

1. はじめに

真核細胞において、核-細胞質間の高分子輸送は細胞核 の機能とその制御を支える重要なプロセスである.この輸 送は核膜を貫通する高分子輸送チャネルである核膜孔を通 して起こる能動輸送であり、ほとんどの場合、karyopherinβファミリーに属する可溶性タンパク質である核輸送受容 体によって担われている. 核輸送受容体は, 輸送の方向性 によって importin あるいは exportin と総称される. Importin は輸送基質 (cargo) を細胞質から核に運び (核内輸 送), exportin は cargo を核から細胞質に運び出す(核外輸 送). Importin や exportin にはさまざまなものが存在し, cargoの種類によって使い分けられている。輸送の方向性 は低分子量Gタンパク質Ranによって制御されており、 Ran による GTP 加水分解が輸送の駆動力となっている¹. Ran は, Ras などと同様に, GTP 結合型 (RanGTP) と GDP 結合型 (RanGDP) では異なるコンフォメーションをとり、 この構造変化が、他のタンパク質との相互作用に大きく影 響する".

CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) は最も代表 的な exportin であり, ロイシンリッチ核外輸送シグナル (<u>Nuclear Export Signal; NES</u>と略称; **図**1A)をもつタン パク質やタンパク質-RNA 複合体の核外輸送を担う(図1 B)^{3~6}. NESをもつ輸送基質(NES-cargo)はそれ自身では 核膜孔を通過できず, CRM1と複合体を形成したときにの み,核膜孔を通過できる.ただし,核膜孔通過は可逆反応 であり,輸送を一方向に駆動するためには核内で CRM1 と NES-cargo が結合し, 細胞質では CRM1 と NES-cargo が解離するように, NES の結合解離を空間的に制御する 仕組みが必要である.この方向性制御は Ran と Ran 結合



図1 CRM1による核外輸送サイクル

A: ロイシンリッチ核外輸送シグナル (NES) のコンセンサス 配列. NES は両親媒性 α ヘリックス構造をとることが多い. B: CRM1 は NES をもつタンパク質やタンパク質・RNA 複合 体を認識して核から細胞質に運び出す. この輸送は核膜孔を通 して起こる能動輸送であり, Ran GTPase と Ran 結合タンパク 質群によって制御されている.

タンパク質群によって実現されている.核には Ran のヌ クレオチド交換を促進するタンパク質 RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1)が局在しているため、核内 では RanGTP が豊富に存在しており、CRM1 と NES-cargo は RanGTP 依存的に結合して CRM1: NES-cargo: RanGTP 三者複合体(核外輸送複合体)を形成する.一方,細胞質 には Ran による GTP 加水分解を促進するタンパク質群 (RanGAP, RanBP1/2)が局在しており、これらのタンパ ク質の作用により核外輸送複合体は解体されると同時に Ran は RanGDP となる.CRM1 は単独で核膜孔を通過し, 核に戻る.RanGDP は、NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) という核内輸送受容体によって核に運ばれ、核内で RCC1

みにれびゆう

の作用を受けて Ran が RanGTP になると NTF2 から解離す る.このように核にリサイクルされた CRM1 と Ran は, 再び NES-cargo と結合し,核外輸送サイクルをくり返す. この輸送サイクルは Ran による GTP 加水分解と共役して おり,GTP 加水分解によってリリースされる自由エネル ギーが能動輸送の駆動力となり,CRM1 が cargo の濃度勾 配に逆らって cargo を運ぶことを可能にする.

