

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23770110

研究課題名（和文）

CRM1による核外輸送：X線結晶構造解析から生細胞内機能メカニズム解明への展開

研究課題名（英文）

Nuclear export mediated by CRM1: from X-ray structures to mechanism in living cells

研究代表者

松浦 能行 (MATSUURA YOSHIYUKI)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：10402413

研究成果の概要（和文）：核と細胞質の間的高分子能動輸送は、真核細胞の多様な生理機能に必須である。CRM1は代表的な核外輸送受容体(exportin)であり、Leu-rich nuclear export signal (NES)をもつ輸送基質(cargo)を認識して核から細胞質に運び出す。CRM1による核外輸送では、まず核内でCRM1とNES-cargoとRanGTPが3者複合体(核外輸送複合体)を形成する。本研究では、出芽酵母のCRM1単独の結晶構造を2.1Å分解能で解き、CRM1-NES-RanGTP複合体との構造比較ならびに構造情報に基づいた変異体解析により、CRM1の自己阻害機構およびCRM1とNESの結合がRanGTPに依存する機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：Nucleocytoplasmic transport of macromolecules is a fundamental activity essential for a plethora of physiological functions of eukaryotic cells. CRM1 is a major nuclear export receptor (exportin) that mediates nuclear export of cargo macromolecules bearing a leucine-rich nuclear export signal (NES). In the nucleus, CRM1 binds cooperatively to RanGTP and NES-cargo, forming a trimeric complex. In this study, we determined X-ray crystal structure of unliganded *Saccharomyces cerevisiae* CRM1 at 2.1-Å resolution. Comparison with the structure of CRM1-NES-RanGTP complex and structure-based mutational analyses revealed the mechanism of autoinhibition of CRM1 and the mechanism by which the binding of NES to CRM1 depends on RanGTP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の大きな特徴は、脂質二重膜で囲まれた細胞内空間に、さらに脂質二重膜で仕切られたさまざまな細胞小器官（オルガネラ）をもつことである。核は真核細胞の中で最も目立つオルガネラである。核と細胞質が核膜によって隔てられているため、真核細胞ではさまざまな現象を空間的、時間的に制御することが可能になっており、これは真核細胞特有の高度な機能の基盤となっている。

核内で機能するタンパク質（ヒストンや転写因子、DNA複製・修復因子など）は、細胞質で合成された後に核内に輸送される必要がある。また逆に、核で転写されてプロセシングされたRNA（mRNAやtRNAなど）やリボソーム、核内で不要になったタンパク質（役割を終えた転写因子など）は核から細胞質に輸送されなければならない。また、核と細胞質がタンパク質やRNAをやりとりすることでコミュニケーションをとることは、

外部環境の変化に迅速に応答して遺伝子の転写量を調節するためのメカニズムとしても重要である。こうした核-細胞質間高分子輸送は、核膜を貫通する巨大なタンパク質複合体である核膜孔複合体を通しておこる。

低分子は核膜孔を自由拡散で通過できるが、5 nm 以上の大きさの高分子は、核膜孔複合体構成タンパク質群と相互作用する能力をもつ核輸送受容体と結合したときのみ、核膜孔を通過することができる。

核輸送受容体の大多数は、karyopherin- β ファミリーに属しており、輸送の方向性によって二種類に分けられる。核内輸送受容体(importin)は細胞質から核への輸送を担い、核外輸送受容体(exportin)は核から細胞質への輸送を担う。輸送の方向性はRan GTPaseによって制御されている。RanによるGTP加水分解は、核-細胞質間高分子輸送の駆動力(エネルギー源)を供給し、輸送基質(cargo)を濃度勾配に逆らって輸送することを可能にしている。

2. 研究の目的

CRM1は代表的なexportinである。CRM1によって運ばれるcargoには、細胞内シグナル伝達で重要なPKIやMAPKK、細胞周期制御に関わるCyclin B1、さらにはリボソームサブユニットなど、真核細胞において機能的に重要なタンパク質やRNA・タンパク質複合体が多数ある。CRM1のcargoはLeu-rich nuclear export signal (NES)をもつものが多い。Leu-rich NESは数個のロイシン残基(あるいは似たような疎水性アミノ酸残基)が適当な間隔で並んだものである。

