

## 特集：タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

## タンパク質の核内輸送機構の構造的基盤

清水 敏之, 佐藤 衛

核-細胞質間の生体高分子の物質輸送は核膜孔を通して行われるが、多くの場合輸送受容体を必要とする。タンパク質の核内輸送ではインポーチン $\beta$ ファミリーに属する輸送受容体が生化学的・構造生物学的によく研究されている。このファミリーに属するトランスポーチンは、よく知られている塩基性アミノ酸のクラスターからなる核局在化シグナルとは異なるシグナルを認識し輸送する。今回我々は、トランスポーチン単体の構造および複数の基質との複合体構造解析に成功し、トランスポーチンの構造の柔軟性、二箇所の認識サイトの存在ならびに基質の認識様式を原子レベルで明らかにした。今回の構造解析の結果、二段階で基質を認識する機構やトランスポーチンに特徴的なループによる基質解離機構を提唱することが可能になった。

## 1. はじめに

真核生物の細胞では、核と細胞質は核膜によって隔てられている。したがって、DNAの複製・修飾・修復・転写に関与するタンパク質やヌクレオソームを構成するヒストンや各種ヒストン修飾酵素などの核内タンパク質は細胞質で合成された後、核内に輸送される。このように核-細胞質間の物質輸送は遺伝子の発現や調節など機能的に重要な役割を担っており、生体内のプロセスのなかでもその重要性はきわめて高い。核と細胞質を隔てる核膜は外膜と内膜の脂質二重層から構成されているが、そこにはそれを貫くように核膜孔複合体(NPC:nuclear pore complex)と呼ばれる巨大タンパク質複合体が存在している。分子量約30K以下の小さな分子は核膜孔複合体内部に存在するチャンネルを通過して拡散により核-細胞質間を自由に移動できるが、それ以上の大きさのタンパク質などの巨大分子はNPCの内部チャンネルを自由に移動することはできない<sup>1,2)</sup>。このようなタンパク質分子は分子内に核内タンパク質であること

を示す核局在化シグナル(NLS:nuclear localization signal)をもち、これを核内輸送受容体と呼ばれるタンパク質が認識して複合体を形成し、この状態でNPCと相互作用しながら核膜を通過する。

このような核内輸送受容体はいくつかのファミリーを形成しているが、その多くはインポーチン $\beta$ ファミリーの核内輸送受容体が担っている。このファミリーに属するメンバーにはこのような核内輸送受容体の他に、核から細胞質への物質輸送に関与する核外輸送受容体や核-細胞質間をシャトル輸送する受容体も含まれている<sup>3)</sup>。インポーチン $\beta$ ファミリーの核内輸送受容体としてはヒトでは10種類ほど知られているが<sup>3)</sup>、その中でも典型的な核局在シグナルである塩基性アミノ酸残基のクラスターを認識する核内輸送受容体インポーチン $\beta$ はアダプタータンパク質としてのインポーチン $\alpha$ が必要で、この系は生化学的な知見に加え構造生物学的な観点からもよく研究されている。すなわち、細胞質でインポーチン $\alpha$ によって認識された核内に輸送される基質は、インポーチン $\alpha$ のIBBドメイン(インポーチン $\beta$ 結合ドメイン)を介してインポーチン $\beta$ と結合して三者複合体を形成し、この状態でNPCと相互作用しながら核膜を通過する。核内に移行後は、核内に多く存在するGTP結合型の低分子量Gタンパク質Ran(RanGTP)がインポーチン $\beta$ と結合することが引き金となって輸送基質のタンパク質が解離する(図1)。

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子専攻  
(〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29)

Structural basis for nuclear transport mechanism

Toshiyuki Shimizu and Mamoru Sato (Supramolecular Biology, International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, 1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan)

