

Kap121p による細胞周期依存的核移行機構 の構造基盤

小林 純也

目次

要旨	3
----	---

1、序論

1.1 核—細胞質間の物質輸送の意義	6
1.2 核-細胞質間の物質輸送装置として働く核膜孔複合体	6
1.3 核-細胞質間の物質輸送サイクル：核内輸送と核外輸送	11
1.4 Ran による GTPase サイクルとその構造変化	13
1.5 Karyopherin family の特徴的な構造：HEAT リピート	14
1.6 Karyopherin による cargo (NLS) 認識機構の多様性	15
1.7 核-細胞質間の物質輸送の制御機構	18
1.8 細胞周期依存的な核移行制御機構：出芽酵母の Importin Kap121p による核移行経路が細胞周期依存的に阻害される	19
1.9 本研究の目的と特徴	23

2、材料と方法

2.1 Kap121p-RanGTP 複合体の X 線結晶構造解析	25
2.2 Kap121p-Ste12p (cargo) 複合体の X 線結晶解析	27
2.3 Kap121p-Pho4p (cargo) 複合体の X 線結晶解析	30
2.4 Kap121p 単独の X 線結晶解析	31
2.5 Kap121p-Nup53p 複合体の X 線結晶解析	32
2.6 in vitro での結合実験	34
2.7 SPR 解析	36
2.8 出芽酵母での機能解析	37

3、結果と考察

3.1	新規の Karyopherin : Kap121p の結晶構造	38
3.1.1	結晶化と構造決定	
3.1.2	Kap121p の結晶構造	
3.2	Kap121p による輸送基質 (cargo) 認識機構と特異的 NLS の同定	42
3.2.1	Kap121p-cargo (Ste12p、Pho4p) 複合体の結晶構造	
3.2.2	Kap121p と cargo との相互作用における機能解析	
3.2.3	Kap121p が特異的に認識する保存された NLS の同定	
3.2.4	Kap121p の種内および種間における保存性	
3.3	Nup53p による Kap121p 認識機構と核移行阻害機構の解明	49
3.3.1	Kap121p-Nup53p 複合体の結晶構造	
3.3.2	Kap121p と Nup53p との相互作用は cargo との相互作用と同一のメカニズムである	
3.3.3	Nup53p 変異体の機能解析	
3.3.4	結晶構造から導きだされる Nup53p による核移行制御機構 (Nup53p と cargo は直接競合する)	
3.4	Kap121p における RanGTP による cargo 解離機構の解明	52
3.4.1	Kap121p-RanGTP 複合体の結晶構造	
3.4.2	Kap121p における RanGTP による cargo 解離機構	

結論	57
----	----

参考文献	59
------	----

謝辞	66
----	----

要旨

真核生物は多様な細胞内小器官を得たことで機能の分業化を獲得したが、細胞内での多様なコミュニケーション（生体高分子の細胞内輸送）が必須となった。特にゲノム DNA を有する核においてその重要性は高く、核と細胞質の間の物質輸送は DNA 複製や蛋白質合成などの生命に必須の機能のために必要である。核-細胞質間輸送は核膜にある核膜孔複合体と呼ばれる蛋白質複合体を通して起こる。40 kDa 以下の分子は核膜孔を自由拡散で通り抜けることができるが、それ以上大きな分子は自力での核膜孔通過は不可能であり、運び屋として機能する蛋白質（輸送因子）の助けが必要となる。運び蛋白質の多くは Karyopherin β (Kap β) family に属する蛋白質（出芽酵母では 14 種類、高等生物では 20 種類以上存在）であり、HEAT リピートを共通して有している。核内輸送を担う Kap β 蛋白質を Importin、核外輸送を担う Kap β 蛋白質を Exportin と総称する。Kap β による輸送の方向性をコントロールしているのが Ran と呼ばれる small GTPase である。Ran は GTP 型が核内で、GDP 型が細胞質に局在するように RanGTP-GDP 濃度勾配が形成されている。Ran が輸送因子と cargo との結合、解離を調節することで輸送の方向性が成立する。

このような核-細胞質間の輸送を厳密に制御することは遺伝子発現、シグナル伝達、細胞増殖、分化および細胞周期の進行など多様な生理機能の調節に必須である。近年、核-細胞質間の物質輸送を制御する新しい機構として、その通り道である核膜孔複合体の内部構造の再編成による輸送制御機構が存在することが明らかになってきた。出芽酵母の Importin の一つである Kap121p が担う核移行経路は細胞周期依存的に制御されることが知られている。これは核膜孔複合体構成蛋白質のひとつである Nup53p の M 期特異的な Kap121p との結合により起こると考えられている。Nup53p は Kap121p と特異的な結合領域を有しているが、間期ではその結合領域が核膜孔の別の蛋白質との相互作用によりマスクされているため、Kap121p による核移行は正常に起こる。だが、M 期になると

核膜孔複合体内での内部構造の再編成によりマスクされていた領域が表面に露出する。これにより Nup53p が Kap121p と結合できるようになり、Kap121p を核膜孔にトラップするとともに cargo を解離させることで Kap121p による核移行を阻害する。このような作業仮説が考えられている。だがその分子メカニズムは未だ解明されていない。またこの制御機構が近年 Spindle の調節に関与することが報告されたが、生理的な意義における直接的な証拠は未解明のままである。

この核移行制御は今まで静的な単なる孔と思われていた核膜孔複合体の動的な性質を見ることができる点で斬新であり、また細胞周期という生物学的に重要な現象と直接リンクする点でも興味深い。そこで本研究では、Kap121p による cargo の核移行サイクルおよびこの核移行制御の分子メカニズムを、X 線結晶解析を用いて原子レベルで解明することを目的とした。Kap121p 単独、cargo との複合体、Nup53p との複合体および RanGTP との複合体の結晶構造を解明し、それらの構造情報に基づいた in vivo および in vitro での機能解析を行うことで、Kap121p による核移行サイクル（cargo 認識機構および cargo 解離機構）および Nup53p による核移行制御（新しい核移行制御機構）の構造基盤を確立した。

これまで Kap121p の構造的な知見は皆無であり、本研究で初めて Kap121p の結晶構造を解明した。Kap121p は 24 の HEAT リピートをもつ右巻き超らせん構造をしており、単独の構造において二ヶ所の分子内相互作用により安定な閉じた構造を形成していた。Kap121p-cargo 複合体の構造から Kap121p が特異的に認識するシグナル配列（NLS : nuclear localization signal）を初めて同定した。Cargo との複合体は単独の構造とほとんど同じであり、cargo との結合において Kap121p はほとんど構造を変わらないことが分かった。Kap121p はらせん内部の中央部分で cargo の複数の塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸である V/I の側鎖を特異的に認識しており、全体としては KV/IxKx₁₋₂K/H/R という配列を Kap121p 特異的 NLS として同定し、機能解析により証明した。興味深いことに Nup53p との複合体の構造において Nup53p は cargo と同じ特異性で結合しており、Nup53p が NLS-like な配列を有していることを発見した。このことから Nup53p による Kap121p 核移行阻害は cargo との直接的な競合によって passive

に起こることを示唆し、それを速度論的な解析により証明した。さらに RanGTP との複合体の結晶構造を解いた。RanGTP は Kap121p の N 末側の arch の内部に包まれるように結合しており、興味深いことにこの結合により Kap121p は今まで形成されていた分子内相互作用が解除されて、そのらせん構造が大きく構造変化していた。Cargo との複合体の構造と RanGTP との複合体の構造を比較したところ、RanGTP による cargo の解離は RanGTP により引き起こされる Kap121p の構造変化による NLS 結合サイトの不安定化（cargo-incompatible な構造への変化）と RanGTP の cargo との立体障害による直接的な追い出しという二つのメカニズムの combination により起こることが明らかとした。

以上のように本研究では、いくつかの重要な蛋白質複合体の結晶構造を決定することで、新規の Importin による核移行サイクルおよび Nup53p による核移行阻害の構造基盤を確立し、その構造に基づいて多面的なアプローチからの機能解析を通してそれらを証明した。

1, 序論

1.1 核-細胞質間の物質輸送の意義

真核生物は進化の過程で様々な脂質二重膜で仕切られた細胞小器官（オルガネラ）を得た。これは真核生物の特徴であり、核をはじめとしてミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、ペルオキシソーム、葉緑体などがそれぞれ異なる機能を果たしている。細胞内での機能の分業化が可能となったことで複雑な機能を果たすことができるようになり、生物はより高度なものへと進化した。これらのことを可能にしているのは多くの物質を適切な場所へ運ぶ細胞内輸送システムである。細胞内には、ある特定の場所へと物質を輸送する様々なシステムが確立しており、これらが細胞内でのコミュニケーション（情報伝達）のために必須の役割を果たしている。細胞内輸送には多くの因子が関与している。その中でも特に生命の設計図としてはたらく DNA を有する核において、その重要性は高い。核は核膜と呼ばれる脂質二重膜により包まれており、細胞質とは完全に分離されている。核内では DNA 複製、蛋白質合成における DNA から RNA への転写やプロセッシング、細胞質内では翻訳というように機能の場が分けられている。そのためには RNA ポリメラーゼなどの核内で働く多くの蛋白質を核内に運ぶこと、不要になった分子、mRNA や rRNA を核外へ運ぶことが必要である。またシグナル伝達、遺伝子発現調節、細胞増殖時などにおいても核内に転写因子などの多くの因子を核内へ運び込む、また不要な分子は核外に出すことを迅速に行うことが不可欠である。このように生物が多様な生理機能を行うためには多様な物質が核と細胞質間を行き来している。よって核と細胞質間の情報伝達がすべての真核生物の生存に必要不可欠となっている (Gorlich and Kutay, 1999)。

1.2 核-細胞質間の物質輸送装置として働く核膜孔複合体

核は外膜と内膜の二層の脂質二重膜により形成されている核膜（nuclear envelope）により細胞質から完全に隔てられている。核膜には核膜孔と呼ばれる核膜を貫通する孔が巨大な蛋白質複合体により形成されている。すべての核-細胞質間の物質輸送は核膜に埋め込まれている巨大な蛋白質複合体である核膜孔複合体（Nuclear Pore Complex : NPC）を通して起こる（Figure.1-1、Table.1-1）。核膜孔複合体の全体構造は3つの部分に大きく分けられており（1, nuclear basket、2, central channel、3, cytoplasmic filament）、全体としては非対称な形状をしている。核膜孔複合体は核内に非常に多く存在している。例えば1つの出芽酵母細胞の核膜に189個存在することが分かっており、増殖系のヒト細胞で約3000~5000、matureなXenopusのoocyteで約 5×10^7 あることが知られている（Gorlich and Kutay, 1999; Hoelz et al., 2011）。

現在最も研究が進んでいるのが、出芽酵母の核膜孔複合体である。その全体の分子量が約66 MDaで、少なくとも456の蛋白質分子により構成されている。核膜孔複合体を構成する蛋白質はnucleoporin（Nups）と呼ばれており、yeastでは約30種類の異なるnucleoporinにより構成されている。核膜孔複合体は8回回転対称性を持つ形状をしており、30のnucleoporinがそれぞれ8の倍数含まれていることから、規則正しい回転対称構造をしていることが示唆される（Figure.1-2, 1-3, 1-4）。これらのnucleoporinは大きく3つのカテゴリーに分類される（a, transmembrane-Nups、b, Structural-Nups、c, FG-Nups）。

Transmembrane-Nupsは膜結合ドメインまたは膜貫通ドメインをもつ蛋白質である。一般にPOMs (integral membrane proteins of the pore membrane domain of the nuclear envelope)と呼ばれ、膜と直接結合することで、核膜孔複合体を核膜へanchoringする。POMsは3種類の蛋白質群が知られているが（出芽酵母ではNdc1p、Pom34p、Pom152p、ヒトなどの高等真核生物ではNDC1、Gp210、POM121）、このTransmembrane-Nupsに関しては出芽酵母とヒトで相同性がほとんどない。

Structural-Nupsは核膜孔複合体の形を作る上で重要な蛋白質群であり、多くのNupsがこれに属する（全体の5割）。ほとんどのStructural-Nupsは α -helical solenoid 構造、または β -propeller 構造のいずれかもしくはその両方から成るマ

ルチドメイン構造をしている。上記の構造は蛋白質同士の相互作用に重要であると考えられており、Transmembrane-Nups や他の Structural-Nups と相互作用することで、核膜孔表面をコートして核膜孔複合体の構造や強度の維持に関与している。また nuclear basket や cytoplasmic filament の形成の軸部分になっており、すなわち核膜孔複合体の足場部分 (scaffold) を形成する蛋白質群である。

FG-Nups は FG リピート (Phe-Gly という配列が親水性のリンカーをはさんでリピートしたアミノ酸配列) を有する Nups で全体の 1/3 がこれに分類される。FG リピート領域は特定の二次構造をもたない天然変性領域である (Denning et al., 2003)。この FG リピートが核膜孔複体内での物質輸送の選択性に関与しており、NPC の permeability barrier として機能すると考えられている。これらの FG-Nups は Structural-Nups と相互作用することで完全な核膜孔複合体を構築している。

一方、高等真核生物では約 125 MDa で、50~100 の nucleoporin が関わることが示唆されているが、その全体構造はよく類似しており、その構成因子の約 2/3 が構造的、機能的に出芽酵母からヒトまで保存されている (Gorlich and Kutay, 1999, Suntharalingam, M Wentz, SR, 2003)。

核膜孔複合体についての研究は非常に盛んであり、プロテオミクス解析を用いた網羅的な nucleoporin の同定、nucleoporin 同士の相互作用解析、電子顕微鏡を用いた核膜孔複合体全体の低分解能の構造解析 (Beck et al., 2004)、X 線結晶解析を用いたいくつかの nucleoporin およびそれらの subcomplex の高分解能構造解析など多面的なアプローチによる研究が進んでいる。近年それらの研究とコンピュータによる計算を組み合わせることで、核膜孔複体内での nucleoporin のおおよその位置関係が明らかとなっている (Aler et al., 2007; Hoelz et al., 2011)。これらの位置関係の研究から全体構造としては非対称的な構造をしているが、central channel では多くの nucleoporin が核側と細胞質側で対称的に配置されており、核膜孔複合体の孔は極性を持たないという特徴がある。よって核内への物質輸送と核外への物質輸送は本質的には同じ動きであることを示唆している。

核-細胞質間の輸送において核膜孔複合体は一種の permeability barrier として

働いており (Mohr et al., 2009)、40kDa 以下の低分子はこの間を自由拡散で通り抜けることができるが、それ以上大きな分子は自身だけでは通り抜けることができない。これらの物質の輸送には核-細胞質間輸送受容体 (Karyopherin) と呼ばれる蛋白質群が荷物を運ぶ運び屋として機能することで核膜孔通過が可能となる。Karyopherin は自由に核膜孔の間を通り抜けることができる限られた蛋白質である。この際の barrier として実質的に働いているのが FG-Nups の FG リピート領域である (Figure.1-5, 1-6)。FG-Nups は核膜孔複合体の孔表面部分に多く局在しており、二次構造を持たない FG リピートが物質輸送の選択性を決めている。Karyopherin はこの FG リピートとの μ M オーダーの弱い相互作用の繰り返しすることで迅速に核膜孔を通り抜けると考えられていた。これは Karyopherin と FG-Nups の複合体の結晶構造とその後の機能解析により証明された (Baylis et al., 2000)。FG リピートにもいくつかの種類があり、大きく FG、GLFG、FXFG (X はいかなるアミノ酸でも良い) を一つ FG リピートのユニットとしたものに分けられ、さらにそれぞれでスペーサーに含むアミノ酸にも傾向がある (Terry and Wentz, 2009)。FXFG のスペーサーは Ser、Thr、チャージを持ったアミノ酸に富んでおり、GLFG のスペーサーは Asn、Gln、酸性アミノ酸に富んでいる。またこれら以外にも PSFG や SAFG と呼ばれる特殊な FG リピートを有する FG-Nup も存在しており、細かく分類されている。これら性質の異なる FG-Nups が核膜孔複合体には対称的または非対称的に局在している。Karyopherin と FG-Nups の相互作用の強度は組み合わせにより異なっており、それぞれの Karyopherin によって結合強度の高い FG-nups と結合強度の弱い FG-Nups がある (Allen et al., 2001)。またその結合強度は RanGTP との結合によって大きく変化することも報告された。それらの違いが効率的な核膜孔複体内での移動と cargo に輸送を可能にしていると考えられているが、どのようにしてその preference が決まっているかは未解明であり、非常に興味深い部分である。

このように Karyopherin は FG-Nups と相互作用により核膜孔を乗り越えろと考えられているが、この barrier の実態 (FG-Nups がどのように選択的な barrier を形成するか)、そしてどのように核輸送受容体が迅速に核膜孔を移動できるかについては未解明であり、現在までに様々なモデルが提唱されている (Figure. 1-7)。最初の輸送モデルは Rout らにより virtual gating model の考え方が提唱さ

れた (Rout et al., 2000)。

Virtual gating model (Brownian virtual gating model) は核膜孔複合体を energy/entropy barrier であると見なしている。すなわち FG 領域がサイズ依存的なマナーでエントロピー的に不利になる分子に対する熱力学的な barrier を核膜孔複合体内に形成しているというものである。FG 領域は構造をとらない天然変性領域であり、伸びた構造をとっているため、激しくブラウン運動していると考えられている。Karyopherin は FG 領域との弱い相互作用により、このエントロピーの障壁を乗り越えることができる。核膜孔複合体周辺に FG 領域を集積させることで Karyopherin が自発的に barrier を乗り越える確率を上昇させていると考えられている。

このモデルに加えて、現在いくつかの新しいモデルが提唱されている。

一点目が reduction of dimensionally (ROD) model である。これは FG 領域が核膜孔複合体の内表面上に Karyopherin が相互作用できる連続的な表面構造を形成することで、Karyopherin はあたかも 2 次元表面上を歩くように移動するというモデルである。FG-Nups のスパーサー配列や別の Nucleoporin が選択的な filter として機能し、非対称的に存在する FG-Nups が Karyopherin 複合体を捕まえてくると考えている。

二点目が selective phase model である。これは FG 領域同士が相互作用することで核膜孔複合体内に meshwork を形成し、それが物理的に選択的な filter として機能するというものである。近年 FG-Nups 同士の相互作用が確認されたこと、高濃度の FG ペプチドが in vitro で hydrogel を形成することなどの報告があり、多くの実験事実と辻褃が合う (Karyopherin はこの gel にとけ込むように浸透するという実験結果が得られている) (Frey and Gorich, 2006)。だが今までの実験だけではこのモデルを検証することが難しく、実際の核膜孔複合体内で hydrogel を形成しているという直接の証拠はまだない。

多様なアプローチの実験からこのように多くのモデルが提唱されているにもかかわらず、それらのいずれかを証明するための直接的な証拠は未だ得られていないのが現状である。この課題を解くためには細胞内の核膜孔複合体の内部構造をそのまま詳細に見るための技術開発が必要となるだろう。核膜孔複合体の内部構造とどのようにその間を物質が輸送するかは現在の最も大きな謎であり、大変興味深い対象である。

1.3 核-細胞質間の物質輸送サイクル：核内輸送と核外輸送

核-細胞質間の効率的な輸送はそのほとんどが Karyopherin β family に属する可溶性の蛋白質によって担われており、出芽酵母では 14 種類、ヒトでは 20 種類以上が知られている (Table.1-2)。Karyopherin β family に属する蛋白質は類似した大きさの分子量 (90-150 kDa) と等電点 ($pI = 4.0-5.0$) を有しているが、配列の保存性は低い (10-20 %)。Karyopherin が有するこれらの輸送機能は 1, 核内への輸送、2, 核外への輸送、3, 両方向への輸送の大きく 3 つに分けられる。核内輸送を担う蛋白質は Importin と呼ばれ、一方核外輸送を担う蛋白質は Exportin と呼ばれる。これらの Karyopherin は cargo の持つ特定のアミノ酸の並びをシグナル配列として特異的に認識、結合することで cargo の輸送を達成する。Importin が認識するシグナル配列は核内局在シグナル (NLS : Nuclear localization signal)、Exportin が認識するシグナル配列は核外輸送シグナル (NES : Nuclear export signal) と呼ばれており、それぞれの Karyopherin は異なる特異性を持つシグナル配列を認識することで、多くの cargo を運ぶことができる。その結果、機能の分業化を成立させていると考えられている (Gorlich and Kutay, 1999; Chook and Blobel, 2001; Weis, 2003)。

これらの Karyopherin が核膜孔を通過する際は完全なランダムウォークであり、そのプロセスに方向性はないことが 1 分子イメージングの実験から明らかとなっている (Yang et al., 2004)。Ran と呼ばれる Ras like small GTPase が核-細胞質間の物質輸送の方向性を決定している。この Ran のヌクレオチド結合型の局在が輸送方向性制御の鍵となっており、Ran の GTP 結合型 (RanGTP) が核内に、Ran の GDP 結合型 (RanGDP) が細胞質に局在するようにコントロールされている (Vetter and Wittinghofer, 2001)。これは核内では Ran guanine nucleotide exchange factor (RanGEF : RCC1) がクロマチンに結合する形で核内に局在しているため、Ran は積極的に GTP 型へと変換される。一方細胞質では Ran GTPase-activating protein (RanGAP) が局在しており、これと RanBP1 という補助蛋白質に作用により積極的には Ran は GDP 型へと加水分解されることでこの濃度勾配が成立している。この RanGTP-RanGDP の核と細胞質の間での濃度勾配が Karyopherin の物質輸送の方向性を決める決定的な要因である。

核内輸送に関して、Importin は細胞質で cargo を認識して、結合する (Gorlich and Kutay, 1999)。この際の結合はとても強く、高い特異性を持つことが知られている (解離定数が nM のオーダーである)。核内へ移動後 (このプロセスは可逆的である)、RanGTP と結合する。すべての Karyopherin は RanGTP とのみ結合できることが分かっており、RanGDP とは結合できない。これは GTP の加水分解に Ran の立体構造が変化することに起因する (Wittinghofer et al., 2011)。そしてこの Importin と RanGTP の結合により Importin の構造が変化することで cargo を解離させる。Importin と RanGTP の結合力は cargo との結合力と同等かそれ以上に強いので、この解離反応は効率よく起こると考えられる。Importin-RanGTP 複合体は細胞質に戻った後、細胞質に局在する RanBP1 および RanGAP により効率よく加水分解され、RanGDP になる。すると Importin は Ran から解離するため、importin は再度 cargo を運べるようになる。Importin による核内移行に関して RanGTP は cargo 解離因子として働いている。RanGTP は核内に豊富に存在するようコントロールされているため、Importin と結合する cargo は核内で効率よく解離する。そのため cargo の輸送の方向性が生じる (Figure. 1-8)。

一方、核外輸送に関して Ran はその逆の機能を果たしており、Exportin は RanGTP と cargo と三者協調的に結合することで安定な複合体を形成する。この複合体形成メカニズムは Exportin により様々で、近年いくつかの Exportin-cargo-RanGTP 複合体の結晶構造が相次いで解明されたことで明らかとなった (Matsuura and Stewart, 2004; Okada et al., 2009; Monecke et al., 2009)。これらの結晶構造から三者で結合することで初めて安定な複合体を形成することが明らかとなった。この三者複合体が核膜孔を通過し、細胞質に移動すると細胞質に局在する RanBP1 および RanGAP の作用により Ran は効率的に加水分解される。するとこの三者複合体は解離するので、cargo は細胞質内に release される。その後 Exportin は単独で核内に戻ることによって次のサイクルに使われる。Ran は核外輸送においては cargo 積載因子として機能している。すなわち輸送の方向性は Ran が Karyopherin と cargo の結合に関してどのように働くかが一番の鍵となっている (Figure. 1-9)。

例外的に Ran の濃度勾配を利用しない輸送経路として、TAP:p15 による mRNA 核外輸送経路が知られている (Stewart, 2010)。TAP:p15 はいくつかの

コファクターと協調して働くことで mRNA を核外へと輸送する。また mRNA の品質管理にも関与しており、核内で正常にプロセッシングを受けた mRNA を選択的に核外へ輸送する。他の Exportin との相同性は FG-Nups と相互作用する以外は知られていない。輸送の方向性を決める因子としては DEAD-box RNA helicase が有力視されており、これによる ATP 加水分解が輸送の原動力となっていると考えられている。

また核内輸送に関しては Hikeshi と呼ばれる蛋白質が近年発見されており、熱ストレス時に特異的に Hsp70 の ATP 結合型を核内へと輸送する (Kose et al., 2012)。この際の輸送の方向性を決める駆動力は Hsp70 の ATPase による加水分解であると考えられている。この Hikeshi も FG-Nups との相互作用以外に他の Importin との相同性は見られない。これらがどのように進化したかは不明であるが、ある特定の cargo を運ぶために特化したものである。これら以外にも Ran を利用しない輸送因子が存在している可能性がある。

1.4 Ran による GTPase サイクルとその構造変化

核-細胞質間の物質輸送の大部分の方向性を制御しているのが Ran と呼ばれる small GTPase である (Figure. 1-10)。Ran (Ras-related-nuclear protein) は Ras GTPase ファミリーに属しており、その GTP 型のコンフォメーションは、全体構造がよく似ており、GTP 結合モチーフ部分のアミノ酸配列はよく保存されている。多くの NTPase の活性部位の構造と同様に P-loop (phosphate-binding loop) の GxxxxGKS/T モチーフが GTP の β -phosphate を包むように強く結合している。GTP 結合型と GDP 結合型で大きく構造が変化するのは Switch I、Switch II および C-terminal tail の三ヶ所である。Switch I、Switch II は Ras の結晶構造 (Milburn et al., 1990) において GTP 結合型と GDP 結合型の間のコンフォメーションチェンジのスイッチループとして発見された。Ran においてもその機能は同様であり、Switch I、Switch II は GTP の γ -phosphate のセンサーとして機能している。GTP 型では γ -phosphate は存在しているが、GDP 型では γ -phosphate が Ran の構造から放出されることにより Switch I、Switch II の構造と位置が大きく変化する。この二ヶ所に加えて、C-terminal tail にも大きな構造変化が見られた。GTP 型では Ran の C-terminal tail は Ran のコアドメイン (G

domain) から離れているが、GDP 型になると Switch I 領域の構造変化によって C-terminal tail が結合できる領域が G domain 表面に形成されることで RanGDP では Ran の C-terminal tail は G domain と広範囲に結合する。このような構造変化により Ran と結合する蛋白質との相互作用を調節する。Ran においてはこの調節が核-細胞質間の物質輸送のために重要な機能を果たしている。

1.5 Karyopherin family の特徴的な構造 : HEAT リピート

蛋白質の機能や構造の進化は大部分、gene duplication によるものである (Andrade et al., 2001)。一遺伝子内での duplication や recombination によって配列の類似したリピート配列を有する遺伝子を作り出し、すべての蛋白質の少なくとも 14 %はこれにより生じたと考えられている。このような蛋白質のもつリピート配列はそれぞれユニットとなる配列が持つ二次構造が規則正しく積み重なって対称性を持った構造をとる (多くはらせん構造や rod のような構造) ことで、分子の表面が増大させて蛋白質や核酸が結合する領域を形成している。

Karyopherin β family に属する蛋白質は、そのほとんどが HEAT リピートと呼ばれる約 50 残基のアミノ酸がタンデムにつながって出来たリピート配列を有している。このリピート配列は最初にこのモチーフを有していた 4 つの蛋白質である Huntingtin、elongation factor 3、protein phosphatase 2A の PR65/A subunit、lipid kinase である IOR (Target of rapamycin) kinase の頭文字に由来している。この HEAT リピートはその立体構造において興味深い特徴をもっている。HEAT リピートは逆平行の二本の α helix (A helix と B helix) が対となってループでつながったものを一つのユニットとして、それが隣り合うユニットと stack して積み重なることで連続的な疎水性のコアを形成する。多くの HEAT リピートの積み重ねにより全体構造は C に近いアーチのような構造や超らせん構造を形成する。この構造において HEAT リピートの A helix が内側表面を、B helix が外側表面の構造形成に関与する。そのようにして形成された分子表面は蛋白質間の相互作用に利用されており、Karyopherin β family も同様の性質を有している (Figure. 1-11)。

HEAT リピートを持つ蛋白質は多く存在しており、少なくとも 500 個に 1 個

は HEAT リピートを含む蛋白質が存在していると配列検索から導きだされている。同定されている蛋白質も多く、いくつかはその結晶構造についても明らかとなっている。その結晶構造から HEAT リピートは柔軟性の高い性質を持ち、結合するパートナーにより自身の構造を大きく変化させること報告されている。この構造変化は蛋白質複合体の形成または解体の制御に利用されている（すなわち機能のために重要な性質である）と考えられている。

1.6 Karyopherin による cargo (NLS) 認識機構の多様性

Importin による cargo 認識機構の研究は進んでおり、いくつかの importin が特異的に認識する NLS は既に同定されている。この際強力な手がかりとなったのが X 線結晶解析による Importin-NLS 複合体の構造情報であった。今までに Importin β 1 と Karyopherin β 2 (Kap β 2/transportin) に関してその NLS が詳細に研究されている (Xu et al., 2010; Chook, 2011)。

Importin β 1 は最も多くの cargo を輸送すると考えられており、最も研究が進んでいる Importin である。Importin β 1 は右巻きの超らせん構造をしており、19 の HEAT リピートによりその全体構造が形成されている。この Importin が特異的に認識する NLS は 1980 年代に初めて発見された。Importin β 1 は他の Importin とは異なり、cargo と直接結合せず、アダプター蛋白質を介して結合しており、cargo の NLS は Importin β 1 のアダプター蛋白質として働く Importin α が認識する。Importin α もその全体構造は HEAT リピートに似た ARM リピートと呼ばれるリピートより形成されているが、Importin β 1 とは異なり、緩いアーチ構造をしている。ARM リピート構造は三つの α helix を一つのユニットとして形成されたリピート構造である。Importin α は自身の内側表面に NLS 結合サイトを有しているが、通常は自身の N 末部分がそこへ結合することで、単独では cargo と結合できないように自己阻害を起こしている。だが Importin β 1 と結合することで、その阻害がはずれて cargo と結合できるようになる。Importin α により認識される NLS は classical NLS と呼ばれ、K-K/R-X-K/R (X はいかなるアミノ酸でもよい) という塩基性アミノ酸のクラスターからなる配列であった。詳細な相互作用は Importin α の Asp と NLS の backbone による水素結合、Trp と塩基性アミノ酸の側鎖との疎水性相互作用および周辺の極性アミノ酸と酸性アミノ

酸との静電相互作用により形成されていた。また興味深いことに Importin α には NLS 認識部位がもう一ヶ所存在しており (minor NLS binding site)、10 から 12 残基のリンカーを挟んで 2 ヶ所で塩基性アミノ酸クラスターを認識する機構も有していた (Figure. 1-12)。この際の NLS は $(K/R)(K/R)X_{10-12}(K/R)_{3-5}$ となり、前述の NLS を mono-partite NLS と、今回のものは bi-partite NLS と称している (Fontes et al., 2000)。これは cargo との特異性の高い結合のため、またより多くの cargo を認識するために戦略だと推測されている。どちらにしても Importin α は数残基の塩基性アミノ酸クラスターを NLS として特異的に認識している。これに加えて例外として Importin $\beta 1$ が直接 cargo を結合する例が報告されている (Lee et al., 2003) (Figure. 1-13)。その cargo の一つとして知られているのが SREBP-2 というコレステロール代謝に必須の転写因子である。SREBP-2 は二量体を形成することで、Importin $\beta 1$ の内側表面に結合する。この結合においては特異的なアミノ酸配列の認識ではなく、特異的な二次構造の認識であった。この Importin $\beta 1$ と結合する二量体構造は basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLHZ) domain として知られており、いくつかの転写因子でよく見られる構造である。よって Importin $\beta 1$ はこの二次構造そのものを NLS として認識している可能性がある。

一方 Kap $\beta 2$ が認識する NLS は PY-NLS と呼ばれており、classical NLS よりも複雑で長い。Kap $\beta 2$ は 20 の HEAT リピートからなる右巻きらせん構造をしており、直接 cargo の NLS を認識する。Kap $\beta 2$ は内側表面で cargo の NLS と結合しており、結合領域が Importin $\beta 1$ に比べて大規模である (全体構造の半分が結合に関与するものもある)。その NLS 配列は柔軟性が高くいくつかのサブタイプに分けられる。1 つ目が N 末側に 4 つの疎水性の残基 (ϕ -G/A/S- ϕ ϕ : ϕ は疎水性アミノ酸を表す) を持ち、4~20 残基のリンカーを挟み R/H/K- X_{2-5} -PY を有する hPY-NLS である。もう 1 つが、N 末に塩基性アミノ酸に富んだアミノ酸配列を持ち、4~20 残基のリンカーを挟み R/H/K- X_{2-5} -PY を有する bPY-NLS である (Lee et al., 2006; Imasaki et al., 2007) (Figure. 1-14)。

これに加えて Importin 13 と cargo の複合体の結晶構造が近年解かれた (Bono et al., 2010; Gruenwald and Bono, 2011)。Importin 13 は 20 の HEAT リピートからなり、リングに近い右巻きらせん構造をしていた (これはらせん構造のピッチが短いために生じている)。このような構造は代表的な Exportin である CRM1 の構造に類似している (Monecke et al., 2009)。Importin 13 は Importin $\beta 1$

の SREBP-2 認識と同様、特異的なアミノ酸配列ではなく cargo の二次構造を認識して結合していた。今までに 2 種類の cargo との複合体の構造が解かれたが、興味深いことにそれぞれの cargo で結合様式が異なっていた (Figure. 1-15)。よって Importin 13 がどのような特異性の cargo を認識しているかを評価するためには他の cargo との複合体の構造を解く必要があるだろう。

また importin と同様に Exportin も特異的に認識するシグナル配列である NES の同定研究が進められている。多くの cargo を輸送する Exportin である Crm1 (Xpo1) は疎水性アミノ酸が適当な間隔でスペーサーをはさんで並んだ 10 残基程度の長さのペプチドを NES として機能することが明らかとなっていた (Fischer et al., 1995)。そして近年 Crm1-Spn1 (cargo) -RanGTP 複合体の結晶構造が解かれ、Crm1 による NES 認識機構が原子レベルで明らかとなった (Monecke et al., 2009) (Figure. 1-16)。その結晶構造から Crm1 は 21 の HEAT リピートからなる大きなリング構造を形成していた。そして cargo は Crm1 の外側表面に 2 ヶ所で結合していた。そのうち一ヶ所は Leu-rich NES 様の配列を持つ Spn1 の N 末端の 14 アミノ酸残基が、Crm1 の HEAT11、HEAT12 の外側のヘリックスの間の疎水性の溝に結合しており、Spn1 の五つの疎水性残基がこの溝の五ヶ所の疎水性ポケットにはまり込むように結合していた。この結合において Spn1 のこの領域は両親媒性の α helix を形成していた。

このように上記に記した Karyopherin は全体構造の類似性に関わらず、全く異なるアミノ酸配列または二次構造を異なるメカニズムで認識していることが明らかとなっている。この多様性の獲得により生物は核-細胞質間の物質輸送に関して細かい分業化を行うことが可能であり、それにより複雑な機能の発揮に役立てているものと推測される。そのため核-細胞質間の輸送経路を詳細に理解するためには今研究が進んでいる Karyopherins のみでは不十分であり、すべての Karyopherin による物質輸送サイクル (認識するシグナル配列、Ran による cargo 解離機構など) を理解することが非常に重要な位置を占める。また今までに解明されたシグナル配列認識機構は Karyopherin-cargo 複合体の構造を解くことで初めて明らかになったことであり、X 線結晶構造解析が強力なツールとして使えることがよく分かる。この他にも Karyopherin は多種類知られているが、それらについての研究は未だに進んでいない部分が多く、それらが特異的に認

識するシグナル配列はほとんど解明されていない。これらの Karyopherin についても cargo との複合体の構造を解明し、それらの cargo 認識機構を明らかにすることは生物学的に重要な研究であるといえる。

1.7 核-細胞質間の物質輸送の制御機構

この核と細胞質間の物質輸送は多様な Karyopherin によって担われていることを 1.6 で述べた。これに加えてこの輸送を時間的、空間的に厳密に制御することは遺伝子発現、細胞増殖、細胞分化、シグナル伝達や細胞周期進行などの多様な生理機能の調節のために必須の現象である。この制御メカニズムも非常に多様化されているが、最もメジャーな制御機構が cargo や Karyopherin といった輸送因子の modification による性質の変化による制御である。よく知られているメカニズムは cargo のリン酸化修飾による制御である (Kaffman et al., 1999; Komeili and O'Shea, 1999)。リン酸化依存的に局在が変化する蛋白質が知られており、これは cargo のリン酸化により Karyopherin との相互作用に影響をもたらすために起こる。このような構成要素の可逆的修飾に制御がもっともメジャーな制御機構であり、リン酸化以外の修飾でも起こることが知られている。Cargo だけでなく Kap114 と呼ばれる importin は、その輸送機能が SUMO 化によって制御されるということが近年発見された (Rothenbusch et al., 2012)。Kap114 にとって SUMO 化は cargo の効率的な解離に必須であり、自身の細胞内での局在にも関与していると示唆されている。

また輸送制御は輸送因子のみでなく通り道として働く核膜孔複合体側でも起こる。いくつかの nucleoporin は細胞外シグナルによりリン酸化されることが報告されており、それが核移行の制御に関与することが報告された (Kosako and Imamoto, 2010)。リン酸化される nucleoporin は FG-Nups であり、この FG-Nups のリン酸化により Karyopherin との相互作用が阻害される。よって Karyopherin による核移行の効率が減少するため、FG-Nups のリン酸化依存的に核移行が阻害される。

このような蛋白質の修飾による制御機構は核移行経路において非常に多様に用いられている。このような修飾は可逆的であり、反応自体が単純であるため

に効率よく起こすことができる。よって時間的、空間的に厳密な制御を必要とする核移行制御のためには非常に有効であると言える。さらに cargo のレベル、Karyopherin のレベル、核移行そのもののレベルなど階層ごとの制御も可能であるので、その利便性も高い。そのため核移行制御以外にも多くのシグナル伝達などでのスイッチングにもよく用いられており、細胞内での最も簡便な制御機構である。これ以外にも多様な核移行制御機構が知られているが、その詳細なメカニズムは解明されていない部分が多い。

1.8 細胞周期依存的な核移行制御機構：出芽酵母の Importin Kap121p による核移行経路が細胞周期依存的に阻害される

新規の核-細胞質間の物質輸送の制御機構として核膜孔複合体内部での構成因子の再編成が関与するという報告がなされた (Makhnevych et al., 2003)。このようなメカニズムで起こる核移行制御は今までにない新しい制御機構である。これは出芽酵母で発見された制御機構で、importin の一つである Kap121p (別名 Pse1p) が深く関与する (Figure. 1-17)。

Kap121p は出芽酵母において生存に必須な蛋白質の一つであり、最初は蛋白質の分泌を促進する因子 PSE1 (Protein secretion enhancer) として発見された (Chow et al., 1992)。核内輸送する主要な cargo として Histone と ribosomal proteins がよく知られているが (Table.1-3)、これらを輸送する importin は Kap123p がすでに知られており、Kap121p は Kap123p の機能的なホモログであり、補助的な役割を持つにすぎないと考えられていた (Mosammaparast et al., 2001)。だが Kap123p は生存に必須ではないこと、Kap121p 特異的に運ばれる cargo の発見などがあり、Kap121p の機能はより特別なものである可能性が示唆されている (Chook and Suel, 2011)。Kap121p の cargo はいくつか同定されているが、詳細な相互作用機構などについての機能情報は不十分で、詳細な研究は未だ進んでいない (Leslie et al., 2006)。

出芽酵母は高等生物とは異なり、細胞分裂時にも核膜が消失しない closed mitosis を行う。そのため細胞分裂時にも積極的な核-細胞質間の物質輸送とその厳密な制御が正常な cell cycle の進行には必須となる。よって有糸分裂に関わる

多くの因子が核移行制御を受けていると考えられているが、その詳細な部分は不明な部分が多い。その中でこの Kap121p による核移行が細胞周期依存的に制御されることが知られていた。これは Kap121p 特有の cargo にのみ見られる現象で他の Importin により輸送される cargo には見られなかった。この輸送制御は Kap121p が nucleoporin の一つである直接 Nup53p と結合するために起こることが報告された。Kap121p は Nup53p との特異的な結合が知られており (Lusk et al., 2002)、その結合は K_D が nM オーダーの強い結合であることを今回確かめた。この特異的な Kap121p との結合は核膜孔複合体の生合成 (Nup53p の核膜孔複合体へのターゲティング) に関与することが示唆されていた。本研究で焦点をあてているのがこの Kap121p による核移行制御である。

