

博士論文

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

日本大学大学院総合基礎科学研究科

相関理化学専攻

地引 和也

目次

第1章 序論.....	- 4 -
1-1 importin α による核輸送機構.....	- 4 -
1-2 importin α の機能ドメイン.....	- 4 -
1-3 importin α のファミリー遺伝子.....	- 4 -
1-4 importin α の核輸送機能と非核輸送機能について.....	- 5 -
第2章 importin α とクロマチン DNA の相互作用解析.....	- 7 -
2-1 序.....	- 7 -
2-2 実験方法.....	- 7 -
2-2-1 細胞培養.....	- 7 -
2-2-2 免疫染色.....	- 7 -
2-2-3 タンパク質精製.....	- 8 -
2-2-4 ゲノム DNA 断片化.....	- 8 -
2-2-5 ゲルシフトアッセイ.....	- 9 -
2-2-6 ChIP (Chromatin Immunoprecipitation, クロマチン免疫沈降) アッセイ.....	- 9 -
2-2-7 qPCR (quantitative PCR, 定量 PCR).....	- 10 -
2-2-8 相同性検索.....	- 10 -
2-2-9 CD (circular dichroism) 分光法.....	- 11 -
2-2-10 ホモロジーモデリング.....	- 11 -
2-2-11 分子ドッキング.....	- 11 -
2-2-12 MD (Molecular dynamics, 分子動力学) シミュレーション.....	- 11 -
2-2-13 結合自由エネルギー推定.....	- 12 -
2-2-14 NMR 測定.....	- 12 -
2-2-15 解離定数と化学量論の推定.....	- 13 -
2-2-16 プラスミド作製.....	- 14 -
2-2-17 DNA 結合ビーズを用いたタンパク質の結合実験.....	- 15 -
2-2-18 蛍光標識タンパク質のトランスフェクションと細胞の Triton X100 及び DNase I 処理.....	- 15 -
2-2-19 ヘリカルホイールプロジェクション.....	- 16 -
2-3 結果.....	- 17 -
2-3-1 importin $\alpha 2$ と DNA の結合解析.....	- 17 -
2-3-2 importin $\alpha 2$ の DNA 結合ドメイン探索.....	- 21 -
2-3-3 DNA 結合に関わる IBB domain 残基の探索.....	- 23 -
2-3-4 IBB domain と DNA 結合の結合様式解析.....	- 25 -
2-3-5 細胞内における importin α の DNA 結合解析.....	- 31 -
2-3-6 importin α を介した NLS 輸送基質の DNA 結合解析.....	- 34 -
2-3-7 importin α ファミリータンパク質の DNA 結合解析.....	- 38 -

2-4 考察.....	- 40 -
第3章 importin α IBB domain の生化学的性質解析.....	- 46 -
3-1 序.....	- 46 -
3-2 実験方法.....	- 47 -
3-2-1 データベース.....	- 47 -
3-2-2 配列セットの作成.....	- 47 -
3-2-3 マルチプルアライメント.....	- 47 -
3-2-4 系統解析.....	- 47 -
3-2-5 ホモロジーモデリング.....	- 48 -
3-2-6 結合パートナーに対する IBB domain 残基の接触面積計算.....	- 49 -
3-2-7 エネルギー計算.....	- 49 -
3-2-8 IBB domain 残基の生化学的性質スコアリング.....	- 49 -
3-2-9 クラスタリング解析.....	- 49 -
3-2-10 ラマチャンドランプロット.....	- 50 -
3-2-11 接触面積に基づいたファミリーメンバー間の共通項と相違点のスクリーニング.....	- 50 -
3-3 結果と考察.....	- 51 -
3-3-1 importin α IBB domain コンセンサス配列の作成.....	- 51 -
3-3-2 IBB domain 残基の保存性解析.....	- 53 -
3-3-3 IBB domain と結合パートナーの界面解析.....	- 55 -
3-3-4 IBB domain の生化学的性質解析.....	- 62 -
3-3-5 importin β 複合体における IBB domain の界面解析.....	- 67 -
3-3-6 核外移行複合体における IBB domain の界面解析.....	- 72 -
3-3-7 自己阻害における IBB domain の界面解析.....	- 74 -
3-3-8 各結合パートナーに対する IBB domain の界面比較.....	- 78 -
第4章 総括.....	- 82 -
参考文献.....	- 84 -
謝辞.....	- 96 -

第1章 序論

1-1 importin α による核輸送機構

真核細胞では核膜によって核と細胞質が隔てられており、通常タンパク質は細胞質で翻訳される。そのため、核タンパク質は核輸送受容体によって核膜に存在する核膜孔を通過して核内に運ばれる。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が持つ NLS (Nuclear Localization Signal) と結合し (Kalderon, Roberts, et al., 1984; Lange et al., 2007)、さらに別の核輸送因子である importin β と三者複合体を形成して核内に進入する (図 1A) (Görlich & Mattaj, 1996; Imamoto et al., 1995)。その後、核内において RanGTP が importin β と結合することで三者複合体から importin β が解離する (Floer et al., 1997; Gilchrist et al., 2002; Vetter et al., 1999)。さらに、CAS/CSE1 (Cellular Apoptosis Susceptibility protein/Chromosome Segregation 1) あるいは Nup50 (Nucleoporin 50) が importin α と相互作用することで importin α と輸送基質が解離し、importin α は CAS によって細胞質へリサイクルされる (Kutay et al., 1997; Lindsay et al., 2002; Matsuura & Stewart, 2004)。

これまでに最もよく研究されている NLS は cNLS (classical NLS) と呼ばれるタイプの NLS であり、2-8 残基の塩基性アミノ酸クラスターによって構成されている (Lu et al., 2021)。cNLS は一つの塩基性アミノ酸クラスターで構成される monopartite と二つの塩基性アミノ酸クラスターが 9-12 残基のリンカーによってつながれた bipartite に分類される (Kalderon, Richardson, et al., 1984; Kalderon, Roberts, et al., 1984; Robbins et al., 1991)。

1-2 importin α の機能ドメイン

importin α の大部分は ARM repeat (armadillo repeat) と呼ばれる 10 回繰り返し構造 (ARM1-10) であり、importin α は 3 つの機能ドメインで構成されている (図 1B) (Conti et al., 1998)。N 末端には importin β との結合ドメインとして知られる IBB domain (importin β binding domain) が存在し、リンカーによって ARM repeat とつながれている (Cingolani et al., 1999)。ARM repeat には major NLS binding site と minor NLS binding site と呼ばれる 2 つの NLS 結合部位がそれぞれ ARM2-4 と ARM6-8 に存在し、monopartite NLS が主に major NLS binding site、bipartite NLS が二つの NLS 結合部位に対して結合する (Conti et al., 1998; Conti & Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2000, 2003)。また、ARM9、10 から C 末端の天然変性領域には Nup50 と CAS の結合部位が含まれる (Görlich et al., 1997; Hood & Silver, 1998; Kutay et al., 1997; Matsuura & Stewart, 2005; Solsbacher et al., 1998)。IBB domain には cNLS 様配列が含まれており、importin α 自身の NLS 結合部位と結合して importin β 非存在下での NLS 結合を防ぐ自己阻害に働く (Kobe, 1999; Lott & Cingolani, 2011)。

1-3 importin α のファミリー遺伝子

importin α ファミリータンパク質は、複数の遺伝子から発現されており、ファミリーメンバーごとに輸送基質特異性を持つ。さらに、ファミリーメンバーの発現プロファイルは細胞

種によって大きく異なるため、核タンパク質の核輸送は細胞種ごとに選択的に制御される (Köhler et al., 1999; Miyamoto et al., 2016; Oka & Yoneda, 2018; Pumroy & Cingolani, 2015)。この研究では、importin α ファミリータンパク質を importin $\alpha 1$ / KPNA1 (ヒトでは importin $\alpha 5$ 、マウスでは importin $\alpha 1$)、importin $\alpha 2$ / KPNA2 (ヒトでは importin $\alpha 1$ 、マウスでは importin $\alpha 2$)、importin $\alpha 3$ / KPNA3 (ヒトでは importin $\alpha 4$ 、マウスでは importin $\alpha 3$)、importin $\alpha 4$ / KPNA4 (ヒトでは importin $\alpha 3$ 、マウスでは importin $\alpha 4$)、KPNA5 (ヒトでは importin $\alpha 6$)、importin $\alpha 6$ / KPNA6 (ヒトでは importin $\alpha 7$ 、マウスでは importin $\alpha 6$) importin $\alpha 8$ / KPNA7 (マウスとヒトで importin $\alpha 8$) と定義する (図 1C)。importin α ファミリータンパク質はさらにアミノ酸の相同性に基づいて 3 つのサブタイプに分類されており、この研究では KPNA1、KPNA5、KPNA6 が属するサブタイプをサブタイプ 1、KPNA3、KPNA4 が属するサブタイプをサブタイプ 3、KPNA2 と KPNA7 が属するサブタイプをサブタイプ 2 と定義する (Oka & Yoneda, 2018)。

1-4 importin α の核輸送機能と非核輸送機能について

importin α による選択的な核輸送は様々な生命現象の分子基盤となっており、細胞の運命決定にも関わる (Miyamoto et al., 2012; Yasuhara & Yoneda, 2017)。一方、importin α は核輸送以外にも紡錘体の形成、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 関連機能などの非核輸送機能を持つことが報告されている (Miyamoto et al., 2016; Oka & Yoneda, 2018)。そのため、細胞活動における importin α の役割を理解するためには、各機能の分子メカニズムと核輸送および非核輸送機能を含めた機能間のバランス調整の仕組みを解明することが重要である。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 の機能間の切り換えについても完全な理解は得られていない。

そこで本研究では上記の課題にアプローチするために、第 2 章において 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、第 3 章において importin α の多機能性を担う IBB domain の生化学的性質を解析した。

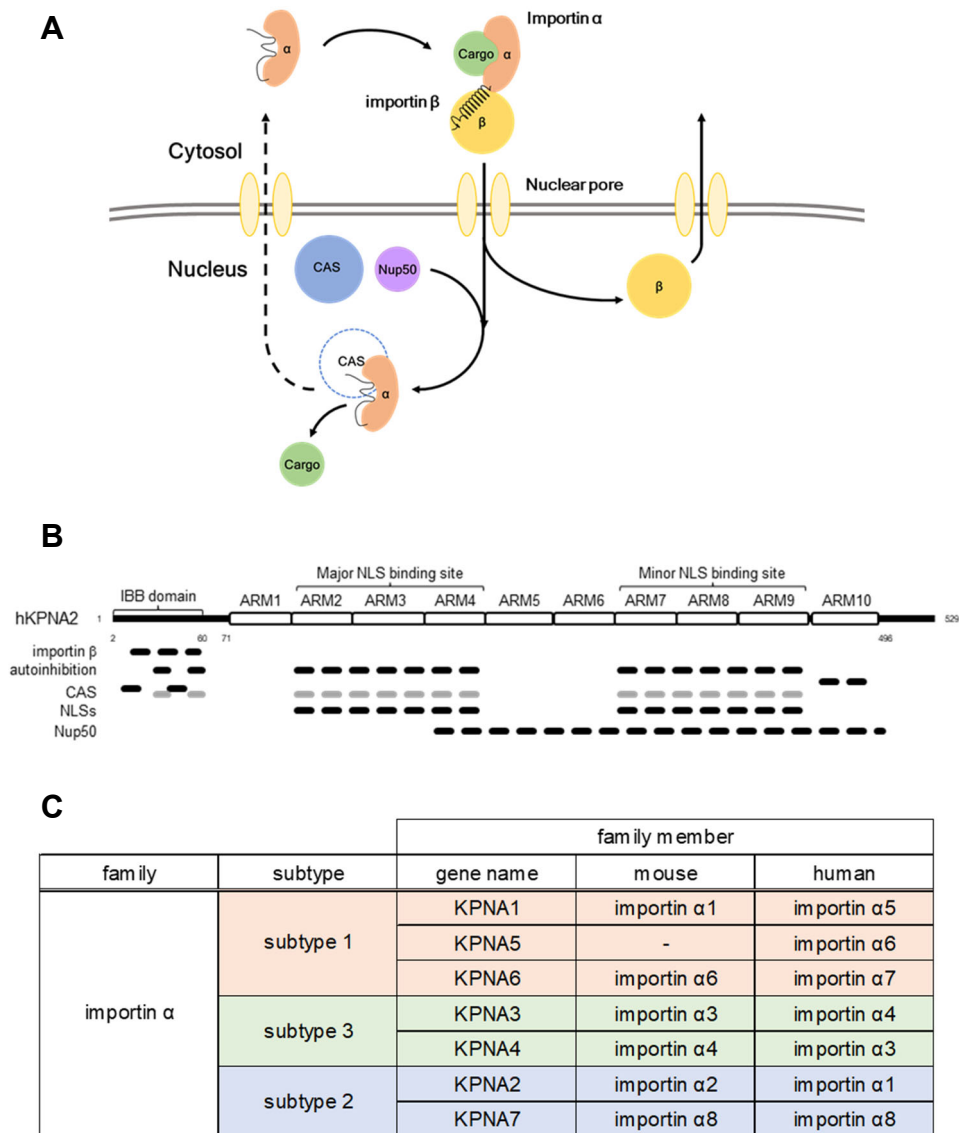


図1 importin α による核輸送機構

(A) importin α による核輸送機構の概略図。(B) ヒトの importin α 2 / KPNA2 を例に、機能ドメインの模式図を残基番号と共に示す。模式図の下には、importin β 結合、自己阻害、CAS 結合、Nup50 結合に関与する領域が黒の点線で示されている。また、importin α が CAS と結合する際に IBB domain と ARM repeat が相互作用する領域を灰色の点線で示した。(C) 本研究における importin α ファミリーメンバーの定義とサブタイプ分類。

第2章 importin α とクロマチン DNA の相互作用解析

2-1 序

これまでに、HeLa 細胞において importin α ファミリーメンバーの一種である importin $\alpha 2$ が熱ショックや酸化などの特定のストレス条件下で核に蓄積し、DNase 感受性核成分に結合することが知られている(Furuta et al., 2004; Kodiha et al., 2004; Miyamoto et al., 2004; Yasuda et al., 2012)。また、importin $\alpha 2$ が特定のクロマチン領域に結合し、importin $\alpha 2$ の発現によって結合領域の転写活性が促進することが数例の遺伝子について報告されている(Huang et al., 2007; Yasuda et al., 2012)。そのため、importin $\alpha 2$ は核内に分子を輸送するのみでなく、クロマチンと相互作用し、核機能の制御に関わる可能性がある。しかし、importin $\alpha 2$ とクロマチン結合の分子メカニズムは明らかになっておらず、その直接的な作用も未知であった。

そこで本研究では、importin $\alpha 2$ とクロマチン結合の分子メカニズムを明らかにするために、まず、生化学的実験とコンピュータシミュレーションにより、importin $\alpha 2$ と DNA の結合様式を解析した。さらに、得られた知見を基に、細胞内における importin $\alpha 2$ 及び輸送基質の挙動をクロマチン DNA 結合の側面から解析した。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

マウス由来の ES 細胞である Bruce-4 細胞株は、15% FCS 及び ESGRO (Merck Millipore) を添加した DMEM を使用し、10% CO₂ の条件下で 0.1% ゼラチンコーティングディッシュ上で培養した。ヒト子宮頸癌細胞由来の HeLa 細胞は、10% FCS を添加した DMEM を使用し、10% CO₂ の条件下で培養した。

2-2-2 免疫染色

免疫細胞染色では、細胞を 0.1% ゼラチンでコーティングしたカバーガラススリップに播種し、3.7% ホルマリン (Nacalai Tesque, Inc.) を含む PBS により固定した。その後、0.5% Triton X100 (Nacalai Tesque, Inc.) を含む PBS によって細胞を透過処理し、3% スキムミルク (Nacalai Tesque, Inc.) を含む PBS によってブロッキングを行った。一次抗体として 400 倍希釈した KPNA2 (importin $\alpha 2$) 抗体 (rat monoclonal antibody, MBL) あるいは 200 倍希釈した KPNA2 (importin $\alpha 2$) 抗体 (goat polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体として 100 倍希釈した Alexa488 conjugated anti-rat IgG あるいは Alexa488 conjugated anti-goat IgG (Thermo Fisher Scientific) を使用し、それぞれ Can-Get-Signal solution (Toyobo) に懸濁した。DNA は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Nacalai Tesque, Inc.) によって染色した。定量解析のための単一焦点面画像は、PlanApo λ 60X oil、NA=1.4. objective lens を備えた confocal microscopy A1 (Nikon) と NIS-Elements ソフトウェア (Nikon) を使用し、実験ごとに撮影条件を統一して撮影した。

DNA 結合ビーズと結合した importin $\alpha 2$ の検出には、一次抗体として 500 倍希釈した

KPNA2 (importin α 2) 抗体 (goat polyclonal, Novus Biologicals)、二次抗体として 500 倍希釈した Alexa568 conjugated anti-goat IgG (Thermo Fisher Scientific) を使用した。単一焦点面画像は、PlanApoVC 20X、NA=0.75. objective lens を備えた Nikon A1 confocal microscope (Nikon) と NIS-Elements ソフトウェア (Nikon) を使用して取得した。

2-2-3 タンパク質精製

GST-importin α 1 (Sekimoto et al., 1997)、GST-importin α 2 (Imamoto et al., 1995)、GST-importin α 3 (Kimoto et al., 2015) の発現プラスミドは過去の報告と同様に作製した。リコンビナントタンパク質は、過去に報告された手順を以下の通り一部改変して pGEX コンストラクトから精製した (Imamoto et al., 1995)。タンパク質のプラスミドコンストラクトを BL21 (DE3) コンピテントセルに形質転換し、200 mL の LB 培地で 30°C で 5 時間培養した後、0.1 μ M IPTG を添加して 24°C で 6 時間培養することにより発現誘導した。その後、100 μ g/mL lysozyme、PMSF、0.5% NP40 を添加した PBS により溶解し、SONIFIER 250 (Branson) を使用してレベル 4、最大振幅 40% での 10 秒間の超音波処理を 10 秒間のインターバルで 4 回繰り返した。超音波処理後、ライセートの遠心分離を 1000 rpm にて 4°C で 10 分間行い、上清を回収した。GST 融合タンパク質は、GST Accept (Nacalai Tesque Inc.) の製品プロトコルに従って上清から濃縮した。GST タグは、ベクターに応じて Prescission Protease (GE Life Science) または Thrombin (Nacalai Tesque Inc.) を使用し、製品プロトコルに従って切断した。GST 切断処理後のリコンビナントタンパク質は、PD 10 Desalting Columns (GE Life Science) を使用し、プロテアーゼ阻害剤を含む buffer (20 mM HEPES, 110 mM KOAc, 5 mM NaOAc, 2 mM MgOAc, 1 mM EGTA, 2 mM DTT) によって精製した。

2-2-4 ゲノム DNA 断片化

直径 10 cm ディッシュの接着面の約 60%-70% まで増殖した Bruce-4 細胞を ChIP Elution Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) により溶解し、Handy Sonic (TOMY) を使用して出力レベル 4 での 5 秒間の超音波処理を 6 回行った後、Bioruptor II (BM Equipment) を使用して高レベルでの 30 秒間の超音波処理を 60 秒間のインターバルで 7 回繰り返してライセートを調製した。その後、超音波処理後のライセートを 250 mM NaCl、0.25 mg / mL Proteinase K (Nacalai Tesque Inc.) とともに 3.75 時間インキュベートした。ゲルシフトアッセイでは、FastGene Gel / PCR Extraction Kit (Nippon Genetics Co., Ltd.) を使用して断片化されたゲノム DNA を精製し、2% アガロースゲルでの電気泳動により DNA 断片をサイズごとに分離した。その後、約 600 bp のゲノム DNA を含む画分をアガロースゲルから切り出し (図 2B)、FastGene Gel / PCR Extraction Kit (Nippon Genetics Co., Ltd) を使用してゲノム DNA を精製した。DNA 結合ビーズアッセイでは、ライセートの Proteinase K 処理後、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿により、ゲノム DNA を精製した。

2-2-5 ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイでは、3'末端にビオチンが付加された 600 bp の二本鎖 DNA 断片 (upstream-1, upstream-2, ゲノム DNA) をプローブとして使用した。二本鎖 DNA の 3'末端のビオチン化は、Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して、製品プロトコルを一部改変して行った。この反応では、93.5 ng の二本鎖 DNA 断片のビオチン化をラベリング反応液 (1X TdT Reaction Buffer, 0.5 μ M Biotin-11-UTP, 0.15 U/ μ l TdT) 中の terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) によって 37°Cで行い、30分後に 0.2 M EDTA をラベリング反応液に添加して反応を停止させた。その後、クロロホルム抽出によりラベリング反応液から TdT を除去し、ゲルシフトアッセイに使用した。ゲルシフトアッセイは、LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Fisher Scientific) と Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Fisher Scientific) を使用して製品プロトコルに従って行った。ゲルシフトアッセイでは、1 μ g (17.3 pmol)あるいは 2 μ g (34.6 pmol)の importin α 2 リコンビナントタンパク質と 0.33 μ L の TdT 除去処理後のラベリング反応液を結合反応液 (1X Binding Buffer, 50 ng/ μ L, Poly (dl-dC), 2.5% glycerol, 0.05% NP-40, 5 mM MgCl₂) 中で混和し、室温 (24°C) で 20 分間反応させた。その後、4%TBE ポリアクリルアミドゲルでの結合反応液の電気泳動を 200 V 定圧電流で行い、ゲル中の DNA 断片をナイロンメンブレンに転写して UV による架橋を行った。メンブレン上のビオチン化 DNA 断片を Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate によって標識し、Pxi4 (Syngene) または G : BOX mini (Syngene) を使用してメンブレン上の Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate を検出した。

2-2-6 ChIP (Chromatin Immunoprecipitation, クロマチン免疫沈降) アッセイ

1.0 \times 10⁷ 個の ES 細胞を室温 (24°C) で 0.5% ホルムアルデヒド含有培地により架橋し、5 分後、0.125 M グリシンにより反応を停止させた。その後、細胞ペレットを RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktail) に懸濁し、Bioruptor II (BM Equipment) を使用して高レベルでの 30 秒間の超音波処理を 60 秒間のインターバルで 7 回繰り返した。超音波処理後のライセートを 15000 \times g で 10 分間遠心分離した後、100 ng / μ L の DNA 濃度に希釈し、特定の抗体を用いた免疫沈降に使用した。また、希釈ライセートのうち 25 μ L を後の手順の input として使用した。anti-KPNA2 (importin α 2) (rabbit polyclonal, Abcam)、normal rabbit IgG (EMD Millipore Corp)、anti-Oct-3 (Oct 3/4) (mouse monoclonal, BD Biosciences)、normal mouse IgG (EMD Millipore Corp.)の各抗体 1 μ g を 20 μ L の Dynabeads M-280 (Thermo Fisher Scientific)を添加した 250 μ L の希釈ライセートに加え、ローテーターで回転させながら 4°Cで一晩インキュベートした。その後、ビーズを ChIP buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.5% NP-40, protease inhibitor cocktail)、wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.5% NP-40, protease inhibitor cocktail)、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA ·

Na2, pH8.0) で洗浄し、ビーズと input をそれぞれ 25 μ L と 50 μ L の ChIPelution Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS, 2% proteinase K) と混合して 50°C で 1 時間インキュベートすることで逆架橋とタンパク質消化を行った。ChIP によって得られた DNA は Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) を使用して最終容量 50 μ L で精製した。

また、ChIP サンプルのウエスタンブロットを行い、importin α 2 あるいは Oct3/4 の IP 効率を確認した。ウエスタンブロットの一次抗体には、goat polyclonal antibody for KPNA2(importin α 2) (Novus Biologicals) あるいは mouse monoclonal antibody for Oct 4 (Oct3/4) (Santa Cruz) を使用し、二次抗体には donkey anti-mouse IgG-HRP antibody (Santa Cruz) あるいは Clean-Blot IP detection Reagent (Thermo Scientific) を使用した。

2-2-7 qPCR (quantitative PCR, 定量 PCR)

ChIP 後の qPCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)、Thermal Cycler Dice Real-Time System II (Takara Bio)、下記のプライマーを使用して製品プロトコルに従って行った。精製した 50 μ L の ChIP サンプルを、0.6 μ L の 10 μ M プライマー溶液と 10 μ L の THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix と混合し、nuclease-free water (Nacalai Tesque) によって合計 20 μ L に調整した。PCR は、95°C での 30 秒間の初期変性と 95°C での 15 秒間の変性、54°C での 15 秒間のアニーリング、60°C での 30 秒間の伸長の反応サイクルによって行い、37 未満の Ct 値が有効と判断された。また、融解曲線を 95°C で 15 秒、60°C で 30 秒、95°C で 15 秒の単一サイクルによって得た。各プライマーセットの検量線は、0 倍、0.1 倍、0.01 倍、0.001 倍の 4 段階に希釈した input から精製したゲノム DNA の PCR によって得た。1 回の PCR 反応につき同一サンプルを 3 セット用意し、検量線から各サンプルの平均相対量と importin α 2 あるいは Oct3/4 の ChIP サンプルとコントロールサンプルの比を計算した。3 回の独立した qPCR を行い、importin α 2 の ChIP サンプルの Ct 値はすべて標準曲線の範囲内であった。

ターゲット配列はマウス POU5F1 遺伝子上流に存在する (MGI: 101893, NCBI Gene: 18999, LOC108961160 on chromosome 17, NCBI Reference Sequence: NG_051978.1.)。

upstream-1 Fwd: CACATCTGTTTCAAGCTAGTTCTAAGAA

upstream-1-2 Rev: CAACCTTGTCTTATGGATTGTTCTCTT

upstream-2 Fwd: ATGAAGACTACCATCAAGAGACACC

upstream-2-2 Rev: TTGTCTGTCTGCTCCTACCAT

2-2-8 相同性検索

相同性検索は Protein BLAST を使用して、以下のパラメーターによって実行した。クエリ配列: AARLNRFKNGKGDSTEMRRRRISNVELRKAKKDEQMLKRRNVSSF (IBB domain の塩基性領域全体) あるいは KDSTEMRRRRISNVELRKAKKDEQMLKRR (短いコア配列)、データベース: Protein Data Bank (PDB)、アルゴリズム: BLASTp (protein-protein BLAST)

with automatic adjustment of parameters for short input sequences、expected threshold: 5、word size: 3、matrix: PAM30、gap costs: Existence 8、Extension 1、compositional adjustments: conditioned compositional score matrix adjustments。タンパク質と DNA または RNA 分子を同時に含むすべての PDB エントリ (2019 年 9 月 25 日時点) を抽出し、それらを上記の BLASTp の出力と照合した。RRRR motif を含むタンパク質配列については、各構造を個別に調べ、モチーフと核酸の相互作用と二次構造を確認した。

2-2-9 CD (circular dichroism) 分光法

0.05-cm path-length fused silica cuvette を使用し、20 mM phosphate buffer (pH 7.0) 中に含まれる 50 mM の importin α ペプチドの 300 nm から 195 nm の遠紫外線 CD スペクトルを室温 (24°C) で Jasco J-820 spectropolarimeter (Jasco Corporation) によって計測した。バンドパスは 1 nm であり、対応するスキャン速度を選択した。64 回のスキャンを平均し、サンプルスペクトルからブランクスペクトルを差し引いて楕円率を計算した。

2-2-10 ホモロジーモデリング

importin $\alpha 2$ IBB domain のホモロジーモデリングは、マウス importin $\alpha 2$ の IBB domain をターゲット配列、PDB ID: 1QGK を鋳型として、Swiss Model を使用してデフォルトのパラメーターにより行った。

2-2-11 分子ドッキング

IBB domain のヘリックス構造を IBB domain と importin β の複合体構造 (PDB ID: 1QGK) から抽出し、マウス importin $\alpha 2$ IBB domain 配列に手動で置換した。DNA 配列には、upstream-1 の上流 20 bp を採用し、AmberTools パッケージ(Case et al. 2016)の NAB molecular manipulation language(Macke & Case, 1997)を使用して標準的な B 型 DNA 構造を生成した。IBB domain と DNA は AutoDock vina(Trott & Olson, 2009)を使用してドッキングした。ドッキングセンターは DNA の質量の中心に設定し、ドッキングボックスのサイズを[x =50 Å、y =50 Å、z =50 Å]に設定して DNA 構造全体をカバーした。生成された 10 個のドッキングポーズのうち、最高スコアのドッキング構造を MD シミュレーションによるドッキングモデル構造の最適化に使用した。

2-2-12 MD (Molecular dynamics, 分子動力学) シミュレーション

シミュレーションシステムの正味の電荷は、Amber16 パッケージ(Case et al. 2016)の Leap モジュールを使用してドッキングモデル構造に対しイオン (Na⁺) を追加することで中和した。対イオンを含むドッキングモデル構造をウォーターボックスの中央に配置し、水分子は TIP3P 3-point charge model potential(Jorgensen et al., 1983)を使用してモデル化した。ウォーターボックスのサイズは、タンパク質及び DNA の全原子とウォーターボック

スの境界との間の距離が短くとも 15 Å になるよう設定した。最急降下法の 100 ステップを介して完全に溶媒和されたシステムのエネルギーを最小化し、その後、エネルギー勾配が 0.0001 kcal / mol 未満になるまで共役勾配法を適用した。

エネルギーを最小化した構造から 30 ns の MD シミュレーションを実行し、Amber 16 パッケージ(Case et al. 2016)の pmemd モジュールを使用してより良いコンフォメーションのサンプリングを行った。タンパク質の分子力場には ff14SB(Maier et al., 2015)、DNA の分子力場には OL15(Zgarbová et al., 2015)を採用し、積分の時間ステップを 1 fs に設定した。水素原子を含むすべての結合長は、SHAKE 法(Ryckaert et al., 1977)によってそれぞれの平衡値に制限された。非結合ファンデルワールス相互作用は Lennard-Jones potential を使用して推定し、静電エネルギーと力はカットオフ距離 10.0 Å の particle-mesh Ewald summation アルゴリズム(Darden et al., 1993)を使用して計算した。システムは、最初の 50 ps の間に 6 K / ps の加熱速度で徐々に 300 K まで加熱された後、Berendsen らのサーモスタット(Berendsen et al., 1984)を適用することにより、結合時定数 1.0 ps において温度と圧力をそれぞれ 300 K と 1 atm で一定に維持した。MD 軌道は 10 ps ごとにサンプリングされ、root mean squared deviation (RMSD) 計算、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、AmberTools 16(Case et al. 2016)を使用した結合自由エネルギー推定を行った。

2-2-13 結合自由エネルギー推定

importin $\alpha 2$ IBB domain と DNA 間の結合自由エネルギー (ΔG) は、molecular mechanics generalised born surface area (MM-GBSA) implicit solvent model(Bashford & Case, 2000)によって推定した。 ΔG_{MMGBSA} を野生型では 1 ns-30 ns、変異体では 1 ns-10 ns の 100 ps ごとに計算した。各時間 t ps の ΔG_{MMGBSA} は、($t-990$) ps から t ps まで 10 ps ごとに保存された 100 個のスナップショットから計算した。すべての ΔG_{MMGBSA} 計算は、GB-OBC モデル(Onufriev et al., 2004)に基づき、内部及び外部誘電率をそれぞれ $\epsilon_{\text{in}} = 1$ と $\epsilon_{\text{out}} = 80$ として計算した。

implicit solvent GBSA モデルは、溶媒のエントロピー効果を考慮するが、溶質の配置エントロピー効果は考慮しない。溶質の配置エントロピーは、PDB2ENTROPY および PDB2TRENT(Fogolari et al., 2018)を使用して計算した。この計算において、MD 軌道は ΔG_{MMGBSA} で説明したものと同一である。

