

平成22年 6月26日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18687010

研究課題名(和文) 核外輸送機構の多様性と同一性

研究課題名(英文) Molecular mechanism of nuclear export: variations on a theme

研究代表者

松浦 能行 (MATSUURA YOSHIYUKI)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10402413

研究成果の概要：真核細胞では、核と細胞質の間での物質のやりとりが不可欠であり、多様な核・細胞質間輸送システムによって真核細胞の生理機能が巧みに調節される機構を明らかにすることは、細胞生物学のひとつの重要課題である。本研究では、特に生理的に重要で一般的興味が高い exportin である CRM1 によって担われる核外輸送経路について、輸送の方向性の鍵を握る、細胞質における解体反応中間体の結晶構造を高分解能で解き、輸送基質と CRM1 の結合・解離のアロステリック制御機構を提唱するに至った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	19,200,000	5,760,000	24,960,000
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：X線結晶解析、細胞内輸送、核外輸送受容体

1. 研究開始当初の背景

生体高分子の細胞内の時空動態はその機能にとって極めて重要である。本研究の主題である核と細胞質の間での高分子輸送は、核膜孔を通しておこる選択的な能動輸送であり、シグナル伝達や細胞周期の制御などさまざまな生理的意義をもつ。この輸送はほとんどの場合、可溶性の輸送因子である importin あるいは exportin によって担われており、低分子量 G タンパク質 Ran が輸送を制御している。Importin は輸送基質を細胞質から核に運び(核内輸送)、輸送基質は核内で RanGTP

によって importin から解離される。対照的に exportin は核内で RanGTP および輸送基質と 3 者複合体(核外輸送複合体)を形成し、核から細胞質に輸送基質を運び出す(核外輸送)。Importin, exportin というのはそれぞれ一群のタンパク質の総称で、個々の importin あるいは exportin は特定の輸送基質を特異的に認識して運び、たくさんの輸送基質が存在するがゆえに輸送経路には多様性がある。さらに、核膜孔を通過するときの輸送経路も多様である(すなわち全ての輸送因子が核膜孔の中の全く同じルートをたど

るのではない) ことを示唆する報告もあり、多様な両方向 (核への import, 核からの export) の輸送経路によって真核細胞の生理機能が巧みに調節される機構を明らかにすることは細胞生物学のひとつの中心的課題である。

歴史的には、核外輸送よりも核内輸送の方が機能解析と構造解析がはやくから進んでいた。本研究を開始した時点では、核外輸送複合体としては、研究代表者が 2004 年に解いた、importin- α を核外輸送する 3 者複合体の結晶構造 (Matsuura & Stewart, Nature, 2004) が唯一解かれていたのみであり、他の数多くの核外輸送経路についての構造基盤は未解明のままであった。

2. 研究の目的

CRM1 は最も代表的な核外輸送受容体 (exportin) である。CRM1 は細胞周期間期においては、Leu-rich NES (Nuclear Export Signal) をもつ輸送基質 (cargo) を核から細胞質に運ぶ。さらに CRM1 は、細胞分裂期において有糸分裂紡錘体の形成や中心体の数の制御などの重要な機能をもつ。これら CRM1 が担う生理機能の根幹は、Ran GTPase が作り出す細胞内位置情報に基づいて、CRM1 と NES-cargo の結合・解離が制御されることにある。RanGTP の濃度が高く保たれている場所 (間期では核内) では CRM1:NES:RanGTP 複合体が形成されるが、RanBP1 と RanGAP が存在する場所 (間期では細胞質) では Ran による GTP 加水分解が促進され、NES が CRM1 から解離する (図 1)。NES 解離反応においては、まず CRM1:NES:RanGTP 複合体に RanBP1 が結合することで NES が解離する。次に、かわりに形成された CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体に対して RanGAP が作用することで Ran が GDP 型になって 3 者複合体が解体する。CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体は NES の解離を速やかに進めるために重要な反応中間体である。また、RanBP1 は核膜孔を受動拡散で通過できる小さいタンパク質であるため、細胞質に局在させるためには核から排除する仕組みが必要である。この RanBP1 核外輸送は CRM1 が担っている。したがって RanBP1 は CRM1 によって核外輸送される cargo のひとつでもある。本研究では CRM1 が形成する各種複合体の原子レベルの構造解析を行うことにより、CRM1 が担う「核外輸送」と「細胞分裂制御」の基本となる分子メカニズムを理解することを目指した。ここでは CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体の X 線結晶解析について報告する。

