

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440019

研究課題名(和文)細胞周期依存的な核膜孔複合体構造変化による核移行制御機構とその生理的意義の解明

研究課題名(英文)Cell-cycle dependent regulatory mechanism of nuclear import and its physiological significance

研究代表者

松浦 能行(Matsuura, Yoshiyuki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10402413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母のフォスファターゼCdc14pは、細胞周期のM期後期におこるプロセスが適時に進行するように制御する。Cdc14pの核-細胞質間輸送の制御は細胞周期の正常な進行のために重要である。本研究では、出芽酵母の生育に必須のインポーチンKap121pとCdc14pの相互作用の構造機能解析を行い、Cdc14pのC末端領域にKap121p特異的な核移行シグナル(NLS)を同定した。他の輸送基質のNLSとの比較に基づき、Kap121p特異的NLSをIK-NLSと名付けた。

研究成果の概要(英文)：The protein phosphatase Cdc14p is an antagonist of mitotic cyclin-dependent kinases and is a key regulator of late mitotic events such as chromosome segregation, spindle disassembly, and cytokinesis in the budding yeast. It has been proposed that regulated nucleocytoplasmic shuttling of Cdc14p is important for exit from mitosis. We performed structural and functional characterization of the interactions between the karyopherin Kap121p (an essential nuclear import receptor in yeast) and the C-terminal region of Cdc14p. This study identified nuclear localization signals (NLSs) in the C-terminal region of Cdc14p, in which isoleucine and lysine residues play crucial roles in the interaction with Kap121p. Based on comparison with other Kap121p-specific nuclear import cargoes, we proposed "IK-NLS" as an appropriate term to refer to the Kap121p-specific NLS.

研究分野：構造生物学

キーワード：核輸送 インポーチン 細胞周期 核膜孔

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞周期は、正確かつ一方向性に進行する必要がある。タンパク質の可逆的なリン酸化は、細胞周期進行の主な制御機構の一つである。サイクリン依存性キナーゼ(Cdk)のアンタゴニストであるフォスファターゼ Cdc14 は、染色体分配、有糸分裂紡錘体の脱構築、細胞質分裂など、細胞周期の M 期後半におこるさまざまなプロセスが適時に進行するように制御するシステムにおいて中心的な役割を果たす (Stegmeier & Amon, 2004)。

(2) 出芽酵母において、Cdc14p は M 期後期になるまでは、Cdc14p 阻害タンパク質である核小体タンパク質 Net1p (別名 Cfi1p) に結合して核小体に局在しており、この間 Cdc14p のフォスファターゼ活性は阻害されている。M 期後期になると、その初期に Cdc14p を一時的に活性化するシグナル伝達系 FEAR がはたらき、Net1p がリン酸化されるため、Cdc14p が核小体からリリースされる。これにより Cdc14p は核内に広がり、基質タンパク質の脱リン酸化と、染色体分離の促進、chromosomal passenger proteins の局在制御などを行う。M 期後期の終盤にさしかかると別のシグナル伝達系 MEN がはたらき、再び Cdc14p が Net1p から解離する。Early anaphase でのシグナル伝達系 FEAR による Cdc14p の核小体からのリリースが一時的なリリースであるのに対して、late anaphase でのシグナル伝達系 MEN による Cdc14p の核小体からのリリースは持続的なリリースであり、MEN によって活性化された Cdc14p は細胞質にも移行して数多くの基質を脱リン酸化し、Cdk を急速に不活性化する。これにより Cdc14p は有糸分裂を終結させ、細胞を細胞周期の G1 期の最初の状態にリセットする。このように Cdc14p は M 期終結 (mitotic exit) の master regulator として機能する。

(3) 核の内部 (核質) と外 (細胞質) は、内外 2 枚の脂質二重膜からなる核膜によって隔てられている。核膜を貫通する核膜孔 (nuclear pore) は、内外 2 枚の核膜が融合するところに約 500 個もの多数のタンパク質が集まってできた巨大なタンパク質複合体によって形成されている。これが核膜孔複合体 (nuclear pore complex) であり、核-細胞質間高分子輸送は全てこの核膜孔複合体を通しておこる。核膜孔複合体の構成タンパク質群はヌクレオポリン (nucleoporin) と総称されている。高等な真核生物ほど核膜孔複合体の分子量は大きくなる傾向があるが、酵母からヒトまで、核膜孔複合体の形状はよく保存されている。