Kap121p による細胞周期依存的な核移行制御機構 (Kap121p transport inhibitory pathway : KTIP) は次のような作業仮説がたてられている (Makhnevych et al., 2003)。Nup53p は自身の C 末領域に Kap121p と特異的に結合するドメイン Kap121p Binding Domain (KBD) を持っている。間期ではそのドメインが核膜孔複体内の別の nucleoporin、Nup170p と結合することで Nup53p の KBD はマスクされている。そのため間期には Kap121p は正常に核内に cargo を輸送する。一方 M 期になると核膜孔複体内での nucleoporin の再編成が起こることで、今までマスクされていた Nup53p の KBD が露出する。それにより Nup53p は Kap121p と結合できるようになる。この結合は Importin と FG-Nups の結合のような弱い結合ではなく、nM オーダーの強く、そして特異性の高い結合である。この結合によって Kap121p と cargo の結合は解離するとともに Kap121p は核膜孔複合体にトラップされる。そのため Kap121p による核移行の効率は極端に低下する。このようにして Kap121p による核移行は阻害されることが考えられている。だがその詳細な分子メカニズムは未だ解明されていない。

この細胞周期依存的な核移行制御は正常な細胞周期の進行に必須であることは知られていたが、その生物学的な意義は解明されていなかった。最近この一端が解明された (Cairo et al., 2013)。この KTIP が spindle assembly checkpoint (SAC) の構成因子の一つである Mad1p により制御されていることが報告された。

SAC はしばしば M-phase checkpoint と呼ばれており、細胞分裂時や減数分裂時に起こる現象で (Figure. 1-18)、適切な染色体の分離を完遂するために細胞周期を一時的に停止させる (Lara-Gonzalez et al., 2012)。SAC はゲノムの安定的な維持に必須であり、このプロセスに不全が起こると染色体の異常分離が生じる。この SAC ネットワークのメカニズムの研究は盛んであり、特に出芽酵母においてよく進んでいる。SAC の鍵となる構成因子として Mad1、Mad2、Mad3、Bub1、Bub3、Mps1 が見つかっている。SAC の下流のターゲットは anaphase promoting complex /cyclosome (APC/C) である。APC/C は細胞周期後期ではたらく E3 ユビキチンリガーゼで、mitotic cyclin を含む多くの蛋白質の分解を行うことで細胞周期の後期以降の進行を制御する重要な蛋白質複合体である。SAC の活性化により mitotic checkpoint complex (MCC) と呼ばれる Mad2、BubR1 (Mad3 の脊椎動物でのホモログ)、Bub3、Cdc20 からなる複合体が形成され、その MCC が APC/C の活性を阻害する。その阻害によって細胞周期は一時的に停止すると考えられている。Mad1p は SAC の引き金を引くトリガーとしてはたらいっていると考えられている。

KTIP の活性化には微小管のキネトコアからの解離がトリガーとして働くことが報告された。この解離は SAC の構成要素である Mad1p が鍵となる機能を果たしている。Mad1p は Nup53p、Nup60p/Mlp1p/Mlp2p 複合体を介して核膜孔複合体に局在していることが知られていた (Iouk et al., 2002)。また SAC の活性化によって Mad1p の局在が核膜孔複合体とキネトコアの両方に局在する (核膜孔複合体とキネトコアの間を激しく行き来する) ようになることが明らかとなっている (Scott et al., 2009)。この Mad1p のキネトコアへの局在は SAC を引き起こすために必要である。それをトリガーとして KTIP が引き起こされることがここでは報告された。この Mad1p のキネトコアへの局在は Ipl1p を活性化するために必要である。

Ipl1p は Aurora kinase の出芽酵母のホモログであり (Ke et al., 2003; Ruchaud et al., 2007)、この機能は出芽酵母からヒトまで広く保存されている。Ipl1p は INCENP (出芽酵母では Sli15p)、survivin、Borealin と chromosomal passenger complex (CPC) と呼ばれる複合体を形成しており、この複合体形成により Ipl1p の酵素活性、安定性および細胞内局在が厳密に制御されている。

CPC は細胞周期の分裂期後期までは inner centromere に局在し、その後 spindle midzone と equatorial cell cortex に局在が変化する。CPC は多くの基質をリン酸化することで、細胞周期の進行を制御している。特にキネトコアへの微小管の attachment 制御、染色体分離、細胞質分裂のために必要であることがわかっている (Figure. 1-19)。

このことから Ipl1p の KTIP への関与が考えられた。変異体の解析からこの Ipl1p の機能 (kinase 活性) が KTIP の活性化に必要であることが分かった。Ipl1p によるキネトコアと微小管の相互作用の不安定化が活性化のトリガーになると推測された。さらに KTIP の生物学的意義として一つの可能性が示唆された。ここでは Kap121p によって運ばれる cargo のひとつとして Glc7p と呼ばれる phosphatase を報告している。Glc7p は Ipl1p のアンタゴニストとして働くことが知られている。これらの結果から KTIP が引き起こされると Glc7p の核内輸送が阻害されるため、核内での Ipl1p の活性が持続的に続くと考えられ、これが細胞周期の正常な進行に関与していると推測されている (Figure. 1-20)。

だが、KTIP は SAC の制御に関わることは今回の報告から示唆されたが、その他の機能を持つ可能性がある。なぜならもしこの系だけに重要なのだとすれば Glc7p のみを制御する方がリーズナブルである。KTIP が Kap121p という核移行受容体そのものの機能を失活させる現象であるため、他の cargo の輸送阻害が別の細胞周期の機能に関与する可能性も十分に考えられる。今まで見つかった Kap121p の cargo のうち、唯一関与していると考えられるのは Cdh1p と呼ばれる APC/C のコアクチベーターである (Jaquenoud et al., 2002)。Cdh1p は G1-S 期に Kap121p により核内へ輸送され、APC/C を活性化する。一方 G2-M 期にはリン酸化されることで Exportin である Msn5p と結合できるようになり、核外へ輸送され、APC/C から隔離されることで、APC/C の活性を阻害することが分かっている。KTIP は Msn5p による核外輸送とカップリングすることで、効率よく Cdh1p を核外へ輸送すると考えられる。だが、Kap121p の輸送基質の同定は未だに不十分であるため、KTIP に関わる因子の同定は遅れている。KTIP の正確な生物学的意義を解明するためにはより多くの Kap121p の cargo を同定し、その機能を検証しなければならない。

Kap121p による核移行制御機構は核膜孔複合体が単なる静的な孔として機能

するだけでなく自身がダイナミックに構造を変化させる動的な側面を見ることができる斬新で、興味深い事例である。加えて、この核移行制御は細胞周期依存的に起こることから細胞周期の深い理解につながるため、その生物学的な意義は大きいといえる。また Importin レベルの核移行制御は cargo レベルの核移行制御とは異なり、一度に多くの cargo の輸送を制御できる。Cargo レベルの核移行制御はひとつの cargo に完全に依存するので、多くの場面で用いられているため事例も多く、その制御機構も単純であるため、分子メカニズムおよび生物学的な意義を理解するための研究が進んでいる (Kaffman, 1999; Jaquenoud et al., 2002)。だが、特定の Importin による核移行経路全体の阻害は発見されている事例が少なく未だ詳細なメカニズムの解明には至っていない。本研究は新しいレベルの核移行制御の意義に迫る核-細胞質間輸送分野における興味深い研究対象でもある。

本研究で対象としている核移行制御は closed mitosis を行う出芽酵母などの種でのみ見られる現象であるが、機能の一端を解明したことで open mitosis を行う種とも機能的な相関が保存されている可能性が示唆された (Cairo et al., 2013)。高等生物の核膜は細胞分裂時に消失し、核膜孔複合体も一時的に解体し、細胞内に散らばる非常に動的な面を有している。だがこの dissassembly が起こるのは late prophase である。KITP のトリガーとして機能すると考えられている Mad1p の核膜孔複合体とキネトコアのシャトリングは高等生物でも保存されており、その Mad1p のキネトコアへのリクルートは early prophase に起こる。この時期は高等生物でも核膜が存在しており、核-細胞質間の輸送システムを使用していると考えられる。そのため mitosis の初期で KITP に対応する核移行制御も存在しているかもしれない。

1.9 本研究の目的と特徴

現在までにいくつかの Importin、Exportin と cargo との複合体の結晶構造が解かれたことで、Karyopherin の cargo 認識機構の理解が進んでいる。しかし Karyopherin は出芽酵母で 14 種、ヒトでは 20 種以上知られているため、それは全体の 1/3 にしか満たない。核-細胞質間の物質輸送を真に理解するためには 2

つのことを解明する必要がある。1 点目が核膜孔複合体の全容解明、もう 1 点がすべての Karyopherin の機能の解明である。これらを統合して初めて核-細胞質間の輸送の全容解明に近づける。特に Karyopherin はそれぞれ個性がものすごく大きい、ひとつの機能を解明しただけでは不十分である。にもかかわらず研究が進んでいる Karyopherin は限られており、ゴールへの道のりはまだまだ遠いのが現状である。そのため機能未解明な Karyopherin 研究の生物学的な重要性は大きい。そのため本研究はこの意味でも価値は高い。

Karyopherin の一つ Kap121p は yeast において生存に必須な蛋白質でありながらその機能に関する研究は他の Karyopherin に比べて遅れている。本研究では Kap121p の Karyopherin としての機能を原子レベルで解明することを第一の目的として X 線結晶解析を用いて Kap121p 単独の構造、いくつかの Kap121p-cargo 複合体、Kap121p-Nup53p 複合体および Kap121p-RanGTP 複合体の結晶構造を最大で 2.2 Å の分解能で解明した。Kap121p の結晶構造は初めて本研究で明らかにした。またこれらの構造情報から Kap121p による cargo (NLS) 認識機構を解明し、Kap121p が特異的に認識するコンセンサスな NLS 配列を初めて同定することに成功した。加えて新規の基質の同定にも成功した。加えて RanGTP による cargo 解離機構を明らかにしたことで Kap121p による核移行サイクルの全容の解明に成功した。そしてこれらのメカニズムを構造情報に基づいて作製した変異体を用いた in vivo および in vitro での機能解析や速度論解析により検証した。

これに加えて Kap121p による核移行経路での細胞周期依存的な制御機構の中核となる部分の構造基盤を明らかにした。この制御機構は Nucleoporin である Nup53p と Kap121p との特異的な相互作用により起こることが分かっていたが、その詳細な部分は未解明であった。本研究においてその分子メカニズムの解明を目的として、X 線結晶解析により Kap121-Nup53p 複合体の結晶構造を解き、これらの構造情報から Nup53p による Kap121p の核移行阻害のメカニズムを明らかにした。この核移行制御機構は核膜孔複合体の構造変化により引き起こされる今までにない新しい制御機構である。また Nucleoporin との特異的な相互作用が核移行を負に制御している事例は他に見られない新しい機能であり、これを原子レベルで解明したことは非常に重要度の高い研究だといえる。

2、材料と方法

2.1. Kap121p-RanGTP 複合体の X 線結晶構造解析

2.1.1 遺伝子クローニングと発現

組み換え蛋白質として大量発現するために大腸菌株 XL1-Blue (Stratagene) を用いて cloning によりすべてのコンストラクトを作成した。GST-Kap121p (budding yeast, full length)は pGEX-TEV (Matsuura, Y. and Stewart, M, 2004) に組み込むことで発現させた。His/S-Ran (canine, 1-176)は pET30a-TEV (Matsuura and Stewart, 2004)に組み込むことで発現させた。作成したコンストラクトはすべて Bigdye Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems) を用いて DNA sequencing 反応を行い、名古屋大学遺伝子実験施設のシーケンス解析サービスにより、配列を確かめた。大量培養において大腸菌株の BL21-CodonPlus(DE3)RIL 株 (Stratagene) を用い、培地は 2xYT を用いた。全培養として 32 °C、220 rpm で一晩培養し、20 °Cにおいた後、IPTG を最終濃度が 0.5 mM になるように加えて induction を 20 °C、220 rpm、24 h 行った後に、集菌した。集菌した菌体は 20 mM Tris-HCl [pH 8.0]で洗浄後に、そのペレットを液体窒素で凍結し、-20 °Cで保存した。

2.1.2 Kap121p-RanGTP 複合体の精製

GST-tag を融合した Kap121p (full length) と His/S-tag を融合した Ran (1-176)を、それぞれ大腸菌を用いた大量培養により回収した。その後、Ni buffer G (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、5 mM MgAc、1 mM GTP、10 mM imidazole、7 mM 2-mercaptoethanol、0.5 mM PMSF、0.5 mM AEBSF)で再懸濁し、18,000 rpm、20' 遠心した。以後の操作はすべて 4 °C下で行った。その上清を 0.45 µm のフィルターでろ過後、bed volume 4 ml Ni-NTA resin へ load し、Ni buffer G および Ni buffer H (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、5 mM MgAc、25 mM imidazole)で洗った後、Ni buffer I (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、5 mM MgAc、250 mM imidazole)で溶出した。そのサンプルに 0.05 % Tween 20、0.2 mM AEBSF を加え、Glutathione-sepharose resin (GE Healthcare) 1.5 ml と混合し、4 °Cで一晩incubate した。その resin を buffer B (10 mM Tris-HCl

[pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 2 mM 2-mercaptoethanol)で洗い、0.2 mM AEBSF、His-TEV protease (0.1 mg/ml)を加えて一晩 4 °Cで incubate した。Resin を除いた上清を 100,000 rpm, 10' 超遠心後、buffer E (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 120 mM NaCl, 5 mM Mg Ac, 2 mM 2-mercaptoethanol)下で Superdex 200 (GE Healthcare)によりゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで精製した。1 mM GTP を加えた後、最終的な sample は濃縮により 15 mg/ml に調整した。メチオニンをセレノメチオニンに置換した Kap121p と RanGTP 複合体の精製についても同様のプロトコルで行い、最終的なサンプルを 20 mg/ml で調整した。ただしセレノメチオニンに置換した蛋白質の精製においては適時 Ar ガスを噴射し、酸化によるセレノメチオニンの分解を抑えながら行った。

2.1.3 Kap121p-RanGTP 複合体の結晶化

上記の方法で精製したそれぞれ蛋白質溶液を結晶化 sample として結晶化条件の探索を hanging drop vapour diffusion 法によって行った。結晶化用 24 穴プレートのウェルに結晶化母液を 0.5 ml 入れ、その後ドロップを蛋白質溶液 2 μ l と結晶化母液 2 μ l を混合して作成した。その後、20 °Cの部屋または incubator で結晶が出来るまで incubate した。Screening として 4 種の screen kit、PEG/ION screen kit、Protein complex crystallization screen kit、Crystal Screen Cryo Formulation および Protein complex crystallization screen (Radaev et al., 2006) を用いて結晶化を行い (Table.2-1, 2-2, 2-3, 2-4)、結晶の兆しが見られる条件を発見したら、さらに最適化を行った。具体的には沈殿剤の濃度、塩濃度、pH などを細かく変化させた条件を試すことで X 線結晶解析に適した大きさの単結晶の作成を目指した。その結果、約 4 日後 20 % PEG 3350、0.2M CaCl_2 、0.1 M MES [pH 6.5]の条件化で結晶の作成に成功した。初期条件で形成させた結晶を種として streak seeding を 10-14 % PEG 3350、0.2M CaCl_2 、0.1 M MES [pH 6.5] 条件下で行うことで、約 1 週間で 0.2 x 0.5 x 0.05 mm の六角形の単結晶に成長させた。

2.1.4 X 線回折データ収集

結晶はクライオループ (Hampton Research) ですくい、段階的に glycerol を含んだ結晶化母液に移した。具体的には 20-22 % PEG 3350、0.2M CaCl_2 、0.1 M MES [pH 6.5]、5-15 % Glycerol に 2~3 回に分けて、5' 静置して母液を完全に

置換した後、液体窒素により急速凍結させた。

最終的に構造解析に使用したデータセットは Spring-8 ビームライン BL41XU で収集した。データ収集はまずスピンドル軸周りの回転角を 90° 変えた 2 方向でテスト露光を行い、そのデータを用いて MOSFLM で指数付けを行い、データを収集する範囲の角度を strategy により決定し、X 線波長 1.0 \AA で、露光時間 1 秒、Attenuator 650 nm で測定した。また単波長異常分散法 (SAD; Single-wavelength Anomalous Diffraction) による位相決定のためにセレノメチオニン置換蛋白質で作成した結晶も同様にデータ収集を行った。まず XASF (X 線吸収微細構造) 実験を行い、peak (最大ピーク)、edge (吸収端)、edge - 200 eV、edge + 200 eV の波長を測定した (peak; 0.99789 \AA 、edge; 0.9793 \AA 、edge - 200 eV; 0.9950 \AA 、edge + 200 eV; 0.9641 \AA)。最終的に SAD のための X 線回折データに用いる X 線波長は peak 波長に相当する 0.9789 \AA で行った。

2.1.5 構造解析

構造解析に使用したデータは 2.7 \AA の分解能でデータセットを収集したものを用いた。すべての構造解析には MOSFLM と CCP4 program を使用した (Collaborative Computational Project Number 4, 1994)。この複合体の結晶は指数付けの結果、 $P3_221$ の空間群に属し ($a = b = 97.75$ 、 $c = 289.98$ 、 $\alpha = \beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 120^\circ$)、非対称単位当たり一分子の複合体を含むことが予測された。Kap121p の構造情報は存在しない。そのため位相決定および構造決定には program Phaser (McCoy et al., 2007) を用いて Cse1p-Kap60p-RanGTP 複合体 (Matsuura and Stewart, 2004) の RanGTP の構造の分子置換とセレノメチオニンによる SAD phasing を組み合わせて行うことで決定した。次に program Parrot (Cowtan, 2010) を用いた Density modification により解釈可能な電子密度を作成した。Model building には program Coot (Emsley and Cowton, 2004) を用い、refinement には program Refmac5 (Murshudov et al., 2011) を用いて、これらを繰り返すことで構造の精密化を行った。その結果、最終的なモデルは $R_{\text{free}} = 29.78 \%$ ($R_{\text{cryst}} = 26.06 \%$) まで精密化できた。

2.2 Kap121p-Ste12p (cargo) 複合体の X 線結晶解析

2.2.1 遺伝子クローニングと発現

GST-Kap121p (budding yeast, 80-90 を欠損させた Kap121p) は pGEX-TEV に組み込むことで発現させた。Kap121p-RanGTP 複合体の結晶構造から Kap121p 内に電子密度が見えない、いくつかの disorder した領域が観察された。本研究ではその一つの loop を除去することによって全長のコンストラクトでは全く出来なかった Kap121p の結晶を作成することに成功した。His/S-Ste12p (budding yeast, 581-649) は pET30a-TEV (Matsuura and Stewart, 2004) に組み込むことで発現させた。発現は 2.1.1 と同様のプロトコルで行い、induction は GST-Kap121p は 20 °C、24h で、His/S-Ste12p は 25 °C、5 h で行った。

2.2.2 Kap121p-Ste12p 複合体の精製

GST-Kap121p (80-90 を欠損させた Kap121p) と His/S-Ste12p (581-649) を、それぞれ大腸菌を用いた大量培養により回収した。その後両方のペレットを Ni buffer D (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、10 mM imidazole、7 mM 2-mercaptoethanol、0.5 mM PMSF、0.5 mM AEBSF) で再懸濁し、18,000 rpm、20' 遠心した。以後の操作はすべて 4 °C 下で行った。その上清を 0.45 µm のフィルターでろ過後、bed volume 4 ml Ni-NTA resin へ load し、Ni buffer D および Ni buffer E (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、25 mM imidazole) で洗った後、Ni buffer F (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、250 mM imidazole) で溶出した。そのサンプルに 0.05 % Tween 20、0.2 mM AEBSF を加え、Glutathione-sepharose resin (GE Healthcare) 1.5 ml と混合し、4 °C で一晩 incubate した。その resin を buffer B (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、0.05 % Tween 20、2 mM 2-mercaptoethanol) で洗い、0.2 mM AEBSF、His-TEV protease (0.1 mg/ml) を加えて一晩 4 °C で incubate した。Resin を除いた上清を 100,000 rpm、10' 超遠心後、buffer D (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、120 mM NaCl、2 mM 2-mercaptoethanol) 下で Superdex 200 (GE Healthcare) によりゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで精製した。最終的なサンプルは限外ろ過による濃縮により 15 mg/ml に調整した。

2.2.3 Kap121p-Ste12p 複合体の結晶化

結晶化は 20°C で hanging drop vapour diffusion 法によって行った。結晶化用 24 穴プレートのウェルに結晶化母液を 0.5 ml 入れ、その後ドロップを蛋白質溶

液 2 μ l と結晶化母液 2 μ l を混合して作成した。その後、20 °Cの部屋または incubator で結晶が出来るまで incubate した。その結果約一ヶ月後に 0.1 M HEPES [pH 7.0]、10 % 2-propanol、16 % PEG 20000 の条件化で結晶の作成に成功した。最適化を行った中で結晶化サンプルと混ぜる母液を 0.1 M HEPES [pH 7.0]、10 % 2-propanol、11-13 % PEG 20000 とし、ウェルに reserve する母液を 0.1 M HEPES [pH 7.0]、10 % 2-propanol、24 % PEG 20000 とすることで、約 2 週間で大きさが最大で 0.8 x 0.5 x 0.05 mm のプレート上の結晶に成長させた (Figure. 2-1A)。

2.2.4 X線回折データ収集

結晶はクライオルーブ (Hampton Research) ですくい、抗凍結剤として glycerol の入った結晶化母液 (0.1 M HEPES [pH 7.0]、10~15 % Glycerol、24 % PEG 20000) に移し、液体窒素に素早く投入して急速凍結させた。この際抗凍結剤を含む母液への置換は一度のみ行い、その置換時間も 1 ~ 2 秒程度にとどめた (長時間静置すると結晶が溶けるため)。最終的なデータセットは Photon factory のビームライン BL-17A で収集した。X線波長 0.98 Åで、露光時間 5 秒で測定した。

2.2.5 構造解析

2.2 Å分解能のデータセットを収集し (Figure. 2-1B)、MOSFLM と CCP 4 プログラムにより、データのプロセッシングを行った。Kap121p-Ste12p 複合体の結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属しており ($a = 77.57$ 、 $b = 126.16$ 、 $c = 130.78$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$)、非対称単位当たり一分子の Kap121p を含んでいると予想された。既に構造を解明した Kap121p-RanGTP 複合体の Kap121p の構造をサーチモデルとして分子置換を行った。最初全長の Kap121p をサーチモデルとして Molrep (Vagin and Teplyakov, 2010) を行ったが、うまくいかなかった。よって Kap121p に何らかの構造変化が予測された。そのため分子置換を行う際に、Kap121p の構造を中央部分で半分に分割し、それらの両方をサーチモデルとして Phaser を用いて構造解析を行ったところ良好な解が得られた。その後、Coot と Refmac5 を用いて構造の精密化を行った。最終的なモデルは $R_{\text{free}} = 25.62\%$ ($R_{\text{cryst}} = 21.53\%$) となった (Figure. 2-1C)。

2.3 Kap121p-Pho4p (cargo) 複合体の X 線結晶解析

2.3.1 遺伝子クローニングと発現

GST-Kap121p (budding yeast、80-90 を欠損させた Kap121p)を pGEX-TEV に組み込むことで発現させた。Pho4p はペプチド合成により作成した Pho4p の NLS を含むと考えられる residues 140-166 の 27 アミノ酸のペプチド (140 SANKVTKNKSNSSPYLNKRRGKPGPDS 166)を milliQ 220 μ l で溶解し、1 M Tris-HCl [pH 8.8]を加えることで pH を 7.0~8.0 に調製した (SIGMA Life Science)。最終サンプルは 28.5 mg/ml になるように調整した。

2.3.2 Kap121p-Pho4p 複合体の精製

Kap121p-Pho4p 複合体の調整はまず Kap121p を単独で精製した後、最終的に出来たサンプルに Pho4p のペプチドを加え、共結晶化を行う戦略をとった。

2.3.2.1 Kap121p 単独の精製

GST-Kap121p は大腸菌に大量発現させた菌体を回収後、1 xPBS、2 mM DTT、1 mM PMSF で再懸濁させ、氷上で sonication により菌体を破碎し、18,000 rpm、20' 遠心した。以後の操作はすべて 4 °C 下で行った。その上清に 0.1 % Tween 20 を加え、0.45 μ m のフィルターでろ過後、Glutathione-sepharose resin (GE Healthcare)と混ぜ、4 °C 下で 6 時間結合させた。その resin を buffer B (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 2 mM 2-mercaptoethanol)で洗い、Buffer C (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 7 mM 2-mercaptoethanol, 20 mM glutathione) で溶出させた。100,000 rpm, 10' 超遠心を行い、Superdex 200 (GE Healthcare)により buffer C (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol)下でゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで精製した。最終的なサンプルは限外ろ過による濃縮を行うことで調製し、最終濃度 20 mg/ml とした。

2.3.2.2 Kap121p-Pho4p 複合体の共結晶化のための sample 調製

2.3.2.1 で精製した Kap121p (20 mg/ml) と 2.3.1 で調製した Pho4p 合成ペプチドを用いて、Kap121p : Pho4p ペプチドを Mol/L 比が 1 : 2.5 の割合になるように混合し、on ice で 24 h 静置した。それを最終的な結晶化のサンプルとして

使用した。

2.3.3 Kap121p-Pho4p 複合体の結晶化

結晶化は 20 °C で hanging drop vapour diffusion 法によって行った。結晶が出来た条件は Kap121p-Ste12p 複合体の結晶と同じ条件で、2.2.3 の方法と同様の最適化の結果、同程度の大きさの結晶を得ることに成功した。

2.3.4 X 線回折データ収集

結晶はクライオルーブ (Hampton Research) ですくい、抗凍結剤として glycerol の入った結晶化母液 (0.1 M HEPES [pH 7.0]、10~15 % Glycerol、24 % PEG 20000) に移し、液体窒素に素早く投入して急速凍結させた。抗凍結剤を含む母液への置換は 2.2.4 と同様の方法で行った。最終的なデータセットは Spring-8 のビームライン BL41XU で収集した。X 線波長 1.0 Å で、露光時間 1 秒、Attenuator 450 nm で測定した。

2.3.5 構造解析

2.9 Å 分解能のデータセットを収集し、MOSFLM と CCP 4 プログラムにより、データのプロセッシングを行った。Kap121p-Pho4p 複合体の結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属しており ($a = 78.09$ 、 $b = 126.31$ 、 $c = 128.05$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$)、非対称単位当たり一分子の Kap121p-Pho4p 複合体を含んでいると予想された。これは Kap121p-Ste12p 複合体と同じ空間群であった。よって 2.3.4 で解いた Kap121p-Ste12p 複合体の Kap121p の結晶構造をサーチモデルとして、Molrep を用いて分子置換を行った。その結果、良好な電子密度マップが得られ、その中に Pho4p ペプチドと思われる明瞭な電子密度を観察できた。その後、Coot と Refmac5 を用いて構造の精密化を行った。最終的なモデルは $R_{\text{free}} = 26.82\%$ ($R_{\text{cryst}} = 22.43\%$) となった。

2.4 Kap121p 単独の X 線結晶解析

2.4.1 遺伝子クローニングと発現

GST-Kap121p (budding yeast、80-90 を欠損させた Kap121p) を pGEX-TEV

に組み込むことで発現させた。また変異体の作成には Quickchange system (Stratagene) を用いた。作成した変異体は Table. 3-6 に示した。

2.4.2 Kap121p 単独の精製

2.3.2.1 で行った精製と同一のプロトコルで行った。

2.4.3 Kap121p 単独の結晶化

結晶化は 20°C で hanging drop vapour diffusion 法によって行った。結晶が出来た条件は Kap121p-Ste12p 複合体の結晶と同じ条件で、2.2.3 の方法と同様の最適化の結果、同程度の大きさの結晶を得ることに成功した。

2.4.4 X 線回折データ収集

結晶はクライオルーブ (Hampton Research) である、抗凍結剤として glycerol の入った結晶化母液 (0.1 M HEPES [pH 7.0]、10~15 % Glycerol、24 % PEG 20000) に移し、液体窒素に素早く投入して急速凍結させた。抗凍結剤を含む母液への置換は 2.2.4 と同様の方法で行った。最終的なデータセットは Spring-8 のビームライン BL41XU で収集した。X 線波長 1.0 Å で、露光時間 1 秒、Attenuator 500 nm で測定した。

2.4.5 構造解析

2.9 Å 分解能のデータセットを収集し、MOSFLM と CCP 4 プログラムにより、データのプロセッシングを行った。Kap121p 単独の野生型の結晶は空間群 $P2_1$ に属しており ($a = 77.77$ 、 $b = 124.39$ 、 $c = 85.18$ 、 $\alpha = \gamma = 90^\circ$ 、 $\beta = 117.02^\circ$)、非対称単位当たり一分子の Kap121p を含んでいると予想された。上で解いた Kap121p-cargo 複合体のうち最も分解能の高かった Kap121p-Ste12p 複合体の Kap121p の結晶構造をサーチモデルとして、Molrep を用いて分子置換を行った。その後、Coot と Refmac5 を用いて構造の精密化を行った。最終的なモデルは $R_{\text{free}} = 24.74\%$ ($R_{\text{cryst}} = 20.12\%$) となった。変異体についても同様の解析を行うことで構造を解いた。詳細は Table. 3-1 に示した。

2.5 Kap121p-Nup53p 複合体の X 線結晶構造解析

2.5.1 遺伝子クローニングと発現

GST-Kap121p (budding yeast, 80-90 を欠損させた Kap121p)を pGEX-TEV (Matsuura and Stewart, 2004)に組み込むことで発現させた。His/S-Nup53p (budding yeast, 401-448) は pET30a-TEV (Matsuura and Stewart, 2004)に組み込むことで発現させた。発現は 2.1.1 と同様のプロトコルで行い、induction は GST-Kap121p は 20°C、24h で、His/S-Nup53p は 25°C、5h で行った。

2.5.2 Kap121p-Nup53p 複合体の精製

共発現により発現させた大腸菌を回収後、2.2.2 と同様のプロトコルで精製を行った。限外ろ過による濃縮により最終濃度 12 mg/ml のサンプルを得た。

2.5.3 Kap121p-Nup53p 複合体の結晶化

結晶化は 20°C で hanging drop vapour diffusion 法によって行った。結晶が出来た条件は Kap121p-Ste12p 複合体の結晶と同じ条件で、2.2.3 の方法と同様の最適化の結果、同程度の大きさの結晶を得ることに成功した。

2.5.4 X 線データ回折によるデータ収集

結晶はクライオループ (Hampton Research) ですくい、抗凍結剤として glycerol の入った結晶化母液 (0.1 M HEPES [pH 7.0]、10~15 % Glycerol、24 % PEG 20000) に移し、液体窒素に素早く投入して急速凍結させた。抗凍結剤を含む母液への置換は 2.2.4 と同様の方法で行った。最終的なデータセットは Photon Factory のビームライン BL5A で収集した。X 線波長 1.0 Å で、露光時間 5 秒で測定した。

2.5.5 構造解析

2.8 Å 分解能のデータセットを収集し、MOSFLM と CCP 4 プログラムにより、データのプロセッシングを行った。Kap121p-Nup53p 複合体の結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属しており ($a = 78.33$ 、 $b = 131.44$ 、 $c = 131.50$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$)、非対称単位当たり一分子の Kap121p-Nup53p 複合体を含んでいると予想された。Kap121p-Ste12p 複合体の Kap121p の結晶構造をサーチモデルとして、Molrep を用いて分子置換を行った。その後、Coot と Refmac5 を用いて構造の精密化を行った。最終的なモデルは $R_{\text{free}} = 29.67\%$ ($R_{\text{cryst}} = 26.06\%$) となった。

2.6 in vitro での結合実験

2.6.1 遺伝子クローニングと発現

GST-Kap121p (budding yeast)、GST-Ste12p (budding yeast)、GST-Pho4p (budding yeast)、GST-Nup53p (budding yeast)、GST-Gsp1p (budding yeast)は pGEX-TEV に組み込むことで発現させた。His/S-Gsp1p は pET30a-TEV に組み込むことで発現させた。His-CFP-Nup53p は pET15b に CFP を挿入したものに組み込むことで発現させた。作成したコンストラクトは Table 3-4 に示した。また変異体の作成には Quickchange system (Stratagene) を用いた。作成した変異体は Table. 3-5 に示した。

2.6.2 蛋白質の発現と精製

大量発現はいずれも腸菌株の BL21-CodonPlus(DE3)RIL 株 (Stratagene) を用いて行った。

GST-Kap121p は精製後に GST-tag を除去した後、すべての結合実験に用いた。精製は 2.3.2.1 で行った精製と同一のプロトコルで行った。GST-tag をもつ他の蛋白質は大腸菌に大量発現させた菌体を回収後、1 xPBS、2 mM DTT、1 mM PMSF で再懸濁させ、氷上で sonication により菌体を破碎し、18,000 rpm、20' 遠心した。以後の操作はすべて 4 °C 下で行った。その上清に 0.1 % Tween 20 を加え、0.45 µm のフィルターでろ過後、Glutathione-sepharose resin (GE Healthcare)と混ぜ、4 °C 下で 6 時間結合させた。その resin を buffer B (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 2 mM 2-mercaptoethanol)で洗い、Buffer C (100mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 7 mM 2-mercaptoethanol, 20 mM glutathione) で溶出させた。100,000 rpm, 10' 超遠心を行い、Superdex 200 (GE Healthcare)により buffer C (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol)下でゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで精製した。最終的なサンプルは限外ろ過による濃縮で 2-10 mg/ml に調製した。

His/S-tag をもつ蛋白質は大腸菌に大量発現させた菌体を回収後、Ni buffer A (30 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 7 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF)で再懸濁し、氷上で sonication により破碎し、

18,000 rpm、20' 遠心した。以後の操作はすべて 4 °C 下で行った。上清を回収し、0.45 µm のフィルターでろ過後、Ni-NTA resin(Novagen)を詰めた open column へ load し、Ni buffer A および Ni buffer B (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、500 mM NaCl、25 mM imidazole)で洗った後、Ni buffer C (30 mM Tris-HCl [pH 7.5]、500 mM NaCl、250 mM imidazole)で溶出させた。100,000 rpm、10' 超遠心し、Superdex 75 (GE Healthcare)または Superdex 200 (GE Healthcare)によりゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで精製し、限外ろ過による濃縮で最終的なサンプルを 2-5 mg/ml に調製した。

2.6.3 in vitro pull-down assay

すべての pull-down assay は binding buffer (1 xPBS、0.1 % Tween 20、0.2 mM PMSF、2 mM DTT)下で行われた。GST-tag 融合蛋白質を Glutathione-sepharose resin (GE Healthcare) 10 µl に 4 °C 下で 30' incubate することで結合させた。それぞれの結合反応は 4 °C で 1 h、50 µl の volume 下で行った。Incubate 後に beads を spin down し、その上清を unbound fraction として採取し、2 度の binding buffer 1 ml での洗いの後に beads に結合した蛋白質を SDS sample buffer により溶出させたものを bound fraction とした。それぞれの画分を SDS PAGE により分析し、CBB により染色した。また反応に用いた蛋白質の量はそれぞれの figure legend に詳述した。

また Ran を pull-down に用いる際には RanGTP form を形成させるために GTP exchange をあらかじめ行った。そのプロトコルは以下の通りである。精製した Ran に 10 mM EDTA、1 mM GTP、0.1 mM PMSF を加えて、25 °C で 1 h 静置した。その後、15 mM MgAc₂ を加えることで作成した。

2.6.4 in vitro competition assay

すべての assay は binding buffer 下で行われた。GST-tag 融合蛋白質を Glutathione-sepharose resin (GE Healthcare) 10 µl に 4 °C 下で 30' incubate することで結合させた。それぞれの結合反応は 4 °C で 1h、50 µl の volume 下で行った。Binding buffer 1ml で 2 回洗った後、競合させる蛋白質と 4 °C 下で 1 h、50 µl の volume 下で競合反応させた。Incubate 後に beads を spin down し、その上清を unbound fraction として採取し、2 度の binding buffer 1 ml での洗いの

後に beads に結合した蛋白質を SDS sample buffer により溶出させたものを bound fraction とした。それぞれの画分を SDS PAGE により分析し、CBB により染色した。また反応に用いた蛋白質の量は figure legend に詳述した。

2.7 SPR 解析

2.7.1 遺伝子クローニングと発現および蛋白質の精製

すべてのコンストラクトは 2.6.1 で作成したものを用い、精製は 2.6.2 と同様のプロトコルで行った。

2.7.2 表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR) による kinetics 測定

すべての測定には BIAcore 2000 (GE Healthcare)を用いた。すべての測定は 25 °C で 10 mM Tris [pH 7.5]、150 mM NaCl、0.005 % Tween 20 の組成の buffer D を用いて行った。抗 GST 抗体を carboxymethyldextran sensor (CM5)チップに NHS/EDC カップリングにより固定した。リガンドとして GST-cargo を流速 20 μ l/m で 30" 流すことで約 1000 resonance unit (RU)の濃度で固定化した抗 GST 抗体に結合させた。アナライトとなる sample は buffer により 5~6 段階に濃度を振り分けたものを調製した。流速 20 μ l/ml で 1' inject し、その後同じ流速で 3' buffer を流すことで、その解離をモニターした。それぞれの濃度での測定は 2 回行った。結合した蛋白質 (リガンドおよびアナライト) は 10 mM Glycine pH 2.2 を流速 20 μ l/m で 1' 流すことで溶出させて、チップを再生させた。結合および解離定数の解析は BIAevaluation version 4.1 (GH Healthcare) を用いて計算を行った。

結合定数および解離定数を算出するためのフィッティングカーブは 1 : 1 binding simplest (Langmuir) model : $A + B \rightleftharpoons AB$ にフィットさせた。解離定数 K_D は $K_D = k_d/k_a$ の式に基づいて算出した。実験値とフィッティングカーブの評価には χ^2 analysis により判断した。

2.8 出芽酵母での機能解析

2.8.1 遺伝子クローニングと発現

すべての DNA コンストラクトは大腸菌株 XL1-Blue (Stratagene) を用いて cloning により作成した。Complementation assay のためのコンストラクト作成には YCp ベクターである pRS315 (*CEN, LEU2*) または pRS316 (*CEN, URA3*) に Kap121p の内在性の promoter 領域 (Kap121p の ORF の上流 1650bp) と CYC1 terminator 領域を挿入した pRS316KC または pRS315KC を使用した。それに Kap121p の野生型および変異体のコンストラクトを組み込んだ。変異体の作成には Quickchange system (Stratagene) を用いた。作成した変異体は Table. 3-6 に示した。

また yeast を用いた import assay のためのコンストラクトは YCp ベクターである pRS313 (*CEN, HIS3*) に ADH1 promoter 領域と CYC1 terminator 領域を組み込んだ pRS313ADHC を用いた。そこへ Ste12p (581-688)、Pho4p (101-200) の C 末側に GFP を 2 つ融合させた DNA を組み込んだ。変異体の作成には Quickchange system (Stratagene) を用いた。作成した変異体は Table. 3-6 に示した。

2.8.2 出芽酵母での相補性検定

Kap121 は生存に必須な遺伝子である。このことを利用して結晶化および機能解析に用いた Kap121 変異体が出芽酵母の生育に影響を与えるかを検証した。Kap121p ヘテロ破壊株 Y20898 (BY4743; MAT a/α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YMR308c::kanMX4/YMR308c) (EUROSCARF より提供) に pRS316KC-Kap121p を形質転換により、導入し、液体の孢子形成培地下で 2~3 日 250 rpm、25 °C で培養することで孢子形成させた。SC-U+G418 培地下で四分子解析を行うことで、 Δ Kap121p の一倍体 (MATa; his Δ 1; leu2 Δ 0; LYS2; MET15; ura3 Δ 0; YMR308c::kanMX4) を取得し、それに pRS315KC-Kap121p の野生型および変異体を形質転換に導入した。それらの形質転換体を SC-UL と SC-L+5-FOA (0.4 mg/ml) に 6 段階に 1/10 ごとに希釈して 4 μ l ずつスポットティングを行い、30 °C で incubate した。これによりプラスミドシャッフリングさせることでそれらの相補性を検証した。Negative control として空ベクターを用い

た。

2.8.3 酵母の遺伝型の同定

2.8.2 で作成した一倍体 Δ Kap121p の株の遺伝子型を決定した。提供された二倍体出芽酵母は BY4743; MAT a/ α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YMR308c::kanMX4/YMR308c であったので、一倍体にしたときに不明となる遺伝子型は mating type と LYS および MET に対する栄養要求性の有無であった。栄養要求性に関してはこの一倍体を SC-UM および SC-UK 下での生存の有無により検証した。Mating type は mating-type tester である BY23529 および BY23530 (NBRP 提供) を用いた。これらの株の遺伝子型は BY23529 が MAT α ; arg6、BY23530 が MAT a; arg6 である。この株のそれぞれを今回作成した一倍体と混合して SC-URLH 下での生存の有無を検証した。