2-2-14 NMR 測定

NMR スペクトルは、極低温に冷却された proton optimised triple resonance NMR 'inverse' probe (TXI) を備えた Bruker Avance II 800MHz spectrometer (Bruker BioSpin) によって取得した。すべてのスペクトルは、p3919gp pulse program を使用して 25°C (298 K) での 256 スキャンによって取得した。データ取得とスペクトル処理は、Topspin3.2TM ソフトウェアを使用して行った。化学合成されたペプチドと DNA を 10% D₂O を含む 50 mM Tris-Cl buffer (pH7.9)に溶解し、4-mm ϕ Shigemitsu tube 内で測定を行った。ペプチドのアミノ酸配列は

KDSTEMRRRRISNVELRKAKKDEQMLKRR (importin α_2 _21-50)、15 bp DNA 配列は GCAGATGCATAACCG (POU) と GCGGACCACTAGACG (ランダム配列) である。

2-2-15 解離定数と化学量論の推定

NMR 滴定実験の各ペプチド濃度における一次元 NMR スペクトルのイミノプロトン領域をローレンツピーク関数を使用した非線形フィッティングによって 12 個のピークに分解した(Cavanagh et al. 1996; Tauler, 1995)。

$$f(x)_i = 2h_i w_i / (4\pi(x - u_i)^2 + w_i^2) + b_i$$

h_i 、 w_i 、 u_i 、 b_i はそれぞれピークの高さ、幅、中心、 i 番目のピークのベースラインである。

観察されたスペクトル変化は明らかに 2 つの相を示し、POU 配列の場合、最初のステップと 2 番目のステップの結合は、50 μ M DNA に対してそれぞれ 100 μ M と 250 μ M のペプチド濃度で飽和しているようにみえた。したがって、化学量論が最初のステップで 1 : 2 (DNA : ペプチド)、2 番目のステップで 1 : 3 (DNA : ペプチド) となる 2 ステップの一連の結合プロセスを想定した。一方、ランダム配列の場合、最初のステップと 2 番目のステップの結合は、50 μ M DNA に対してそれぞれ 150 μ M と 200 μ M のペプチド濃度で飽和しているようにみえたため。結合は比較的弱く、飽和点はあいまいであったが、化学量論が最初のステップで 1 : 3 (DNA : ペプチド)、2 番目のステップで 1 : 1 (DNA : ペプチド) となる 2 ステップの一連の結合プロセスを想定した。

2 つの結合ステップが独立しており、完全に連続しているという仮定の下で、化学シフトとピーク高さの変化を非線形最小二乗フィッティングによって分析し、結合強度と化学量論を推定した。

上記のモデルを仮定した場合、 i 番目のピーク $\Delta\delta_{obs}(i)$ の化学シフト変化は次のように表される。

$$\Delta\delta_{obs}(i) = \Delta\delta_{1_{obs}}(i) + \Delta\delta_{2_{obs}}(i)$$

$\Delta\delta_{1_{obs}}(i)$ は最初の結合ステップにおける化学シフト変化であり、 $\Delta\delta_{2_{obs}}(i)$ は 2 番目の結合ステップにおける化学シフト変化である。化学シフト変化の各成分($\Delta\delta_{1_{obs}}(i)$ と $\Delta\delta_{2_{obs}}(i)$) は、飽和点でのピーク i の化学シフト変化と DNA 結合型ペプチドの濃度の積として表すことができる(Inase et al., 2004)。

$$\begin{aligned} \Delta\delta_{1_{obs}}(i) &= \Delta\delta_{1_{sat}}(i) \frac{[p]_t - [p]}{[D_{site1}]_t} \\ &= \frac{\Delta\delta_{1_{sat}}(i)}{[D_{site1}]_t} \cdot \frac{([p]_t + K_{d1} + [D_{site1}]_t) - \sqrt{([p]_t + K_{d1} + [D_{site1}]_t)^2 + 4K_{d1}[p]_t}}{2} \end{aligned}$$

$\Delta\delta_{1_{sat}}(i)$ 、 $[p]_t$ 、 $[p]$ 、 $[D_{site1}]_t$ 、 K_{d1} はそれぞれ最初の結合ステップにおける飽和点でのピーク i の化学シフト変化、ペプチドの総濃度、遊離ペプチドの濃度、DNA 結合部位の総濃度、解離定数である。

最初の結合ステップが飽和した後、遊離ペプチドの濃度はおおよそ次のように記述される。

$$[p] = [p]_t - [D_{site1}]_t$$

そこで、二番目の結合ステップにおけるピーク*i*の化学シフト変化は次のように記述される。

$$\Delta\delta_{obs}(i) = \Delta\delta_{sat}(i) \frac{[p]_t - [p]}{[D_{site1}]_t}$$

$$= \frac{\Delta\delta_{sat}(i)}{[D_{site2}]_t} \cdot \frac{([p]_t + K_{d2} + [D_{site2}]_t) - \sqrt{([p]_t + K_{d2} + [D_{site2}]_t)^2 + 4K_{d2}[p]_t}}{2}$$

$\Delta\delta_{sat}(i)$ 、 $[D_{site2}]_t$ 、 K_{d2} は、それぞれ2番目の結合ステップにおける飽和点でのピーク*i*の化学シフト変化、DNA結合部位の総濃度、解離定数である。

2-2-16 プラスミド作製

importin α の野生型及び変異体、SV40NLSのpEGFPコンストラクトは過去の報告と同様に作製した(Yasuda et al., 2012)。pEGFP-importin $\alpha 2$ NAAT変異体(28A4, 39A5, 49A3)はKOD-plus-Mutagenesis Kit (Toyobo) を使用して作製した。importin $\alpha 2$ の野生型と28A4変異体へのC変異の導入は過去の報告と同様に行った(Yasuda et al., 2012)。使用したプライマーを以下に示す。

NAAT-28A4 Fwd: GCTGCTATAGAAGTTAATGTGGAACCTCAGGAAA

NAAT-28A4 Rev: AGCAGCCATTTCTGTGCTGTCCTTCCC

NAAT-39A5 Fwd: AGCGGCAGCGAGTTCCACATTAAC

NAAT-39A5 Rev: GCTGCCGATGAGCAGATGCTG

NAAT-49A3 Fwd: AACGTCAGCTCCTTTCCTGATGAT

NAAT-49A3 Rev: AGCAGCAGCCAGCATCTGCTCATCTT

pEGFP-importin $\alpha 2$ NAAT変異体は、pEGFPプラスミドから増幅したBamHI-EcoRI PCRフラグメントとN末端GST融合タンパク質発現ベクターpGEX-6P-2 (GE Healthcare) のBamHI-EcoRI部位に挿入して作製した。

マウスPOU5F1遺伝子(MGI: 101893, NCBI Gene: 18999)の上流調節領域(17番染色体上のLOC108961160, NCBI Reference Sequence: NG_051978.1)内のDNA断片は、以下のプライマーを使用してBruce-4細胞のゲノムDNAから調製した。

EcoRV upstream-1 Fwd: TACGATATCCACATCTGTTTCAAGCTAGTTCTA

EcoRV upstream-1-1 Rev: TACGATATCTGAATCTTCCGTTTCCTCC

EcoRV upstream-2 Fwd: TACGATATCGAGAATTATCAGGAGTTCAAGG

EcoRV upstream-2-1 Rev: TACGATATCACTTCCTGCTCCCCA.

さらに、得られたDNA断片をpBlueScriptベクターに挿入し、以下のプライマーを使用してPCRを行った。

upstream-1-1 Fwd: CACATCTGTTTCAAGCTAGTTCTAAGAA

upstream-1-3 Rev: TGAATCTTCCGTTTCCTCCA

upstream-2-1 Fwd: ATGAAGACTACCATCAAGAGACACC

upstream-2-3 Rev: ACTTCCTGCTCCCCAACC.

mCherry-SV40 NLS は、以下のプライマーを使用して、NLS 配列を mCherry-C1 ベクター (Clontech) に挿入することによって作製した。

SV40 NLS-EcoRI-Fwd:

AATTCTATGCGGCCGTCTAGTGATGAGGCTACGGCCGACTCTCAACATAGTACTCCTCCA
AAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACG

SV40 NLS-BamHI-Rev:

GATCCGTCTTCTACCTTTCTTCTTTTTGGAGGAGTACTATGTTGAGAGTCGGCCGTAG
CCTCATCACTAGACGGCCGCATAG

2-2-17 DNA 結合ビーズを用いたタンパク質の結合実験

前述のゲルシフトアッセイと同様に Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して、断片化した ES 細胞のゲノム DNA 300 ng をビオチン化した。20 ng のビオチン化ゲノム DNA 断片と 1.5 ul の Streptavidin Sepharose Beads (Cell Signaling Technology) を 100ul の buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA) 中で混和し、室温 (24°C) で 1 時間穏やかにローテーターで回転させて結合反応を行った。その後 2 回、同様の buffer でビーズを洗浄した。ビーズに対する DNA の結合は、ビーズに 3 µg/mL Hoechst (Nacalai Tesque) を加えて室温 (24°C) で 30 分間染色することにより確認した。importin α2 あるいは GFP 融合 importin α2、mCherry 融合 SV40 NLS と DNA 結合ビーズを 50 ul の buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2.5% glycerol, 0.05% NP40) 中で混和し、室温 (24°C) で 30 分間穏やかにローテーターで回転させた。その後、ビーズを 2 回洗浄し、3.7% ホルムアルデヒドを含む PBS によって固定した。すべての実験において 3 回の独立した実験を行った。DNA 結合ビーズ上の importin α2 は、免疫染色によって検出した。

2-2-18 蛍光標識タンパク質のトランスフェクションと細胞の Triton X100 及び DNase I 処理

カバースリップに播種した ES 細胞に等モル量の各 GFP コンストラクトを Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を使用して製品プロトコルに従ってトランスフェクションし、24 時間培養した。3.7%ホルムアルデヒドを含む PBS による固定の後、細胞に 1 µg/mL Hoechst (Nacalai Tesque, Inc) を加えて室温 (24°C) で 5 分間インキュベートした。細胞核内における GFP 融合タンパク質の定量分析のために、PlanApoλ 60X oil, NA=1.4. objective lens を備えた confocal microscopy A1 (Nikon) と NIS-Elements software (Nikon) を使用し、実験ごとに撮影条件を統一して ES 細胞内の GFP 融合タンパク質の単一焦点面画像を取得した。

カバースリップに播種した HeLa 細胞に等モル量の各 GFP または mCherry コンストラクト

を Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を使用して製品プロトコルに従ってトランスフェクションし、24 時間培養した。その後、過去の報告と同様に細胞を TritonX100 および DNaseI で処理した(Yasuda et al., 2012)。細胞を buffer (20 mM HEPES-KOH [pH 7.3], 110 mM CH₃COOK, 5 mM CH₃COONa, 2 mM (CH₃COO)₂Mg, 2 mM DTT, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin, 1 µg/mL aprotinin) で洗浄し、0.5% Triton X100 を含む同様の buffer を加え、4°C で 5 分間インキュベートした。その後、細胞を buffer で洗浄し、0.2 mg / mL DNase I (Worthington Biochemical) を加え、室温 (24°C) で 5 分間インキュベートした。3.7% ホルムアルデヒドを含む PBS による固定の後、細胞に 1µg/mL Hoechst (Nacalai Tesque) を加え、室温 (24°C) で 5 分間インキュベートした。細胞核内における GFP 融合タンパク質の定量分析のために、20X objective lens を備えた conventional fluorescence microscope CKX53 (Olympus) と Cell Sens Standard ソフトウェア (Olympus) を使用し、実験ごとに撮影条件を統一して撮影した。独立した 2 回の実験を行い、取得した画像を ImageJ (NIH)によって解析した。画像内のすべての核をヘキスト染色の粒子として認識し、ROI (regions of interest) としてプロットした。複数の核が一つの粒子として認識された場合は新たに ROI をプロットして区別し、死細胞や細胞断片、分裂細胞の小さい粒子は解析から除外した。このとき、コンストラクトの過剰発現による核サイズに変化はみられなかった。画像中の核ごとに GFP 蛍光強度の平均値を測定し、バックグラウンドの平均蛍光強度を差し引くことで、GFP 融合タンパク質の核内分布を定量した。さらに、統計分析のために Tukey HSD test (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/) を行った。

2-2-19 ヘリカルホイールプロジェクション

NAAT domain のヘリカルホイール(Schiffer & Edmundson, 1967)は、NetWheels : Peptides Helical Wheel and Net Projections maker(Mól & Castro, 2018)を使用して作成した。

2-3 結果

2-3-1 importin α 2 と DNA の結合解析

未分化 ES 細胞では importin α ファミリーメンバーのうち、主に importin α 2 が高発現する (Yasuhara et al., 2007)。本研究はまず、未分化 ES 細胞をモデルとして解析に着手した。

マウスの未分化 ES 細胞における importin α 2 の局在を異なる 2 種類の importin α 2 抗体を用いた免疫染色法により調べたところ、これまでに様々な細胞種で報告がある通り細胞質のみならず核の内部にも局在することが確認された (図 2A) (Miyamoto et al., 2004; Yasuda et al., 2012)。そこでまず、importin α 2 が ES 細胞のゲノム DNA と直接結合するかを検証した。未分化 ES 細胞から調製した約 600 bp のゲノム DNA 断片を用いてゲルシフトアッセイを行った結果、importin α 2 リコンビナントタンパク質を反応させたレーンでは、ネガティブコントロールとして使用した BSA と比較して、DNA バンドが importin α 2 リコンビナントタンパク質の濃度依存的にシフトアップした (図 2B-D)。このことから、importin α 2 が多様な配列の DNA に対して直接結合することが明らかとなった。

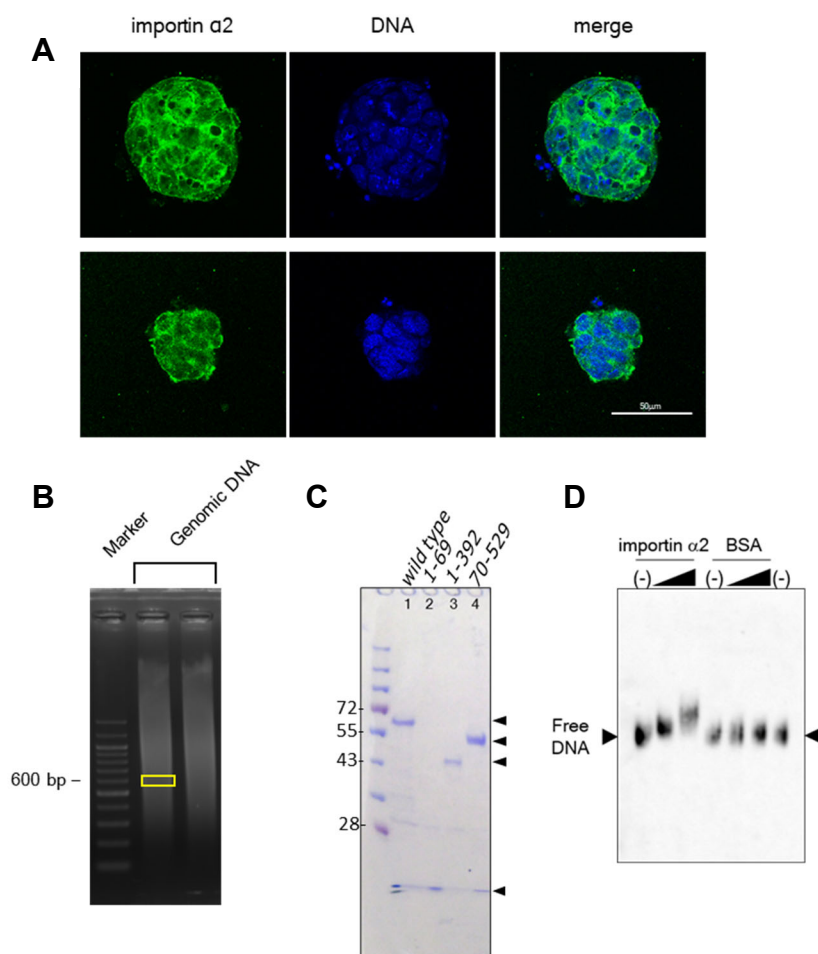


図2 importin $\alpha 2$ の細胞内局在とゲルシフトアッセイによる DNA 結合実験

(A) 未分化 ES 細胞における内在性 importin $\alpha 2$ の局在を 2 種類の異なる抗体（上段：goat polyclonal antibody, 下段：rat monoclonal antibody）を用いた免疫染色により示した。(B) 断片化した Bruce4 細胞のゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によってサイズごとに分離し、黄色の四角で示したように、約 600 bp の DNA 画分をゲルから切り出してゲルシフトアッセイに使用した。(C) 本研究で使用した importin $\alpha 2$ の野生型及び機能ドメイン欠損変異体のリコンビナントタンパク質 20 pmol を SDS-PAGE により展開し、CBB 染色により検出した。(D) 約 600 bp のゲノム DNA と importin $\alpha 2$ リコンビナントタンパク質あるいは BSA と混合し、電気泳動を行った。DNA 断片は HRP 標識 Streptavidin によって検出した。ゲルの上の黒い三角は、結合反応液に含まれるリコンビナントタンパク質あるいは BSA の量を表す。矢頭は DNA のみのバンドを示す。

次に、importin $\alpha 2$ が ES 細胞内でクロマチンと結合するかを ChIP-qPCR (Chromatin Immunoprecipitation quantitative PCR、クロマチン免疫沈降定量 PCR) 解析によって調べた。ES 細胞において転写因子 Oct3/4 は未分化維持に関わり、その遺伝子である POU5F1 の約 2 kb 上流に存在する遠位エンハンサーに含まれる CR4 domain は Oct3/4 の発現に必須であり、約 1.2 kb 上流に存在する近位エンハンサーはエピプラストにおける Oct3/4 の転写調節に重要である(Choi et al., 2016; Liao et al., 2013)。これまでに ES 細胞における Oct3/4 の ChIP-sequence 解析においてどちらのエンハンサー領域においてもポジティブなシグナルがみられている (GSE136489, GSE136485) (ENCODE Project Consortium. 2012)。この研究では、未分化 ES 細胞において機能していると考えられるこれら二つのエンハンサー領域の上流及び下流 300 bp をそれぞれ便宜的に upstream-1、upstream-2 と呼び、それぞれの上流 200bp に対するプライマーを設計した (図 3A)。importin $\alpha 2$ 抗体及び Oct3/4 抗体を使用してクロマチン免疫沈降を行い、得られた DNA 産物を上記の 2 種類のプライマーセットによって増幅した結果、importin $\alpha 2$ 及び Oct3/4 がどちらの領域に対しても細胞内で結合することが明らかとなった (図 3B-E)。そこで、以降の解析において、upstream-1、upstream-2 をモデル配列として使用した。

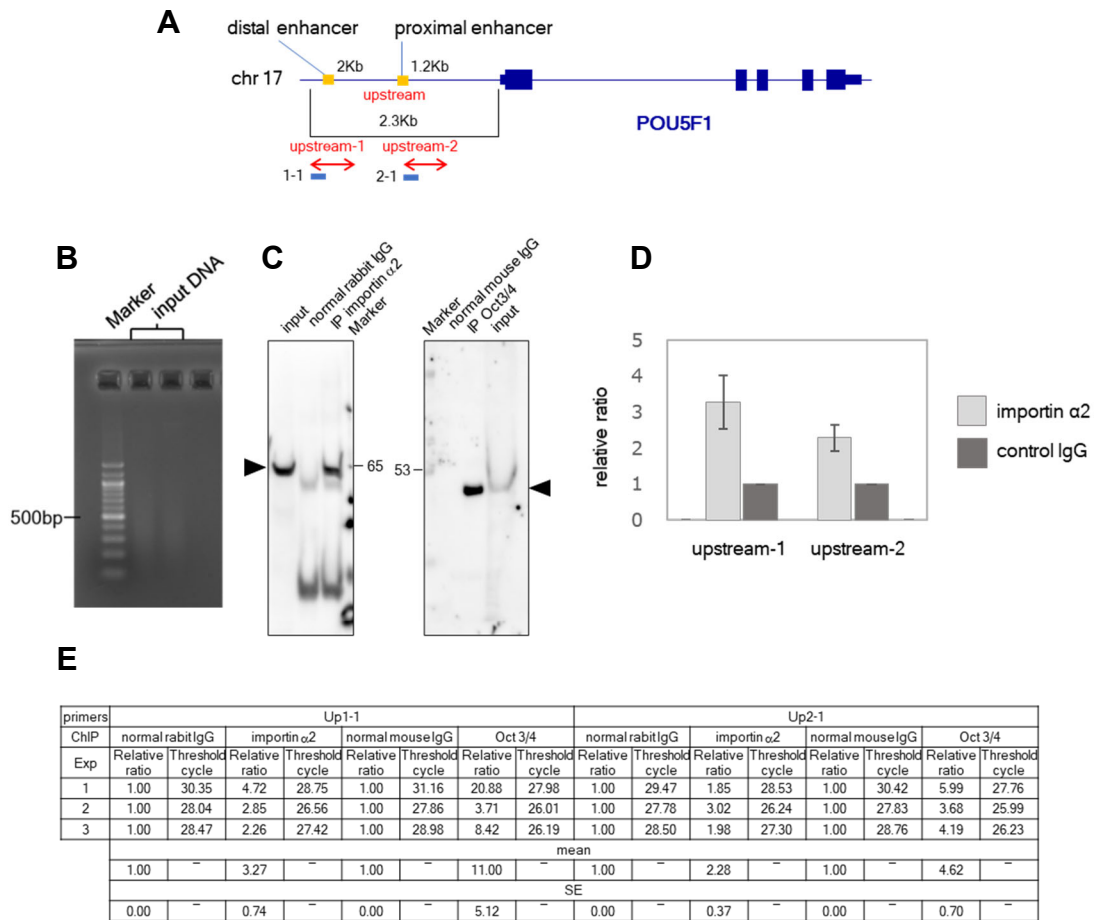


図3 importin α2 のクロマチン結合解析

(A) ゲノム上のモデル配列領域と ChIP-qPCR 解析における増幅領域 (1-1, 2-1) を示す。
 (B) ChIP-qPCR 解析において超音波処理した DNA をアガロースゲル電気泳動により展開し、DNA の断片化を確認した。(C) ChIP-qPCR 解析におけるタンパク質消化前のサンプルを SDS-PAGE により展開し、ウエスタンブロットにより importin α2 あるいは Oct3/4 を検出した。矢頭は予想される importin α2 と Oct3/4 の分子サイズを示す。(D、E) importin α2 抗体あるいは Oct3/4 抗体を用いて独立した 3 回の ChIP-qPCR 解析を行い、シグナルのサンプル/コントロール比である相対値及びその平均値、標準誤差を求めた。importin α2 のモデル配列に対する結合を (D) のグラフに示す。

2-3-2 importin $\alpha 2$ の DNA 結合ドメイン探索

次に、importin $\alpha 2$ の DNA 結合ドメインを探索した。まず、600 bp のモデル配列 DNA に対して importin $\alpha 2$ が直接結合することをゲルシフトアッセイにより確認した (図 4A)。また、upstream-1 には Oct3/4 自身の結合標的配列 (POU 配列) が含まれている。そこで、ポジティブコントロールとして upstream-1 と Oct3/4 の結合をゲルシフトアッセイにより調べたところ、importin $\alpha 2$ と同様に DNA バンドのシフトアップが確認された (図 4B)。一方、importin $\alpha 2$ を加えたレーンでは DNA バンドが全体的にシフトアップしたのに対して、Oct3/4 の場合は、free DNA バンドとシフトアップしたバンドがみられた。このことから、importin $\alpha 2$ と DNA の結合様式が Oct3/4 とは異なる可能性が示唆される。そこで、importin $\alpha 2$ の DNA 結合ドメインを特定するために、各機能ドメインを欠損した importin $\alpha 2$ の変異体を用いてモデル配列 DNA との結合をゲルシフトアッセイにより調べた。また、この実験では IBB domain 及びリンカー領域 (1-69) と ARM repeat 領域 (70-392)、C 末端領域 (393-529) の 3 つの領域に焦点を当てた (図 1C, 4C)。その結果、IBB domain を含むすべての変異体において upstream-1、upstream-2 どちらの DNA バンドもシフトアップした一方、IBB domain を欠損した変異体では DNA バンドのシフトアップはみられなかった (図 4D)。このことから、IBB domain が核輸送の調節に加えて DNA 結合にも必要であることが示唆された。また、C 末端領域を欠損した変異体 (1-392) は野生型 (1-529) よりも DNA バンドが大幅にシフトアップした (図 4D)。電気泳動における分子の移動速度は分子サイズと電荷の両方を反映しており、野生型の等電点は 5.49 であり、負に帯電した C 末端領域を欠く変異体 (1-393) の等電点は 8.80 である。そのため、C 末端領域を欠損した変異体 (1-392) は野生型よりも泳動速度が減少することが予想される。また、C 末端領域の欠損により、importin $\alpha 2$ の自己阻害機能及び IBB domain の挙動に影響が出た可能性も考えられる。

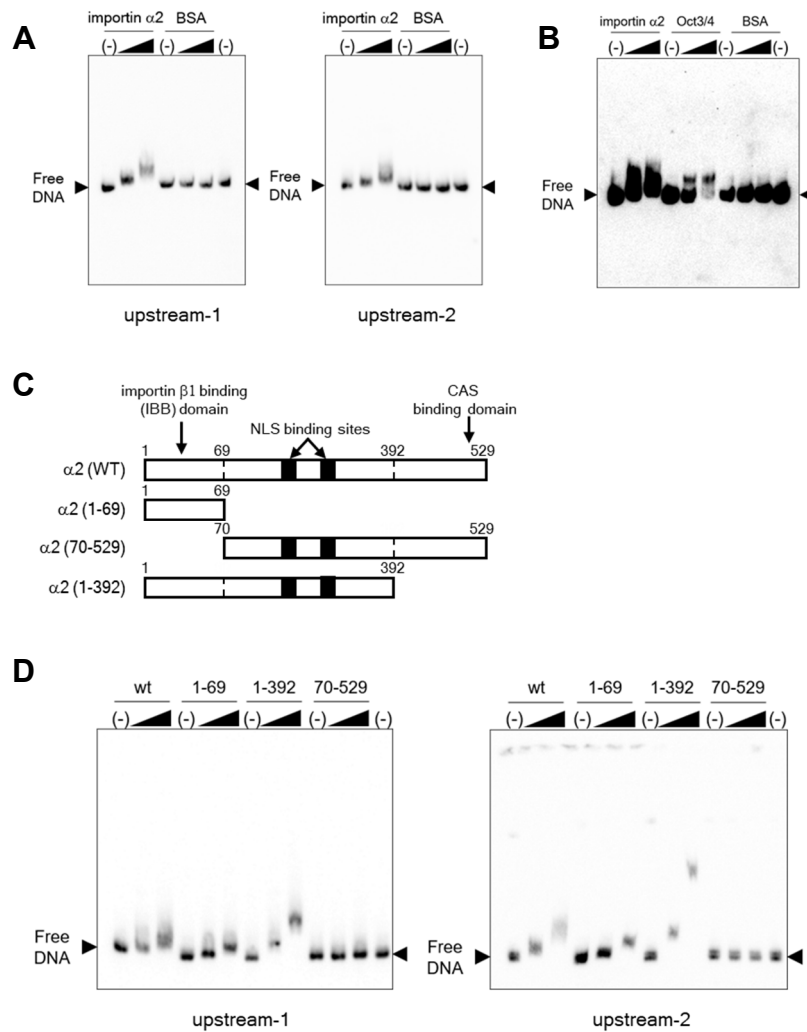


図4 importin $\alpha 2$ 機能ドメイン欠損変異体の DNA 結合実験

(A) PCR によって調製された 600 bp の upstream-1、upstream-2 と importin $\alpha 2$ リコンビナントタンパク質あるいは BSA を混合し、電気泳動を行った。(B) PCR によって調製された 600 bp の upstream-1 と importin $\alpha 2$ あるいは Oct3/4 のリコンビナントタンパク質、BSA を混合し、電気泳動を行った。ゲルの上の黒い三角は、結合反応液に含まれるリコンビナントタンパク質あるいは BSA の量を表す。矢頭は DNA のみのバンドを示す。(C) ゲルシフトアッセイに使用した importin $\alpha 2$ の機能ドメイン欠損変異体。(D) PCR によって調製された 600 bp の upstream-1、upstream-2 と importin $\alpha 2$ 機能ドメイン欠損変異体リコンビナントタンパク質を混合し、電気泳動を行った。ゲルシフトアッセイにおける DNA 断片の検出は、HRP 標識 Streptavidin によって行った。

2-3-3 DNA 結合に関わる IBB domain 残基の探索

IBB domain 内の DNA 結合部位を残基レベルで明らかにするために、まず、IBB domain 配列と既知の核酸結合タンパク質との相同性を調べた。タンパク質及び核酸構造データベース (Protein Data Bank, PDB) に対する BLAST 検索を行った結果、IBB domain 配列全体に対して優位な相同性を示したのは、importin α ファミリータンパク質の IBB domain のみであった。つまり、IBB domain 全体に対して相同性の高い配列を持つ核酸結合タンパク質は importin α ファミリー以外に存在しない。一方、importin $\alpha 2$ IBB domain 配列の一部である importin $\alpha 2_{22-51}$ 配列 (KDSTEMRRRRISNVELRKAKKDEQMLKRR) に対してはデータベース上から多くの相同性を示すモチーフが検出された。この検索結果から DNA 結合タンパク質と RNA 結合タンパク質を抽出した結果、156,365 の PDB エントリのうち、24,830 エントリが importin $\alpha 2_{22-51}$ 配列に対して優位な相同性を示す短いフラグメントを含むことが明らかとなった。驚くべきことに、これまでに核酸結合タンパク質として分類されていなかった importin $\alpha 2$ に多数の核酸結合タンパク質と相同性を示す配列が含まれていることが明らかとなった。抽出された検索結果には DNA-タンパク質複合体が 675 エントリ、RNA-タンパク質複合体が 799 エントリ含まれており、これらは PDB に含まれるすべての DNA-タンパク質複合体 (5071 エントリ)、RNA-タンパク質複合体 (2104 エントリ) のそれぞれ約 13% と約 38% にあたる。また、これらの DNA-タンパク質複合体と RNA-タンパク質複合体のうちそれぞれ 27 エントリと 36 エントリが IBB domain にみられる tetra-R (RRRR) motif を含んでいた。このように、核輸送の調節ドメインとして知られる IBB domain は核酸結合タンパク質と同様の短い基本モチーフを持つことが明らかとなった。また、tetra-R motif と核酸の相互作用パターン及び tetra-R motif が含まれる領域の二次構造、核酸の構造と配列には多様性がみられた。tetra-R motif が DNA と直接接触する方法は大きく次の 3 つの方法に分かれる。すなわち、1) α ヘリックスの一部として DNA の major groove に深く結合する方法、2) 伸長した領域の一部として DNA の minor groove に結合する方法、3) α ヘリックスの一部として DNA のリン酸骨格に乗る方法である。これらの結果を考慮すると、tetra-R motif は核酸との相互作用に有利なモチーフであると考えられる。これらの結果と DNA に対する塩基性アミノ酸の親和性の観点から、importin $\alpha 2$ が IBB domain 内の塩基性アミノ酸に富んだ領域を介して DNA と結合すると仮定した。そして、importin α ファミリーメンバー間の IBB domain 内の塩基性アミノ酸の保存性を調べたところ、いくつかのバリエーションがみられたが、tetra-R motif を含む 4 つの塩基性クラスターが保存されており、importin α の機能における重要性が示唆された (図 5A)。これらの残基の変異は出芽酵母において致命的であり、importin α の古典的な機能に不可欠であることが報告されている (Harreman, Hodel, et al., 2003)、これらの残基は古典的な機能のみならず DNA 結合を介して細胞の維持に関わる可能性も考えられる。