(4) ほとんど全ての核-細胞質間高分子輸送は、karyopherin-beta ファミリーに属する核輸送受容体タンパク質群によって担われて

いる。核輸送受容体は輸送の方向性によって 2 種類に分けられる：核内輸送受容体 (インポーター) は細胞質から核への輸送 (核内輸送) を担い、核外輸送受容体 (エクスポーター) は核から細胞質への輸送 (核外輸送) を担う。Karyopherin-beta ファミリーに属する核輸送受容体としては、ヒトでは少なくとも 20 種、出芽酵母では 14 種が同定されている。インポーター、エクスポーターというのは、それぞれ一群のタンパク質群の総称であり、輸送基質 (カーゴ) の種類ごとに異なるインポーターやエクスポーターが使われている。

(5) インポーターやエクスポーターによる輸送の方向性は Ran GTPase によって制御されている。Ran による GTP 加水分解は、核-細胞質間高分子能動輸送の駆動力 (エネルギー源) を提供し、輸送基質 (カーゴ) を濃度勾配に逆らって輸送することを可能にする。核内輸送では、まず細胞質でインポーターがカーゴを認識して結合する。一般的に、これは特異性の高い強く安定な結合である (nM オーダーのアフィニティーであることが多い)。インポーターとカーゴの複合体は、インポーターとヌクレオポリンの FG リピートとの弱い相互作用によって核膜孔を通過する。核内では、核に局在して Ran のヌクレオチド交換反応を促進するタンパク質 RCC1 のはたらきにより、Ran が主に GTP 結合型の状態で存在しており、RanGTP がインポーターに結合すると、カーゴがインポーターから解離する。インポーターと RanGTP の複合体は細胞質に戻り、細胞質に局在する Ran 結合タンパク質群 (RanBP1/2, RanGAP) の働きにより Ran による GTP 加水分解が促進され、インポーターは Ran から解離する。

(6) Kap121p (別名 Pse1p) は、出芽酵母の生育に必須のインポーターである。Kap121p は転写因子やリボソームタンパク質など、数多くのカーゴの核内輸送を担う。Kap121p による核内輸送は、M 期特異的に阻害される。これは細胞周期制御の重要な機構であり、ヌクレオポリンのひとつである Nup53p が Kap121p と特異的に結合することで、Kap121p からのカーゴの解離が引き起こされるためであると考えられている。Kap121p による核内輸送がなぜ M 期特異的に阻害されるのか、については、次のような作業仮説が有力視されている (Makhnevych et al., 2003)。間期において Nup53p は核膜孔複体内で別のヌクレオポリン Nup170p に結合している。このときは Nup53p の Kap121p 結合領域は Nup170p によってマスクされており、Nup53p は Kap121p と結合できない。そのため Kap121p による核内輸送は、間期では正常に行われる。一方、M 期では、Nup53p が M 期特異的にリン酸化され

ることによって、核膜孔複合体内部での Nup53p の結合の相手が Nup170p から別のスクレオポリン Nic96p にかわる。Nic96p との結合時には Nup53p の Kap121p 結合領域が露出し、Nup53p は Kap121p と強く結合できるようになる。このため、M 期では Kap121p による核内輸送が阻害される、と考えられている。

2. 研究の目的

出芽酵母の Cdc14p は N 末端のフォスファターゼドメイン (約 350 アミノ酸残基)、および C 末端ドメイン (約 200 アミノ酸残基) という、2つのドメインからなる。Cdc14p の核・細胞質間シャトリングのためには Cdc14p の C 末端ドメインが必要であることが知られていたが、輸送受容体がどのように Cdc14p を認識するかなど、輸送メカニズムの詳細は不明であった。興味深いことに、細胞周期において、Kap121p による核内輸送が阻害されている時期は、Cdc14p が核小体からリリースされて核質と細胞質に広く拡散する時期とピットリ一致する。そこで本研究では、Kap121p による輸送経路が細胞周期依存的に制御されることの生理的意義の理解を深めるための研究の一環として、Kap121p と Cdc14p の相互作用について構造機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 生化学的な相互作用解析 (GST プルダウンアッセイ) のために、Cdc14p, Kap121p, Gsp1p (出芽酵母の Ran ホモログ) を大腸菌株 BL21-CodonPlus (DE3) RIL でリコンビナントタンパク質として発現した。Cdc14p の C 末端領域は、N 末に GST を融合した融合タンパク質として発現し、アフィニティーカラムとゲルろ過で精製した。Kap121p は N 末に GST を融合した融合タンパク質として発現し、アフィニティー精製の後、TEV プロテアーゼで GST を除去し、最後はゲルろ過で精製した。Gsp1p は N 末にヒスタグを付加して発現し、ニッケルカラムとゲルろ過で精製した。変異体は QuickChange 法で作製した。本研究で作製したコンストラクトの塩基配列は全て DNA シークエンシングで確認した。