CRM1による核外輸送では、まず核内でCRM1とNES-cargoとRanGTPが3者複合体(核外輸送複合体)を形成する。この複合体はCRM1と核膜孔複合体構成タンパク質群の相互作用によって核膜孔を通過する。細胞質では、RanによるGTP加水分解を促進するタンパク質群(RanBP1/2, RanGAP)のはたらきにより、NES-cargoがCRM1から解離し、Ranに結合したGTPが速やかに加水分解され、NES-cargoの解離は不可逆となる。

最近、CRM1-NES-RanGTP複合体の結晶構造がいくつかのNESについて解かれ、CRM1によるLeu-rich NESの特異的認識機構(CRM1外側表面の疎水性の溝にNESの疎水性側鎖がはまる)の理解が進んだ。これと同時に当研究室では、細胞質での核外輸送複合体解体反応中間体に相当するCRM1-RanBP1-RanGTP複合体の結晶構造を解き、「RanBP1がCRM1の構造変化を引き起こし、NES結合部位をopen状態からclosed状態に変化させることにより、NES-cargoの解離を促進する」というアロステリック機構を明らかにした。残された未解

決課題の一つは、CRM1とNESの結合がRanGTPに依存する機構の解明である。「CRM1単独で最も安定な構造がNES結合型の構造とは異なり、CRM1をNES結合型の構造に変化させるためにRanGTPの結合エネルギーが利用されているということが、CRM1とRanGTPが協同的にNESを認識する機構の核心である」と推測されてきたが、その機構を確立するにはCRM1単独の構造を高分解能で解くことが必要不可欠であった。そこで私たちはCRM1単独の結晶構造を2.1Å分解能で解き、一連の結晶構造から推測されるメカニズムを機能解析により検証した。

3. 研究の方法

出芽酵母のCRM1を大腸菌で大量発現し、精製、結晶化した。Spring-8ビームラインBL41XUでX線回折データを収集し、多波長異常分散法により、結晶構造を解いた。結晶構造に基づいて、CRM1の部位特異的変異体を作製し、変異がCRM1核外輸送複合体アッセイに及ぼす影響をブルダウンアッセイで調べた。

4. 研究成果

(1) CRM1単独の高分解能X線結晶解析

当初、さまざまな生物種のCRM1について、全長、野生型のコンストラクトで結晶化を試みたが、良好な結晶は得られなかった。しかし出芽酵母のCRM1について、CRM1の機能に必須でないループを2カ所削除したコンストラクトを用いて、高分解能まで回折する結晶を得ることに成功した(図1)。

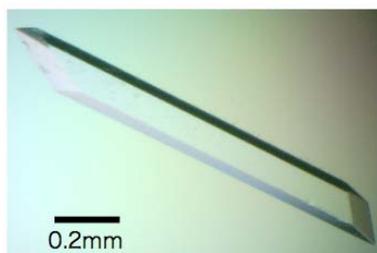


図1 出芽酵母 CRM1 単独の結晶

得られた結晶は空間群 $P4_1$ に属し、非対称単位あたり CRM1 が1分子含まれる結晶であった。まず native 結晶の X 線回折データセットを 2.1Å 分解能で収集した。次に SeMet 置換結晶について、Se の吸収端付近で 3 波長 MAD データセットを 2.4Å 分解能で収集した。MAD phasing と位相拡張により 2.1Å 分解能で計算した電子密度マップは容易に解釈可能であり、原子モデルの構築も容易であった。最終的に R-free 21.7% まで構造精密化した。