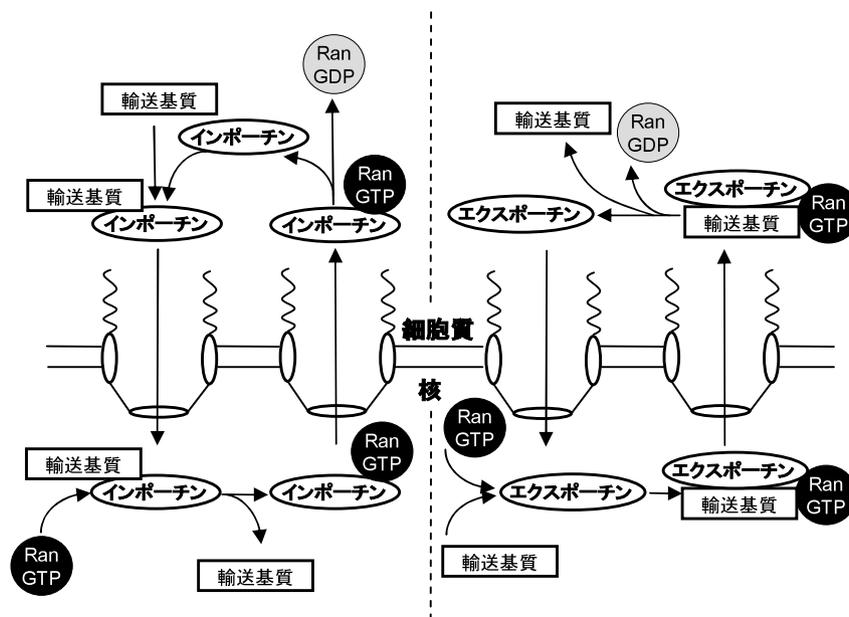


図1 核-細胞質間輸送サイクルの模式図  
左は核内輸送, 右は核外輸送の模式図を表す。

しかしながら, タンパク質の核内輸送機構は多様で, 現在ではインポーチン $\alpha$ を必要としない系も発見されており, インポーチン $\beta$ が核内輸送の主体と考えられている。インポーチン $\alpha$ が関与せずにインポーチン $\beta$ が直接輸送基質と結合して核内に移行する構造科学的な研究例としては, インポーチン $\beta$ とSREBP-2(転写因子の一種)との複合体の構造解析が挙げられる。この系では, 典型的な核局在化シグナルに類似した塩基性領域は核内輸送には関与しないで, SREBP-2分子のほぼ中央に存在するbHLH-Zip(basic helix-loop-helix-zipper)領域が核内輸送に重要であることが明らかにされ, 新しい輸送タンパク質の認識として注目される<sup>4)</sup>。

## 2. インポーチン $\beta$ ファミリーのもう一つの核内輸送受容体(トランスポート)

ヒト由来のトランスポート1(transportin 1, 酵母ではkaryopherin  $\beta$ 2, 以下Trn1と略す)は, M9と呼ばれるhnRNP(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) A1分子に含まれるグリシンに富む核局在化シグナル(M9 NLS)を認識して核内に輸送する受容体として見つけれられた, インポーチン $\beta$ に続く新しいインポーチン $\beta$ ファミリーの核内輸送受容体である<sup>5-7)</sup>。その後, Trn1はhnRNP A1以外にhnRNP D, JKTBP, HuR, poly(A)-binding protein II, TAP, HPV16 E6, HIV Rev, rPL23a, c-Fos等の核内輸送にも関与していることが明らかにされたが, これらTrn1により運ばれるタンパク質のNLSには配列相同性がほとんどないので, インポーチン $\beta$ とは異なる基質認識機構

の存在が示唆される。

Trn1の構造解析については1999年にRanGTPが結合した構造(Trn1-RanGTP複合体)が最初に報告されたが<sup>8)</sup>, 最近になってChookたちがhnRNP A1のNLS(M9 NLS)が結合したTrn1構造<sup>9)</sup>とhnRNP MのNLS<sup>10)</sup>が結合したTrn1構造を発表した。Trn1分子は890アミノ酸残基(約100 kDa)から構成され, HEAT(huntingtin, elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1)リピートと呼ばれる2本の逆平行 $\alpha$ ヘリックスの基本ユニットが20回繰り返され(HEATリピート1-20), 全体としてS字形の超らせん構造をとっている。RanGTPはHEATリピート1-8に, M9 NLSはTrn1のHEATリピート8-20に結合している。また, HEATリピート8には二つの逆平行 $\alpha$ ヘリックスを結ぶ63残基からなる長いループ領域(H8ループ)が存在しているが, このループはプロテアーゼによる切断実験や, 欠変異体の実験から基質解離に非常に重要な役割を果たしていると推定されている。Trn1が認識する配列としては生化学的な実験からPYというよく保存された配列の重要性は示されていたが<sup>7,11)</sup>, ChookらはTrn1-M9NLS複合体の構造解析の結果から, Trn1に結合するコンセンサ配列としてhPY-NLS( $\phi$ -G/A/S- $\phi$ - $\phi$ -X<sub>n</sub>-B-X<sub>(2-5)</sub>-P-Y( $\phi$ :疎水性残基, B:塩基性残基(R/H/K), X:任意の残基)), もしくはbPY-NLS( $\phi$ -G/A/S- $\phi$ - $\phi$ の部分)が5-8残基の塩基性アミノ酸が多い配列)を提唱している<sup>9)</sup>。しかしながら, コンセンサ配列とはいうもののTrn1-M9NLS複合体のみの構造に基づいた仮説であることから, さらなる構造科学的な知見が必要である。また,

		<b>BxxxxxPY</b>
<b>hnRNP D NLS</b>	332 YSNQQSGY	<b>GKVS</b> RRGGHONSYPY 355
<b>TAP NLS</b>	53 EEDDGDVAMSDAQDGPVRVRYN---	<b>PY</b> TTRPNRR 82
<b>JKTBP NLS</b>	396 YSGQQSTYGKASRGGGNHQNNYQPY	420
<b>hnRNP A1 NLS</b>	268 NQSSN	<b>EGPM</b> KGGNFGGRSSG--PYGGGGYF... 305
<b>hnRNP M NLS</b>	41 ERPAQNEKR	<b>KEKNIK</b> RGGNRFE---PYANPTKR 70