2.8.4 Nuclear import assay

すべての assay には Kap121p の欠損一倍体に pRS315KC-Kap121p を組み込んだ株を用いた。に pRS313ADHC-Ste12p (581-688) -GFP₂、pRS313ADHC-Pho4p (101-200) -GFP₂ の野生型または変異体を形質転換により導入した。それぞれの形質転換体を SC-LH 液体培地で 30 °C、250 rpm 24 h 培養後、OD₆₀₀ が 0.3 になるように植継を行い、4 時間培養後 0.2 M hydroxyurea (S phase arrest) または 15 μ g/ml nocodazole (G₂/M phase arrest) を加えて 3 時間培養し、細胞周期の特定の時期に arrest させた。これらの細胞は共焦点レーザー顕微鏡 FV1000D IX81 (OLYMPUS) により GFP の局在を観察した。

3 結果と考察

3.1 新規の Karyopherin : Kap121p の結晶構造

Karyopherin β family は出芽酵母で 14 種、高等生物では 20 種以上知られてい

るが、未だ機能の解明が遅れている Karyopherin が多数存在する。本研究では新しい Karyopherin である Kap121p の結晶構造を初めて解明することに成功した。この結晶構造から Kap121p における興味深い特徴を発見した。

3.1.1 結晶化と構造決定

3.1.1.1 Kap121p-RanGTP 複合体

Kap121p の構造情報は存在していないので、結晶化に最適なコンストラクトの作成が困難であった。そこで full length の Kap121p を用いて単独を含め様々な蛋白質との複合体で結晶化を試した。その結果、Kap121p-RanGTP 複合体でのみ結晶の作成に成功し、native の結晶で 3.0 Å 程度の分解能を得た。Kap121p は分子置換による位相決定が不可能であるため、Kap121p のメチオニンをセレノメチオニンに置換した結晶化サンプルを用いて結晶を作成し、単波長異常分散 (SAD) 法を用いた位相決定を試みた。興味深いことにセレノメチオニンに置換した結晶の方が native よりも良い分解能が得られ、最終的に 2.7 Å までの回折像を得た。このデータを、Phaser を用いて SAD と RanGTP をサーチモデルとした分子置換法を組み合わせることで位相の決定に成功し、全体構造を解明した。この構造から Ran は residues 5-176 と GTP および Mg^{2+} の明瞭な電子密度が、Kap121p は residues 2-1089 の電子密度が観察できた。この複合体の電子密度から Kap121p には全く見えないフレキシブルな長いループ部分を 2 ヶ所 (78-90、813-827) 確認することができた (Figure. 3-1)。

3.1.1.2 Kap121p 単独、Kap121p-cargo (Ste12p、Pho4p) 複合体および Kap121p-Nup53p 複合体

結晶化を最適にするためにこのループの 1 つ (80-90) を欠損させたコンストラクト Kap121p Δ L1 を作成した。このループを欠損させた理由は二点ある。一点目は Kap121p-RanGTP 複合体の結晶構造においてそのループ部分が disorder していたということ、二点目はこのループが他種の Kap121p ホモログとの配列比較を行ったところ、保存されていなかったためである。この変異体 (Kap121p Δ L1) は野生型の Kap121p を相補できることを in vivo で確認しており、また in vitro でも輸送基質や RanGTP との結合に影響がないことを確認している (Figure. 3-2)。よって機能的には野生型と同等であるといえる。よってそ

のループ欠損変異体を用いて単独、いくつかの輸送基質（Ste12p、Pho4p）および Nup53p との複合体において結晶化を行った。

その結果、約一ヶ月後に結晶化に成功した。しかし初期のスクリーニングで得られた条件ではこれらの結晶は結晶化の再現性が著しく悪かったため、より最適な結晶化条件の探索を試みた。数多くの条件検討の末、結晶化母液の reserved solution を結晶化サンプルと混合する母液よりも PEG 20000 の濃度を 2 倍にすることで蒸気拡散の効果を挙げることで結晶作成の再現性を向上させることに成功した。このようにして作成した結晶は最大で 2.2 Å（Kap121p-Ste12p 複合体において）までの回折パターンを得ることに成功した。既に構造を解明した Kap121p-RanGTP 複合体の Kap121p の構造をサーチモデルとして分子置換を行うことでこれらの構造を解明することに成功した。だが、全長の Kap121p を用いた分子置換では解が得られなかった。そのため Kap121p に大きな構造変化が予測された。そこで分子置換を行う際に、Kap121p の構造を中央部で半分に分け、それらの両方をサーチモデルとして Phaser を用いて分子置換を行った。以後の構造解析は分解能が最も良い Kap121p の構造をサーチモデルとして Molrep による分子置換法で構造を決定した。これらの構造から Kap121p では full length にあたる残基 1-1089 の電子密度が観察できた。ただ内部で電子密度が見えない領域がいくつか見られた（546-549、813-816、891-897）。複合体の構造では cargo または Nup53p と思われる明瞭な電子密度が観察でき、作成した結晶が確かに複合体の結晶であることを確かめることができた。結合していた蛋白質については見えた電子密度からそれぞれ Pho4p が 141-150、Ste12p が 606-617、Nup53p が 405-412 を同定した。

3.1.2 Kap121p の結晶構造

3.1.2.1 全体構造

Kap121p の全体構造は構造情報が存在していないが、他の Karyopherin family と類似した α -helix からなる構造を有しているとアミノ酸配列から予測されていた。今回解いた結晶構造から Kap121p は右巻きの螺旋構造をしており、24 の HEAT repeats により構成されていた（Figure. 3-3）。Karyopherin family は共通して HEAT リピートを持っている。そしてそれぞれの Karyopherin の個性が表

れるのが HEAT helix 間に見られる insert である。Kap121p はほとんど α helix で形成されていたが、その HEAT repeat の間にいくつかの特徴的な insert を確認することができた。それは2つの長い loop と特徴的な globular な折りたたみ構造を持つ小さな insert であった。興味深いことに、このような domain-like な構造は今まで構造が解かれているすべての Karyopherin family で見られない新規の insert であった。

3.1.2.2 Kap121p 分子内の特徴（分子内相互作用）

3.1.2.1 で記述したように Kap121p には特徴的な insert が三ヶ所確認できた。1つ目が HEAT 8 の間にある loop (320-342: 以後 HEAT 8 loop と呼ぶ) であり、一般に acidic loop として他の Importin では RanGTP との相互作用に使われることが知られている。この HEAT 8 loop も酸性アミノ酸に富んだ配列を有していた (³²⁰EVSI³⁴²DDDDAAEWIESDDTDDEEE³⁴²)。だが興味深いことに HEAT 8 loop は HEATs 9-12 の一部と相互作用していた (Figure. 3-4)。この HEAT 8 loop は複数の静電相互作用 (E320、D327、E333、E342) と V321、W331 による疎水性相互作用により、広範囲に HEATs 9-12 と結合しており、この loop はほとんど flexibility を持たないと考えられる。そのためここでは Kap121p の構造安定性に深く関わっていることが示唆された。Kap121p は HEAT 8 と HEAT 9 の間で一度 left handed twist が見られており、この構造を安定に維持するために必要な loop であると示唆される。

残り二つの loop と insert も Kap121p 分子内部の相互作用に関与していたが、HEAT 8 loop とは異なり非常に離れた場所で相互作用を形成していた。その一点目が 3.1.2.1 で述べた insert を介した相互作用で HEAT 15 の A-helix と B-helix の間に形成されていたため、HEAT 15 insert (636-668) と名付けた (Figure. 3-5B)。HEAT 15 insert は3つの逆平行の β -sheet と1つの α -helix により形成されていた。HEAT 15 insert の先端部にある acidic な cluster (⁶⁴²EEEE⁶⁴⁵) が自身の HEAT 2 の B-helix にある塩基性残基 (R72、K73) とイオン結合により相互作用していた。この相互作用はサイトが少なく、それほど強い結合ではないことが示唆される。また HEAT 15 insert 領域の電子密度は少し弱く、いくつかの側鎖の電子密度は観察できなかった。そのためこの領域にいくらかの flexibility あることが推測された。

二点目が HEAT 18 の A-helix と B-helix をつなぐ長いループ (809-829) を介

した相互作用でこのループを HEAT 18 loop と名付けた。HEAT 18 loop は一部 disorder している領域 (813-816) が存在しており、その領域の電子密度は見られなかった。HEAT 18 loop は自身の HEATs 5-7 の B-helix により形成される groove に多数のイオン結合、疎水性相互作用を介して相互作用していた (Figure. 3-5A)。興味深いことに、これら 2ヶ所の分子内相互作用により Kap121p は閉じた構造に安定化していた。Karyopherin family における分子内相互作用は他の karyopherin (Kap β 2、Crm1) でも見つかっているが、その相互作用メカニズムおよび機能的な意義は非常に個性に富んでおり、今回見つけた相互作用とは異なっていた。

3.2 Kap121p による輸送基質 (cargo) 認識機構と特異的 NLS の同定

本研究では Kap121p-cargo 複合体の結晶構造からその特異的な結合メカニズムを原子レベルで解明した。そして複数の cargo との複合体を同時に解き、それらの相互作用を比較することで、Kap121p が特異的に認識するシグナル配列である NLS を初めて同定した。

3.2.1 Kap121p-cargo (Ste12p、Pho4p) 複合体の結晶構造

3.2.1.1 複合体の結晶構造に使用した Kap121p の特異的な cargo

Kap121p の輸送基質はこれまでにいくつか知られているが (Rout et al., 1997; Chaves et al., 2001; Delahodde et al., 2001; Isoyama et al., 2001; Leslie et al., 2002; Ueta et al., 2003; Kashyap et al., 2005; Leslie et al., 2006)、その正確な NLS の配列の同定は単純なアミノ酸配列の比較だけでは不可能であった。本研究では既に知られている輸送基質の中で Pho4p、Ste12p の 2 種類を選択した (Figure. 3-7A,B)。これら二種の cargo は in vitro での Kap121p との結合が十分に強いものだったため、用いた。Pho4p は転写因子の 1 つで細胞外のリン酸濃度の変化に反応して活性化することが知られており、リン酸飢餓時に特異的な遺伝子発現を調節している。自身のリン酸化によりその局在が非リン酸化時には核内に、リン酸化時には細胞質に局在するように制御されている。これによ

リリン酸の飢餓に反応して核内に入り、遺伝子発現を誘導することができる。このリン酸化により Importin である Kap121p との結合が阻害されるために核移行が止まることが局在の変化につながる (Kaffman et al., 1998)。Ste12p は転写因子の 1 つで、mating、budding pattern の変化、cell differentiation に必要であり、シグナル伝達において中心的な役割を果たすことが知られている (Pi et al., 1997; Leslie et al., 2002; Wang and Dphlman, 2004) (Figure. 3-8)。すでに Kap121p と結合する領域は同定されており、Pho4p が 140-166、Ste12p は 494-688 であった。Pho4p は短い長さであるので、その領域を合成ペプチドとして用いた。Ste12p は数多くのコンストラクトによる最適化の結果、581-649 の領域を最終的なコンストラクトとして結晶化に用いた。

3.2.1.2 Kap121p-cargo 複合体の精製、結晶化

この二種類の cargo についてコンストラクトの最適化を行いながら、精製、結晶化を試みた。Kap121p はた Pho4p については上で記したように単独で精製した Kap121p Δ L1 と Pho4p 合成ペプチドを混合して共結晶化を行うことで結晶を作成した。Ste12p は 581-649 を最適なコンストラクトとして用いて複合体として精製し、結晶化を行った。その結果、それぞれで目的の結晶が得られ、X 線結晶解析により、Kap121p-Pho4p 複合体は 2.9 Å の分解能で、Kap121p-Ste12p 複合体は 2.2 Å の分解能でその構造を解くことに成功した。

3.2.1.3 Kap121p-cargo 複合体の全体構造

複合体の全体構造は単独の構造とほぼ同一であり (主鎖 Ca で比較したところ r.m.s.d が Kap121p 単独と Kap121p-Ste12p 複合体では 1.8 Å、Kap121p 単独と Kap121p-Pho4p 複合体では 1.6 Å であった)、よって cargo の結合は Kap121p にほとんど構造変化をもたらさないと予想される。これはエネルギー的な観点からも効率よく cargo と結合し、核内に輸送するために reasonable であると考えられる。得られた複合体の構造から輸送基質のと思われる明瞭な電子密度が Kap121p の螺旋構造の内側中央部分 (HEAT repeats の 8-12 または 8-13 の部分に相当) に共に観察出来た (Figure. 3-9A, B)。観察された電子密度マップから相互作用している配列は Ste12p では 606-617 の 12 残基が、Pho4p では 141-150 の 10 残基であることが同定できた。これらの輸送基質は特定の二次構造をとらずに相互作用しており、結合しているペプチドの向きは Kap121p の超

螺旋と反対の方向であった。

3.2.1.4 結晶構造で観察された Kap121p と cargo の詳細な相互作用

Kap121p と結合している Ste12p の配列は ⁶⁰⁶SAKISKPLHIKT⁶¹⁷ であり、Kap121p は K608^{Ste12p}、I609^{Ste12p}、K611^{Ste12p}、H614^{Ste12p} の側鎖との特異的な相互作用およびいくつかの主鎖との相互作用により結合していた。K608^{Ste12p}、K611^{Ste12p}、H614^{Ste12p} の側鎖は Kap121p の酸性領域を形成する D353、E396、E480 と静電相互作用により結合していた。I609^{Ste12p} の側鎖は Kap121p の C429、N430、G433、Q434、H470、A473、N477 により形成される中性のポケットにはまるように疎水性相互作用により結合していた (N477 は I609^{Ste12p} の主鎖と水素結合を形成)。また A607^{Ste12p} の主鎖が Q512 と、I615^{Ste12p} の主鎖が Q350 と水素結合により相互作用していた。加えて S610^{Ste12p} の主鎖が R349、N430、Q434 と水分子を介して相互作用していた。このような相互作用で Kap121p は Ste12p と結合していた (Figure. 3-12, 3-13)。

Kap121p と結合している Pho4p の配列は ¹⁴¹ANKVTKNKSN¹⁵⁰ であり、Kap121p は Ste12p と同様に K143^{Pho4p}、V144^{Pho4p}、K146^{Pho4p}、N147^{Pho4p}、K148^{Pho4p} の側鎖の特異的な認識およびいくつかの主鎖との相互作用により結合していた。K143^{Pho4p}、K146^{Pho4p} および K148^{Pho4p} は Kap121p の酸性領域を形成する D353、E396、E480 との静電相互作用により結合していた。V144^{Pho4p} は Kap121p の C429、N430、G433、Q434、H470、A473、N477 により形成される中性のポケットにはまるように結合していた (N477 は V144^{Pho4p} の主鎖と水素結合を形成)。Pho4p ではこれに加えて、N142^{Pho4p} の側鎖が Q512、K556 と、N147^{Pho4p} の側鎖が D338 と、S149^{Pho4p} の主鎖が Q350 と水素結合により相互作用していた。このような相互作用により Kap121p は Pho4p と結合しており、その結合特異性は Ste12p と非常に類似していたが、Ste12p に比べて相互作用している領域は多く、Pho4p は HEAT 13 にも結合していた (Figure. 3-14, 3-15)。

3.2.2 Kap121p と cargo との相互作用における機能解析

結晶構造から得られたこれらの相互作用が溶液中および細胞内でも同一であるかを検証するために in vitro および in vivo での機能解析を行った。

3.2.2.1 cargo の結合に影響を及ぼす Kap121p 変異体の機能解析

まず cargo の結合に関わる Kap121p のアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異体を作成し、in vitro での pull-down assay を行った。輸送基質との相互作用に関わる残基として R349、Q350、D353、E396、N430、D438、N477 の 7 残基に注目した。これらのいくつかのアミノ酸を置換した変異体を作成し、pull-down assay を行った (D353K, D353K/E396K, D353K/E396K/D438K, D353A/E396A/D438A, R349A/Q350A/D353A/E396A/N430K/D438A/N477A)。その結果、すべてに変異体で結合が弱まった。特に NLS の K を認識する為に必要なアミノ酸である D353、E396、D438 をすべて反対の電荷を持つアミノ酸 (Lysine) に置換した 3 重変異体 (3K : D353K/E396K/D438K) および NLS の V/I および K を認識するアミノ酸のすべてに変異を加えた 7 重変異体 (7m:R349A/Q350A/D353A/E396A/N430K/D438A/N477A) においてその結合がほぼ失われるほど、強い影響が出た (Figure. 3-18A, B)。特に影響の強かったこれらの変異体を用いて in vivo での影響を見た。yeast を用いた complementation assay によりその相補性を検証した所、両方の変異体において致死性の表現型を示した。Negative control としてベクターのみを、positive control として野生型の Kap121p を用いた (Figure. 3-18C)。

今回作成したこれら 2 種類の変異体 (3K、7m) の影響がアミノ酸の側鎖の変異だけによるものであり全体の構造が野生型と同一であること (変異体の影響が全体構造の異常によるものではないこと) を検証するため、これらの 2 種類の変異体 (3K、7m) についても X 線結晶解析による構造解明を行った (Figure. 3-19, 3-20)。その結果、野生型の Kap121p と同一の結晶化条件で結晶を作成することに成功した。そしてそれぞれの変異体を 2.6 Å 分解能 (7mt)、3.2 Å 分解能 (3K) でそれらの立体構造を解き、全体構造に変化がなく変異体の効果がアミノ酸側鎖の変異だけによることを確かめた ($C\alpha$ の r.m.s.d がそれぞれ 0.38 Å と 0.28 Å であった) (Figure. 3-21)。Kap121p は essential な蛋白質であるのでこれらの変異体では輸送能が完全に失われた結果、致死の表現型が出たと考えられる。

3.2.2.2 cargo の変異体の機能解析

Kap121p との相互作用に関わるアミノ酸に変異を加えた cargo の変異体を用いて機能解析を行った。Pho4p と Ste12p でその配列を比較したところ、KV/lxK の並びが完全に保存されていた。Pho4p-NLS (101-200) において保存性が高かった V144 と K146 の 2 アミノ酸に注目し、計 6 種類 (V144A、V144W、K146A、K146E、V144A/K146A、V144W/K146E) の変異体を作成し、pull-down assay により結合力の変化を検証した。その結果すべての変異体で結合が野生型に比べて低くなった。詳細に比較したところ、K146 の変異体 (K146A、K146E) は V144 の変異体 (V144A、V144W) よりも結合が弱まっていた (Kap121p との結合において K146 の方が V144 よりも影響が大きいと示唆された)。そして 2 重変異体ではその結合はほとんど失われた。よってこの二つのアミノ酸が結合に特に重要であると考えられる (Figure. 3-22B)。

そして影響の大きかった V144W/K146E 変異体を用いて in vivo で検証するために、出芽酵母による import assay を行った。野生型および変異体の Pho4p の C 末に GFP タンデムに融合させたコンストラクトを用いて yeast 内での局在の変化を GFP 蛍光により調べた。その結果、野生型では核に局在したのに対して変異体では細胞全体に広がっていた (Figure. 3-23C-D)。これらの in vitro および in vivo の結果から結晶構造から得られた構造が生理条件でも同様に起こることを証明できた。

次に Ste12p-NLS (581-688) においても同様に I609、K611 に注目して変異体を作成し、in vitro において pull-down による機能解析を行った (Figure. 3-22A)。その結果 I609W/K611K の Ste12p 変異体では結合が野生型の 1/3 程度に減少しただけにとどまっていた。Pho4p では結合が完全に消失した変異体と同等の変異体を用いたにも関わらず、Ste12p ではその影響が低かったため、その原因として、いくつかの可能性が考えられた。まずは Pho4p よりも結合領域が大きい可能性を考えたが、今回解いた結晶構造を比べたところ、結合領域にほとんど差は見られなかった。よってその可能性は低いと結論づけた。もう一つの可能性として、Ste12p には複数の NLS をもっていることを推測した。このことを検証するために、Ste12p の配列を確認した。その結果、今回同定された NLS 部分のすぐ上流にもう 1 つ推定的な NLS 配列 (以後結晶構造から同定した NLS を NLS 1 定義し、配列から導きだした NLS を NLS2 と定義した) を発見した

(⁶⁰³VGKSAK⁶⁰⁸)。興味深いことに2つのNLS配列は一部重なって存在していた。そこでI609、K611に加えてV603、K605、K608にも注目し、それらのアミノ酸のすべてに変異を加えた2種類の5重変異体(V603A/K605A/K608A/I609A/K611A、V603W/K605E/K608E/I609W/K611E)を作成し、pull-down assayを行った。その結果二つの変異体Ste12pとKap121pとの結合はほとんど失われた。

この5重変異体のSte12p(V603W/K605E/K608E/I609W/K611E)を用いてPho4pと同様にyeastによるimport assayを行った。野生型では核に局在したGFP蛍光が、変異体では細胞全体に広がった(Figure. 3-23A-B)。よってSte12pのもつ2つのNLSはどちらも機能を持っていることが明らかとなった。

2つのNLSについてより詳しく調べるために片方のNLSのみを有する変異体(NLS1の変異体:I609W/K611E、NLS2の変異体:I609W/K611E)を用いて結合力の変化を見た。その結果、I609W/K611E変異体では結合が野生型の約1/3まで減少したが、V603W/K605E変異体では結合は野生型とほとんど変わらなかった。よって結晶化で明らかとなったNLSの方がNLS2に比べて結合力が強いといえ、溶液中ではNLSが主要な結合サイトであり、NLS2は補助的な機能を果たすことが示唆される。今回結晶化に用いたSte12pのコンストラクトはNLS1とNLS2の両方の配列を含んでいたが、電子密度から当てはめられるSte12pの配列は明らかにNLS1の方であるため、この可能性は高いといえる。またこの2つのNLSは非常に接近した位置に存在している。このため2分子のKap121pが同時に結合することは物理的に不可能だと考えられる。よってこの2つのNLSは干渉し合っていることが示唆される。この2ヶ所のNLSが連続して存在することはKap121pが効率よくcargoと結合するために必要だと推測される。すなわち次のようなプロセスが考えられる。アプローチできる部分が二ヶ所あればKap121pがSte12p内のNLSを見つけて、複合体を形成する速度がNLS一ヶ所に比べて上昇する。その後、より安定な結合を形成できるNLS1との結合に安定化するというものである。これは3.3.3.2で行ったSPR解析の結果とも一致する。

3.2.3 Kap121pが特異的に認識する保存されたNLSの同定

これら2つの相互作用機構および変異体を用いた機能解析から Kap121p が認識する保存された NLS 配列を KV/IxKx₁₋₂K/H/R と同定できた (Figure. 3-24)。この配列は Importin α が認識する classical NLS とともに Karyopherin β 2 が認識する PY-NLS のどちらとも異なる全く新しい NLS であった。既に知られている Kap121p の cargo のアミノ酸配列を調べた所、今回結晶構造から推測した配列と同一の NLS 配列を有していることが明らかとなった。配列の並びを詳細に比較した所、特に保存性の高い領域が I/VxK の並びであり、これはすべての cargo で保存されていた。そしてこれを補助するようにその N 末側と C 末側の両側またはどちらかに塩基性アミノ酸が配置していた。さらにいくつかの NLS には I/VxK の直後に N が見られた。この配列比較から Kap121p が認識する NLS は core となるアミノ酸配列とそれを補助するアミノ酸の2つの部分から構成されていることが示唆された。これは認識する配列の可塑性を高め、より多くの cargo を認識して結合するための戦略の一つであると推測される。

3.2.4 Kap121p の種内および種間における保存性

3.2.2 で解いた結晶構造から cargo の認識に重要であると考えられる Kap121p のアミノ酸の同定に成功した。そこで Kap121p の進化的な保存性を検証するために異なる種間でのアミノ酸配列の比較を行った (Figure. 3-6)。ここでは出芽酵母内で Kap121p と機能的ホモログである Kap123p、配列の類似性の高い高等生物の Kap β 3 (ここでは Human、Mouse、Xenopus を用いた) を用いて Kap121p とのアミノ酸配列の比較を、CLUSTALW を用いて行い、Jalview を用いて解析を行った (similarity が 65.2 %、identity が 28.3 %)。その結果、cargo との相互作用に必要なアミノ酸の多く (今回変異を加えてアミノ酸 7 つのうち 5 つ) が高等生物でも完全に一致していたが、Kap123p ではほぼ異なるアミノ酸が位置していた。この結果から、Kap121p が認識する NLS は高等生物でも保存されている可能性が考えられる。現在までの研究報告からは Kap β 3 が認識する cargo が今回結晶構造から同定した Kap121p の NLS を持つという報告はなく、塩基性アミノ酸に富んだ配列を認識するという報告しかない (Hutchinson et al., 2011)。この配列は Importin α が認識する classical NLS と非常に類似している。だが、Kap β 3 は Kap121p と同様に histone や ribosomal proteins を運ぶことが

報告されているため、Kap β 3 が認識する NLS は複数あり、今回同定した Kap121p 特異的 NLS と同じまたは類似した配列を認識して、結合するかもしれない。また出芽酵母の Kap123p は histone や ribosomal proteins を運ぶ Importin として知られており、Kap121p が運ぶ cargo と一部同じものを運ぶため機能の redundancy が示唆されたため、機能的なホモログであるという報告がなされていた。だが、今回の結果から Kap123p は Kap121p が特異的に認識する NLS とは相互作用できない可能性が高いと考えられる。今回用いた Pho4p と Ste12p は Kap121p 特有の cargo であることが報告されているため、Kap123p の機能の redundancy には 2 つの可能性が考えられる。1 点目は Kap121p には複数の NLS 結合サイトが存在しており、Kap123p にも結合する cargo は他の場所に結合するという可能性、2 点目は Kap123p が特異的に認識する NLS はまた別の配列が存在しており、Kap121p と Kap123p の両方により運ばれる cargo は両方の NLS を持っているという可能性である。そこでいくつかの histone および ribosomal proteins の配列を調べたところ、Kap121p が特異的に認識する NLS 配列を有するものが多く見つかった (Figure. 3-24)。この結果から 2 点目の可能性が高いと考えられる。だがこのことを直接証明するためには Kap123p と cargo の複合体の結晶構造を解く必要がある。

3.3 Nup53p による Kap121p 認識機構と核移行阻害機構の解明

Nup53p がどのように Kap121p と結合し、輸送基質を解離するか（すなわち Kap121p に仲介される核移行を阻害するか）を分子レベルで解明するためには Kap121p-cargo 複合体と Kap121p-Nup53p 複合体の結晶構造を解く必要がある。本研究では既に Kap121p-cargo 複合体の構造解析に成功しているので、次に Kap121p-Nup53p 複合体の結晶構造を解いた。これらの構造比較からそのメカニズムについて詳細に報告する。

3.3.1 Kap121p-Nup53p 複合体の結晶構造

Nup53p の Kap121p binding domain として領域が 401-448 と既に同定されていたので (Figure. 3-7C)、その部分を用いて Kap121p との複合体として精製、

結晶化を行い、その結晶構造 2.8 Åを解いた。その全体構造は Kap121p-cargo 複合体の構造と非常に類似しており (Kap121p-Pho4p 複合体と比べた所 C α の r.m.s.d が 0.9 Åであった)、で Nup53p が結合している領域は cargo が結合している領域 (HEATs 8-12) と一致した (Figure. 3-10A)。

3.3.2 Kap121p と Nup53p との相互作用は cargo との相互作用と同一のメカニズムである

構造情報から得られた電子密度は興味深いことに輸送基質結合サイトと同一の領域に見られ、Nup53p が NLS に類似した配列で結合していたことを発見した (⁴⁰⁶KVSKNST⁴¹²)。相互作用も輸送基質のそれと全く同一であった。K406^{Nup53p}、K409^{Nup53p} は Kap121p の酸性領域を形成する S392、S393、E396、E480 との静電相互作用により結合していた。V407^{Nup53p} は Kap121p の C429、N430、G433、Q434、H470、A473、N477 により形成される中性のポケットにはまるように結合していた (N477 は V144^{Nup53p} の主鎖と水素結合を形成)。また N410^{Nup53p} の側鎖が Q350 と D338 と水素結合により相互作用していた (Figure. 3-16, 3-17)。これに加えて F405^{Nup53p} の主鎖が Q512 と、T412^{Nup53p} の主鎖が Q350 と水素結合していた。これらの構造情報から Nup53p は輸送基質と直接競合することで Kap121p と結合し、Kap121p による物質の核移行を阻害していると示唆される。

3.3.3 Nup53p 変異体の機能解析

3.3.3.1 pull-down assay および competition assay

この相互作用が溶液中でも同様に起こるかを検証するために in vitro での pull down assay を Nup53p-KBD (401-448) の変異体を用いて行った。3 重変異体 (K406E/V407W/K409E)を用いて pull-down assay を行った結果、Kap121p との結合がほとんど失われた (Figure. 3-27A)。

次に in vitro で Nup53p の Kap121p による核移行制御 (Kap121p-cargo 複合体から Kap121p を奪うこと)を再現するために競合実験を行った (Figure. 3-25)。

その結果、in vitro で Nup53p は Ste12p (cargo) と競合することで Kap121p と結合することを確認した。だが、Nup53p の競合力は極端に強くなく、Kap121p との結合アフィニティーは cargo のそれと同程度であると考えられる。そのアフィニティーを定量的に解明するために SPR 解析を行った。測定方法および解析方法の詳細は 3.3.3.2 に示したが、 K_D はほぼ等しかった。詳細な測定結果は後の 3.3.3.2 に示す。でよってこれは competition assay の結果を裏付けている。さらにこの競合が直接起こることを検証するために Ste12p の mild な変異体 (pull-down レベルでは野生型と結合アフィニティーが変わらない変異体) を用いて、competition assay を行った。その結果、Ste12p の変異体 (V603A/K605A、V603W/K605E) を用いると Nup53p の競合力が野生型と比べて上昇した。また Nup53p の変異体 (V407A/K409A、K409A) を用いると、Nup53p の競合力が低下した。これらの結果から Nup53p と Ste12p は結晶構造から得られた相互作用を用いて直接競合していることを証明した。

3.3.3.2 SPR 解析

Kap121p と cargo の NLS または Nup53p との結合を定量的に測定するために表面プラズモン共鳴 (SPR : Surface Plasmon Resonance) を行った (Figure. 3-26)。Simple 1:1 binding model により測定により得られた binding curve を解析した所 Pho4p とでは $K_D = 3.0 \times 10^{-8}$ M で、Nup53p とでは $K_D = 4.2 \times 10^{-8}$ M であった。Pho4p NLS と Nup53p KBD はほぼ同等のアフィニティーであり、Nup53p の結合は直接競合により cargo を解離させるために十分強いと言える。だが一方 Ste12p とでは Simple 1:1 binding model ではうまく fitting が出来なかった。これは Ste12p には複数の NLS が存在しているため、このモデルと合わなかったと考えられる。

3.3.4 結晶構造から導きだされる Nup53p による核移行制御機構 (Nup53p と cargo は直接競合する)

得られた結晶構造およびその結晶構造に基づいた変異体を用いた機能解析 (結合実験および速度論解析) から Nup53p は輸送基質と直接競合することで Kap121p と結合することを証明した (Figure. 3-27C)。だが結合様式は cargo

と Nup53p で完全に同一であるので、この競合は passive に起こることが示唆された。In vitro での競合実験においては同一濃度で cargo（ここでは Ste12p）と Nup53p の競合力を比較したところ、ほぼ同程度か、Nup53p の方が弱いように思われる結果が得られた。実際 Kap121p と Nup53p の解離定数と Kap121p と cargo（Pho4p）の解離定数はほぼ同じ値であることを定量的な解析から明らかにしており、溶液中では結合する比率はほぼ等しいと言える。よって Nup53p による Kap121p の核移行阻害は passive に起こる cargo との直接競合により起こると結論づけた。

では細胞内で Nup53p はどのようにして効率よく Kap121p は cargo から奪い、結合するのだろうか。ここで推測されるのは Nup53p の局在する場所である。Nup53p は核膜孔複合体に多数局在しているので、Kap121p-cargo 複合体が核膜孔複合体を通り抜ける時、一時的に周りの環境が Nup53p の濃度が高い状況になる。この状況であれば、passive な競合は濃度に比例するので Kap121p の結合相手は効率よく Nup53p に変わるため Kap121p による核移行が迅速に阻害されると示唆される。

3.4 Kap121p における RanGTP による cargo 解離機構の解明

RanGTP はほぼすべての Importin に対して cargo を解離させるために働く蛋白質であるが、その結合メカニズムや cargo の解離機構は結合する Importin によって異なる。それはそれぞれの Importin の構造にはそれぞれ独特の特徴があるため、保存されている部分もあるが、大きく異なっている部分も多い。そのためそれぞれの Importin に対する作用を原子レベルで解明することが Importin の保存性の検証においても重要である。本研究では Kap121p-cargo 複合体および Kap121p-RanGTP 複合体の結晶構造を解いた。よって二つの構造を比較から RanGTP がいかにして Kap121p から cargo を解離させるかを解明した。また結晶構造より導きだされたメカニズムを速度論的測定から検証した。

3.4.1 Kap121p-RanGTP 複合体の結晶構造

3.4.1.1 Kap121p-RanGTP 複合体の精製、結晶化

複合体精製に用いた Ran は C 末を除いたコンストラクト (1-176) を用いた。RanGTP の構造において C 末のアミノ酸は disorder することが知られているため結晶化の妨げになる可能性があり、取り除いた。また Ran は yeast のものではなく、canine のものを使用した。この canine の Ran は非常に発現精製がしやすく、以前の Importin-RanGTP 複合体の構造においてもよく用いられてため、それに習って用いた (Matsuura and Stewart, 2004)。Kap121p-RanGTP 複体の結晶が Kap121p で出来た初めての結晶であったため、native に加えて SeMt に置換した Kap121p を用いた結晶化を行うことでその結晶構造を解明した。

3.4.1.2 全体構造

Kap121p-RanGTP 複体の構造において RanGTP は Kap121p の N 末側の arch と広範囲に相互作用しており、主に三ヶ所で相互作用をしていた。Kap121p の HEATs 1-8 と HEAT 15 insert が RanGTP を挟み込むようにして結合していた。この RanGTP の結合により、Kap121p の構造には大きな構造変化が観察された。詳細は 3.4.1.3 で述べる。

3.4.1.3 Kap121p と RanGTP の相互作用

RanGTP は Kap121p の N 末側の arch と広範囲に結合しており、この相互作用は大きく 3 つの結合領域に分けられた (Figure. 3-28A-C)。それは 1) Kap121p の HEAT 15 insert と RanGTP の Switch I 領域と Switch II 領域の一部、2) Kap121p の N 末 (HEATs 1-3) と RanGTP の Switch II 領域と Switch I 領域の一部、3) Kap121p の HEAT 3 の B-helix および HEATs 6-8 と HEAT 8 acidic loop の一部と RanGTP の basic patch、の 3 ヶ所である。まず 1) の領域においては Kap121p の E644 が Switch II の K71 と静電相互作用しており、Kap121p の N648、Q651、Y652 が Switch I の G20、K38、Y39 と水素結合および分子間力により広範囲に相互作用していた。2) では数多くの水素結合、疎水性相互作用、van der Waals contacts、イオン結合を通して Ran (V45、V47、W64、G74、L75、D77、G78、Y79、I81、Q82、R110、V111、E113) と Kap121p の HEATs 1-2 (P19、S21、P22、N24、R27、E31、T62、A65、L66、V69、L70、R72、K73、L74、H120、K121、D124、R161) が相互作用していた。3) では Ran の basic patch (K134、R140、K141、K142、N143、Y147、K159) が Kap121p の酸性領域

(E244、E251、P280、T283、T284、E287、E340、D346、H347、Q350、R354、L357) と水素結合、イオン結合や van der Waals contacts を作ることで相互作用していた。

3.4.1.4 Importin と RanGTP の相互作用は保存されている

RanGTP の持つ Karyopherin 相互作用サイトは一般に保存されており、Switch I、Switch II、basic patch とされている (Figure. 3-29)。今回の相互作用も同一の領域で結合しており、RanGTP の相互作用機構はよく保存されていると考えられる。現在までに Karyopherin β 1-RanGTP 複合体、Karyopherin β 2 (transportin 1)-RanGTP 複合体、Importin 13-RanGTP 複合体の 3 種類の複合体の構造が解かれており、これらの構造間での比較を行った (Chook and Blobel, 1999; Lee et al., 2005; Bono et al., 2010)。すべての Importin の N 末側の arch 部分と RanGTP は結合しており、結合様式も類似していた。特に Switch II との結合領域はすべて HEATs 1-4 であった。Basic patch との結合領域もよく類似しており、多くの Importin で HEATs 6-8 と HEAT 8 acidic loop が結合に関与していた。ただ Importin13 では HEAT 8 loop の関与はなく HEAT9 の B helix のみで相互作用していた。また Kap121p においても相互作用に関与する HEAT 8 acidic loop のアミノ酸残基は一つと非常に少なかった。また Switch I との結合領域が Importin 間で差が見られた。特に Kap121p においてはその違いが大きく、新規の相互作用が見られた。他のすべての Importin が HEAT repeats 部分で相互作用していた (結合する HEAT リピートの位置がそれぞれ少しずつ異なる) のに対して Kap121p で HETA15 insert がその役割を担っていた。HEAT repeat 内のアミノ酸ではなく helix の間に形成される insert がこの相互作用に関わる例は今回が初めてであった。この Kap121p で初めて確認された HEAT 15 insert は Kap121p 内での分子内相互作用と RanGTP との相互作用の両方に関与する興味深い insert であることが明らかとなった。

3.4.1.5 RanGTP の加水分解による Ran の Kap121p からの解離機構

Importin は RanGTP とは結合できるが、RanGDP とは結合できないことが知られている。これは GTP の加水分解により Ran が構造変化を起こすことで Importin との相互作用に影響が出るためであることが結晶構造から示唆されている。RanGTP から RanGDP の構造変化によって Switch I、Switch II、C-terminal

tail の構造変化が起こる。Kap121p では相互作用にどのような影響が出るかを検証するために Kap121p-RanGTP 複合体の RanGTP 部分にすでに解かれている RanGDP の構造を重ね合わせてみることで検証した (Stewart et al., 1998)。その結果、相互作用する領域すべてに影響が出ていることが分かった (Figure. 3-30)。RanGDP では Switch I が Kap121p の HEAT 15 insert と、Switch II が Kap121p の HEAT 1B および 2B と steric clash を起こしていた。また C-terminal tail は Kap121p の HEAT 8B および 7A の部分と立体障害を起こしており、Kap121p を完全に貫通するようなコンフォメーションに変化していた。よって RanGTP の加水分解による構造変化は Kap121p から解離する (Kap121p との結合を失わせる) ために十分であると言える。

3.4.2 Kap121p における RanGTP による cargo 解離機構

3.4.2.1 RanGTP の結合による Kap121p superhelix の構造変化

本研究で Kap121p-cargo 複合体と Kap121p-RanGTP 複合体の構造を初めて解明することに成功した。これら 2 つの構造を比較することで、Kap121p 内で RanGTP がどのように cargo を解離させるかを議論することができる。RanGTP の結合により Kap121p には大きな構造変化が観察された (Figure. 3-31、3-32)。RanGTP の結合により Kap121p 内に形成されていた HEAT 15 insert と HEAT 18 loop による分子内相互作用が完全に失われて、Kap121p の構造が開いた構造に変化していた (全体の C α の rmsd は 13 Å)。この大きな構造変化は Kap121p の中央部分の内部を起点として RanGTP がちょうど収まるような空間をあけるように引き起こされていた。興味深いことにこの Kap121p の構造変化の起点が HEATs 8-12 に相当しており、これは cargo の NLS が結合する領域であった (Figure. 3-33B)。Kap121p のそれぞれの arch 部分の構造は似ており、Kap121p-RanGTP 複合体と Kap121p-Ste12p 複合体の構造の比較において、N-terminal の arch 領域 (HEATs 1-8) では C α の rmsd は 1.3 Å で C-terminal の arch 領域 (HEATs 13-24) では C α の rmsd は 1.4 Å であった。よってこの構造変化は Kap121p の中央部分が蝶番のようにはたらくことで全体構造の屈曲を変化させることで引き起こされていると考えられる。

3.4.2.2 RanGTP による cargo の解離は Kap121p の構造変化と cargo の直接追い出しの combination により引き起こされる

RanGTP の結合による Kap121p の超らせん構造の屈曲の変化により蝶番部分 (HEATs 8-12) の分子表面は大きく変化すると予想できる。よってこの構造変化により NLS との結合が不安定になると考えられる。これに加えて、2つの構造を N-terminal arch の領域 (HEATs 6-10) で重ね合わせたところ、RanGTP と Ste12p の一部が完全に重なっており、steric clash を起こしていた (Figure. 3-33A)。RanGTP と cargo の結合の両方に関与する Kap121p のアミノ酸の Q350 で側鎖レベルの小さな構造変化が見られた。これらの結果から RanGTP による cargo の解離は Kap121p の構造変化に伴う cargo 結合表面の変化 (cargo 非結合型への構造変化) と RanGTP と cargo の立体障害による直接的解離の組み合わせによって起こると考えられる。よってこの解離は単純な passive な競合だけによるものではなく RanGTP の結合が積極的に cargo の解離を促すことが示唆される。そのため RanGTP は効率よく cargo を Kap121p から解離できるのだと考えられる (Figure. 3-34)。

結論

本論文では、新規の importin である Kap121p の構造を解明し、これに加えて重要な多くの Kap121p との蛋白質複合体の結晶構造を解くことで、核移行サイクルおよび Nup53p による核移行阻害機構の分子メカニズムを X 線結晶解析と結晶構造に基づいた変異体を用いた様々な機能解析から解明した。本研究で発見した新しい知見を以下の 4 点に分けて詳述する。

(1) 本研究では Kap121p の全体構造を初めて原子レベルで解明することに成功した。Kap121p には今までの Importin には見られない興味深い特徴として分子内相互作用があることを発見し、この構造維持は FG-Nups との相互作用による核膜孔内の移動に重要であることを示唆する結果を得た。Importin のこのような変異体を発見した例は今回が初めてであった。

(2) 2 種類の cargo と Kap121p の複合体の構造を解くことに成功した。これらの複合体の結晶構造から Kap121p が特異的に認識する NLS 配列が KV/IXKX₁₋₂K/H/R であることを初めて同定した。

(3) Nup53p との複合体の構造から興味深いことに Nup53p と Kap121p との相互作用が cargo との結合機構と全く同一であり、Nup53p は NLS-like な配列を持つことを発見した。この構造情報から Nup53p による Kap121p による核移行阻害が cargo との直接競合によって起こることを示唆された。Stopped-flow および SPR による速度論解析により Nup53p は cargo と passive な直接競合することで Kap121p と結合することを確かめた。

(4) RanGTP との複合体の構造情報から Kap121p は RanGTP との相互作用により構造変化を起こすことが明らかとなった。また cargo との複合体の構造との比較により、RanGTP による cargo の解離は Kap121p 超らせん構造の構造変化による cargo 結合サイト表面の変化による cargo との結合の不安定化および RanGTP と cargo の立体障害による直接的な追い出しにより起こることが強く

示唆された。

以上のように X 線結晶構造解析と変異体を用いた機能解析を組み合わせることで、Kap121p という新規の Importin による核移行サイクルおよび Nup53p による核移行制御機構の構造基盤を初めて確立した。これは核輸送分野の研究において非常に重要性の高い研究であり、その価値は高い。

参考文献

- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B., *et al.* (2007a). Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* 450, 683-694.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B., *et al.* (2007b). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450, 695-701.
- Allen, N.P.C., Huang, L., Burlingame, A., and Rexach, M. (2001). Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276, 29268-29274.
- Andrade, M.A., Perez-Iratxeta, C., and Ponting, C.P. (2001a). Protein repeats: Structures, functions, and evolution. *Journal of Structural Biology* 134, 117-131.
- Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Muller, C.W., and Bork, P. (2001b). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *Journal of Molecular Biology* 309, 1-18.
- Bayliss, R., Littlewood, T., and Stewart, M. (2000a). Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* 102, 99-108.
- Bayliss, R., Littlewood, T., and Stewart, M. (2000b). Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* 102, 99-108.
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J.M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., and Medalia, O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306, 1387-1390.
- Bono, F., Cook, A.G., Grunwald, M., Ebert, J., and Conti, E. (2010). Nuclear Import Mechanism of the EJC Component Mago-Y14 Revealed by Structural Studies of Importin 13. *Molecular Cell* 37, 211-222.
- Brunger, A.T., Milburn, M.V., Tong, L., Devos, A.M., Jancarik, J., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Ohtsuka, E., and Kim, S.H. (1990). CRYSTAL-STRUCTURE OF AN ACTIVE FORM OF RAS PROTEIN, A COMPLEX OF A GTP ANALOG AND THE

HRAS P21 CATALYTIC DOMAIN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4849-4853.

