

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370041

研究課題名（和文）

核外輸送因子複合体との結晶構造解析による tRNA 核外輸送機構の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of nuclear export machinery of tRNA by crystal structural analysis of exportin/tRNA complex

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

研究成果の概要（和文）：真核生物では、遺伝情報を保持する核と蛋白質合成の場である細胞質が、核膜によって隔てられているため、生命の維持や活動には輸送因子に関わる核-細胞質間の連携した物質輸送が必須である。本研究では、生命の維持に重要な働きを担うノンコーディング RNA を核外に輸送する機能として働く輸送因子について、各状態での輸送因子の構造解析を行い、得られた構造を基に構造変化を見出し、核外輸送因子がなぜ多種のノンコーディング RNA を認識でき、どのような機構で核外に輸送するのかを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotic cells, the nucleus, where transcription occurs, and the cytoplasm, where translation takes place, are separated by the nuclear envelope. The regulation of nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNAs is essential for biological activity. Here, we solve crystal structures of a nuclear export factor and export factor complex for non-coding RNA export from the nucleus and the crystal structures reveal RNA recognition mechanism of the nuclear export factor transporting various non coding RNAs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X 線結晶解析・核-細胞質間物質輸送・構造生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 核-細胞質間物質輸送

① 真核生物では、生命の維持や活動に必要な遺伝情報を保持する核と、蛋白質合成の場である細胞質が、核膜によって隔てられ

ているため、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核膜を介した物質輸送が必要である。

② 蛋白質合成に必須の tRNA や RNA 干渉の主役である microRNA などノンコーディ

ング RNA が生命の維持に重要な働きがあることが見出された。これらノンコーディング RNA は核内で転写され、核からそれぞれの働きの場である細胞質に運ばれる。

③ tRNA や microRNA 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 や exportin-5 である。exportin-t は tRNA だけを輸送し、exportin-5 は多種の小さなノンコーディング RNA を認識し輸送する。

(2) RNA-核外輸送因子複合体の構造

① 我々は RNA 干渉の主役である pre-microRNA の生合成過程における核-細胞質間物質輸送の仕組みを明らかにするために、pre-microRNA/exportin-5/RanGTP 複合体の X 線結晶構造を行っており、2.9Å 分解能で決定することに成功した。構造解析の結果から、exportin-5 が pre-microRNA を捕捉し、安定に核外に輸送する機構について明らかにした。また、exportin-5 が多種の小さなノンコーディング RNA を認識し、輸送する仕組みについても提案した。

② 同時期に tRNA/exportin-t/RanGTP 複合体の結晶構造が 3.5Å 分解能で報告され、exportin-t による tRNA の捕捉様式について明らかにされた。

2. 研究の目的

構造解析された二つの輸送因子 exportin-5 と exportin-t との間にはアミノ酸配列の相同性は全くなく、exportin-5 は tRNA の核外輸送では、tRNA だけを輸送する場合と tRNA と共に翻訳伸長因子 eEF1A を輸送する場合がある。pre-microRNA/exportin-5/RanGTP 複合体から exportin-5/RanGTP による tRNA の結合様式を推測したが、exportin-t/RanGTP との結合様式に共通性が見られなかった。また、実際の tRNA/exportin-5/RanGTP 複合体構造ではないため、tRNA の 3' 末端塩基を認識する機構、RNA stem 領域との相互作用による tRNA の保持機構や tRNA 輸送に関連した翻訳因子 eEF1A との輸送機構など未解決の課題が多くあった。これらの課題を解決するために、tRNA/exportin-5/RanGTP 複合体の X 線結晶構造解析を行った。また、exportin-5 が多種の RNA を捕捉する仕組みを理解するために、exportin-5 の構造解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 輸送因子 exportin-5 の構造解析

① exportin5 の精製及び結晶化を行った。Exportin-5 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ゲル濾過や動的光散乱法を用いて単分散で安定なバッファー条件の検討が重要と考えを行った。安定なバッファー条

件下で結晶化条件の探索を行った。

② exportin-5 の回折実験及び構造構築を行った。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 exportin-5 の構造解析を行った。

(2) 輸送因子 exportin-5/輸送制御因子 RanGTP 2 複合体の構造解析

① exportin-5/RanGTP 2 者複合体が溶液状態で形成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 exportin-5 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 exportin-5 と Ran が存在するかを確認した。