図2 本研究で用いた NLS ペプチドと関連タンパク質の NLS の配列  
コンセンサス配列の C 末端領域の配列と N 末端配列を四角で囲んだ。

Chook たちは結晶化の問題から Trm1 として基質解離に重要な役割を果たしている H8 ループの大半を欠失したコンストラクトを用いており、基質解離機構を明らかにするためには適切ではない。

そこで我々はヒト全長の野生型 Trm1 を用いて多様な基質結合機構および基質解離機構を解明することを目的に、Trm1 単体および Trm1 と hnRNP D の NLS (332-355) との複合体、Trm1 と JKTBP の NLS (396-420) との複合体、Trm1 と TAP の NLS (69-102) との複合体の X 線結晶構造解析を行った。用いた NLS ペプチドの配列と関連した NLS の配列を図 2 に示す。さらに、Trm1 と NLS ペプチドとの相互作用様式を野生型および変異体を用いた GST プルダウンアッセイや表面プラズモン共鳴法によって解析し、核内輸送受容体による細胞質から核内へのタンパク質の輸送機構を実験的に明らかにした<sup>12)</sup>。

### 3. トランスポートの全体構造と構造変化

前述のように、インポーチン  $\beta$  ファミリーの核内輸送受容体の多くは 2 本の逆平行  $\alpha$  ヘリックスを基本ユニットとした繰り返し構造 (HEAT リピート) をとっており (図 3a)、分子全体として S 字形をした超らせん構造を形成している。HEAT リピートの数はインポーチン  $\beta$  では 19、Trm1 では 20 である。今回構造解析した Trm1 単体、および Trm1 と hnRNP D の NLS (332-355) との複合体、Trm1 と JKTBP の NLS (396-420) との複合体、Trm1 と TAP の NLS (69-102) との複合体の全体構造 (図 3b) をみると、先に報告された Trm1 構造と同様に、Trm1 分子は HEAT リピート 1-13 (H1-H13) の N 末端アーチと HEAT リピート 8-20 (H8-H20) の C 末端アーチが H8-H13 を重複させて互いにほぼ垂直に連結した S 字状の超らせん構造をしていたが、新事実として Trm1 単体および三つの Trm1-NLS 複合体のすべてにおいて H8 ループの大半の構造が不規則であることがわかった。インポーチン  $\beta$  の構造解析もこれまでに NLS を含む様々なリガンドとの複合体で行われてきたが<sup>4,13-17)</sup>、インポーチン  $\beta$  には Trm1 の H8 ループに相当する長いループが存在しないので、今回の構造解析で初めて Trm1 の H8 ループが Trm1 単体および Trm1-NLS 複合体においてその大半の構造が不規則であることが明らか

にされた。過去のインポーチン  $\beta$  ファミリーの核内輸送受容体の構造解析を振り返ってみると、これも柔軟性の高い超らせん構造に起因していると思われるが、インポーチン  $\beta$  および Trm1 とともに全長かつ RanGTP やリガンドが結合していない状態の構造解析には成功していなかった。今回の構造解析では全長 Trm1 単独での構造解析にも成功し、Trm1 の構造と機能との関連がより詳細に解析できるものと期待される。

今回の構造解析で決定された四つの構造を比較してみると、C 末端アーチ (H8-H20) は NLS の有無や結合する NLS の種類に応じて独自の構造変化を起こしていることがわかる (図 3c)。詳細な解析の結果、この構造変化は H13 と H14 の間を支点として H14 から H20 の領域が大きく動いているが、この H14 から H20 の領域のコンフォメーションにはあまり構造変化が認められない (図 2)。このことはインポーチン  $\beta$  が HEAT リピートの向きを少しずつ変化させながらその積み重ねで全体の構造を変化させることは対照的である。したがって、Trm1 分子は H13 と H14 の間を支点にして H14-H20 を含む領域の構造を変化させながら、多様な NLS との相互作用に対応していることが示唆される。一方、N 末端アーチ (H1-H13) の構造は比較的良好に一致している。しかしながら、N 末端アーチに RanGTP が結合すると N 末端アーチに大きな構造変化が引き起こされる。さらに、RanGTP の結合はこの構造変化だけでなく、C 末端アーチにも構造変化を引き起こすことがわかった。すなわち、今回の構造解析のすべてにおいてその大半の構造が不規則であった H8 ループが、N 末端アーチ領域に RanGTP が結合することによって C 末端アーチ領域と相互作用して安定化され、その結果、NLS が結合したときと同じように H13 と H14 の間を支点とした H14-H20 領域の構造変化が引き起こされた。この構造変化は核内移行後の基質解離において非常に重要な役割を果たすが、その詳細については後述する。また、興味あることに、N 末端アーチと C 末端アーチが重複する領域 (H8-H13) は H14-H20 領域とは対照的に NLS や RanGTP が結合してもほとんど構造変化が認められない。H8-H13 は H14-H20 とともに NLS との結合に関与する重要な領域であるが、その詳細については次節で述べる。

