

論文内容の要旨

氏名：地引 和也

博士の専攻分野の名称：博士（理学）

論文題目：

核輸送受容体 importin α の多機能性を担う IBB domain に関する研究

第1章 序論

真核細胞において核は核膜によって細胞質と隔てられており、核タンパク質は細胞質で翻訳された後、核膜孔を通過して核内に入る。多くの核タンパク質は拡散によって核膜孔を通過できないため、核輸送受容体によりエネルギー依存的に核内へ輸送される。核輸送受容体の一種である importin α は細胞質において輸送基質となる核タンパク質の NLS (Nuclear Localization Signal) と結合し、別の核輸送受容体である importin β と三者複合体を形成する。その後、核内へ侵入した三者複合体は importin β に RanGTP が結合することで、三者複合体から importin β が解離する。さらに、Nup50 (Nucleoporin 50) あるいは CAS (cellular apoptosis susceptibility) が importin α と結合することで NLS と importin α の解離が促進され、importin α は CAS によって細胞質へリサイクルされる (図1)。importin α の大部分は ARM (Armadillo) repeat と呼ばれる 10 回繰り返し構造をとっており、その中に 2 か所の NLS 結合部位が含まれる。N 末端には importin β との結合ドメインとして知られる IBB (importin β binding) domain が存在し、C 末端には Nup50 や CAS との結合部位が含まれている。importin α には 7 種類のファミリー遺伝子 (KPNA1~7) が存在し、すべてのファミリーメンバーが上記の機能ドメインを保持している一方、輸送基質に特異性を持つ。さらに、ファミリーメンバーごとに発現する組織が異なることで核輸送の選択性につながり、様々な生命現象に関わる核機能制御における分子基盤となっている。また、importin α は核輸送以外にも紡錘体形成やラミン重合、核膜形成、タンパク質分解、ストレス応答、遺伝子発現、細胞表面機能、mRNA 関連機能など様々な非核輸送機能を持つ。そのため、細胞イベントにおける importin α の役割を包括的に理解するためには各機能の分子メカニズムと機能間のバランス調整の仕組みを理解することが重要となる。しかし、非核輸送機能の中には詳細な分子メカニズムが明らかになっていないものがある。また、importin α の機能間の切り替え機構はほとんど明らかになっていない。

本研究ではこれらの課題にアプローチすべく、第2章にて未知であった importin α の非核輸送機能の一つであるクロマチン結合の分子メカニズムを解析した。さらに、第3章では多機能タンパク質である importin α の機能制御を理解するために、複数の結合パートナーの結合ドメインとなる IBB domain の生化学的性質を解析し、重要な残基とその生化学的性質を結合ごとに区別した。

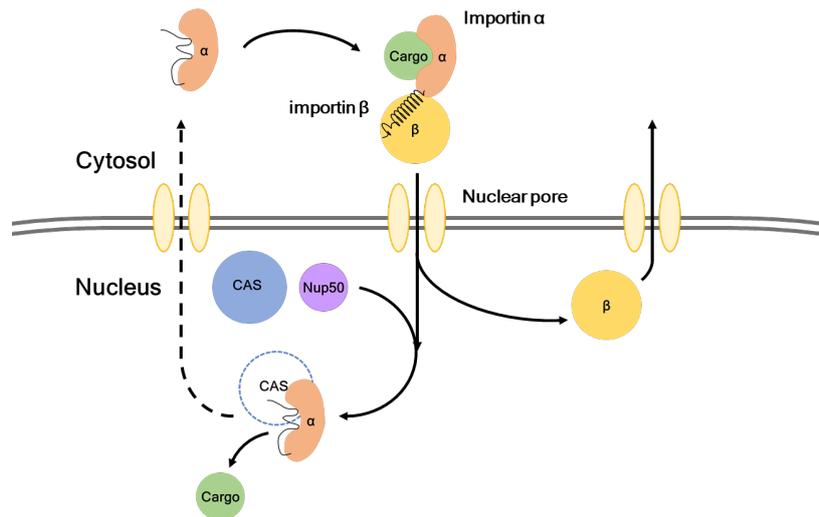


図 1 importin α による核輸送サイクル

importin α は細胞質から核内へ輸送基質を輸送した後、細胞質へとリサイクルされる。
importin α の IBB domain を黒の曲線あるいはらせんで示した。

第 2 章 importin α とクロマチンの相互作用解析

これまでに、importin α ファミリータンパク質の一種である importin $\alpha 2$ がクロマチンと結合することが特定の限られた遺伝子領域について数例報告されており、転写制御に関わる可能性が示唆されているが、その分子メカニズムと直接的な作用は不明である。