Cairo, L.V., Ptak, C., and Wozniak, R.W. (2013). Mitosis-specific regulation of nuclear transport by the spindle assembly checkpoint protein mad1p. *Molecular cell* **49**, 109-120.

Chaves, S.R., and Blobel, G. (2001). Nuclear import of Spo12p, a protein essential for meiosis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 17712-17717.

Chook, Y., and Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 703-715.

Chook, Y.M., and Blobel, G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta 2-Ran center dot GppNHp. *Nature* **399**, 230-237.

Chook, Y.M., and Sueel, K.E. (2011). Nuclear import by karyopherin-beta s: Recognition and inhibition. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1813**, 1593-1606.

Chow, T.Y.K., Ash, J.J., Dignard, D., and Thomas, D.Y. (1992). SCREENING AND IDENTIFICATION OF A GENE, PSE-1, THAT AFFECTS PROTEIN SECRETION IN SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Journal of Cell Science* **101**, 709-719.

Cowtan, K. (2010). Recent developments in classical density modification. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **66**, 470-478.

Delahodde, A., Pandjaitan, R., Corral-Debrinski, M., and Jacq, C. (2001). Pse1/Kap121-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1. *Molecular Microbiology* **39**, 304-312.

Denning, D., Patel, S., Uversky, V., Fink, A., and Rexach, M. (2003). Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2450-2455.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**, 2126-2132.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., and Luhrmann, R. (1995). THE HIV-1 REV ACTIVATION DOMAIN IS A NUCLEAR EXPORT SIGNAL THAT ACCESSES AN EXPORT PATHWAY USED BY SPECIFIC CELLULAR RNAS. *Cell* **82**, 475-483.

Fontes, M.R.M., Teh, T., and Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *Journal of Molecular Biology* 297, 1183-1194.

Frey, S., Richter, R.P., and Goerlich, D. (2006). FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* 314, 815-817.

Gorlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 607-660.

Gruenwald, M., and Bono, F. (2011). Structure of Importin13-Ubc9 complex: nuclear import and release of a key regulator of sumoylation. *Embo Journal* 30, 427-438.

Guettler, T., and Goerlich, D. (2011). Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *Embo Journal* 30, 3457-3474.

Handa, N., Kukimoto-Niino, M., Akasaka, R., Kishishita, S., Murayama, K., Terada, T., Inoue, M., Kigawa, T., Kose, S., Imamoto, N., *et al.* (2006). The crystal structure of mouse Nup35 reveals atypical RNP motifs and novel homodimerization of the RRM domain. *Journal of Molecular Biology* 363, 114-124.

Hoelz, A., Debler, E., Blobel, G., Kornberg, R., Raetz, C., Rothman, J., and Thorner, J. (2011). The Structure of the Nuclear Pore Complex. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 80 80, 613-643.

Hutchinson, E.C., Orr, O.E., Liu, S.M., Engelhardt, O.G., and Fodor, E. (2011). Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor Ran-binding protein 5. *Journal of General Virology* 92, 1859-1869.

Imasaki, T., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Kose, S., Imamoto, N., Yamada, M., and Sato, M. (2007). Structural basis for substrate recognition and dissociation by human transportin 1. *Molecular Cell* 28, 57-67.

Iouk, T., Kerscher, O., Scott, R.J., Basrai, M.A., and Wozniak, R.W. (2002). The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *Journal of Cell Biology* 159, 807-819.

Isoyama, T., Murayama, A., Nomoto, A., and Kuge, S. (2001). Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21863-21869.

- Jaquenoud, M., van Drogen, F., and Peter, M. (2002). Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/Cdh1. *Embo Journal* 21, 6515-6526.
- Kaffman, A., Rank, N.M., and O'Shea, E.K. (1998). Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes & Development* 12, 2673-2683.
- Kashyap, A.K., Schieltz, D., Yates, J., and Kellogg, D.R. (2005). Biochemical and genetic characterization of Yra1p in budding yeast. *Yeast* 22, 43-56.
- Ke, Y.W., Dou, Z., Zhang, J., and Yao, X.B. (2003). Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. *Cell Research* 13, 69-81.
- Komeili, A., and O'Shea, E.K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* 284, 977-980.
- Kosako, H., and Imamoto, N. (2010). Phosphorylation of nucleoporins: signal transduction-mediated regulation of their interaction with nuclear transport receptors. *Nucleus (Austin, Tex)* 1, 309-313.
- Kose, S., Furuta, M., and Imamoto, N. (2012). Hikeshi, a Nuclear Import Carrier for Hsp70s, Protects Cells from Heat Shock-Induced Nuclear Damage. *Cell* 149, 578-589.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* 22, R966-R980.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., and Chook, Y.M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126, 543-558.
- Lee, S.J., Matsuura, Y., Liu, S.M., and Stewart, M. (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* 435, 693-696.
- Lee, S.J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K.T., Tsukihara, T., *et al.* (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2: Nuclear import of a transcription factor. *Science* 302, 1571-1575.
- Leslie, D.M., Grill, B., Rout, M.P., Wozniak, R.W., and Aitchison, J.D. (2002). Kap121p-mediated nuclear import is required for mating and cellular differentiation in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 22, 2544-2555.
- Leslie, D.M., Timney, B., Rout, M.P., and Aitchison, J.D. (2006). Studying nuclear protein import in yeast. *Methods* 39, 291-308.

Lusk, C.P., Makhnevych, T., Marelli, M., Aitchison, J.D., and Wozniak, R.W. (2002). Karyopherins in nuclear pore biogenesis: a role for Kap121p in the assembly of Nup53p into nuclear pore complexes. *Journal of Cell Biology* 159, 267-278.

Makhnevych, T., Lusk, C.P., Anderson, A.M., Aitchison, J.D., and Wozniak, R.W. (2003). Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex. *Cell* 115, 813-823.

Makhnevych, T., Ptak, C., Lusk, C.P., Aitchison, J.D., and Wozniak, R.W. (2007). The role of karyopherins in the regulated sumoylation of septins. *Journal of Cell Biology* 177, 39-49.

Matsuura, Y., and Stewart, M. (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 432, 872-877.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* 40, 658-674.

Mohr, D., Frey, S., Fischer, T., Guttler, T., and Gorlich, D. (2009). Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *Embo Journal* 28, 2541-2553.

Monecke, T., Guettler, T., Neumann, P., Dickmanns, A., Goerlich, D., and Ficner, R. (2009). Crystal Structure of the Nuclear Export Receptor CRM1 in Complex with Snurportin1 and RanGTP. *Science* 324, 1087-1091.

Mosammaparast, N., Jackson, K.R., Guo, Y.R., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Pemberton, L.F. (2001). Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *Journal of Cell Biology* 153, 251-262.

Murshudov, G.N., Skubak, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., and Vagin, A.A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 67, 355-367.

Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science* 326, 1275-1279.

Peters, R. (2009). Translocation through the nuclear pore: Kaps pave the way. *Bioessays* 31, 466-477.

Pi, H.W., Chien, C.T., and Fields, S. (1997). Transcriptional activation upon pheromone stimulation mediated by a small domain of *Saccharomyces cerevisiae* Ste12p. *Molecular and Cellular Biology* 17, 6410-6418.

Radaev, S., Li, S., and Sun, P.D. (2006). A survey of protein-protein complex crystallizations. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 62, 605-612.

Rothenbusch, U., Sawatzki, M., Chang, Y., Caesar, S., and Schlenstedt, G. (2012). Sumoylation regulates Kap114-mediated nuclear transport. *Embo Journal* 31, 2461-2472.

Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y.M., and Chait, B.T. (2000). The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. *Journal of Cell Biology* 148, 635-651.

Rout, M.P., Blobel, G., and Aitchison, J.D. (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89, 715-725.

Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 798-812.

Scott, R.J., Cairo, L.V., Van de Vosse, D.W., and Wozniak, R.W. (2009). The nuclear export factor Xpo1p targets Mad1p to kinetochores in yeast. *Journal of Cell Biology* 184, 21-29.

Seewald, M.J., Korner, C., Wittinghofer, A., and Vetter, I.R. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* 415, 662-666.

Stewart, M. (2010). Nuclear export of mRNA. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 609-617.

Stewart, M., Kent, H.M., and McCoy, A.J. (1998). The structure of the Q69L mutant of GDP-Ran shows a major conformational change in the switch II loop that accounts for its failure to bind nuclear transport factor 2 (NTF2). *Journal of Molecular Biology* 284, 1517-1527.

Suntharalingam, M., and Wente, S. (2003). Peering through the pore: Nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Developmental Cell* 4, 775-789.

Terry, L.J., and Wente, S.R. (2009). Flexible Gates: Dynamic Topologies and Functions for FG Nucleoporins in Nucleocytoplasmic Transport. *Eukaryotic Cell* 8, 1814-1827.

Tran, E.J., Bolger, T.A., and Wente, S.R. (2007). SnapShot: Nuclear transport. *Cell* 131, 2.

Ueta, R., Fukunaka, A., and Yamaguchi-Iwai, Y. (2003). Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 50120-50127.

Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 66, 22-25.

Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). Signal transduction - The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.

Wang, Y.Q., and Dohlman, H.G. (2004). Pheromone signaling mechanisms in yeast: A prototypical sex machine. *Science* 306, 1508-1509.

Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112, 441-451.

Wente, S.R., and Rout, M.P. (2010). The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.

Wittinghofer, A., and Vetter, I.R. (2011). Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 80 80, 943-971.

Xu, D., Farmer, A., and Chook, Y.M. (2010). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 20, 782-790.

Yang, W., Gelles, J., and Musser, S. (2004). Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12887-12892.

謝辞

本論文を執筆するにあたり、指導教官である分子第三講座の松浦能行准教授には、研究計画、実験技術の習得、論文執筆に至るまでの多くの面でご指導を頂きました。この場を借りて深く感謝申し上げます。シンクロトロンにおけるX線回折データ収集において、Photon Factory ならびに Spring-8 のビームラインのスタッフの皆様にお世話になりました。心より感謝申し上げます。また、分子第三講座の前田雄一郎教授には、多くの研究に対する有益なアドバイスを頂きました。技術員の平野秀美さん、小山昌子博士には多くの実験技術および実験装置の習得から研究に関する議論に至るまで、非常に多くの場面で大変お世話になりました。また質量分析装置を使用するにあたって名古屋大学大学院医学系研究科付属医学教育研究支援センター分析機器部門分子構造解析研究室の技術職員の瀧健太郎さんに装置を使用する際に大変お世話になりました。この場を借りて感謝申し上げます。また分子第三講座の皆様、家族、周囲の皆様に心より感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたって研究費および奨励費を支給していただいたグローバル COE プログラムおよびリーディング大学院プログラムに深く感謝致します。

Table. 1-1 核膜孔複合体の輸送特性

Property	Passive permeability (hindered diffusion)	NTR-mediated transport (facilitated diffusion)
Typical transport substrates	Inorganic ions, small metabolites, small and intermediate polypeptides	Karyophilic proteins, ribonucleoprotein particles, ribosomal subunits ~14 in secondary human cells ⁽²⁹⁾
Total amount of transported material (MDa/NPC/second)		
Energy dependence	None	Primarily none. However, energy coupled outside the NPC to transport by the Ran cycle
Selectivity	Equivalent to that of a molecular sieve with cylindrical pores of 4–5 nm radius and 45 nm length ⁽⁴³⁾	High selectivity achieved by signal sequences on cargos that are bound by nuclear transport receptors
Exclusion limit	8–10 nm diameter ⁽⁴³⁾	~40 nm diameter ⁽⁸¹⁾
Transport rates (molecules/NPC/second/ μ M)	GFP (2.8 nm radius): 3 ⁽⁴⁵⁾ BSA (3.35 nm radius): <0.1 ⁽²⁹⁾	NTF2 (2.36 nm radius): ~100 ⁽⁴⁵⁾ Transportin (4.13 nm radius): 65 ⁽²⁹⁾
Directionality	Bidirectional	Primarily bidirectional. However, directionality imposed outside the NPC by Ran cycle
Parallel transport		~10 NTF2 molecules transported simultaneously ⁽⁵²⁾

Table. 1-2 Karyopherin β family

Transport Complex Category		<i>S. cerevisiae</i> Karyopherins & Other Receptors	Cargo(s)	Essential	Metazoan Karyopherins & Other Receptors	Cargo(s)
Import	I	Kap95	Kap60 adaptor for cNLS proteins	Yes	Importin-β1	Importin-α adaptor for cNLS proteins, Snurportin adaptor for U snRNPs
	II	Kap95	—	Yes	Importin-β1	SREBP-2, HIV Rev and TAT, Cyclin B
		Kap104	Nab2, Hrp1 (mRNA-binding proteins)	t.s.	Transportin or Transportin 2	PY-NLS-containing proteins, mRNA-binding proteins, histones, ribosomal proteins
		Kap123	SRP proteins, histones, ribosomal proteins	No	Importin 4	histones, ribosomal protein S3a, Transition Protein 2
		Kap111/Mtr10	Npl3 (mRNA-binding protein), tRNAs	t.s.	Transportin SR1 or SR2	SR proteins, HuR
		Kap121/Pse1	ribosomal proteins, Yra1, Spo12, Ste12, Yap1, Pho4, histones	Yes	Importin 5/ Importin-β3/ RanBP5	histones, ribosomal proteins
		Kap119/Nmd5	ribosomal proteins, histones, Hog1, Crz1, Dst1	No	Importin 7	GR, ribosomal proteins, Smad, ERK
		Kap108/Sxm1	Lhp1, ribosomal proteins	No	Importin 8	SRP19, Smad
		Kap114	TBP, histones, Nap1, Sua7	No	Importin 9	histones, ribosomal proteins
		Kap122/Pdr6	Toa1 and Toa2, TFIIA	No	—	—
		Kap120	Rpf1	No	—	—
		—	—	—	Importin 11	UbcM2, rpL12
		Ntf2	Ran/Gsp1 (GDP-bound form)	Yes	NTF2	Ran (GDP-bound form)
		Import/Export	III	Kap142/Msn5	Replication protein A (import), Pho4, Crz1, Cdh1 (export)	No
—	—			—	Importin 13	UBC9, Y14 (import), eIF1A (export)
Export	IV	Crm1/Xpo1	Leucine-rich NES sequences	Yes	CRM1/ Exportin 1	Leucine-rich NES sequences
		Kap109/Cse1	Kap60/Srp1	Yes	CAS	Importin-α family members
		Kap127/Los1	tRNAs	No	Exportin-t	tRNAs
		—	—	—	Exportin 4	eIF5A
		—	—	—	Exportin 5	pre-miRNA
		—	—	—	Exportin 6	Profilin, actin
		—	—	—	RanBP16/ Exportin 7	p50-RhoGAP
	V	Crm1/Xpo1	Nmd3 adaptor for 60S ribosomal subunit	Yes	CRM1/ Exportin 1	NMD3 adaptor for 60S ribosomal subunit
		Mex67-Mtr2	60S via 5S rRNA	Yes	—	—
		Arx1	60S ribosomal subunit	No	—	—
		Crm1/Xpo1	Ltv1 putative adaptor for 40S ribosomal subunit	Yes	CRM1/ Exportin 1	40S ribosomal subunit
	VI	Mex67-Mtr2	Npl3, Yra1, and Hpr1 adaptors for mRNA	Yes	TAP/NXF1-p15/ NXT1	REF/Aly adaptor for mRNA

Table. 1-3 Kap121p特異的なcargoとNLSを含むと考えられるアミノ酸配列

NLSs recognized by Kap121p

Cargo	Amino acid residues	Sequence
Pho4p	140–166	SANKVTKNKSNSSPYLNKRRGKPGPDS
Spo12p	76–143	KKSTSNLKSSHTTSNLVKKTMTFKRDLLKQDPKRKLQLQQRFASTDRLVSPCSLKLNEHKVK MFGKKK
Pdr1p	729-769	WTD MNKILLDFDNDYSVYRSFAHYSISCIILVSQAFSVAEF
Rpl25p	1–62	MAPSAKATAAKKAVVKG TNGKKALKVRTSATFRLPKTLKLARAPKYASKAVPHYNRLDSY KV
Yap1p	5–59	TAKRSLDVVSPGSLAEFEGSKSRHDEIENEHRRTGTRDGEDSEQPKKKGSKTSKK
Histone H2A	1–46	MSGGKGGKAGSAAKASQSRSAKAGLTFPVGRVHRLLRGNYAQRIG
Histone H2B	1–52	MSAKAEKKPASKAPAEKKPAAKKTSTSTDGKKRSKARKETYSSYIYKVLKQT
Histone H3	1–28	MARTKQTARKSTGGKAPRKQLASKAARK
Histone H4	1–42	MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKILRDNIQGITKPAIRRLARRGG
Aft1p	198–226 and 332–365	TSSIKPKKKRCVSRFN NCPFRVRATYSL and SKRPCLPSVNNTGSINTNNVRKPKSQCKNKDTLL
Stel2p	494–688	NNMLYPQTATSWNVLPQAMQPAPTYVGRPYTPNYRSTPGSAMFPYMQSSNSMQWNTAVSP YSSRAPSTTAKNYPPSTFY SQNINQYPRRRTVGMKSSQGNVPTGNKQSVGKSAKISKPLHIKTS AYQKQYKINLETKARPSAGDEDSAHPDKNKEISMPTPDSNTLVVQSEEGGAHSLEVDTNRRS DKNLPDAT
Nop1p	1–90	MSFRPGSRGGSRGGSRGGF GGRGGSRGGARGGSRGGF GGRGGSRGGARGGSRGGF GGRG GSRGGARGGSRGGRGGAAGGARGGAKVVIEP
Sof1p	381–489	ERSNVKTTREKNKLEYDEKLKERFRHMPEIKRISRHRHVPQVIKKAQEIKNIELSSIKRREAN ERRTRKDMPYISERKKQIVGTVHKYEDSGRDRKRRKEDDKRDTQEK

Table. 2-1 Protein complex crystallization screen kit

Precipitant	Salt	Buffer	pH
1 20% PEG 400	0.1M CaAc ₂	HEPES	7
2 20% MPEG 550		Tris	8
3 20% PEG 1000		MES	6.5
4 20% PEG 1500		MES	6.5
5 15% PEG 2000	0.15M NaCl	Tris	8.5
6 20% MPEG 2000		Citrate	6.5
7 20% MPEG 2000	0.2M NaCl	HEPES	7
8 20% MPEG 2000	0.1M Li ₂ SO ₄	MES	6
9 15% PEG 3350	0.1M (NH ₄) ₂ SO ₄	HEPES	7.5
10 20% PEG 3350	0.1M NaCl	Tris	8
11 20% PEG 3350	0.1M MgCl ₂	MOPS	7
12 20% PEG 3350		MES	6.5
13 8% PEG 4000		MES	6
14 12% PEG 4000		Citrate	5.5
15 12% PEG 4000	0.1M (NH ₄) ₂ SO ₄	Citrate	5.5
16 15% PEG 4000	0.1M MgCl ₂	MES	6
17 15% PEG 4000	0.1M CaCl ₂	MES	6.5
18 15% PEG 4000	10% 2-propanol	HEPES	7
19 15% PEG 4000	0.1M NaCl	Tris	8
20 20% PEG 4000		HEPES	7
21 10% MPEG 5000	10% 2-propanol	MES	6
22 20% MPEG 5000		HEPES	7.5
23 8% PEG 6000		MES	6
24 15% PEG 6000		NaAc	5
25 10% PEG 6000	0.1M NaCl	HEPES	7
26 10% PEG 6000	0.1M CaAc ₂	HEPES	7.5
27 15% PEG 6000		Tris	8
28 8% PEG 8000		MES	6
29 12% PEG 8000		Citrate	5.5
30 12% PEG 8000	0.1M NaCl	MES	6
31 12% PEG 8000	0.1M MgAc ₂	MES	6.5
32 12% PEG 8000	0.1M KCl	HEPES	7
33 12% PEG 8000	0.1M (NH ₄) ₂ SO ₄	HEPES	7.5
34 12% PEG 8000		Tris	8
35 12% PEG 8000	0.1M MgAc ₂	Tris	8.5
36 8% PEG 20000		MES	6
37 12% PEG 20000		Tris	8
38 12% PEG 20000		HEPES	7
39 12% PEG 20000	0.1M CaCl ₂	MES	6.5
40 1M (NH ₄) ₂ SO ₄		MES	6
41 1.5M (NH ₄) ₂ SO ₄		Citrate	5.5
42 1.6M (NH ₄) ₂ SO ₄		MES	6.5
43 1.6M (NH ₄) ₂ SO ₄		HEPES	7.5
44 1.8M (NH ₄) ₂ SO ₄		Tris	8.5
45 1M NaCl		Tris	8
46 1M K ⁻ ,Na-tartrate		HEPES	7
47 1.3M Li ₂ SO ₄		Tris	8

Table. 2-2 PEG/ION SCREEN

Salt (0.2M)	pH
1 Sodium Fluoride	7.1
2 Potassium Fluoride	7.2
3 Ammonium Fluoride	6.2
4 Lithium Chloride anhydrous	6.7
5 Magnesium Chloride hexahydrate	5.8
6 Sodium Chloride	6.9
7 Calcium Chloride dihydrate	5.1
8 Potassium Chloride	6.9
9 Ammonium Chloride	6.3
10 Sodium Iodide	6.9
11 Potassium Iodide	6.8
12 Ammonium Iodide	6.2
13 Sodium Thiocyanate	6.9
14 Potassium Thiocyanate	7
15 Lithium Nitrate	7.1
16 Magnesium Nitrate hexahydrate	5.8
17 Sodium Nitrate	6.8
18 Potassium Nitrate	6.9
19 Ammonium Nitrate	6.3
20 Magnesium Formate	5.9
21 Sodium Formate	7.2
22 Potassium Formate	7.3
23 Ammonium Formate	6.6
24 Lithium Acetate dihydrate	7.8
25 Magnesium Acetate tetrahydrate	7.7
26 Zinc Acetate dihydrate	6.3
27 Sodium Acetate trihydrate	7.9
28 Calcium Acetate hydrate	7.3
29 Potassium Acetate	7.8
30 Ammonium Acetate	7.1
31 Lithium Sulfate monohydrate	6.4
32 Magnesium Sulfate heptahydrate	5.9
33 Sodium Sulfate decahydrate	6.6
34 Potassium Sulfate	6.7
35 Ammonium Sulfate	6
36 di-Sodium Tartrate dihydrate	7.2
37 Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	7.2
38 di-Ammonium Tartrate	6.6
39 Sodium dihydrogen Phosphate monohydrate	4.5
40 di-Sodium hydrogen Phosphate dihydrate	9.1
41 Potassium dihydrogen Phosphate	4.7
42 di-Potassium hydrogen Phosphate	9.2
43 Ammonium dihydrogen Phosphate	4.6
44 di-Ammonium hydrogen Phosphate	7.9
45 tri-Lithium Citrate tetrahydrate	8.1
46 tri-Sodium Citrate dihydrate	8.2
47 tri-Potassium Citrate monohydrate	8.3
48 di-Ammonium hydrogen Citrate	5

Buffer 20% PEG 3350

Table. 2-3 CRYSTAL SCREEN CRYO FORMULATION

Salt	Buffer	Prrecipitant	Cryoprotectant
1 0.02M Calcium Chloride dihydrate	0.1M sodium Acetate trihydrate pH4.6	30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	
2		0.26M Potassium Sodium tartrate tetrahydrate	35% Glycerol anhydrous
3		0.26M Ammonium dihydrogen Phosphate	35% Glycerol anhydrous
4	0.075M Tris Hydrochloride pH8.5	1.5M Ammonium Sulfate	25% Glycerol anhydrous
5 0.2M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.1M HEPES-Na pH7.5	30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	
6 0.16M Magnesium Chloride hexahydrate	0.08M Tris Hydrochloride pH8.5	24% PEG 4000	20% Glycerol anhydrous
7	0.07M Sodium Cacodylate pH6.5	0.98M Sodium Acetate trihydrate	30% Glycerol anhydrous
8 0.14M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.07M Sodium Cacodylate pH6.5	21% iso-Propanol	30% Glycerol anhydrous
9 0.17M Ammonium Acetate	0.085M tri-Sodium Citrate dihydrate pH5.6	25.5% PEG 4000	15% Glycerol anhydrous
10 0.17M Ammonium Acetate	0.085M Sodium Acetate trihydrate pH4.6	25.5% PEG 4000	15% Glycerol anhydrous
11 0.18M Magnesium Chloride hexahydrate	0.09M HEPES-Na pH7.5	27% iso-Propanol	10% Glycerol anhydrous
12 0.2M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.1M Tris Hydrochloride pH8.5	30% PEG 400	
13 0.19M Calcium Chloride dihydrate	0.095M HEPES-Na pH7.5	26.6% PEG 400	5% Glycerol anhydrous
14 0.17M Ammonium Sulfate	0.085M Sodium Cacodylate pH6.5	25.5% PEG 8000	15% Glycerol anhydrous
15	0.075M HEPES-Na pH7.5	1.125M Lithium Sulfate monohydrate	25% Glycerol anhydrous
16 0.17M Lithium Sulfate monohydrate	0.085M Tris hydrochloride pH8.5	25.5% PEG 4000	15% Glycerol anhydrous
17 0.16M Magnesium Acetate tetrahydrate	0.08M Sodium Cacodylate pH6.5	16% PEG 8000	20% Glycerol anhydrous
18 0.16M Ammonium Acetate	0.08M Tris Hydrochloride pH8.5	24% iso-Propanol	20% Glycerol anhydrous
19 0.16M Ammonium Sulfate	0.08M Sodium Acetate trihydrate pH4.6	20% PEG 4000	20% Glycerol anhydrous
20 0.2M Magnesium Acetate tetrahydrate	0.1M Sodium Cacodylate pH6.5	30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	
21 0.17M Sodium Acetate trihydrate	0.085M Tris Hydrochloride pH8.5	25.5% PEG 4000	15% Glycerol anhydrous
22 0.2M Magnesium Chloride hexahydrate	0.1M HEPES-Na pH7.5	30% PEG 400	
23 0.14M Calcium Chloride dihydrate	0.07M Sodium Acetate trihydrate pH4.6	14% iso-Propanol	30% Glycerol anhydrous
24	0.07M Imidazole pH6.5	0.7M Sodium Acetate trihydrate	30% Glycerol anhydrous
25 0.2M Ammonium Acetate	0.1M tri-Sodium Citrate dihydrate pH5.6	30% 2-Methyl-2,4-pentandiol	
26 0.14M tri-Sodium Citrate dihydrate	0.07M HEPES-Na pH7.5	14% iso-Propanol	30% Glycerol anhydrous
27 0.17M Sodium Acetate trihydrate	0.085M Sodium Cacodylate pH6.5	25.5% PEG 8000	15% Glycerol anhydrous
28	0.065M HEPES-Na pH7.5	0.52M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	35% Glycerol anhydrous
29 0.17M Ammonium Sulfate		25.5% PEG 8000	15% Glycerol anhydrous
30 0.17M Ammonium Sulfate		25.5% PEG 4000	15% Glycerol anhydrous
31		1.5M Ammonium Sulfate	25% Glycerol anhydrous
32		3.6M Sodium Formate	10% Glycerol anhydrous
33	0.07M Sodium Acetate trihydrate pH4.6	1.4M Sodium Formate	30% Glycerol anhydrous
34	0.075M HEPES-Na pH7.5	0.6M Sodium dihydrogen Phosphate	25% Glycerol anhydrous
		0.6M Potassium dihydrogen Phosphate	
35	0.065M Tris Hydrochloride pH8.5	5.2% PEG 8000	35% Glycerol anhydrous
36	0.07M Sodium Acetate trihydrate pH4.6	5.6% PEG 4000	30% Glycerol anhydrous
37	0.09M HEPES-Na pH7.5	1.26M tri-Sodium Citrate dihydrate	10% Glycerol anhydrous
38	0.085M HEPES-Na pH7.5	1.7% PEG 400, 1.7M Ammonium Sulfate	15% Glycerol anhydrous
39	0.095M tri-Sodium Citrate dihydrate pH5.6	19% iso-Propanol, 19% PEG 4000	5% Glycerol anhydrous
40	0.085M HEPES-Na pH7.5	8.5% iso-Propanol, 17%PEG 4000	15% Glycerol anhydrous
41 0.04M Potassium dihydrogen Phosphate		16% PEG 8000	20% Glycerol anhydrous
42		24% PEG 1500	20% Glycerol anhydrous
43		0.1M Magnesium Formate	50% Glycerol anhydrous
44 0.16M Calcium Acetate hydrate	0.08M Sodium Cacodylate pH6.5	14.4% PEG 8000	20% Glycerol anhydrous
45	0.08M Sodium Acetate trihydrate pH4.6	1.6M Ammonium Sulfate	20% Glycerol anhydrous
46	0.08M Tris Hydrochloride pH8.5	1.6M Ammonium dihydrogen Phosphate	20% Glycerol anhydrous
47 0.8M Lithium Sulfate monohydrate		1.6% PEG 8000	20% Glycerol anhydrous
48 0.4M Lithium Sulfate monohydrate		12% PEG 8000	20% Glycerol anhydrous

Table. 2-4 Protein complex screen (その1)

List of conditions in the Protein Complex Screen.

	Precipitant	Salt	Additive	Buffer
1	25% PEG 350 MME			0.1 M Tris pH 8.0
2	15% PEG 400	0.1 M calcium acetate		0.1 M MES pH 6.0
3	20% PEG 400	0.1 M LiCl		0.1 M HEPES pH 7.5
4	25% PEG 400			0.1 M Tris pH 8.0
5	15% PEG 550 MME			0.1 M MES pH 6.5
6	25% PEG 1000	0.2 M NaCl		0.1 M Na/K phosphate pH 6.5
7	20% PEG 1500	0.1 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M Tris pH 7.5
8	10% PEG 2000 MME	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M Na acetate pH 5.5
9	20% PEG 2000 MME	0.2 M NaCl		0.1 M MES pH 6.0
10	15% PEG 2000 MME	0.1 M KCl		0.1 M Tris pH 8.0
11	25% PEG 2000 MME			0.1 M HEPES pH 7.5
12	5% PEG 4000	0.2 M Na acetate		0.1 M Na citrate pH 5.5
13	5% PEG 4000	0.2 M Li ₂ SO ₄		0.1 M Tris pH 7.5
14	10% PEG 4000	0.1 M Ca acetate		0.1 M Na acetate pH 4.5
15	10% PEG 4000	0.2 M Na acetate		0.1 M Na citrate pH 5.5
16	10% PEG 4000	0.2 M NaCl		0.1 M MES pH 6.5
17	10% PEG 4000	0.1 M MgCl ₂		0.1 M HEPES pH 7.5
18	10% PEG 4000		10% 2-propanol	0.1 M HEPES pH 7.0
19	15% PEG 4000	0.2 M ammonium acetate		0.1 M Na acetate pH 4.0
20	15% PEG 4000	0.1 M MgCl ₂		0.1 M Na citrate pH 5.0
21	15% PEG 4000			0.1 M Na cacodylate pH 6.0
22	15% PEG 4000	0.15 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M MES pH 6.0
23	15% PEG 4000			0.1 M HEPES pH 7.0
24	15% PEG 4000	0.1 M MgCl ₂		0.1 M HEPES pH 7.0
25	15% PEG 4000	0.15 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M Tris pH 8.0
26	20% PEG 4000			0.1 M Na citrate pH 4.5
27	20% PEG 4000	0.2 M ammonium acetate		0.1 M Na acetate pH 5.0
28	20% PEG 4000	0.2 M Li ₂ SO ₄		0.1 M MES pH 6.0
29	20% PEG 4000			0.1 M Tris pH 8.0
30	20% PEG 4000	0.15 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M HEPES pH 7.0
31	20% PEG 4000		20% 2-propanol	0.1 M Na citrate pH 5.6
32	20% PEG 4000	0.2 M NaCl		0.1 M Tris pH 8.0
33	25% PEG 4000			0.1 M Na cacodylate pH 5.5
34	25% PEG 4000	0.15 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M MES pH 5.5
35	25% PEG 4000			0.1 M Na cacodylate pH 6.5
36	25% PEG 4000	0.2 M KI		0.1 M MES pH 6.5
37	25% PEG 4000	0.2 M NaCl		0.1 M HEPES pH 7.5
38	10% PEG 5000 MME		12% 1-propanol	0.1 M MES pH 6.5
39	15% PEG 5000 MME	0.1 M KCl		0.1 M HEPES 7.0
40	20% PEG 5000 MME	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M Tris pH 7.5
41	8% PEG 6000	0.1 M MgCl ₂		0.1 M MES pH 6.0
42	8% PEG 6000	0.15 M NaCl		0.1 M Tris pH 8.0
43	15% PEG 6000			0.1 M Na citrate pH 5.5
44	15% PEG 6000	0.1 M Mg acetate		0.1 M Na cacodylate pH 6.5
45	15% PEG 6000		5% MPD	0.1 M MES pH 6.5
46	15% PEG 6000	0.1 M KCl		0.1 M HEPES pH 7.5
47	15% PEG 6000			0.1 M Tris pH 8.5
48	20% PEG 6000			0.1 M Tris pH 8.5
49	8% PEG 8000	0.1 M Mg acetate		0.1 M Na acetate pH 4.5
50	8% PEG 8000			0.1 M Na citrate pH 5.0

Table. 2-4 Protein complex screen (その2)

	Precipitant	Salt	Additive	Buffer
51	8% PEG 8000	0.2 M NaCl		0.1 M Na cacodylate pH 6.0
52	8% PEG 8000			0.1 M HEPES pH 7.0
53	8% PEG 8000			0.1 M Tris pH 8.0
54	12% PEG 8000	0.1 M Ca acetate		0.1 M Na cacodylate pH 5.5
55	12% PEG 8000			0.1 M Na phosphate pH 6.5
56	12% PEG 8000	0.1 M Mg acetate		0.1 M MOPS 7.5
57	12% PEG 8000	0.2 M NaCl		0.1 M HEPES 7.5
58	12% PEG 8000	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M Tris 8.5
59	20% PEG 8000			0.1 M Na citrate pH 5.0
60	20% PEG 8000	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄		0.1 M MES pH 6.5
61	20% PEG 8000			0.1 M HEPES 7.0
62	20% PEG 8000	0.2 M LiCl		0.1 M Tris 8.0
63	10% PEG 10 000	0.1 M Mg acetate		0.1 M MES pH 6.5
64	18% PEG 12 000			0.1 M HEPES pH 7.0
65	8% PEG 20 000	0.1 M NaCl		0.1 M Tris pH 8.0
66	15% PEG 20 000			0.1 M HEPES pH 7.0
67	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M MES pH 6.5
68	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M Na acetate pH 5.0
69	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M MES pH 6.5
70	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M Tris pH 8.0
71	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M Na acetate pH 5.0
72	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M HEPES pH 7.0
73	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M Tris pH 8.0
74	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M Na acetate pH 5.0
75	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M HEPES pH 7.0
76	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄			0.1 M Tris pH 8.0
77	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1 M KCl		0.1 M HEPES pH 7.0
78	2 M Na formate			0.1 M Na acetate pH 5.0
79	3 M Na formate			0.1 M Tris pH 7.5
80	0.8 M NaKHPO ₄			pH 7.5
81	1.3 M NaKHPO ₄			pH 7.0
82	1.6 M NaKHPO ₄			pH 6.5
83	1 M Na acetate			0.1 M HEPES pH 7.5
84	1 M Na citrate			0.1 M HEPES pH 7.0
85	2 M NaCl			0.1 M Na citrate pH 6.0
86	1 M Li ₂ SO ₄			0.1 M MES pH 6.5
87	1.6 M Li ₂ SO ₄			0.1 M Tris pH 8.0
88	1.4 M Na malonate			pH 6.0
89	1.2 M Na/K tartrate			0.1 M Tris pH 8.0
90	1.6 M MgSO ₄			0.1 M MES pH 6.5
91	15% MPD		2% PEG 4000	0.1 M Na acetate pH5.0
92	25% MPD	50 mM Ca acetate		0.1 M Na cacodylate pH 6.0
93	50% MPD			0.1 M imidazole pH 7.0
94	10% 2-propanol	50 mM MgCl ₂	5% PEG 4000	0.1 M MES pH 6.5
95	25% 2-propanol	0.2 M ammonium acetate		0.1 M HEPES pH 7.5
96	15% ethanol	0.1 M NaCl	5% MPD	0.1 M Tris pH 8.0

Table. 3-1 Crystallographic data and refinement statistics

Crystal	unliganded Kap121p (wild-type)	unliganded Kap121p (mutant 7m) ^b	unliganded Kap121p (mutant 3K) ^c	Kap121p bound to Ste12p	Kap121p bound to Pho4p	Kap121p bound to Nup53p	Kap121p bound to RanGTP
Data collection							
X-ray source	SPring-8, BL41XU	SPring-8, BL41XU	SPring-8, BL41XU	PF, BL-17A	SPring-8, BL41XU	PF, BL-5A	SPring-8, BL41XU
Wavelength (Å)	1.00000	1.00000	1.00000	0.98000	1.00000	1.00000	0.97897
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₂ 2 ₁
Unit cell parameters							
a (Å)	77.77	77.38	77.79	77.57	78.09	78.33	97.75
b (Å)	124.39	124.20	122.31	126.16	126.31	131.44	97.75
c (Å)	85.18	85.03	84.67	130.78	128.05	131.50	289.98
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
β (°)	117.02	116.73	116.08	90.00	90.00	90.00	90.00
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	120.00
Resolution (Å) ^a	31.10-2.90 (3.06-2.90)	26.55-2.60 (2.70-2.60)	25.55-3.20 (3.42-3.20)	39.18-2.20 (2.25-2.20)	29.97-2.90 (3.08-2.90)	30.99-2.80 (2.94-2.80)	48.77-2.70 (2.79-2.70)
R _{merge} ^a	0.080 (0.66)	0.062 (0.72)	0.092 (0.50)	0.083 (0.76)	0.13 (0.56)	0.11 (0.64)	0.087 (0.92)
Mean I/σ(I) ^a	10.3 (2.1)	11.7 (1.8)	8.3 (2.3)	11.5 (1.7)	7.2 (2.3)	9.0 (1.7)	11.0 (1.9)
Mean I half-set correlation CC(1/2) ^a	0.998 (0.692)	0.998 (0.586)	0.996 (0.794)	0.998 (0.608)	0.992 (0.729)	0.997 (0.689)	0.998 (0.609)
Completeness (%) ^a	99.6 (99.7)	97.7 (84.3)	99.6 (99.8)	95.9 (75.5)	98.9 (96.9)	95.2 (79.2)	99.7 (100.0)
Multiplicity ^a	3.7 (3.7)	3.8 (3.4)	3.3 (3.3)	5.8 (3.9)	4.5 (3.7)	5.8 (3.5)	4.3 (3.3)
No. of measured reflections ^a	119358 (17024)	161850 (12915)	78232 (13974)	365367 (13205)	126735 (16507)	187468 (11837)	365031 (27505)
No. of unique reflections ^a	31943 (4660)	43084 (3838)	23498 (4250)	62953 (3397)	28382 (4408)	32341 (3419)	45100 (4388)
Refinement							
No. of used reflections	30302	40914	22284	59696	26917	30646	42804
R _{work} (%)	20.12	22.18	20.28	21.53	22.43	25.08	26.06
R _{free} (%)	24.74	26.74	25.19	25.62	26.82	29.67	29.78
No. of atoms							
Protein	7845	8088	7841	7938	7849	7862	9109
Water	0	0	0	101	0	0	4
GTP	0	0	0	0	0	0	32
Mg ²⁺	0	0	0	0	0	0	1
R.m.s. deviations							
Bond lengths (Å)	0.013	0.013	0.010	0.016	0.011	0.011	0.013
Bond angles (°)	1.8	1.8	1.5	1.9	1.5	1.6	1.6
Ramachandran plot ^d							
Favored (%)	96.8	96.2	96.7	95.7	96.3	96.0	96.5
Outliers (%)	0	0	0	0	0	0	0

^a Highest resolution shell is shown in parenthesis.