3. 研究の方法

CRM1, RanBP1, Ran は全て大腸菌で大量発

現させ、His タグと GST タグを利用したアフィニティー精製とゲルろ過クロマトグラフィーにより、結晶化のための CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体を調製した (タグは精製の途中で TEV プロテアーゼにより除去した)。結晶化は蒸気拡散法 (hanging drop または sitting drop) により行った。X 線回折データをシンクロトロン放射光施設 Photon Factory のビームライン BL-5A ならびに SPring-8 のビームライン BL41XU にて収集し、分子置換法により構造解析を行った。

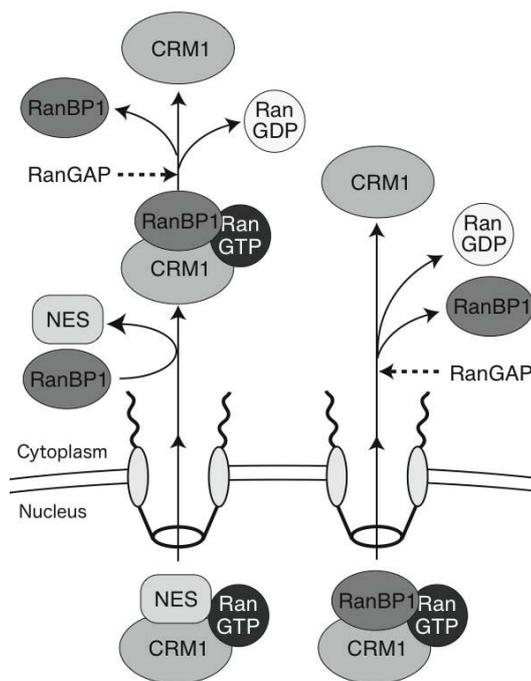


図 1 CRM1 による核外輸送経路

4. 研究成果

CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体の結晶 (図 2) は正方晶系 (tetragonal) で空間群 $P4_32_12$ 、格子定数 $a=b=106.1 \text{ \AA}$, $c=303.0 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であり、非対称単位あたり複合体がひとつしか入り得ない、解析に適したものであった。シンクロトロン放射光施設で 2.0 \AA 分解能まで回折し、高精度の構造解析に成功した (最終的に $R_{\text{free}} 22.1\%$, $R_{\text{cryst}} 17.5\%$ まで構造精密化した)。

図 3 に示すように、CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体では、RanBP1:RanGTP のまわりを取り巻くように CRM1 が結合していた。アミノ酸配列から推測されていたように、CRM1 はほぼ全長にわたって HEAT リピート構造をしており、ところどころに長いループが挿入されていた。特に長いのが HEAT9 の 2 つの α -ヘリックス間のループ (以下 HEAT9 ループと略称する) である。

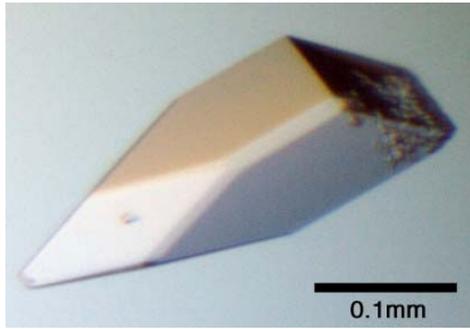


図2 CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体の結晶

この CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体を私たちが解いたのとはほぼ同時期に、海外のグループによって CRM1:snurportin-1:RanGTP 複合体の結晶構造が報告された (Monecke et al., Science, 2009)。Snurportin-1 は CRM1 の cargo の一種で、N 末端に Leu-rich NES をもつ。CRM1:snurportin-1:RanGTP 複合体の結晶構造は、Leu-rich NES の結合部位が HEAT11 と HEAT12 の外側ヘリックスの間の疎水性の溝であることを示すものであった。

