

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22121006

研究課題名（和文）核輸送関連の核内複合体の構造解析と放射光測定法の改良

研究課題名（英文）Structural basis for nuclear transport mechanism by the nuclear transport receptor and improvement of a synchrotron beamline.

研究代表者

山下 栄樹 (Yamashita, Eiki)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：00294132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 50,300,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物では、細胞が正常にかつ効率よく機能するためには、核と細胞質の間で連携した物質輸送が必要である。核-細胞質間物質輸送では、輸送担体が分子量の大きな積荷分子を認識し、輸送担体-積荷分子複合体を形成し核膜を通過する。本研究では、核-細胞質間物質輸送において、輸送担体がどのように積荷分子を認識し、どのような仕組みで核膜を通過するのかを、放射光を用いた高精度測定により得られた複合体構造に基づいて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Nucleocytoplasmic transport is essential for the function of eukaryotic cells. Nucleocytoplasmic transport of large molecules, including proteins and RNAs, require transport receptors. The transport receptors recognize cargo molecule and the receptor-cargo complexes are translocated through the nuclear pore complex. Here, we solved crystal structures of a transport receptor and transport receptor complex with the high accuracy measurement using a improved synchrotron beamline for the cell structural biological research.

研究分野：構造生物学

キーワード：細胞構造生物 核-細胞質間輸送 X線結晶構造解析 放射光

1. 研究開始当初の背景

(1) 核輸送複合体の構造解析

① RNA 核外輸送に関わる複合体の構造解析
タンパク質合成に必須の tRNA や RNA 干渉の主要な役である microRNA(miRNA) など non-coding RNA(ncRNA) が生命の維持に重要な働きがあることが見いだされてきた。これら ncRNA は核内で転写され、核からそれぞれの働きのある細胞質に運ばれる。tRNA や miRNA の核-細胞質間輸送で輸送担体として機能するのが、importin- β ファミリーの exportin-t (Expt) や exportin-5 (Exp5) である。Expt は tRNA だけを輸送し、Exp5 は多種の小さな ncRNA を認識し輸送する。

研究代表者は、pre-miRNA \cdot Exp5 \cdot RanGTP 複合体の結晶構造解析に成功し、miRNA の生合成過程で必須の核外輸送の機構を明らかにした。同時期に、tRNA \cdot Expt \cdot RanGTP 複合体及び Expt 単体の結晶構造が報告され、Expt による tRNA の捕捉様式について明らかにされた。報告された構造を比較すると、Expt と Exp5 とで RNA の認識方法が異なっていた。

② 細胞分化に関わる核輸送複合体の構造解析

研究代表者はこれまでにコレステロール代謝に関わる転写因子と輸送担体 importin- β との複合体の X 線結晶構造解析に成功し、輸送担体が転写因子を認識し効率よく運ぶ仕組みを明らかにした。細胞の分化に関わる転写因子は、核局在シグナル受容体である輸送担体 importin- α よって認識され輸送される。importin- α は、動物細胞では大きく分けて3つのサブタイプがあり、それぞれが特異的に異なる転写因子を認識し輸送する。この輸送の種分けが、細胞分化と密接に関わることが明らかになった。

(2) 放射光測定法の改良

研究代表者は、生体内の種々の超分子複合体の構造解析を進めながら、高精度の回折強度を得るための放射光ビームラインの技術開発を行ってきた。離散集合を繰り返す輸送担体-積荷分子複合体の構造解析では、結晶が多結晶になり易く、放射光ビームラインを利用した回折強度データ収集でも困難を要した。

2. 研究の目的

(1) 核輸送複合体の構造解析

① RNA 核外輸送に関わる複合体の構造解析
Exp5 における多種の ncRNA と結合様式を pre-miRNA \cdot Exp5 \cdot RanGTP 複合体の結晶構造から推測したが、実際の複合体でないため、pre-miRNA 以外の認識機構などについて未解決の課題が多くある。また、1 状態の構造しか得られていないため、Exp5 の複合体形成過程についても未解決である。本研究では、これらの課題を解決するために、Exp5 の核外輸送過程に出現する他の構造状態の結晶構造

解析を行った。

② 細胞分化に関わる核輸送複合体の構造解析

本研究では、importin- α が細胞分化に関わる適切な転写因子をどのように種分けするのかを明らかにするために、それら転写因子群と importin- α との複合体の構造解析を行った。