(2) GST プルダウンアッセイは常法にならった。Glutathione-sepharose 4B ビーズに GST 融合タンパク質を固定し、そこにさまざまなタンパク質を加えて 4°C で 1 時間インキュベートして結合反応を行った後、結合画分と非結合画分に分離し、それぞれポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で解析した。ゲルは CBB 染色した。

(3) 出芽酵母における核内輸送アッセイのために、Cdc14p-GFP-GFP 融合タンパク質を発現するプラスミドを作製して出芽酵母を形質転換し、生細胞をレーザー共焦点蛍光顕微

鏡 (オリンパス FV1000) で観察して GFP の蛍光をモニターし、GFP 融合タンパク質の細胞内局在を解析した。

(4) Kap121p-Cdc14p 複合体を結晶化するために、GST-Kap121p と His/S-Cdc14p を大腸菌で別々に大量発現した。これら 2 種類の菌体を混ぜて超音波破碎し、大腸菌抽出液中でタンパク質複合体を形成させた。GST タグと His タグを利用してアフィニティー精製した後、TEV プロテアーゼでタグを除去した。最後にゲルろ過で Kap121p-Cdc14p 複合体を精製した。

(5) ハンギングドロップ蒸気拡散法により、Kap121p-Cdc14p 複合体を結晶化した。温度は 20°C、タンパク質濃度は 16 mg/ml、結晶化母液の組成は 0.1 M HEPES (pH 7.0), 10% 2-propanol, 24% PEG20000 であった。結晶をクライオルーブですくって液体窒素で急速凍結した。Native 結晶の X 線回折データセットを SPring-8 のビームライン BL41XU で収集し、MOSFLM と CCP4 のプログラムでデータをプロセスした。Kap121p-Pho4p 複合体の結晶構造 (PDB code, 3W3X; Kobayashi & Matsuura, 2013) をサーチモデルとして MOLREP で分子置換の解を見つけた後、REFMAC5 と PHENIX による精密化計算と COOT による原子モデル構築・修正作業を繰り返して、構造精密化した。MolProbity で結晶構造のクオリティを評価した。

4. 研究成果

(1) 先行研究により、Cdc14p の C 末端最後の 100 アミノ酸残基 (residues 450-551) が、核局在化シグナル (nuclear localization signal; 略して NLS) としての活性をもつことが示されていた (Mohl *et al.*, 2009)。この 100 残基のうち、特に塩基性アミノ酸に富む領域 (residues 517-551) が *in vivo* で NLS 活性を持つかどうかを調べるために、Cdc14p (517-551)-GFP-GFP 融合タンパク質を出芽酵母で発現したところ、この融合タンパク質は核に局在したので、この領域 (residues 517-551) が NLS 活性を持つことがわかった。

(2) NLS 活性をもつ Cdc14p の領域 (residues 517-551) が Kap121p と結合するかどうかを調べるため、精製タンパク質を用いて *in vitro* の結合実験 (GST プルダウンアッセイ) を行った。Kap121p は GST には結合しなかったが、GST-Cdc14p (517-551) 融合タンパク質には結合した。この結果から、Kap121p が Cdc14p の residues 517-551 に特異的に結合することがわかった。もし Kap121p が Cdc14p の核内輸送を担うなら、核内で RanGTP が Cdc14p の Kap121p からの解離を引き起こすはずである。この点を検討するために、出芽酵母の Ran ホモログ Gsp1p と Cdc14p が

Kap121p への結合に関して競合するかどうかを、精製タンパク質を用いた GST プルダウンアッセイで調べた。その結果、Kap121p への結合に関して、GTP 結合型の Gsp1p は Cdc14p と競合するが、GDP 結合型の Gsp1p は Cdc14p と競合しないことがわかった。