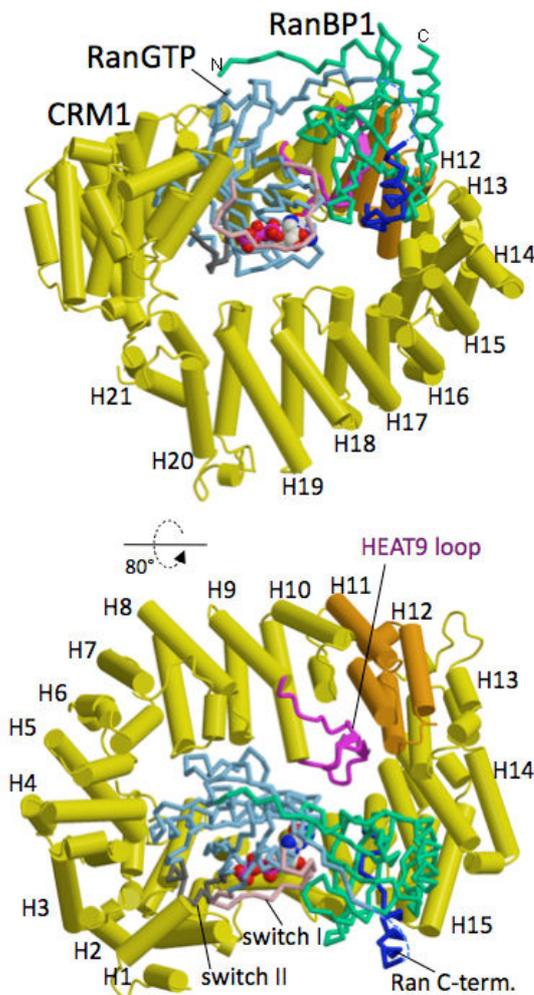


図3 CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体の結晶構造

興味深いことに、私たちが解いた CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体の結晶構造においては、Leu-rich NES 結合部位は閉じた構造をしていた。これは RanBP1 が NES-cargo の解離を促進することとつじつまがっており、図3の構造は NES-cargo が解離した直後の構造 (post-dissociation complex) に対応すると考えられる。

CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体において、RanBP1 は NES 結合部位から遠く離れた位置に結合している。HEAT9 ループは、NES-cargo が結合したときの構造と、RanBP1 が結合したときの構造が大きく異なっており、この HEAT9 ループが、RanBP1 結合部位と NES 結合部位の間の遠隔コミュニケーションの鍵を握っていると思われる。すなわち、図4に示すように、RanBP1 が結合すると、cargo が結合しているときに HEAT9 ループが位置するところに RanBP1 と RanGTP の一部がはまり込み、