(2) 放射光測定法の改良

微量な結晶や多結晶から高精度な測定を行うために、ビームラインをミニビームに対応可能に改良し、効率よく高精度の回折強度を収集する方法の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 核輸送複合体の構造解析

① RNA 核外輸送に関わる複合体の構造解析
Exp5 は分子全体が柔軟な構造であると予想されたので、純度を上げるための精製条件の検討と単分散で安定なバッファー条件の検討が重要であると考え、ゲル濾過、動的光散乱法や X 線小角散乱法を用いて精製純度及び安定なバッファー条件下の検索を行った。精製条件が確定した後、結晶化条件の探索を行った。得られた結晶が安定に保存できる凍結条件を探索し、放射光ビームラインで回折実験を行った。精度の高い回折強度データを用いて、分子置換法を利用し Exp5 の構造解析を行った。

Exp5 と RanGTP が溶液状態で安定に存在できるかどうかの確認実験を行った。高純度に精製された Exp5 と RanGTP を混ぜてゲル濾過を行い、得られたピークについて電気泳動法を用いて同じピーク位置に Exp5 と Ran が存在することを確認した。Exp5 \cdot RanGTP 複合体結晶の回折強度データ処理を行い、構造精密化を行った。

② 細胞分化に関わる核輸送複合体の構造解析

細胞分化に関わる転写因子の核への輸送を担う輸送担体 importin- α 1 (impA1) と importin- α 5 (impA5) の大腸菌を用いた大量発現系をそれぞれ構築した。両輸送担体について、His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製を行い、動的光散乱法を用いて試料の単分散性を検討しながら、結晶化の探索を行った。impA1 については結晶が得られ、回折強度データを収集した後、分子置換法により構造解析を行った。

細胞分化に関わる転写因子 (Oct3/4 および Oct6) が持つ核輸送シグナル (NLS) ペプチドと impA1 との複合体の結晶化を行なった。impA1 と Oct6 との複合体の結晶は得られなかったが、Oct3/4 との複合体については結晶構造解析を行った。

(2) 放射光測定法の改良

放射光ビームラインのミニビーム化に対応するために、高精度高速試料回転軸の導入を行い、多結晶から効率良く回折強度データが得られるようにセンターリングソフトウェアの改良を行った。光学機器の振動対策を行いビーム強度の安定化を図った。微少な結晶の構造解析でも、特定原子種（硫黄やリン等）の位置を容易に決定するための測定法の開発を行った。

4. 研究成果

(1) 核輸送複合体の構造解析

① RNA 核外輸送に関わる複合体の構造解析

積荷分子が結合していない状態の Exp5 単体と Exp5・RanGTP 複合体の構造を、それぞれ 3.3Å、3.0Å 分解能で明らかにした(図 1、図 2)。

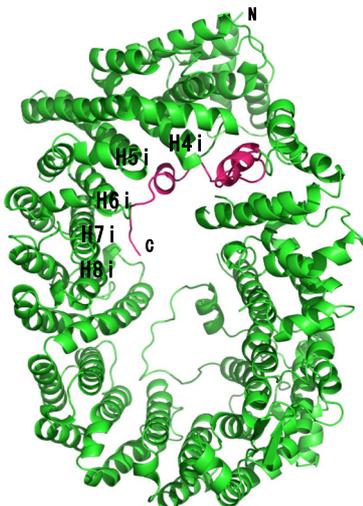


図 1. Exp5 単体の構造

赤：観測された C 末領域

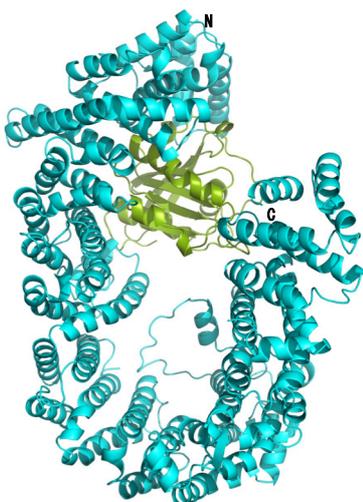


図 2. Exp5・RanGTP 複合体の構造

黄緑：RanGTP

Exp5 単体の構造では、既報の pre-miRNA・Exp5・RanGTP 複合体の構造では観測できなかつた C 末端領域の 72 残基のうち、48 残基が観測された。観測された C 末端領域は、HeatRepeat 4 (H4) から HeatRepeat 8 (H8) までの内側ヘリックスと相互作用しており、Exp5 単体の全体構造は楕円体のような構造を取っていた(図 1)。Exp5 単体で観測できた C 末領域を欠損させると Exp5 が精製できないことから、この領域は Exp5 単体時の安定性に寄与しているのではないかと考えられる。