② exportin-5/RanGTP 2 者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。

(3) 輸送基質 tRNA/輸送因子 exportin-5/輸送制御因子 RanGTP 3 複合体の X 線結晶構造解析

① tRNA/exportin-5/RanGTP 3 者複合体の結晶を得るための試料調製を行った。exportin-5, RanGTP と tRNA をそれぞれ精製し、精製した標品を混ぜて 3 者複合体を形成させた。続いて、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行い、3 者複合体の試料を調製した。

② tRNA/exportin-5/RanGTP 3 者複合体の結晶化条件の探索を行った。Pre-microRNA/exportin-5/RanGTP の結晶構造解析の結果から、輸送基質 tRNA が複合体化から解離しやすいのが予想できたので、3 者複合体が安定に存在できる条件を動的光散乱で観測しながら結晶化条件の探索を行った。

③ tRNA/exportin-5/RanGTP 3 者複合体結晶の回折実験を行った。

4. 研究成果

(1) 輸送因子 exportin-5 の構造

先行研究で用いられていた exportin-5 精製方法では、会合状態の違う 2 状態が溶液中に存在することがゲル濾過実験で分かった。塩の濃度やバッファーの pH 等を検討した結果、バッファー、の pH8.0、MgCl₂ 濃度が 10mM のときに、exportin-5 が単量体で安定に存在することを見つけた。この条件においては、ゲル濾過の溶出ピークが正規分布 (図 1) を示し、動的光散乱法では Pd が 17% であった。exportin-5 は分子全体が柔軟な構造であると予想されており、結晶を得ることは困難であると考えられていたが、exportin-5 単量体を安定にするバッファーを見つけたことにより、結晶化に成功した。得られた結晶を SPring-8 のビームラインで回折実験を行っ

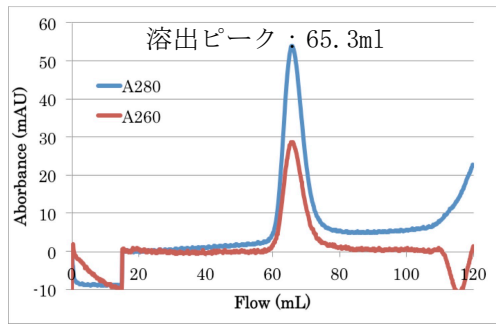


図1 exportin-5のゲル濾過

たところ、Completeness=99.3%、Redundancy=5.2、 $I/\sigma(I)=20.8$ 、 $R_{merge}=9.0\%$ の4.0Å分解能の回折強度データを収集することに成功した。このデータを用いて、分子置換法により初期位相を求め、構造精密化を行った。構造精密化の結果、 $R/R_{free}=27.3\%/31.5\%$ の輸送因子 exportin-5単体の構造を明らかにした(図2)。

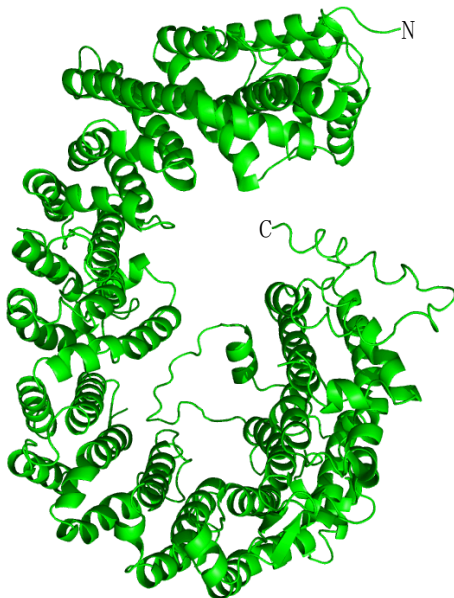


図2 exportin-5の構造

(2) 輸送因子 exportin-5/輸送制御因子 RanGTP 2者複合体の構造

高純度に精製された exportin-5 と RanGTP を混ぜてゲル濾過及び電気泳動実験を行ったところ、ゲル濾過による試料の溶出ピークが exportin-5 単体より高分子量側にシフトし、溶出ピーク内に exportin-5 と RanGTP が存在することを電気泳動により確認できた(図3)。このことから、溶液中において、exportin-5/RanGTP 2者複合体が形成できることを明らかにした。

3者複合体の結晶構造解析において、高塩濃度の結晶化条件から exportin-5/RanGTP 2者複合体の結晶が得られ、Completeness=82.3%、Redundancy=3.1、 $I/\sigma(I)=11.8$ 、 $R_{merge}=12.0\%$ の3.0Å分解能の回折強度デー