CRM1 は大きなリング状の構造をしており、21 個の HEAT リピートが繰り返してできてい

る (図 2)。

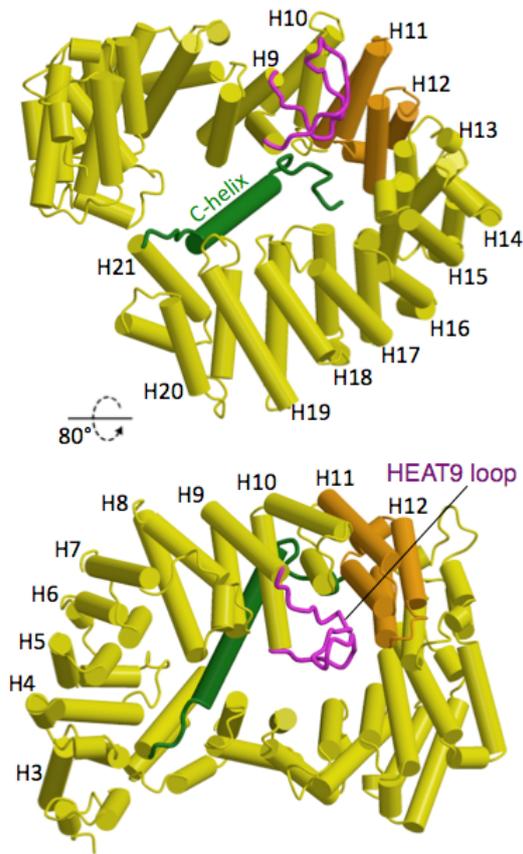


図 2 CRM1 単独の結晶構造

(2) CRM1 の自己阻害機構

今回解いた CRM1 単独の構造を、CRM1-NES-RanGTP 複合体における CRM1 の構造と比較すると、いくつか大きな違いがある。私たちがかつて変異体解析に基づいて予想した通り (Koyama & Matsuura, 2010, EMBO J.), CRM1 単独では HEAT9 ループが HEAT11, 12 の内側表面 (NES 結合部位の反対側) に結合しており、NES 結合部位が閉じた状態になっている (図 3)。HEAT9 ループと HEAT11, 12 のコンフォメーションに関しては、CRM1 単独と CRM1-RanBP1-RanGTP 複合体は全く同じである。HEAT9 ループと HEAT11, 12 の間の相互作用でとくに重要なのは、結合インターフェース中央における疎水性相互作用である。HEAT9 ループは、Ran との結合に重要な酸性残基をいくつかもっているため、しばしば acidic loop とよばれるが、HEAT9 ループには極めて良く保存された疎水性残基がいくつかあり、CRM1 の V441, L442, V443, I451 がクラスターになって HEAT11, 12 の内側表面と疎水性相互作用をし、HEAT9 ループと HEAT11, 12 のインターフェースの疎水性コアとなっている。HEAT9 ループと HEAT11, 12 の間の相互作用はこの疎水性相互作用だけで

はなく、さまざまな残基間の水素結合やファンデルワールス相互作用もあるが、とくにこの疎水性相互作用で HEAT12 の B-helix の M594, M556 が HEAT9 ループにひきつけられることにより、HEAT9 ループと HEAT11, 12 のインターフェースにおける shape complementarity が最適化されているように見える。この結果、CRM1 単独では HEAT11 の A-helix と HEAT12 の A-helix の間の疎水性の溝が閉じ、NES が結合できない状態になっている。