そこで、本研究では importin $\alpha 2$ とクロマチンの相互作用を解析した。まず importin $\alpha 2$ が直接 DNA と結合するかを生化学的手法により調べたところ、importin $\alpha 2$ が多様な配列の DNA 断片に対して直接結合することが明らかとなった。そこで、importin $\alpha 2$ の DNA 結合ドメインを同定するために、様々な変異体を作製して DNA との結合実験を行った結果、importin α の IBB domain 内に DNA 結合ドメインを見つけ、新たに NAAT (Nucleic Acid Associating Trolley pole) domain と定義した。さらに、importin $\alpha 2$ と DNA の結合様式を調べるために、分子動力学シミュレーション及び NMR 解析を行った結果、importin $\alpha 2$ と DNA の相互作用に次の 4 つの特徴があることが分かった。すなわち、①multimodal であった、②多価結合をした、③on-rate と off-rate が高く、見かけの親和性は中程度であった、④DNA 配列に対して半特異性を持つことが明らかとなった。また、細胞内においても importin $\alpha 2$ は多数のクロマチン領域と結合し、NLS 輸送基質を DNA 上にとどめる可能性も示唆した (図 2)。さらに、importin α の DNA 結合機能はファミリーメンバー間で保存されている一方、ファミリーメンバーごとに DNA との親和性が異なることも明らかとなった。今回明らかとなった importin $\alpha 2$ と DNA の結合様式から、importin α が促進拡散メカニズムを介して DNA の周辺を移動する可能性が見いだされ、importin α がファミリーメンバー特異的に輸送基質を核へ運びつつ、核内では輸送基質を DNA 上へ誘導するという新たな遺伝子制御機構の存在が示唆された。

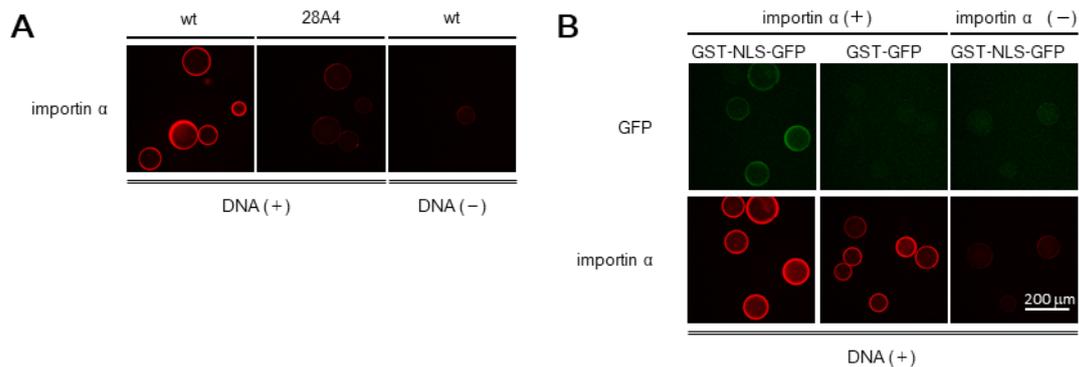


図2 importin $\alpha 2$ と DNA の結合実験

(A) DNA 結合ビーズと野生型 (wt) あるいは NAAT domain 変異型 (28A4) の importin $\alpha 2$ を反応させ、免疫染色法により DNA 結合ビーズ上の importin $\alpha 2$ を検出した。(B) DNA 結合ビーズと importin $\alpha 2$ 、GST-NLS-GFP あるいは GST-GFP を反応させ、DNA 結合ビーズ上の GFP を検出した。

第3章 importin α IBB domain の生化学的性質解析

IBB domain は importin β 結合以外にも、importin α 自身の NLS 結合部位と結合する自己阻害、CAS との複合体形成といった機能を持つ。つまり IBB domain は核輸送プロセスにおいて結合相手を切り換えて核輸送機能を調節するマスターレギュレーターとして機能する。さらに、第2章にて IBB domain 内に DNA 結合ドメインが含まれることが明らかとなった。そのため、importin α の核輸送機能と非核輸送機能のバランスにおいて IBB domain は重要な役割を担う。また、IBB domain は相互作用分子によって構造が異なることから、同一の配列が複数の構造をとるカメレオン配列と定義することができる。以上より IBB domain は機能的にも構造的にも多様性を持つ。しかし、単一の IBB ドメインが複数の結合パートナーとどのように相互作用し、importin α の機能の切り替えにつながるかは完全には解明されていない。また、IBB domain を介した importin α の機能はファミリーメンバーや生物種によって異なることが報告されているが、その根底にあるメカニズムの包括的な理解は得られていない。