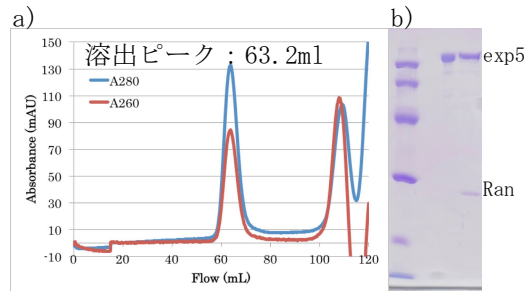


図3 2者複合体の形成確認

a) 2者複合体のゲル濾過

b) 溶出ピークの電気泳動

レーン1: マーカー

レーン2: exportin-5

レーン3: 溶出ピーク

タを収集することに成功した。先行研究で明らかにした pre-microRNA/exportin-5/RanGTP 複合体構造に含まれる exportin-5/RanGTP 複合体の構造をモデル分子とし、分子置換法により構造解析を行った。構造解析の結果、 $R/R_{free}=25.6\%/30.6\%$ の exportin-5/RanGTP 2者複合体の構造を明らかにした(図4)。

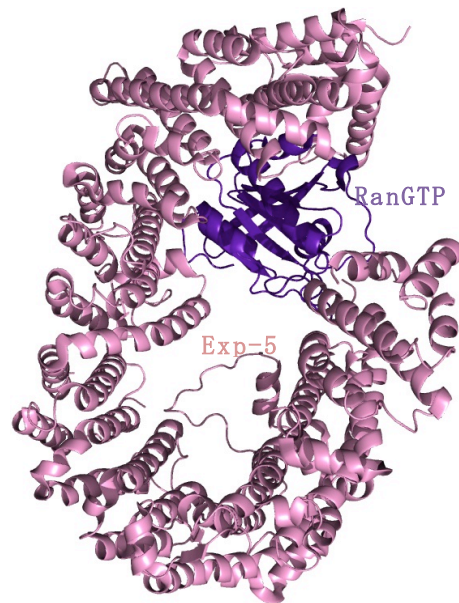


図4 exportin-5/RanGTP 複合体の構造

(3) 輸送基質 tRNA/輸送因子 exportin-5/輸送制御因子 RanGTP 3者複合体のX線結晶構造解析

tRNAの合成では、初期には市販キットを用いて1回の合成で1mg以下しか得られていなかったが、合成方法を改善し、大量(5~6mg)に合成することに成功した。これまでtRNAの合成収量が低かったために3者複合体形成実験が、困難であったが、tRNAの大量合成方法を確立したことにより、各蛋白質の同じ精製ロットを用いて3者複合体形成実験を多数行えることが可能になり、条件検討の精度を上げることができた。これにより、輸送基

質 tRNA/輸送因子 exportin-5/輸送制御因子 RanGTP 3 複合体が形成できることを明らかにした (図 5)。

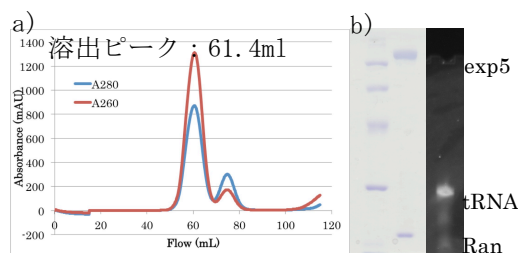


図 5 3 者複合体の精製結果

a)最終過程のゲル濾過

b)精製試料の電気泳動

レーン 1:マーカー

レーン 2:溶出ピーク (SDS)

レーン 3:溶出ピーク (アガロースゲル)

3 者複合体形成確認実験時のゲル濾過実験において、使った試料の大半がボイドにあり、かつ導入した tRNA の量以上に核酸量があることが分かった。先行研究で用いられていた RanGTP の精製方法では、持込の核酸量が多く、核酸が 3 者複合体形成を阻害していると考え、核酸を除去するために Ran 精製時に陰イオン交換カラムに通す工程を導入した。これにより複合体の形成効率が 7~8 倍に増えた。pre-microRNA との複合体形成では Ran 精製標品の持込の核酸によって阻害されず、tRNA との 3 複合体では阻害されやすいことから、exportin-5/RanGTP 核外輸送体は、tRNA より pre-microRNA との相互作用が強いと考えられる。

Ran の精製方法を改善したことにより、3 者複合体の収量が増え、同じ精製標品を用いて多くの結晶化条件探索が可能になった。2000 条件以上の結晶化条件を探索した結果、複合体の結晶を得ることに成功した (図 6)。得られた結晶を SPring-8 ビームラインで回折実験を行ったところ、130Å 分解能のところから回折斑点を観測でき、複合体の結晶であることが確認できた (図 7)。