2. CRM1による核外輸送シグナル認識機構

最近 NES-cargo の一種 Snurportin 1 (Spn1) と CRM1, RanGTPの複合体の結晶構造が2.5Å分解能で解かれ(図2 Aの左), CRM1による核外輸送シグナル特異的認識機構 の理解が進んだ⁷). CRM1 は, HEAT リピート(最初にこ の構造モチーフが見出された四つの蛋白質 Huntingtin, EF3, PP2AのAサブユニット, TORの頭文字から名付け られた)とよばれる逆平行のαヘリックスペアが21個タ ンデムに繋がってできた大きなリング状の構造をしてお り、RanGTP をリングの内側に抱え込んで広範囲にわたっ て結合する. この結合は Ran が GTP 結合型のコンフォ メーションをとっているときにのみ可能である.一方, Spn1 は CRM1 リングの外側に結合する. Spn1 は N 末端 領域に両親媒性 α ヘリックス構造をとる Leu-rich NES を もっており、この NES は CRM1 のリング外側表面の HEAT11と12が形成する疎水性の溝に結合する.この疎 水性の溝には, Spn1 だけでなく PKI (Protein Kinase Inhibitor)や HIV ウイルスのゲノム RNA が核外輸送される際に アダプターとして機能する Rev など,他の NES-cargo の NES も結合することも明らかになり[®],一般的な NES 結合 部位であると考えられている. また, この疎水性の溝には CRM1 による核外輸送の特異的阻害剤であるレプトマイシ ンBが結合するシステイン残基があり⁹、レプトマイシン Bはこの溝を塞ぐことで NES の結合を阻害するのかもし れない.

3. 細胞質における核外輸送複合体解体機構

私たちは蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用して CRM1とNESの結合解離のキネティックスを測定する系 を開発した.その結果,核外輸送複合体からNES-cargoが 自発的に解離する速度は0.0073/sと極めて遅く,RanGAP はNESの解離速度を高めることはできないがRanBP1は NES 解離速度を2,000倍にも上昇させ,核外輸送複合体 からNES-cargoを速やかに解離させることができることを 見出した¹⁰⁾.このキネティックスのデータとその他の知見 から、細胞質での核外輸送複合体解体反応は次のような順 番で起こると考えられる(図1B):まずRanBP1がNES を解離させてCRM1:RanBP1:RanGTP複合体が形成さ れ、これがCRM1とRanBP1:RanGTP複合体に解離した 後にRanGAPがGTP加水分解を促進する.CRM1: RanBP1:RanGTP複合体は細胞質での速やかな核外輸送 複合体解体に必須の反応中間体であり、この構造が解けれ ば、RanBP1がなぜNES解離を促進できるのか理解できる はずである.そこで私たちはCRM1:RanBP1:RanGTP 複合体の結晶構造を2.0Å分解能で解いた¹⁰⁰(図2Aの右).

CRM1:RanBP1:RanGTP 三者複合体の結晶構造におい て,RanBP1はRanGTPとは広範囲にわたって結合してい るものの,CRM1との直接の相互作用はほとんどなく NES 結合部位からは遠く離れたところに位置している. したがって RanBP1 が NES-cargo と直接競合して NEScargo を CRM1 から解離させるわけではないと考えられ る.

CRM1: RanBP1: RanGTP 複合体の構造を CRM1: NEScargo: RanGTP 複合体の構造と比較すると, NES 結合部 位として機能する CRM1 の HEAT11 と 12 の間にある疎水 性の溝に構造変化がみられた. CRM1: NES-cargo: RanGTP 複合体ではこの疎水性の溝は開いていたが, CRM1: RanBP1: RanGTP 複合体では溝は閉じており NES が結合できない状態になっている(図 2B). このことから RanBP1 は NES 結合部位の溝を, NES が結合できる「開 いた構造」から, NES が結合できない「閉じた構造」に 変化させることで, NES-cargo を CRM1 から解離させるの ではないかと推測される.