^b Mutant 7m refers to the R349A/Q350A/D353A/E396A/N430K/D438A/N477A mutant of Kap121p.

^c Mutant 3K refers to the D353K/E396K/D438K mutant of Kap121p.

^d As defined by MolProbity (Chen *et al*, 2010).

Table. 3-2 Kinetic parameters of Kap121p interacting with ligands

Analyte	Ligand	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)	χ^2
Kap121p	Pho4p	8.8×10^4	2.6×10^{-3}	3.0×10^{-8}	2.4
Kap121p	Nup53p	3.2×10^5	1.3×10^{-2}	4.2×10^{-8}	1.7

データ測定は 5 段階の異なる濃度で行い、それぞれの濃度で 2 回

Table. 3-3 出芽酵母による import assay

Strain	N	(N+C)	[p value]
Ste12p wild type			85 (15)
Ste12p V603W/K605E/K608E/I609W/K611E			1 (99)
			[p < 0.001]
Pho4p wild type			89 (11)
Pho4p V144W/K146E			2 (97)
			[p < 0.001]

N は核内を C は細胞質を示す。p value は χ^2 test により算出した。

Table. 3-4 作成したコンストラクト

Protein name	Construct
Kap121p	Full length
Ste12p	581-688, 581-649,
Pho4p	Full length, 1-200, 101-200
Nup53p	401-448
Gsp1p	Full length
Ran (canine)	1-176

すべてのコンストラクトは pGEX-TEV、pET30a-TEV、pET15b、pRSFDuet-1、pRS316、pRS315、pRS313 のいずれかに挿入して使用した。

Table. 3-5 作成した変異体

Protein name	Mutants
Kap121p	Δ 80-90, Δ 642-649, Δ 815-827, Δ 642-649 & Δ 815-827, D353K,
full length	D353K/E396K, D353K/E396K/D438K : 3K, D353A/E396A/D438A, R349A/Q350A/D353A/E396A/N430K/D438A/N477A : 7mt
Ste12p 581-688	V603A/K605A, V603E/K605E, I609W/K611E, V603W/K605E/K608E/I609W/K611E, V603A/K605A/K608A/I609A/K611A
Pho4p 101-200	V144A, V144W, K146A, K146E, V144A/K146A, V144W/K146E
Nup53p 401-448	V407A, V407A/K409A, K406A/V407A/K409A, K406E/V407W/K409E

すべてのコンストラクトは pGEX-TEV、pET30a-TEV、pET15b、pRSFDuet-1、pRS316、pRS315、pRS313 のいずれかに挿入して使用した。

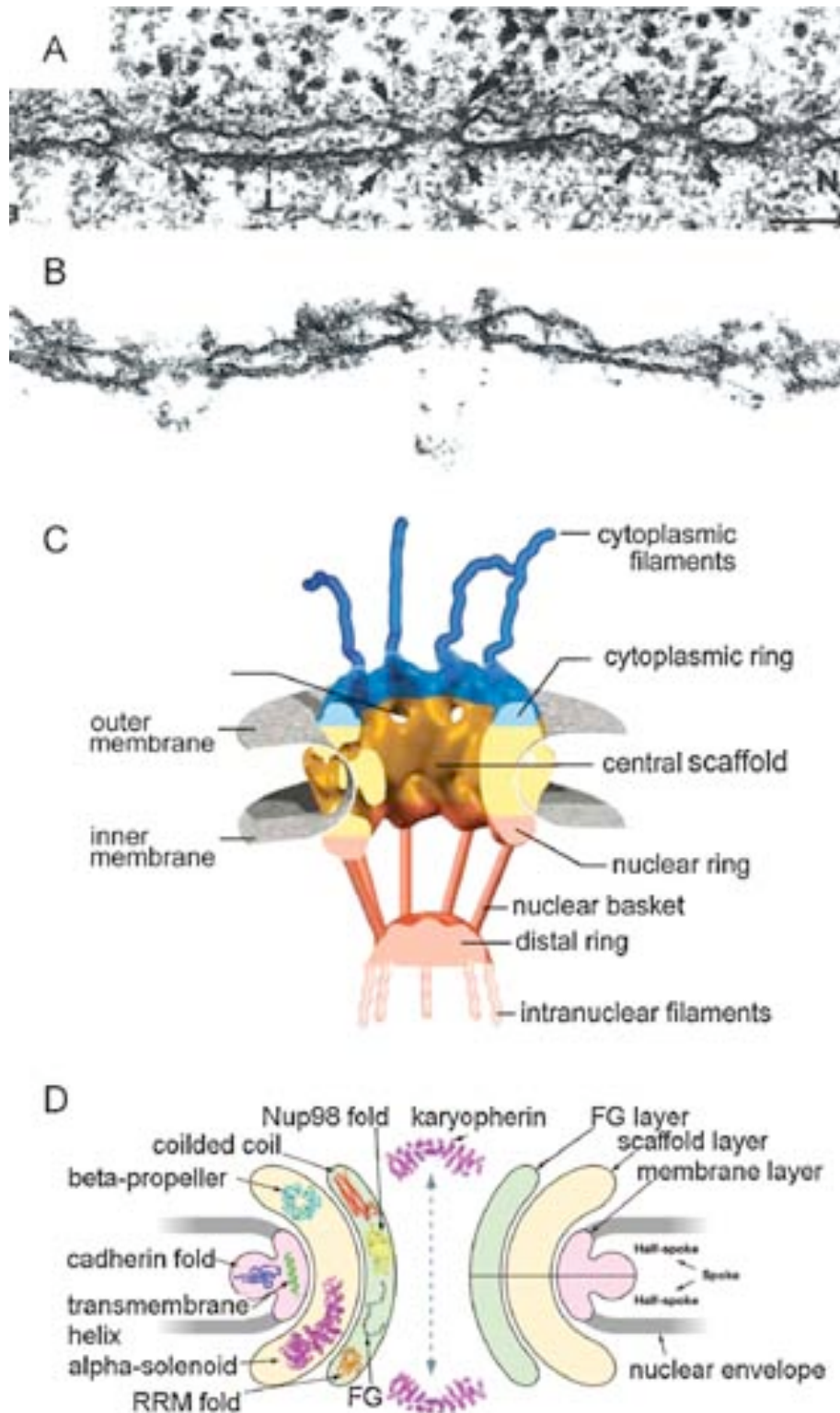


Figure.1-1 核膜孔複合体の全体構造 (Peters, 2009)

A. 生細胞の核膜の電子顕微鏡写真。B. 単離した核膜の電子顕微鏡写真。C. cryo電子顕微鏡を用いたXenopus oocyteの核膜孔複合体の三次元再構成。D. 核膜孔複合体は三層構造からなるmodular構造をしている。

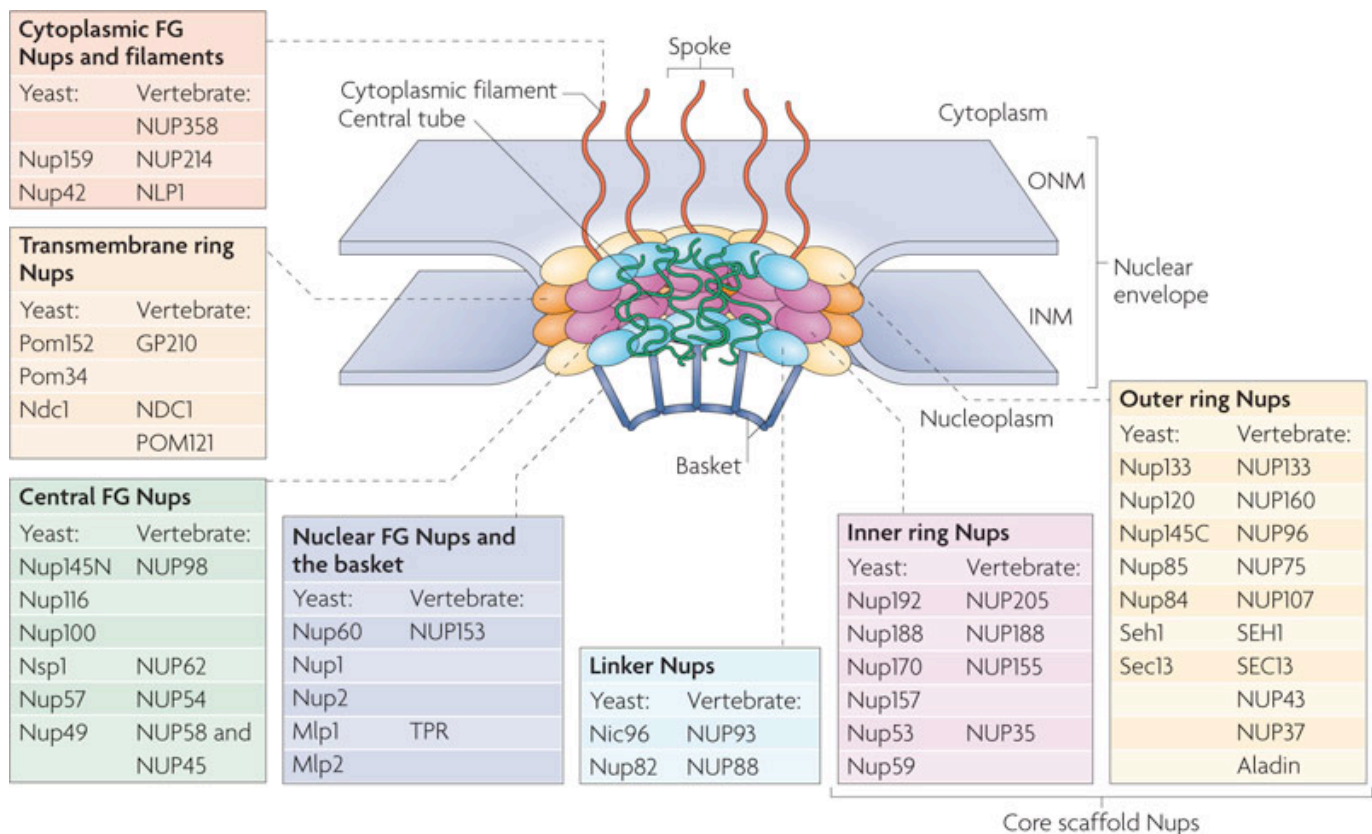


Figure. 1-2 核膜孔複体内でのNucleoporinの配置 (Strambio-de-Castillia et al., 2010)

核膜孔は(nuclear pore)は内膜(INM : Inner nuclear membrane)と外膜(ONM : Outer nuclear membrane)が融合する所に形成されるチューブ状のporeである。核膜孔にある核膜孔複合体は核と細胞質をつなぐチャネルであり、8回の対称性をもつシリンダー構造をしている。その中央部のコアではほぼ対称な構造をしているが、核質側と細胞質側では非対称な構造をしており、細胞質側はcytoplasmic filamentと呼ばれる伸びた構造をしており、核側にはnuclear basketと呼ばれる籠状の構造をしている。核膜孔複合体を構成する蛋白質nucleoporins(Nups)により構成されており、三つの種類に大別される(transmembrane-Nups、structural-Nups、FG-Nups)。核膜孔複合体は膜貫通リング構造を有するtransmembrane-Nupsによって核膜にアンカーされており、膜貫通領域はinner ringやouter ringを構成するstructural Nupsと相互作用することで、核膜につなぐためのscaffoldとしてはたらいっている。FG-Nupsは自身の配列にPhe-Glyの並びが複数リピートされた構造をしており、このFGリピートが核膜孔複合体の表面部分を覆うように配置することで、核膜孔のpermeability barrierとして機能している。

Symmetric nucleoporins			Asymmetric nucleoporins			
	Yeast	Human		Yeast	Human	
Coat nucleoporins	Seh1	Seh1	mRNA export	Dbp5	Ddx19	
	Nup85	Nup75		Gle1	Gle1	
	Nup120	Nup160	Cytoplasmic filaments	---	Nup358	
	Sec13	Sec13		Nup82	Nup88	
	Nup145C	Nup96		Nup159	Nup214	
	Nup84	Nup107		Nup42	CG1	
	Nup133	Nup133		Gle2	Rae1	
	---	Nup37		Nup116	}	Nup98
	---	Nup43		Nup100		
Nic96	Nup93	Nup145N				
Adaptor nucleoporins	Nup192	Nup205	---	ALADIN		
	Nup188	Nup188	Nup1	Nup153		
	Nup157	}	Nup2	Nup50		
	Nup170		Mlp1	}	TPR	
	Nup53	}	Mlp2			
	Nup59		Nup60	---		
Channel nucleoporins	Nsp1	Nup62				
	Nup57	Nup54				
	Nup49	{	Nup58			
Nup45						
POMs	NDC1	NDC1				
	POM34	---				
	POM152	---				
	---	Gp210				
	---	POM121				

Figure. 1-3 Nucleoporinの対称的配置と非対称的配置 (Hoelz et al., 2010)

出芽酵母とヒトの核膜孔複合体の分子構成図。対称的な配置で存在するnucleoporinの大部分はコア部分を構成する因子であり、非対称に存在するnucleoporinはnuclear basket、cytoplasmic filamentを構成する因子である。

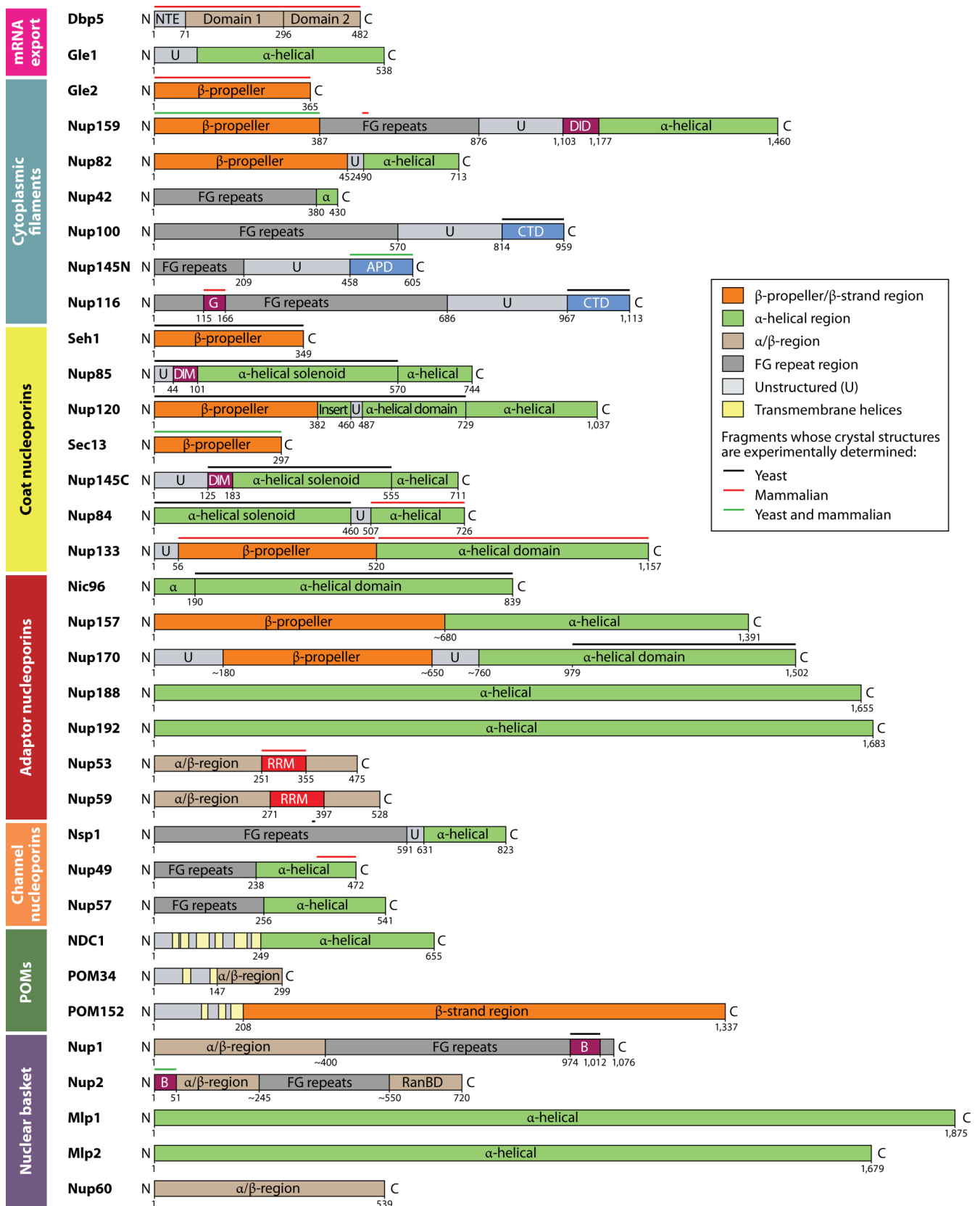


Figure. 1-4 出芽酵母のNucleoporinの二次構造 (Hoelz et al., 2010)

出芽酵母のnucleoporinのドメイン構造を示した。NTEはN-terminal extensionを、Uは二次構造をとらない領域であることを、FG repeatsはPhe-Glyからなるリピート構造を、DIDはdynein light-chain 相互作用ドメインを、CTDはC-末ドメインを、GがGle2結合配列を、APDがautoproteolyticドメインを、DIMがdomain invasionモチーフを、RRMがRNA認識モチーフを、BがKaryopherin結合ドメインを、RanBDがRan結合ドメインを、POMが膜蛋白質であることを、ドメイン構造の模式図の上部にあるbarは結晶構造がすでに解かれている領域である。黒線が出芽酵母の蛋白質を、赤線がほ乳類の蛋白質を、緑線がその両方を示している。

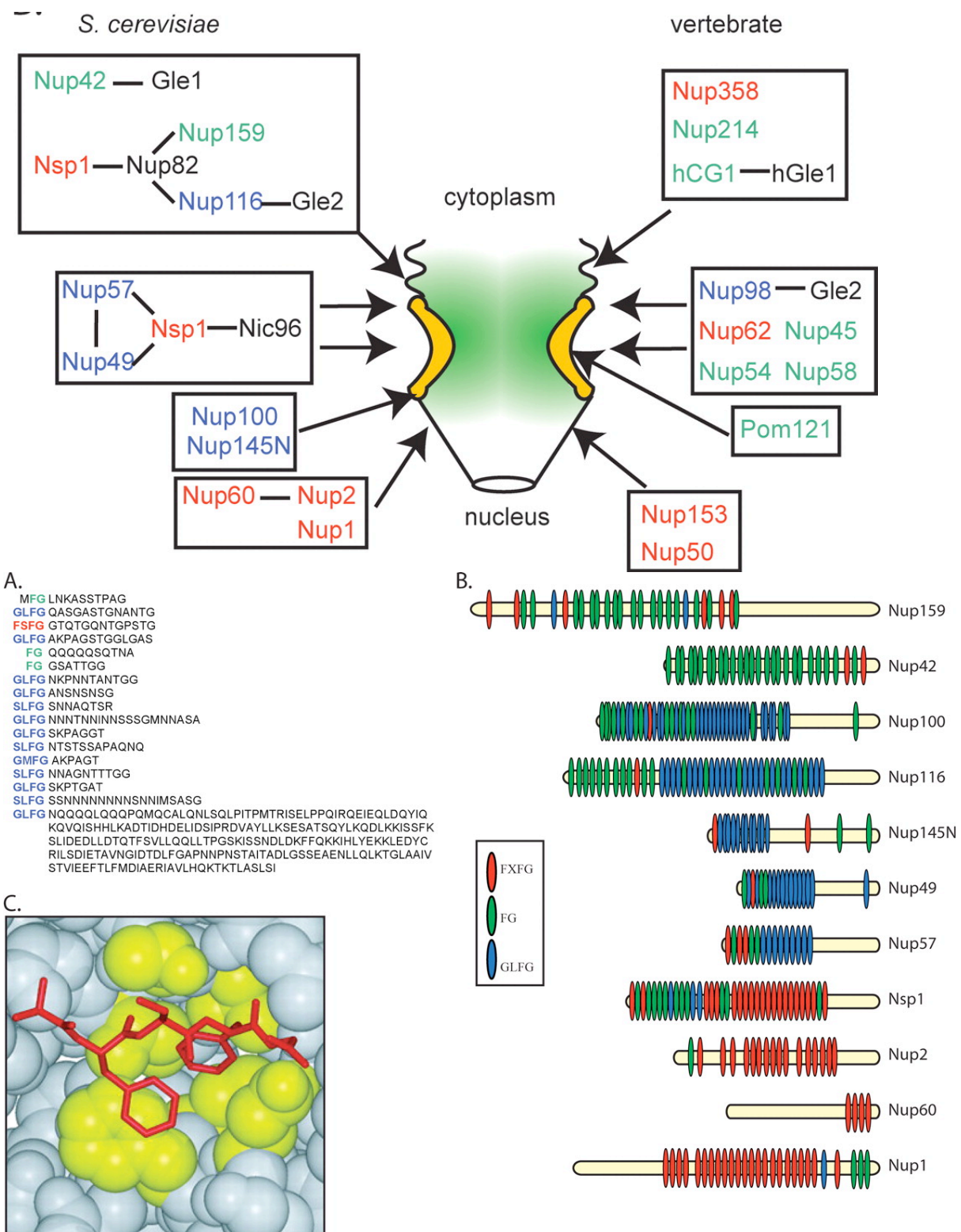


Figure. 1-5 FG-Nupsの核膜孔複体内での局在と詳細な性質(配列と構造)

出芽酵母のFGドメインの構造と配列。A. FGリピートの配列。FGリピートにも複数種存在しており、この配列の違いが機能に反映していると考えられている。B. 出芽酵母のFG-Nupsの模式図とFGリピートの分布図。FGを緑で、FXFGを赤で、GLFGを青で表示した。C. 結晶構造から明らかとなったFXFGとImportin β の相互作用。

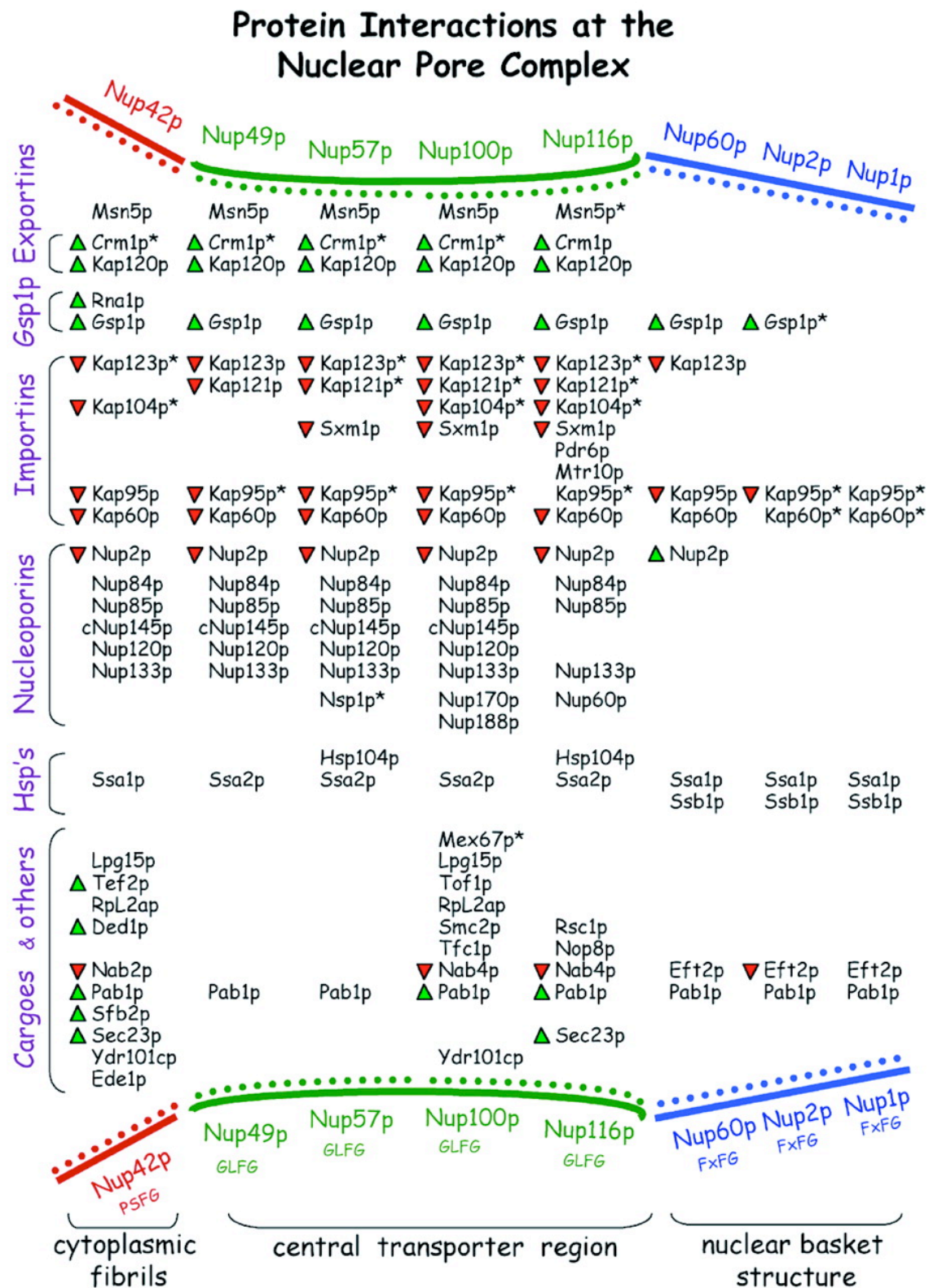


Figure. 1-6 相互作用するKaryopherinとFG-Nupsの組み合わせとRanGTPによる結合への影響

In vitroでのKaryopherinとFG-Nupsの結合の組み合わせを示した。△と▽はRanGTPの存在下でFG-Nupsとの相互作用が上昇するか、減少するかを表している。

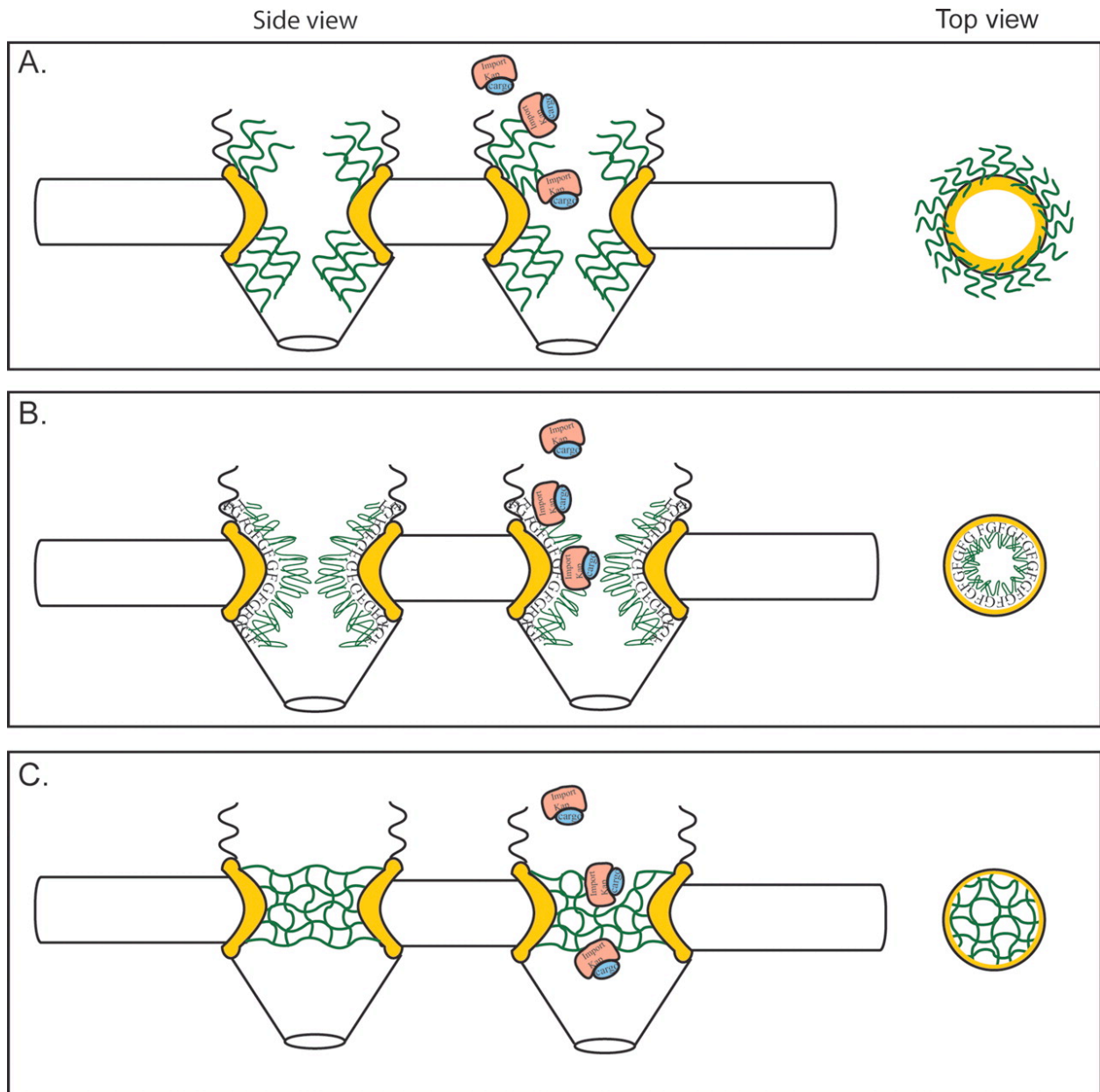


Figure. 1-7 核膜孔透過の代表的なモデル(Terry and Went, 2009より転記)

A. Brownian virtual gating modelを示した。核膜孔複合体の中央部は狭い孔で、FG領域が輸送においてエントロピー的障壁を形成している。KaryopherinはFG領域と相互作用することでこの障壁を乗り越える。B. Reduction of dimensionality modelを示した。FG領域がNPCの内部表面に連続的な構造を形成し、そこをKaryopherinの通り道としている。FG領域の Spacer や他の Nucleoporin が選択的な filter として機能する。C. Selective phase modelを示した。FG領域同士の相互作用により meshwork (hydrogelのような構造)を形成することで物理的に filter を形成する。

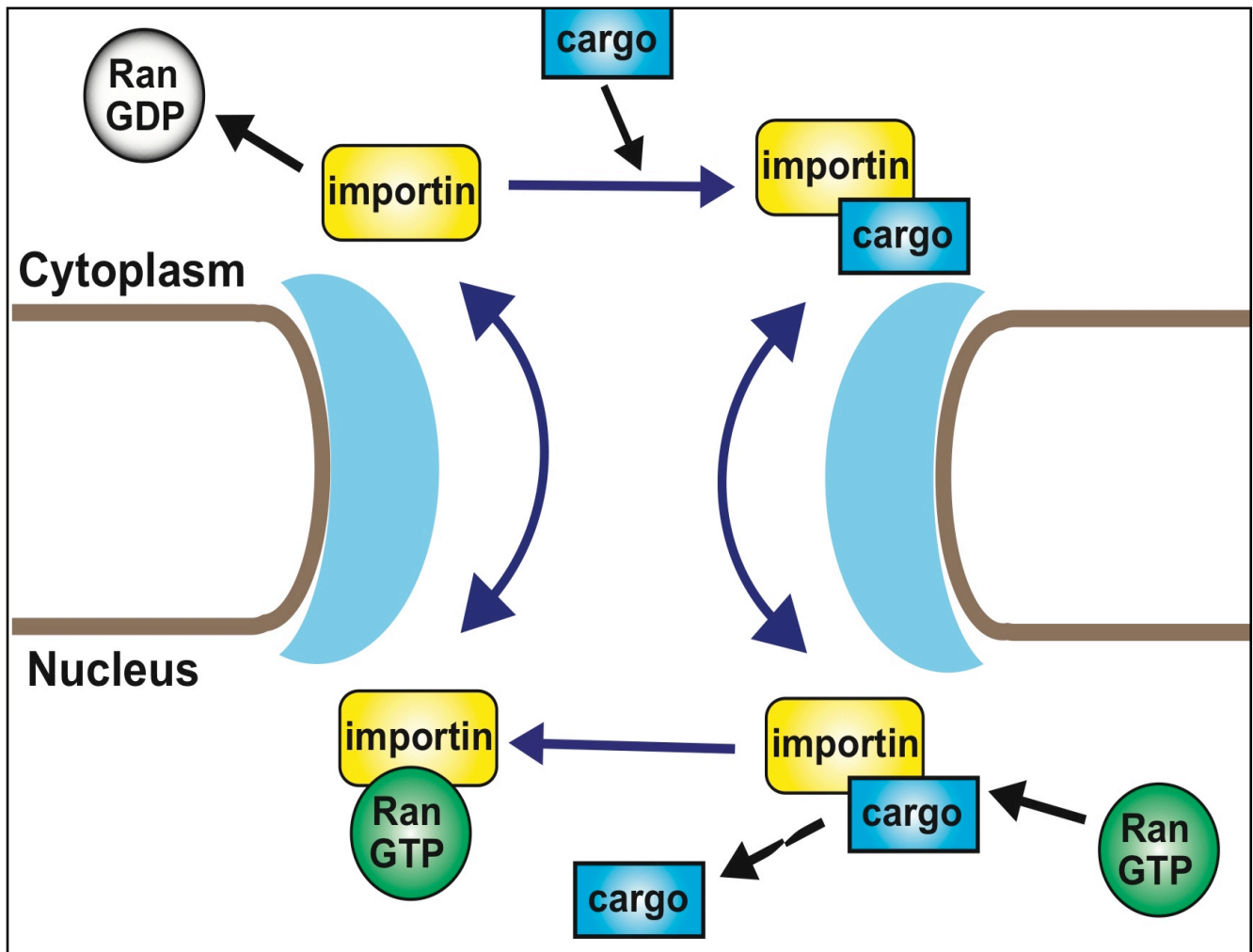


Figure. 1-8 Importinによるcargoの核内輸送サイクル

核内受容体Importinによる核移行サイクルの模式図。FreeのImportinは細胞質でcargoと直接またはアダプター分子を介して相互作用する。この結合の際cargoが共通して持つシグナル配列(NLS: Nuclear localization signal)を特異的に認識し、結合する。その後核膜孔を通り抜け、核内に移動するがこのプロセスはランダムウォークである。核内でRanGTPとの相互作用により、Importinの構造が変化することでcargoが解離する。その結果cargoは核内に運ばれる。RanGTPはcargo解離因子として働く。その後、Importin-RanGTP複合体は細胞質に戻るとRanGTPが加水分解され、RanGDPになる。するとImportinから解離するため、Importinは再びfreeとなり、次のサイクルに入る。

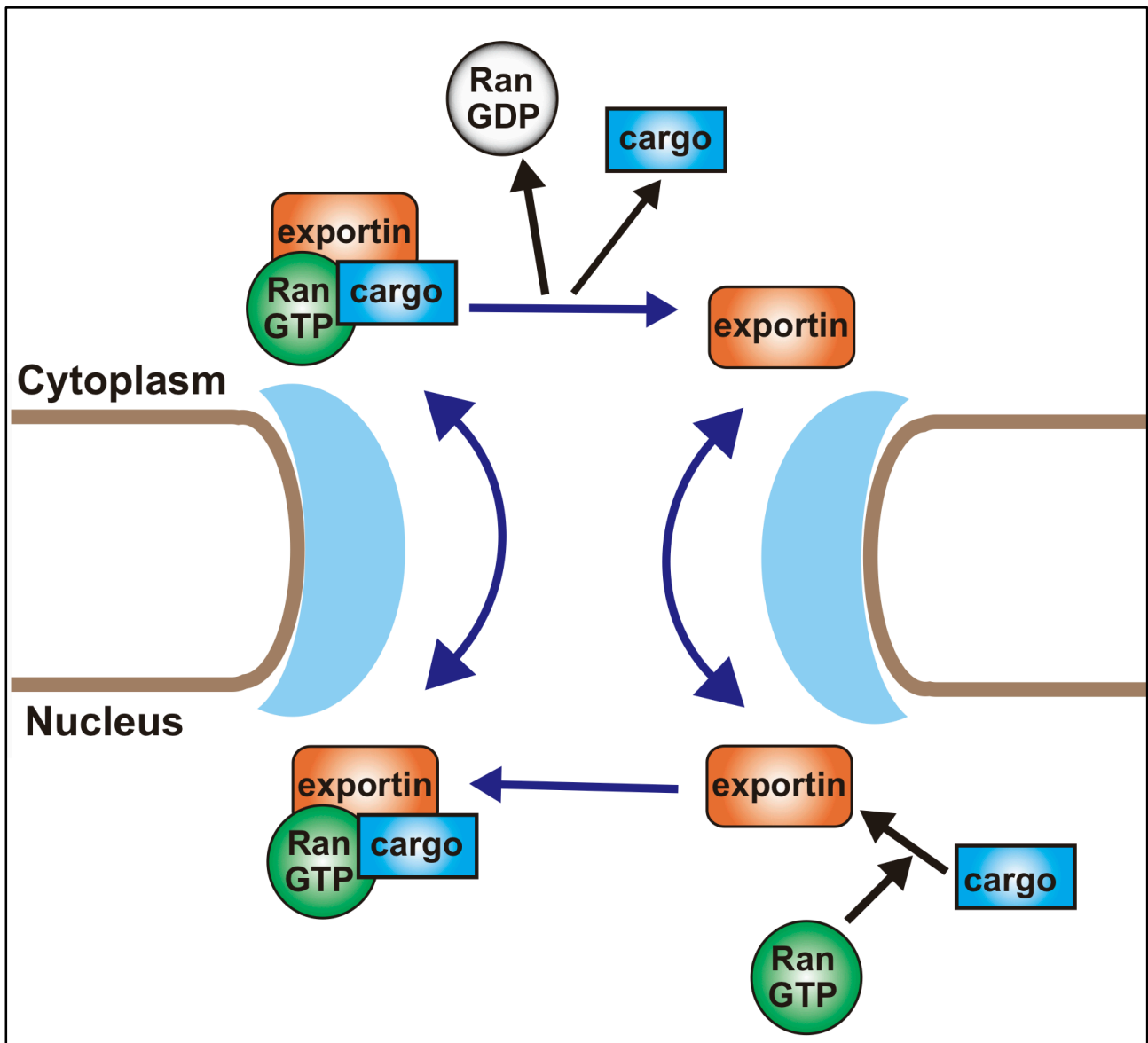
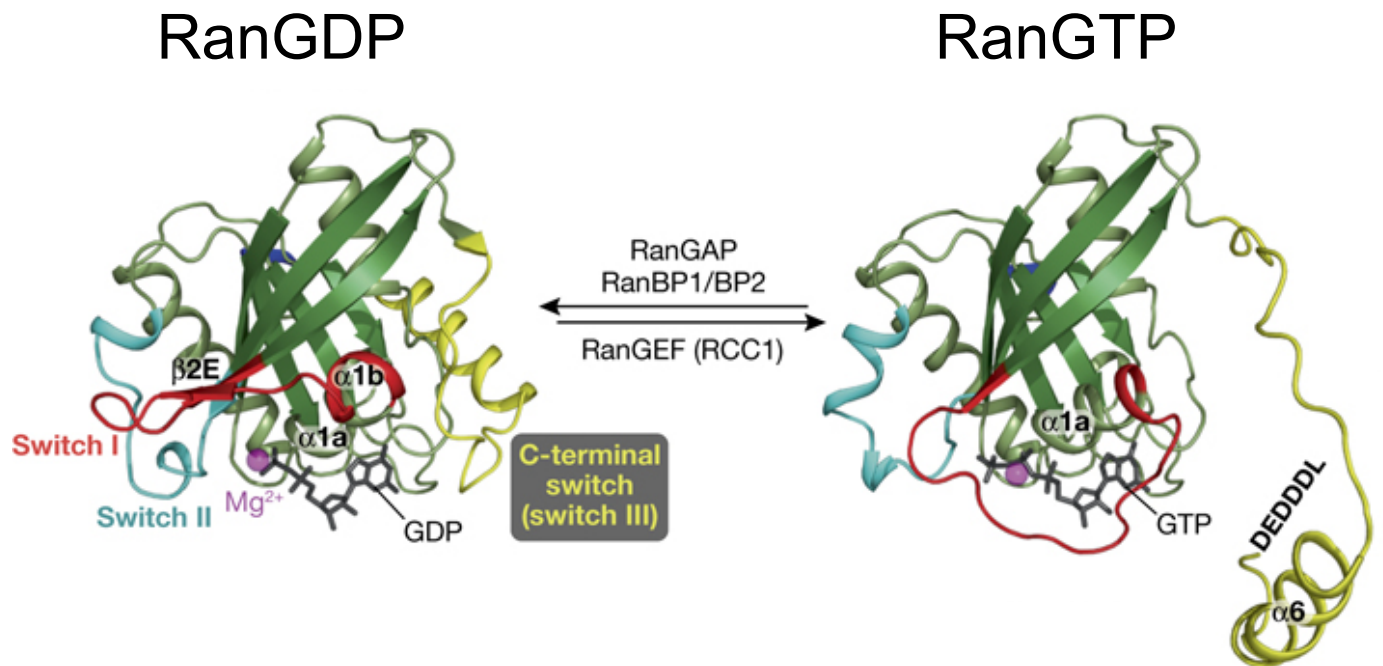