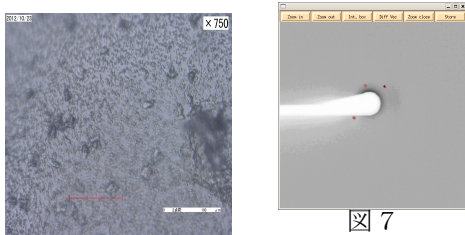


図 6 3 者複合体の結晶

図 7 3 者複合体結晶の回折像

(4) exportin-5 単体、exportin-5/RanGTP 複合体の結晶構造の結果から、exportin-5 は RanGTP が結合することにより、20 番目の heat repeat のヘリックスが 14Å 近く動き、単体より広がった構造に変化することを明らかにした (図 8)。このことから、RanGTP が exportin-5 に結合することで、RNA を捕捉す

る形を形成することが分かった。つまり、RNA の核外輸送では、まず exportin-5 と RanGTP とが結合し、次に、輸送基質である RNA が exportin/RanGTP 輸送複合体と結合するというプロセスであることを明らかにした。また、まず exportin-5/RanGTP 複合体が形成されることから、exportin/RanGTP 輸送複合体における多種の RNA を認識する部位は類似しており、exportin-5 の柔軟な構造が、様々な RNA を捕捉できる要因だと推察した。



図 8 exportin-5 の構造変化

緑色: exp-5 単体時の構造

桃色: 2 者複合体時の構造

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 10 件)

① Hasan S. S., Yamashita E., Baniulis D., Cramer W. A., Quinone-dependent proton transfer pathways in the photosynthetic cytochrome b6f complex., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **110**, (2013), 4297-4302, 査読有

② 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**, (2013), 284-291, 査読有

③ Zakharov S. D., Sharma O., Zhalnina M. V., Yamashita E., Cramer W. A., Pathways

of colicin import: utilization of BtuB, OmpF porin and the TolC drug-export protein., *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, (2012), 1463-1468, 査読有

④ Song J., Hong H., Choi S., Lee Y. H., Yamashita E., Bae S. C., Park I. Y., Lee S. J., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the human MST2 SARAH domain., *Acta Cryst.*, **F67**, (2011), 1403-1405, 査読有

⑤ Hasan S. S., Yamashita E., Ryan C. M., Whitelegge J. P., Cramer W. A., Conservation of Lipid Functions in Cytochrome bc Complexes., *J Mol. Biol.*, **414**, (2011), 145-162, 査読有

⑥ 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., *Acta Cryst.*, **F67**, (2011), 837-841, 査読有

⑦ Suga M., Yano N., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K., Maeda T., Yamashita E., Tsukihara T., Yoshikawa S., Distinguishing between C1(-) and O(2) (2-) as the bridging element between Fe(3+) and Cu(2+) in resting-oxidized cytochrome c oxidase., *Acta Cryst.*, **D67**, (2011), 742-744, 査読有

⑧ Matsuda M., Takeshita K., Kurokawa T., Sakata S., Suzuki M., Yamashita E., Okamura Y., Nakagawa A., Crystal structure of the cytoplasmic PTEN-like region of Ci-VSP provides insight into substrate specificity and redox regulation of the phosphoinositide phosphatase activity., *J. Biol. Chem.*, **286**, (2011), 23368-23377, 査読有

⑨ Takeshita K., Suetake I., Yamashita E., Suga M., Narita H., Nakagawa A., Tajima S., Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1)., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **108**, (2011), 9055-9059, 査読有

⑩ Lee S. J., Jiko C., Yamashita E., Tsukihara T., Selective nuclear export mechanism of small RNAs., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **21**, (2011), 101-108, 査読有

[学会発表] (計 10 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、2013. 1. 12、名古屋大学

② 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

③ 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

④ 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

⑤ 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

⑥ 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、東京ステーションコンファレンス

⑦ Soo Jae Lee, Eiki Yamashita, Nuclear translocation machinery of pre-microRNA., AsCA2010、2010. 11. 1、プサン (韓国)

⑧ 慈幸千真理、山下栄樹、microRNA 核外輸送複合体の X 線結晶構造解析、日本蛋白質科学会、2010. 6. 18、札幌コンベンションセンター

[図書] (計 1 件)

① 山下栄樹、X線結晶構造解析のためのタンパク質調製法、タンパク質実験ノート (上) 改訂第 4 版 (編/岡田雅人・宮崎香)、羊土社、(2011)、198-201

[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)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)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

(H22-H23)

小林 武 (KOBAYASHI TAKESHI)

大阪大学大学院・理学研究科・博士前期課程

1年

(H23)