トピックス

翻訳開始因子eIF4Eの相互作用調節による 翻訳制御機構

関山直孝 京都大学大学院理学研究科

1. eIF4E を介したキャップ依存的翻訳機構

真核生物の細胞には、環境の変化に適応するために遺伝子発現を変化させる制御機構が備わっている。DNA からメッセンジャー RNA (mRNA) が合成される「転写」と比べて、mRNA から蛋白質が合成される「翻訳」は、短期的な応答が可能であることから、ストレス応答に重要な役割を果たしている。

翻訳過程は大きく分けて、開始、伸長、終結の三段階に分かれているが、特に開始段階において厳密な制御機構が存在する。この開始段階を制御している因子の一つとして、翻訳開始因子 eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) がある。eIF4E は mRNA の 5' 末端に存在するキャップ構造 (5'-cap) を認識するキャップ結合蛋白質である (図 1)。キャップ構造に結合した eIF4E は、足場蛋白質 eIF4G, RNA ヘリカーゼ eIF4A と三者複合体 eIF4F を形成した後、eIF4G がリボソームを mRNA 上に呼び込むことで翻訳を開始させる。この翻訳機構をキャップ依存的翻訳と呼ぶ。

栄養欠乏状態や低酸素状態においては、細胞内のエネルギー消費を最小限にとどめる必要があるため、新規蛋白質の合成、つまり翻訳過程が抑制されている。この eIF4F によるキャップ依存的翻訳を抑制する因子が eIF4E 結合蛋白質 4E-BPs (eIF4E-binding proteins) である。哺乳類の 4E-BPs には三種類のアイソフォームが存在し、その中でも 4E-BP1 についての研究が進んでいる。4E-BPs は eIF4E と強固に結合することで、eIF4E/eIF4G 複合体の形成を阻害し、キャップ依存的翻訳を阻害する。ここで、ストレスの緩和、つまり増殖因子、成長因子、アミノ酸や酸素により PI3K/Akt/mTOR 経路が活性化されると、セリンスレオニンキナーゼである mTOR を含む分子複合体 mTORC1 が 4E-BPs をリン酸化する。4E-BPs のリン酸化は段階的であることが知られており、4E-BP1 の場合、最初に T37/T46 がリン酸化され、続いて T70, そして S65 がリン酸化されると、4E-BP1 は eIF4E との結合能を失

図 1

eIF4E による翻訳制御機構。PI3K/Akt/mTOR 経路により 4E-BPs がリン酸化されることで、eIF4E の結合相手が 4E-BPs から eIF4G へ変化する。これにより eIF4F 複合体が形成され、キャップ依存的翻訳が活性化される。本経路は細胞増殖に関与する mRNA の翻訳に寄与していることから、抗癌剤のターゲットとして注目されている。

う。遊離した eIF4E は eIF4G と複合体を形成し、翻訳が再開される。

上記の eIF4E を介したキャップ依存的翻訳は、特定の mRNA の翻訳を優先的に制御することが知られている。eIF4E の影響を受けやすい mRNA 群は「eIF4E 感受性 mRNA」と呼ばれ、5'UTR (untranslated region) 領域が長鎖で複雑な二次構造をとる、という特徴をもつ。5'UTR 領域とは、キャップ構造と開始コドンの間に存在する非翻訳領域である。5'UTR 領域が高次構造を形成している場合、リボソームがこの高次構造を乗り越えられず翻訳は阻害される。一方、mRNA のキャップ構造に eIF4F が結合すると、RNA ヘリカーゼ eIF4A の働きにより 5'UTR 領域の高次構造がほどこれ翻訳が進む、と考えられている。この eIF4E 感受性 mRNA には、細胞増殖に関わる蛋白質である、cyclin D1, c-Myc, VEGF などがコードされていることから、eIF4E の機能異常は細胞の癌化につながることが報告されている。

2. | キャップ依存的翻訳をターゲットとした抗癌剤開発

キャップ依存的翻訳は細胞増殖に深く関与していることから、その機能異常は細胞の癌化を引き起こすことが知られている。実際に、多くの癌細胞では eIF4E の発現量が増加しており、eIF4E の過剰発現が細胞の癌化を誘導することも報告されている¹⁾。上記の事実から、eIF4E の機能を抑制する化合物の開発は癌の化学療法につながる可能性を示唆している。現在までに、PI3K/Akt/mTOR 経路や eIF4E をターゲットとした低分子化合物が多数開発されている。

第一に、4E-BPs のリン酸化を阻害することで eIF4E による翻訳を抑制するため、mTORC1 のアロステリック阻害剤であるラパマイシンおよびその誘導体（ラパログ）が開発された。さらに現在は、mTOR の活性部位に直接結合しその機能を阻害する active-site mTOR inhibitors (asTORi) が開発段階にある。しかしながら、asTORi の一つである AZD8055 に対する薬剤耐性細胞では eIF4E の増幅が確認され²⁾、同様の現象が他の mTOR 阻害剤でも報告されたことから、eIF4E に直接作用する化合物の開発も行われてきている。