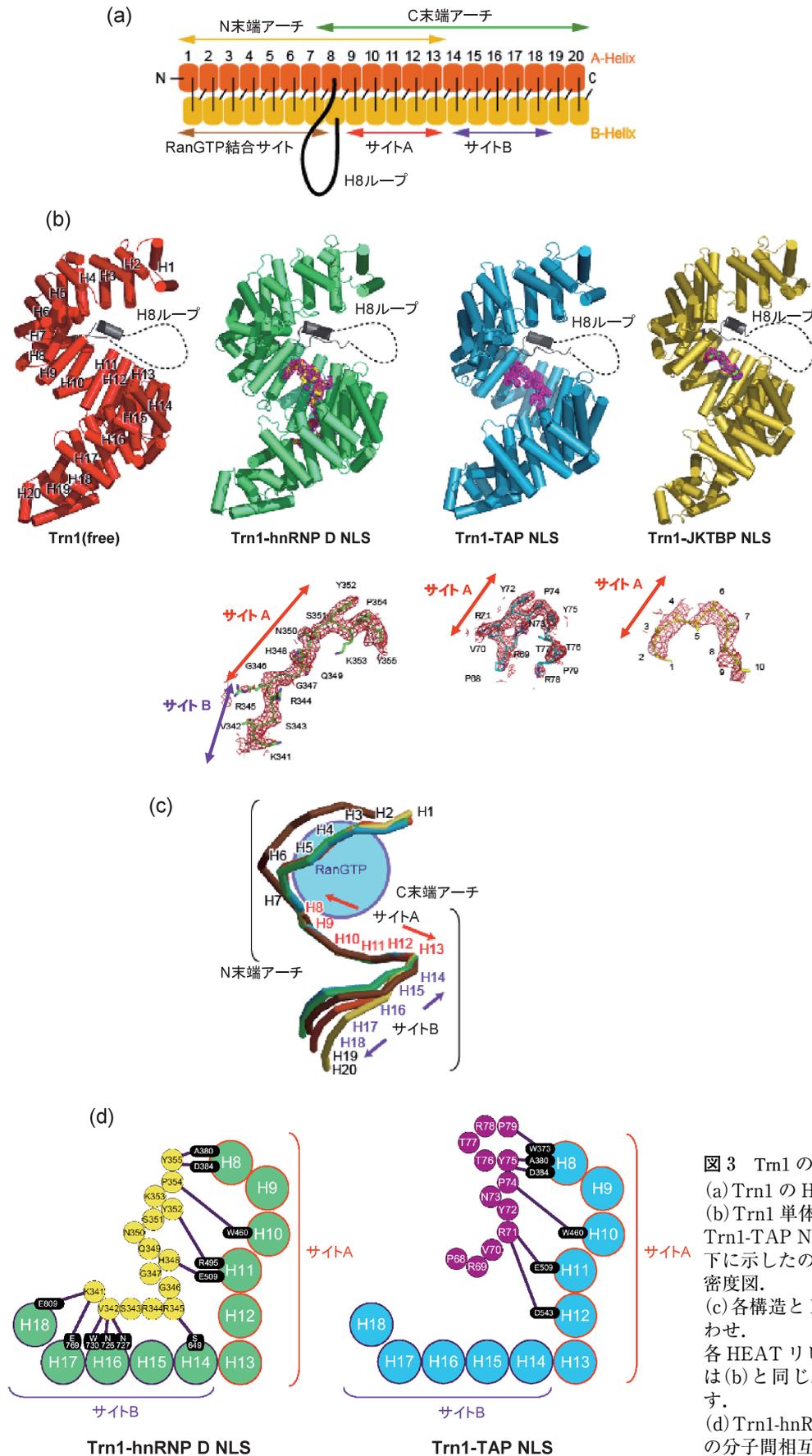


図3 Trn1の全体構造

(a) Trn1のHEATリピートの模式図。

(b) Trn1単体(赤), Trn1-hnRNP D NLS(緑), Trn1-TAP NLS(青), Trn1-JKTBP NLS(黄色)。下に示したのは結合しているNLSの構造と電子密度図。

(c) 各構造とRanGTPが結合したTrn1の重ね合わせ。

各HEATリピートの中心を結んだ図で表す。色は(b)と同じ。RanGTPとの複合体は茶色で示す。

(d) Trn1-hnRNP D NLSとTrn1-JKTBP NLSでの分子間相互作用の模式図。

4. 基質を認識するサイトは二つある

Trn1 と hnRNP D NLS (332-355) との複合体および Trn1 と TAP NLS (69-102) との複合体構造では、それぞれ hnRNP D NLS および TAP NLS のペプチドの電子密度が明瞭に観測できたので複合体のモデルを構築することができた。しかしながら、Trn1 と JKTBP NLS (396-420) との複合体では JKTBP NLS の側鎖の電子密度が不明瞭なため、JKTBP の NLS 部分はポリアラニンでモデルを構築した。いずれの基質 NLS も明瞭な二次構造をもたない伸張

