors 5B and 1A Complex

(真核生物翻訳開始因子eIF5B-1A複合体の構造解析)

学位論文内容の要旨

The initiation of protein synthesis is one of the crucial processes in the cell for all organisms and requires at least eight initiation factors (eIFs) in eukaryotes. In this process, 48S initiation complex, formed by 40S ribosomal subunit, mRNA, eIF2•GTP•Met-tRNA^{Met}, eIF1A, eIF1, etc. scans mRNA for the start codon, during which the eIF2-bound GTP hydrolysis. The recognition of start codon triggers the dissociation of eIF1, eIF2•GDP and Pi. Afterwards, eIF1A, which is still present on the 48S initiation complex assists in recruiting eIF5B•GTP to the initiation complex, and eIF5B•GTP encourages the joining of 60S ribosomal subunit to form the 80S initiation complex. After that, the GTP bound to eIF5B is hydrolyzed and eIF5B•GDP leaves the complex with eIF1A, resulting an 80S complex which is ready for the elongation step.

The interaction between eIF5B and eIF1A, two universally conserved initiation factors through all three kingdoms, is important for the conversion of 48S complex to a functional 80S ribosome. In bacteria, their homolog IF2 and IF1 have been cross-linked on the ribosome. In eukaryotes, it was reported that eIF1A and eIF5B bind to each other even off the ribosome. However the details of this interaction are not yet understood. To elucidate the molecular bases for this interaction, we attempt to determine the structure of eIF5B-eIF1A complex from *Saccharomyces cerevisiae* by X-ray crystallography.

As the N-terminal domain of *S. cerevisiae* eIF5B is not required for its function and the N-terminal tail of *S. cerevisiae* eIF1A is unstructured, the N-termini of both proteins are truncated and these truncation variants are referred to as eIF5B and eIF1A. The recombinant eIF5B and eIF1A were overexpressed and purified independently, eIF5B-eIF1A complex was constructed by mixing two purified protein and further purified by size-exclusion chromatography. The crystals, which were confirmed to contain both proteins by SDS-PAGE, were obtained and diffracted to maximum resolution of 3.3 Å. The structure was solved by molecule replacement. There are two complex molecules in the asymmetric unit.

The structure of eIF5B consists of four domains, a conserved N-terminal G-domain (domain I), an EF-Tu-type β barrel (domain II), an α/β/α-sandwich (domain III), and a second EF-Tu-type β barrel (domain IV), which is connected to domain I-III via a long helix. The two eIF5B molecules in the asymmetric unit have different conformations. Although the structures of individual domain of two

eIF5B molecules are similar, the positions of domain III and domain IV relative to domain I-II are quite different. Domain IV even adopt almost opposite orientation in two eIF5B molecules. Their conformations are also different from that of the isolated eIF5B structure. Such high flexibility of eIF5B conformation may reflect the requirement for conformational change between pre- and post- state of ribosomal subunits joining.

Although the model of eIF1A core domain is difficult to build since the electron density map is poor, we are still able to build the extreme C-terminal tail of eIF1A based on the 2Fo-Fc and Fo-Fc map. The C-terminal tail of eIF1A binds to a pocket formed by two helices in eIF5B domain IV. The interaction is mainly hydrophobic as suggested by previous reports, while the hydrogen bonds between eIF5B side chain and eIF1A main chain are also important. This interaction is unique to eukaryotes because the unstructured C-terminal tail of eIF1A is not found in bacteria and archaea, and in bacteria IF2 (eIF5B homolog) also lacks the corresponding binding pocket. The evolution of this unique interaction may result from the much weaker affinity between eIF5B and initiator tRNA in eukaryotes ($K_d = 40 \mu\text{M}$) compared to its bacterial and archaeal homologs, which are in micromolar range. The interaction between eIF1A and eIF5B domain IV might facilitate the weak binding between eIF5B domain IV and initiator tRNA by restricting the flexibility of eIF5B domain IV, and as a result prevent the dissociation of initiator tRNA and stabilize the interface between 40S and 60S subunit for upcoming ribosome assembly.