では RanBP1 はどうやって遠く離れたところにある NES 結合部位の構造変化を引き起こすのだろうか? CRM1 に おいて,他に構造変化がみつかったのは、CRM1の HEAT9 に挿入された長いループ(HEAT9 ループ)である (図 2A). CRM1: NES-cargo: RanGTP 複合体において HEAT9 ループは Ranの switch I (GTPの γ -phosphateのセ ンサーとして機能する領域のうちの一つ)に結合している. 一方、CRM1: RanBP1: RanGTP 複合体では、Ranの switch I には、RanBP1と RanのC末端領域が結合してい る. RanのC末端領域はCRM1: NES-cargo: RanGTP 複 合体ではどことも相互作用せず disorder していると考えら れるが、RanBP1が RanGTP に強く結合するためには Ran のC末端領域が必要であり、RanBP1 は Ranの球状ドメイ ンに結合するときに RanのC末端をリクルートし、立体 障害により CRM1の HEAT9 ループを Ranの switch I から





図2 CRM1 核外輸送複合体の形成と解体

A: CRM1: NES-cargo: RanGTP 複合体(左)とCRM1: RanBP1: RanGTP 複合体(右)の結 晶構造. CRM1の21個のHEATリピートをH1~H21とラベルした. B: RanBP1によってHEAT9ループの移動が引き起こされ,NES 結合部位(HEAT11-12間の 疎水性の溝)が開いた構造から閉じた構造へ変化し,NESが解離する. C:核内でCRM1とNESが RanGTP 依存的に結合する仕組み(左)と,細胞質でRanBP1が CRM1からのNES 解離を促進するアロステリック機構(右).いずれにおいても,HEAT9ルー プが NES 結合部位の構造動態を調節することが決定的な鍵となる.

みにれびゆう

押しのけると考えられる.興味深いことに,このように 押しのけられたHEAT9ループは,CRM1:RanBP1: RanGTP 複合体ではちょうどNES 結合部位の裏側に相当 する部位(HEAT11,12のCRM1リング内側表面)に結 合している.このHEAT9ループとHEAT11,12との相互 作用によって,NES が結合する疎水性の溝の形成に関与 するアミノ酸残基がHEAT9ループの方に移動し,これに 伴って疎水性の溝が閉じている.したがって,RanBP1は HEAT9ループのRanからNES 結合部位裏側への移動を引 き起こすことで,NES が結合する疎水性の溝を「開いた 構造」から「閉じた構造」に変化させ,これによってNES の解離を促進すると考えられる(図2Cの右).このNES 解離促進のアロステリックモデルは,HEAT9ループの変 異体解析によって裏付けられた¹⁰.

NES-cargo が CRM1 と RanGTP から自発的に解離した後 でなければ RanBP1 が結合できないということであるな ら, RanBP1 が CRM1 からの NES 解離速度を高めること はできないので, RanBP1 は図 2C の右に模式的に示した ように, CRM1, NES-cargo, RanGTP と一時的に4者複合 体を形成し, NES の結合を不安定化することで NES を速 やかに解離させるのだと考えられる. CRM1: NEScargo: RanGTP 複合体では, Ran の表面で RanBP1 が結合 する領域がほとんど溶媒に露出しており, これは RanBP1 がこの3者複合体にアクセスして一時的に4者複合体を形 成することを容易にしている.

CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体では、CRM1:NEScargo:RanGTP 複合体と比べると、CRM1と Ranの接触面 積が狭くなっている.このことから、RanBP1は CRM1と RanGTP の結合を不安定化する働きもしているように思わ れる.CRM1から解離した RanBP1:RanGTP 複合体に RanGAP が結合すると、Ranの活性部位の switch II 領域に あるグルタミンの側鎖が GTP 加水分解を触媒するコン フォメーションに変化し^{III},GTP が速やかに加水分解さ れ、RanBP1と RanGAP が解離する.RanBP1は RanのC 末端領域が RanGAP の邪魔をするのを防ぐことにより、 RanGAP による Ranの GTP 加水分解促進を助けると考え られている^{III}.