上記を踏まえ、IBB domain に含まれる特に顕著な 3 つの塩基性残基クラスター (28RRRR, 39RKAKK, 49KRR) に焦点を当て、図 5B に示すように、各クラスターを構成するリシン

あるいはアルギニンをアラニンに置換し、それぞれ 28A4、39A5、49A3 変異体を作製した。それらの変異体とモデル配列 DNA との結合をゲルシフトアッセイにより調べた結果、いずれの変異体においも野生型と比較して DNA バンドのシフトアップが大幅に減少した (図 5C)。また、そのような変異による影響は 28A4 変異体で特に顕著であった。さらに、ゲノム DNA に対する結合においても同様の傾向が確認された (図 5C)。これらの結果から、IBB domain に含まれる 3つの塩基性アミノ酸クラスターが DNA 結合に関わることが示された。

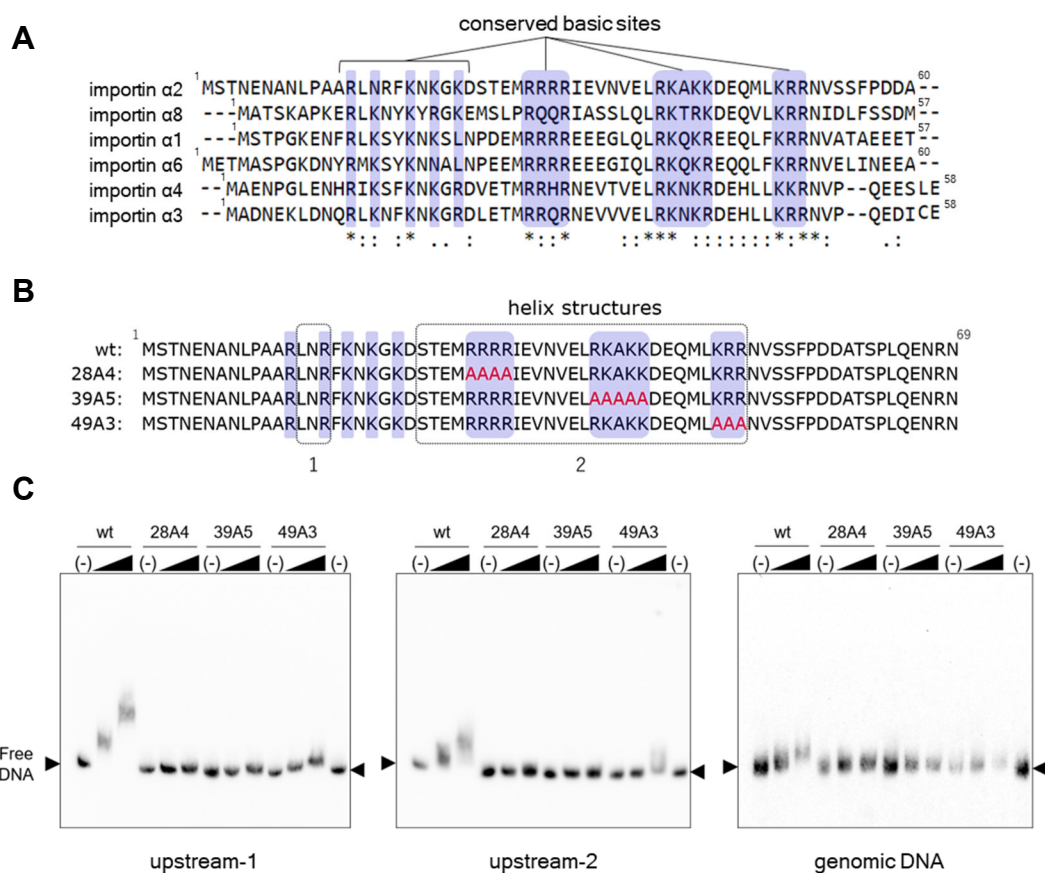


図5 importin α2点変異体のDNA結合実験

(A) ClustalWによってimportin αファミリーメンバーのIBB domainをアライメントした。ファミリーメンバー間で保存されている4つの塩基性クラスターを青の網掛けで示す。(B) importin α2 IBB domainにおける塩基性クラスターに導入した残基置換を示す。点線で囲まれた領域は、importin βとの複合体における310ヘリックス(1)とαヘリックス(2)を示す。(C) PCRによって調製された600 bpのupstream-1、upstream-2、ゲノムDNAとimportin α2点変異体リコンビナントタンパク質を混合し、電気泳動を行った。DNA断片はHRP標識Streptavidinによって検出した。ゲルの上の黒い三角は、結合反応液に含まれるリコンビナントタンパクの量を表す。矢頭はDNAのみのバンドを示す。

2-3-4 IBB domain と DNA 結合の結合様式解析

次に、IBB domain と DNA の結合様式を調べた。これまでに解かれている importin α ファミリータンパク質の結晶構造において、IBB domain はヘリックス構造 (PDB ID: 1QGK) やランダムコイル構造 (PDB ID: 1IAL, 1IQ1, 3TPO, 1WA5)、欠落部位 (PDB ID: 5TBK, 5HUW, 5HUY, 5V5P, 5V5O, 5W4E) として報告されている。これは IBB domain がマルチコンフォメーションを採用していることを示す。しかし、核酸結合モチーフの相同性検索では、tetra-R motif の多くがヘリックス構造内に含まれていた。そこで、機械学習によるアプローチを採用した SCRATCH web サーバー(Cheng et al., 2005)により、IBB domain の二次構造予測を行った。その結果、IBB domain の中央部にあたる 24S-51R は、 α ヘリックス構造を形成する傾向があることが分かった (図 6A)。また、importin α_2 _1-69 ペプチドの CD (circular dichroism) スペクトルを測定した結果、ヘリックス領域が 33.7%含まれており、upstream-1 配列二本鎖 DNA の存在下でヘリックス構造の含有量が 40.5%に増加した (図 6B, C)。これらの結果から、IBB domain の塩基性アミノ酸クラスターが DNA と相互作用し、importin β との結晶構造にみられるようなヘリックス構造が誘導される可能性が示唆される (図 6D)。

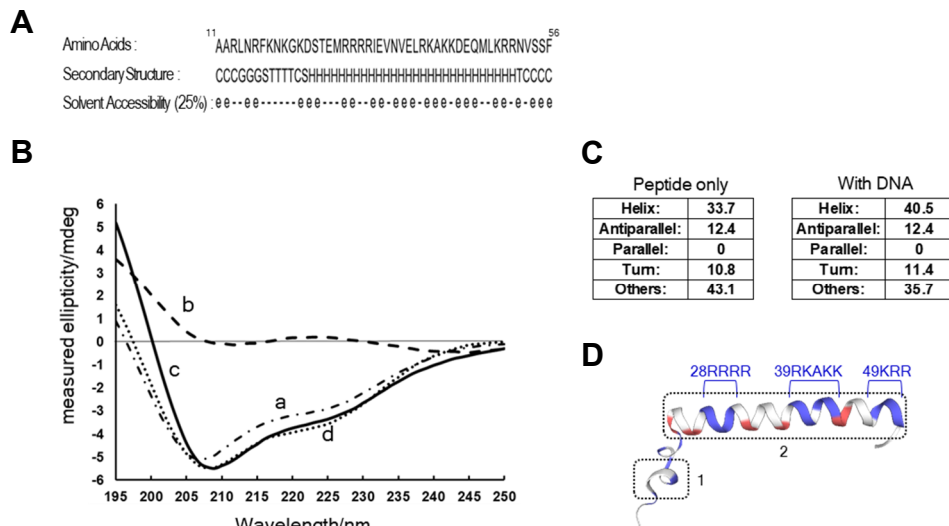


図 6 DNA 結合における IBB domain の構造解析

(A) SCRATCH web サーバーによって予測された IBB domain の構造的特徴。(B) 600 bp の upstream-1 配列二本鎖 DNA の非存在下及び存在下における importin α_2 _1-69 ペプチドの CD スペクトル。ペプチドのみ (a)、DNA のみ (b)、ペプチドと DNA の混合物 (c)、(c) から (b) を差し引いて得られた差スペクトル (d) を示す。縦軸は mdeg 単位の楕円率。(C) CD スペクトルから予測された DNA の非存在下および存在下での importin α_2 _1-69 ペプチドの二次構造比率。(D) Swiss Model によってモデリングした importin β 複合体における IBB domain 構造。塩基性残基と酸性残基をそれぞれ青色と赤色で示した。点線で囲まれた 310ヘリックス (1) と α ヘリックス (2) は図 5B と対応する。

次に、 α ヘリックスを形成した IBB domain と DNA の結合様式を調べるために、分子ドッキング及び MD (Molecular dynamics, 分子動力学) シミュレーションを行った。まず、importin β 複合体の結晶構造 (PDB ID: 1QGK) における IBB domain の座標を使用し、AutoDock Vina(Trott & Olson, 2009)による IBB domain と DNA の分子ドッキングを行った。さらに、30 ns の MD シミュレーションを行い、IBB domain と DNA の相互作用を解析した。その結果、IBB domain の DNA に対する 2 つの結合モードが見いだされた。MD シミュレーションにおける最初の 21 ns では IBB domain は大きなドリフトを示さず (モード A)、21 ns 前後で突然離れた位置にスイングし、25-30 ns で 2 番目の安定状態 (モード B) に達した (図 7A-C)。モード A では IBB domain の α ヘリックスは B 型 DNA の major groove にはまり、モード B では DNA と平行に配位した (図 7D-G)。また、モード B では IBB domain ペプチドが DNA のリン酸骨格に 4 点で同時に相互作用した。これらの結合モードは 3-2-3 の BLAST 検索で検出された 3 つの tetra-R motif の結合様式のうち、 α ヘリックス構造が採用する 2 つの結合様式に対応している可能性がある。また、IBB domain の α ヘリックス上では塩基性アミノ酸が片側に集中するため、どちらの結合モードにおいてもヘリックスの形成は DNA との相互作用に有利であると考えられる。DNA の負に帯電したリン酸基と IBB domain の α ヘリックス表面の正に帯電したパッチ (28RRRR, 39RKAKK, 49KRR) 間の静電相互作用は、両方の結合モードで重要であり、28A4、39A5、49A3 変異を導入したシミュレーションでは野生型と比較して DNA との親和性が減少した (図 7H)。

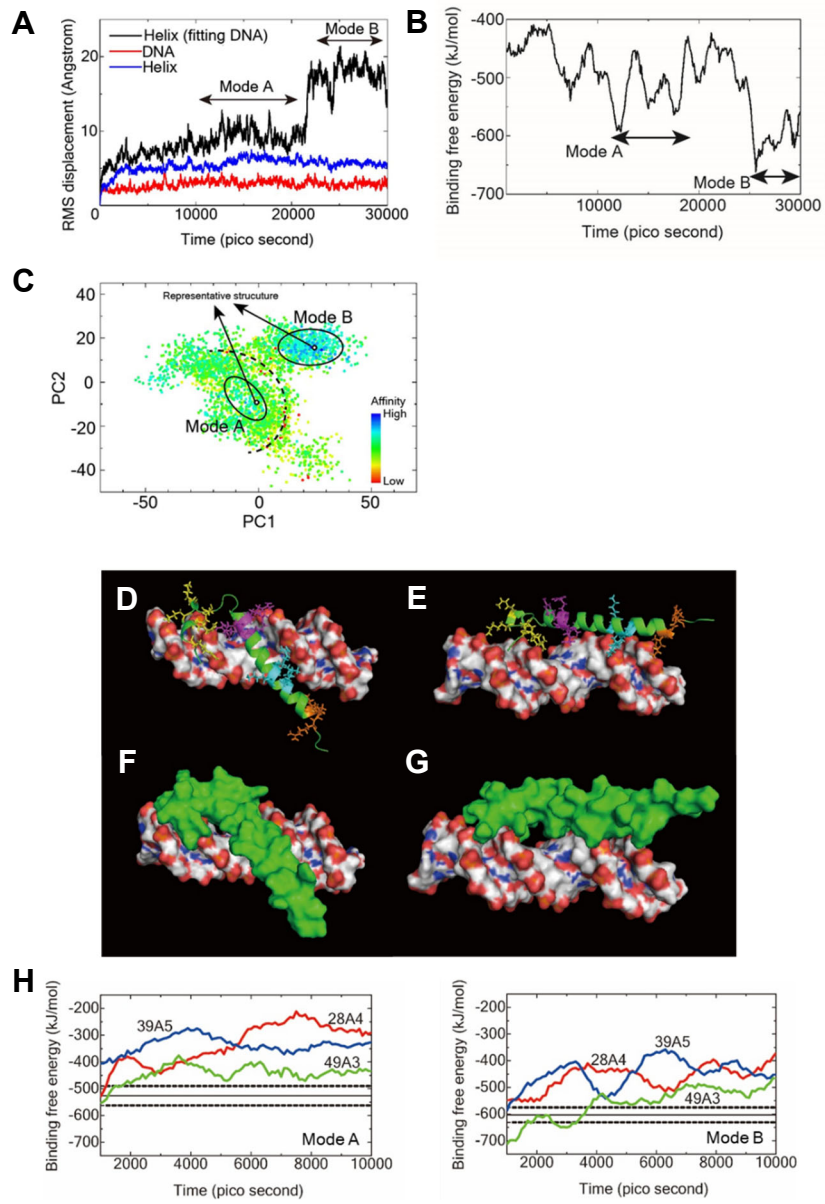


図7 MDシミュレーションによる IBB domain と DNA の相互作用解析

(A) 初期ドッキングモデル構造からの時間経過によるバックボーン重原子の RMSD 変化。
(B) 時間経過による IBB domain と DNA の結合自由エネルギー変化。(C) IBB domain と DNA の結合自由エネルギーランドスケープの主成分分析。結合自由エネルギーは、PC1 と PC2 の関数としてマッピングされた。黒い破線はモード A とモード B の間のエネルギー障壁を表した。矢印は (D-G) に示す代表構造のプロットを示す。(D-G) モード A (D, F) とモード B (E, G) の代表構造。DNA はサーフェスモデルで示され、原子 (炭素: 灰色, 酸素: 赤, 窒素: 青, リン: 黄色) に応じて色付けされている。IBB domain はリボンモデル (D, E) あるいはサーフェスモデル (F, G) で示され、緑で色付けされている。また、リボンモデルでは 3つの塩基性クラスター 28RRRR、39RKAKK、49KRR と 310 ヘリックスの塩基性残基 (13R, 16R, 18K, 20K, 22K) がそれぞれマゼンタ、シアン、オレンジ、黄色で色付けされたスティックモデルで示されている。(H) モード A とモード B における時間経過による IBB domain 点変異体と DNA の結合自由エネルギー変化。黒い実線は野生型 IBB domain の平均結合自由エネルギー値、黒い破線は標準偏差を示す。

さらに、IBB domain と DNA の結合強度と化学量論を評価するために、upstream-1 に含まれる 15 bp の POU 配列二本鎖 DNA (GCAGATGCATAACCG) と importin α 2₂₁₋₅₀ ペプチドをそれぞれ化学合成し、一次元 NMR 滴定実験を行った。また、DNA 配列に対する IBB domain の特異性を調べるために、POU 配列と同じ長さのランダム配列 DNA (GCGGACCACTAGACG) についても同様の実験を行った。ペプチド滴定による DNA イミノプロトン領域の化学シフト変化を図 8A に示す。どちらの DNA 配列においても、1 次元スペクトルのイミノプロトン領域のピークがペプチドの滴定によって乱された。観察されたスペクトル変化はどちらの滴定実験においても 2 つの相を示し、ペプチドと DNA の結合には少なくとも 2 つのモードがあることが示唆された。したがって、イミノプロトン領域全体の典型的なピークのスペクトル変化を非線形最小二乗フィッティングによって分析し、2 段階の多価結合を仮定して解離定数と化学量論を求めた。推定された POU 配列における見かけの結合強度は $K_{d1} = 3 \times 10^{-7}$ および $K_{d2} = 6 \times 10^{-4}$ であり、化学量論は最初の強い結合モードが 1:2 (DNA: ペプチド)、比較的弱い結合モードが 1:3 であった。ランダム配列の場合、見かけの結合強度は $K_{d1} = K_{d2} = 1 \times 10^{-4}$ であり、スペクトル変化は 1:4 (DNA: ペプチド) で飽和した (図 8A)。ピークの顕著な広がりを伴わない化学シフト変化は、NMR 化学シフトタイムスケールの fast exchange レジームで相互作用することを示し、解離定数が 10^{-6} M よりも大きい (弱い) ことを示唆する (Williamson, 2013)。これは、ランダム配列の両方の結合モードに当てはまり、結合がほとんど拡散によって制限されることを示す。一方、POU 配列における最初の結合モードの解離定数はこの範囲外であった。これは、POU 配列に対するペプチドの結合のオンレートが大幅に促進され、全体的な結合が比較的強いにもかかわらず、結合イベントの各微視的ステップの半減期が短いことを意味する。結合強度が比較的弱い多価結合は中程度の結合強度であるため、IBB domain と DNA の結合を次のように特徴づけることができる。すなわち、結合は多価であり、オンレートとオフレートの両方が高く、見かけの全体的な結合強度は中程度であり、DNA 配列に対して半特異的である。

図 5A に示したように、importin α の IBB domain には N 末端の 310 ヘリックス (importin α の 14L-16R) 周辺と importin α 2 の 28RRRR、39RKAKK、49KRR に対応する位置に塩基性残基が保存されており、これらの塩基性残基は MD シミュレーションにおける結合モード A と結合モード B のいずれにおいても DNA と接触していた。そこで、IBB domain 内に保存されているこれら 4 つの塩基性クラスターを含む領域 (importin α 2 の 13R-51R) を importin α の DNA 結合ドメインと定義し、"Nucleic Acid Associating Trolley pole" (NAAT) domain と命名した (図 8B)。また、NAAT domain は importin α の NLS 結合部位と独立しているため、importin α は輸送基質と同時に DNA と結合する可能性がある。

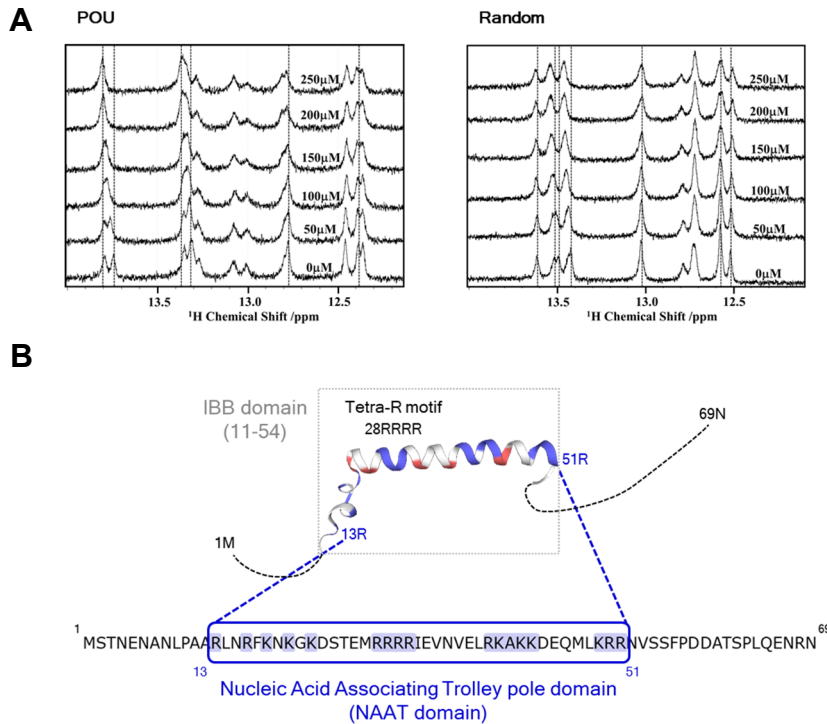


図8 NMR測定によるIBB domainとDNAの相互作用解析

(A) importin α_2 _21-50 ペプチド濃度に依存した 50 μM POU 配列 DNA あるいはランダム配列 DNA のイミノプロトン領域の NMR スペクトル変化。試料に含まれるペプチド濃度が図中に示されている。(B) 本研究によって同定された importin α_2 の DNA 結合ドメイン。IBB domain (点線の四角) 内に存在する NAAT domain (13R-51R, 青色の四角) には、tetra-R motif を含む塩基性残基クラスター (青色の網掛け) が含まれている。モデル構造は importin β 複合体 (PDB ID: 1QGK) を鋳型とした Swiss Model によるホモロジーモデリングによってモデリングした。塩基性残基と酸性残基がそれぞれ青色と赤色で示されている。

2-3-5 細胞内における importin α の DNA 結合解析

次に、細胞内における NAAT domain を介した importin α の DNA 結合を調べた。まず、ゲルシフトアッセイにおいて DNA との親和性が最も減少した 28A4 変異の影響を調べた。未分化 ES 細胞に GFP 融合 importin $\alpha 2$ 野生型及び 28A4 変異体を発現させた結果、GFP-importin $\alpha 2$ は核と細胞質に局在したが、GFP-28A4 は主に細胞質に局在し、核内の GFP 蛍光シグナルは野生型と比較して弱かった (図 9A)。importin α は核-細胞質シャトルタンパク質であり、NAAT domain と IBB domain はオーバーラップしているため、核移行あるいは核外移行、核内滞留の効率の変化が 28A4 変異による細胞内局在の変化に関与している可能性がある。そこで、28A4 変異体の核移行能を調べるために、importin α の核外移行を阻害する変異として確立された C 末端における CAS 結合部位変異 (C 変異) を 28A4 変異体に導入した。その結果、CAS 結合部位の変異により、GFP-importin $\alpha 2$ 及び GFP-28A4 の核局在化が促進された (図 9A)。また、このような局在の傾向は HeLa 細胞でも同様に確認された (図 9B)。

そこで、細胞内における NAAT domain を介した importin $\alpha 2$ と DNA の結合を調べるために、Hela 細胞を Triton X100 及び DNase I により処理し、GFP-28A4 C 変異体の核内残留を観察した。Triton X100 処理により、核膜と細胞膜の半透過性が失われるため、ゲノム DNA などの細胞内成分に結合していない分子は細胞内から除去される。これまでに、HeLa 細胞において内在性 importin $\alpha 2$ が Triton X100 処理後も核内に残留する一方、Triton X100 処理後の DNase I 処理によって核内から除去されることが報告されている (Furuta et al., 2004; Yasuda et al., 2012)。

予想通り、GFP-importin $\alpha 2$ C 変異体は Triton X100 処理後も一定の割合で核内に残留したが、その後の DNase I 処理によって除去された。一方、GFP-28A4 C 変異体は Triton X100 処理後、コントロールとして用いた拡散性の GFP と同等にまで核内シグナルが除去された (図 9C)。Triton X100 処理前の GFP-28A4 C 変異体の核内蛍光シグナルは GFP-importin $\alpha 2$ C 変異体と同等であり、Triton X100 処理後に importin $\alpha 2$ C 変異体の核シグナルが中央値で約 80% 保持されたのに対し、GFP-28A4 C 変異体では核シグナルは中央値で約 53% まで減少した (図 9D)。28A4 変異による核内局在の変化は、importin β 結合への影響によって核移行効率が減少した可能性があるが、CAS 結合部位変異の導入によって GFP-28A4 C 変異体が核に集積したことから、28A4 変異体が核移行能を保持していることが示された。また、importin α は importin β に依存せずに核移行することが報告されており (Miyamoto et al., 2002)、28A4 変異体はそのような経路で核移行する可能性もある。

これらの結果に基づき、細胞内においても importin $\alpha 2$ が NAAT domain を介して DNA と結合し、核内に滞留すると結論付けた。

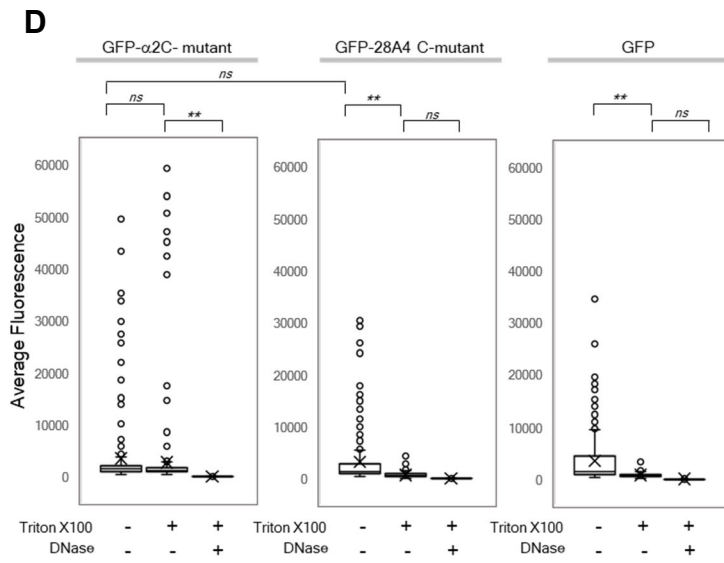
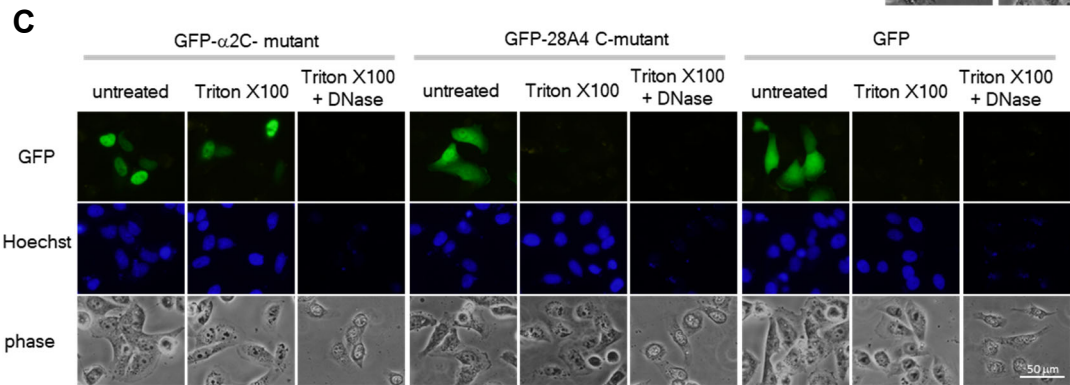
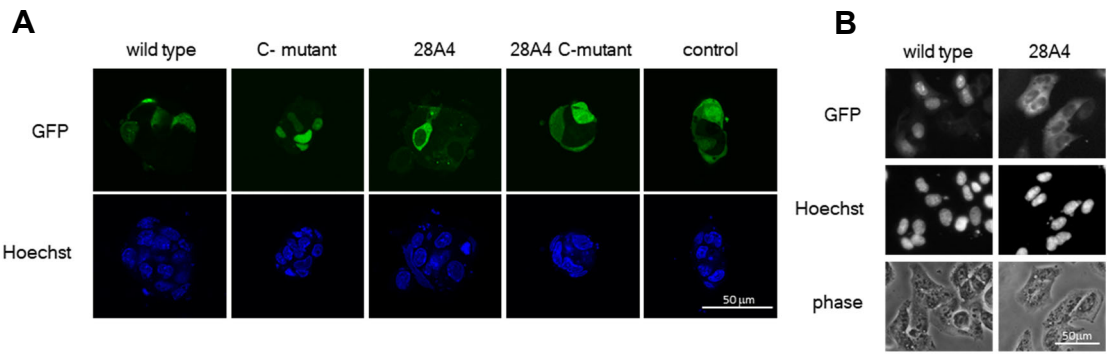


図9 細胞内における importin α 2 と DNA の結合解析

(A) GFP 融合 importin α 2 タンパク質を一過性トランスフェクションによって ES 細胞に発現させた。GFP と融合した importin α 2 の野生型、C 変異体、28A4 変異体、28A4 C 変異体と GFP の細胞内局在が共焦点画像の GFP 蛍光によって示されている。DNA はヘキストによって染色した。(B) HeLa 細胞において一過性トランスフェクションによって発現させた GFP-importin α 2 と GFP-importin α 2 28A4 変異体の GFP 蛍光が示されている。DNA はヘキストによって染色した。(C-D) GFP-importin α 2、GFP-importin α 2 28A4 変異体、GFP を一過的にトランスフェクションした HeLa 細胞を TritonX100 によって透過処理し、その後 DNase 処理を行った。各処理ステップにおける GFP 融合タンパク質とヘキスト染色による DNA の蛍光が (C) に示されている。また、核内における GFP 融合タンパク質の平均蛍光強度を (D) に示した。横線は中央値、X は平均値を示す。n = 288、ns : 有意差なし、** : p < 0.01。

2-3-6 importin α を介した NLS 輸送基質の DNA 結合解析

importin α の NAAT domain と NLS 結合部位は独立しているため、importin α に対して NLS と DNA は競合しない可能性がある。そこで、NLS と DNA に対する importin α の結合を調べた。まず、ES 細胞のゲノム DNA 断片と結合させた DNA 結合ビーズを調製し、importin $\alpha 2$ リコンビナントタンパク質との結合を調べた。その結果、28A4 変異体と比較して野生型は効率的に DNA 結合ビーズと結合し、この実験系においても NAAT domain が importin $\alpha 2$ の DNA 結合に必要であることが確認された (図 10A-C)。次に、cNLS である GST-SV40 NLS-GFP を反応系に加えたところ、importin $\alpha 2$ の存在下で NLS が DNA 結合ビーズ上に保持されることが明らかとなった (図 10D)。この結果は、importin $\alpha 2$ が DNA 結合機能を介して輸送基質を DNA 上へ誘導する可能性を示唆する。