Finally, a model for the interaction between eIF5B and eIF1A on the ribosome is proposed based on structures of ribosome in complex with translation factor. eIF1A is assigned to the A-site of small subunit by superposing to the structure of its bacterial homolog IF1 in the 30S•IF1 complex. The position of eIF5B on the ribosome is obtained via superposing domain G of eIF5B to that of another ribosomal dependent GTPase EF-G in the crystal structure of EF-G•70S complex. In this model, the core domain of eIF1A is close to domain III of eIF5B, while domain IV of eIF5B is far from the initiator tRNA acceptor arm, which is consist with a state after eIF5B-bound GTP hydrolysis. Before GTP hydrolysis, initiator tRNA is supposed to adopt a hybrid P/I state, and eIF5B domain IV is supposed to bind with initiator tRNA acceptor arm. To build the GTP state model, eIF5B domain IV was manually rotated to initiator tRNA acceptor arm, which is easy to accomplish in vivo considering the high flexibility of eIF5B conformation. In this GTP state model, both eIF1A C-terminal tail and initiator tRNA acceptor arm bind with eIF5B domain IV, forming a stable tripod ready for the binding with 60S subunits. The joining of 60S subunit induces the hydrolyzation of eIF5B-bound GTP, which causes the movement of eIF5B domain IV and the dissociation of eIF5B and tRNA contacts. Then initiator tRNA back-translocate into P/P state ready for the formation of the first peptide bond. The resulting conformation change of 80S complex also looses the binding of eIF1A and promotes a rapid release of eIF1A, whereas eIF5B, having lost main anchorages to the 80S complex, dissociates from the ribosome coupled with eIF1A.

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	姚	関
副 査	教 授	田 中	勲
副 査	教 授	出 村	誠
副 査	准教授	尾 瀬	農 之

学 位 論 文 題 名

Structure Analysis of Eukaryotic Translation Initiation Factors 5B and 1A Complex

(真核生物翻訳開始因子eIF5B-1A複合体の構造解析)

蛋白質の翻訳開始反応は、すべての生物種に存在する最も重要なプロセスの1つであり、真核生物において少なくとも8個の開始因子(eIFs)が必要とする。この翻訳開始反応では、まず、mRNA, eIF2・GTP・Met-tRNA^{Met}, eIF1A, eIF1などがリボソーム40Sサブユニットに結合し、開始複合体である48Sになる。そして、eIF2に結合しているGTPが加水分解しながら、mRNAの開始コドンのスキャンする。開始コドンが認識されたら、eIF1, eIF2・GDPとPiが48Sから解離する。その後、eIF5B・GTPがリボソーム小サブユニットに残っているeIF1Aとの相互作用によってリボソーム小サブユニットに結合し、eIF1Aと協調的に働くことによって60Sサブユニットとの会合を促進する。80Sリボソームが形成された後に、eIF5Bに結合しているGTPが加水分解し、eIF5B・GDPがeIF1Aとともに80Sから離れ、翻訳は次の伸長反応へと移行し、タンパク質合成が開始される。

これらの開始因子の中で、真核、バクテリア、古細菌の3大種類の生物種によく保存されているのはeIF5BとeIF1Aである。この二つの因子の相互作用は、リボソーム小サブユニットから機能する80Sリボソームになることに対して重要である。バクテリアでは、eIF5BとeIF1AのホモログであるIF2とIF1はリボソームに依存的に結合することに対して、真核生物のeIF5BとeIF1Aはリボソームが存在しなくても相互作用することが知られているが、それらの相互作用の詳細はまだ明らかにされていない。そこで、本研究はX線結晶構造解析により酵母由来のeIF5B-eIF1A複合体の構造を明らかにし、それらの相互作用の分子基盤を解明する。

酵母由来eIF5BのN末端ドメインは機能に寄与していない、またeIF1AのN末端の部分はフォールドしていないため、この二つのタンパク質のN末端を欠損したサンプルを用いて、複合体の構造解析を行った。二つのサンプルを大腸菌の発現系によりそれぞれ発現し、大量調製した。精製後のサンプルを混合することによって、複合体を形成し、結晶化を試みた結果、3.3Å回折能を持つ結晶を得ることに成功した。また、得られた結晶を用いて、SDS-PAGEによってチェックしたところ、eIF5BとeIF1Aのバンドが確認され、その結晶は複合体であることを確認できた。また、分子置換により位相計算を行い、非対称単位に2個の複合体の分子が存在することがわかった。