CRM1と核外輸送シグナルの結合が RanGTPに依存する仕組み

CRM1:RanBP1:RanGTP 複合体では,HEAT9ループ とHEAT11,12との相互作用という,CRM1の「分子内 相互作用」によって NES 結合部位が閉じた状態で安定化

されている.このことから、HEAT9ループには、CRM1 への NES の結合を阻害するという「自己阻害機能」が備 わっており, RanGTP は HEAT9 ループを NES 結合部位裏 側から引き離して CRM1 の自己阻害を解除することによ り、NESの安定な結合を可能にするのではないかと私た ちは考えた(図2Cの左).この仮説を検証するために、 HEAT9 ループと HEAT11, 12 との相互作用を弱くし, か つ、CRM1: NES-cargo: RanGTP 複合体の形成には影響が 及ばないように HEAT9 ループに変異を導入した CRM1 変 異体を作製したところ、予想通りこの変異体は RanGTP が なくても NES-cargo と強く結合した¹⁰⁾. したがって HEAT9 ループはCRM1の構造動態調節ループとして機能し、細 胞質における NES 解離反応の鍵を握っているのみならず, 核内で CRM1 と NES-cargo の結合が RanGTP に依存する という、「核外輸送複合体アッセンブリーの協同性(cooperativity)」を実現する上でも決定的に重要な役割を果たし ていると考えられる.後者の機構を確立するために,当研 究室ではCRM1 単独の高分解能構造解析に取り組んでい る.

5. おわりに

本稿で紹介した二つの複合体の結晶構造から, NES 結 合部位の開閉制御(核では開いて、細胞質では閉じる)と いう、CRM1による輸送の方向性制御機構の鍵を握るプロ セスについて、原子レベルでメカニズムが明らかになって きた. 核外輸送機構に関して, 残された最も主要な未解明 課題は核膜孔通過機構である。核輸送受容体がなぜ核膜孔 を通過する能力をもつのか、さまざまな説が提唱されてい るが¹²⁾. まだそのメカニズムはよくわかっていない. 核膜 孔を形成するタンパク質群 (ヌクレオポリン) どうしの相 互作用や、ヌクレオポリンと exportin の相互作用の解析, 核膜孔通過の1分子イメージングによる核膜孔通過モデル の検証など、さまざまなアプローチを組み合わせた取り組 みが必要である.また最近の新展開として,CRM1やRan が、中心体が細胞周期あたり1回だけ複製されるように複 製回数を制御したり、核膜が消失する細胞分裂期における 紡錘体形成を制御するなど、核-細胞質間輸送因子群がも つ新たな機能が次々に発見されており^{13,14)},今後の研究展 開が楽しみである.

- Görlich, D. & Kutay, U. (1999) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 15, 607–660.
- 2) Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. (2001) Science, 294, 1299-

1304.

- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., & Mattaj, I.W. (1997) *Cell*, 90, 1051–1060.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., & Nishida, E. (1997) *Nature*, 390, 308– 311.
- 5) Ossareh-Nazari, B., Bachelerie, F., & Dargemont, C. (1997) *Science*, **278**, 141–144.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C., & Weis, K. (1997) Cell, 90, 1041–1050.
- Monecke, T., Güttler, T., Neumann, P., Dickmanns, A., Görlich, D., & Ficner, R. (2009) Science, 324, 1087–1091.
- Güttler, T., Madl, T., Neumann, P., Deichsel, D., Corsini, L., Monecke, T., Ficner, R., Sattler, M., & Görlich, D. (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 1367–1376.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., & Horinouchi, S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9112–9117.
- 10) Koyama, M. & Matsuura, Y. (2010) EMBO J., 29, 2002–2013.
- 11) Seewald, M.J., Korner, C., Wittinghofer, A., & Vetter, I.R. (2002) *Nature*, 415, 662–666.
- 12) Wälde, S. & Kehlenbach, R.H. (2010) Trends Cell Biol., 20, 461–469.
- 13) Arnaoutov, A., Azuma, Y., Ribbeck, K., Joseph, J., Boyarchuk, Y., Karpova, T., McNally, J., & Dasso, M. (2005) *Nat. Cell Biol.*, 7, 626–632.
- 14) Wang, W., Budhu, A., Forgues, M., & Wang, X.W. (2005) Nat. Cell Biol., 7, 823–830.