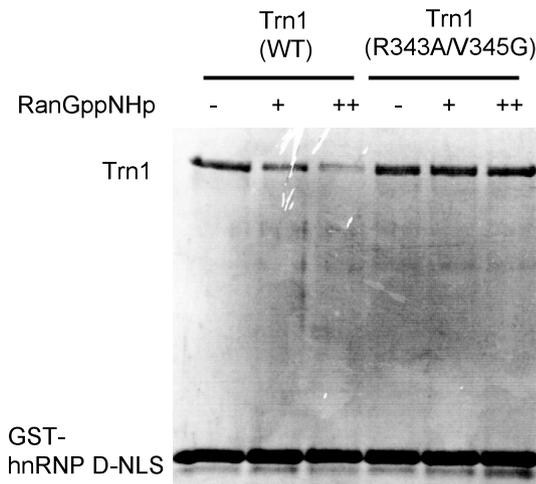


図4 RanGTPによる基質解離実験  
hnRNP DはRanGTPの添加により解離するが、Trn1のH8ループ変異体はRanGTPを添加しても解離しない。

した構造をとっていた (図3b)。

NLSペプチドの結合領域および様式を詳細に解析すると、いずれのNLSもH8-H13の領域で認識されていた。さらに、hnRNP D NLSはH8-H13の領域以外にH14-H18の領域でも認識されているが、TAP NLSはH8-H13の領域のみで、H14-H18の領域には電子密度が観測されなかった。また、JKTBP NLSはTAP NLSと同様にH8-H13の領域でのみ認識されていたが、その電子密度はあまり明瞭ではなく側鎖の帰属は困難であった。興味深いことに、NLSの電子密度の表れ方はTrn1に対するNLSペプチドの解離定数 $K_d$ とよい相関を示した。すなわち、最も広い領域(H8-H13領域+H14-H18領域)で相互作用するhnRNP D NLSの $K_d$ は3.2 nM、H8-H13領域に明瞭な電子密度が観測されたTAP NLSの $K_d$ は17 nM、そして、H8-H13領域のみで相互作用するが電子密度はあまり明瞭でないJKTBP NLSの $K_d$ は1.0  $\mu$ Mとなり、電子密度の観測される領域と電子密度の明瞭さが解離定数によく反映されている。

ChookらがTrn1-M9NLS複合体の構造解析<sup>9)</sup>から提唱したTrn1に結合するNLSのコンセンサス配列hPY-NLSとbPY-NLSに共通するB-X<sub>(2-5)</sub>-P-Yの領域は、Trn1のH8-H13の領域と相互作用しているが、この領域は前節で述べたようにNLSやRanGTPが結合してもほとんど構造が変化しない領域に相当している。そこで、このH8-H13の領域をサイトA、NLSの有無や結合するNLSに応じて構造変化を起こすH14-H18の領域をサイトBとした。すでにChookらによって構造解析が行われたTrn1とhnRNP A1