Figure. 1-9 Exportinによるcargoの核外輸送サイクル

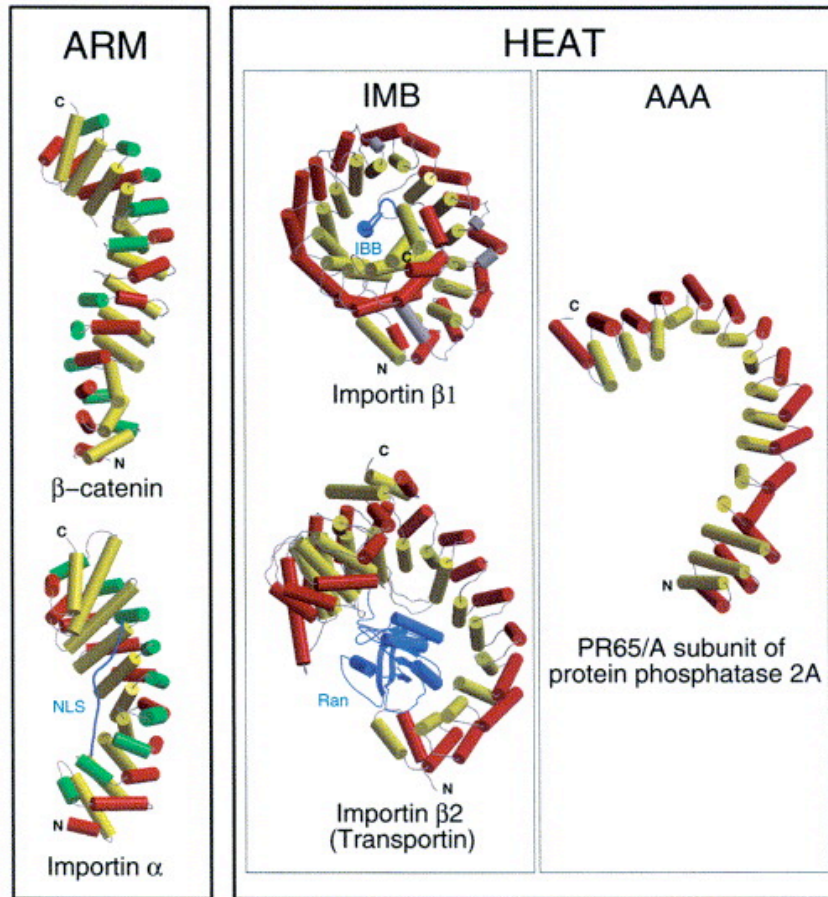
核外受容体Exportinによる核外移行サイクルの模式図。FreeのExportinは核内でcargoとRanGTPと三者協調的に相互作用することで複合体を形成する。RanGTPはcargo結合補助因子として働く。この結合の際cargoが共通して持つシグナル配列(NES : Nuclear Export signal)を特異的に認識し、結合する。その後核膜孔を通り抜け、細胞質内に移動するがこのプロセスはランダムウォークである。その後、RanGTPが加水分解されると、複合体が解離するため、cargoが細胞質に運ばれる。その後freeなExportinは核内に戻り、次のサイクルに入る。



**Figure. 1-10 RanのGTPaseサイクルによる構造変化
(Guttler and Gorlich, 2011より転記)**

RanのGTP加水分解によるスイッチング。RanのGTP型とGDP型の構造を表示した。RanのSwitch I を赤で、Switch II をシアン、C-terminal tailを黄色で表示した。GTP型からGDP型への変化はRanGAPおよびRanBP1/BP2による加水分解の促進により起こり、逆にGDP型からGTP型への変化はRanGEF (RCC1)によりヌクレオチドの交換が促進されることで起こる。GTP型からGDP型への構造変化によりSwitch I およびSwitch II の二次構造の変化が起こった。またC-terminal tailがGTP型ではdisorderしていたが、GDP型ではコアドメインと相互作用することで全体としてグロビュラーな構造をとっている。

A



B

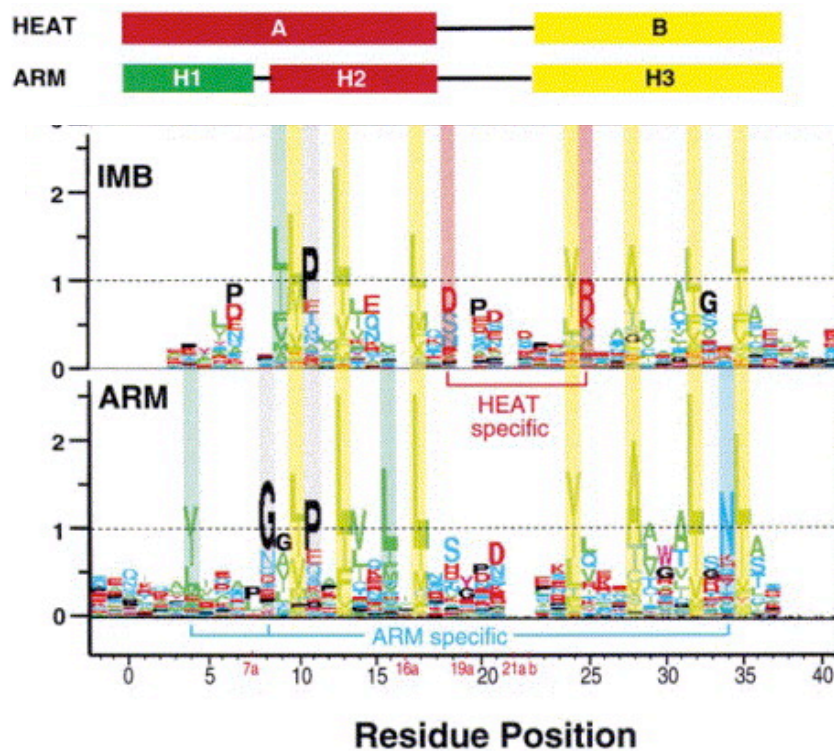


Figure. 1-11 HEATリピート蛋白質の構造とその配列の保存性 (Andrade et al., 2001)

A. 代表的なHEATリピート蛋白質およびARMリピート蛋白質の結晶構造。HEATリピートのA helixを赤で、B helixを黄色で示し、ARMリピートのA helixを緑、B helixを赤、C helixを黄色で表示した。B. ARMリピートとHEATリピートの配列比較から推測されるsequence logos。

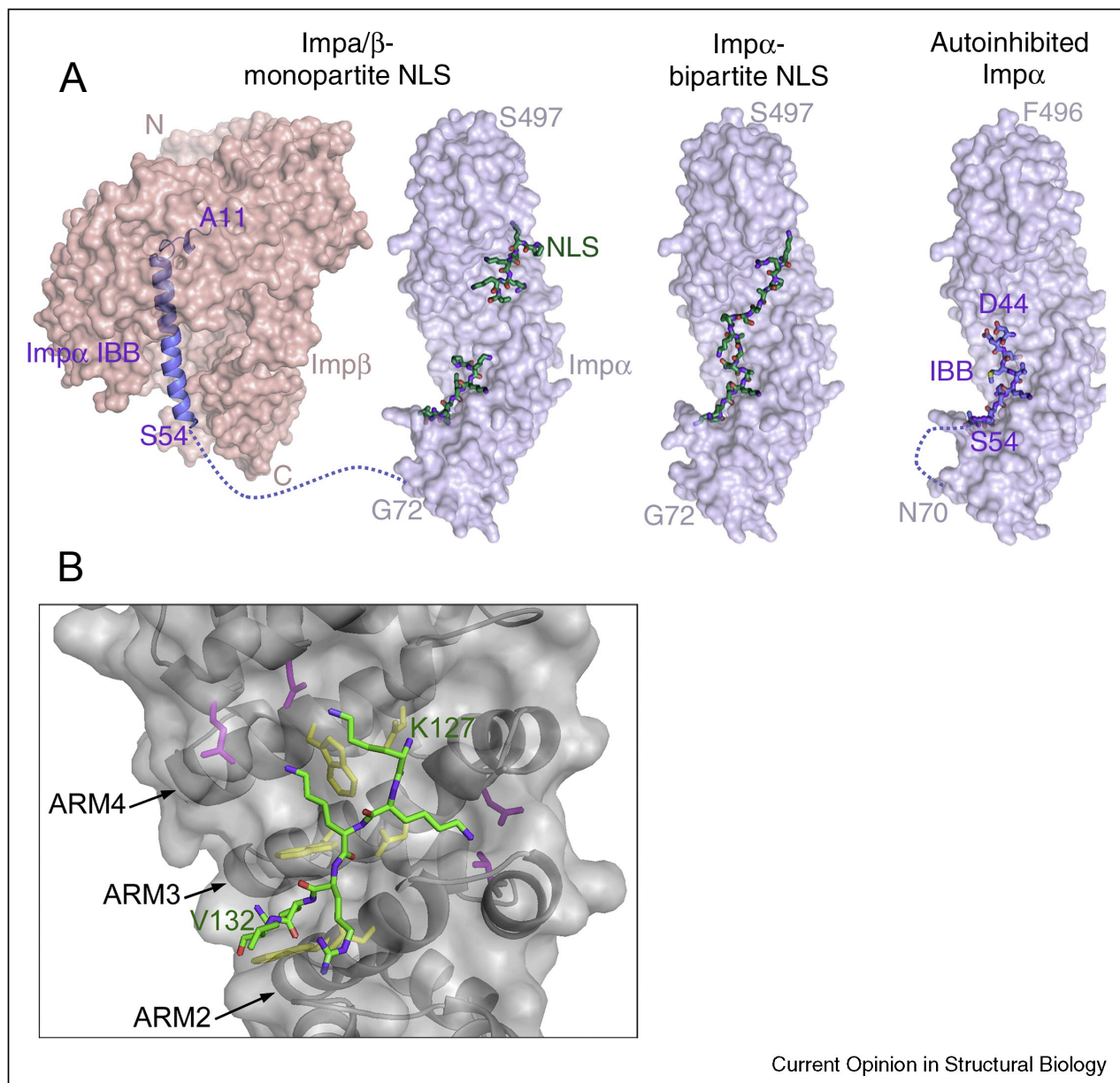


Figure. 1-12 Importin αによるcargo (classical NLS) 認識機構(Xu et al., 2010)

A. Importin β (ピンク) が Importin α の IBB ドメイン (青で、リボン表示) との結合様式を表示した。Monopartite および bipartite の classical NLS (緑) は Importin α に結合する。Full length の Importin α は自身の N 末が NLS 結合サイトと結合することで、自己阻害を起こしている。B. SV40 T antigen の NLS と Importin α の NLS 結合サイトとの相互作用を示した。Importin α の保存された Trp-Asn ペアを黄色で、酸性残基を深紅色で、NLS を緑で示した。

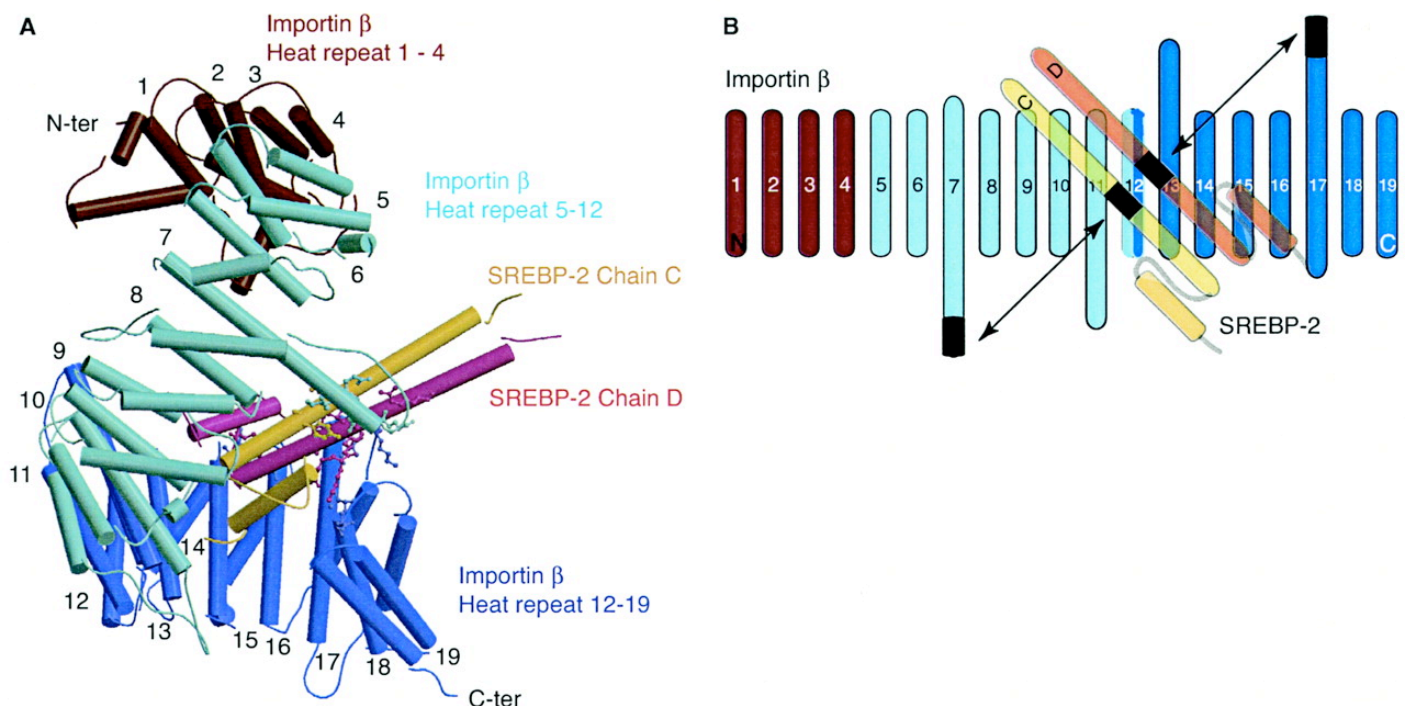


Figure. 1-13 Importin b1とSREBP-2の複合体の結晶構造と結合メカニズム (Lee et al., 2003)

A. Full lengthのImportin βとSREBP-2 dimerの複合体の結晶構造。Importin βは三色に分けて記されており、HEATs 1-4は茶色で、HEATs 5-12の半分の前半を薄い青で、後半を濃い青で記した。SREBP-2 dimerは黄色とピンクで記した。B. Importin βとSREBP-2の模式図。色はAと同様の組み合わせにしてある。二つの主な相互作用はHEAT 7とHEAT 17の間で起こり、そのImportin βの相互作用サイトを黒で示した。Importin βは特徴的な長い2本のhelix (HEAT 7とHEAT 17) がSREBP-2を箸でつかむように結合していた。

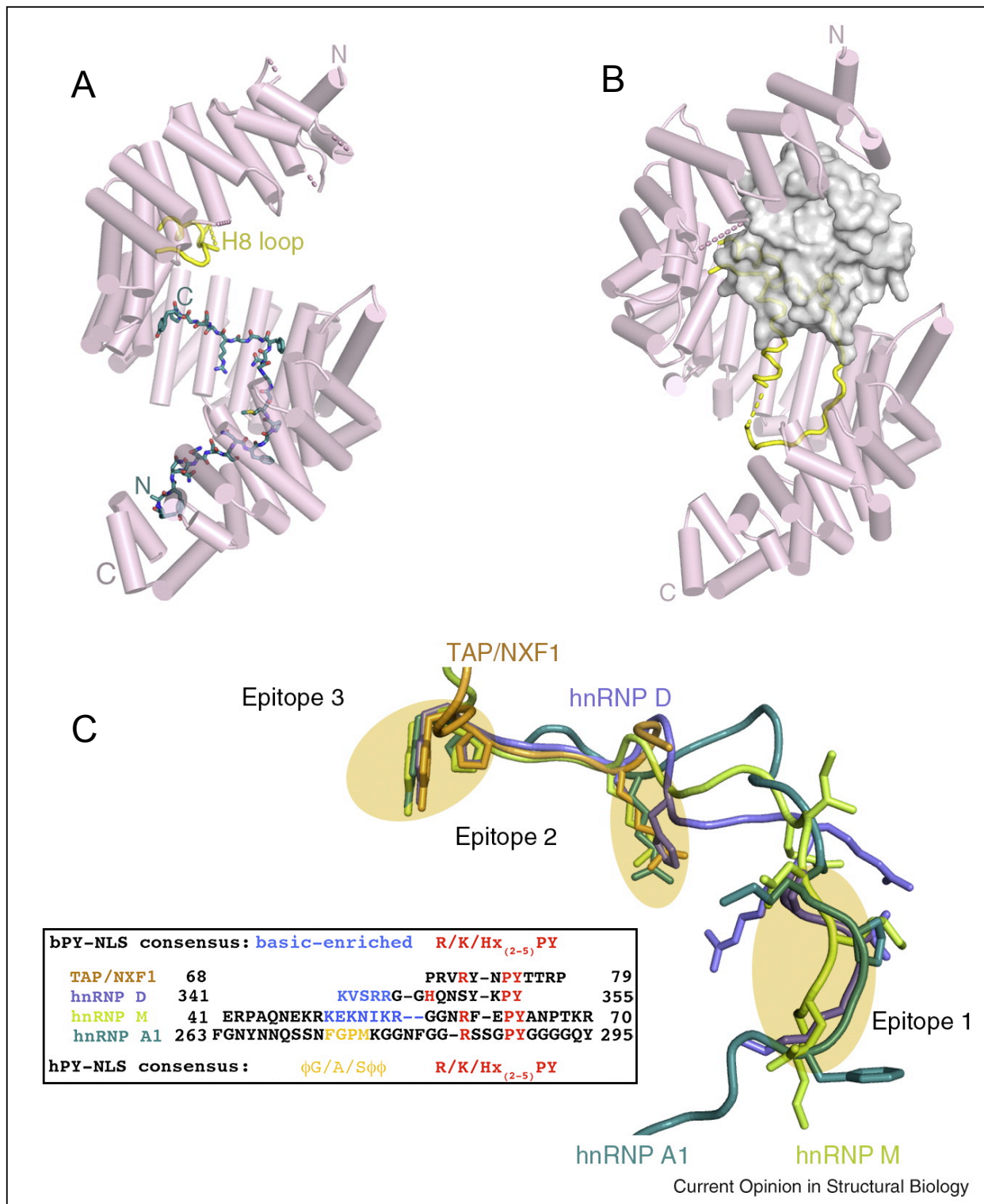
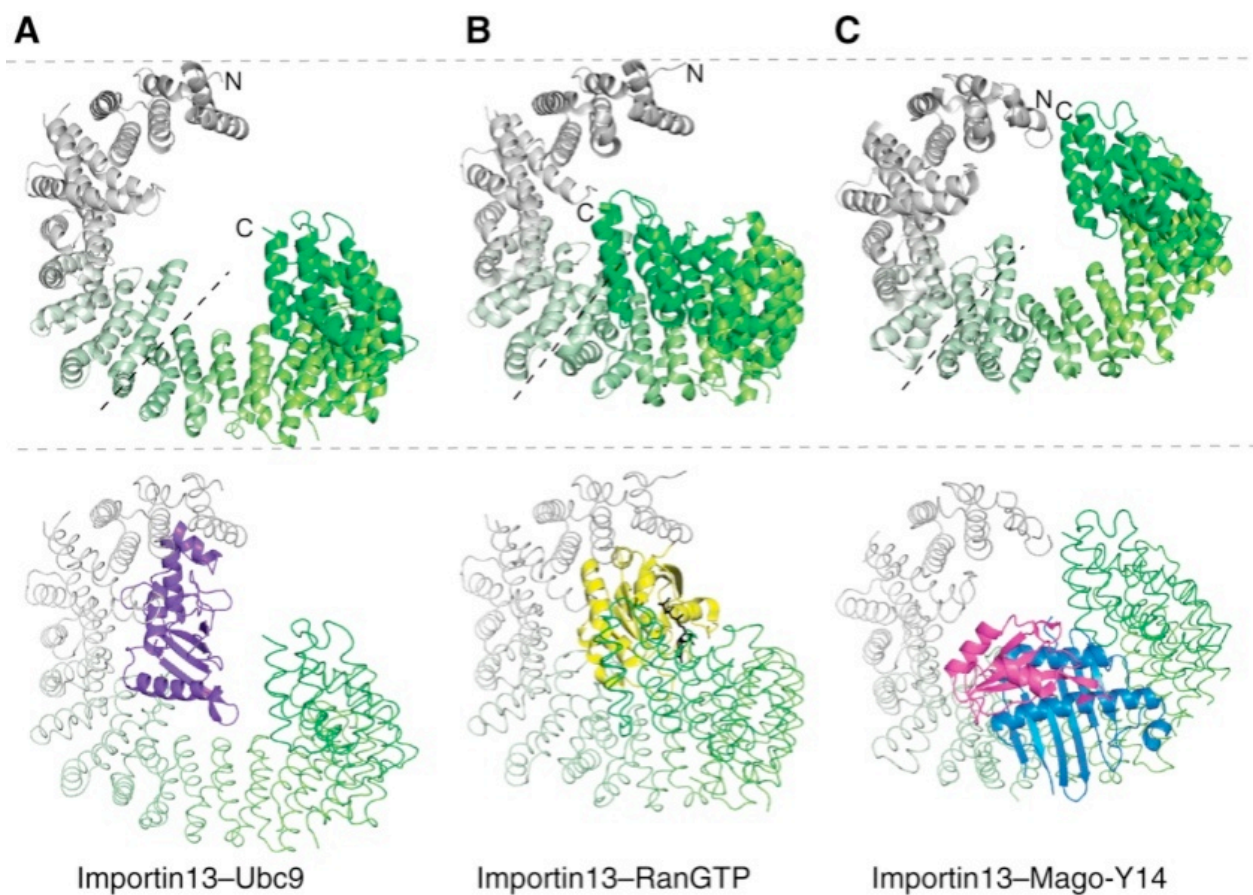


Figure. 1-14 Kap β2によるNLS認識機構 (Xu et al., 2010)

A. Kap β2 (ピンク) と hnRNP A1 の PY-NLS (緑) の複合体の結晶構造。HEAT 8 の間にある loop は disorder しており、黄色で示した。B. Kap β2 と RanGppNHp の複合体の結晶構造。Ran が結合すると disorder していた HEAT 8 loop が PY-NLS 結合サイトに結合した。C. hnRNP A1、M、D、mRNA export factor NXF1 の NLS 部分の配列および構造の重ね合わせ。三つの epitope が存在しており、モチーフ1は疎水性アミノ酸、モチーフ2は塩基性アミノ酸、モチーフ3は Phe-Tyr を示している。



**Figure. 1-15 Importin 13のcargo認識機構
(Grunwald and Bono, 2010)**

Importin 13の異なる複合体の構造変化。A. Importin 13-cargo(Ubc9)複合体の結晶構造。B. Importin 13-RanGTP複合体の結晶構造。C. Importin 13-Mago-Y14(cargo)複合体の結晶構造。三つの構造においてImportin 13の全体構造は大きく変化する。

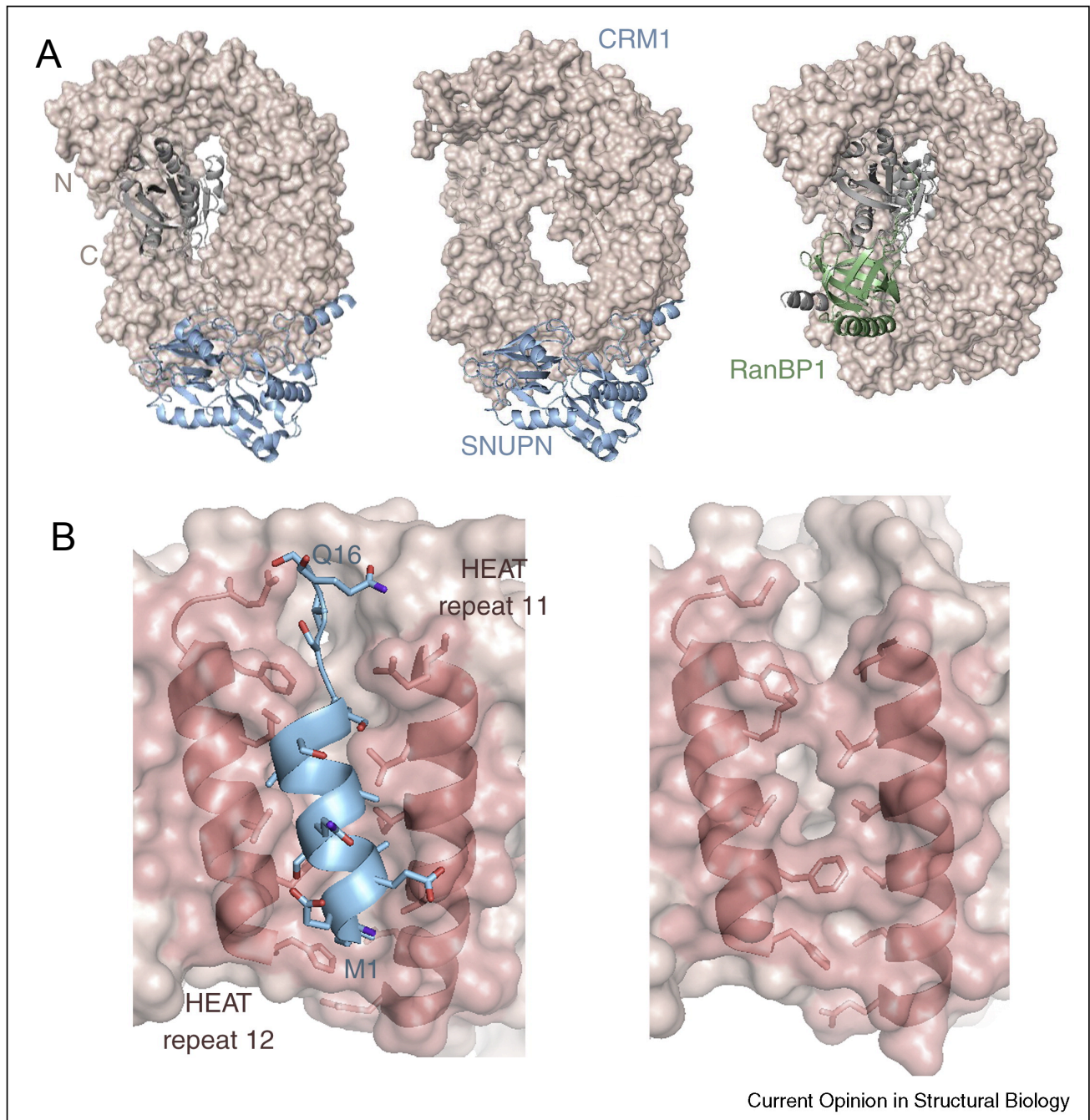


Figure. 1-16 CRM1によるNES認識機構 (Xu et al., 2010)

CRM1複合体の結晶構造。A. 左からCRM1-cargo(SNUPN)複合体、CRM1-cargo(SNUPN)-RanGTP複合体、CRM1-RanGTP-RanBP1複体の結晶構造。B. SNUPNのleu-rich NESがCRM1の外側の疎水性の溝に結合する。一方CRM1-RanGTP-RanBP1複体の構造でNESの溝が閉じている(右図)。

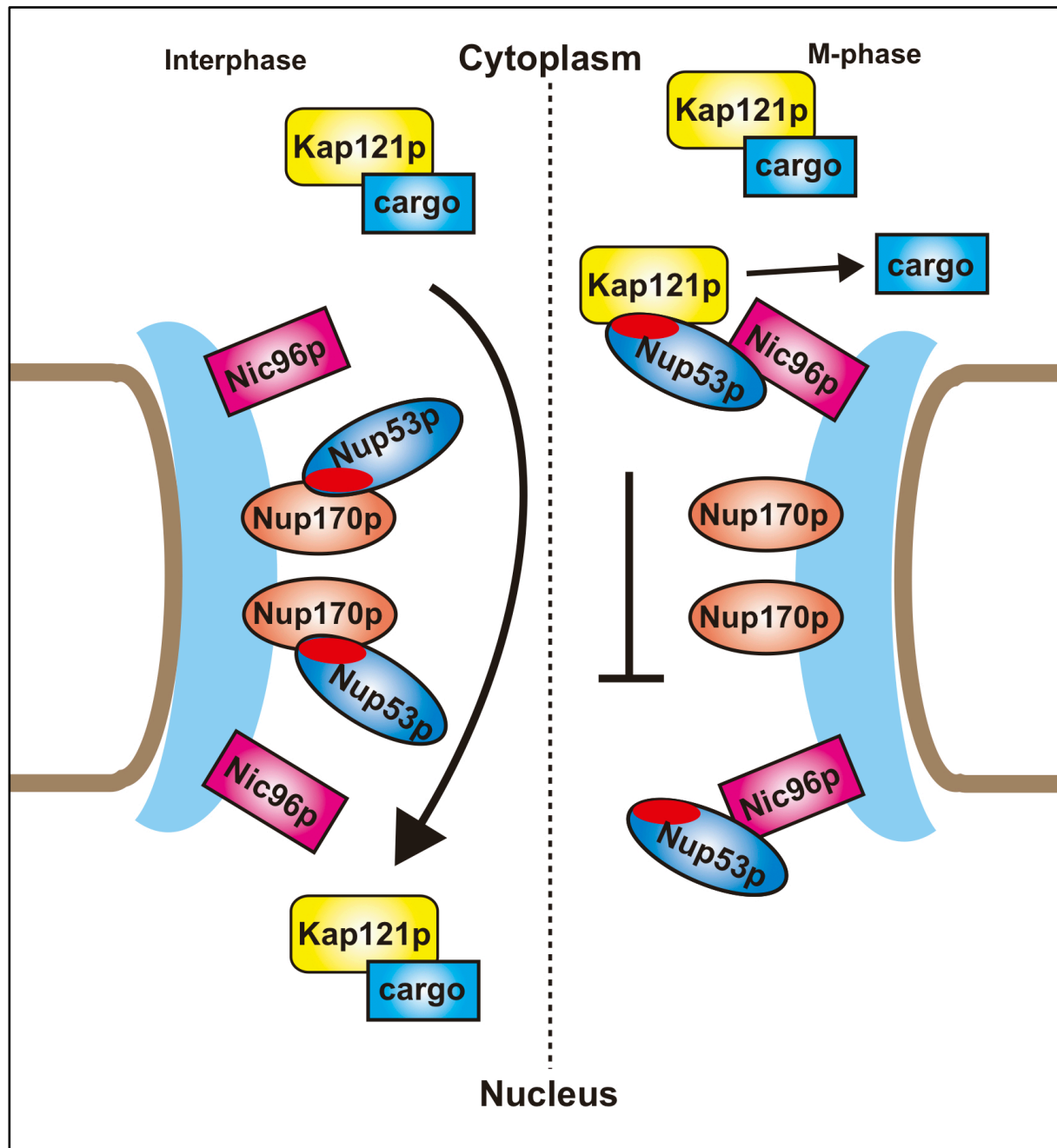
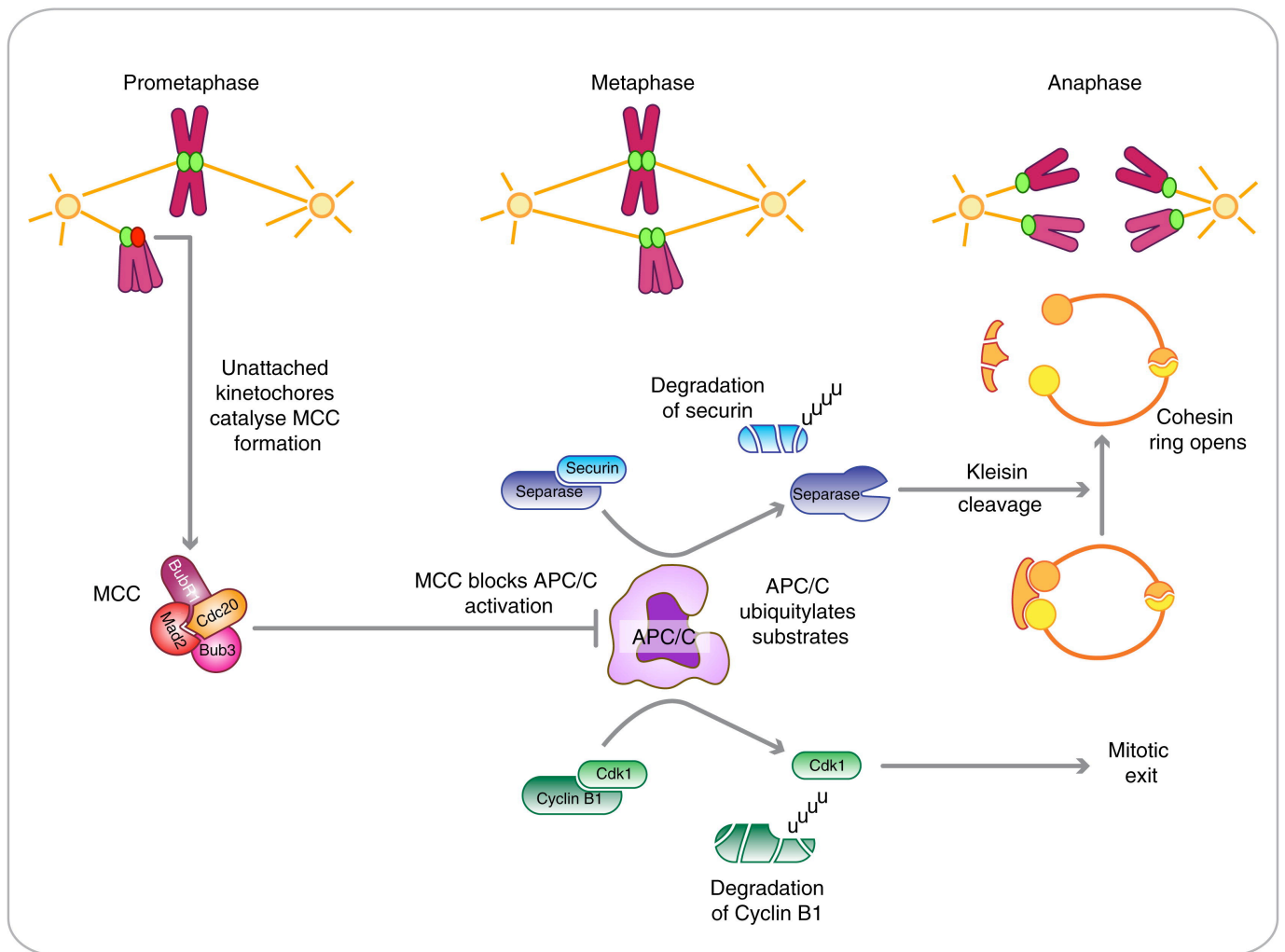


Figure. 1-17 Kap121pによる細胞周期依存的な核移行制御機構の作業仮説(Makhnevych et al., 2003)

出芽酵母のImportinであるKap121p依存的な核移行制御機構の仮説のモデル図。NucleoporinのひとつであるNup53pが主要な機能を果たしており、Nup53pはKap121pと特異的に相互作用するドメイン(Kap121p binding site : KBD、赤で示した部分)を持っている。間期ではNup53pのKBDは別のnucleoporinであるNup170pと相互作用することでマスクされている。そのためKap121pにより起こる物質の核移行は正常に起こる。一方M期では核膜孔複合体の内部構造の再編成により、Nup53pの核膜孔複合体内部での結合のパートナーが変化することで、今までマスクされていたKBDが露出する。そのためNup53pはKap121pと結合できるようになり、この結合によりKap121pからcargoが解離するとともに核膜孔複合体アンカーされる。そのためKap121pによる核移行は阻害されると考えられている。



Current Biology

Figure. 1-18 Spindle Assembly Checkpointの分子メカニズム (Lara-Gonzalez et al., 2010)

Mitosisの初期 (prometaphase) の間に、MTと結合していないキネトコアがmitotic checkpoint complex (MCC) の形成を触媒する。MCCはBubR1、Bub3、Mad2、Cdc20により形成されている。このMCCの形成によりAPC/Cの活性を阻害する。すべての染色体がspindleと結合したキネトコアで中央部に並ぶと (metaphase)、MCCの解離が引き起こされ、Cdc20がAPC/Cを活性化する。その活性化により、securinやcyclin B1の分解が促進され、細胞周期がmitotic exitを導く方向に進む。