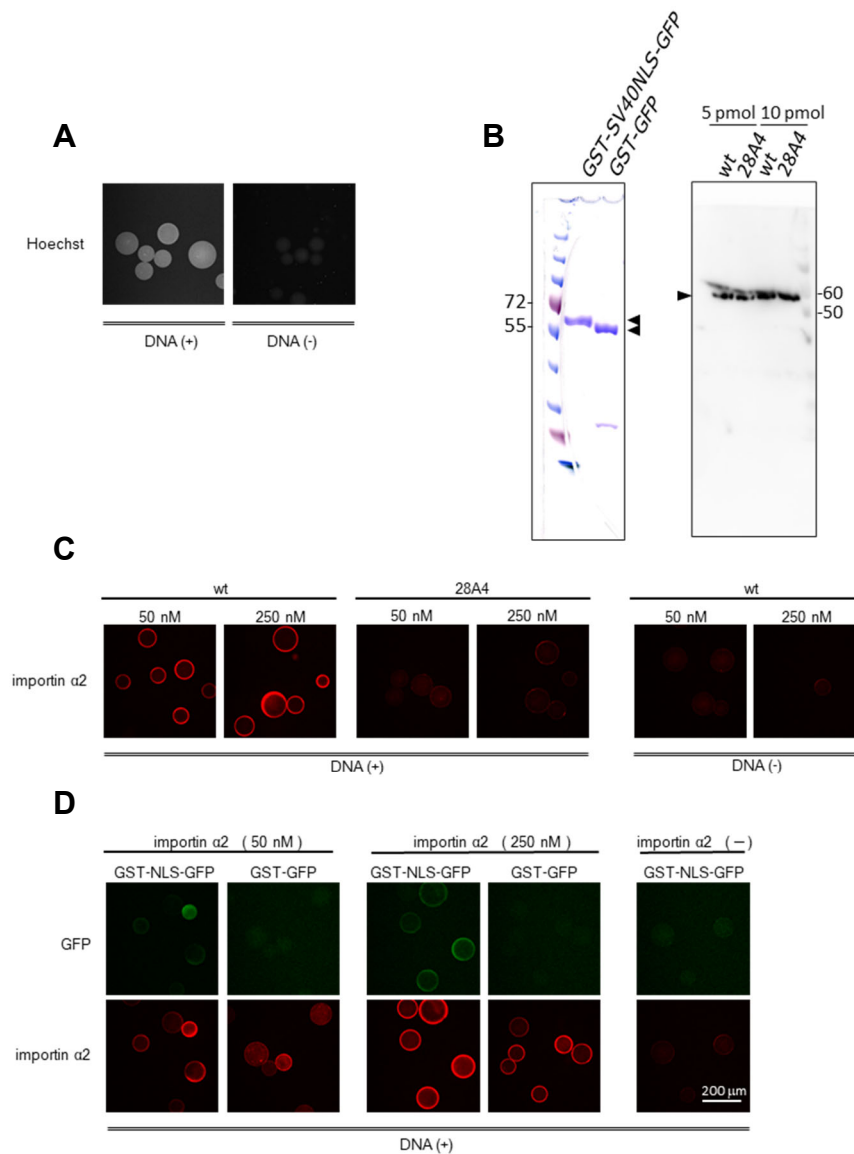


図 10 importin α 2 と NLS の DNA 結合実験

(A) ストレプトアビジンビーズに結合したビオチン化 DNA 断片をヘキスト染色によって検出した。(B) 本研究で使用した GST-SV40 NLS-GFP および GST-GFP のリコンビナントタンパク質 11 pmol を SDS-PAGE により展開し、CBB 染色により検出した (左)。importin α 2 の野生型と 28A4 変異体のリコンビナントタンパク質を importin α 2 の C 末端をエピトープとした抗体 (goat polyclonal) を使用したウエスタンブロットにより検出した。(C) importin α 2 の野生型と 28A4 変異体のリコンビナントタンパク質を (A) に示した DNA 結合ビーズと反応させ、(B) で使用した importin α 2 抗体によって検出した。(D) 50 nM の GST-SV40 NLS-GFP または GST-GFP のリコンビナントタンパク質を DNA 結合ビーズ、importin α 2 リコンビナントタンパク質と反応させ、DNA 結合ビーズ上の GFP 蛍光を検出した。

また、細胞内においても同様の知見が得られた。HeLa 細胞に mCherry-SV40 NLS または mCherry を発現させて Triton X100 処理を行ったところ、ほとんどの mCherry タンパク質が核から除去された一方、mCherry-SV40 NLS は Triton X100 処理後も mCherry と比較して有意に核内に残留し、GFP-importin $\alpha 2$ の共発現によって残留量が増加した (図 11A, B)。さらに、mCherry-SV40 NLS の核内シグナルは DNase I 処理によって除去されることが確認された (図 11A, B)。HeLa 細胞は importin α ファミリータンパク質を発現するため、GFP をトランスフェクションした細胞における mCherry-SV40 NLS の核内残留の一部は内在性の importin α ファミリータンパク質によって引き起こされると考えられる。興味深いことに、Triton X100 処理後の GFP-importin $\alpha 2$ の核内シグナルは mCherry-SV40 NLS の共発現によって増加した (図 11A, B)。このことから、輸送基質が importin α の NLS 結合部位を占有することで IBB domain の自己阻害機能が抑制され、開放された NAAT domain が importin α の DNA 結合を促進する可能性がある。

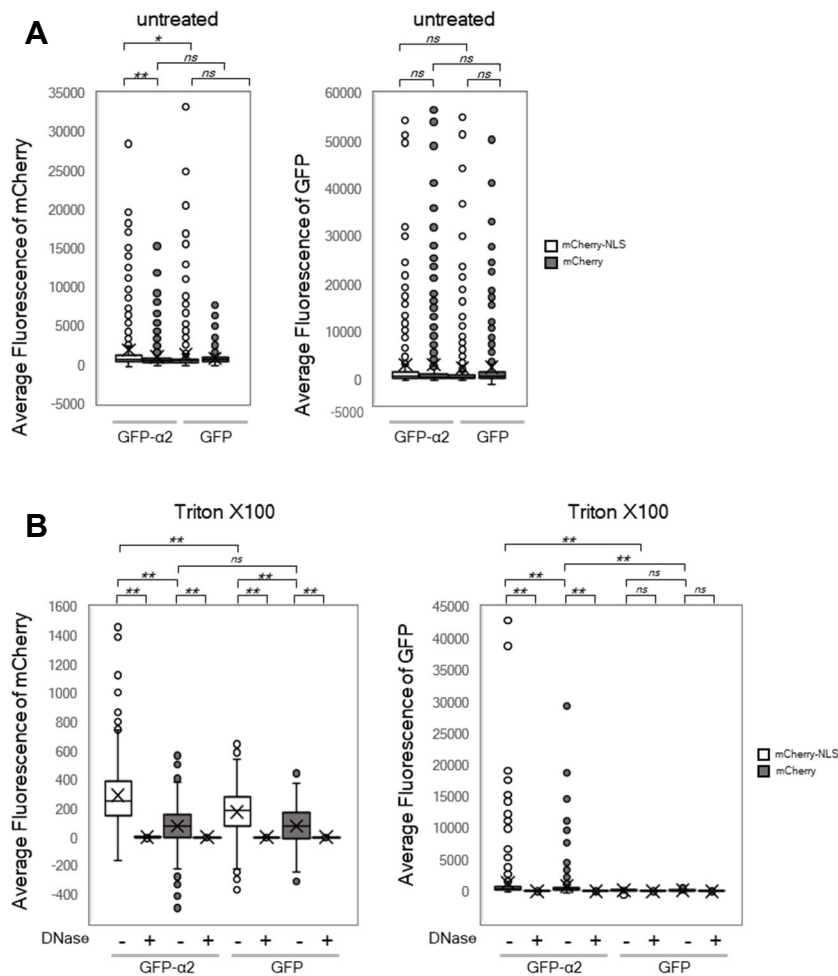


図 11 細胞内における importin $\alpha 2$ を介した NLS の DNA 結合解析

(A) mCherry-SV40 NLS または mCherry を GFP-importin $\alpha 2$ または GFP とともに HeLa 細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションから 22 時間後の核内における mCherry (左) と GFP (右) の平均蛍光強度を示す。(B) さらに、HeLa 細胞を TritonX100 によって透過処理した後、DNase 処理を行った。各処理ステップにおける mCherry (左) と GFP (右) の平均蛍光強度を示す。横線は中央値、X は平均値を示す。n = 354、ns : 有意差なし、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。

2-3-7 importin α ファミリータンパク質の DNA 結合解析

NAAT domain 内の塩基性残基クラスターとそれらの α ヘリックスにおける位置はファミリーメンバー間で保存されているため、NAAT domain を介した DNA 結合機能もファミリーメンバー間で保存されている可能性がある (図 5A)。

また、importin $\alpha 2$ 、8 の保存された塩基性残基によって正に帯電したヘリックスの片側に importin $\alpha 3$ 、4 と importin $\alpha 1$ 、6 では酸性残基がそれぞれ一つと二つ含まれており、importin α ファミリーメンバーはそのようなヘリックス上の塩基性残基と酸性残基の配位から 3 つのグループに分類することができる (図 12)。予期せぬことに、このような観点による分類はアミノ酸の相同性に基いた従来の importin α ファミリーメンバーのサブタイプ分類と一致しており、importin α の古典的機能と今回明らかとなった NAAT domain を介した新規機能の進化における関係を反映している可能性がある。

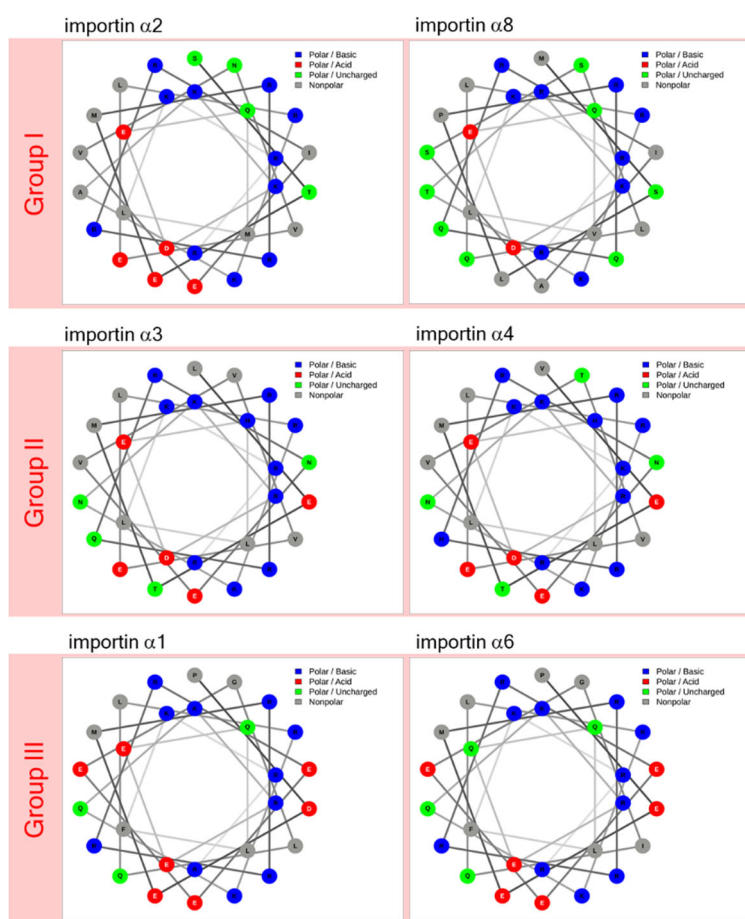


図 12 IBB domain の α ヘリックスにおける残基配位

importin $\alpha 2$ IBB domain の α ヘリックス (24S-51R) に対応する残基のヘリカルホイールプロジェクション。ヘリックス上の正に帯電したパッチを構成する塩基性残基のほとんどがヘリックスの片側 (右側) に偏っている。importin α ファミリーメンバーは塩基性残基が偏った側に含まれる酸性残基の数から 3 つのグループに分類することができる。

そこで、DNA 結合機能が importin α ファミリーメンバー間で保存されているかを調べるために、importin $\alpha 2$ と同様にゲルシフトアッセイによって他のファミリーメンバーと DNA との結合を解析した。この実験では各サブタイプの代表として importin $\alpha 2$ 及び importin $\alpha 1$ 、importin $\alpha 3$ を使用した。その結果、importin $\alpha 2$ と同様に importin $\alpha 1$ 及び importin $\alpha 3$ は 600 bp のゲノム DNA バンド全体をスメア状にシフトアップさせたが、親和性に違いがみられた (図 13)。importin $\alpha 3$ は importin $\alpha 2$ と同等の効率で DNA バンドをシフトアップさせたが、importin $\alpha 1$ の効率はわずかに低かった。これらの結果は、DNA 結合機能が importin α ファミリーメンバー間で保存されていることを示唆する一方、DNA 結合の特性がファミリーメンバー間で異なる可能性を同時に示唆する。

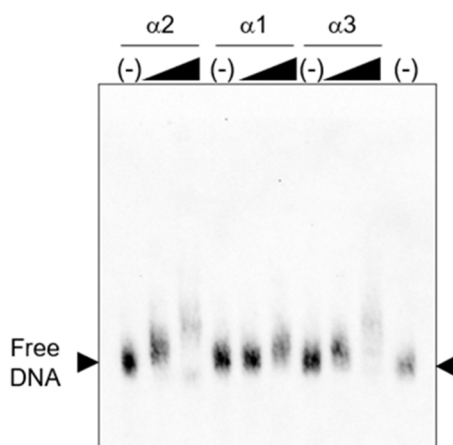


図 13 importin α ファミリーメンバーの DNA 結合実験

約 600 bp のゲノム DNA と importin $\alpha 2$ 、importin $\alpha 1$ 、importin $\alpha 3$ のリコンビナントタンパク質を混合し、電気泳動を行った。DNA 断片は HRP 標識 Streptavidin によって検出した。ゲルの上の黒い三角は、結合反応液に含まれるリコンビナントタンパク質の量を表す。矢頭は DNA のみのバンドを示す。

2-4 考察

本研究により得られた結果は、importin α タンパク質がユニークな特徴を持つ DNA 結合タンパク質であることを示唆する。新規 DNA 結合ドメインである NAAT ドメインは、importin $\alpha 2$ の N 末端に存在する IBB domain 内のヘリックスまたは誘導性ヘリックス構造として同定された。ヘリックスの表面に正電荷のパッチとして並んだ塩基性残基は、importin $\alpha 2$ が半特異的にゲノム DNA の広い領域に対して複数の結合モードで結合することを可能にし、結果的に importin $\alpha 2$ が核内に保持される。また、この特性はおそらくすべての importin α ファミリータンパク質に保存されている。

NAAT domain は、既知の DNA 結合タンパク質が持つ従来の DNA 結合ドメインとは異なる一方、いくつかの共通した特徴もみられる。例えば、相同性検索で示されたように、正に帯電した残基クラスターは DNA 結合タンパク質の典型的な特徴であるが、NAAT domain の静電相互作用に基づいた DNA 配列半特異的な結合様式と構造的特徴は既知の DNA 結合タンパク質とは異なる。既知の配列特異的なタンパク質-DNA 相互作用のほとんどは、一般的に、無視できる程度から非常に不利な正味の静電相互作用と非常に有利なファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用によって実現する(Jayaram et al., 2002)。さらに、IBB / NAAT domain は importin α 自身の NLS 結合部位に対して自己阻害的に結合するが(Catimel et al., 2001)、一般的に DNA 結合タンパク質の NLS は DNA との結合面の外に配置される(Cokol et al., 2000)。つまり、輸送基質の NLS の塩基性残基は DNA 結合残基と独立しているが、NAAT domain は同一の残基を介して DNA と NLS 結合部位の両方に結合する。このような特徴は、異なる系統の別個の構造的特徴として認識される必要がある。

今回の結果から、NAAT domain を介した importin α とクロマチン DNA の相互作用について、2つの特性が示された。第一に、importin α はゲノム領域の大部分と相互作用することができ、第二に、それと同時に特定の配列に対して中程度の選択性を持つ。興味深いことに、これらの特性は DNA 結合タンパク質がクロマチン上のプロモーター領域を探索するための促進拡散モデルのフレームワークと優れた一致を示す(Hannon et al., 1986; Kozakov et al., 2014)。このメカニズムでは、DNA 結合タンパク質が、基本的に非選択的であるが、標的領域の探索のためにある程度の配列優先性を有する半特異的結合を持つ必要があり(Slutsky & Mirny, 2004; Yasuno et al., 2001)、そのような振舞いのバランスが標的領域の探索効率を決定する(Brackley et al., 2013)。また、DNA 上のある領域から別の領域へとセグメント間の移動を行うために、少なくとも2つ以上の DNA 結合面を有することが好ましいと考えられている(Halford & Marko, 2004)。さらに、理論的に、この促進拡散において静電相互作用が重要な役割を果たす可能性があることも示唆されている(Halford & Marko, 2004; Leven & Levy, 2019)。このような観点から、NAAT domain の DNA 結合特性は、DNA との半特異的相互作用による促進拡散を通じて、核内の膨大な空間からクロマチン上の標的領域の探索を促進することが可能であると考えられる。そこで、importin α あるいはその複合体とクロマチン DNA との相互作用について、'stroll'モデルを提案する。このモデルでは、importin α は

NAAT domain を介して DNA と直接結合し、継続的に DNA の周辺を移動することでゲノム領域を広範囲に渡って探索し、標的領域へと到達する（図 14）。

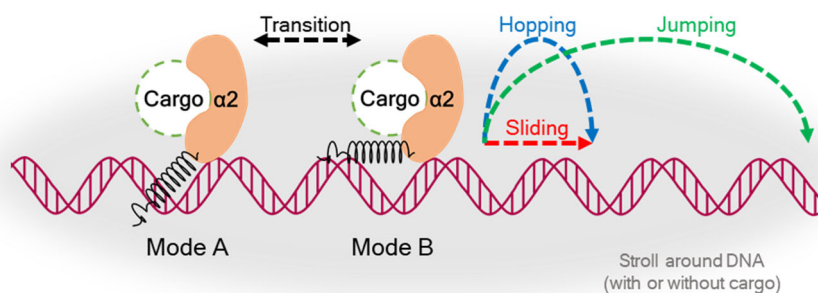


図 14 'stroll'モデルにおける importin α とクロマチン DNA の相互作用
細胞核内で importin $\alpha 2$ は NAAT ドメインを介してクロマチン DNA と結合し、スライディングやホッピング、ジャンピング運動を介して DNA の周辺を移動する。

IBB / NAAT domain の結合パートナーの切り換えは importin α の多機能性と密接に関連している可能性がある。古典的な IBB domain の機能については、importin α が様々なタンパク質と結合することが、異なる細胞内機能につながるという報告が増えている (Herold et al., 1998; Kutay et al., 1997; Lee et al., 2005; Matsuura & Stewart, 2004, 2005; Sun et al., 2013)。これまでの研究では、核輸送活性と自己阻害との関係が説明されており、IBB domain は importin α 自身の NLS 結合部位と結合し、その際に IBB domain 内の塩基性アミノ酸が重要な役割を果たすことが報告されている (Harreman, Hodel, et al., 2003; Kobe, 1999; Lott & Cingolani, 2011; Matsuura & Stewart, 2005)。NAAT domain が核輸送に必要な IBB domain と重複する形で同定されたことを考慮すると、importin α 自身や DNA あるいはその他の結合パートナー間で干渉を引き起こす可能性がある。多数の結合パートナーが存在するという事実は、古典的な IBB domain の機能から新たな NAAT domain の機能への切り替えのための何らかの調節メカニズムの存在を示唆する。そしてこの文脈では、主に静電的である NAAT-DNA 相互作用が、IBB domain と importin β の高度に保存された酸性および疎水性残基の空間的配置を介した相互作用や (Cingolani et al., 1999)、CAS との相互作用など他の相互作用とは異なることが重要である可能性がある。

さらに、各核輸送ステップにおける核輸送複合体構成因子の行先は確率的であることが報告されている (Sun et al., 2013)。また、核輸送複合体の分解がどこで起こるかについても多くの可能性がある。例えば、染色体タンパク質 RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) は、RanGDP から RanGTP への置換を介して、IBB domain から importin β の解離を促進することが知られている (Bischoff & Ponstingl, 1991; Kai et al., 1986)。そのため、クロマチンの近傍において RCC1 を介したメカニズムで核輸送複合体から importin β が解離した場合、古典的な IBB domain の機能から新規 NAAT domain の機能への切り換えは効率的に起こる可能性がある。一般的に、importin α と NLS 輸送基質との結合は、importin β が IBB domain と結合して importin α の自己阻害を解除し、importin α の NLS 結合部位を露出させることで促進される。同様の理由で、NAAT domain と DNA の相互作用が importin β の解離の直後に起こる場合、NLS 輸送基質は importin α から解離せず、importin α を介して DNA 上にとどまる可能性がある。逆に、NLS 輸送基質がクロマチン上の importin α の挙動を変える可能性もある。これらの場合において、輸送基質の行先は IBB / NAAT domain の機能の切り替えによって調節される (図 15)。

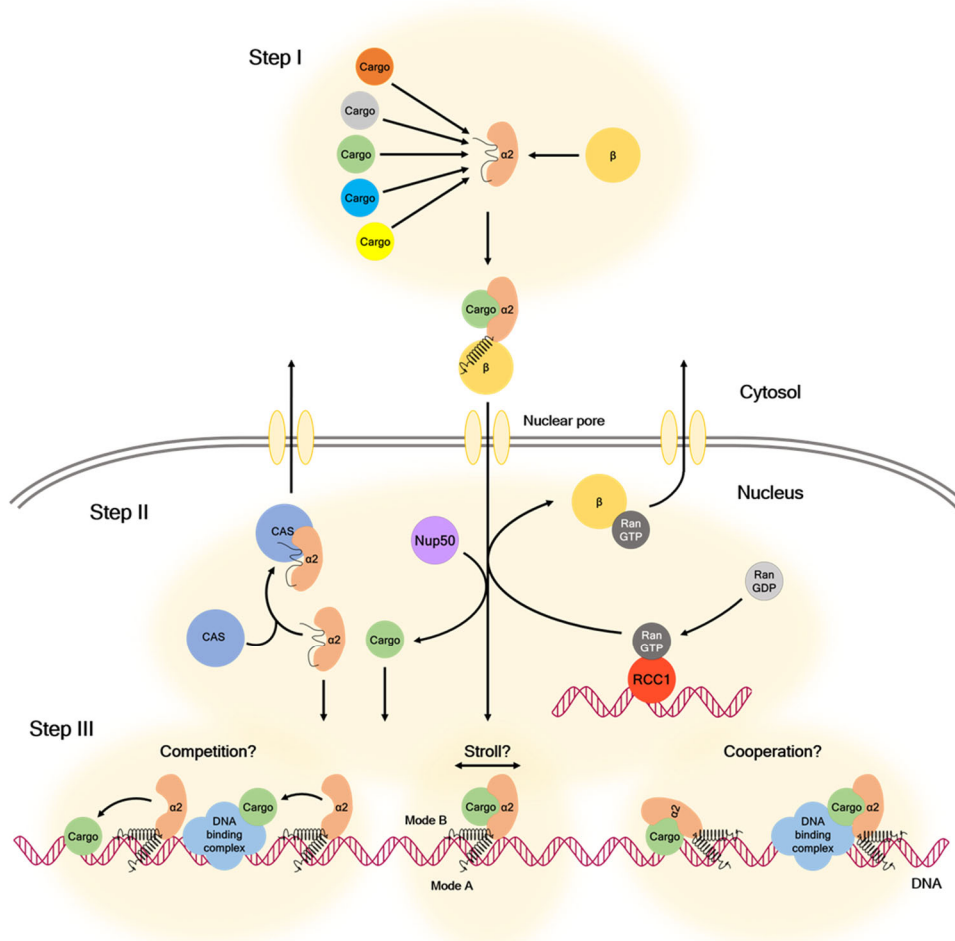


図 15 輸送基質の行先に関与する importin α 依存的核輸送とクロマチン DNA 相互作用の競合的かつ協調的なプロセス

(I) 細胞質においては、importin α の NLS 結合サイトに対して IBB domain と多数の輸送基質が競合する。(II) 核内では、RCC1 によって供給された RanGTP によって核輸送複合体から importin β が解離した後、IBB domain、Nup50、CAS、輸送基質の間で起こる競合によって輸送基質が importin α から解離する場所が決まる。(III) 核の深部では、輸送基質と結合した importin α が DNA の周辺を移動することにより、輸送基質に対する importin α と DNA 標的領域あるいは DNA 上の結合パートナー間での競合によって輸送基質が DNA 上で解離する、あるいは、輸送基質は DNA 上のそれら結合標的に対して importin α と協調的に結合する。

IBB / NAAT domain の機能切り替えは、importin α の輸送サイクルに影響する可能性もある。この仮説は、熱ショックや酸化ストレスなどのストレス条件下において DNase 感受性核成分との相互作用を介した importin α の核蓄積により、importin α の核輸送機能が変化するという以前の研究と一致する(Miyamoto et al., 2004)。また、核輸送受容体としての importin α の機能不全が NLS 輸送抑制の主要な要因であったことを示唆する報告もある(Ogawa & Imamoto, 2018)。さらに、これまでの研究で、Hikeshi を介した Hsp70 の核内輸送のように熱ショックタンパク質の選択的な輸送を促進するために、通常のタンパク質輸送経路には抑制メカニズムが存在することも報告されている(Kose et al., 2012; Miyamoto et al., 2004; Yasuda et al., 2012)。したがって、NAAT / IBB domain 内に存在する古典的な結合部位と非古典的な結合部位の重複は、細胞のストレス応答における核輸送の抑制と importin α の核蓄積の機能カップリングにおける分子基盤であると考えられる。また、今回行った IBB ドメインの相同性検索において、NAAT domain と同様の塩基性残基クラスターを持つ多くの RNA-タンパク質複合体が同定されたことから、RNA も NAAT/IBB domain の結合パートナーである可能性もある。

importin α の多数の結合パートナーの中で、何百ものタンパク質が転写、クロマチン編成、RNA プロセッシング、核酸代謝プロセスに関与している(Mackmull et al., 2017; Oka & Yoneda, 2018)。転写調節に関しては、転写因子 Zac1 は核移行だけでなく標的遺伝子である p21 の発現にも importin α を必要とすることが示された(Huang et al., 2007)。さらに、importin α は、転写因子 GAL4 および GAL4 の標的配列 DNA と複合体を形成する(Chan & Jans, 1999)。importin α の核内蓄積は、STK35 (Serine/Threonine Kinase 35) 遺伝子の発現調節を介して HeLa 細胞の運命決定に関わることも報告されている(Yasuda et al., 2012)。本研究では、ChIP-qPCR 解析により、importin $\alpha 2$ が ES 細胞内で POU5F1 遺伝子の調節領域に結合していることが示され、NMR 滴定実験では、NAAT domain が POU 配列に対してある程度の特異性を持つことが示された。一方、POU 配列に結合する Oct3/4 は、importin $\alpha 2$ の輸送基質であり(Li et al., 2008; Yasuhara et al., 2007; Young et al., 2011)、importin α は DNA 結合タンパク質を輸送するだけでなく、それらの DNA 結合にも影響を与える可能性がある。

クロマチン制御に関しては、TRIM28 (Tripartite Motif Containing 28) は HP1 (Heterochromatin Protein 1) 結合ボックスと重複した NLS を持つことが報告されており、ヘテロクロマチンに関連した TRIM28 と HP1 の間の相互作用が importin α 依存的核輸送の後に起こることが示唆されている(Moriyama et al., 2015)。アカバシカビ (*Neurospora crassa*) の importin α 変異体である dim-3 (Defective in Methylation -3) 変異体を用いた研究では、importin α が輸送基質をクロマチン上に誘導することがヘテロクロマチン形成と DNA メチル化に不可欠であり、dim-3 変異体により、構成的ヘテロクロマチンドメイン間の相互作用が減少することが報告されている(Galazka et al., 2016; Klocko et al., 2015)。この変異体では自己阻害に関わるアミノ酸が変異しているため、IBB / NAAT domain の挙動に影響を及ぼし、importin α とクロマチンの相互作用が変化した可能性も考えられる。つまり、importin α の

NAAT domain とクロマチンの相互作用は結合タンパク質と共役してクロマチン制御に影響を与える可能性がある。

すべての importin α ファミリーメンバーが NAAT domain を持つと考えられる一方、アミノ酸配列はわずかに異なるため、NAAT domain を介したクロマチン DNA 結合による生理学的作用のファミリーメンバー間の違いも非常に興味深い。importin α ファミリーメンバーの発現パターンは、細胞の種類によって異なり、細胞の運命決定におけるそれらの役割が示されている (Yasuda et al., 2012; Yasuhara & Yoneda, 2017)。さらに、importin α ファミリーメンバーはそれぞれ異なる輸送基質特異性を持つ。したがって、これらの要因が織り交ざることにより、厳格な核機能制御を可能にする可能性がある。逆に、importin α とクロマチン間の相互作用は、転写調節因子などの輸送基質の存在によって変化する可能性もある。importin α のクロマチン結合が輸送基質の影響を受ける場合、importin α と輸送基質のバリエーションがもたらす複合的な効果は、一般的な転写調節とさまざまな生理学的機能に関連している可能性がある。さらに、前述のように、importin α のクロマチン結合に影響を与える可能性のある RCC1 は、主に importin $\alpha 4$ によって細胞核に輸送されることが知られている (Friedrich et al., 2006; Köhler et al., 1999; Sankhala et al., 2017)。そのため、importin α の DNA 結合に対する RCC1 の影響と、その結果として生じる生理学的効果は、ファミリーメンバーによって異なる可能性がある。

第3章 importin α IBB domain の生化学的性質解析

3-1 序

核輸送プロセスにおいて、importin α の IBB domain は、自己阻害、importin β 結合、CAS 結合に関わり、マスターレギュレーターとして機能する(Lott & Cingolani, 2011)。また、第2章では新たに、IBB domain が DNA と結合することも明らかとなった。このことから、importin α の核輸送機能と非核輸送機能を含めた機能間のバランス調節において IBB domain は重要な役割を担う。

これまで importin β との複合体及び核外移行複合体、自己阻害型における IBB domain の三次元構造が報告されているが、それぞれの IBB domain のコンフォメーションは異なり、構造の多様性を示している。そのような異なるコンフォメーションをとる同一のアミノ酸配列はカメレオン配列 (chameleon sequences, ChSeqs) と呼ばれる(Minor & Kim, 1996)。実際に、IBB domain は、AlfaFold(Jumper et al., 2021)による構造予測においてはヘリックス構造が予測されるが、その信頼度は低い (e.g. P52292, human KPNA2)。天然変性タンパク質/領域 (intrinsically disordered proteins/regions, IDPs/IDRs) はAlfaFoldによる構造予測において信頼度が低いことが示されており(Ruff & Pappu, 2021)、これは IBB domain が IDR のような性質を持ち、高度に多様なカメレオン配列であることを示す。

したがって、importin α ファミリーの IBB domain は、構造と機能の両方の点で多型である。しかし、単一の IBB domain が複数の結合パートナーとどのように相互作用し、importin α の機能の区別と切り替えにつながるかは未だ完全には理解されていない。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おり(Lott & Cingolani, 2011; Miyamoto et al., 2016; Oka & Yoneda, 2018; Pumroy & Cingolani, 2015)、そのうちのいくつかは IBB domain がファミリーメンバー間の機能の違いに直接関係していることを示唆している(Pumroy et al., 2015; Zienkiewicz et al., 2013)。しかし、そのような現象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。