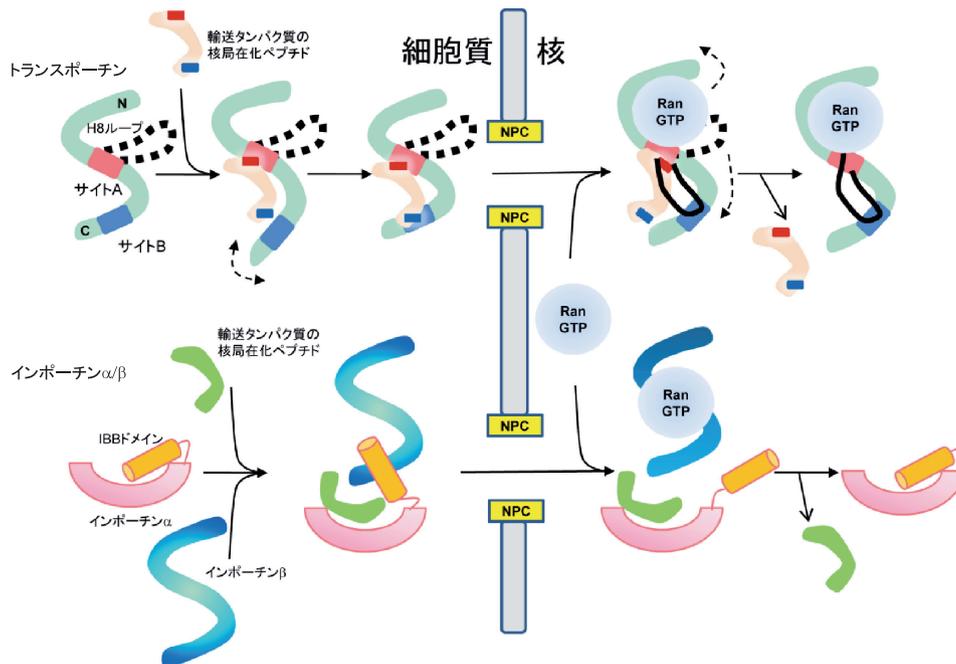


図5 Trn1による基質核内輸送の模式図  
比較のためインポートン $\alpha$ 、 $\beta$ による核内輸送の模式図も載せる

表1 表面プラズモン共鳴法による Trn1 と各基質 NLS との解離定数

単位は nM

Trn1 \ hnRNP D		WT	N末側		B-Xn-P-Y(C末側)		
			V342G	V342A	H348A	P354A	Y355A
WT		3.2	42	94	17	7.3	43
サイトA	W460A	3600					
	E509A	13					
サイトB	W730A	290					
H8ループ	R343G/V345G	5					
Trn1 \ TAP		WT	N末側		B-Xn-P-Y(C末側)		
			V59G	V59A	R71A	P74A	Y75A
WT		17	50	53	67	55	63
サイトA	W460A	ND					
	E509A	110					
サイトB	W730A	970					
H8ループ	R343G/V345G	15					
Trn1 \ JKTBP		WT	N末側		B-Xn-P-Y(C末側)		
			Q399A	G404A	H413A	P419A	Y420A
WT		1000	1900	1400	6300	14000	ND
サイトA	W460A	ND					
	E509A	3500					
サイトB	W730A	2600					
H8ループ	R343G/V345G	87					

NLS との複合体や Trn1 と hnRNP M NLS との複合体では、サイト A およびサイト B 以外に両サイトにはさまれた領域やそれ以外の領域でも相互作用が認められるが、今回の構造解析で決定された基質 NLS ペプチドの構造を重ね合わせてみると、サイト A およびサイト B では基質のコンフォメーションが比較的良好に重なり合うのに対し、その他の部分では NLS ペプチドの主鎖の配向は全く異なっていた。したがって、Trn1 における基質結合部位は基本的にサイト A とサイト B の二箇所であり、その他の部位は NLS の種類に応じた付随的なサイトであると考えられる。

### 5. 基質 NLS の認識様式

Chook らによって提唱された Trn1 が認識するコンセンサス配列の C 末端領域には B-X<sub>(2-5)</sub>-P-Y 配列が存在する。我々が構造解析した三つの基質もすべてこのコンセンサス配列にあてはまる。今回の我々の構造解析ではさらにこのコンセンサス配列の領域が共通してサイト A で Trn1 と相互作用することが明らかにされた。この相互作用を詳細に解析してみると、最もよく保存されている C 末端の PY 領域は hnRNP D NLS および TAP NLS とともに共通して A380, D384, W460 で認識され、hnRNP D NLS および TAP NLS の配列はそれぞれ BX<sub>3</sub>PY と BX<sub>2</sub>PY であることが明らかとなった (図 3d)。なお、Chook らによって構造解析された M9 NLS の配列は BX<sub>3</sub>PY になるが、いずれの場合も B の位置の塩基性アミノ酸は PY からの残基数が異なるにも関

わらず共通して E509 によって認識されることが示された。

一方、コンセンサス配列の N 末端領域については、Chook らによって  $\phi$ -G/A/S- $\phi$ - $\phi$  配列が提唱されているが、この領域は Trn1 のサイト B と相互作用する。M9 NLS では相当する配列は FGPM であるが、今回我々が解析した三つの基質 NLS は必ずしもこの法則にはあてはまらない。例えば、hnRNP D NLS ではサイト B によって認識されるアミノ酸残基は Val342 であるが、この前後の配列は GKVS となっている。なお、TAP NLS や JKTBP NLS に関してはサイト B と相互作用していないので、サイト B での相互作用は不明である。

### 6. サイト A とサイト B の役割

今回の構造解析からは相互作用の数や接触面積の広さを考えるとサイト A が親和性の高いサイトであると考えられる。そこで、我々はサイト A 及びサイト A と相互作用する NLS ペプチドに変異を導入し、親和性がどのように変化するかを表面プラズモン共鳴法で解析した (表 1)。その結果、Trn1 と強い親和性をもつ hnRNP D NLS においては、サイト A の認識アミノ酸に変異をいれるといずれも解離定数は大きくなり、結合力は最大でおよそ 1,000 倍弱くなる (W460A の場合)。同様に B-X<sub>(2-5)</sub>-P-Y 配列中の B, P, Y を A に変異させるとやはり解離定数は大きくなった。この傾向は中程度の親和性をもつ TAP, 弱い親