小山 昌子,松浦 能行 (名古屋大学大学院理学研究科)

Structural basis for CRM1-mediated nuclear export Masako Koyama and Yoshiyuki Matsuura (Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464–8602, Japan)

光合成生物におけるアスコルビン酸生合成 研究の新展開

はじめに

L-アスコルビン酸 (AsA) は,植物や真核藻類を含めた 光合成生物およびほとんどの動物で生合成される (霊長類 やモルモット,コウモリなど一部の鳥類,真骨魚類は生合 成できない).動物の AsA はウロン酸経路の一分枝として D-グルクロン酸 (D-GlcUA)からL-グロン酸 (L-GulA),L-グロノ-1,4-ラクトン (L-GulL)を経て生合成されること が,最終段階を触媒する L-GulL 酸化酵素やアルドノラク トナーゼ (SMP30, ALase)の解析から明らかになってい

る^{1,2)}. ヒトを含めた霊長類は L-GulL 酸化酵素が偽遺伝子 化しているため、食事からビタミンCとして AsA を摂取 しなければならない.我々にとって最大のAsA供給源と なる光合成生物の細胞内には, mM オーダーの高濃度で AsA が蓄積しており、細胞壁やデンプンなどを除いた可 溶性糖類に占める割合は最大で約10%に達する。光合成 生物の AsA 生合成経路は長らく未解明であったが、最近 ようやく遺伝子レベルで明らかになってきた.動物とは異 なり、D-マンノース (D-Man) とL-ガラクトース (L-Gal) の誘導体を代謝中間体とする D-Man/L-Gal 経路と, D-ガラ クツロン酸 (D-GalUA) を代謝中間体とする D-GalUA 経 路が存在し、それぞれの経路の分布は植物や藻類の種によ り異なることが分かってきた.本稿では、これまでに筆者 らの行ってきた研究を中心に、光合成生物の二つの AsA 生合成経路に関する知見と今後の展望について概説した い.

1. D-マンノース/L-ガラクトース経路

D-Man/L-Gal 経路は, D-フルクトース 6-リン酸(P)から D-Man 6-P, D-Man 1-Pを経た後, ピロホスホリラーゼに より GTP と反応して GDP-D-Man となり, エピマー化によ り GDP-L-Gal となる. GDP-L-Gal は, さらに L-Gal 1-P, L-Gal を経て AsA の最終前駆体 L-ガラクトノ-1,4-ラクトン (L-GalL) へと順次変換される (図1). この経路を構成す る代謝酵素はすべて遺伝子レベルでの同定が完了し, ミト コンドリアに局在しシトクロム c を電子受容体とする L-GalL 脱水素酵素を除いて, 全て細胞質で機能している^{3.4}.

D-Man/L-Gal 経路構成酵素の同定には、シロイヌナズナ の AsA 欠乏 vtc 変異体が重要な役割を果たしてきた.vtc 変異体は5種類存在し, vtc1 と vtc4 の原因遺伝子は, そ れぞれ D-Man/L-Gal 経路上の GDP-Man ピロホスフォリ ラーゼおよび L-Gal 1-P ホスファターゼである^{3,4)}. また vtc2 と vtc5 の原因遺伝子は、どちらも D-Man/L-Gal 経路 上で GDP-L-Gal から L-Gal 1-P への変換反応を触媒する GDP-L-Gal ホスホリラーゼをコードしているパラログ遺伝 子である. GDP-L-Gal ホスホリラーゼは、ヌクレオチド加 水分解酵素や転移酵素ファミリーに特徴的な Histidine triad (HIT) モチーフを持つ新奇糖核酸代謝酵素であり, 動物でも機能は未同定であるがオルソログが存在する⁵. 我々は VTC2 および VTC5 の機能解析のため、これらの 遺伝子の二重破壊変異株をシロイヌナズナで作出した⁵. この変異株は通常の栽培用培地上で発芽直後に黄化し致死 的表現型を示すが、培地に L-Gal を添加することで正常な