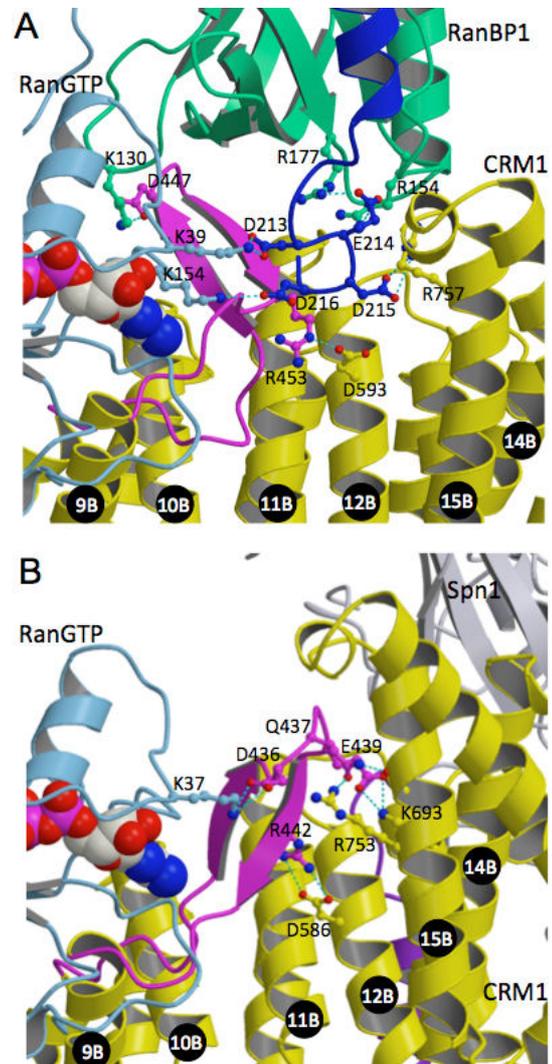


図4 HEAT9 ループ (紫色) の構造変化
(A) CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体
(B) CRM1:snurportin-1:RanGTP 複合体

HEAT9 ループが押し出される。その結果、HEAT9 ループは HEAT11-12 の内側表面に移動する。このとき、HEAT11-12 の内側の疎水性残基と HEAT9 ループの疎水性残基の間のパッキングを密にするように CRM1 の構造変化がおこり、HEAT11-12 の外側に位置する NES 結合部位の溝が閉じる (図 5)。このように、HEAT9 ループの変化によるアロステリック機構により、RanBP1 は NES-cargo の速やかな解離を引き起こすと考えられる。

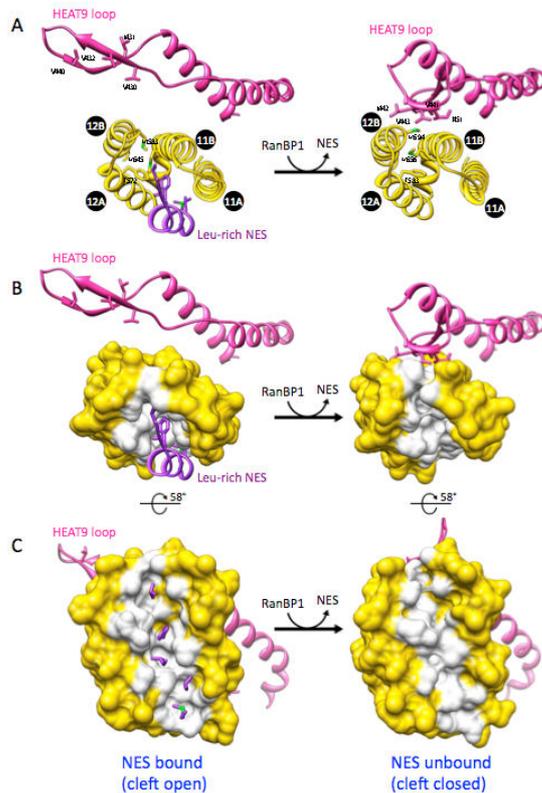


図 5 RanBP1 による NES 解離促進機構

私たちが現在行っている変異体解析の結果は、結晶構造解析から推測されるアロステリック機構を支持している。また、私たちは CRM1 の構造動態と機能の関係を溶液中や細胞内で検証するための蛍光エネルギー移動 (FRET) の系も立ち上げており、これらの本研究の成果は、核外輸送機構を深く理解するための今後の研究に大いに活用できるものと思われる。

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 1 件)

Koyama, M. & Matsuura, Y. An allosteric mechanism to displace nuclear export cargo from CRM1 and RanGTP by RanBP1. *EMBO J.*, 29: 2002-2013 (2010). 査読有

[学会発表] (計 1 件)

齊藤なつみ、小山昌子、松浦能行「NES/RanGTP 結合に伴う CRM1 構造変化の FRET による検出」第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会 2008 年 12 月 12 日 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 能行 (MATSUURA YOSHIYUKI)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：10402413

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：