和性しかもたない JKTBP でも同様な傾向を示す。このことはサイト A が基質認識に主要な役割を果たすことを明確に示している。

一方、サイト B に関してはどうか。強い親和性をもつ hnRNP D NLS ではサイト B においても電子密度が観測されたが、TAP および JKTBP の NLS ではともにサイト B には明瞭な電子密度が観測されず、構造科学的に NLS がどのように Trn1 に認識されるのかは不明である。そこで、サイト A と同じように表面プラズモン共鳴法によってサイト B 及びサイト B と相互作用する NLS ペプチドに変異を導入し、親和性がどのように変化するかを解析したところ (表 1)、hnRNP D NLS ではサイト B への変異や  $\phi$ -G/A/S- $\phi$ - $\phi$  配列の変異により解離定数が最大で約 100 倍大きくなっていった (W730A)。興味深いことに、TAP NLS の場合はサイト B への変異の導入により解離定数が約 50 倍大きくなっていった (W730A)。これは TAP NLS の場合サイト B に明瞭な電子密度は観測できなかったが、なんらかの相互作用があることを示唆している。一方、JKTBP NLS では変異を導入しても多少解離定数は大きくなるもののそれほど顕著な変化は示さなかった。このことは JKTBP NLS はサイト B とは直接的に結合していないことを示しており、hnRNP D NLS、TAP NLS、JKTBP NLS はそれぞれ Trn1 による認識が異なることが示唆された。

では、サイト B はどのような役割を果たしているのだろうか? Chook らによって構造解析された Trn1 と RanGTP との複合体構造と今回我々が構造解析した複合体構造を比較検討すると、非常に興味のある事実が判明した。すなわち、Trn1 の N 末端アーチに RanGTP が結合すると、構造が不規則であった H8 ループが C 末端アーチ側に追いやられ、その先端がサイト B と相互作用して安定化されていたのである。従って、サイト A とサイト B の両方に基質が結合している状態の Trn1 に RanGTP が結合すると、揺らいで構造が不規則であった H8 ループの先端がサイト B と相互作用して基質を解離させるという仮説を提唱することができる。そこで、この仮説を検証するため、我々は RanGTP が結合したときにサイト B と相互作用する H8 ループの先端部に二重の変異を導入した変異体 (R343A/V345G) を作成し、RanGTP による解離実験を行った。まずこの変異体は各基質への親和性には影響しないことを確認後 (表 1)、GST と融合した各基質 NLS をグルタチオンレジンに結合させ、Trn1 を混合し、そこに Ran (GDP 型と GTP 型) を加えることによって解離が起こるかどうかをみた (図 4)。その結果、予想通り hnRNP D NLS においては野生型の Trn1 は RanGTP の添加により解離するが、二重変異体では解離が見られなくなり、RanGTP の結合によって起こる H8 ループとサイト B との相互作用が核内における基質解離に重要な役割を果たすこ

とが示された。

## 7. Trn1 によるタンパク質の核内輸送機構

今回の我々の構造解析の結果とこれまで報告されてきた知見を総合させると Trn1 による基質の認識と解離機構は次のように考えられる (図 5 上)。

- 1) Trn1 は基質の認識サイトとして C 末端アーチ領域にサイト A とサイト B をもち、最初にサイト A に基質がもつ B-X<sub>(2-5)</sub>-P-Y 配列が結合する。次に、hnRNP D NLS のような高親和性の基質に対してはさらにサイト B においても結合する。この場合、基質 NLS の配列や長さ、親和性の違いなどによって最も高い親和性が得られるように H13 と H14 の間を支点にして C 末端アーチの H14-H20 領域のコンフォメーションを変化させる。
- 2) この状態で NPC と相互作用しながら核膜を通過して核内に移行する。移行後は、核内において高濃度で存在する RanGTP と相互作用する。RanGTP との相互作用は N 末端アーチで起こるが、RanGTP が N 末端アーチに結合すると構造が不規則であった H8 ループが C 末端アーチの方に追いやられ、その先端がサイト B と相互作用 (結合) して H8 ループが安定化される。そして、サイト B 上での H8 ループの結合サイトと基質 NLS の結合サイトは大部分が重複するので、サイト B 上から NLS が解離する。TAP NLS の場合も基本的には同様なことが起きているものと考えられるが、JKTBP NLS は直接的にサイト B とは相互作用しないので、JKTBP NLS では結合サイトが重複して NLS がサイト B から解離するプロセスは存在しない。
- 3) Trn1 と NLS との相互作用は、サイト B での相互作用がなくなったので大きく減少する (この減少は hnRNP NLS と TAP NLS の場合で、JKTBP NLS は直接的にサイト B とは相互作用していない)。さらに RanGTP が N 末端アーチに結合している状態の H8 ループは、その一部の領域がサイト A の NLS と重なり合うので、NLS と立体障害が生じて基質 NLS がサイト A から解離していくものと考えられる。なお、JKTBP NLS のようにサイト B での結合が観測されないような Trn1 との相互作用の弱い基質は、サイト A 上での H8 ループとの立体障害だけで解離していくものと考えられる。

## 8. 他のインポーチンファミリーとの比較

構造科学的にも最もよく研究されているインポーチン  $\alpha$  と  $\beta$  の系では、次のように基質解離機構が提唱されている (図 5 下)。

- 1) インポーチン  $\alpha$  は NLS 結合ドメインであるアルマジロリピートと N 末端にある IBB ドメインから構成され、インポーチン  $\alpha$  が IBB ドメインを通してインポーチン  $\beta$  に結合する。