その一つとして、eIF4E の mRNA を標的とした anti-sense oligonucleotides (ASOs) を用いる方法が検討された³⁾。eIF4E 特異的 ASOs は、eIF4E の mRNA と結合し分解へと導くことで、eIF4E の発現量を低下させる核酸医薬である。この eIF4E 特異的 ASOs は、キャップ依存的翻訳を抑制することで、癌細胞のアポトーシス誘導、免疫不全マウスゼノグラフトモデルでの腫瘍縮小効果を示した。さらに、eIF4E 特異的 ASOs を投与されたマウスでは、eIF4E の mRNA が減少しているにも関わらず、体重や臓器の大きさには変化がなかった。この現象は一見すると矛盾しているようだが、その後、eIF4E をノックダウンした培養細胞では、4E-BPs のユビキチン化による分解が起こり、翻訳量の減少を回避する機構が存在することがわかった⁴⁾。上記の事実からも、eIF4E 特異的 ASOs は癌細胞特異的な抗癌剤としても期待されている。

そして、eIF4E 特異的 ASOs と同時期に開発されたのが、eIF4E/eIF4G 複合体形成の阻害剤 4EGI-1 である。

3. | eIF4E/eIF4G 複合体の形成を阻害する 4EGI-1

eIF4E を標的とする阻害剤の開発には、eIF4E の構造情報が必要不可欠であることから、eIF4E とその結合因子である eIF4G や 4E-BPs との構造学的研究が精力的に行われてきた。

初めに、eIF4G および 4E-BP1 には、非常によく保

存された配列 (YxxxxLΦ:eIF4E 結合モチーフ) が含まれており、この領域が eIF4E と強固に結合することがわかった。その後、eIF4G および 4E-BP1 の eIF4E 結合モチーフを含む 17 残基のペプチドと、eIF4E との複合体の構造が、X 線結晶構造解析から明らかになった⁵⁾。その結果、eIF4G および 4E-BP1 のペプチドはともに eIF4E の α -helix1 と α -helix2 にまたがるように結合していたことから、4E-BP1 は eIF4E 上の eIF4G 結合表面に結合することで eIF4G を拮抗阻害する、という制御機構が明らかとなった。

そこで G. Wagner らは、eIF4E/eIF4G 複合体の形成を阻害する化合物を開発するために、eIF4G の eIF4E 結合モチーフを含む 11 残基のペプチドに蛍光ラベルを導入し、蛍光偏光度解消法を用いて eIF4E と eIF4G ペプチドの相互作用を阻害する低分子のハイスループットスクリーニングを行った。その結果、4EGI-1 (eIF4E/eIF4G interaction inhibitor 1) が同定された。4EGI-1 は、eIF4E/eIF4G 複合体形成を阻害することで、eIF4E 感受性 mRNA の翻訳を抑制し、癌細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに驚くべきことに、4EGI-1 は eIF4E/4E-BP1 複合体形成を促進することもわかった⁶⁾。

同様の現象は 4EGI-1 の誘導体においても確認されているが⁷⁾、eIF4E 上で 4E-BP1 と eIF4G が拮抗する機能モデルではこの現象を完全に説明できない。さらに、4E-BP1 の全長蛋白質は、X 線結晶構造解析に用いられた 17 残基のペプチドよりも 10 倍ほど親和性が高いという事実からも⁵⁾、eIF4E/4E-BP1 と eIF4E/eIF4G の複合体構造に差異があるのではないかと示唆された。

4. | eIF4E/4EGI-1 および eIF4E/4E-BP1 の複合体構造

初めに、4EGI-1 による eIF4E/eIF4G 複合体形成の阻害機構を明らかにするため、eIF4E/4EGI-1 複合体の構造解析が行われた⁸⁾。その結果、4EGI-1 は、当初考えられていた eIF4E の eIF4G 結合部位ではなく、eIF4G 結合部位から離れた位置、つまり eIF4E の α -helix1 と β -sheet2 の間に結合していた (図 2)。さらに、NMR や X 線結晶構造の詳細な解析の結果、eIF4E は、4EGI-1 結合時のみ 3¹⁰-helix (Ser82-Leu85) がほどけ、 α -helix1 が一巻き分 (His78-Ser82) 伸長することがわかった (図 2 黄色部分)。つまり 4EGI-1 は、アロステリックな効果により eIF4E に構造変化を誘起することで、eIF4G との複合体形成を阻害しているという制御機構が示された。

次に我々は、4E-BP1 と eIF4G の eIF4E 相互作用様

図 2

eIF4E とその結合因子との複合体構造. eIF4E/eIF4G (1EJH), eIF4E/4EGI-1 (4TQC), eIF4E/4E-BP1 (5BXV) の構造の重ね合わせ図. eIF4G を orange, 4E-BP1 を blue, 4EGI-1 を green, eIF4E (eIF4G, 4E-BP1) を light gray, eIF4E (4EGI-1) を dark gray, 4EGI-1 結合による eIF4E の構造変化部位を yellow で示してある. また, 4E-BP1 の C 末端ループによる相互作用部位を破線で囲んである.