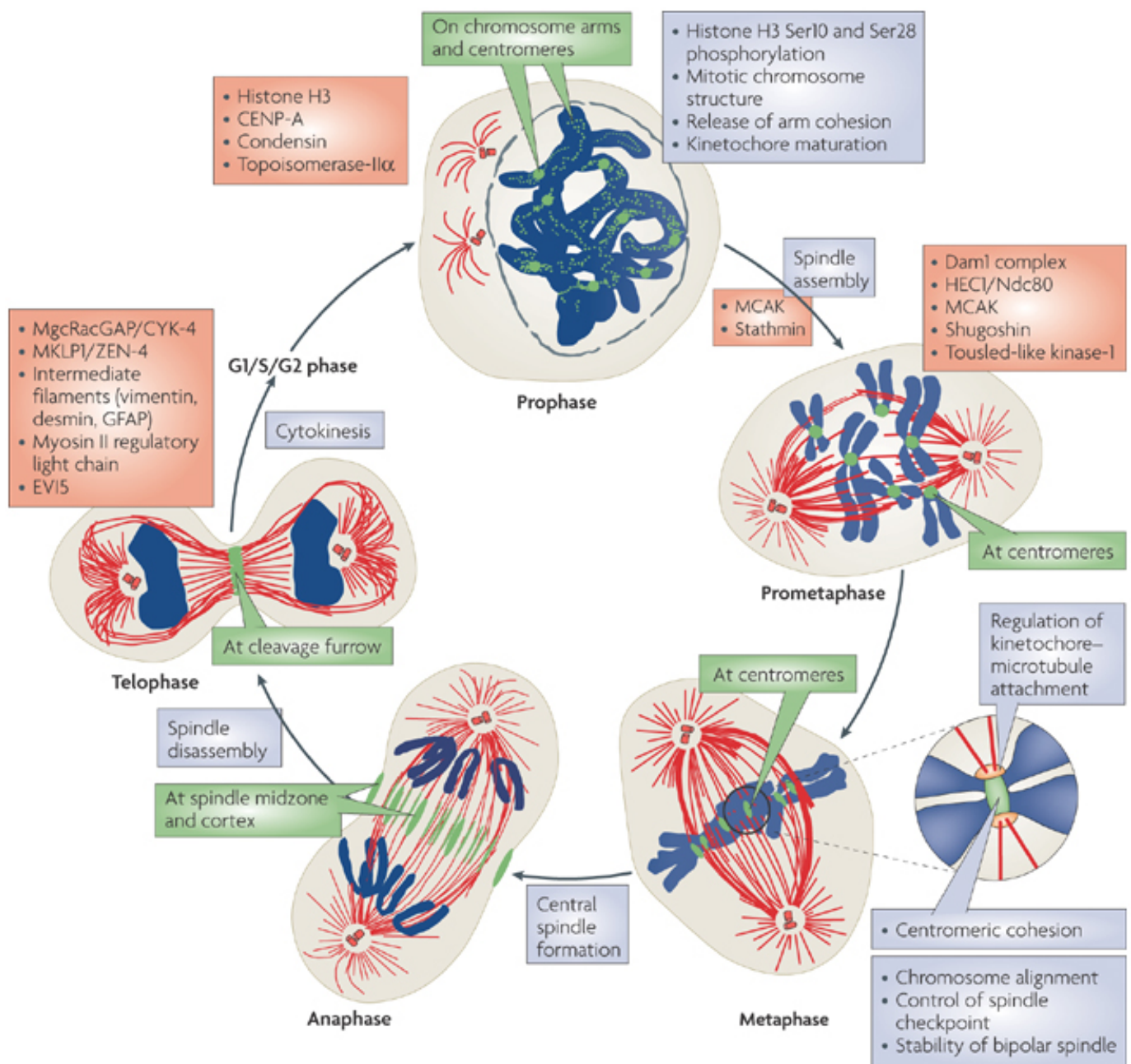


Figure. 1-19 Mitosisの間のChromosomal passenger complexの局在と機能(Ruchaud et al., 2007より転記)

Chromosomal passenger complex (CPC)のモデル図。CPCの局在を緑で示しており、緑のboxにその局在位置を記した。灰色のboxはその時期のCPCの機能を記し、赤のboxはCPCの主なターゲット分子を記した。

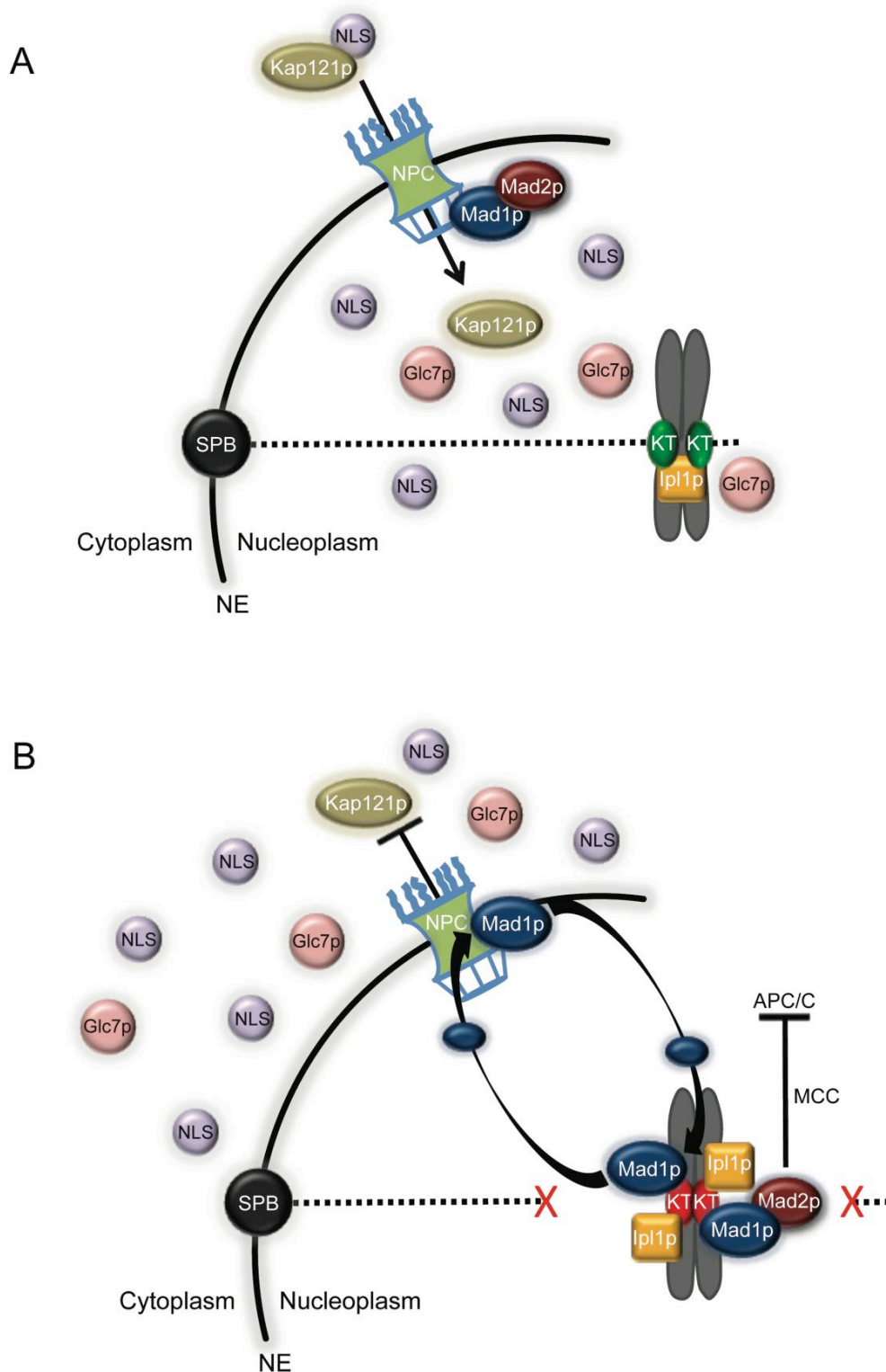


Figure. 1-20 KTIPによるMad1p活性化のモデル(Cairo et al., 2013より転記)

A. Metaphaseにはspindle MTsがspindle pore body (SPB)とキネトコアをつなぎ、染色体にテンションがかかる。するとSpindle Assembly Checkpoint(SAC)が解除され、細胞周期が進行する。この状況ではMad1pが核膜孔複合体の核側のみに局在しており、Kap121pによる物質の核移行(Glc7pを含む)は正常に起こる。

B. KinetochoreとMTの相互作用が崩壊すると、SACによる細胞周期のarrestが誘導される。Mad1pおよびMad2pは核膜孔複合体から解離し、MTから解離したkinetochoreと相互作用する。これにより mitotic checkpoint complex (MCC) の形成およびAPC/Cの活性抑制が引き起こされる。これに付随してMad1pは核膜孔複合体 (Mad1p/Mad2p複合体として核膜孔複合体に結合する領域とは異なる所に結合すると示唆される) とkinetochoreの間をシャトリングする。このもう一つの推定的な核膜孔複合体とMad1pとの結合により Kap121pが担う核移行が阻害される。このプロセスはIpl1pキナーゼの活性に依存しており、Glc7pフォスファターゼの核移行を阻害を起こすと考えられている。

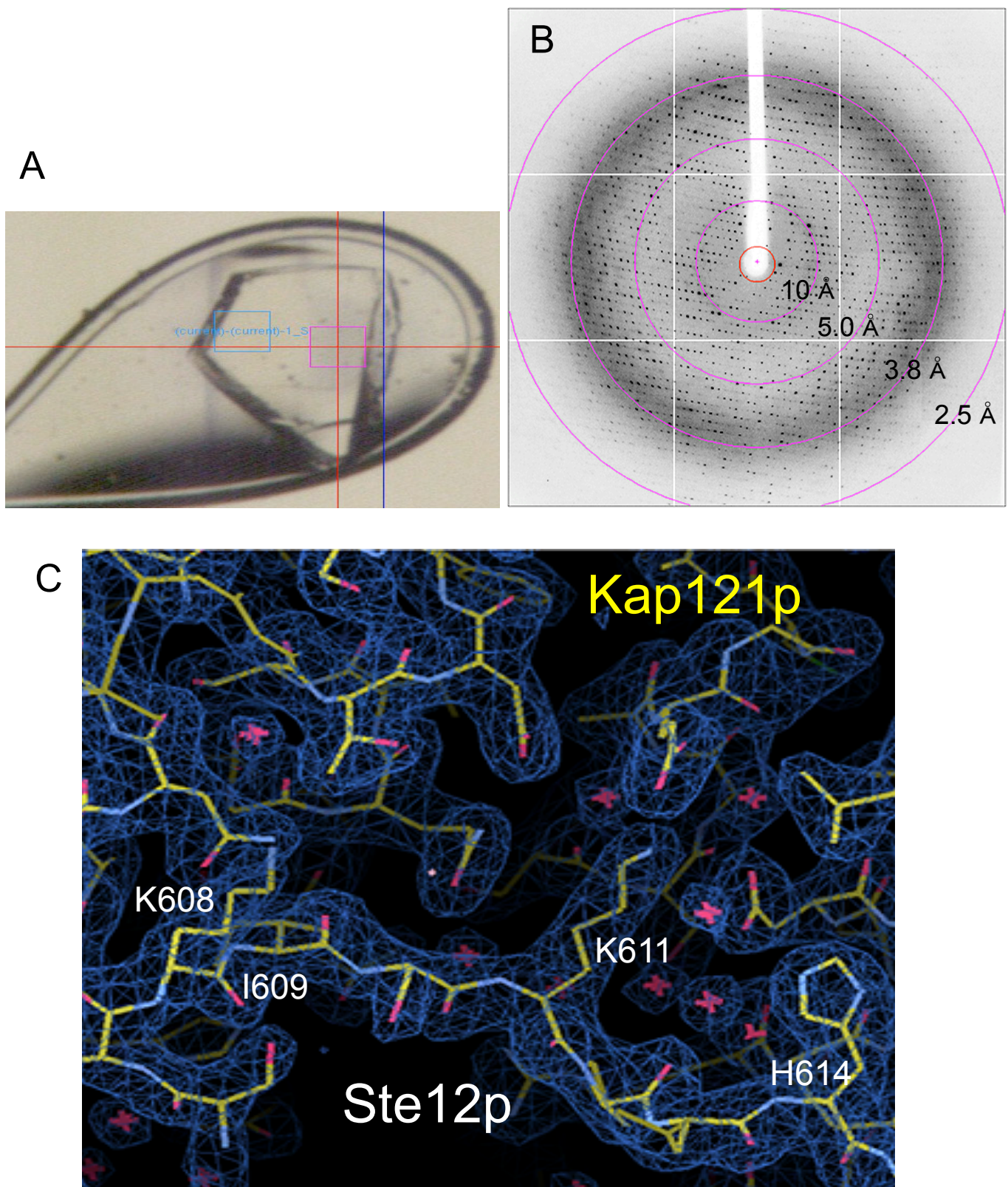
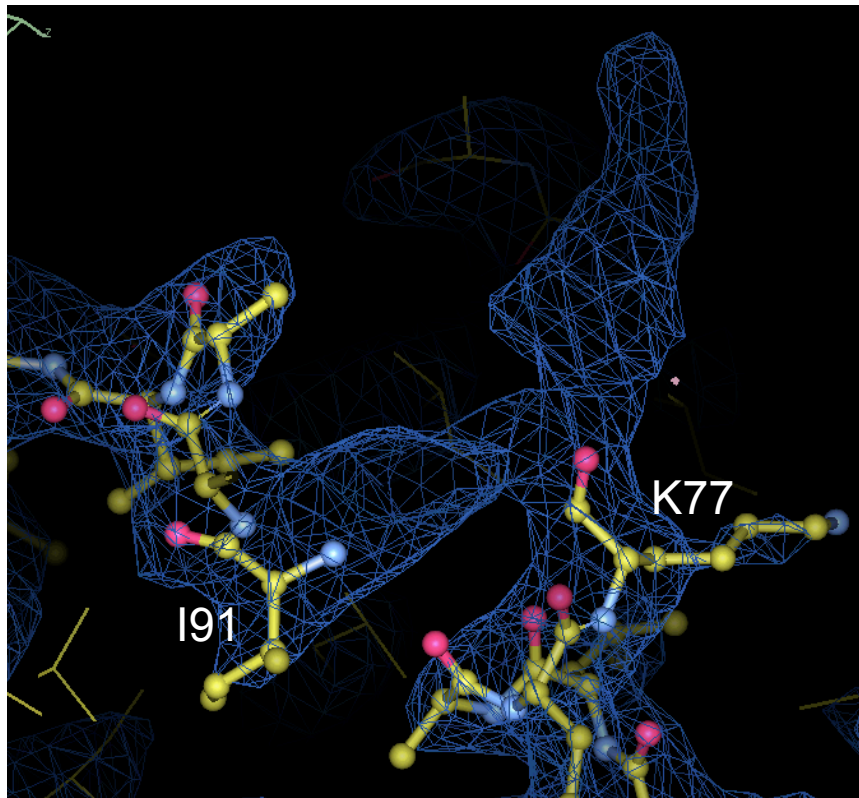


Figure. 2-1 Kap121p-Ste12p複合体のX線結晶解析

A. Kap121p-Ste12p複合体の結晶。B. X線回折パターン。Spring-8ビームラインBL41XUにて測定。C. 2Fo-Fcマップと原子モデルを表示した。電子密度マップ青で、はcontourレベル1.0 σ で表示した。原子モデル内の炭素原子を黄、酸素原子を赤、窒素原子を青で表示した。また水分子を×印で表示した。

電子密度が見えないloop 1 (78-90)

A



電子密度が見えないloop 2(813-827)

B

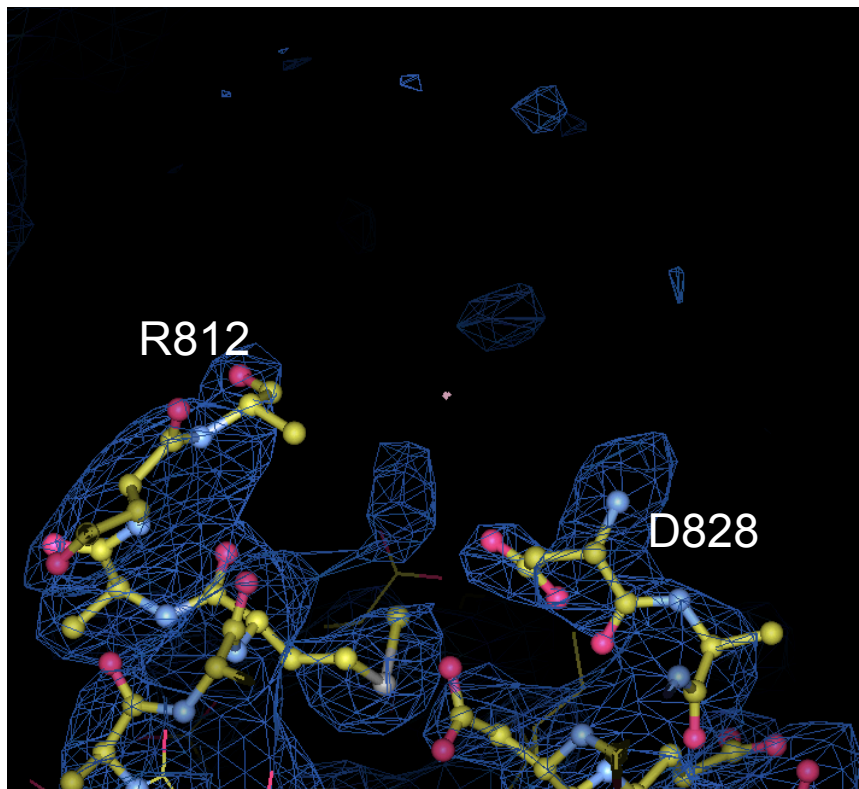


Figure. 3-1 Kap121p-RanGTP複合体内の電子密度の見えないループ

2Fo-Fcマップと原子モデル。contourレベル0.9 σ で表示した。A.Bはそれぞれのループ付近の電子密度マップと原子モデルを表示した。原子モデル内の炭素原子を黄、酸素原子を赤、窒素原子を青で表示した。

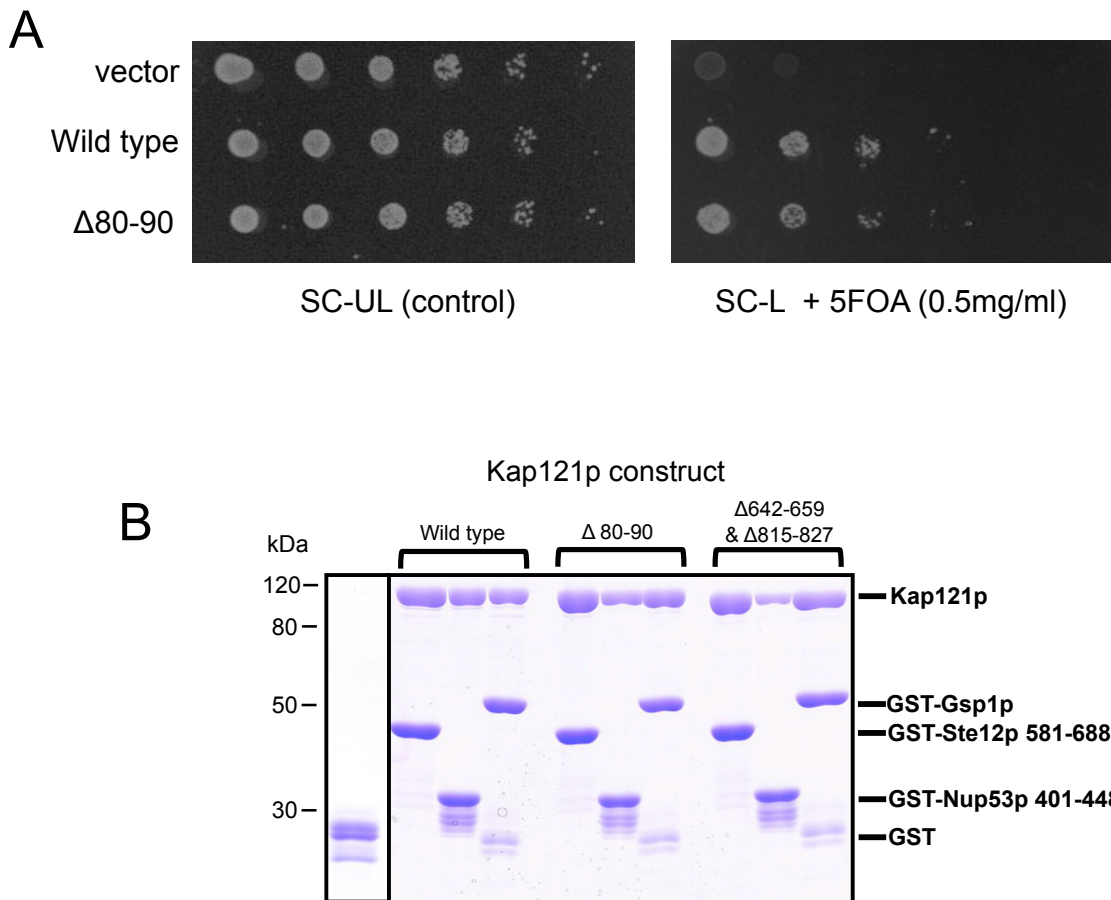


Figure. 3-2 Kap121pの変異体コンストラクトの機能解析

結晶化に用いたコンストラクトが機能を野生型と同等の機能を持つかを、in vivoおよびin vitroで検証した。A. 出芽酵母による相補性解析。結晶化に使用した出芽酵母のKap121p $\Delta L1$ (アミノ酸残基80-90を除去したコンストラクト) がwild typeのKap121pを相補した。B. 結晶化に使用したKap121p $\Delta L1$ およびKap121p $\Delta L2$ & $\Delta insert$ (アミノ酸残基642-659および815-827を除去したコンストラクト) のin vitroでのcargo、Nup53pおよびRanGTPとのpull down assayを行った。8.5 μ gのGST、GST-Ste12p (581-688)、GST-Nup53p (401-448)、GST-Gsp1pを固定したGSH-Sepharoseに16 μ gの野生型および変異体のKap121pをincubateした。その結果、用いた二つの変異体は共に野生型と同等の結合アフィニティで結合した。

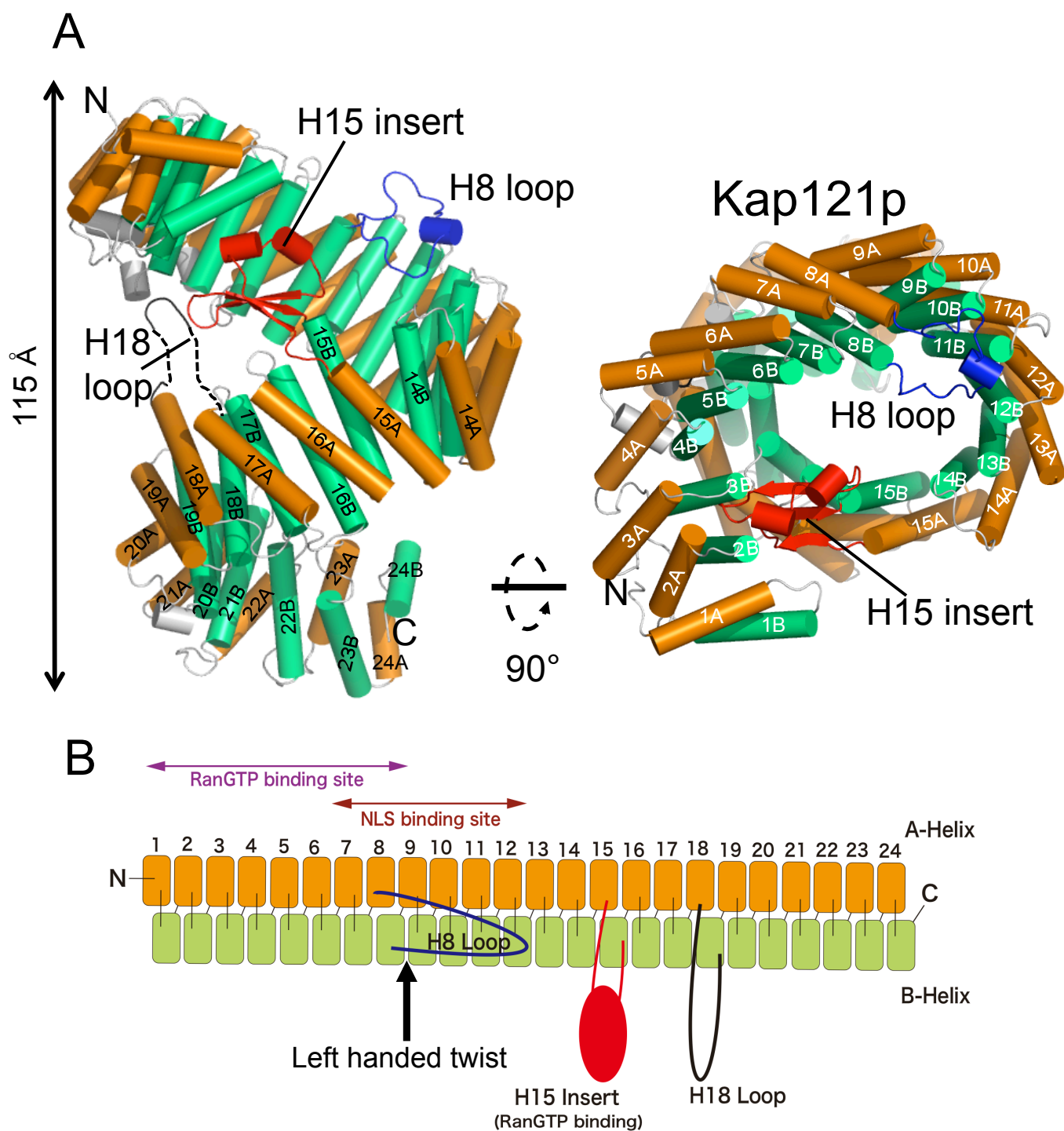


Figure. 3-3 Kap121pの全体構造

本研究で初めて明らかにしたKap121pの結晶構造を表示した。Kap121pは右巻きの超らせん構造をしており、24のHEATリピートより形成されていた。A. Kap121pの全体構造。A-helixを橙色、B-helixを緑色で表示した。HEAT 8 loopを青色、HEAT 15 insertを赤色、HEAT18 loopを黒色で表示した。B. Kap121pの構造とドメイン構成のイラスト。それぞれの色はAと対応している。

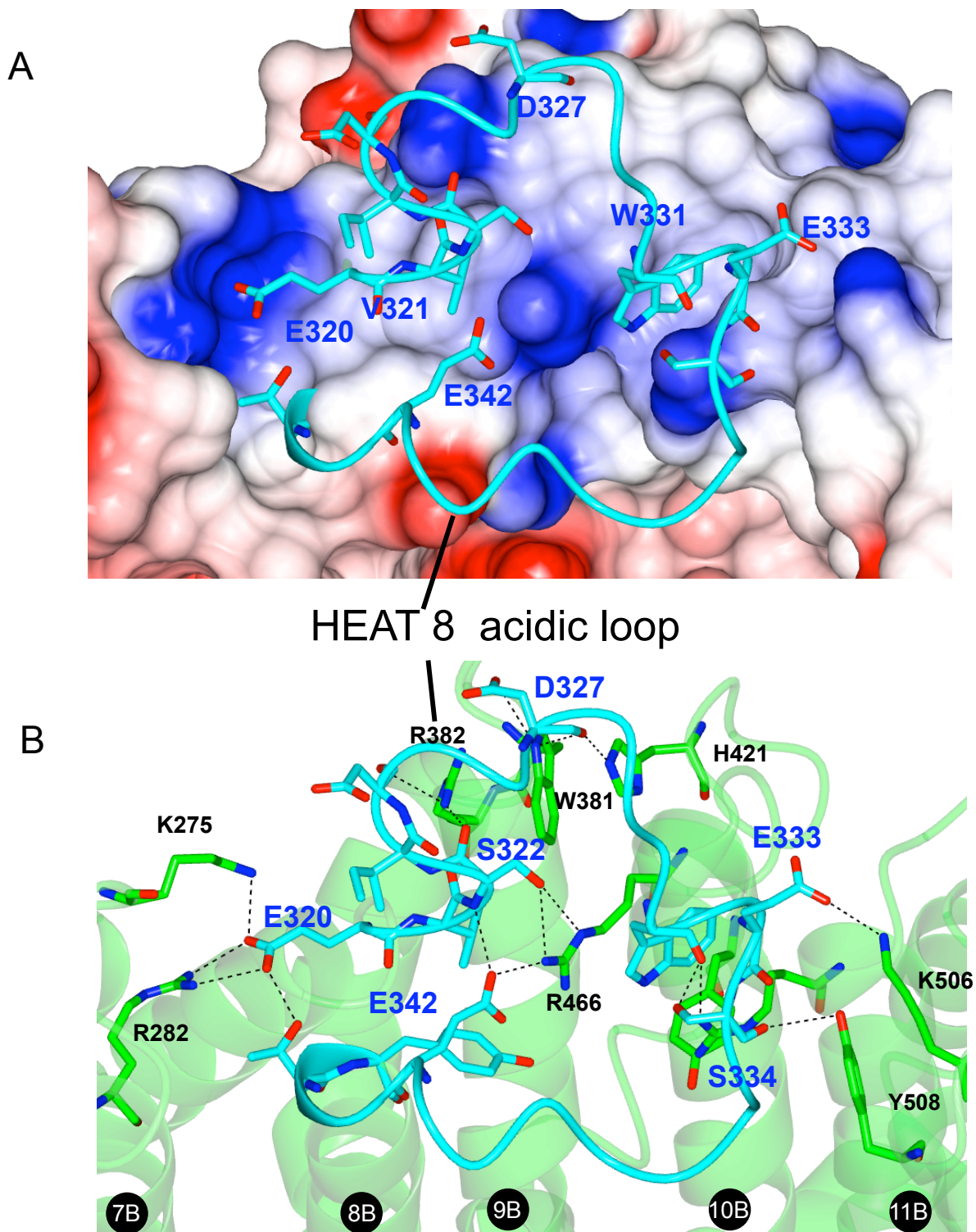
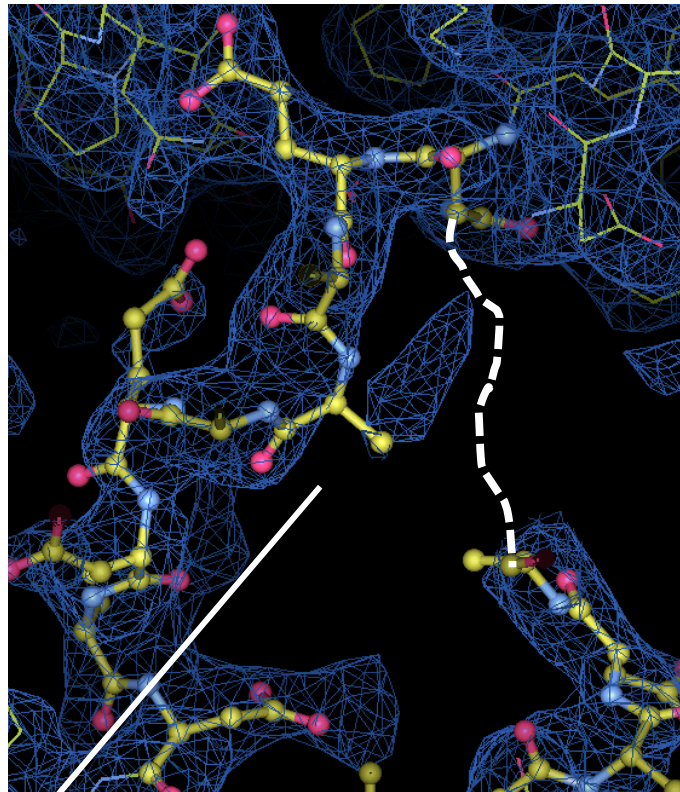
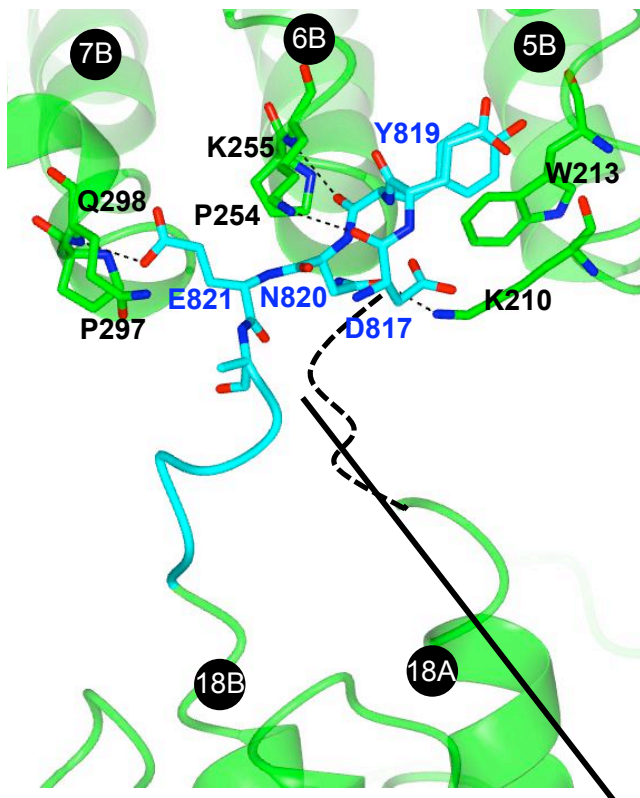


Figure. 3-4 HEAT 8 loopの分子内相互作用

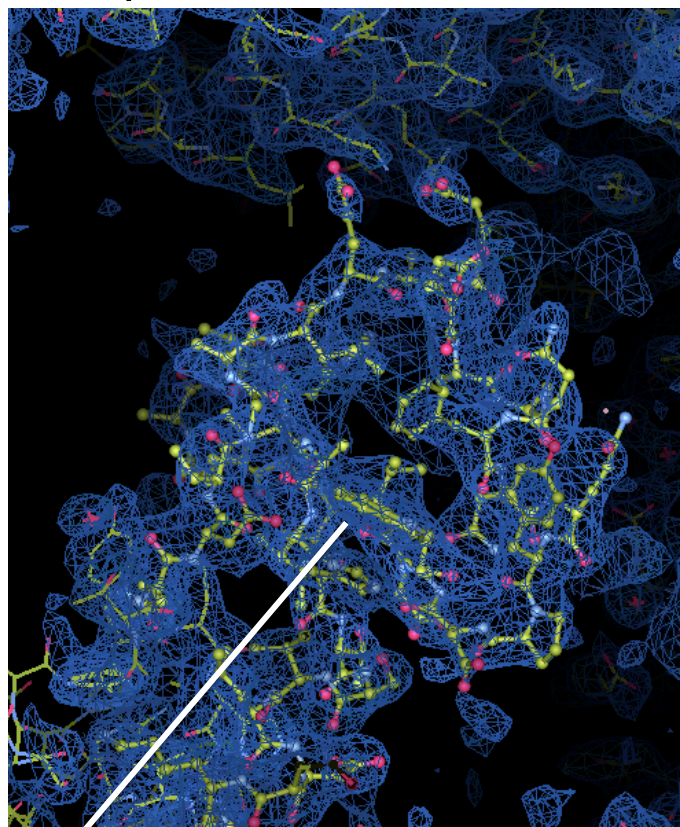
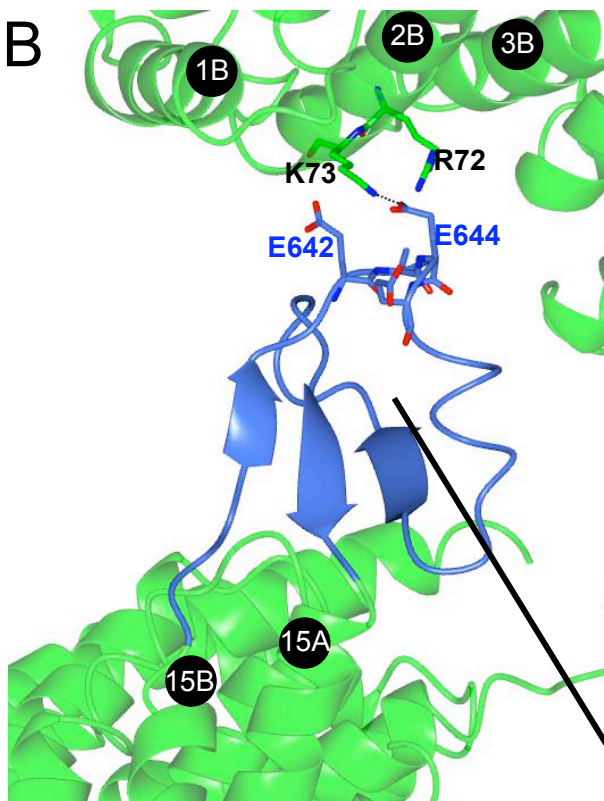
HEAT 8 loop(cyan)とKap121p(green)のHEATs 9-11領域の相互作用を表示した。HEAT 8 loop内の酸性アミノ酸および極性アミノ酸(E320、S322、D327、E333、S334、E342)による静電相互作用とV321、W331による疎水性相互作用によりHEAT 8はloopが相互作用していた。AはKap121pのHEATs9-11を表面で表示し、赤色が負の、青色が正の静電ポテンシャルを表す。Bはリボン表示で表示した。

A



HEAT 18 loop

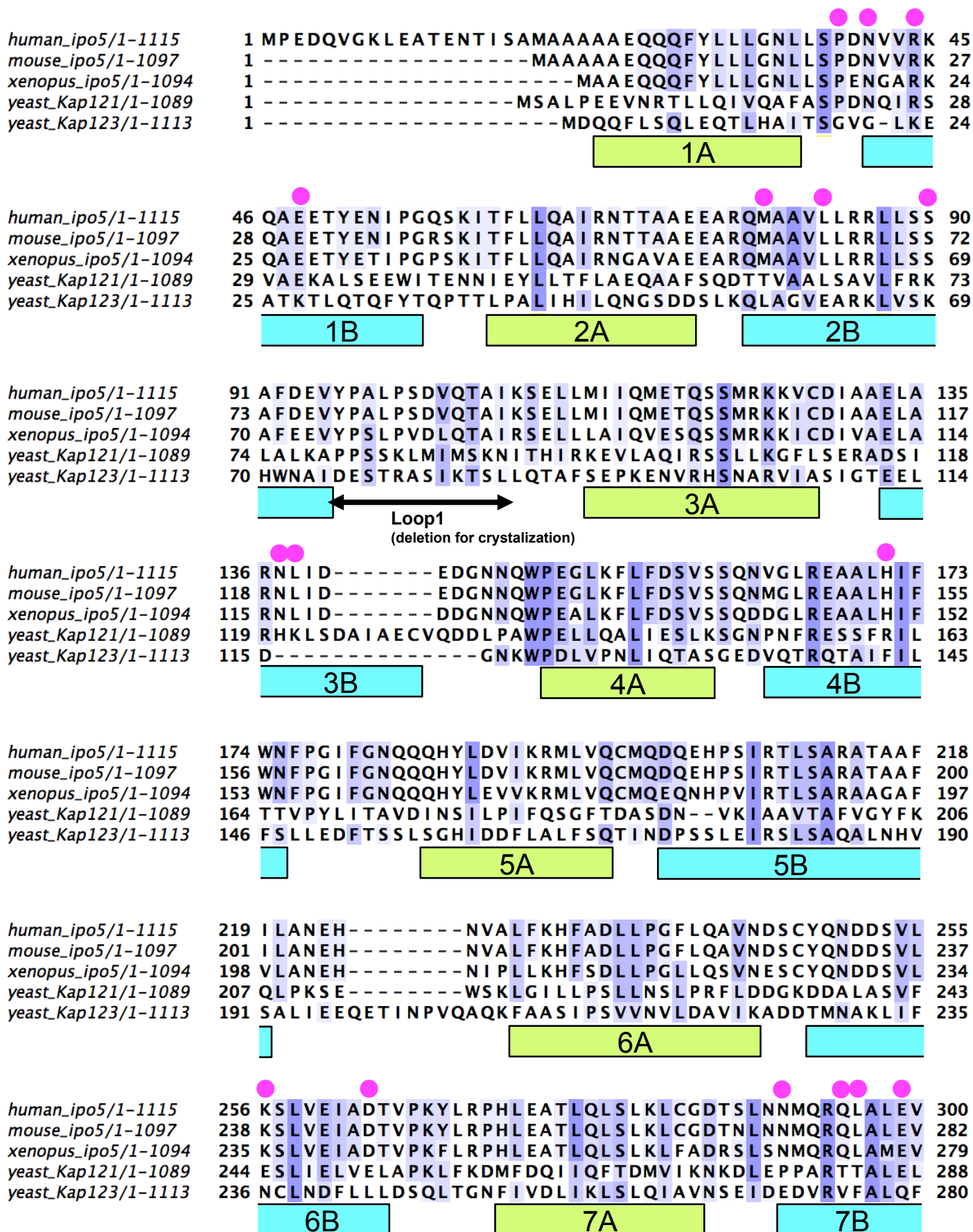
B



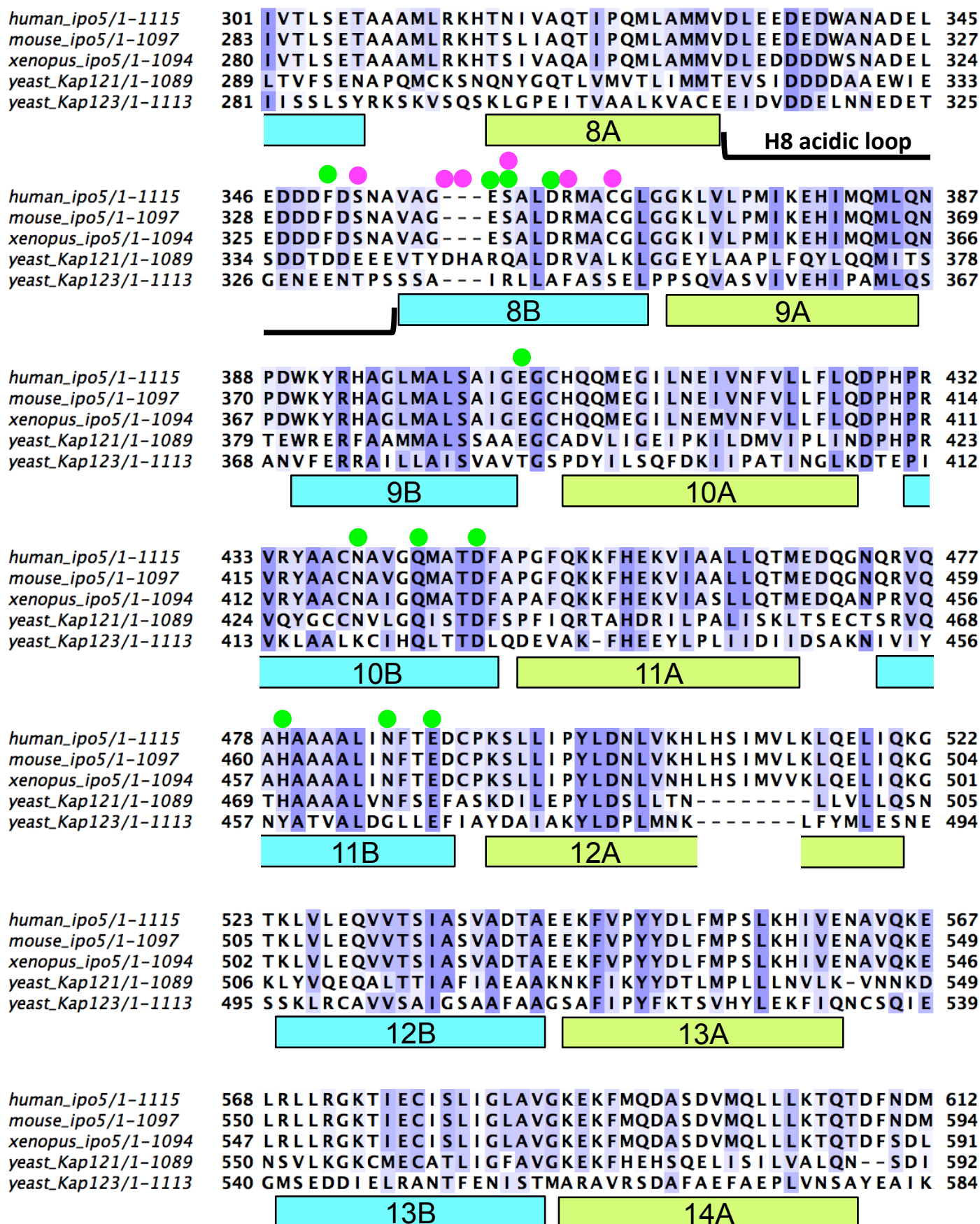
HEAT 15 insert

Figure. 3-5 ニヶ所のKap121pの分子内相互作用

ニヶ所の分子内相互作用を表示した。A. HEAT 18 loop (809-823)とHEATs 5B-7Bの分子内相互作用は複数の水素結合と疎水性相互作用により形成された。HEAT 18 loopの一部(813-816)がdisorderしていて、電子密度が見えなかった。右に電子密度マップを青で、HEAT 18 loopの原子モデルをboll and stickで表示した。contourレベル0.8 σ で表示した。B. HEAT 15 insert (636-688)とHEAT 2Bの相互作用を示した。HEAT 15 insertの酸性アミノ酸とHEAT 2Bの塩基性アミノ酸による水素結合により形成されていた。右に電子密度マップを青で、HEAT 15 insertの原子モデルをboll and stickで表示した。contourレベル0.7 σ で表示した。