eIF5Bの構造は、よく保存されているN末端Gドメイン(ドメインI)、EF-Tuタイプβ

barrel ドメイン (ドメイン II), $\alpha/\beta/\alpha$ -sandwich ドメイン (ドメイン III), 2 番目の EF-Tu-type β barrel ドメイン (ドメイン IV) の4つのドメインからなる。ドメイン IV は1本の長い helix によって ドメイン I-III とつながっている。非対称単位にある2個の eIF5B 分子のそれぞれのドメイン構造が似ているにもかかわらず、全体の構造は異なっている。それは、ドメイン I, II に対してのドメイン III と IV の配置が異なっているからである。二つの分子のドメイン IV はほぼ反対方向を向いている。さらに、これらのドメインの配置も本研究室で解析された単独の eIF5B 構造と異なっている。このような high flexibility を持つ eIF5B 構造は、リボソームサブユニット会合の前後 (re- and post- state) に要求されている eIF5B の構造変化を反映していると考えられる。

eIF1A のコア構造は電子密度マップの貧弱のため、構築できなかったが、eIF1A の C 末端 tail の 2Fo-Fc と Fo-Fc マップは明瞭であった。eIF1A の C 末端が eIF5B ドメイン IV の2つの helix から形成されたポケットに入り、主に疎水性相互作用により eIF5B と結合している。また、eIF5B の側鎖と eIF1A 主鎖の間に水素結合も形成されている。このような eIF5B と eIF1A の相互作用は真核生物に特有である。何故ならば、バクテリア IF1 と古細菌 aIF1A (eIF1A のホモログ) には、C 末端 tail が存在しない、また、バクテリア IF2 (eIF5B のホモログ) には eIF1A と結合するポケットも欠けているためである。このユニークな相互作用は eIF5B と開始 tRNA の相互作用の進化によるものと考えられる。すなわち、バクテリアおよび古細菌 (mM レベル) と比べて、真核生物では、eIF5B と開始 tRNA の結合アフィニティ ($K_d=40\mu\text{M}$) が弱いため、eIF5B のドメイン IV が eIF1A の C 末端から受けた flexibility への制限は開始 tRNA との弱い相互作用を補助し、開始 tRNA の解離を防ぎ、40S と 60S の会合に有利な接触面を保つと考えられる。

リボソームにおける eIF5B と eIF1A の働きを明らかにするため、得られた構造を 80S リボソーム構造にマッピングした。まず、①eIF1A を構造解析された 30S・IF1 複合体構造の IF1 に fitting によって、eIF1A が 40S の A サイトに配置されることが分った。②eIF5B を 70S・EF-G 複合体の構造にある EF-G (eIF5B のドメイン G のホモログ) と重ね合わせることで、70S・eIF5B 複合体のモデルを作成し、さらに、そのモデルを 30S・eIF1A と重ねることによって、70S・eIF5B・eIF1A のモデルを得た。③70S・eIF5B・eIF1A のモデルを 80S の結晶構造の rRNA (28S) と重ね合わせることで、最終的に 80S・eIF5B・eIF1A のモデルを作成した。このモデルでは、eIF1A のコアが eIF5B のドメイン III の付近に配置され、eIF5B のドメイン IV が開始 tRNA と離れている。これは、eIF5B に結合している GTP の加水分解後に eIF5B-GDP がリボソームから解離する直前の状態と考えられる。また、80S に会合する前に、不安定な P/I 結合状態の開始 tRNA のアクセプターアームが eIF5B のドメイン IV と結合することが報告されていたので、本研究で得られた high flexibility eIF5B の構造に基づいて、eIF5B のドメイン III と IV を回転させ、GTP が加水分解する前のモデルを作成した。つまり、eIF1A の C 末端に制限された eIF5B-GTP のドメイン IV は開始 tRNA のアクセプターアームと結合することによって 60S と会合しやすい界面を形成する。そして、60S と結合することで、eIF5B の GTP が加水分解され、eIF5B-GDP のドメイン III と IV の構造変化が起こり、開始 tRNA から離れる。最終的に、開始 tRNA が P/P 配置になり、eIF5B と eIF1A がリボソームから解離し、80S がタンパク質合成反応の伸長段階に入る。

以上、本研究では真核生物の翻訳開始因子 eIF5B-1A 複合体の X 線構造解析によって eIF5B と eIF1A の相互作用を明らかにし、得られた構造をリボソーム構造にマッピングすることによって、eIF5B と eIF1 の働きを提案した。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。