したがってこの研究では、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、複数の結合パートナーと相互作用する IBB domain に着目し、残基ごとの保存性と生化学的性質を解析した。さらに、核輸送プロセスにおける相互作用ごとに IBB domain 残基の寄与を評価し、個々の相互作用に重要な残基及び生化学的性質をファミリーメンバーごとに区別した。

3-2 実験方法

3-2-1 データベース

配列セットに含まれる importin α ファミリータンパク質とホモロジーモデリングにおけるターゲット配列及び鋳型配列として使用したヒト KPNA1 (UniProtKB: P52294)、ヒト KPNA2 (UniProtKB: P52292)、ヒト KPNA3 (UniProtKB: O00505)、ヒト KPNA4 (UniProtKB: O00629)、ヒト KPNA5 (UniProtKB: O15131)、ヒト KPNA6 (UniProtKB: O60684)、ヒト KPNA7 (UniProtKB: A9QM74)、ヒト importin β (UniProtKB: Q14974)、ヒト Ran (UniProtKB: P62826)、ヒト CAS (UniProtKB: P55060)、パン酵母 SRP1 (UniProtKB: Q02821, ヒトの importin α に相当)、マウス KPNA2 (UniProtKB: P52293)、イヌ Ran (UniProtKB: P62825)、パン酵母 CSE1 (UniProtKB: P33307) のアミノ酸配列は UniProtKB (Bateman et al., 2021) から取得した。ホモロジーモデリングの鋳型構造として使用した IBB domain と importin β の複合体 (PDB ID: 1QGK)、CSE1 と SRP1、RanGTP の三者複合体 (PDB ID: 1WA5)、importin α 単量体 (PDB ID: 1IAL) の座標は PDBj (Protein Data Bank Japan) (Kinjo et al., 2017, 2018) から取得した。

3-2-2 配列セットの作成

まず、UniProtKB (release date 2021_02) から IBB domain の PROSITE ID (Sigrist et al., 2013) である PS51214 の検索結果として 8268 エントリを取得し、そのうち遺伝子名に“KPNA”を含む 1644 エントリを抽出した。その後、IBB domain 配列が 50 残基以下のエントリを断片化されたフラグメントとして除き、同一の IBB domain 配列を持つ同じ生物種を統一した。

3-2-3 マルチプルアライメント

マルチプルアライメントは、GenomeNet の CULUSTALW 2.1 (Larkin et al., 2007) を使用して実行した。ペアワイズアライメントは常に slow-accurate mode で実行した。ペアワイズアライメント及びマルチプルアライメントにおいて、weight matrix には BLOSUM for PROTEIN を使用し gap open penalty と gap extension penalty はそれぞれ 0.5 と 0.1 に設定した。ホモロジーモデリングの手順に含まれるマルチプルアライメントに関しては、ギャップの挿入を少なくするために、ペアワイズアライメントにおける gap open penalty と gap extension penalty をそれぞれ 10.0 と 0.1 に、マルチプルアライメントにおける gap open penalty と gap extension penalty をそれぞれ 10.0 と 0.05 に設定した。

3-2-4 系統解析

系統解析は MEGAX 10.2.5 (Kumar et al., 2018) によって行った。IBB domain または全長コンセンサス配列の進化史は、近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) または最尤法とポアソン補正モデル (ZUCKERKANDL & PAULING, 1965) を使用して推測された。近隣結合法では、最適化された系統樹が示されている。ブートストラップテスト (500 回) において関連する分類

群がクラスター化された複製ツリーの割合が枝の横に表示されている(Felsenstein, 1985)。系統樹の枝は、系統樹を推測するために使用した進化距離と同じ単位で描かれた。進化距離は、ポアソン補正法(ZUCKERKANDL & PAULING, 1965)を使用して計算され、サイトごとのアミノ酸置換数の単位で表される。pairwise deletion option によってシーケンスペアごとにあいまいな位置はすべて削除された。最尤法とポアソン補正モデルでは、IBB domain または全長コンセンサス配列はそれぞれ最も高い対数尤度 (-703.46) または (-6081.23) となる系統樹が示された。関連する分類群にクラスター化された系統樹の割合が枝の横に表示されている。heuristic search の初期系統樹は、ポアソンモデルを使用して推定されたペアワイズ距離の行列に neighbor-join アルゴリズムと BioNJ アルゴリズムを適用し、対数尤度値が優れたトポロジを選択することで自動的に取得された。系統樹は一定の縮尺で描かれ、枝の長さはサイトごとの置換数で測定される。IBB domain コンセンサス配列の系統樹は、アラインメントによって挿入されたギャップを含めて 68 残基の 7 つの異なる配列を使用して作成された。全長コンセンサス配列については、cKPNA2 と cKPNA7 の非 IBB domain 領域の配列にそれぞれ 2 つと 24 のパターンが存在したため、アラインメントによって挿入されたギャップを含めて 560 残基の 31 つの異なる配列を使用して作成された。

3-2-5 ホモロジーモデリング

IBB domain コンセンサス配列のホモロジーモデリングは、Swiss-Model modeling server の ProMod3 3.2.0(Studer et al., 2021; Waterhouse et al., 2018)によって実行した。鋳型構造には、importin β 結合型 (PDB ID: 1QGK)、CSE1 及び RanGTP との核外移行複合体 (PDB ID: 1WA5)、自己阻害型 (PDB ID: 1IAL) を使用した。IBB domain の結合パートナーのターゲット配列はヒト配列に統一し、核外移行複合体及び自己阻害型のモデリングにおいては、完全長のヒト importin α ファミリー配列 (UniProtKB: P52294, P52292, O00505, O00629, O15131, O60684, A9QM74) の IBB ドメイン部分に対応する IBB domain コンセンサス配列に置換したキメラ配列をターゲット配列として使用した。importin β 結合型は、IBB domain コンセンサス配列とヒト importin β 配列 (UniProtKB: Q14974) をヘテロターゲットとしてモデリングした。核外移行複合体及び自己抑制型のモデリングにおいては、まずキメラ配列とパン酵母 SRP1 配列 (UniProtKB: Q02821) 間、ヒト Ran 配列 (UniProtKB: P62826) とイヌ Ran 配列 (UniProtKB: P62825) 間、ヒト CAS 配列 (UniProtKB: P55060) とパン酵母 CSE1 配列 (UniProtKB: P33307) 間、キメラ配列とマウス KPNA2 配列 (UniProtKB: P52293) 間のアラインメントを ClustalW によって実行した。その後、核外移行複合体及び自己抑制型における各 chain をアラインメントモードによって個別にモデリングした。核外移行複合体は、モデリングしたキメラ配列、ヒト Ran 配列、ヒト CAS 配列を Swiss-PdbViewer4.1.0(Guex & Peitsch, 1997)によって統合した。さらに、各 chain の界面の整合性を確認するために、Swiss-Pdb Viewer によって生成した PDB ファイルを鋳型として、キメラ配列、ヒト Ran 配列、ヒト CAS 配列のヘテロターゲットモデリングを実行した。モデリン

グ構造と鋳型構造の全原子間の RMSD (Root Mean Square Deviation) は、PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2 Schrödinger, LLC によって計算した。

3-2-6 結合パートナーに対する IBB domain 残基の接触面積計算

3次元機能構造における IBB domain の各残基の溶媒露出表面積を STRIDE(Heinig & Frishman, 2004)によって計算した。同様に、結合パートナーの非存在下における IBB domain の各残基の溶媒露出表面積を計算し、結合パートナーの有無による溶媒露出表面積の差を結合パートナーに対する接触面積と定義した。

3-2-7 エネルギー計算

結合パートナーとの界面形成における IBB domain 残基の非結合性及び静電的相互作用のエネルギーは、Swiss-Pdb Viewer 4.1.0.の GROMOS96 43B1 force field を使用し、結合パートナーの有無による各エネルギーの差として計算した。IBB domain 残基と結合パートナー間の溶媒和自由エネルギーは、European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html) の 'Protein interfaces, surfaces and assemblies' service PISA v1.52(Krissinel & Henrick, 2007)によって計算した。

3-2-8 IBB domain 残基の生化学的性質スコアリング

残基の極性(Zimmerman et al., 1968)、疎水性(Kyte & Doolittle, 1982)、かさ高さ(Zimmerman et al., 1968)、柔軟性(BHASKARAN & PONNUSWAMY, 2009)、 α ヘリックス形成(Chou & Fasman, 2006)、 β シート形成(Chou & Fasman, 2006)、 β ターン形成(Chou & Fasman, 2006)、コイル形成(Deléage & Roux, 1987)に関するスコア指標を図 23 に示すように性質ごとに平均 5、標準偏差 1 となるよう標準化した。IBB domain コンセンサス配列のスコアリングでは、各残基を標準化されたスコア指標を使用してスコアリングした。同様に、配列セットに含まれるすべての IBB domain 配列のスコアリングを行い、コンセンサス配列を作成した際のアライメントに従ってコンセンサス配列の各残基位置における生物種間の平均スコアをギャップを無視して計算した。酸性、塩基性、ヘリックスブレイカーについては、それぞれアスパラギン酸とグルタミン酸、リジンとアルギニン、グリシンとプロリンにダミー変数 1、その他の残基とギャップにダミー変数 0 を与え、IBB domain コンセンサス配列のスコアとコンセンサス配列の各残基位置における生物種間の平均スコアを計算した。二次構造の形成に関する指標である、 α ヘリックス形成、 β -シート形成、 β -ターン形成、コイル形成のスコアについては、最終的に 5 残基間の相乗平均を計算した。

3-2-9 クラスタリング解析

IBB domain コンセンサス配列を各残基の生化学的性質スコアと結合パートナーに対する接触面積に基づいてクラスタリング解析を行った。クラスタリングは、それらの数値のユ

ークリッド距離に基づいたウォード法によって実行した。生化学的性質スコアに基づいたクラスタリングには、図 19A に示す IBB domain コンセンサス配列の残基位置 4-60 (α ヘリックス形成, β シート形成, β ターン形成, コイル形成については残基位置 6-58) のスコアを使用した。importin β 結合型、核外移行複合体、自己阻害型の接触面積に基づいたクラスタリングには、それぞれ残基位置 13-54、8-16 及び 26-53、44-54 の接触面積を使用した。

3-2-10 ラマチャンドラランプロット

ホモロジーモデリングの鋳型として使用した 1QGK、1WA5、1IAL の IBB domain 残基のラマチャンドラランプロットを Swiss-Pdb Viewer4.1.0 によって表示した。

3-2-11 接触面積に基づいたファミリーメンバー間の共通項と相違点のスクリーニング

モデリング構造ごとに IBB domain コンセンサス配列の各残基位置の接触面積の大きさを評価するために、残基あたりの接触面積の平均値を計算した。また、ファミリーメンバー間の変動を評価するために、残基位置ごとにファミリーメンバー間での接触面積の最大値と最小値の比を計算した。その後、IBB domain と結合パートナーとの相互作用に重要な残基位置を次のようにスクリーニングした。まず、いずれかのファミリーメンバーが平均値以上の接触面積を持つ残基位置を Large として抽出し、平均値未満を Small とした。次に、ファミリーメンバー間で接触面積の最大値と最小値の比が中央値を下回る残基位置の残基をファミリーメンバーに共通する重要な残基として抽出した。また、ファミリーメンバー間で接触面積の最大値と最小値の比が 2 以上となる残基位置の残基をファミリーメンバー間の違いを生み出す可能性のある残基として抽出した。さらに、そのような残基位置の接触面積を次のように 3 段階で評価した。接触面積の最小値と最大値の差を 3 で割った値を基準値とし、最大値との差が基準値よりも小さい接触面積、最大値との差が基準値の 2 倍よりも大きい接触面積。

3-3 結果と考察

3-3-1 importin α IBB domain コンセンサス配列の作成

まず、importin α IBB domain 残基の保存性を調べ、各ファミリーメンバーの代表配列として使用するコンセンサス配列を作成するために、多様な生物の IBB domain 配列を収集した (図 16A)。収集した配列のマルチプルアライメントをファミリーメンバーごとに行い、IBB domain 及び全長について各位置で最も保存された残基で構成されるコンセンサス配列を作成した (図 16B、16C)。本研究において作成された KPNA1、KPNA2、KPNA3、KPNA4、KPNA5、KPNA6、KPNA7 の IBB domain のコンセンサス配列はそれぞれ cIBB1、cIBB2、cIBB3、cIBB4、cIBB5、cIBB6、cIBB7 と命名し、全長のコンセンサス配列はそれぞれ cKPNA1、cKPNA2、cKPNA3、cKPNA4、cKPNA5、cKPNA6、cKPNA7 と命名した (図 16B)。全体的に哺乳綱が配列セットの主要な綱であったが、KPNA2 の配列セットには脊椎動物の 50%以上を占める条鰭綱が最も多く含まれていた (図 16A)。KPNA2 の IBB domain について哺乳綱と条鰭綱のコンセンサス配列を作成したところ、相同性は 73%であったが、cIBB2 と哺乳綱のコンセンサス配列の相同性は 100%であった。したがって、配列セットに含まれる生物種の比率の違いが cIBB2 固有のバイアスにつながらないことが確認された。

A

Class	Subtype 1			Subtype 3		Subtype 2	
	KPNA1	KPNA5	KPNA6	KPNA3	KPNA4	KPNA2	KPNA7
Anthozoa	--	--	1 (0.4%)	--	1 (0.7%)	1 (0.5%)	--
Hydrozoa	--	--	1 (0.4%)	1 (0.8%)	--	1 (0.5%)	--
Trematoda	--	--	--	1 (0.8%)	--	--	--
Enoplea	--	--	--	7 (5.6%)	1 (0.7%)	--	--
Chromadorea	--	1 (0.7%)	--	--	--	--	--
Arachnida	--	1 (0.7%)	1 (0.4%)	--	2 (1.4%)	1 (0.5%)	--
Malacostraca	--	--	--	--	1 (0.7%)	2 (1.1%)	--
Insecta	1 (0.6%)	1 (0.7%)	7 (2.8%)	3 (2.4%)	6 (4.1%)	5 (2.7%)	--
Hexanauplia	--	--	1 (0.4%)	--	--	1 (0.5%)	--
Asciacea	1 (0.6%)	--	1 (0.4%)	--	1 (0.7%)	--	--
Chondrichthyes	--	3 (2.0%)	2 (0.8%)	--	3 (2.0%)	1 (0.5%)	1 (1.0%)
Actinopterygii	37 (23.0%)	28 (18.7%)	60 (24.1%)	35 (28.2%)	33 (22.3%)	83 (44.4%)	3 (3.1%)
Sarcopterygii	1 (0.6%)	1 (0.7%)	--	1 (0.8%)	1 (0.7%)	1 (0.5%)	--
Amphibia	8 (5.0%)	--	7 (2.8%)	5 (4.0%)	4 (2.7%)	7 (3.7%)	5 (5.2%)
Reptilia	31 (19.3%)	28 (18.7%)	33 (13.3%)	19 (15.3%)	23 (15.5%)	25 (13.4%)	24 (25.0%)
Mammalia	82 (50.9%)	85 (56.7%)	135 (54.2%)	52 (41.9%)	72 (48.6%)	59 (31.6%)	63 (66.6%)
Magnoliopsida	--	2 (1.3%)	--	--	--	--	--
Total	161	150	249	124	148	187	96

B

family	subtype	family member	consensus sequence	
			IBB domain	full-length
importin α	subtype 1	KPNA1	cIBB1	cKPNA1
		KPNA5	cIBB5	cKPNA5
		KPNA6	cIBB6	cKPNA6
	subtype 3	KPNA3	cIBB3	cKPNA3
		KPNA4	cIBB4	cKPNA4
	subtype 2	KPNA2	cIBB2	cKPNA2
		KPNA7	cIBB7	cKPNA7

C

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 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: 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 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: 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 R E E E G I Q L R K Q K R E Q Q L F K R R N V E L I N E E A
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 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: 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 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: 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 R I E V N V E L R K A K K D D Q M L K R R N V S S F P D D A
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 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

図 16 配列セットに含まれる生物種の分布と IBB domain コンセンサス配列

(A) 配列セットに含まれる生物クラスの各クラスに属する生物種の数と全体に占める割合を括弧内に示す。(B) 本研究において作成した importin α ファミリーメンバーのコンセンサス配列名を表にまとめた。(C) 各ファミリーメンバーの IBB domain コンセンサス配列。RXXR motif と KR (R) R motif を下線と下二重線で示す。

3-3-2 IBB domain 残基の保存性解析

次に、ファミリーメンバー間の一次配列を分類するために、ファミリーメンバーの IBB domain コンセンサス配列間及び全長コンセンサス配列間のマルチプルアライメントを行い、系統樹を作成した。近隣結合法または最尤法によって作成した全長のコンセンサス配列の系統樹においては、すべてのファミリーメンバーがヒトの importin α について報告されているような従来のサブタイプごとに分類された(Kelley et al., 2010; Miyamoto et al., 2016; Pumroy & Cingolani, 2015)。同様に、最尤法によって作成した IBB domain のコンセンサス配列の系統樹は従来のサブタイプごとに分類されたが、近隣結合法によって作成した系統樹では枝の分かれ方が異なっていた(図 17A、B)。これらの事実を踏まえると、IBB domain を機能と関連させて特徴付けるには一次配列から得られる情報のみでは不十分である可能性がある。

また、配列相同性の観点からも、コンセンサス配列が importin α ファミリーメンバーの性質を反映していることが確認された。今回作成した IBB domain コンセンサス配列のうち、cIBB7 は他のコンセンサス配列と相同性が低く、KPNA7 の IBB domain は他のファミリーメンバーと比較して生物種間でも相同性が低かった(図 17C、D)。このような傾向はヒトの importin α ファミリーメンバーの相同性を比較した以前の研究と一致しており(Kelley et al., 2010)、今回新たに KPNA7 がファミリーメンバー間のみならず生物種間でも相同性が低いことが明らかとなった。このことは、KPNA7 の IBB domain 配列が様々な選択圧に対応して他のファミリーメンバーとは異なる進化をした可能性があるという仮説を支持する(Kelley et al., 2010)。

また、IBB domain 配列について残基ごとの生物間の保存性と多様性に焦点を当て、IBB domain コンセンサス配列を構成する各残基の保存度と配列セットに含まれる IBB domain をアライメントした際に IBB domain コンセンサス配列の各残基位置に配置される残基の種類を計算した(図 17E)。残基の保存度は特定の残基に対する選択圧を反映し、多様性は特定の性質に対する選択圧を反映する可能性がある。例えば、保存度と多様性が低い残基位置には、特定の性質を持つ限られた残基に対する選択圧が存在する可能性がある。

これまでによく知られている IBB domain の特徴は図 16C に下線で示した RXXX motif と KR (K) R motif であり、これら二つの塩基性パッチは核外移行複合体及び自己阻害においてそれぞれ自身の minor NLS 結合部位と major NLS 結合部位を占める(Chang et al., 2013; Kobe, 1999; Matsuura & Stewart, 2004)。すべての IBB domain コンセンサス配列はそれらの塩基性パッチを含んでおり、いずれのファミリーメンバーにおいても生物間で 95.7%以上保存されていることが明らかとなった(図 17E)。

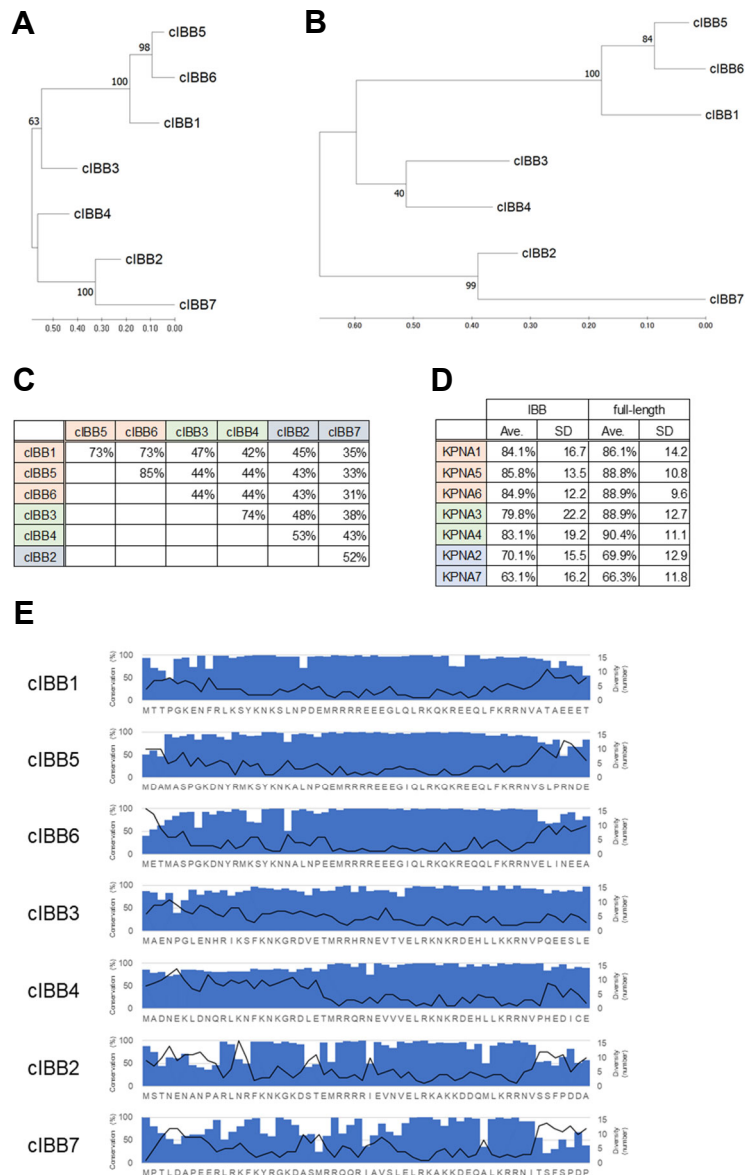


図 17 IBB domain 残基の保存性解析

(A, B) 近隣結合法 (A) と最尤法 (B) によって作成された IBB domain コンセンサス配列の系統樹。(C) IBB domain コンセンサス配列間のペアワイズアライメントにおける percent identity score。(D) 各ファミリーメンバーの配列セットに含まれる IBB domain 配列間または全長配列間のペアワイズアライメントにおける percent identity score の平均値と標準偏差 (SD)。(E) 配列セットに含まれる IBB domain 配列間のアライメント結果に基づき、IBB domain コンセンサス配列の残基の保存度と各残基位置における多様性を計算し、それぞれ棒グラフと折れ線グラフで示した。

3-3-3 IBB domain と結合パートナーの界面解析

立体構造の観点から機能と関連付けて IBB domain を特徴づけるために、importin β 複合体及び核外移行複合体、自己阻害型の IBB domain コンセンサス配列のホモロジーモデリングを行った。核外移行複合体および自己阻害型のモデリングにおいては、cKPNA2 及び cKPNA7 の冗長性により全長コンセンサス配列を使用するのが困難であったため、各ファミリーメンバーのヒト全長配列の IBB domain 部分に対応する cIBB 配列に置換したキメラ配列を使用した。キメラ配列の非 IBB domain 領域のうち、結合パートナーとの界面形成による非結合性及び静電相互作用エネルギー変化の合計の絶対値が上位 30%にあたる残基について、全長コンセンサス配列との同一性を調べたところ、いずれのファミリーメンバーにおいても 84.7%以上の残基が一致していた。したがって、分子間相互作用の解析において全長コンセンサス配列の代わりにキメラ配列を使用することによる影響は少ないと結論付けた。また、すべてのモデリング構造について、複合体の界面に歪み、あるいは、立体障害がないことを GROMOS96 43B1 の力場を用いた Swiss-Pdb Viewer 4.1.0 によるエネルギー計算により確認した。モデリング結果の GMQEs (Global Model Quality Estimates) 及び铸型構造とモデリング構造の全原子間についての RMSD (Root Mean Square Deviation) の平均値を図 18A-E に示す。

A

Target	template	GMQE
cIBB1	chain B	0.89
human importin β	chain A	
cIBB5	chain B	0.89
human importin β	chain A	
cIBB6	chain B	0.89
human importin β	chain A	
cIBB3	chain B	0.89
human importin β	chain A	
cIBB4	chain B	0.89
human importin β	chain A	
cIBB2	chain B	0.89
human importin β	chain A	
cIBB7	chain B	0.89
human importin β	chain A	

B

Target	template	GMQE
human Ran	chain A	0.74
chimeric KPNA1	chain B	0.76
chimeric KPNA5	chain B	0.76
chimeric KPNA6	chain B	0.77
chimeric KPNA3	chain B	0.74
chimeric KPNA4	chain B	0.74
chimeric KPNA2	chain B	0.76
chimeric KPNA7	chain B	0.74
human CAS	chain C	0.73

C

Target	template	GMQE
chimeric KPNA1	chain B	0.84
human Ran	chain A	
human CAS	chain C	
chimeric KPNA5	chain B	0.83
human Ran	chain A	
human CAS	chain C	
chimeric KPNA6	chain B	0.84
human Ran	chain A	
human CAS	chain C	
chimeric KPNA3	chain B	0.83
human Ran	chain A	
human CAS	chain C	
chimeric KPNA4	chain B	0.83
human Ran	chain A	
human CAS	chain C	
chimeric KPNA2	chain B	0.83
human Ran	chain A	
human CAS	chain C	
chimeric KPNA7	chain B	0.84
human Ran	chain A	
human CAS	chain C	

D

Target	template	GMQE
chimeric KPNA1	chain A	0.69
chimeric KPNA5	chain A	0.69
chimeric KPNA6	chain A	0.70
chimeric KPNA3	chain A	0.74
chimeric KPNA4	chain A	0.73
chimeric KPNA2	chain A	0.82
chimeric KPNA7	chain A	0.76

E

Template	Target		RMSD (Å)
1QGK	cIBB1	human importin β	0.099
	cIBB5	human importin β	0.109
	cIBB6	human importin β	0.109
	cIBB3	human importin β	0.090
	cIBB4	human importin β	0.093
	cIBB2	human importin β	0.134
	cIBB7	human importin β	0.115

Template	Target			RMSD (Å)
1WA5	chimeric KPNA1	human Ran	human CAS	0.296
	chimeric KPNA5	human Ran	human CAS	0.298
	chimeric KPNA6	human Ran	human CAS	0.220
	chimeric KPNA3	human Ran	human CAS	0.272
	chimeric KPNA4	human Ran	human CAS	0.227
	chimeric KPNA2	human Ran	human CAS	0.284
	chimeric KPNA7	human Ran	human CAS	0.272

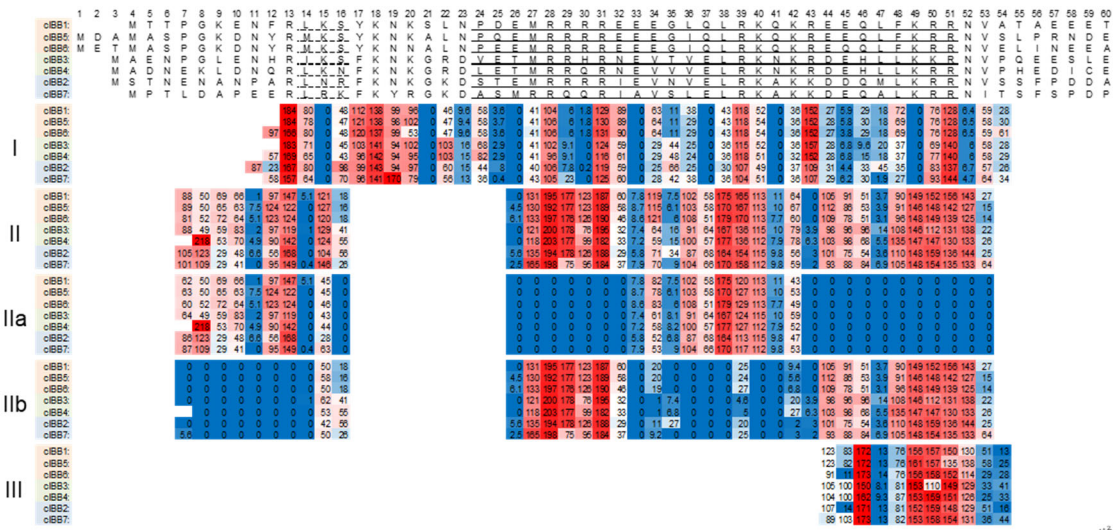
Template	Target	RMSD (Å)
1IAL	chimeric KPNA1	0.151
	chimeric KPNA5	0.150
	chimeric KPNA6	0.156
	chimeric KPNA3	0.151
	chimeric KPNA4	0.143
	chimeric KPNA2	0.093
	chimeric KPNA7	0.137

図 18 ホモロジーモデリングにおける GMQE と RMSD

(A-D) 1QGK (A)、1WA5 の各 chain (B)、Swiss-PdbViewer によって統合した核移行複合体 (C)、1IAL (D) を鋳型としたホモロジーモデリングにおける GMQE。(E) ホモロジーモデリングによって構築された構造と鋳型構造の全原子間についての RMSD の平均値。

次に、モデリング構造から IBB domain コンセンサス配列の各結合パートナーに対する接触面積を残基ごとに計算し、結合への寄与を評価した (図 19A)。3 つのモデリング構造における接触面積の合計を図 19B に示す。いずれの構造においてもファミリーメンバー間で接触面積の合計に大きな差はなく、結合パートナーに対する全体的な界面がファミリーメンバー間で保存されていることが示唆された。一般的に、タンパク質-タンパク質相互作用の標準的な界面面積は $1600 (\pm 400) \text{ \AA}^2$ であり (Conte et al., 1999)、このことから、IBB domain と importin β は比較的安定した複合体を形成することが分かる。核外移行複合体における CAS と ARM に対する接触面積も標準的な範囲内であるが、これらの相互作用が協調的に起こることを考慮すると、正味の接触面積は非常に大きく、複合体全体として十分に安定であると考えられる。一方、自己阻害型の場合、ARM repeat との接触面積は比較的小さく、自己阻害型が一時的で不安定であるか結晶構造における欠落部位が相互作用に寄与する可能性がある。また、モデリング構造ごとに、IBB domain コンセンサス配列の各残基について界面形成による非結合性及び静電相互作用のエネルギー変化とその合計、溶媒和のエネルギー変化を計算した結果、接触面積と非結合性及び静電相互作用のエネルギー変化の合計との間に高い相関関係があることが確認された (図 20、21)。これは、タンパク質-タンパク質相互作用の接触面積と結合強度の間に相関関係があるという事実と一致する (Henrick & Thornton, 1998)。また、核外移行複合体における cIBB4 の CAS に対する接触面積と非結合性及び静電相互作用のエネルギー変化との合計には矛盾がみられたが、これはモデリングの際に切断された N 末端の残基による電荷の強い反発によるものだと考えられる (図 20)。そのため、cIBB4 については N 末端の 1 残基を省いて相関係数を計算した (図 21)。GROMOS によるエネルギー計算には溶媒和エネルギーが含まれておらず、溶媒和と脱溶媒和による自由エネルギー変化、特にエントロピーの絶対値を推定することは一般的に困難である。一方、前述のように接触面積と非結合性及び静電相互作用のエネルギー変化には強い相関関係があり、溶媒和の変化と分子表面の変化にも基本的には相関関係がある。したがって、今回の解析では結合パートナーとの相互作用における IBB domain の各残基の寄与を接触面積に基づいて評価することとした。

A



(A)

B

	I	II	IIa	Ib	III
cBB1	2204.5	3232.1	1197.7	1959.3	1122.8
cBB5	2218.9	3186.9	1202.3	1919.1	1139.6
cBB6	2180.1	3186.5	1221.6	1905.4	999.6
cBB3	2160.4	3094.3	1159.3	1901.2	1057.3
cBB4	2134.1	3312.0	1326.2	1955.3	1107.3
cBB2	2143.5	3165.2	1127.0	1969.5	1041.4
cBB7	2112.5	3133.0	1188.6	1883.3	1136.8

(Å²)

図 19 各結合パートナーに対する IBB domain 残基の接触面積

(A) 各 IBB domain コンセンサス配列をホモロジーモデリングにおけるアライメントに従って示す。配列の上には残基位置の番号が振られている。また、importin β 複合体における α ヘリックス及び 310 ヘリックス領域をそれぞれ下線と点線で示した。その下には、importin β 複合体における importin β (I)、核外移行複合体における CAS 及び ARM repeat (II)、CAS (IIa)、ARM repeat (Ib)、自己阻害型における ARM repeat (III) に対する IBB domain コンセンサス配列の接触面積 (\AA^2) が残基ごとにヒートマップとして示されている。空欄は鋳型構造における欠落部位である。接触面積のヒートマップは最大値を赤、中央値を白色、最小値を青色としてグラデーションによって色付けされている。(B) (A) に示した各残基の接触面積をファミリーメンバーごとに合計した。Iは残基位置 13~54、IIは残基位置 8~16 および 26~53、IIIは残基位置 44~54 の接触面積を合計した。

I

Table I: A 7x60 grid of numerical data. Rows are labeled GBE1 to GBE7. Columns are numbered 1 to 60. The data consists of various numerical values, some in red and some in blue, representing different categories or states.