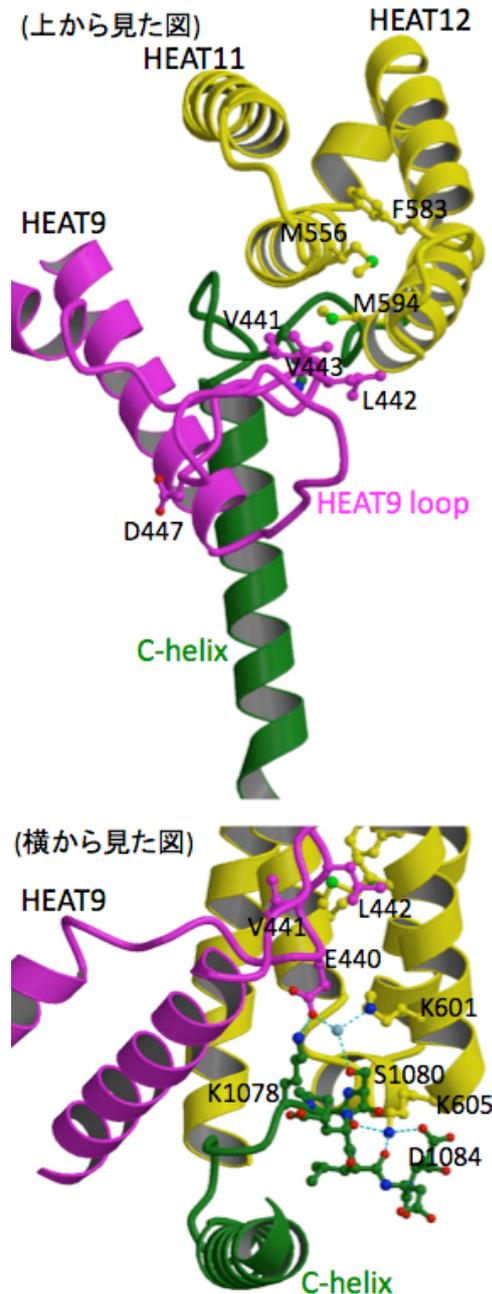


図 3 CRM1 単独の結晶構造において、NES 結合部位を closed 状態で安定化している分子内相互作用

また、CRM1 単独の結晶構造では、CRM1-NES-RanGTP 複合体や CRM1-RanBP1-RanGTP 複合体とは異なり、HEAT21 の B-helix が CRM1 リングの外側ではなく、内側に大きく向きと位置を変えて移動しており、さらにこの α ヘリックスの後に続く約 10 残基 (CRM1 の C 末端最後の 10 残基) はループ状になって、HEAT9 ループや HEAT8-12 の内側表面と結合している。この C 末端のヘリックスは、CRM1 の他の HEAT リピートのヘリックスとは異なり、RanGTP の結合に依存して向きと位置が大きく変化するので、以後 C-helix とよぶ。C-helix の後に続く C 末端領域の K1078 の側鎖は HEAT9 ループの E440 と salt bridge を形成している (図 3)。CRM1 の E440 は、CRM1-NES-RanGTP 複合体では RanGTP の Y155 と水素結合する残基であり、NES と RanGTP の結合に伴って大きく位置が移動する残基である。したがって K1078 と E440 の相互作用は、CRM1 単独において、HEAT9 ループの「NES 結合阻害型コンフォメーション」を安定化しているように見える。K1078 の後の C 末端領域数残基は、その主鎖が HEAT12 の K605 の側鎖を取り囲むようになって K605 と C 末端領域主鎖のいくつかのカルボニル基、ならびに C 末端の最後の残基である D1084 の側鎖と水素結合を形成している (図 3)。ただしこの K605 の側鎖は、CRM1-NES-RanGTP 複合体でも CRM1 単独でもほぼ同じ位置にあり、CRM1 単独での C 末端領域数残基と K605 の相互作用によって HEAT12 のコンフォメーションが変化するとは考えにくい。むしろ K605 と C 末端領域との相互作用には、HEAT9 ループの「NES 結合阻害型コンフォメーション」の安定化にとって重要な「K1078-E440 間の相互作用」を安定化する効果があると考えられる。

