

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06511

研究課題名(和文) がんの発症と進展に寄与するシグナル分子の核移行メカニズムの構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for nuclear import of cancer-promoting signaling molecules

研究代表者

松浦 能行 (Yoshiyuki, Matsuura)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：10402413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんの発症と進展に寄与するシグナル伝達経路では、核膜孔を通じたシグナル分子の選択的能動輸送により、シグナルが細胞核に伝わり、がんに関わる遺伝子群の発現を誘導することが多い。本研究では、多くの難治がんががんの発症と進展に寄与する主要な「シグナル分子」のうちの一つである転写因子と核移行受容体が形成する複合体の結晶構造を高分解能で解いた。本研究により、がんの悪性化において重要な転写因子の核移行メカニズムの理解が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞の無秩序な増殖と血管新生の不均衡に起因する低酸素環境下にある固形癌のがん細胞では、有酸素条件とは異なるさまざまな遺伝子の発現が誘導され、その結果、がんの悪性化が促進される。本研究では、低酸素ストレス応答の鍵を握る転写因子の細胞質から核への移行の鍵を握るタンパク質複合体の立体構造を原子レベルで解き、分子認識機構の詳細を解明した。本研究の成果は、がんの悪性化に寄与するタンパク質間相互作用の理解を進展させたものである。

研究成果の概要(英文)：In a number of signal transduction pathways that contribute to the initiation and promotion of cancer, signaling molecules are selectively and actively transported from the cytoplasm into nucleus through nuclear pore complexes. In this study, we determined a high-resolution crystal structure of a protein complex composed of a nuclear import receptor and a cancer-promoting transcription factor. This study has advanced our understanding of the molecular mechanism underlying nuclear import of a cancer-promoting signaling molecule.

研究分野：構造生物学

キーワード：核移行

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がんの発症・進展過程において、細胞の環境変化や、さまざまなゲノム・エピゲノム異常がもたらす増殖シグナルや不死化シグナルの活性化が、がん細胞の異常増殖能獲得やがん幹細胞性の獲得、治療抵抗性の獲得など、がん細胞に固有の特性を付与している。そのような「がんシグナル」は、多くの場合、最終的に細胞核に伝わり、がんに関わるさまざまな遺伝子の発現を誘導する。がんシグナルは、核膜孔を通したシグナル分子の選択的能動輸送(核移行)システムによって、細胞質から核に伝達される。

(2) 一般に、シグナル分子の核移行では、まず細胞質で運搬体タンパク質(核移行受容体)がシグナル分子の核移行シグナルを特異的に認識して結合し、複合体を形成する。この複合体(核移行複合体)は、核膜孔構成タンパク質群がもつFGリピート配列と核移行受容体との相互作用により、核膜孔を通過する。多くの場合、核内でGタンパク質Ranのはたらきにより、シグナル分子は核移行受容体からリリースされる。

### 2. 研究の目的

これまでにさまざまな核移行受容体が同定されているが、核移行シグナル認識機構の理解はまだ不十分である。本研究では、がん増殖と悪性化の分子機構を解き明かすための基礎研究の一環として、がんに関わる多様な核移行経路について、がんシグナル分子と核移行受容体の相互作用の構造生物学研究に取り組んだ。本稿では、論文として発表済みの成果(Matsuura & Miyawaki (2023) BBRC)について述べる。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトの低酸素応答因子HIF-1のアルファサブユニット(HIF-1 $\alpha$ )の核移行シグナル(NLS)と考えられている領域をGSTとの融合タンパク質として大腸菌で大量発現した。これとは別に、マウスの核移行受容体の一種であるimportin- $\alpha$ 1のアルマジロリピートドメイン(NLS結合ドメイン)をアフィニティータグがついていないコンストラクトを用いて大腸菌で大量発現した。これら2種類の大腸菌ペレットを混ぜて懸濁して超音波破碎し、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーによりHIF-1 $\alpha$  NLSとimportin- $\alpha$ 1の複合体を精製し(GSTタグは精製途中にプロテアーゼ処理により除去)、ハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化した。