Exp5・RanGTP 複体内での Exp5 の構造は、pre-miRNA・Exp5・RanGTP 複体内の Exp5 の構造とほぼ一致した(図 3(b))。

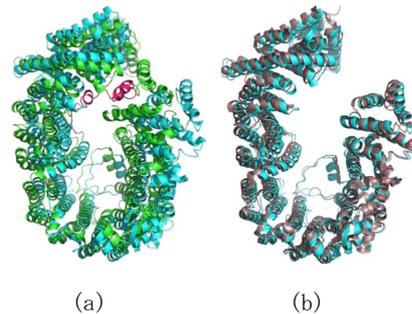


図 3. 各状態での Exp5 の構造比較

(a) Exp5 単体時と Exp5・RanGTP 複合体時の Exp5 の構造比較

(b) Exp5・RanGTP 複合体時と microRNA・Exp5・RanGTP 複合体時の Exp5 の構造比較

緑色：Exp5 単体時

水色：Exp5・RanGTP 複合体時

桃色：microRNA・Exp5・RanGTP 複合体時

3 状態における Exp5 の構造比較(図 3)を行ったところ、単体と Exp5・RanGTP 複合体の C α 間の r. m. s. d 及び Exp5・RanGTP 複合体と pre-miRNA・Exp5・RanGTP 複合体の C α 間の r. m. s. d はそれぞれ 5.7Å と 1.1Å であった。つまり、Exp5 に Ran が結合することにより Exp5 が大きく構造変化し(図 3(a))、stem 構造を持つ RNA を結合できる構造を取ることが分かった。このことから、Exp5 はまず Ran と結合することによって RNA を捉える構造を形成し、次に stem 構造を持つ RNA を認識し捕捉することが構造解析から明らかになった。

② 細胞分化に関わる核輸送複合体の構造解析

impA1・Oct3/4 複合体について、2.5Å 分解能で構造解析に成功し、impA1 に新規の NLS 結合部位を見出すことに成功した(図 4)。

新しく見つかった NLS 結合部位は impA1 の C 末端領域にあり、すでに知られていた 2 箇所の結合部位(major と minor 部位)が湾曲した impA1 分子の内側に存在するのに対して、外側に位置していた。NLS は数個の塩基性アミノ酸残基が並んだ領域であり、転写因子によりその配列が僅かに異なる。転写因子が持つ NLS の僅かなアミノ酸残基の違いを、impA1 は異なった NLS 結合部位で認識し、NLS が占有した部位によって核への輸送を制御しているのではないかと考えられる。

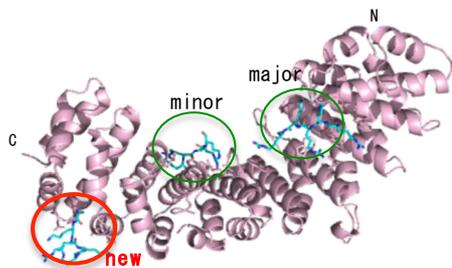


図 4. impA1-NLS ペプチド複合体の構造
スティックモデル：ペプチド

(2) 放射光測定法の改良

試料の回転偏差を $0.5\mu\text{m}$ 以下に抑え、同軸結晶観察装置と組み合わせることにより、結晶中の測定位置を μm 精度で合わせられるようになった。ビーム強度の安定化を行い、小さなビーム径を用いて微量な結晶から安定にデータ収集が可能となった。ファージの細菌への感染時に宿主細胞の膜を突き破る central-spike 蛋白質の構造解析では、薄い小さな結晶(厚さ $20\mu\text{m}$ 以下)から重原子同形置換法によって構造解析に成功し、蛋白質内に存在していた金属イオンの種類を放射光の波長可変性を利用して同定した(図 5)。