II

Table II: A 7x60 grid of numerical data, similar to Table I. It contains numerical values in a grid format, with some cells highlighted in red and blue.

Ila

Table Ila: A 7x60 grid of numerical data. The values are more varied than in the previous tables, including some larger numbers and more frequent use of red and blue highlights.

Ilb

Table Ilb: A 7x60 grid of numerical data. This table shows a different distribution of values, with a mix of positive and negative numbers and highlighted cells.

III

Table III: A 7x60 grid of numerical data. This is the final table in the set, showing a complex pattern of numerical values and highlights.

図 20 結合パートナーとの界面形成によるエネルギー変化

importin β 複合体における importin β (I)、核外移行複合体における CAS と ARM repeat (II)、CAS (IIa)、ARM repeat (IIb)、自己阻害型における ARM repeat (III) との界面形成による、IBB domain コンセンサス配列の非結合性及び静電相互作用のエネルギー変化とその合計、溶媒和の自由エネルギー変化を残基ごとヒートマップとして示す。非結合性相互作用と静電相互作用のエネルギー単位は (kJ / mol)、溶媒和のエネルギー単位は (kcal / mol) である。ヒートマップは最大値を赤、中央値を白色、最小値を青色としてグラデーションによって色付けされている。

	I	II	IIa	IIb	III
cBB1	-0.82	-0.83	-0.92	-0.92	-0.74
cBB5	-0.83	-0.85	-0.90	-0.94	-0.76
cBB6	-0.88	-0.84	-0.94	-0.93	-0.85
cBB3	-0.84	-0.59	-0.66	-0.89	-0.54
cBB4	-0.83	-0.86	-0.91	-0.94	-0.65
cBB2	-0.75	-0.80	-0.87	-0.89	-0.80
cBB7	-0.86	-0.76	-0.88	-0.85	-0.72

図 21 結合パートナーに対する IBB domain 残基の接触面積とエネルギーの関係

importin β 複合体における importin β (I)、核外移行複合体における CAS と ARM repeat (II)、CAS (IIa)、ARM repeat (IIb)、自己阻害型における ARM repeat (III) との界面における IBB domain コンセンサス配列の各残基の接触面積と非結合性及び静電相互作用のエネルギー変化の合計の相関係数。I は残基位置 13~54、II は残基位置 7~16 および 26~53、III は残基位置 44~54 について計算した。

次に、IBB domain コンセンサス配列の各残基位置について結合パートナーとの接触面積と残基の保存度の関係を調べた。その結果、接触面積が比較的大きい残基位置 (Large) に配置されている残基はすべてのファミリーメンバーで高い保存度を示し、相互作用の維持のための強い選択圧の存在が示唆された (図 22)。興味深いことに、接触面積が比較的小さい残基位置 (Small) に配置されている残基についても同様に多くのファミリーメンバーで高い保存度を示した。これは、IBB domain の多機能性によって解釈される。つまり、特定の分子との相互作用に重要でない残基が別の分子との相互作用にとって重要である可能性があり、その逆もあり得る。そのため、IBB domain の多くの残基は少なくとも 1 つの機能にとって重要であり、進化的に保存されている可能性がある。しかし、サブタイプ 2 に属する cIBB2 と cIBB7 においては、接触面積が小さい残基位置 (Small) に配置されている残基の保存度が他のファミリーメンバーと四角して低い傾向がみられた (図 22)。このことから、KPNA2 と KPNA7 に関しては、限られた機能に特化して進化した可能性がある。

	I					II					III				
	Large		Small		p-value	Large		Small		p-value	Large		Small		p-value
	Ave.	SD	Ave.	SD		Ave.	SD	Ave.	SD		Ave.	SD	Ave.	SD	
cIBB1	95.1%	7.2	96.1%	5.3	0.609	95.0%	7.6	93.7%	7.8	0.625	93.8%	8.1	92.4%	0.5	0.687
cIBB5	95.1%	6.3	97.2%	2.4	0.159	95.8%	4.7	96.3%	3.5	0.723	95.4%	2.7	88.5%	6.1	0.142
cIBB6	93.81%	12.5	96.63%	6.2	0.368	95.3%	10.1	95.6%	7.9	0.922	98.3%	1.1	91.0%	10.8	0.323
cIBB3	91.31%	5.8	91.33%	6.0	0.992	90.5%	7.9	89.8%	6.2	0.782	93.7%	3.7	93.1%	3.3	0.839
cIBB4	91.34%	7.9	93.95%	6.0	0.245	94.5%	6.4	90.5%	8.2	0.137	96.9%	3.1	97.1%	2.4	0.910
cIBB2	86.12%	18.3	86.76%	17.5	0.910	88.4%	15.7	74.1%	23.9	0.063	93.8%	5.6	70.6%	19.0	0.123
cIBB7	82.70%	19.3	77.08%	21.1	0.388	86.1%	16.5	66.3%	22.0	0.008	96.0%	3.5	69.3%	25.0	0.161

図 22 界面における IBB domain 残基の接触面積と保存度の関係

構造ごとに残基位置を、いずれかの IBB domain コンセンサス配列が平均値以上の接触面積を持つ残基位置 (Large) といずれの IBB domain コンセンサス配列も接触面積が平均値未満であった残基位置 (Small) に分け、残基の保存度の平均値と標準偏差 (SD)、p 値を計算した。

3-3-4 IBB domain の生化学的性質解析

次に、生化学的性質の観点から相互作用に重要な IBB domain 残基を解析するために、複数の生化学的性質を IBB domain コンセンサス配列にマッピングした。具体的には、残基の極性、疎水性、かさ高さ、柔軟性、 α ヘリックス形成、 β シート形成、 β ターン形成、コイル形成に関するスコア表を基に IBB domain コンセンサス配列の各残基をスコアリングした (図 23)。また、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸、ヘリックスブレイカーをダミー変数に置換した。スコアリングされた IBB domain コンセンサス配列のヒートマップと生物種間の平均スコア及び標準偏差を図 24-26 に示す。さらに、生化学的性質の観点からファミリーメンバー間の IBB domain の類似性を調べるために、スコアリング結果を基にクラスタリング解析を行った。その結果、 α ヘリックス形成と β シート形成、ヘリックスブレイカーを除き、すべてのファミリーメンバーが従来のサブタイプごとに分類された (図 27)。この結果は、複数の生化学的性質がサブタイプ間で保存されていることを示唆する。

A

	polarity	hydrophobicity	bulkiness	average flexibility	α -helix	β -sheet	β -turn	coil
Ala	0	1.8	11.5	0.36	1.42	0.83	0.66	0.824
Arg	52	-4.5	14.28	0.53	0.98	0.93	0.95	0.893
Asn	3.38	-3.5	12.82	0.46	0.67	0.89	1.56	1.167
Asp	49.7	-3.5	11.68	0.51	1.01	0.54	1.46	1.197
Cys	1.48	2.5	13.46	0.35	0.7	1.19	1.19	0.953
Gln	3.53	-3.5	14.45	0.49	1.11	1.1	0.98	0.947
Glu	49.9	-3.5	13.57	0.5	1.51	0.37	0.74	0.761
Gly	0	-0.4	3.4	0.54	0.57	0.75	1.56	1.251
His	51.6	-3.2	13.69	0.32	1	0.87	0.95	1.068
Ile	0.13	4.5	21.4	0.46	1.08	1.6	0.47	0.886
Leu	0.13	3.8	21.4	0.37	1.21	1.3	0.59	0.81
Lys	49.5	-3.9	15.71	0.47	1.16	0.74	1.01	0.897
Met	1.43	1.9	16.25	0.3	1.45	1.05	0.6	0.81
Phe	0.35	2.8	19.8	0.31	1.13	1.38	0.6	0.797
Pro	1.58	-1.6	17.43	0.51	0.57	0.55	1.52	1.54
Ser	1.67	-0.8	9.47	0.51	0.77	0.75	1.43	1.13
Thr	1.66	-0.7	15.77	0.44	0.83	1.19	0.96	1.148
Trp	2.1	-0.9	21.67	0.31	1.08	1.37	0.96	0.941
Tyr	1.61	-1.3	18.03	0.42	0.69	1.47	1.14	1.109
Val	0.13	4.2	21.57	0.39	1.06	1.7	0.5	0.772

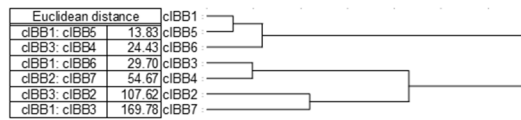
B

	polarity	hydrophobicity	bulkiness	average flexibility	α -helix	β -sheet	β -turn	coil
Ala	4.38	5.77	4.17	4.18	6.49	4.46	4.10	4.15
Arg	6.75	3.66	4.77	6.25	4.93	4.73	4.89	4.49
Asn	4.53	3.99	4.45	5.40	3.83	4.62	6.55	5.85
Asp	6.65	3.99	4.20	6.01	5.04	3.67	6.28	6.00
Cys	4.45	6.00	4.59	4.05	3.93	5.44	5.54	4.79
Gln	4.54	3.99	4.80	5.76	5.39	5.19	4.97	4.76
Glu	6.66	3.99	4.61	5.88	6.81	3.21	4.31	3.84
Gly	4.38	5.03	2.42	6.37	3.47	4.24	6.55	6.27
His	6.73	4.09	4.64	3.69	5.00	4.57	4.89	5.36
Ile	4.39	6.67	6.30	5.40	5.28	6.55	3.58	4.46
Leu	4.39	6.44	6.30	4.30	5.75	5.74	3.91	4.08
Lys	6.64	3.86	5.07	5.52	5.57	4.22	5.05	4.51
Met	4.44	5.80	5.19	3.44	6.60	5.06	3.93	4.08
Phe	4.40	6.10	5.96	3.57	5.46	5.95	3.93	4.02
Pro	4.45	4.63	5.45	6.01	3.47	3.70	6.44	7.70
Ser	4.46	4.90	3.73	6.01	4.18	4.24	6.19	5.67
Thr	4.46	4.93	5.09	5.15	4.40	5.44	4.91	5.76
Trp	4.48	4.86	6.36	3.57	5.28	5.93	4.91	4.73
Tyr	4.45	4.73	5.57	4.91	3.90	6.20	5.40	5.56
Val	4.39	6.57	6.34	4.54	5.21	6.82	3.66	3.89

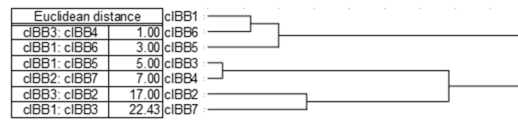
図 23 生化学的性質のスコア表

(A) 残基の極性、疎水性、かさ高さ、柔軟性、 α ヘリックス形成、 β シート形成、 β ターン形成、コイル形成に関するスコア表。(B) 性質ごとに平均値が 5、標準偏差が 1 となる

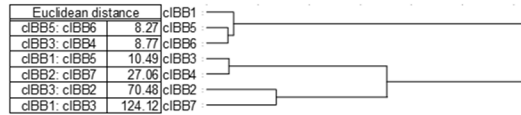
polarity



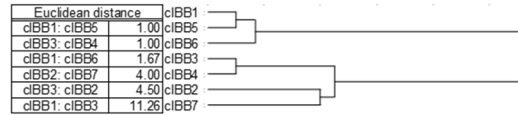
acidic amino acid



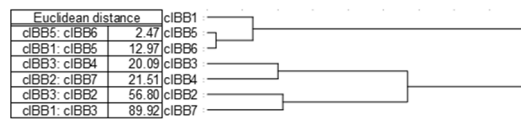
hydrophobicity



basic amino acid



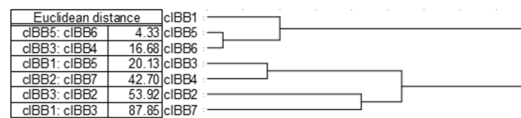
bulkiness



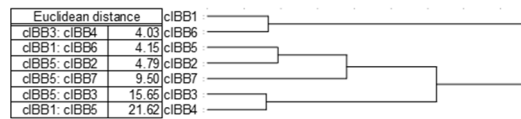
helix breaker



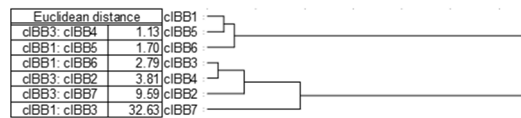
average flexibility



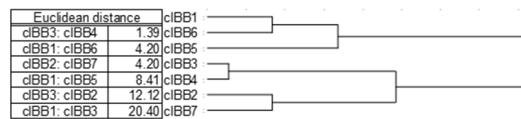
α-helix



β-sheet



β-turn



coil



図 27 生化学的性質による IBB domain コンセンサス配列のクラスタリング解析
 生化学的性質に関するスコアから計算された IBB domain コンセンサス配列間のユークリッド距離。デンドログラムはユークリッド距離を基に作成された。

3-3-5 importin β 複合体における IBB domain の界面解析

importin β と結合した IBB domain は、短いループでつながれた 310 ヘリックスと約 30 残基の α ヘリックスを形成する (Cingolani et al., 1999)。モデリングされた importin β 結合型の IBB domain コンセンサス配列はすべてのファミリーメンバーにおいて残基位置 14-16 に 310 ヘリックス、残基位置 24-51 に α ヘリックス構造を形成している (図 19A)。また、 α ヘリックス形成に関するスコアはすべての IBB domain コンセンサス配列について残基位置 24-49 周辺で高く、このような傾向は生物間の平均スコアでも同様にみられた (図 24, 25)。さらに、残基位置 26-49 の高いコイル形成スコアとその外側の低いスコアは、そのような二次構造維持のための進化的選択圧の存在を示唆する (図 24, 25)。

importin β 結合型 IBB domain のホモロジーモデリングの鋳型として使用された結晶構造 (1QGK) では IBB domain の一部が α ヘリックス構造をとるが、核外移行複体の結晶構造 (1WA5) においてはその部分がコイル状のコンフォメーションを持つ。また、IBB domain の一部または全体が欠落部位として報告されている結晶構造も多数あり、importin α 単量体の自己阻害型の結晶構造 (1IAL) では一部が欠落部位となっている。図 28 に示すこれらの結晶構造における IBB domain 領域のラムチャンドラプロットから明らかのように、IBB domain ペプチド主鎖の二面角は構造間で劇的に切り替わる。このような事実と今回の解析結果を考慮すると、IBB domain のこの領域には必要に応じて特定の結合パートナーに対して誘導される α ヘリックスを形成する性質があり、この α ヘリックスを含む複数のコンフォメーション間を切り替え可能な多機能 ChSeq としての性質が保存されていると考えられる。

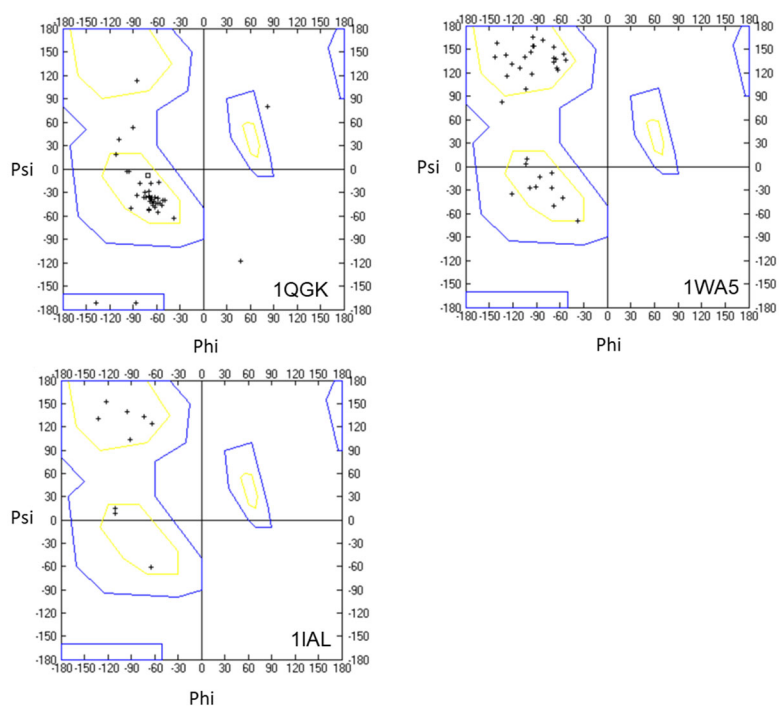


図 28 IBB domain 残基のラマチャンドランプロット

importin β 複合体 (1QGK)、核外移行複合体 (1WA5)、自己阻害型 (1IAL) における IBB domain 残基のラマチャンドランプロット。1QGK、1WA5、1IAL はそれぞれ図 19A の残基位置 13-54、7-16 および 26-53、44-54 に対応する残基についてプロットした。

次に、importin β と界面を形成する残基についてファミリーメンバー間の共通項と違いを調べた (図 29)。残基位置 13、14、17、18、28、31、39、40、43、50、51、53 ではすべてのコンセンサス配列が同様の比較的大きな接触面積を持ち、これらの残基の近傍には鋳型構造において対応する IBB domain 残基の近傍に存在する importin β 残基がモデリング構造においても存在した。また、R13、K18、R28、R31、R39、K40、R51 はファミリーメンバー及び生物間で高度に保存されていた (図 29)。

一方、残基位置 14、17、43、50、53 ではファミリーメンバー間で残基に多様性がみられるが、そのような位置には特定の生化学的性質がファミリーメンバー間で保存されている。例えば、残基位置 14、17、53 では疎水性、残基位置 43 と 50 では塩基性が保存されている (図 24)。ただし、KPNA7 の配列セットには 14 位にメチオニンを持つ IBB domain が多く含まれているため、KPNA7 の 14 位における疎水性は生物種間で変動する (図 26)。これらの事実はファミリーメンバーに共通する結合パートナーとの界面にはアミノ酸自体が保存されておらずとも、特定の性質が保存されていることを示唆する。すなわち、各残基位置における残基の種類に対する選択圧は、特定の生化学的性質に対して作用する。このような視点は、複合体における IBB domain の界面形成と機能を考える上で不可欠であると考えられる。

一方、importin β 結合においてファミリーメンバー間に違いを生み出す可能性のある残基も予測された。43 位では、サブタイプ 2 に属する cIBB2 と cIBB7 のみがアルギニンの代わりにリシンを持ち、importin β との接触面積が他のファミリーメンバーと比較して比較的小さい (図 19A)。また、これらの残基の近傍に存在する importin β の残基は他のサブタイプに属するファミリーメンバーと異なっていた (図 29)。また、16 位と 22 位では塩基性とアルギニンがそれぞれサブタイプ 2 とサブタイプ 3 に importin β との相互作用に特徴的界面を与えている (図 19A)。ただし、16 位における KPNA2 の塩基性アミノ酸の保存度は 57.2% と低かった (図 25)。これらの残基の接触面積の差異は、静電相互作用のエネルギー変化と一致している (図 20)。24 位と 35 位では、単純に残基のかさ高さがファミリーメンバー間の接触面積の違いを生み出していると考えられる (図 19A, 24)。しかし、生物種間の多様性の観点では、かさ高さのスコアが 35 位よりも 24 位で生物種間の変動が大きいため、この特徴は 24 位よりも 35 位の方が重要であるように考えられる (図 26)。また、モデリングされたすべての IBB domain コンセンサス配列の 34 位の近傍には importin β の塩基性アミノ酸が存在する (図 29)。サブタイプ 1 に属する cIBB1、cIBB5、cIBB6 はこの位置に酸性アミノ酸であるグルタミン酸を持ち、生物種間で非常によく保存されている (図 25)。電荷の相性により、この位置の酸性アミノ酸は importin β との界面形成に有利であると考えられる。54 位では同様に、cIBB6 の酸性アミノ酸が importin β との相互作用を特徴づける可能性がある (図 19A)。cIBB6 の E54 の生物種間の保存度は 72.3% と低かったが、酸性の性質ははるかに高い割合で保存されていることもそのような仮説の裏付けとなる (図 25, 29)。48 位においては、サブタイプ 1 に属するファミリーメンバーではフェニルアラニン、その

他のファミリーメンバーはロイシンが配置されており、importin β との接触面積に大きな差がみられた (図 19A)。この残基位置に配置された残基はいずれのファミリーメンバーにおいても生物種間で 88.8%以上保存されており、importin β との相互作用の調節に関与して進化的に保存された可能性がある (図 29)。したがって、残基位置 22、34、35、48、54 に配置された残基と一部の生物種では 16 位と 24 位の残基が協調することで、importin β との相互作用においてファミリーメンバー間に個性を与える可能性がある。

importin β 結合に関しては、出芽酵母の importin α の 34RRRR (図 19A の 28RXXR に対応) と 45RKAKR (図 19A の 39RKXKR (K) に対応) のアラニン置換により、importin β との親和性が低下することが報告されている (Harreman, Hodel, et al., 2003)。今回の解析では、すべてのコンセンサス配列において RXXR motif の 28R と 31R、39RKXKR (K) の 39R と 43R (K) が importin β に対して大きな接触面積を持つ一方、RXXR motif の中央部分である 29X、30X と 39RKXKR(K) の中央部分である 40K、41X、42K の接触面積は小さいことが示された (図 19A)。したがって、RXXR および RKXKR (K) モチーフのアラニン置換、特にそれぞれのモチーフの先頭と末尾の R (K) が置換される場合、importin β との結合に大きな影響を与える可能性がある。

Criteria	Position	Residues in close proximity in a binding partner previously reported	MAX/MIN	Residues in close proximity in a binding partner in the modeled structure							Conservation of amino acid in tested species							
				ciBB1	ciBB5	ciBB6	ciBB3	ciBB4	ciBB2	ciBB7	ciBB1	ciBB5	ciBB6	ciBB3	ciBB4	ciBB2	ciBB7	
●	13	E281 D288 W342 V350	1.17	E281 S284 N285 D288 W342 V350 L354	E281 S284 N285 D288 W342 V350 L354	E281 S284 N285 D288 W342 V350 L354	E281 S284 N285 D288 W342 V350 L354	E281 S284 N285 D288 W342 V350 L354	E281 S284 N285 D288 W342 V350 L354	E281 S284 N285 D288 W342 V350 L354	98.1	100	98.8	88.7	81.1	97.9	93.8	
	18	D426 T427 M388 W430	1.04	M388 D426 T427 W430	M388 D426 T427 W430	M388 D426 T427 W430	M388 D426 T427 W430	M388 D426 T427 W430	M388 D426 T427 W430	M388 D426 T427 W430	99.4	100	100	94.4	85.8	97.8	97.9	
	28	G623 D627	1.11	S582 G623 E626 D627 Q665	S582 G623 E626 D627 Q665	S582 G623 E626 D627 Q665	S582 G623 E626 D627 Q665	S582 G623 E626 D627 Q665	S582 G623 E626 D627 Q665	S582 G623 E626 D627 Q665	100	100	100	96.8	100	95.7	99.0	
	31	E530	1.13	E530 A586 Q589 D627	E530 A586 Q589 D627	E530 A586 Q589 D627	E530 A586 Q589 D627	E530 A586 Q589 D627	E530 A586 Q589 D627	E530 A586 Q589 D627	100	98.7	100	97.6	99.3	99.5	96.9	
	39	G672 D676	1.13	S633 G672 D676 R679	S633 G672 D676	S633 G672 D676 R679	S633 G672 D676 R679	S633 G672 D676 R679	S633 G672 D676 R679	S633 G672 D676 R679	100	100	100	96.8	99.3	100	100	
	40	E763	1.10	E763	E763	E763	E763	E763	E763	E763	100	100	100	96.8	99.3	93.6	100	
	51	D624 W864	1.13	G820 D824 L861 W864	T770 G820 D824 L861 W864	T770 G820 D824 L861 W864	T770 G820 D824 L861 W864	T770 G820 D824 L861 W864	T770 G820 D824 L861 W864	T770 G820 D824 L861 W864	95.0	93.3	98.4	99.2	100	100	99.0	
	14	W342	1.26	D339 D340 D341 W342	D340 W342	D339 D340 W342	D340 W342	D339 D340 D341 W342	D339 D340 D341 W342	D339 D340 D341 W342	98.1	94.7	95.6	77.4	81.8	91.4	51.0	
	17	K346	1.26	K346 V350 M388	K346 V350 M388	K346 V350 M388	K346	K346 V350	K346 V350	K346 V350	98.1	100	98.8	96.8	87.2	97.9	94.8	
	43	D719 E767	1.47	D719 L722 E767 G771	D719 L722 E767 G771	D719 L722 E767 G771	D719 L722 E767 G771	D719 L722 E767 G771	D719 L722 E767 G771	R679 S715 D719 E767	75.8	100	100	97.6	100	95.2	99.0	
	50	L722	1.33	L722 Q774	L722 Q774	L722 Q774	L722 Q774	L722 Q774	L722 Q774	L722 Q774	95.0	92.0	100	91.9	98.0	93.6	96.9	
	53	W864	1.12	T860 W864	T860 W864	T860 W864	T860 W864	T860 W864	T860 W864	T860 L861 W864	93.2	90.7	98.0	93.5	98.6	90.4	90.6	
	○	16	V350	2.29	V350 M353	V350 M353	V350 M353	V350 M353	V350 M353	V350 M353 L354	D288 V350 M353	96.3	92.7	89.1	87.9	81.8	49.2	80.2
		22	W472	2.23	W472	W472	W472	E437 W472	E437 W472	W472	W472	96.9	97.3	98.4	88.7	80.4	94.7	94.8
24		-	2.28	S526	S526	S526	S526	D679	-	-	71.4	90.0	88.8	78.2	89.2	42.2	60.4	
34		-	2.57	K537	K537	K537	R593	R593	R593	R593	96.9	96.7	99.2	89.5	96.6	89.8	86.5	
35		R593	5.88	-	-	-	R593	R593	R593 M630	R593	96.9	98.0	99.6	85.5	90.5	84.0	68.8	
48		-	2.71	K857 L861	K857 L861	K857 L861	-	-	-	-	92.5	92.7	96.0	89.5	93.2	88.8	95.8	
54		-	2.32	T860	T860	T860	T860	T860	T860	T860	91.9	78.0	72.3	91.1	99.3	52.9	55.2	

図 29 importin β 複合体における importin β との相互作用に重要な IBB domain 残基
importin β 複合体のモデリング構造における IBB domain 残基の importin β との平均接触面積
(51.2 Å²) と各残基位置におけるファミリーメンバー間の接触面積の最大値と最小値の比
率とその中央値 (1.49) を計算し、相互作用に重要な IBB domain 残基をスクリーニングし
た。●: すべてのファミリーメンバーが平均以上の接触面積を持ち、接触面積の最大値と
最小値の比率が中央値未満の残基位置、○: 特定のファミリーメンバー間が平均以上の接
触面積を持つ一方、ファミリーメンバー間で接触面積に 2 倍以上差がある残基位置。鋳型
構造において IBB domain との相互作用がみられた importin β 残基を極性相互作用 (赤) と
疎水性相互作用 (紫) に分けて示した。モデリング構造において各 IBB domain 残基の近傍
(4Å 以内) に存在する importin β 残基は PyMol によって検出した。スクリーニングされた
残基の生物種間の保存度がファミリーメンバーごとに示されている。

3-3-6 核外移行複合体における IBB domain の界面解析

importin α の核外移行複合体において、IBB domain は CAS/CSE1 と二か所の結合部位を介して結合し、同時に自身の ARM repeat と二か所の結合部位を介して結合する。また IBB domain が ARM repeat と結合する際には、IBB domain の RXXR motif と KR (K) R motif が輸送基質の NLS と同様に ARM repeat と接触する(Matsuura & Stewart, 2004)。核外移行複合体において CAS あるいは ARM repeat と界面を形成する残基について共通項と違いを図 30 に示す。ファミリーメンバー間に共通した接触面積の大きい残基が、残基位置 13、15、27、28、31、36、38、39、40、44、45、49、50、51、52 で見つかリ、13R、28R、31R、38L、39R、40K、49K、51R、52N はすべてのコンセンサス配列に共通であった (図 30)。

残基位置 15、27、36、44、45、50 では、アミノ酸はコンセンサス配列ごとに異なっていたが、生化学的性質には共通点がみられた。15 位では、すべてのコンセンサス配列が中程度以上の親水性を持っていた (図 24)。36 位では、アミノ酸の生物種間の保存度は 60.4-97.3%であったが、すべてのコンセンサス配列において疎水性とかさ高さに関するスコアが高く、生物種間の変動も小さかった (図 24-26, 30)。44 位では、すべてのコンセンサス配列が酸性アミノ酸を持ち、アミノ酸自体の生物種間の保存度は 74.5-99.3%であったが、酸性度は高度に保存されていた (図 25, 30)。45 位では、いずれのコンセンサス配列も中程度以上の親水性を持っている (図 24)。今回の解析ではコンセンサス配列間で接触面積に大きな差はみられなかったが、この位置の近傍には ARM repeat のアルギニンが存在するため、グルタミン酸とアスパラギン酸が配置される場合、静電相互作用によって界面の形成が促進される可能性がある (図 30)。また、この位置の残基はいずれのコンセンサス配列においても生物種間で 81.3%以上保存されていた (図 30)。3-3-5 ですでに説明したように、50 位にはすべてのコンセンサス配列が塩基性アミノ酸を持ち、生物種間でも塩基性度は保存されている (図 25)。