そこで本研究では、多機能タンパク質である importin α の機能制御を理解するために、ファミリーメンバーごとに IBB domain のコンセンサス配列を作成し、進化的に保存された生化学的性質を解析した。また、機能に重要な IBB domain の残基を相互作用ごとに区別するために、既知の複数の機能構造を鋳型にホモロジーモデリングを行い、相互作用に対する各残基の寄与を接触面積の観点から評価した (図 3)。その結果、各相互作用においてファミリーメンバー間の違いとその原因となる残基とその生化学的性質が予測された (図 4)。

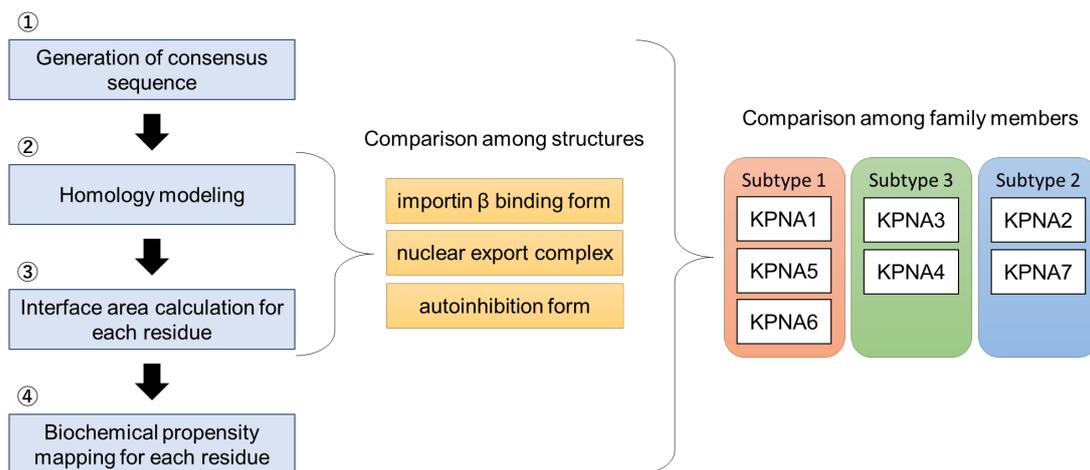


図3 解析概略図

結合パートナーとの相互作用ごとに IBB domain の重要な残基とその生化学的性質を予測するための解析手順を示す。

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| cIBB1: | | | | M | T | T | P | G | K | E | N | F | R | L | K | S | Y | K | N | K | S | L | N | P | D | E | M | R | R | R |
| cIBB5: | M | D | A | M | A | S | P | G | K | D | N | Y | R | M | K | S | Y | K | N | K | A | L | N | P | Q | E | M | R | R | R |
| cIBB6: | M | E | T | M | A | S | P | G | K | D | N | Y | R | M | K | S | Y | K | N | N | A | L | N | P | E | E | M | R | R | R |
| cIBB3: | | | M | A | E | N | P | G | L | E | N | H | R | I | K | S | F | K | N | K | G | R | D | V | E | T | M | R | R | H |
| cIBB4: | | M | A | D | N | E | K | L | D | N | Q | R | L | K | N | F | K | N | K | G | R | D | L | E | T | M | R | R | Q | |
| cIBB2: | | M | S | T | N | E | N | A | N | P | A | R | L | N | R | F | K | N | K | G | K | D | S | T | E | M | R | R | R | |
| cIBB7: | | M | P | T | L | D | A | P | E | E | R | L | R | K | F | K | Y | R | G | K | D | A | S | M | R | R | Q | Q | | |
| I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ● | ● | ○ | ● | ● | △ | △ | | ○ | | ○ | | | | | | ● | |
| IIa | - | - | - | - | - | - | - | ○ | | | | ○ | ● | | | ● | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IIb | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ● | | | | | | | | | | | | | ● | ● | ○ |
| III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IV | | | | | | | | | * | * | * | | | | | | | | | | * | * | * | * | | | | | | |
| | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |
| cIBB1: | R | E | E | E | G | L | Q | L | R | K | Q | K | R | E | E | Q | L | F | K | R | R | N | V | A | T | A | E | E | E | T |
| cIBB5: | R | E | E | E | G | I | Q | L | R | K | Q | K | R | E | E | Q | L | F | K | R | R | N | V | S | L | P | R | N | D | E |
| cIBB6: | R | E | E | E | G | I | Q | L | R | K | Q | K | R | E | Q | L | F | K | R | R | N | V | E | L | I | N | E | E | A | |
| cIBB3: | R | N | E | V | T | V | E | L | R | K | N | K | R | D | E | H | L | L | K | K | R | N | V | P | Q | E | E | S | L | E |
| cIBB4: | R | N | E | V | V | V | E | L | R | K | N | K | R | D | E | H | L | L | K | R | R | N | V | P | H | E | D | I | C | E |
| cIBB2: | R | I | E | V | N | V | E | L | R | K | A | K | K | D | E | Q | M | L | K | R | R | N | V | S | S | F | P | D | A | |
| cIBB7: | R | I | A | V | S | L | E | L | R | K | A | K | K | D | E | Q | A | L | K | R | R | N | I | T | S | F | S | P | D | P |
| I | ● | △ | | ○ | ○ | | | | ● | ● | | | ● | | | | | | ○ | | ● | ● | | ● | ○ | - | - | - | - | - |
| IIa | | | | ○ | | ● | | ● | ● | | | | | | | | | | | | | | | | - | - | - | - | - | - |
| IIb | ● | | | ○ | | ● | | ● | ● | | | | | | ● | ● | △ | | △ | ● | ● | ● | ● | | - | - | - | - | - | - |
| III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ● | ○ | ● | | | | ● | △ | ● | ● | | - | - | - | - | - | - |
| IV | | | * | | | * | | | | * | * | | | | | * | | | | | | | | | | | | | | |