(2) 高エネルギー加速器研究機構(茨城県つくば市)Photon FactoryビームラインBL-17AでX線回折データを収集した。X線回折データはiMOSFLMとCCP4プログラムPOINTLESS、AIMLESS、CTRUNCATE、FREERFLAGを用いてプロセッシングした。マウスimportin- $\alpha$ 1の構造(PDB code 6IU7 chain A)をサーチモデルとして、CCP4プログラムMOLREPを用いて分子置換法の解をサーチした。さらに、COOTを用いた実空間でのモデルビルディングとPHENIXを用いた逆空間での精密化計算を繰り返し、構造精密化を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 核移行受容体 importin- $\alpha$ : $\beta$ ヘテロ二量体のうち、 $\alpha$ サブユニットのさまざまなアイソフォームが HIF-1 $\alpha$ に直接結合する。本研究では、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーで高い純度に精製したヒト HIF-1 $\alpha$  NLS (野生型) とマウス importin- $\alpha$ 1 の複合体を結晶化用サンプルとし、ハンギングドロップ蒸気拡散法により、ロッド状の大型の単結晶を育てることに成功した (図1)。Photon Factory ビームライン BL-17A で native 結晶の 1.8 Å 分解能の X 線回折データを収集した (図2)。

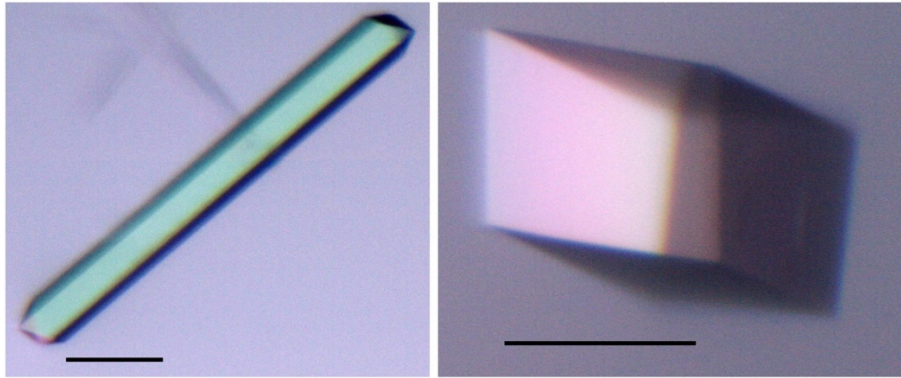


図1 HIF-1 $\alpha$  NLS (野生型) と importin- $\alpha$ 1 の共結晶 (scale bar: 100  $\mu$ m)