2) インポーチン $\alpha$ -インポーチン $\beta$ 二量体のインポーチン $\alpha$ のNLS結合ドメインに輸送される基質が結合し、この状態でNPCと相互作用しながら核膜を通過して核内に移行する。

3) 核内に移行後は、核内において高濃度で存在するRanGTPと相互作用するが、IBBドメインとRanGTPが結合する領域が重複するので、RanGTPがインポーチン $\alpha$ をインポーチン $\beta$ から押しおける、インポーチン $\alpha$ を解離させる。

4) 解離したインポーチン $\alpha$ はIBBドメインがNLS結合ドメインと相互作用するために、NLS結合ドメインに結合した基質はインポーチン $\alpha$ から解離する。

このようにインポーチン $\alpha$ と $\beta$ の系ではTrn1のように基質解離にH8ループは関与しない。インポーチン $\alpha/\beta$ 系での基質解離機構はTrn1とは異なる点が多いがTrn1におけるH8ループの役割とインポーチン $\alpha$ におけるIBBドメインの役割は似ているなど共通している点も存在する。

### 9. まとめと今後の課題

以上のように、インポーチン $\beta$ ファミリーのタンパク質は非常に柔軟な構造をもち、結合する相手分子の構造や性質に対して自身の構造を変化させて独自の機能を発揮させていることがわかる。さらに、Trn1による細胞質から核内へのタンパク質輸送は、核局在化ペプチドが細胞質でサイトAとサイトBの両方でトランスポーチンに認識される機構とサイトAのみで認識される機構の二つの機構が存在し、どちらの機構が選択されるかはサイトBでの相互作用の有無によって決まることが示された。このような構造の柔軟性の理解には結晶解析による立体構造情報のみならずX線小角散乱法や分子動力学シミュレーション、さらには両者を組み合わせた研究など多方面からの研究が必要になってくると思われる。

またインポーチン $\beta$ とTrn1では細胞質での基質認識及び核内での基質解離の両機構とも異なり、インポーチン $\beta$ ファミリーの核内輸送受容体によるタンパク質の核内輸送の多様性があらためて認識されることになった。多数の核内タンパク質の存在を考えると、この他にも数多くの核内輸送機構が存在していると考えられるが統合的に理解するためには本研究のような立体構造解析を含めた研究が必要

であろう。輸送因子と輸送基質の認識・解離機構の問題は本研究でもその一端を明らかにしたように進んできているが、その一方で核膜孔通過の問題は構造研究を含め未解決のものが多い。核膜孔が巨大な超分子複合体であるゆえ方法論を含め様々な研究が必要になってくるであろう。

### 謝辞

本研究は今崎剛、橋本博、山田道之、小瀬真吾、今本尚子博士(敬称略)との共同研究です。またデータ収集にあたりSPRING-8、PFのスタッフにお世話になりました。記してここに感謝いたします。

### 文 献

- Görllich, D. & Kutay, U. (1999) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **15**, 607-660.
- Tran, E.J. & Wentz, S.R. (2006) *Cell*, **125**, 1041-1053.
- Pemberton, L.F. & Paschal, B.M. (2005) *Traffic*, **6**, 187-198.
- Lee, S.J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K.T., Tsukihara, T., & Yoneda, Y. (2003) *Science*, **302**, 1571-1575.
- Siomi, H. & Dreyfuss, G. (1995) *J. Cell Biol.*, **129**, 551-560.
- Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielny, S., Siomi, M.C., Wang, F., & Dreyfuss, G. (1996) *Cell*, **86**, 985-994.
- Iijima, M., Suzuki, M., Tanabe, A., Nishimura, A., & Yamada, M. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 1365-1370.
- Chook, Y.M. & Blobel, G. (1999) *Nature*, **399**, 230-237.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., & Chook, Y.M. (2006) *Cell*, **126**, 543-558.
- Cansizoglu, A.E., Lee, B.J., Zhang, Z.C., Fontoura, B.M.A., & Chook, Y.M. (2007) *Nature Struct. Mol. Biol.*, **14**, 452-454.
- Suzuki, M., Iijima, M., Nishimura, A., Tomozoe, Y., Kamei, D., & Yamada, M. (2005) *FEBS J.*, **272**, 3975-3987.
- Imasaki, T., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Kose, S., Imamoto, N., Yamada, M., & Sato, M. (2006) *Mol. Cell*, **28**, 57-67.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., & Muller, C.W. (1999) *Nature*, **399**, 221-229.
- Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M.T., & Gerace, L. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 1345-1353.
- Lee, S. J., Matsuura, Y., Liu, S.M., & Stewart, M. (2005) *Nature*, **435**, 693-696.
- Bayliss, R., Littlewood, T., & Stewart, M. (2000) *Cell*, **102**, 99-108.
- Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Görllich, D., & Wittinghofer, A. (1999) *Cell*, **97**, 635-646.