図4 結合パートナーとの相互作用に関わる IBB domain の残基

importin β (I)、核外輸送複合体における CAS (IIa) 及び ARM (IIb)、自己阻害における ARM (III) との相互作用に重要な IBB domain コンセンサス配列の残基を示す。また、いずれの相互作用においても寄与が少ないにも関わらず、生物種間での保存性が高い残基を * で示した。

- : 相互作用に重要な残基。○: 相互作用においてファミリーメンバー間の違いの原因となる可能性がある残基。△: 相互作用に関わる残基。空白: 相互作用への寄与が少ない残基。
- : 铸型構造における欠落残基。

第4章 総括

細胞イベントにおける importin α の役割を包括的な理解を目的とし、第2章では importin α とクロマチン DNA の結合様式を明らかにし、第3章では importin α の機能制御に関わる IBB domain の生化学的性質を解析し、相互作用ごとに重要な IBB domain の残基を区別した。

これまでに、DNA 結合タンパク質が膨大なクロマチン領域から効率的に標的領域を探索する方法として、単純拡散ではなく促進拡散メカニズムによって DNA 周辺を移動すると考えられている。今回得られた知見から、importin α は輸送基質として DNA タンパク質と共に DNA と相互作用し、促進拡散メカニズムを介して標的領域への効率的な送達を促進する可能性がある。importin α の輸送基質には多数の DNA 結合タンパク質が含まれていることから、そのような importin α と共役した DNA 結合タンパク質の促進拡散メカニズムが明らかになることで、新たな遺伝子制御機構と多数の DNA 結合タンパク質の標的領域探索機構の解明につながることを期待される。

また、importin α は細胞全体で様々な機能を果たすため、importin α 細胞内局在は機能を調節重要な要因である。第2章では、新たに importin α の DNA 結合ドメインが IBB domain 内に含まれることが明らかとなり、importin $\alpha 2$ は DNA 結合を介して核内に保持された。そのため、IBB domain は importin α の機能及び細胞内局在において支配的な役割を担っている。しかし、単一の IBB domain が複数の機能に関わるため、importin α による生理学的作用を特定の機能と結びつけて解釈するのは困難であった。本研究において、核輸送プロセスにおける各相互作用に重要な残基が区別されたことにより、importin α の特定の機能を抽出した解析が可能となることを期待される。また、importin α ファミリータンパク質以外にも IBB domain を含むタンパク質が存在し、IBB domain 様配列も同定されている。さらに、未同定の IBB domain 様配列が多く存在する可能性があり、今回の解析で得られた IBB domain を構成する残基と生化学的性質の重要性に関する情報は、そのような IBB domain 様配列の機能予測につながる可能性がある。さらに今回の解析では、生物種間で保存されているにもかかわらず、いずれの機能構造においても相互作用への寄与が小さいと予測される残基が見つかった (図4)。今後、それらの残基を解析することにより、IBB domain の新規結合パートナーおよび importin α の新規機能の発見につながる可能性がある。