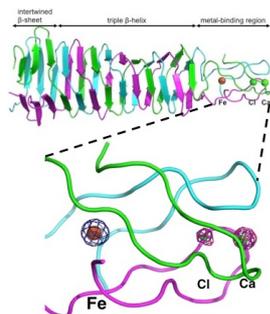


図 5. central-spike 蛋白質構造(上)
異常散乱(下)

青色籠：波長 1.74\AA の異常散乱差
桃色籠：波長 1.75\AA の異常散乱差

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① Song J., Kose S., Watanabe A., Son S. Y., Choi S., Hong H., Yamashita E., Park I. Y., Imamoto N., Lee S. J., Structural and functional analysis of Hikeshi, a new nuclear transport receptor of Hsp70s., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, D71, 473-483 (2015). 査読有

② Choi S., Yamashita E., Yasuhara N., Song J., Son S. Y., Won Y. H., Hong H. R., Shin Y. S., Sekimoto T., Park I. Y., Yoneda Y., Lee S. J., Structural basis for the selective nuclear import of the C2H2 zinc-finger protein Snail by importin β .,

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., D70, 1050-1060 (2014). 査読有

③ Harada K., Yamashita E., Nakagawa A., Miyafusa T., Tsumoto K., Ueno T., Toyama Y., Takeda S., Crystal structure of the C-terminal domain of Mu phage central spike and functions of bound calcium ion., *Biochim Biophys Acta.*, 1834, 284-291 (2013). 査読有

④ Yamashita E., Nakagawa A., Takahashi J., Tsunoda K. I., Yamada S., Takeda S., The host-binding domain of the P2 phage tail spike reveals a trimeric iron-binding structure., *Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, F67, 837-841 (2011). 査読有

⑤ Lee S. J., Jiko C., Yamashita E., Tsukihara T., Selective nuclear export mechanism of small RNAs., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 21, 101-108 (2011). 査読有

[学会発表] (計 14 件)

① 山下栄樹, SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (大阪大学蛋白質研究所) BL44XU の現状、日本放射光学会、2015. 1. 10、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

② Eiki Yamashita, Akifumi Higashiura, IPR Beamline for Macromolecular Assemblies at SPring-8 (BL44XU), IUCr2014, 2014. 8. 5 Montreal

③ 山澤龍治、山下栄樹、リガンドフリー型 Exportin-5 の構造解析、日本結晶学会年会、2013. 10. 12、熊本大学 (熊本)

④ 山澤龍治、山下栄樹、Exportin-5 による RNAs の核外輸送メカニズムの解明、日本蛋白質科学会、2012. 6. 22、名古屋大学

⑤ 山下栄樹、SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (大阪大学蛋白質研究所) BL44XU の現状、日本放射光学会、2012. 1. 8、鳥栖市民文化会館

⑥ 山下栄樹、SPring-8 阪大蛋白研ビームライン BL44XU の現状、日本結晶学会、2010. 12. 3-5、大阪大学

⑦ 山下栄樹、pre-microRNA 核外輸送複合体の X 線結晶構造解析、BMB2010、2010. 12. 10、神戸国際会議場

⑧ 山下栄樹、タンパク質合成を抑制する小さな RNA を輸送する仕組みの解明、SPring-8 合同コンファレンス、2010. 11. 4、東京ステ

⑨ Soo Jae Lee、Eiki Yamashita、Nuclear translocation machinery of pre-microRNA.、AsCA2010、2010. 11. 1、プサン（韓国）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 栄樹 (YAMASHITA, Eiki)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：00294132

(2) 連携研究者

東浦 彰史 (HIGASHIURA, Akifumi)

大阪大学・蛋白質研究所・特任助教

研究者番号：90598129

（平成 25 年度より参画）

(3) 研究協力者

山澤 龍治 (YAMAZAWA, Ryuji)

大阪大学・蛋白質研究所・博士研究員

（平成 23 年度より参画）

小林 武 (KOBAYASHI, Takeshi)

大阪大学大学院・理学研究科・博士前期課程
（平成 23 年度の 1 年間参画）

松本 愛弥 (MATSUMOTO, Ami)

大阪大学大学院・理学研究科・博士後期課程
（平成 25 年度より参画）