また、興味深いことに、HEAT9 ループの根元で C 末端のループに結合している領域は、

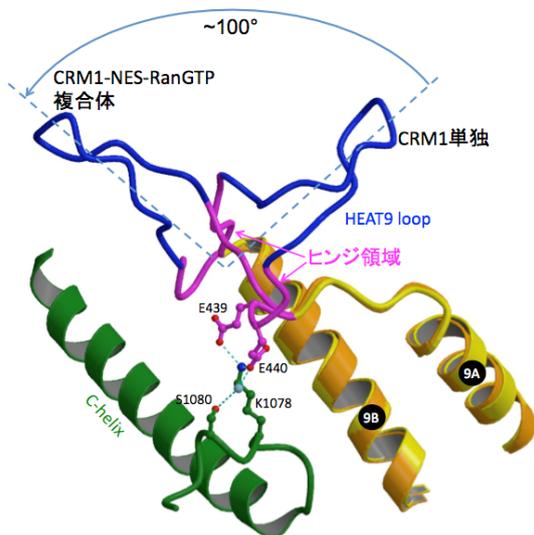


図 4 HEAT9 ループと C 末端領域の相互作用

HEAT9 ループが「NES 結合阻害型コンフォメーション」から「NES・RanGTP 結合型コンフォメーション」に変化するときに、ヒンジとして働く領域である (図 4)。したがって、CRM1 単独では、C 末端のループは、ヒンジ領域の構造を安定化し、その構造変化を妨げることにより、HEAT9 ループの構造変化を防いでいると考えられる。すなわち、CRM1 の自己阻害の主役は HEAT9 ループであり、C 末端領域は HEAT9 ループの自己阻害機能を増強するはたらきをもっている。この仮説は結晶構造に基づいた変異体解析によって裏付けられた (自己阻害のために重要と考えられる、CRM1 内部の相互作用部位のアミノ酸残基をアラニンに置換した CRM1 変異体は、RanGTP 不在下でも NES と強く結合した)。

(3) CRM1 と NES の結合が RanGTP に依存する機構

CRM1 単独では、CRM1-NES-RanGTP 複合体と比べると、CRM1 のリングがやや開いている。CRM1-NES-RanGTP 複合体では、HEAT21 の A-helix と B-helix (HEAT21 の B-helix は C-helix のこと) をつなぐループが HEAT2 の A-helix と B-helix をつなぐループと接触しており、さらに、HEAT4 と HEAT5 をつなぐループが HEAT21 の側面に結合している。このように N 末端領域と C 末端領域が結合しているため、CRM1 のリングは CRM1-NES-RanGTP 複合体では閉じている。一方、CRM1 単独では、C-helix が CRM1 リングの内側を向いており、CRM1-NES-RanGTP 複合体において HEAT2 と接触していた HEAT21 のループが大きくコンフォメーションを変え、CRM1 の N 末端領域 (HEAT1-5) は HEAT21 から離れ、直接接触していない。したがって CRM1 単独では N 末端領域と C 末端領域の結合が解除され、HEAT1-5 と HEAT21 の間にすき間が出来、リングが開く。この、CRM1 リング開閉に伴い、CRM1 単独では HEAT4 と HEAT5 をつなぐループが異なるコンフォメーションをとる。また、CRM1 の N 末端 1/3 くらいの HEAT リピート超らせんの curvature に着目すると、CRM1 単独の方が、この curvature はゆるやかであり、CRM1-NES-RanGTP 複合体ではこの curvature がより湾曲している。CRM1 単独ではリングが開いているせいか、N 末端領域の温度因子は特に高い。

CRM1 のリング開閉に関与する残基の中で、とくに HEAT21 の A-helix のアスパラギン酸 (D1034) は、CRM1 単独では溶媒に露出しているが、CRM1-NES-RanGTP 複合体では、HEAT4 と HEAT5 をつなぐループのスレオニンやグルタミンと水素結合している。このアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 D1034A を作製し、プルダウンアッセイを行ったところ、この変異体は RanGTP の有無にかかわらず、

NES-cargo との結合は極めて弱かった。したがって、CRM1 が NES-cargo と RanGTP と結合することに伴って CRM1 リングが閉じるときの、HEAT21 と HEAT4-5 の間の相互作用は、CRM1-NES-RanGTP 複合体の安定化に貢献していると考えられる。