(3) 上記の細胞生物学実験と生化学実験の結果は、Kap121p が Cdc14p の核内輸送を担い、Cdc14p の residues 517-551 の中に Kap121p 特異的な NLS 配列があることを示唆するものである。Kap121p が Cdc14p の C 末端領域を特異的に認識する機構の構造基盤を明らかにするために、Kap121p-Cdc14p 複合体の X 線結晶解析に取り組んだ。結晶化サンプルとしては、residues 80-90 を削除した Kap121p と、Cdc14p の residues 517-551 の複合体を精製した。なお、Kap121p の residues 80-90 を削除することによって Kap121p の機能に影響が出ることはない (Kobayashi & Matsuura, 2013)。結晶化条件スクリーニングと最適化の結果、プレート状の結晶が育った (図 1)。SPRING-8 のシンクロトロン放射光を用いて、X 線回折データセットを収集した。図 1 の写真は、クライオグループにマウントして凍結した結晶の写真を SPRING-8 のビームラインで撮影したものであり、実際に X 線回折データを収集する実験で使った結晶の写真である (白のクロスが X 線を照射した位置を示す)。



図 1 Kap121p-Cdc14p 複合体の結晶

(4) 分子置換法による構造解析の結果、2.4 Å 分解能で Kap121p-Cdc14p 複合体の結晶構造を解くことができた (図 2)。R-free 25.2%, R-factor 21.9% まで構造精密化した。Kap121p は 24 個の HEAT リピートからなるソレノイド型の超らせん構造をしており、HEAT リピート 8-12 の内側表面に Cdc14p が結合しているのが電子密度マップで明瞭に観察できた。この結合部位は、当研究室が解いた Kap121p-Ste12p 複合体の結晶構造や Kap121p-Pho4p 複合体の結晶構造 (Kobayashi & Matsuura, 2013) において NLS 結合部位として同定された部位と同じであった。電子密度から考えて、Cdc14p の C 末端最後の 5 つのアミノ酸残基 (residues 547-551;

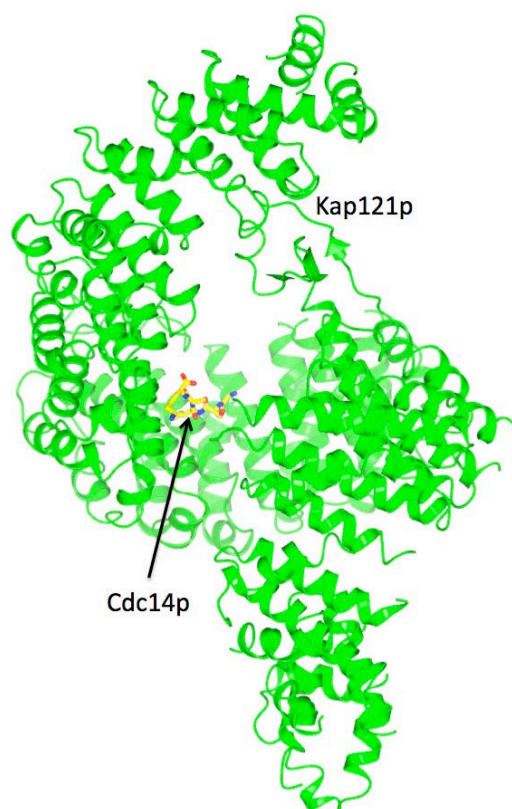


図 2 Kap121p-Cdc14p 複合体の結晶構造

Gly-Ser-Ile-Lys-Lys) が NLS として Kap121p に認識される可能性が高いと思われた。Cdc14p の C 末端においては、この配列のすぐ上流に似たような配列があるが (residues 540-544; Gly-Gly-Ile-Arg-Lys)、電子密度が見えた 5 残基のうち、N 末から 2 つ目の残基の側鎖の電子密度から、これは Gly ではなく Ser として解釈する方が妥当であると思われた。Kap121p は図 3 に示すような、水素結合や疎水性相互作用のネットワークで Cdc14p を認識していた。Cdc14p は extended conformation で Kap121p に結合しており、Cdc14p の主鎖の数カ所が Kap121p と水素結合を形成していた。Cdc14p の 5 残基のうち、側鎖が Kap121p によって直接認識されているのは N 末から 3 つ目の Ile と 5 つ目の Lys のみであり、この 2 つのアミノ酸残基が、特異性を決定づける重要な残基であるように思われた。3 つ目の Ile は NLS 結合部位のポケット P1 に疎水結合し、5 つ目の Lys はポケット P2 に水素結合と静電相互作用で結合していた。