図 3

4EGI-1 による相互作用制御機構. 4EGI-1 は, eIF4E の相互作用相手を eIF4G から 4E-BP1 へとシフトさせることで, キャップ依存的翻訳を抑制している.

式の差異を明らかにするため, eIF4E/4E-BP1 複合体の構造学的研究を行った. 初めに, 4E-BP1 には eIF4E 結合モチーフだけでなく, C 末端側にもう一つの結合部位が存在することが明らかになった. X 線結晶構造解析の結果, この C 末端部位はループ構造を形成しており, eIF4E の β -sheet2 と α -helix1 にまたがるように結合していた. 生化学的な実験から, この C 末端ループは, 4E-BP1 による eIF4E/eIF4G 複合体形成の阻害, キャップ依存的翻訳の抑制, そして細胞増殖阻害能に必要な不可欠な部位であることもわかった. さらにこの C 末端ループは, eIF4G/eIF4E 複合体には存在しない 4E-BP1 特異的な相互作用であり, 4EGI-1 との結合部位とも近接していた⁹⁾ (図 2 破線丸).

そこで, 4EGI-1 と eIF4E/4E-BP1 複合体形成の関連を明らかにするため, NMR による滴定実験を行ったところ, 4E-BP1 の C 末端ループが eIF4E と相互作用することで, 4EGI-1 存在下でも eIF4E/4E-BP1 複合体が維持されるということがわかった. さらに, NMR の飽和移動差スペクトル法や蛍光消光実験から, 4EGI-1 は eIF4E/4E-BP1 複合体と相互作用する可能性も示唆された.

上記の事実は, 以下のような 4EGI-1 の制御機構を

示唆する. 4EGI-1 存在下では, アロステリックな作用により eIF4G は eIF4E から解離するが, 4E-BP1 は C 末端ループによる強固な結合により eIF4E 複合体を維持する. 従って, eIF4E の相互作用相手が eIF4G から 4E-BP1 へシフトすることで, キャップ依存的翻訳が抑制される, という作用モデルである (図 3). 同時期に発表された *Drosophila melanogaster* の 4E-BPs と eIF4E も同様の複合体構造を形成していたことから¹⁰⁾, 4E-BPs の C 末端ループによる機能制御は, 多様な生物種においても保存されている可能性を示唆している.

今後は, 4EGI-1 がどのようにして 4E-BP1 および eIF4E と三者複合体を形成しているのかについて解明する必要がある.

謝 辞

eIF4E/4E-BP1 複合体の構造学的研究は, ハーバード医科大学の Prof. Gerhard Wagner と Dr. Mélissa Léger-Abraham との共同研究である.

文 献

- 1) Avdulov, S. *et al.* (2004) *Cancer Cell* **5**, 553-563. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.05.024.
- 2) Cope, C. L. *et al.* (2014) *J. Cell Sci.* **127**, 788-800. DOI: 10.1242/jcs.137588.
- 3) Graff, J. R. *et al.* (2007) *J. Clin. Invest.* **117**, 2638-2648. DOI: 10.1172/JCI32044.
- 4) Yanagiya, A. *et al.* (2012) *Mol. Cell* **46**, 847-858. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.04.004.
- 5) Marcotrigiano, J. *et al.* (1999) *Mol. Cell* **3**, 707-716. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)80003-4.
- 6) Moerke, N. J. *et al.* (2007) *Cell* **128**, 257-267. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.046.
- 7) Takroui, K. *et al.* (2014) *Eur. J. Med. Chem.* **77**, 361-377. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.03.034.
- 8) Papadopoulos, E. *et al.* (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E3187-3195. DOI: 10.1073/pnas.1410250111.
- 9) Sekiyama, N. *et al.* (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E4036-4045. DOI: 10.1073/pnas.1512118112.
- 10) Peter, D. *et al.* (2015) *Mol. Cell* **57**, 1074-1087. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.01.017.

関山直孝

関山直孝 (せきやま なおたか)

京都大学大学院理学研究科助教

2010 年京都大学大学院工学研究科博士課程修了, 大阪大学蛋白質研究所, ハーバード医科大学を経て, 15 年より現職.

研究内容: 翻訳の制御に関する構造学的研究

連絡先: 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町

京都大学理学部 1 号館 414 号室

E-mail: sekiyama.naotaka.5x@kyoto-u.ac.jp

URL: <http://mb.biophys.kyoto-u.ac.jp/>