CRM1 単独では CRM1 のリングがやや開いているため、CRM1 単独と CRM1-NES-RanGTP 複合体を重ね合わせたときに、RanGTP がどこに位置するかというのは、CRM1 のどこの部分で二つの構造を重ね合わせたかによって大きく異なる。HEAT9 ループを除くと、RanGTP が CRM1 と結合する場所は主に 2 カ所、N 末端領域 (HEAT1-5) の内側表面と C 末端領域 (HEAT17-19) の内側表面である。興味深いことに、CRM1 の N 末端領域の HEAT3 で CRM1 単独と CRM1-NES-RanGTP 複合体を重ね合わせると、RanGTP は CRM1 単独の、どの部位ともクラッシュすることはない。しかし CRM1 の C 末端領域の HEAT19 で CRM1 単独と CRM1-NES-RanGTP 複合体を重ね合わせると、RanGTP は CRM1 単独における C-helix とクラッシュしてしまう。したがって、RanGTP が CRM1 に結合するとき、結合のプロセスは以下のように 2 段階でおこる可能性が高い (図 5)。CRM1 単独での安定な構造を CRM1 がとっているとき、RanGTP は CRM1 の N 末端領域の結合サイトには自由にアクセスできるが、この N 末端領域との結合は接触面積が狭く、これだけでは結合は弱い (第 1 段階の結合)。RanGTP が CRM1 と強く結合するためには (第 2 段階の結合)、CRM1 の C-helix を RanGTP がおしよけてリングの外側に移動させ、リングが閉じて RanGTP が HEAT1-5 と HEAT17-19 の両方の内側表面と接触できるようにし、かつ、RanGTP が HEAT9 ループと結合して HEAT9 ループを NES 結合部位近傍から引き離す必要がある。最近解かれた CRM1-RanGTP 2 者複合体の結晶構造では、CRM1 は CRM1-NES-RanGTP 複合体と全く同じ構造をとっているため、RanGTP が CRM1 と強く結合して HEAT9 ループも C 末端領域も NES 結合部位付近から引き離されたならば、これら 2 カ所の調節領域による自己阻害が解除され、NES 結合部位は閉じた状態より開いた状態 (NES が結合できる状態) の方がエネルギー的に安定になるのだと考えられる。したがって RanGTP と CRM1 の結合が弱い結合 (第 1 段階の結合) から強い結合 (第 2 段階の結合) に遷移するときに、NES が CRM1 に結合できるようになると考えられる (図 5)。

エネルギー論の観点から、CRM1 構造変化の意義を考えると以下のようになる。CRM1 単独と CRM1-NES-RanGTP 複合体とでは、CRM1 の構造が大きく異なる。CRM1 と NES-cargo の 2 者複合体、あるいは CRM1 と RanGTP の 2 者複合体が、あまり安定でなく、2 者複合体では結