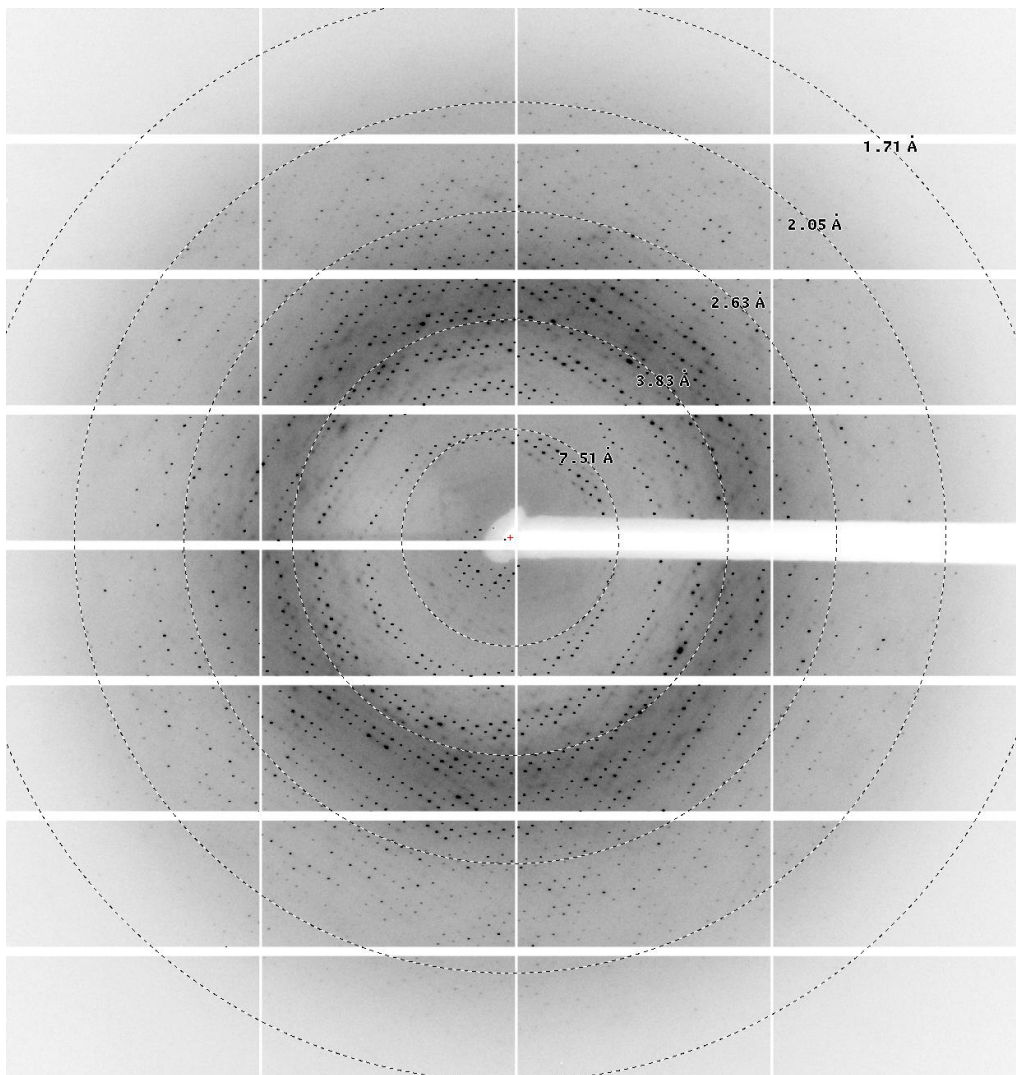


図2 HIF-1 $\alpha$  NLS (野生型) と importin- $\alpha$ 1 の共結晶の X 線回折パターン

この結晶は結晶系が斜方晶系で、非対称単位あたり1つのHIF-1 $\alpha$  NLS（野生型）: importin- $\alpha$ 1複合体が含まれていた。分子置換法により結晶構造を解き、free R-factor 19.8%まで構造精密化した。電子密度マップにおいて、HIF-1 $\alpha$  NLS に相当する電子密度が、アルマジロリピート超らせんの内側表面の溝に沿って明瞭に観察された。結晶化に用いたヒトHIF-1 $\alpha$  NLSのアミノ酸配列には2カ所に塩基性アミノ酸クラスターがある。N末端側の塩基性アミノ酸クラスターを含む6残基の領域（<sup>717</sup>QRKRKM<sup>722</sup>）が importin- $\alpha$ 1 の ARM6~ARM8（6つ目から8つ目のアルマジロリピート）にかけて結合しており、C末端側の塩基性アミノ酸クラスターを含む7残基の領域（<sup>751</sup>SWKRVKG<sup>757</sup>）が ARM2~ARM4（2つ目から4つ目のアルマジロリピート）にかけて結合していた。これら2カ所の結合部位のどちらにおいても、HIF-1 $\alpha$  NLSは主鎖が伸びたコンフォメーション(extended conformation)をとって importin- $\alpha$ 1 に結合していた。HIF-1 $\alpha$ の residues 723-750（3つのグリシン残基を含む領域）に相当する明瞭な電子密度は観測されなかったため、この領域は結晶中で disorder しており、importin- $\alpha$ 1 と直接結合しない領域であると思われる。この結晶構造解析により、importin- $\alpha$ 1 による HIF-1 $\alpha$  NLS（野生型）認識機構の詳細が原子レベルで明らかになった。2箇所の結合部位のどちらにおいても、水素結合のネットワークと疎水性相互作用を組み合わせた広範な相互作用により、HIF-1 $\alpha$  NLS（野生型）は importin- $\alpha$ 1 に特異的に結合していた。インシリコでの自由エネルギー計算により、結合インターフェースのいくつかのアミノ酸残基が、複合体形成において特にエネルギー的寄与が高いことが示唆された。

（2）本研究ではさらに、核移行効率が下がることが知られている HIF-1 $\alpha$ 変異体( $\Delta$ 724-751)と importin- $\alpha$ 1 の複合体についても結晶化に成功し、1.9 Å 分解能で結晶構造を解き、HIF-1 $\alpha$ の  $\Delta$ 724-751 変異が importin- $\alpha$ 1 との相互作用に及ぼす影響を構造的に明らかにした(結晶構造は free R-factor 20.8%まで精密化した)。この変異体の共結晶では、HIF-1 $\alpha$ は importin- $\alpha$ 1 の二箇所ではなく一箇所 (ARM2~ARM4) にのみ結合していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuura Yoshiyuki, Miyawaki Kazuya	4. 巻 652
2. 論文標題 Structures of importin- bound to the wild-type and an internal deletion mutant of the bipartite nuclear localization signal of HIF-1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.02.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------