(5) 図 3 に示したように、結晶構造の最も “plausible” な解釈は Cdc14p の residues 547-551 が Kap121p に結合するというものであるが、Cdc14p の residues 540-544 も、主に Cdc14p の Ile と Lys の 2 残基と、Kap121p の相互作用で、全く同じ結合様式で NLS 結合部位に結合する可能性があると思われた。この可能性を検証するために、Cdc14p の変異体を用いて GST プルダウンアッセイを行った。Cdc14p の I542A/K544A 変異のみでは Kap121p

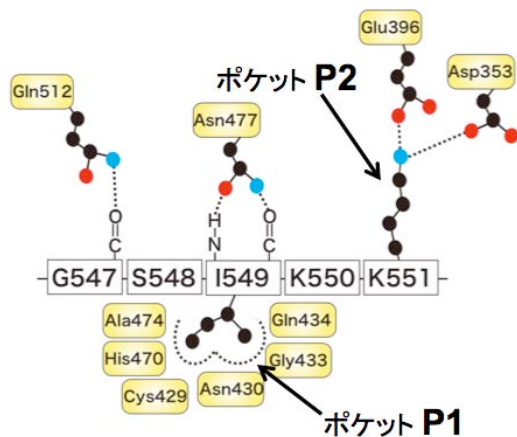


図3 Kap121p と Cdc14p の相互作用

との結合はほとんど弱くならず、I549A/K551A 変異だけでも同様に Kap121p との結合にほとんど影響は出なかった。しかし、I542A/K544A/I549A/K551A 変異体の場合は、Kap121p との結合がプルダウンアッセイでは全く検出できなかった。この結果は、Cdc14p の C 末端に “redundant” な NLS 配列があり、residues 540-544 あるいは residues 547-551 のどちらでも Kap121p に結合できることを示唆する。また、生細胞での NLS 活性を、Cdc14p 変異体を用いて調べてみると、Cdc14p の C 末端の residues 540-551 を削除することにより NLS 活性が失われることがわかった。この *in vivo* 実験の結果は、*in vitro* のプルダウンアッセイの結果とつじつまがあう。

(6) 本研究で得た知見は、Cdc14p が Kap121p 以外のインポーターによっても核内輸送される可能性を否定するものではないが、Cdc14p の核内輸送を担う運搬体タンパク質のうち、少なくともひとつが Kap121p であることを強く示唆するものである。興味深いことに、これまでに当研究室が解いてきた Kap121p-cargo 複合体の結晶構造において、どの構造においても、NLS 結合部位のポケット P1 と P2 が NLS の特異的認識のために重要な役割を果たしており、Kap121p と NLS の結合の特異性は、ほぼこの 2 カ所だけで決まるように思われた。ポケット P1 に結合するアミノ酸残基としては、Ile 以外に Val が使われることもあるが、ポケット P1 の形状は Ile とピッタリ相補的であり、Val よりも Ile の方が、ポケット P1 によくフィットする。ポケット P2 には必ず NLS の Lys が結合する。したがって、NLS を構成するアミノ酸残基のうち Ile と Lys が特に重要であると思われるので、“IK-NLS” という名称が、Kap121p 特異的 NLS の名称としてふさわしいと思われた。NLS としては、インポーター α によって認識される古典的 NLS や、トランスポーターによって認識される PY-NLS が有名であるが (Chook & Suel, 2010)、これらに次ぐ第 3 の general な NLS 配列モチーフとして、

IK-NLS モチーフを提唱した (Kobayashi *et al.*, 2015)。

<引用文献>

- ① Stegmeier, A. & Amon, A. “Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation” *Annu. Rev. Genet.*, 38: 203-232.
- ② Makhnevych, C.P., *et al.* “Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex” *Cell*, 115: 813-823 (2003).
- ③ Kobayashi, J. & Matsuura, Y. “Structural basis for cell-cycle-dependent nuclear import mediated by the karyopherin Kap121p” *J. Mol. Biol.*, 425: 1852-1868 (2013).
- ④ Mohl, D.A., *et al.* “Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis” *J. Cell Biol.*, 184: 527-539 (2009).
- ⑤ Chook, Y.M. & Suel, K.E. “Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition” *Biochim. Biophys. Acta*, 1813: 1593-1606 (2010).

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)

- ① Kobayashi, J., Hirano, H. & Matsuura, Y. “Crystal structure of the karyopherin Kap121p bound to the extreme C-terminus of the protein phosphatase Cdc14p” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463: 309-314 (2015). 査読有

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