残基位置 8、12、29、34 における CAS あるいは ARM repeat に対する接触面積にはファミリーメンバー間で違いがみられた。8 位では、サブタイプ 2 に属する cIBB2 と cIBB7 のアスパラギンとアスパラギン酸はグリシンよりも約 2 倍の接触面積を持つ (図 19A)。また、cIBB4 のリシンはさらにその倍の接触面積を持つが、非結合性及び静電相互作用エネルギーの観点では不利であり、水和エネルギーに特性があることが示唆される (図 20)。また、この残基位置の近傍には CAS のグルタミン酸が存在するため、正電荷によって静電相互作用が起こる可能性がある (図 30)。29 位は minor NLS binding site との相互作用に関与しており、cIBB1-6 の R29 の近傍には ARM repeat のグルタミン酸が存在することから、塩基性アミノ酸が界面の形成に有利であると考えられる (図 30)。また、cIBB1-6 の R29 の生物種間の保存度は 98.7-100% と非常に高い一方、cIBB7 の 29Q の保存度は 64.6% と低い (図 30)。34 位では、サブタイプ 1 に属する cIBB1、cIBB5、cIBB6 のグルタミン酸の CAS 及び ARM repeat に対する接触面積が他のコンセンサス配列よりも大きい (図 19A)。cIBB1、cIBB5、cIBB6 の 34E の近傍には CAS 及び ARM repeat のリシンが存在するため、酸性アミ

ノ酸は界面の形成に有利であると考えられる (図 30)。核外移行複合体に関してこれまでに、ヒトと酵母の importin α において図 19A の R39 に対応するアルギニンが酸性アミノ酸に置換されることにより、CAS との親和性が減少することが報告されている(Lange et al., 2020; Sun et al., 2013)。これは、今回の解析で明らかになった、CAS に対する R39 の接触面積が大きく、R39 がすべてのコンセンサス配列において保存されているという事実と一致する (図 19A)。

Criteria	Position	binding partner	Residues in close proximity in a binding partner previously reported	MAX/MIN	Residues in close proximity in a binding partner in the modeled structure							Conservation of amino acid in tested species						
					cIBB1	cIBB5	cIBB6	cIBB3	cIBB4	cIBB2	cIBB7	cIBB1	cIBB5	cIBB6	cIBB3	cIBB4	cIBB2	cIBB7
●	13	CAS	F117 L157 E166	1.411	R120 F123 P124 E163 E172	F123 P124 E163 E172	R120 F123 P124 E163 E172	R120 F123 P124 E163 E172	R120 F123 P124 E163 E172	R120 F123 P124 E163 E172	R120 F123 P124 E163 E172	98.1	100	98.8	88.7	81.1	97.9	93.8
	28	ARM repeat	S412 A370	1.055	V324 T325 G326 D329 T331 N384 A367 C369 D372 D283 R318 N322 E357 W360	V325 T328 G327 D329 T332 N385 A368 C369 D373 D284 R319 N323 E358 W361	V322 T323 G324 D326 T329 N382 A365 C366 D370 D277 R306 N310 E345 W348	V312 T313 G314 D316 T319 N352 A355 C356 D360 D271 R306 N310 E345 W348	V312 T313 G314 D316 T319 N352 A355 C356 D360 D271 R306 N310 E345 W348	V319 T320 G321 D323 T326 N359 A353 C354 D278 R313 N317 E352 W355	V310 T311 G312 D314 T317 N350 A353 C354 D289 R304 N308 E343 W346	100	100	100	96.8	100	95.7	99.0
	31	ARM repeat	G287	1.074	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	100	98.7	100	97.6	99.3	99.5	96.9
	38	CAS	-	1.092	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	W170 I73 K174 L177 P228 E229	100	98.7	99.2	97.6	100	98.9	99.0
	39	CAS	F194 H167 E223	1.251	D226 L227 E232 Y282 E285	D226 L227 Y282 E284 E285	D226 L227 Y282 E284 E285	D226 L227 Y282 E285	D226 L227 Y282 E285	D226 L227 Y282 E285	D226 L227 Y282 E284 E285	100	100	100	96.8	99.3	100	100
	39	ARM repeat	-	-	-	-	-	-	-	-	K390 K381	-	-	-	-	-	-	-
	40	CAS	H67 D220 D279	1.033	E229 E232 D233	E229 E232 D233	E229 E232 D233	E229 E232 D233	E229 E232 D233	E229 E232 D233	E229 E232 D233	100	100	100	96.8	99.3	93.8	100
	49	ARM repeat	N241 W237	1.020	A156 S156 G157 N158 T162 N195 D199 W234	A156 G158 T159 T163 N196 D200 W235	A156 G157 T158 T163 N196 D200 W235	A143 S144 G145 T146 T150N183 D187	A143 S144 G145 T146 T150 N183 D187	A146 S147 G148 T149 T153 N186 D190 W229	A141 S142 G143 T144 T148 N181 D185 W220	96.3	96.7	98.4	99.2	100	96.3	99.0
	51	ARM repeat	D276 W237 N199 W195 L177	1.201	L110 P114 P116 N153 S156 G157 W191	L111 P115 P117 N154 S157 W192 W191	L111 P115 P117 N154 S157 W192	S144 G145 W179	S143 W179	L102 P108 N144	L97 Q99 P103 N139	95.0	93.3	98.4	99.2	100	99.0	99.0
	52	ARM repeat	S180 N157 I123 P121 R117 L115 F158	1.148	S111 W149 N153 Q189 W191	S112 W150 N154 Q189 W192	A153 S154 G155 T156 T160 N193 D197 W232	S100 W137 N141 Q176 W179	S100 W137 N141 Q176 W179	S103 W140 N144 Q179 W182	S98 W135 N139 Q174 W177	96.3	92.0	98.0	93.5	98.6	96.3	90.6
	52	CAS	H162 E163	1.412	H162 E163	H162 E163	H162 E163	H162 E163	H162 E163	H162 E163	H162 F164	93.2	92.0	71.1	84.7	81.8	58.8	68.8
	52	ARM repeat	K496 D495 N494	-	R10 Y14 K15 Q490	R13 Y17 K18 N19 N490 Q491	R13 Y17 K18 N19 N487 Q488	R11 F15 K16 N17 N470 E471 D472	R11 F15 K16 N17 N470 E471 D472	R11 F15 K16 N17 N479 S481	E9 R10 F14 K15 Y16 N470	-	-	-	-	-	-	-
	27	ARM repeat	-	1.398	P21 D22 R26 A367 N406 S409	Q25 R29 A368 N407 S410	E25 R29 A365 N404 S407	W390 N394 I397	W390 N394 I397	T23 R27 A362 N401 S404	A21 S22 Q26 A353 N392 T395 D431	96.9	97.3	96.4	87.9	97.3	53.5	59.4
	36	CAS	-	1.247	N167 W170 T171	N167 W170 T171	N167 W170 T171	N167 W170 T171	N167 W170 T171 K174	N167 W170 T171 K174	N167 W170 T171	96.9	96.7	96.4	75.0	96.6	97.3	60.4
	44	ARM repeat	-	1.204	K39 W276 S353	K42 Q46 W277 S354	K42 W274 S351	K40 H44 W284 R306 K341	K40 W284 R306 K341	K41 Q44 W271 T308 R313 N348	K39 Q43 W262 T300 R304	74.5	99.3	97.6	91.1	91.9	96.8	90.6
45	ARM repeat	-	1.315	R40 L44 R241 W276	R43 L47 R242 W277	R43 L47 R239 W274	R41 L45 R229 W284	R41 L45 R229 W284	R41 M45 R236 W271	K40 A44 R227 W262 Y266	100	97.3	96.4	91.1	97.3	81.3	99.0	
50	ARM repeat	D203 T166	1.419	Q43 S156 W191 N195 W234 D273	Q46 N52 S157 W192 N196 W235 D274	Q46 S154 W189 N195 W232 D271	N50 S144 W179 N185 N219 W222	H44 N50 S144 W179 N183 W222 D261	Q44 S147 W182 N186 W229 D268	N49 S142 W177 D199 E80 E121	95.0	92.0	100	91.9	98.0	93.6	96.9	
○	8	CAS	E72 N73 G74	4.470	R75 R120 E121	R75 R120 E121	R75 E121	R75 E121	R75 I67 W77 E78 D79 E80 R120 E121	R75 I67 W77 E78 D79 R120 E121	R75 I67 W77 E78 D79 E80 E121	91.9	84.0	57.8	66.9	85.1	70.6	41.7
	12	CAS	E162 L163 E166	2.218	S168 E168	P124 E163 S166 E168 L169 E172	P124 E163 S166 E168 L169 E172	E163 S166 E168 L169	E163 S166 E168	E163 S166 E168	S168 E168 L169	70.2	84.0	92.8	83.9	80.4	46.0	74.0
	29	ARM repeat	T334 D331 W327	2.389	M24 E30 T325 W360 S363 N364 E399 W402	M27 E33 T326 W361 S364 N365 E400 W403	M27 E33 T323 W359 S361 N362 E397 W400	M25 E31 T313 W348 S351 N352 E387 W390	M25 E31 T313 W348 S351 N352 E387 W390	M25 E31 T320 W355 S356 N359 E384 W397	R24 R28 A30 T311 W346 N350	98.8	99.3	100	99.2	98.6	98.9	64.6
	34	CAS	-	2.032	K165 S166 N167	K165 S166 N167	K165 S166 N167	N167	N167	N167	N167	96.9	96.7	99.2	89.5	96.6	89.8	86.5
34	ARM repeat	-	-	E29 L33 Q34 K439	E32 I36 Q37 K439	E32 I36 Q37 K439	N30 V34	N30 V34	I30 V34	I29 L33	-	-	-	-	-	-	-	

図 30 核外移行複合体における CAS 及び ARM repeat との相互作用に重要な IBB domain 残基。核外移行複合体のモデリング構造における IBB domain 残基の CAS 及び ARM repeat との平均接触面積 (86.1 Å²) と各残基位置におけるファミリーメンバー間の接触面積の最大値と最小値の比率とその中央値 (1.42) を計算し、相互作用に重要な IBB domain 残基をスクリーニングした。●: すべてのファミリーメンバーが平均以上の接触面積を持ち、接触面積の最大値と最小値の比率が中央値未満の残基位置、○: 特定のファミリーメンバー間が平均以上の接触面積を持つ、ファミリーメンバー間で接触面積に 2 倍以上差がある残基位置。鋳型構造において IBB domain との相互作用がみられた importin β 残基を極性相互作用 (赤) と疎水性相互作用 (紫) に分けて示した。モデリング構造において各 IBB domain 残基の近傍 (4Å 以内) に存在する CAS 残基あるいは ARM repeat 残基は PyMol によって検出した。スクリーニングされた残基の生物種間の保存度がファミリーメンバーごとに示されている。

3-3-7 自己阻害における IBB domain の界面解析

importin α 単量体の自己阻害では、IBB domain の KRR motif が ARM repeat の major NLS binding site に結合する (Kobe, 1999)。今回の解析により、残基位置 44、46、49、51、52 においてすべての IBB domain コンセンサス配列が ARM repeat に対して比較的大きな接触面積を持つことが明らかとなった (図 19A, 30)。また、49K、51R、52N はコンセンサス配列間で共通であった。49K 及び 52N は、核外移行複合体における ARM repeat との界面、51R は importin β 及び核外移行複合体における ARM repeat との界面としても重要であり、49K、51R、52N は生物種間でそれぞれ 96.3-100%、93.3-100%、90.6-98.6% 保存されていた (図 29-31)。44 位と 46 位の残基はコンセンサス配列間で異なっていたが、前述のようにいずれのコンセンサス配列も 44 位に酸性アミノ酸が配置されていた (図 24)。44 位の近傍には ARM repeat の塩基性アミノ酸が存在するため、静電相互作用のためにこの残基位置に酸性アミノ酸が進化上保存された可能性がある (図 31)。46 位に関しては、中程度の親水性とかさ高さが IBB domain コンセンサス配列間で揃っており、残基自体は生物種間で 89.5-99.6% 保存されていた (図 31)。importin α 単量体における自己阻害型では、45 位に位置する残基の ARM repeat に対する接触面積がコンセンサス配列間で大きく異なっていた (図 19A, 30)。この残基位置に配置されたグルタミン酸は生物種間で 91.1-100% 保存されており、界面形成においてグルタミン酸に対する選択圧が存在する可能性がある (図 30)。

出芽酵母の importin α における K54 と R55 (図 19A の K49 と R50 に対応) の変異は自己阻害を減少させ、特に K54 の置換による効果が顕著であることが報告されている (Harreman, Cohen, et al., 2003)。この効果は同じ塩基性アミノ酸であるアルギニンに置換しても観察されており、この残基位置における相互作用がリシン特異的であることが示唆されている。このような知見は、それらの残基が ARM repeat に対して大きな接触面積を持つという今回の結果と一致する (図 19A)。さらに、IBB domain コンセンサス配列間に共通してみられた K49 から R52 までの連続した大きな接触領域の存在は、この領域における相互作用が協調的かつ選択的であることを示唆する (図 19A)。

importin β 複合体、核外移行複合体、自己阻害型において結合パートナーとの相互作用に重要と予測された IBB domain 残基を図 32A, B にまとめた。

ヒトの importin α において、RXXR motif として RRQR を持つ KPNA4 が RRRR を持つ KPNA2 より自己阻害が弱いことが報告されている (Pumroy et al., 2015)。また、ヒトの KPNA4 に加えて、RRRR motif あるいは KRR motif を持たないヒトの KPNA7 (Oostdyk et al., 2019)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) (Dey & Patankar, 2018)、トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) (Bhatti & Sullivan, 2005)、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) (Hübner et al., 1999) の importin α も自己阻害が弱いことが示唆されている。これらの報告は、RRRR motif 及び KRR motif が ARM repeat との大きな接触領域を持つという今回の解析結果と一致する (図 32B)。核外移行複合体において、IBB domain は ARM repeat に対して自己阻害型と同様の位置を占めると予測されるが、cIBB3、cIBB4、cIBB7 の RXXR motif の中央部分に位置

する H あるいは Q は、同じ位置に R を持つ他のコンセンサス配列よりも接触面積が小さいことが今回の解析で推定された (図 32B)。29R が Q に、30R が H に置換された場合、それぞれ非結合相互作用、静電相互作用、水和エネルギーと静電相互作用、水和エネルギーがそれぞれ大きく影響を受けると予想され、KPNA7 では、RXXR motif の 2 番目の Q が 3 番目の Q よりも自己阻害の抑制に大きな影響を与えていると考えられる (図 20, 32B)。実際、ヒトの KPNA7 の自己阻害は弱く、IBB domain が ARM repeat から離れた open state をとることが示唆されており、KPNA7 は CAS との親和性も低いことが示されている (Oostdyk et al., 2019)。逆にヒトの KPNA7 はヒトの KPNA2 よりも importin β との親和性が高いことが示されているが、IBB domain 自体の importin β に対する親和性には差がみられないことも報告されている (Oostdyk et al., 2019)。これらの報告は、核外移行において、cIBB7 の minor NLS binding site に対する接触面積が他のファミリーメンバーと比較して小さい一方、RXXR motif の中央部分に位置する残基は importin β 結合には関与する可能性が低いという今回の解析結果と一致している (図 32B)。

自己阻害において KR (K) R motif は ARM repeat の major NLS binding site に対して大きな接触面積を持つ。KR (K) R motif の中央に K を持つ cIBB3 は他のファミリーメンバーよりも約 50 \AA^2 ほど接触面積が小さく、水和エネルギーは不利になると予測された (図 19A, 20)。これは KRR motif 中央の R の置換が自己阻害に影響を与えることを示した以前の研究に関連している可能性がある (Harreman, Cohen, et al., 2003)。

Criteria	Position	Residues in close proximity in a binding partner previously reported	MAX/MIN	Residues in close proximity in a binding partner in the modeled structure							Conservation of amino acid in tested species						
				cIBB1	cIBB5	cIBB6	cIBB3	cIBB4	cIBB2	cIBB7	cIBB1	cIBB5	cIBB6	cIBB3	cIBB4	cIBB2	cIBB7
●	49	G150 T151 D192	1.0597698	A155 S156 G157 S158 T162 N195 D199 W234	A156 S157 G158 T159 F160 T163	A153 S154 G155 T156 S157 T160 N193 D197 W232	A143 S144 G145 T146 S147 T150 N183 D187 W222	A143 S144 G145 T146 S147 T150 N183 D187 W222	A146 S147 G148 T149 S150 T153 N186 D190	A153 S154 G155 T156 S157 T160 N193 D197 W232	96.3	96.7	98.4	99.2	100	96.3	99.0
	51	L104 R106 E107	1.1462509	L110 S111 K112 E113 P116 N153 S156 W191	L111 K113 E114 P117 N154 S157 W192	L108 S109 K110 E111 P114 N151 S154 W189	L99 S100 S101 D102 P105 N141 S144W179	L99 S100 S101 D102 P105 N141 S144 W179	L102 S103 R104 E105 P108 N144 S147 W182	L108 S109 K110 E111 P114 N151 S154	95.0	93.3	98.4	99.2	100	100	99.0
	52	S105 N146	1.2119613	S111 W149 N153 Q188 W191	S112 W150 N154 Q189 W192	S99 W147 N151 Q186 W189	S60 S100 W137 N141 Q176 W179	S100 W137 N141 Q176 W179	S103 W140 N144 Q179 W182	S109 W147 N151 Q186 W189	96.3	92.0	98.0	93.5	98.6	96.3	90.6
	44	-	1.382716	Q43 W276 S314 R318 S353	Q46 W277 S315 R319 S354	Q46 W274 R316	H44 W264 R306 K341	H44 R306 K341	Q44 W271 R313	Q43 W262 R304	74.5	99.3	97.6	91.1	91.9	96.8	90.6
	46	R238 S234 D270 Y277	1.1538974	E41 F45 S237 R241 D273 W276 Y280	E44 F48 S238 R242 D274 W277 Y281	E44 F48 S235 R239 D271 W274 Y278	D42 L46 W222 V225 R229 D261 W264 Y268	D42 L46 W222 V225 R229 D261 W264 Y268	D42 L46 W229 S232 R236 D268 W271 Y275	D41 L45 S223 R227 D259 W262 Y266	99.4	97.3	99.6	89.5	92.6	92.5	96.9
○	45	-	9.1517857	L44 W276 S314	L47 W277 S315	L47	L45 W264 T302 K341	L45 W264 T302 K341	M45	A44 W262 N297 T300	100	97.3	96.4	91.1	97.3	81.3	99.0

図 31 自己阻害型における ARM repeat との相互作用に重要な IBB domain 残基

自己阻害型のモデリング構造における IBB domain 残基の ARM repeat との平均接触面積 (98.8 \AA^2) と各残基位置におけるファミリーメンバー間の接触面積の最大値と最小値の比率とその中央値 (1.38) を計算し、相互作用に重要な IBB domain 残基をスクリーニングした。●: すべてのファミリーメンバーが平均以上の接触面積を持ち、接触面積の最大値と最小値の比率が中央値未満の残基位置、○: 特定のファミリーメンバー間が平均以上の接触面積を持つ一方、ファミリーメンバー間で接触面積に 2 倍以上差がある残基位置。鋳型構造において IBB domain との相互作用がみられた importin β 残基を極性相互作用 (赤) と疎水性相互作用 (紫) に分けて示した。モデリング構造において各 IBB domain 残基の近傍 (4\AA 以内) に存在する ARM repeat 残基は PyMol によって検出した。スクリーニングされた残基の生物種間の保存度がファミリーメンバーごとに示されている。

図 32 結合パートナーとの相互作用に重要な IBB domain 残基

(A) importin β 複合体における importin β (I)、核外移行複合体における CAS 及び ARM repeat (II)、自己阻害型における ARM repeat (III) との相互作用において、ファミリーメンバー間に共通して重要な残基位置 (緑) とファミリーメンバー間に違いを生み出す残基位置 (マゼンダ) を予測し、cIBB1 のモデリング構造にマッピングしてスティックモデルで示した。左図に複合体構造、右図に拡大した cIBB1 構造を示す。(B) importin β 複合体における importin β (I)、核外移行複合体における CAS 及び ARM repeat (II)、CAS (IIa)、ARM repeat (IIb)、自己阻害型における ARM repeat (III) との接触面積に基づき、各残基位置を次の規則で色付けした。灰色: すべてのファミリーメンバーに共通して重要であると予測された残基位置、赤、薄茶色、青: ファミリーメンバー間に違いを生み出す可能性のある残基 (接触面積が大きい残基、中間の残基、小さい残基をそれぞれ赤、薄茶色、青で色分けした)、アイボリー: いずれかのファミリーメンバーが大きな接触面積を持つ残基位置、白: いずれのファミリーメンバーにおいても接触面積が小さい残基位置。また、鋳型構造において欠落していた残基位置の残基の文字を薄い灰色で示した。接触面積に基づいた残基位置の重要性に関するスクリーニング方法は実験方法に記載した。

3-3-8 各結合パートナーに対する IBB domain の界面比較

3つの機能構造において結合パートナーとの相互作用に寄与する IBB domain 残基は互いに重複して複雑に配置されている (図 32B) また、前述の通り、今回解析した3つの機能複合体における IBB domain の構造は互いに異なる (図 28, 32A)。importin β と結合する際には、IBB domain の一部は α ヘリックスを形成し、保存された塩基性残基の多くが importin β の酸性残基に囲まれたヘリックスの片側に集中し、大きな接触面となる。また、核外移行複合体の形成により、IBB domain のペプチド主鎖は完全に異なる二面角に変化する。さらに、核外移行複合体では、CAS との接触面と ARM repeat との接触面が交互に IBB domain 上に配置され、IBB domain は CAS と ARM の間で両面テープのように機能する (図 19A)。CAS との接触面と ARM との接触面が切り替わる部位ではサブタイプ 1 にみられる 32EEE やコンセンサス配列に共通する 42KR (K) など、同じ電荷が隣接する部位がある。このような部位では、電荷の反発により、側鎖が互いに離れる方向に移動し、IBB domain は本質的に上記の両面テープのようなコンフォメーションを採用する可能性がある。したがって、IBB domain は長い領域にわたってヘリックス形成能を保持すると同時に、伸長して一定の間隔で側鎖の配向を逆転させる能力、及びそれらのコンフォメーションの切り換えを可能にする全体的な親水性を保持する (図 24, 25)。これらの性質は IBB domain がカメレオン配列として機能するために不可欠であると考えられ、今回の結果は、これらの性質のすべてが進化的に絶妙に保存されていることを示す。

次に、ファミリーメンバー間での各相互作用の類似性を調べるために、各構造の接触面積に基づき、IBB domain コンセンサス配列間のクラスタリング解析を行った。importin β との接触面積の分布パターンは、従来のサブタイプ分類である、cIBB1、5、6、cIBB 3、4、cIBB2、7 の3つのグループに分かれ、核外移行複合体については、近隣結合法によって推測された IBB domain コンセンサス配列の一次配列の系統樹と同様に分かれた (図 33A)。一方、自己阻害における接触面積の分布パターンは、importin α の従来のサブタイプ分類とも、一次配列の系統樹とも相関しなかった (図 33A)。このように接触面積の分布パターンがそれぞれ従来のサブタイプ分類あるいは一次配列の系統樹と異なるという事実は、より厳密な相互作用モードが保存されていることを示唆する。

さらに、結合パートナーとの相互作用ごとファミリーメンバー間に違いをもたらす要素があるという事実は、相互作用間のバランス調節において複雑な個性を生み出す可能性がある。例えば、importin α 単量体の自己阻害型と核外移行複合体において適用される自己阻害型は同じであると見なされることがよくあるが、今回の解析結果は、IBB domain のこれらの界面に実際には違いがある可能性を示唆し、それはファミリーメンバー間でも異なる。核輸送プロセスにおいて、IBB domain はそのコンフォメーションを自己阻害型から核外移行複合体に切り替える必要があると考えられるが、その際に IBB domain と major NLS binding site との相互作用が一度解放されるかどうかは明らかではない。しかし、今回の解析結果は複合体における各ファミリーメンバーの IBB domain の結合モードの違いが自己阻

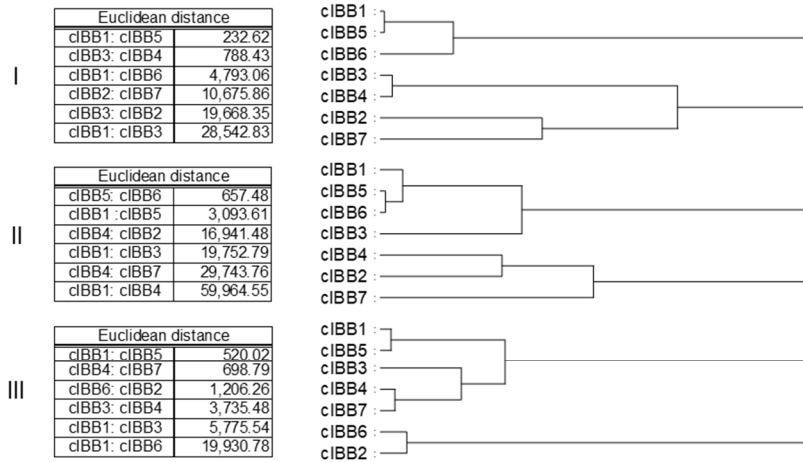
害型あるいは核外移行複合体の切り換え効率の違いにつながる可能性を示唆し、それは importin α のリサイクルにも影響を与えると考えられる。

結合パートナーに対するファミリーメンバー間の相互作用の違いは、第 2 章で示した DNA 以外にも、Rbbp4(Tsujii et al., 2015)などの他の結合パートナーでも報告されている。さらに、importin α は複数の細胞内イベントで重要な役割を果たしているため(Oka & Yoneda, 2018)、未知の結合パートナーが存在する可能性がある。今回明らかとなったファミリーメンバー間の違いは、そのような結合パートナーが関与する機能間の競合や切り替えに影響を与える可能性がある。

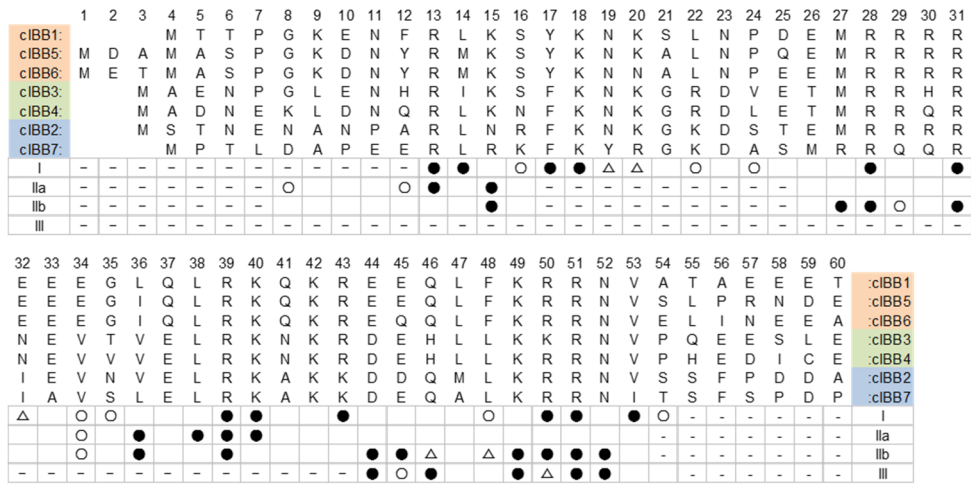
これまでに知られていた IBB domain の機能に重要な 3 つの塩基性クラスターに加えて、この解析では、機能構造ごとに重要あるいはファミリーメンバーを特徴付ける残基及び生化学的性質を特定した (図 33B)。一方、興味深いことに、このような重要な残基を持たない生物種が配列セットに見つかった。例えば、39 位のアルギニンは KPNA1、KPNA2、KPNA5、KPNA6、KPNA7 の配列セットに含まれる生物種間で 100% 保存されている一方、トラフグ (*Takifugu rubripes*) の KPNA3 とゾウギンザメ (*Callorhinchus milii*) の KPNA4 は 39 位にそれぞれ D と Q を持つ。特にトラフグの KPNA3 における、D への置換は ARM repeat に対して静電的に反発を引き起こす可能性があるため、CAS との結合が阻害される可能性がある。

また今回の解析では、3 つの機能構造いずれにおいても界面形成への関与が少ないと予測された残基位置も明らかとなった (図 33C)。さらに、サブタイプ 2 に属する KPNA2 と KPNA7 を除いて、それらに位置する残基のほとんどが生物種間で 80% 以上保存されていた。例えば、K42 はすべての IBB domain コンセンサス配列に含まれており、生物種間で高度に保存されている。この残基は、DNA および Rbbp4(Tsujii et al., 2015)への結合に関与すると予測されており、それらの機能に重要である可能性がある。さらに、21 位では、ファミリーメンバー間で残基は異なっていたが、いずれかのファミリーメンバーにおいてもかさが小さい残基が配置されていた (図 24)。また、23 位と 37 位では、サブタイプ 3 とサブタイプ 2 でのみ酸性アミノ酸が配置されており、ファミリーメンバーに個々の機能を与える特定の相互作用に重要である可能性がある。一方、KPNA2 及び KPNA7 のそのような残基位置については、一部の残基を除いて保存度が低かった (図 33C)。これらの結果は、今回解析した 3 つの機能以外の機能を維持するために、IBB domain に進化的淘汰圧があり、そのような機能の一部では、KPNA2 と KPNA7 の淘汰圧が著しく弱いことを示唆する。これは、KPNA2 と KPNA7、特に保存された残基が少ない KPNA7 が、これらの余分な機能の一部を失い、限られた数の機能のみに特化している可能性があることを示唆する。

A



B



C

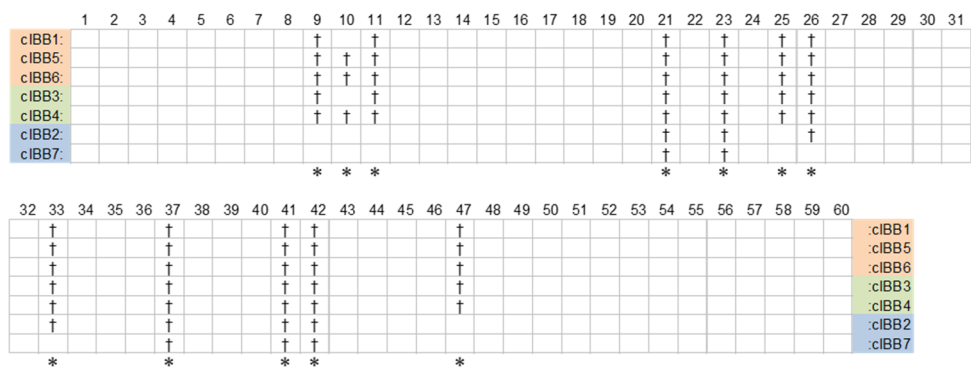


図 33 結合パートナーに対する IBB domain の界面パターン比較

(A) importin β 複合体における importin β (I)、核外移行複合体における CAS と ARM repeat (II)、自己阻害型における ARM repeat (III) に対する IBB domain コンセンサス配列の各残基の接触面積から計算された IBB domain コンセンサス配列間のユークリッド距離。デンドログラムはユークリッド距離を基に作成された。(B) importin β 複合体における importin β (I)、核外移行複合体における CAS (IIa) と ARM repeat (IIb)、自己阻害型における ARM repeat (III) との相互作用において重要な残基位置。●: すべてのファミリーメンバーに共通して重要であると予測された残基位置、○: ファミリーメンバー間に違いを生み出す可能性のある残基、△: いずれかのファミリーメンバーが大きな接触面積を持つ残基位置、-: 鋳型構造における欠落部位。接触面積に基づいた残基位置の重要性に関するスクリーニング方法は実験方法に記載した。(C) 今回解析したいずれの機能構造においても結合パートナーとの接触面積がすべてのファミリーメンバーで小さい残基位置を*で示した。さらに、そのような残基位置において生物種間で 80%以上保存されている残基を†で示した。