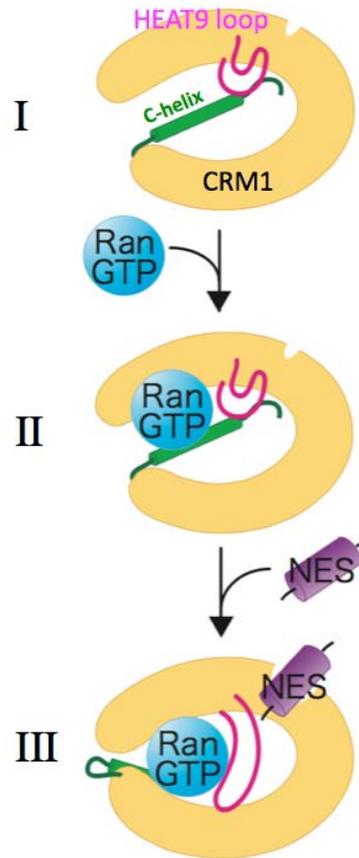


図 5 RanGTP 依存的な NES 結合の仕組み

合が弱くて、CRM1-NES-RanGTP 3 者複合体になってはじめて安定な複合体になるということは、CRM1 を、CRM1 単独でエネルギー的に最も安定な構造 (今回解いた結晶構造がそれに対応すると思われる) から、NES と RanGTP が強く結合できる構造に変化させるには、大きなエネルギーが必要であり、このエネルギーは NES の結合エネルギーだけ、あるいは RanGTP の結合エネルギーだけ、よりも大きく、NES と RanGTP の両方の結合エネルギーをあわせてはじめて CRM1 を構造変化させるに必要なエネルギーを上回ることができるということだと思われる。CRM1 を構造変化させるに必要なエネルギーがそれなりに大きいゆえに、RanGTP と NES が強く結合する前の自由エネルギーと結合の後の自由エネルギーの差は、熱エネルギー kT よりはかなり大きいはずだが、RanGTP と NES の結合エネルギーの和と比べるとだいぶ小さいということになる。このことは、細胞質での CRM1 核外輸送複合体解体反応のために必要なエネルギーがそれほど小さくなくて済むという御利益をもたらすはずである。すなわち、CRM1 の構造変化 (自己阻害の解除) のためにエネルギーが必要であるということには、主に 2 つの意義があり、第 1 に CRM1 と NES の結合が

RanGTP に依存するようになるということ、第2に細胞質での CRM1-NES-RanGTP 複合体解体を容易にすること、という、核外輸送の方向性制御の鍵を握る二つのイベント（核での cargo と exportin の結合、細胞質での cargo の exportin からの解離）のどちらにおいても重要であると考えられる。

今日まで結晶解析により全体構造が解かれている karyopherin- β ファミリーに属する核輸送受容体蛋白質の多くは、自身の HEAT リピート構造が持つ柔軟性を利用して cargo や RanGTP の結合・解離を制御するという点で全て共通していて、これはいわば karyopherin- β ファミリーの作用機序の general principle である。どのように構造の柔軟性を利用するかという詳細は個々の核輸送受容体ごとに様々であるが、これまでに解かれた importin や exportin では、HEAT リピートの超らせん構造の大きな変化と酸性残基に富んだ調節ループの構造変化が見られることが多かった。一方、今回解いた CRM1 単独の結晶構造より明らかとなった C-helix のような、連続した HEAT リピート構造から逸脱した α ヘリックス構造による cargo と RanGTP の結合制御は、今までに報告されていない新しい機構である。

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2件)

- ① Saito, N. & Matsuura, Y. "A 2.1-Å-resolution crystal structure of unliganded CRM1 reveals the mechanism of autoinhibition." *J. Mol. Biol.*, 425: 350-364 (2013). 査読有
doi: 10.1016/j.jmb.2012.11.014
- ② Koyama, M. & Matsuura, Y. "Mechanistic insights from the recent structures of the

CRM1 nuclear export complex and its disassembly intermediate." *Biophysics*, 8: 145-150 (2012). 査読有
doi: 10.2142/biophysics.8.145

[学会発表] (計4件)

- ① 小山昌子、白井菜月、松浦能行「核内の Ran 結合蛋白質 Yrb2 が CRM1 による核外輸送を触媒的に促進する機構の構造基盤」第85回 日本生化学大会 2012年12月16日 福岡国際会議場 (福岡県)
- ② Koyama, M., Shirai, N., Matsuura, Y. "Kinetic and X-ray crystallographic studies of assembly/disassembly of the CRM1 nuclear export complex." 第50回 日本生物物理学会年会 2012年9月23日 名古屋大学 (愛知県)
- ③ Koyama, M., Shirai, N., Matsuura, Y. "Structural insights into the function of Yrb2, a cofactor that facilitates CRM1-mediated nuclear export." American Society for Cell Biology meeting 2011年12月17日 デンバー (米国)
- ④ 小山昌子、齊藤なつみ、松浦能行「CRM1 による核外輸送機構の構造基盤」第11回 日本蛋白質科学会 2011年6月8日 ホテル阪急エキスポパーク (大阪府)

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 なし

(3) 連携研究者 なし