第4章 総括

本研究では細胞活動における importin α の役割の体系的な理解を目的に、未知であったクロマチン結合機能の分子メカニズムと importin α の機能制御に関わる IBB domain の生化学的性質を解析した。

第2章では、importin $\alpha 2$ が IBB domain 内の核酸結合ドメインを介してゲノム DNA の多数の領域に直接結合することを明らかにした。また、importin $\alpha 2$ と DNA の結合は、マルチモーダル、静電的、中程度の強度、半特異的であることが明らかとなった。さらに、NLS 輸送基質は importin $\alpha 2$ によって DNA 上に誘導されることを示した。第3章では、進化的に保存された各ファミリーメンバーの IBB domain 残基の生化学的性質を明らかにし、カメレオン配列としての IBB domain の特徴を示した。さらに、核輸送プロセスにおける各相互作用への残基の寄与を接触面積の観点から評価することにより、相互作用ごとに重要な残基及び生化学的性質を区別した。その結果、相互作用ごとにファミリーメンバー間の違いとその要因となる残基が示唆された。

DNA 結合タンパク質の一部は、拡散で律速される運動から推定されるよりも効率的に膨大なゲノム領域から特定の標的領域に結合することが知られており、DNA 結合タンパク質は DNA 上でのスライディングやホッピング、ジャンピングといった運動による促進拡散を介して標的領域の探索を行うと考えられている(Berg et al., 1981; Halford & Marko, 2004; Normanno et al., 2015; Schmidt et al., 2014; Von Hippel & Berg, 1989)。一方、DNA 結合タンパク質ごとに標的領域の探索運動は異なる(Cuculis et al., 2016; Kamagata et al., 2020; Kang et al., 2021; Sternberg et al., 2014; Subekti et al., 2020; Wang et al., 2006)。今回得られた知見から、importin α は輸送基質である DNA 結合タンパク質と同時に 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、DNA 結合タンパク質と共役した importin α の促進拡散メカニズムの解明が様々な DNA 結合タンパク質の新たな標的領域探索機構及び遺伝子制御機構のクライテリアの確立につながることを期待される。

importin α は細胞全体で様々な機能を持つ多機能性タンパク質である。そのため、importin α の細胞内局在は機能を調節するうえで重要な要因となる。実際に、精子形成(Mackmull et al., 2017)や幹細胞分化(Yasuhara & Yoneda, 2017)、ストレス応答(Furuta et al., 2004; Kodiha et al., 2004; Miyamoto et al., 2004; Yasuda et al., 2012)などの細胞活動の特定の段階において importin α ファミリーメンバーの核局在化が観察されており、importin α の細胞内局在の不均一性は生理学的機能の調節メカニズムの一部であると考えられている。今回新たに、importin α の核酸結合ドメインが IBB domain 内に含まれることが明らかとなり、importin $\alpha 2$ は IBB domain による DNA 結合を介して核内に保持されることが示された。そのため、IBB domain は複数の結合パートナーと相互作用することにより、importin α の機能及び細胞内局在の制御において支配的な役割を担っている。しかし、単一の IBB domain が複数の結合パートナーと相互作用するため、細胞内において importin α がもたらす作用を特

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及び生化学的性質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が期待される。

本研究では、ファミリーメンバー間の複合体形成能力の違いの要因であると推定される残基が特定された。これまでに、importin α の輸送基質の選択性(Köhler et al., 1999; Pumroy & Cingolani, 2015)や、自己阻害(Oostdyk et al., 2019; Pumroy et al., 2015; Zienkiewicz et al., 2013)、核外移行複合体形成(Oostdyk et al., 2019)についてファミリーメンバー間の違いが報告されているが、一部を除いて詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。また、importin β の非存在下で、ヒトの KPNA4 は KPNA2 と KPNA6 と比較して Influenza A virus polymerase subunit PB2 の NLS と高い親和性で結合することが示されており、IBB domain 配列に加え、NLS の構造と ARM repeat の柔軟性が原因であることが示唆されている(Pumroy et al., 2015)。今後、ARM repeat についても同様の解析を行うことで、ファミリーメンバー間の機能の違いをもたらす分子メカニズムが明らかになると考える。今回の解析では、KPNA 遺伝子に絞って解析を行ったが、UniProt などのデータベース上で IBB domain の注釈がつけられているタンパク質には KPNA 遺伝子以外や未分類のものも含まれている。さらに、IBB 様 NLS は importin β 結合タンパク質(Lott & Cingolani, 2011)および importin α 結合タンパク質(Kralt et al., 2015)で同定されており、他にも未同定の IBB domain 様配列が多く存在する可能性がある(Lott & Cingolani, 2011)。この研究で得られた残基位置固有の生化学的性質とそ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、特定の残基及び生化学的性質が生物種またはファミリーメンバー間で強く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結合パートナーとの相互作用に対する寄与が小さいと予測される残基位置が見つかった。このような残基を解析することにより、IBB domain の新規結合パートナー及び importin α の新規機能の発見につながる可能性がある。

参考文献

- Bashford, D., & Case, D. A. (2000). Generalized Born Models of Macromolecular Solvation Effects. *Annual Review of Physical Chemistry*, 51(1), 129–152.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.51.1.129>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Coetzee, R., Cukura, A., Silva, A. Da, Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Castro, L. G., ... Zhang, J. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Dinola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684–3690.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
- Berg, O. G., Winter, R. B., & Von Hippel, P. H. (1981). Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory. *Biochemistry*, 20(24), 6929–6948.
<https://doi.org/10.1021/bi00527a028>
- BHASKARAN, R., & PONNUSWAMY, P. K. (2009). Positional flexibilities of amino acid residues in globular proteins. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 32(4), 241–255.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1988.tb01258.x>
- Bhatti, M. M., & Sullivan, W. J. (2005). Histone acetylase GCN5 enters the nucleus via importin- α in protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5902–5908.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M410656200>
- Bischoff, F. R., & Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, 354(6348), 80–82. <https://doi.org/10.1038/354080a0>
- Brackley, C. A., Cates, M. E., & Marenduzzo, D. (2013). Intracellular facilitated diffusion: Searchers, crowders, and blockers. *Physical Review Letters*, 111(10), 1–9.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.111.108101>
- Case D.A., B.R.M., Cerutti D.S., Cheatham III T.E., Darden T.A., Duke, R.E., G.T.J., Gohlke H., Goetz A.W., Homeyer N., Izadi S., Janowski P., Kaus J., K.A., Lee T.S., LeGrand S., Li P., Lin C., Luchko T., Luo R., Madej B., M.D., Merz K.M., Monard G., Nguyen H., Nguyen H.T., Omelyan, I., O.A., Roe D.R., Roitberg A., Sauci C., Simmerling C.L., Botello-Smith, W.M., S.J., Walker R.C., Wang J., Wolf R.M., Wu X., Xiao L. and Kollman and P.A. (2016) *AMBER*.
- Catimel, B., Teh, T., Fontes, M. R. M., Jennings, I. G., Jans, D. A., Howlett, G. J., Nice, E. C., & Kobe, B. (2001). Biophysical Characterization of Interactions Involving Importin- α during Nuclear Import. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 34189–34198.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103531200>
- Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer III, A. G. and Skelton, N. J. (1996) Protein NMR spectroscopy

principles and practice, Academic Press, San Diego, CA.

- Chan, C. K., & Jans, D. A. (1999). Synergy of importin α recognition and DNA binding by the yeast transcriptional activator GAL4. *FEBS Letters*, *462*(1–2), 221–224. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01515-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01515-X)
- Chang, C. W., Miguez Couñago, R. L., Williams, S. J., Bodén, M., & Kobe, B. (2013). Crystal structure of rice importin- α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. *Plant Cell*, *24*(12), 5074–5088. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104422>
- Cheng, J., Randall, A. Z., Sweredoski, M. J., & Baldi, P. (2005). SCRATCH: A protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Research*, *33*(SUPPL. 2), 72–76. <https://doi.org/10.1093/nar/gki396>
- Choi, H. W., Joo, J. Y., Hong, Y. J., Kim, J. S., Song, H., Lee, J. W., Wu, G., Schöler, H. R., & Do, J. T. (2016). Distinct Enhancer Activity of Oct4 in Naive and Primed Mouse Pluripotency. *Stem Cell Reports*, *7*(5), 911–926. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.09.012>
- Chou, P. Y., & Fasman, G. D. (2006). *Prediction of the Secondary Structure of Proteins from their Amino Acid Sequence* (pp. 45–148). <https://doi.org/10.1002/9780470122921.ch2>
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., & Müller, C. W. (1999). Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α . *Nature*, *399*(6733), 221–229. <https://doi.org/10.1038/20367>
- Cokol, M., Nair, R., & Rost, B. (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Reports*, *1*(5), 411–415. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd092>
- Conte, L. Lo, Chothia, C., & Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Molecular Biology*, *285*(5), 2177–2198. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2439>
- Conti, E., & Kuriyan, J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . *Structure*, *8*(3), 329–338. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00107-6)
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., & Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell*, *94*(2), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81419-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81419-1)
- Cuculis, L., Abil, Z., Zhao, H., & Schroeder, C. M. (2016). TALE proteins search DNA using a rotationally decoupled mechanism. *Nature Chemical Biology*, *12*(10), 831–837. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2152>
- Darden, T., York, D., & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, *98*(12), 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- Deléage, G., & Roux, B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. “*Protein Engineering, Design and Selection*,” *1*(4), 289–294. <https://doi.org/10.1093/protein/1.4.289>

- Dey, V., & Patankar, S. (2018). Molecular basis for the lack of auto-inhibition of *Plasmodium falciparum* importin α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(3), 1792–1797.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.115>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Floer, M., Blobel, G., & Rexach, M. (1997). Disassembly of RanGTP-karyopherin β complex, an intermediate in nuclear protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19538–19546.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19538>
- Fogolari, F., Maloku, O., Dongmo Fomthum, C. J., Corazza, A., & Esposito, G. (2018). PDB2ENTROPY and PDB2TRENT: Conformational and Translational–Rotational Entropy from Molecular Ensembles. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(7), 1319–1324.
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00143>
- Fontes, M. R. M., Teh, T., Jan, D., Brinkworth, R. I., & Kobe, B. (2003). Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27981–27987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303275200>
- Fontes, M. R. M., Teh, T., & Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α 1 Edited by K. Nagai. *Journal of Molecular Biology*, 297(5), 1183–1194. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3642>
- Friedrich, B., Quensel, C., Sommer, T., Hartmann, E., & Köhler, M. (2006). Nuclear Localization Signal and Protein Context both Mediate Importin α Specificity of Nuclear Import Substrates. *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), 8697–8709. <https://doi.org/10.1128/mcb.00708-06>
- Furuta, M., Kose, S., Koike, M., Shimi, T., Hiraoka, Y., Yoneda, Y., Haraguchi, T., & Imamoto, N. (2004). Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin α . *Genes to Cells*, 9(5), 429–441. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00734.x>
- Galazka, J. M., Klocko, A. D., Uesaka, M., Honda, S., Selker, E. U., & Freitag, M. (2016). *Neurospora* chromosomes are organized by blocks of importin α -dependent heterochromatin that are largely independent of H3K9me3. *Genome Research*, 26(8), 1069–1080.
<https://doi.org/10.1101/gr.203182.115>
- Gilchrist, D., Mykytka, B., & Rexach, M. (2002). Accelerating the rate of disassembly of karyopherin-cargo complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 18161–18172.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112306200>
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., & Izaurralde, E. (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *Journal of Cell Biology*, 138(1), 65–80.
<https://doi.org/10.1083/jcb.138.1.65>
- Görlich, D., & Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic Transport. *Science*, 271(5255), 1513–1519.
<https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1513>

- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, *18*(15), 2714–2723.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- Halford, S. E., & Marko, J. F. (2004). How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Research*, *32*(10), 3040–3052. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh624>
- Hannon, R., Richards, E. G., & Gould, H. J. (1986). Facilitated diffusion of a DNA binding protein on chromatin. *The EMBO Journal*, *5*(12), 3313–3319. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04645.x>
- Harreman, M. T., Cohen, P. E., Hodel, M. R., Truscott, G. J., Corbett, A. H., & Hodel, A. E. (2003). Characterization of the auto-inhibitory sequence within the N-terminal domain of importin α . *Journal of Biological Chemistry*, *278*(24), 21361–21369. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301114200>
- Harreman, M. T., Hodel, M. R., Fanara, P., Hodel, A. E., & Corbett, A. H. (2003). The auto-inhibitory function of importin α is essential in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(8), 5854–5863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210951200>
- Heinig, M., & Frishman, D. (2004). STRIDE: A web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Research*, *32*(WEB SERVER ISS.), 500–502. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh429>
- Henrick, K., & Thornton, J. M. (1998). PQS: A protein quaternary structure file server. *Trends in Biochemical Sciences*, *23*(9), 358–361. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01253-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01253-5)
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H., & Cullen, B. R. (1998). Determination of the functional domain organization of the importin α nuclear import factor. *Journal of Cell Biology*, *143*(2), 309–318. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.2.309>
- Hood, J. K., & Silver, P. A. (1998). Cse1p is required for export of Srp1p/importin- α from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(52), 35142–35146. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.35142>
- Huang, S. M., Huang, S. P., Wang, S. L., & Liu, P. Y. (2007). Importin $\alpha 1$ is involved in the nuclear localization of Zac1 and the induction of p21WAF1/CIP1 by Zac1. *Biochemical Journal*, *402*(2), 359–366. <https://doi.org/10.1042/BJ20061295>
- Hübner, S., Smith, H. M. S., Hu, W., Chan, C. K., Rihs, H. P., Paschal, B. M., Raikhel, N. V., & Jans, D. A. (1999). Plant importin α binds nuclear localization sequences with high affinity and can mediate nuclear import independent of importin β . *Journal of Biological Chemistry*, *274*(32), 22610–22617. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22610>
- Imamoto, N., Shimamoto, T., Takao, T., Tachibana, T., Kose, S., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., & Yoneda, Y. (1995). In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *EMBO Journal*, *14*(15), 3617–3626. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00031.x>

- Inase, A., Kodama, T. S., Sharif, J., Xu, V., Ayame, H., Sugiyama, H., & Iwai, S. (2004). Binding of distamycin A to UV-damaged DNA. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(35), 11017–11023. <https://doi.org/10.1021/ja048851k>
- Jayaram, B., McConnell, K., Dixit, S. B., Das, A., & Beveridge, D. L. (2002). Free-energy component analysis of 40 protein-DNA complexes: A consensus view on the thermodynamics of binding at the molecular level. *Journal of Computational Chemistry*, *23*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/jcc.10009>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kai, R., Ohtsubo, M., Sekiguchi, M., & Nishimoto, T. (1986). Molecular cloning of a human gene that regulates chromosome condensation and is essential for cell proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, *6*(6), 2027–2032. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.6.2027-2032.1986>
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., & Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, *311*(5981), 33–38. <https://doi.org/10.1038/311033a0>
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, *39*(3 PART 2), 499–509. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90457-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90457-4)
- Kamagata, K., Itoh, Y., & Subekti, D. R. G. (2020). How p53 molecules solve the target DNA search problem: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031031>
- Kang, W., Hwang, S., Kang, J. Y., Kang, C., & Hohng, S. (2021). Hopping and flipping of rna polymerase on dna during recycling for reinitiation after intrinsic termination in bacterial transcription. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms22052398>
- Kelley, J. B., Talley, A. M., Spencer, A., Gioeli, D., & Paschal, B. M. (2010). Karyopherin $\alpha 7$ (KPNA7), a divergent member of the importin α family of nuclear import receptors. *BMC Cell Biology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-63>
- Kimoto, C., Moriyama, T., Tsujii, A., Igarashi, Y., Obuse, C., Miyamoto, Y., Oka, M., & Yoneda, Y. (2015). Functional characterization of importin $\alpha 8$ as a classical nuclear localization signal receptor.

- Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(10), 2676–2683.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.017>
- Kinjo, A. R., Bekker, G. J., Suzuki, H., Tsuchiya, Y., Kawabata, T., Ikegawa, Y., & Nakamura, H. (2017). Protein Data Bank Japan (PDBj): Updated user interfaces, resource description framework, analysis tools for large structures. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D282–D288.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw962>
- Kinjo, A. R., Bekker, G. J., Wako, H., Endo, S., Tsuchiya, Y., Sato, H., Nishi, H., Kinoshita, K., Suzuki, H., Kawabata, T., Yokochi, M., Iwata, T., Kobayashi, N., Fujiwara, T., Kurisu, G., & Nakamura, H. (2018). New tools and functions in data-out activities at Protein Data Bank Japan (PDBj). *Protein Science*, 27(1), 95–102. <https://doi.org/10.1002/pro.3273>
- Klocko, A. D., Rountree, M. R., Grisafi, P. L., Hays, S. M., Adhvaryu, K. K., & Selker, E. U. (2015). Neurospora Importin α Is Required for Normal Heterochromatic Formation and DNA Methylation. *PLoS Genetics*, 11(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005083>
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nature Structural Biology*, 6(4), 388–397. <https://doi.org/10.1038/7625>
- Kodiha, M., Chu, A., Matusiewicz, N., & Stochaj, U. (2004). Multiple mechanisms promote the inhibition of classical nuclear import upon exposure to severe oxidative stress. *Cell Death and Differentiation*, 11(8), 862–874. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401432>
- Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D., & Hartmann, E. (1999). Evidence for Distinct Substrate Specificities of Importin α Family Members in Nuclear Protein Import. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7782–7791.
<https://doi.org/10.1128/mcb.19.11.7782>
- Kose, S., Furuta, M., & Imamoto, N. (2012). Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage. *Cell*, 149(3), 578–589.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.058>
- Kozakov, D., Li, K., Hall, D. R., Beglov, D., Zheng, J., Vakili, P., Schueler-furman, O., Paschalidis, I. C., Clore, G. M., & Vajda, S. (2014). Encounter complexes and dimensionality reduction in protein – protein association. 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.01370>
- Kralt, A., Jagalur, N. B., Van Den Boom, V., Lokareddy, R. K., Steen, A., Cingolani, G., Fornerod, M., & Veenhoff, L. M. (2015). Conservation of inner nuclear membrane targeting sequences in mammalian Pom121 and yeast Heh2 membrane proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 26(18), 3301–3312. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-03-0184>
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2007). Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), 774–797. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.

- <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kutay, U., Ralf Bischoff, F., Kostka, S., Kraft, R., & Görlich, D. (1997). Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, *90*(6), 1061–1071.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80372-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80372-4)
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, *157*(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lange, A., Fasken, M. B., Stewart, M., & Corbett, A. H. (2020). Dissecting the roles of Cse1 and Nup2 in classical NLS-cargo release in vivo. *Traffic*, *21*(10), 622–635. <https://doi.org/10.1111/tra.12759>
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . *Journal of Biological Chemistry*, *282*(8), 5101–5105. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600026200>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*(21), 2947–2948.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lee, S. J., Matsuura, Y., Liu, S. M., & Stewart, M. (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature*, *435*(7042), 693–696. <https://doi.org/10.1038/nature03578>
- Leven, I., & Levy, Y. (2019). *Quantifying the two-state facilitated diffusion model of protein – DNA interactions*. *47*(11), 5530–5538. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz308>
- Li, X., Sun, L., & Jin, Y. (2008). Identification of karyopherin- α 2 as an Oct4 associated protein. *Journal of Genetics and Genomics*, *35*(12), 723–728. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60227-1](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60227-1)
- Liao, J., He, Y., & Szabó, P. E. (2013). The Pou5f1 distal enhancer is sufficient to drive Pou5f1 promoter-EGFP expression in embryonic stem cells. *The International Journal of Developmental Biology*, *57*(9–10), 725–729. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120186ps>
- Lindsay, M. E., Plafker, K., Smith, A. E., Clurman, B. E., & Macara, I. G. (2002). Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin- α : β -mediated nuclear protein import. *Cell*, *110*(3), 349–360.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00836-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00836-X)
- Lott, K., & Cingolani, G. (2011). The importin β binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1813*(9), 1578–1592. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.012>
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
- Macke, T. J., & Case, D. A. (1997). Modeling Unusual Nucleic Acid Structures. *ACS Symposium Series*, 379–393. <https://doi.org/10.1021/bk-1998-0682.ch024>

- Mackmull, M., Klaus, B., Heinze, I., Chokkalingam, M., Beyer, A., Russell, R. B., Ori, A., & Beck, M. (2017). Landscape of nuclear transport receptor cargo specificity. *Molecular Systems Biology*, *13*(12), 962. <https://doi.org/10.15252/msb.20177608>
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Matsuura, Y., & Stewart, M. (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature*, *432*(7019), 872–877. <https://doi.org/10.1038/nature03144>
- Matsuura, Y., & Stewart, M. (2005). Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO Journal*, *24*(21), 3681–3689. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600843>
- Minor, D. L., & Kim, P. S. (1996). Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature*, *380*(6576), 730–734. <https://doi.org/10.1038/380730a0>
- Miyamoto, Y., Boag, P. R., Hime, G. R., & Loveland, K. L. (2012). Regulated nucleocytoplasmic transport during gametogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(6), 616–630. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.01.015>
- Miyamoto, Y., Hieda, M., Harreman, M. T., Fukumoto, M., Saiwaki, T., Hodel, A. E., Corbett, A. H., & Yoneda, Y. (2002). Importin α can migrate into the nucleus in an importin β - and Ran-independent manner. *EMBO Journal*, *21*(21), 5833–5842. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf569>
- Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., & Yoneda, Y. (2004). Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin α and cause a conventional nuclear import block. *Journal of Cell Biology*, *165*(5), 617–623. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312008>
- Miyamoto, Y., Yamada, K., & Yoneda, Y. (2016). Importin α : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. *Journal of Biochemistry*, *160*(2), 69–75. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw036>
- Mól, A. R., & Castro, M. S. (2018). NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. *BioRxiv*, 416347. <https://doi.org/10.1101/416347>
- Moriyama, T., Sangel, P., Yamaguchi, H., Obuse, C., Miyamoto, Y., Oka, M., & Yoneda, Y. (2015). Identification and characterization of a nuclear localization signal of TRIM28 that overlaps with the HP1 box. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *462*(3), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.108>
- Normanno, D., Boudarène, L., Dugast-Darzacq, C., Chen, J., Richter, C., Proux, F., Bénichou, O., Voituriez, R., Darzacq, X., & Dahan, M. (2015). Probing the target search of DNA-binding proteins in mammalian cells using TetR as model searcher. *Nature Communications*, *6*(1), 7357.

- <https://doi.org/10.1038/ncomms8357>
- Ogawa, Y., & Imamoto, N. (2018). Nuclear transport adapts to varying heat stress in a multistep mechanism. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2341–2352. <https://doi.org/10.1083/jcb.201712042>
- Oka, M., & Yoneda, Y. (2018). Importin α : Functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 94(7), 259–274. <https://doi.org/10.2183/pjab.94.018>
- Onufriev, A., Bashford, D., & Case, D. A. (2004). Exploring Protein Native States and Large-Scale Conformational Changes with a Modified Generalized Born Model. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 55(2), 383–394. <https://doi.org/10.1002/prot.20033>
- Oostdyk, L. T., McConnell, M. J., & Paschal, B. M. (2019). Characterization of the Importin- β binding domain in nuclear import receptor KPNA7. *Biochemical Journal*, 476(21), 3413–3434. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190717>
- Pumroy, R. A., & Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *Biochemical Journal*, 466(1), 13–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20141186>
- Pumroy, R. A., Ke, S., Hart, D. J., Zachariae, U., & Cingolani, G. (2015). Molecular determinants for nuclear import of influenza A PB2 by importin α isoforms 3 and 7. *Structure*, 23(2), 374–384. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.015>
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., & Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64(3), 615–623. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90245-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90245-T)
- Ruff, K. M., & Pappu, R. V. (2021). AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(20), 167208. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167208>
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3), 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sankhala, R. S., Lokareddy, R. K., Begum, S., Pumroy, R. A., Gillilan, R. E., & Cingolani, G. (2017). Three-dimensional context rather than NLS amino acid sequence determines importin α subtype specificity for RCC1. *Nature Communications*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01057-7>
- Schiffer, M., & Edmundson, A. B. (1967). Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential. *Biophysical Journal*, 7(2), 121–135. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)
- Schmidt, H. G., Sewitz, S., Andrews, S. S., & Lipkow, K. (2014). An integrated model of transcription

- factor diffusion shows the importance of intersegmental transfer and quaternary protein structure for target site finding. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108575>
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., & Yoneda, Y. (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO Journal*, 16(23), 7067–7077. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.7067>
- Sigrist, C. J. A., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 344–347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Slutsky, M., & Mirny, L. A. (2004). Kinetics of Protein-DNA Interaction : Facilitated Target Location in Sequence-Dependent Potential. *Biophysical Journal*, 87(6), 4021–4035. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050765>
- Solsbacher, J., Maurer, P., Bischoff, F. R., & Schlenstedt, G. (1998). Cse1p Is Involved in Export of Yeast Importin α from the Nucleus. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6805–6815. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.11.6805>
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johner, N., & Schwede, T. (2021). ProMod3 - A versatile homology modelling toolbox. *PLoS Computational Biology*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1008667>
- Subekti, D. R. G., Murata, A., Itoh, Y., Takahashi, S., & Kamagata, K. (2020). Transient binding and jumping dynamics of p53 along DNA revealed by sub-millisecond resolved single-molecule fluorescence tracking. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70763-y>
- Sun, C., Fu, G., Ciziene, D., Stewart, M., & Musser, S. M. (2013). Choreography of importin- α /CAS complex assembly and disassembly at nuclear pores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.1220610110>
- Tauler, R. (1995). Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30(1), 133–146. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00047-X)
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tsujii, A., Miyamoto, Y., Moriyama, T., Tsuchiya, Y., Obuse, C., Mizuguchi, K., Oka, M., & Yoneda, Y. (2015). Retinoblastoma-binding protein 4-regulated classical nuclear transport is involved in cellular senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29375–29388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.681908>

- Vetter, I. R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J., & Wittinghofer, A. (1999). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: Implications for nuclear transport. *Nature*, *398*(6722), 39–46. <https://doi.org/10.1038/17969>
- Von Hippel, P. H., & Berg, O. G. (1989). Facilitated target location in biological systems. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(2), 675–678. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)84994-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84994-3)
- Wang, Y. M., Austin, R. H., & Cox, E. C. (2006). Single molecule measurements of repressor protein 1D diffusion on DNA. *Physical Review Letters*, *97*(4), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.048302>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Williamson, M. P. (2013). Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *73*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.02.001>
- Yasuda, Y., Miyamoto, Y., Yamashiro, T., Asally, M., Masui, A., Wong, C., Loveland, K. L., & Yoneda, Y. (2012). Nuclear retention of importin α coordinates cell fate through changes in gene expression. *EMBO Journal*, *31*(1), 83–94. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.360>
- Yasuhara, N., Shibazaki, N., Tanaka, S., Nagai, M., Kamikawa, Y., Oe, S., Asally, M., Kamachi, Y., Kondoh, H., & Yoneda, Y. (2007). Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin- α . *Nature Cell Biology*, *9*(1), 72–79. <https://doi.org/10.1038/ncb1521>
- Yasuhara, N., & Yoneda, Y. (2017). Importins in the maintenance and lineage commitment of ES cells. *Neurochemistry International*, *105*, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.01.020>
- Yasuno, K., Yamazaki, T., Tanaka, Y., Kodama, T. S., Matsugami, A., Katahira, M., Ishihama, A., & Kyogoku, Y. (2001). Interaction of the C-terminal domain of the E. coli RNA polymerase α subunit with the UP element: recognizing the backbone structure in the minor groove surface. Edited by R. Ebright. *Journal of Molecular Biology*, *306*(2), 213–225. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4369>
- Young, J. C., Major, A. T., Miyamoto, Y., Loveland, K. L., & Jans, D. A. (2011). Distinct effects of importin $\alpha 2$ and $\alpha 4$ on Oct3/4 localization and expression in mouse embryonic stem cells. *The FASEB Journal*, *25*(11), 3958–3965. <https://doi.org/10.1096/fj.10-176941>
- Zgarbová, M., Šponer, J., Otyepka, M., Cheatham, T. E., Galindo-Murillo, R., & Jurečka, P. (2015). Refinement of the Sugar–Phosphate Backbone Torsion Beta for AMBER Force Fields Improves the Description of Z- and B-DNA. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(12), 5723–5736. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00716>
- Zienkiewicz, J., Armitage, A., & Hawiger, J. (2013). Targeting nuclear import shuttles, importins/karyopherins alpha by a peptide mimicking the NF κ B1/p50 nuclear localization sequence. *Journal of the American Heart Association*, *2*(5), 1–16.

<https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000386>

Zimmerman, J. M., Eliezer, N., & Simha, R. (1968). The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods. *Journal of Theoretical Biology*, 21(2), 170–201.

[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(68\)90069-6](https://doi.org/10.1016/0022-5193(68)90069-6)

ZUCKERKANDL, E., & PAULING, L. (1965). Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins.

In *Evolving Genes and Proteins* (pp. 97–166). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6>

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官として終始熱心なご指導を賜りました日本大学文理学部生命科学科 安原徳子准教授に心より感謝いたします。また、主査及び副査を快く引き受けてくださった日本大学文理学部生命科学科 澤田博司教授と岩本政明教授に深く感謝を申し上げます。

大阪大学蛋白質研究所機能構造計測学研究室 児玉高志先生には本研究を通して適切なお指導を賜り、CD スペクトル計測、NMR 解析にご協力いただきました。日本大学文理学部生命科学科 末永敦准教授と長嶋美咲さんには MD シミュレーションにご協力いただきました。理化学研究所環境資源科学研究センター環境代謝分析研究チーム 赤木謙一博士には NMR 解析にご協力いただきました。医薬基盤・健康・栄養研究所 米田悦啓理事長、大阪大学蛋白質研究所機能構造計測学研究室 藤原敏道教授、横浜国立大学大学院工学研究院機能の創生部門 児嶋長次郎教授、がん研究会がん研究所生がん物部 斉藤典子部長、Dr. Rashid Mehmood, Assistant Professor of Molecular Biology & Chair, Department of Life Sciences には本研究をまとめるにあたり適切なお助言をいただきました。ここに深く感謝いたします。

また、日本大学文理学部生命科学科 柴崎典子助手をはじめ、安原研究室のみなさまには本研究の遂行に多大なるご協力を頂きました。深くお礼申し上げます。

最後に、いつも応援してくれた家族に感謝いたします。