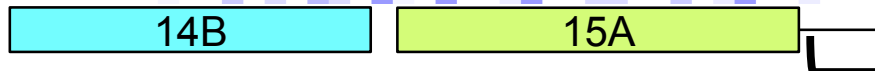


(図は次ページに続く)



(図は次ページに続く)

human_ipo5/1-1115 613 EDDDPQISYMI SAWARMCKILGKEFQQYL PVVMGPLMKTASIKPE 657
 mouse_ipo5/1-1097 595 EDDDPQISYMI SAWARMCKILGKEFQQYL PVVMGPLMKTASIKPE 639
 xenopus_ipo5/1-1094 592 EDDDPQISYMI SAWARMCKILGKEFQQYL PVVMGPLMKTASIKPE 636
 yeast_Kap121/1-1089 593 DEDDALRSYLEQSWSRICRILGDDFVPLLPIVIPLLITAKATQD 637
 yeast_Kap123/1-1113 585 TDSARLRESGYAFIANLAKVYGENFAPFLKTILPEIFKTLELDEY 629



human_ipo5/1-1115 658 VALLDLTQDMENMSDDDGWEFVN LGDQQSFGIKTAGLEEKSTACQM 702
 mouse_ipo5/1-1097 640 VALLDLTQDMENMSDDDGWEFVN LGDQQSFGIKTAGLEEKSTACQM 684
 xenopus_ipo5/1-1094 637 VALLDLTQDMEGMGEDDGWEFVN LGDQQSFGIKTAGLEEKATACQM 681
 yeast_Kap121/1-1089 638 VGLIEEEEAANFQQYPDWVQVQG-KHIAIHTSVLDDKVSAMEL 681
 yeast_Kap123/1-1113 630 QFNFDGDAEDLAAFADSANEELQN--KFTVNTGISYEKEVASAA 672



human_ipo5/1-1115 703 LVCYAKELKEGFVEYTEQVVKLMVP-LLKFYFHDG----- 736
 mouse_ipo5/1-1097 685 LVCYAKELKEGFVEYTEQVVKLMVP-LLKFYFHDG----- 718
 xenopus_ipo5/1-1094 682 LVCYAKELKEGFADYTEQVVKLMVP-LLKFYFHDG----- 715
 yeast_Kap121/1-1089 682 LQSYATLLRGQFAVYVKEVMEI ALPSLDFYLHDG----- 716
 yeast_Kap123/1-1113 673 LSELALGTKEHFLPYVEQSLKVLNEQVDES YGLRETALNTIWNVV 717



human_ipo5/1-1115 737 -VRVAAAESMP L LLECARVRG---PEYLTQMWHFMCDA LIKAIGT 777
 mouse_ipo5/1-1097 719 -VRVAAAESMP L LLECARVRG---PEYLTQMWHFMCDA LIKAIGT 759
 xenopus_ipo5/1-1094 716 -VRVAAAESMP L LLECARVRG---PEYLTQMWHFMCDA LIKGIGT 756
 yeast_Kap121/1-1089 717 -VRAAGATLIP I LLSCLLAATGTQNEELVLLWHKASSKLIGGLMS 760
 yeast_Kap123/1-1113 718 KSVLLASKEVEPE SYPKGI PASSYVNADVLA VIQAARETS MGNLSD 762



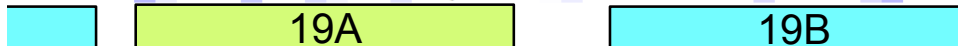
human_ipo5/1-1115 778 EPDSDVLSEIMHSFAKCI EVMGDGCLNNEHFEEELGGI LKAKLEEH 822
 mouse_ipo5/1-1097 760 EPDSDVLSEIMHSFAKCI EVMGDGCLNNEHFEEELGGI LKAKLEEH 804
 xenopus_ipo5/1-1094 757 EPDSDVLSEIMHSFAKCI EVMGDGCLNNEHFEEELGGI LKSKLEEH 801
 yeast_Kap121/1-1089 761 EPMPEITQVYHNSLVNGI KVMGDNCL SEDQLAAFTKGVSANLTD 805
 yeast_Kap123/1-1113 763 EFETSMVITVMEDFANMI KQFGAIIIMDNGDSSMLEALCMQVLSV 807



human_ipo5/1-1115 823 FKNQELRQVKRQDE DYDEQVEES LQDEDDNDVY I LTKVSDI LHSI 867
 mouse_ipo5/1-1097 805 FKNQELRQVKRQDE DYDEQVEES LQDEDDNDVY I LTKVSDI LHSI 849
 xenopus_ipo5/1-1094 802 FKNQELRQVKRQDE DYDEQVEES LQDEDDNDVY I LTKVSDV LHSI 846
 yeast_Kap121/1-1089 806 YERMQDRHG-----DGDEYNEN IDEEEDFTDEDLLDEINKS IAAV 845
 yeast_Kap123/1-1113 808 LKGTHTCQTIDIEEDVPRDEELDASETEATLQDVALEVLVLSLSQA 852



human_ipo5/1-1115 868 FSSYKEKVL PWFEQL LPLIVNLI CPHRPWPDRQWGLC I FDDVIEH 912
 mouse_ipo5/1-1097 850 FSSYKEKVL PWFEQL LPLIVNLI CPQRPWPDRQWGLC I FDDVIEH 894
 xenopus_ipo5/1-1094 847 FSSYKEKIL LWFEQL LPLFVNLI CPNRPWPDRQWGLC I FDDVIEH 891
 yeast_Kap121/1-1089 846 LKTTNGHYLKNLENIWPMINTFLDNE-PILVIFALVVIGDLIQY 889
 yeast_Kap123/1-1113 853 LAGDFAKVFDNFRPVVFGLFQSKSKNK----RSSAVGAASELALG 893



(図は次ページに続く)

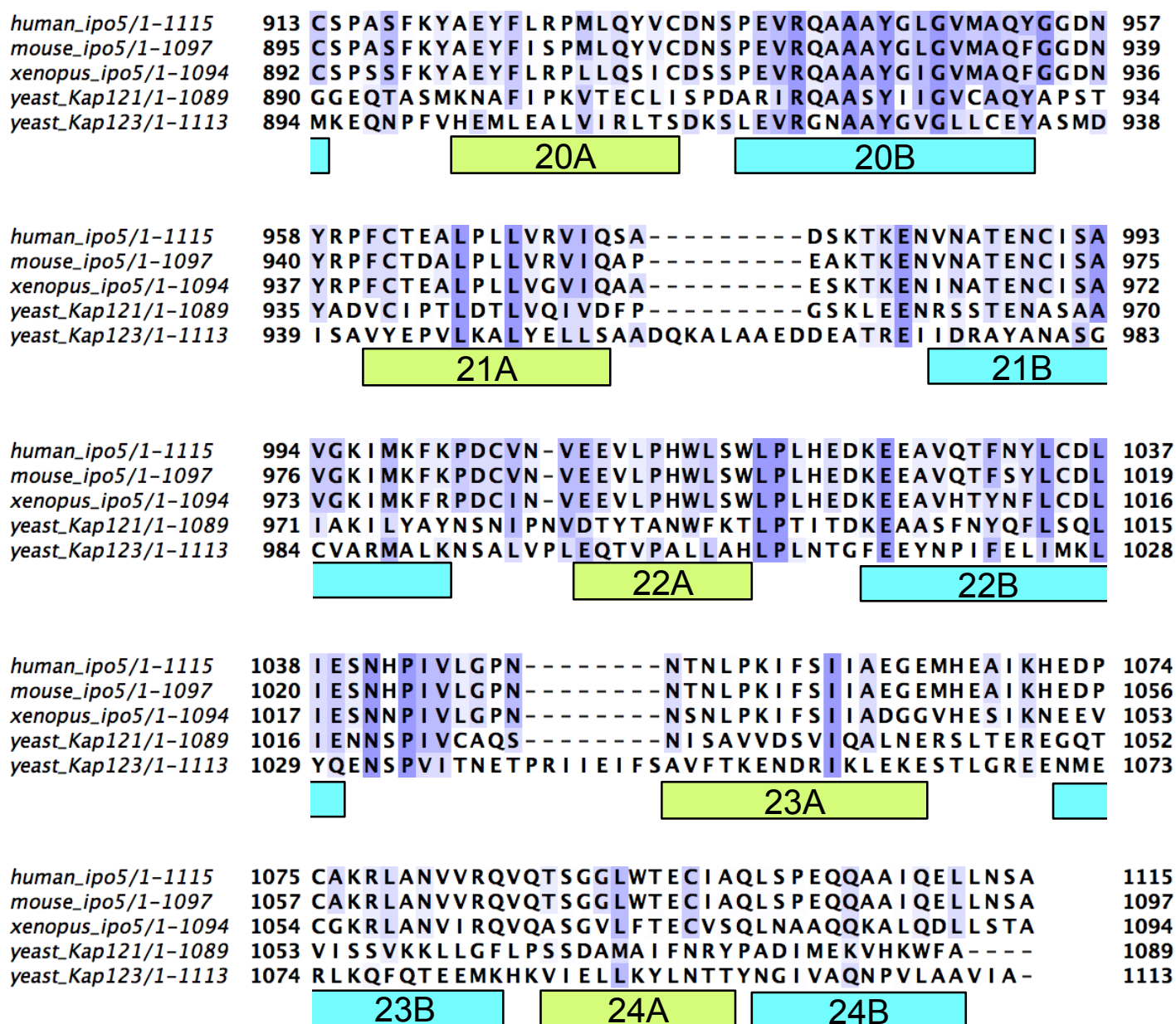
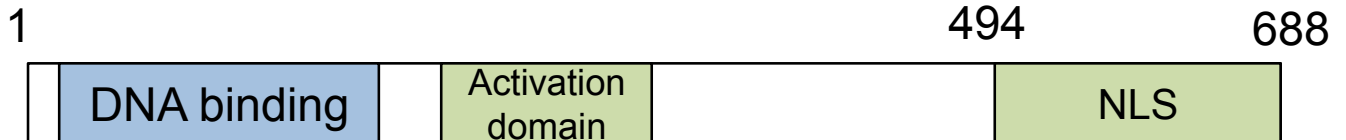


Figure. 3-6 様々な生物種のKap121pのアミノ酸配列比較

ヒト、マウス、アフリカツメガエル、出芽酵母のKap121pおよび出芽酵母のKap121pの機能ホモログとして知られているKap123pについて CLUSTALWでマルチプルアラインメントを行った。RanGTPとの結合に関わる残基をMagentaで、NLS(cargo)との結合に関わる残基をGreenの印で表示した。

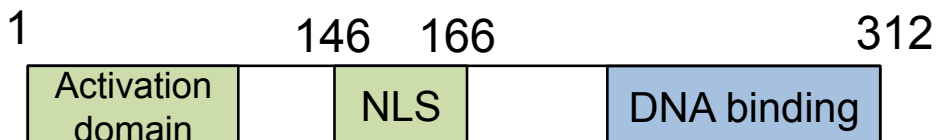
A

Ste12p



B

Pho4p



C

Nup53p

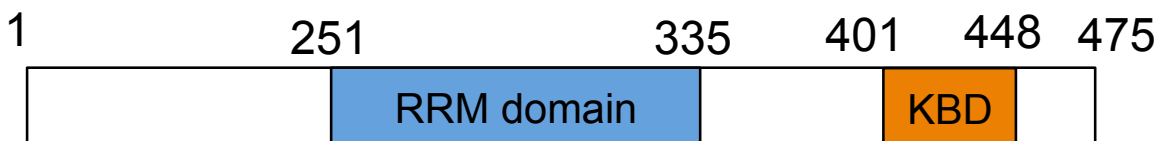


Figure. 3-7 Ste12p、Pho4p、Nup53pのドメイン構造

Kap121pとの複合体の結晶化に用いた蛋白質である出芽酵母の Ste12p(A)、Pho4p(B)、Nup53p(C)のドメイン構造を示した。NLSは Kap121p特異的なnuclear localization signalを、RRMはRNA recognition motifを、KBDはKap121p binding domainを意味している (Kaffman et al.,1999)。

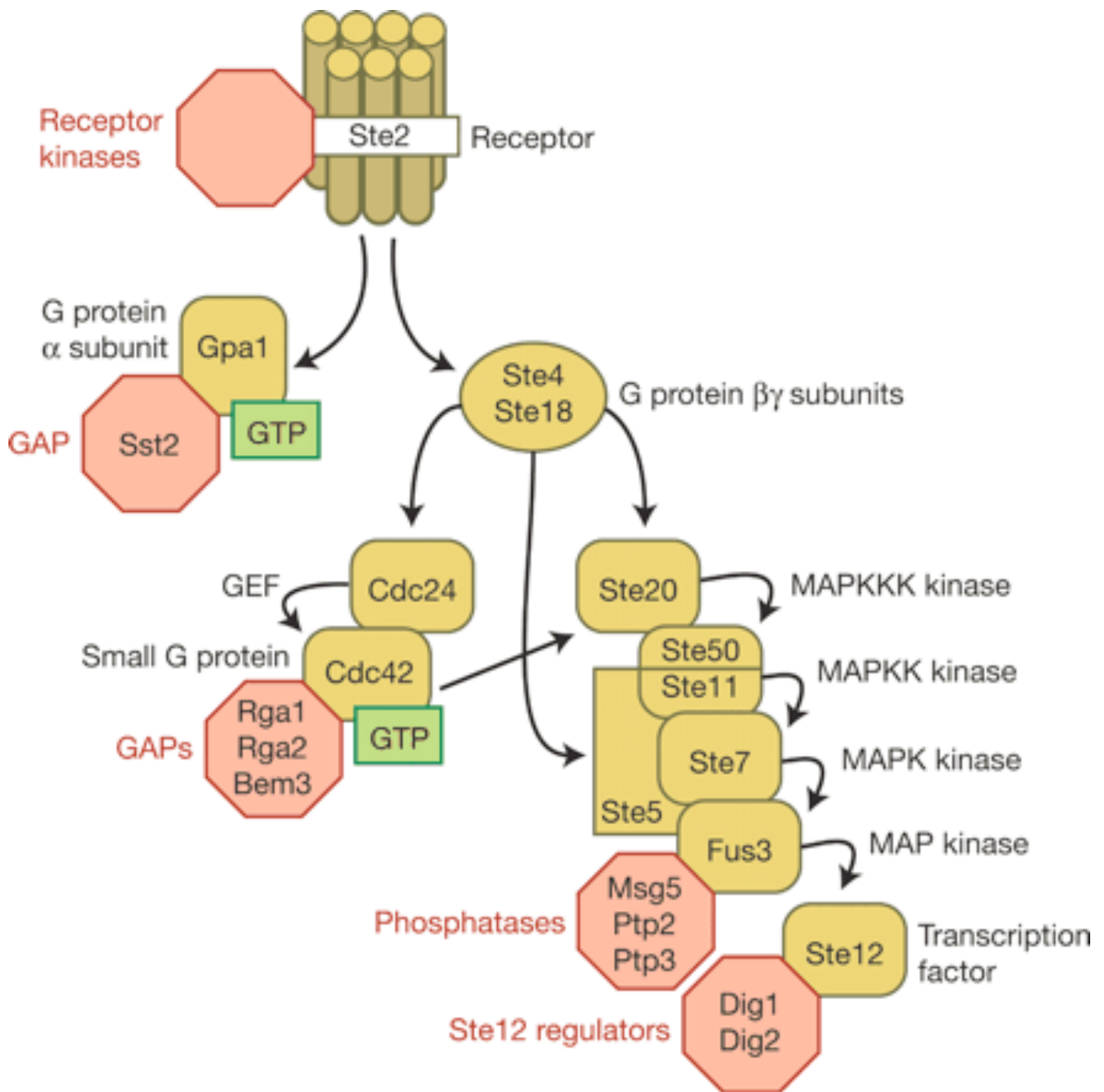
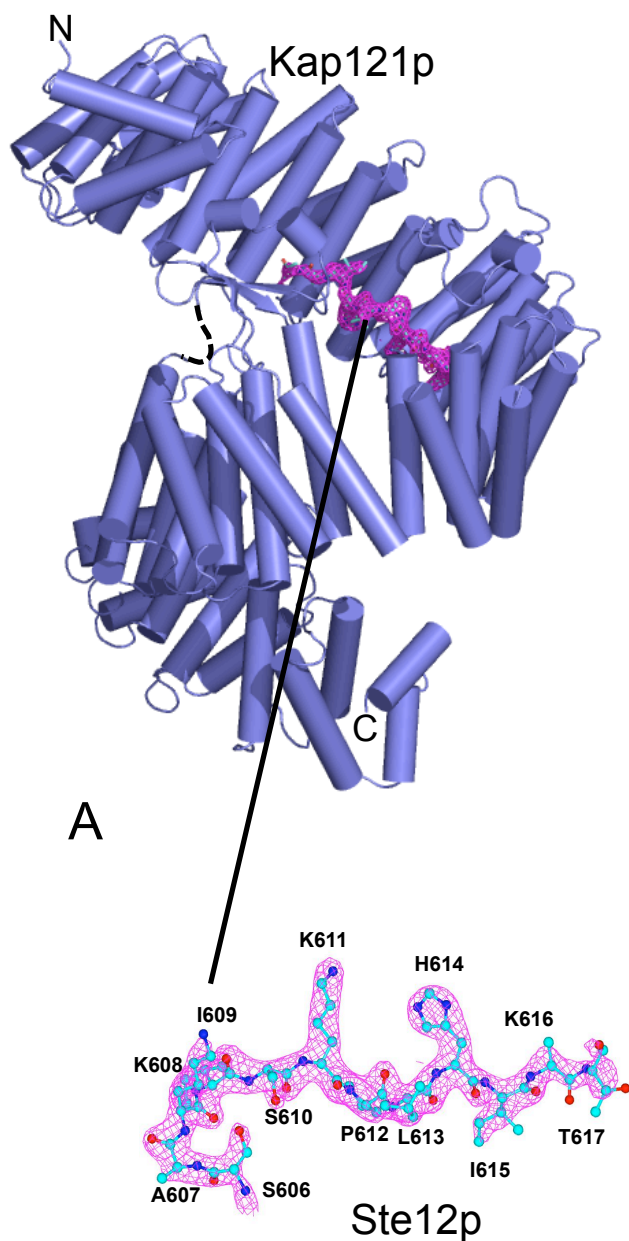


Figure. 3-8 出芽酵母におけるフェロモン反応経路に関わる蛋白質 (Wang and Dohlman, 2004により転記)

フェロモンである α factorは細胞表面受容体(Ste2)に結合し、G蛋白質を活性化し(α サブユニットへのGTPの結合を促進)、 α と $\beta\gamma$ サブユニットの解離を促進する。Freeになった $\beta\gamma$ サブユニットがGEFを通して下流の因子を活性化する。このシグナルカスケードはMAPキナーゼカスケードでシグナル伝達が進む。最後に転写因子であるSte12p活性化され、核内へ輸送され、遺伝子発現が起こる

Kap121p-Ste12p complex



Kap121p-Pho4p complex

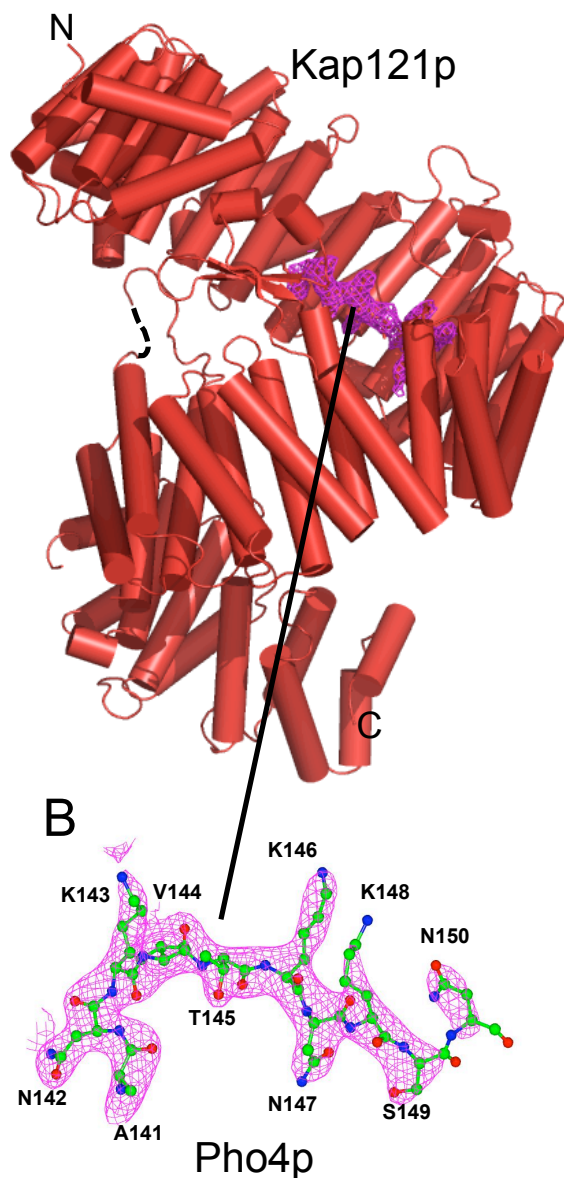


Figure. 3-9 Kap121p-cargo (Ste12p, Pho4p)複合体の結晶構造の全体像

複合体の結晶構造の全体構造を表示した。結合しているSte12pおよびPho4pの電子密度をmagentaで表示した。マップはcontourレベル1.0 σ で表示した。下図は拡大図で、当てはめたアミノ酸配列を表示した。Kap121p-Ste12p複合体のKap121pを青色で、Kap121p-Pho4p複合体のKap121pを赤色で表示した。A. Kap121p-Ste12p複合体、B. Kap121p-Pho4p複合体。

Kap121p-Nup53p complex

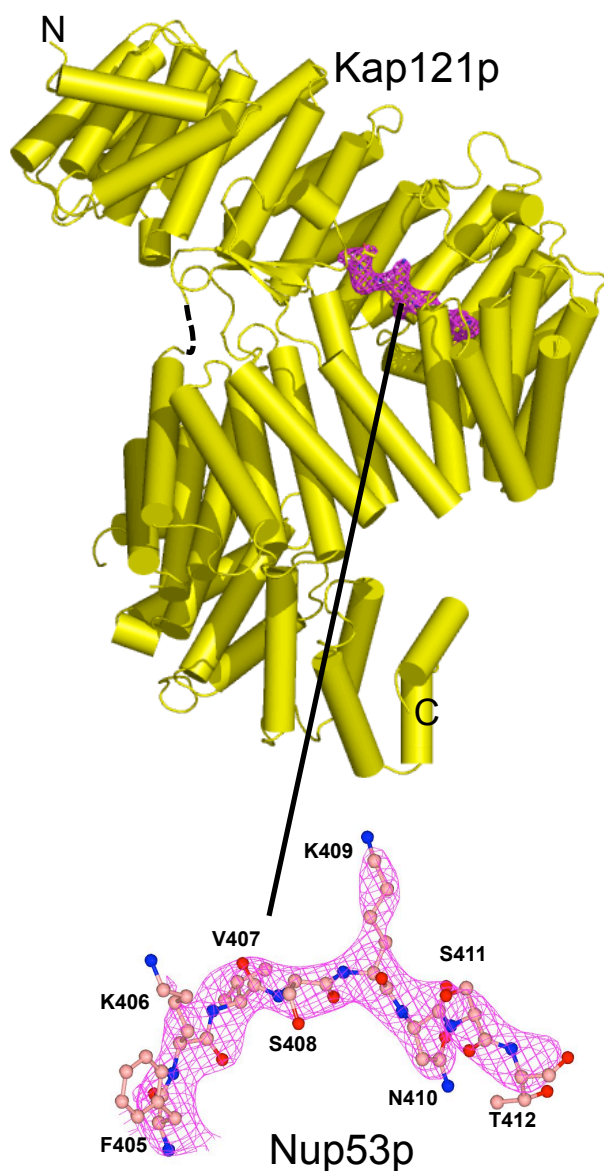


Figure. 3-10 Kap121p-Nup53p複合体およびKap121p-Pho4p複合体の結晶構造の全体像

複合体の結晶構造の全体構造を表示した。結合しているNup53pの電子密度をmagentaで表示した。マップはcontourレベル1.0 σ で表示した。下図は拡大図で、当てはめたアミノ酸配列を表示した。Kap121p-Nup53p複合体のKap121pを黄色で表示した。

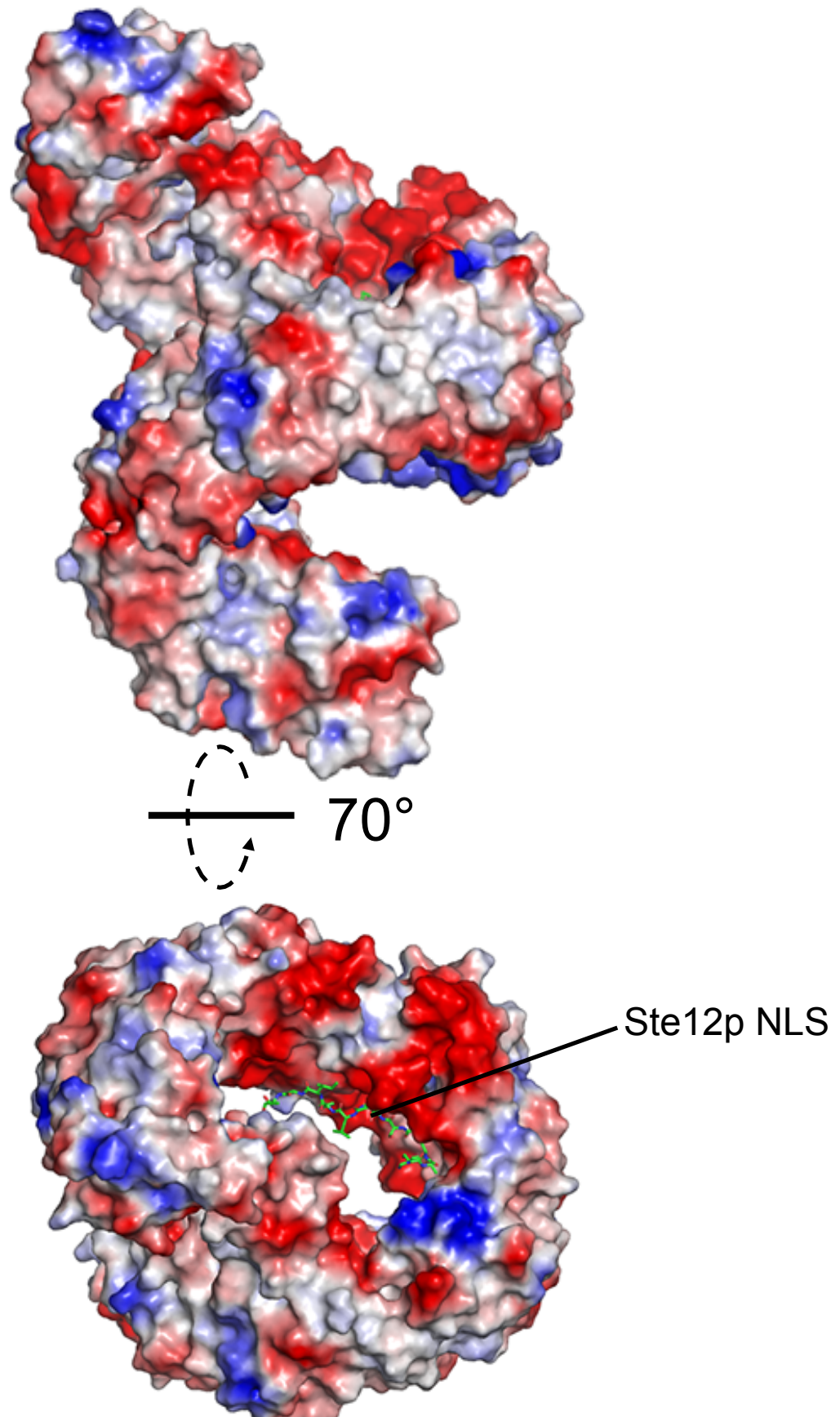


Figure. 3-11 Kap121p-cargo (Ste12p)複合体の表面電荷

Kap121p-Ste12p複合体のKap121pの構造を表面表示で表示し、その表面電荷を表した。赤色が負の静電ポテンシャルを、青色が正の静電ポテンシャル、白が中性を表している。Kap121pは外側に中性部分が多く、内側に酸性の部分が多かった。

A Kap121p-Ste12p complex

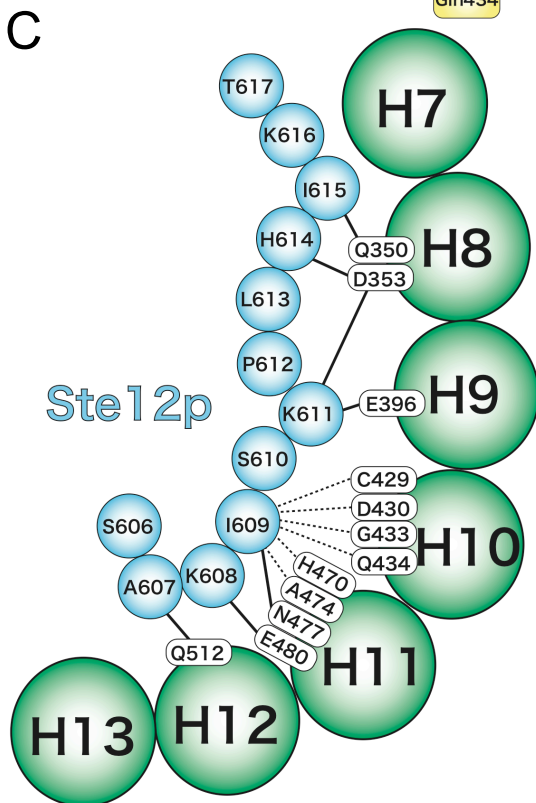
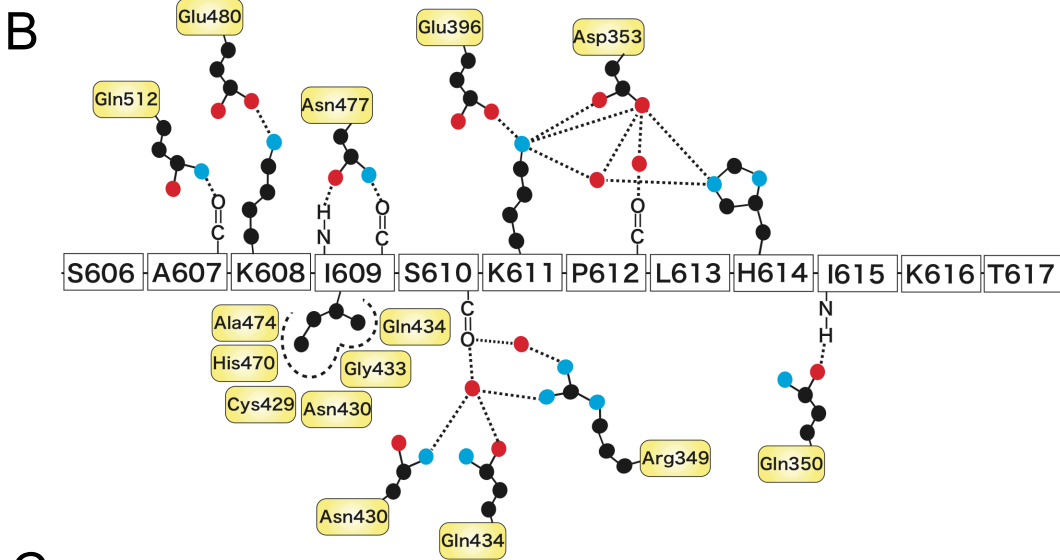
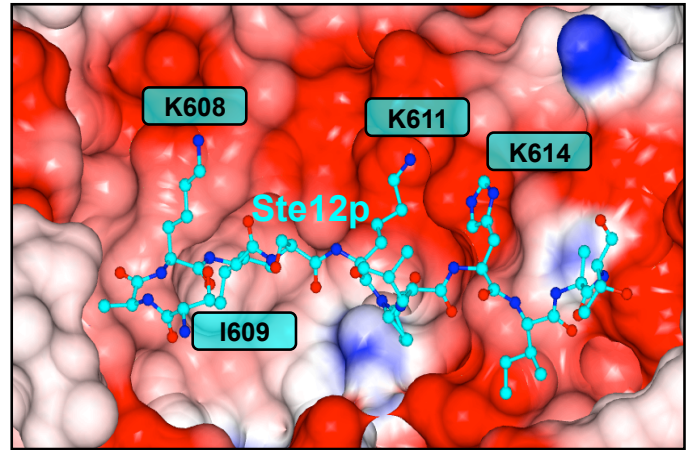
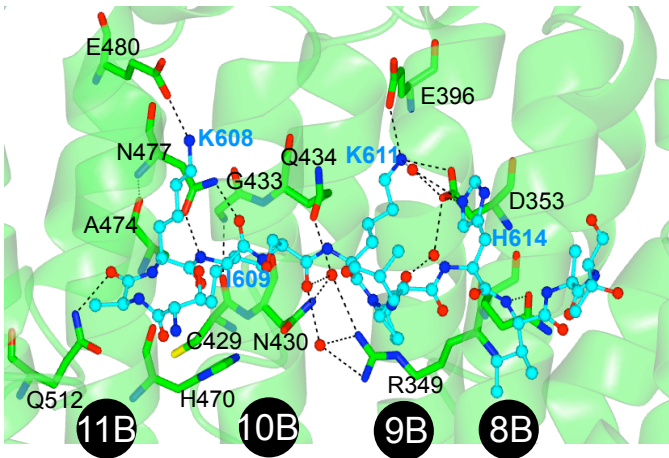


Figure. 3-12 Kap121pとSte12pの相互作用サイト

Kap121pとSte12pの相互作用機構の詳細を表示した。A. Kap121pをリボン表示、緑で、Ste12pをスティック表示、青緑で表示した。Kap121pはSte12pの特定のアミノ酸(K608、I609、K611、H614)の側鎖を特異的に認識していた。右図はKap121pの表面電荷を表示しており、赤色が負の静電ポテンシャルを、青色が正の静電ポテンシャルを示している。B、C. Kap121pとSte12pの相互作用を模式図で表示した。

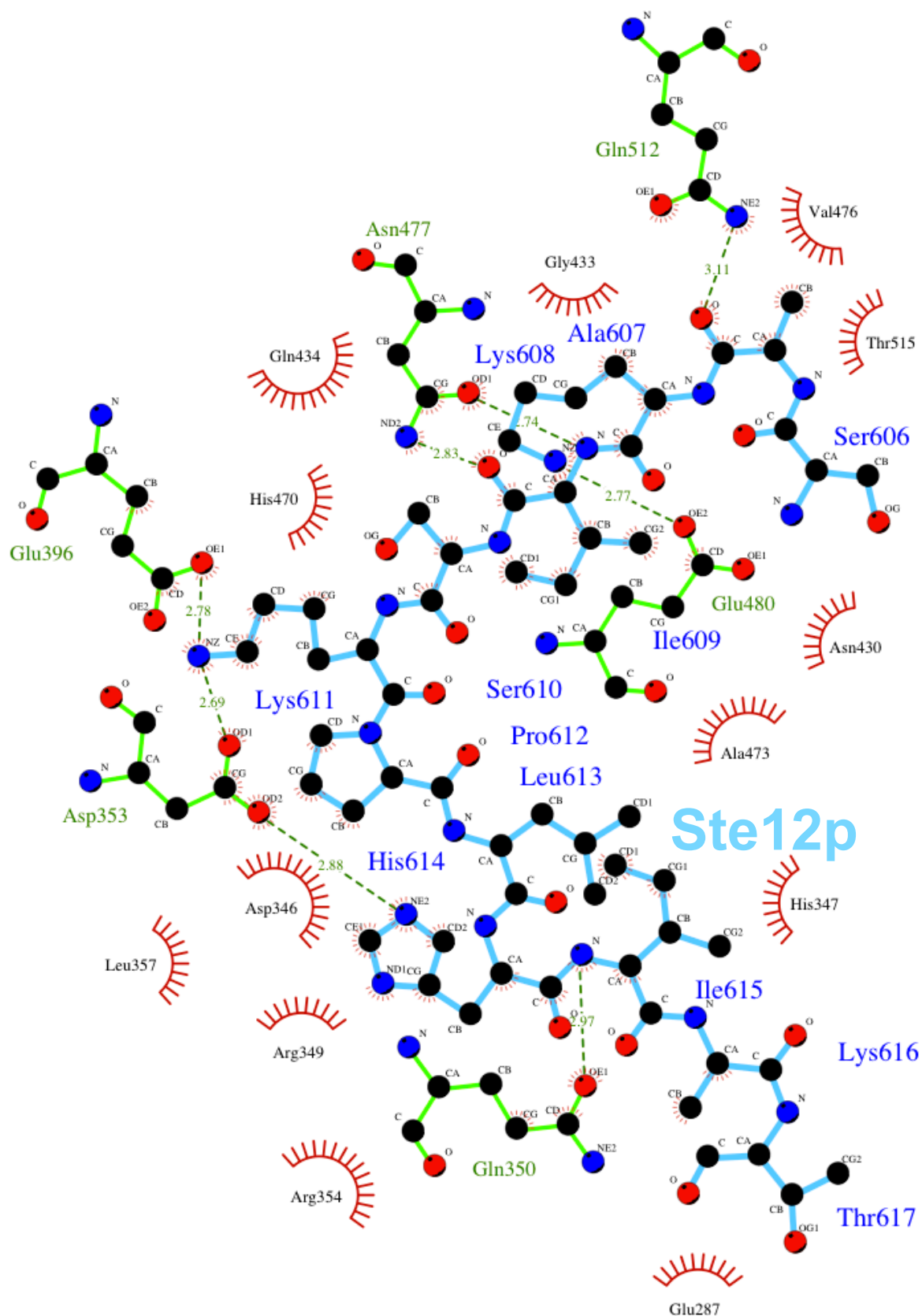
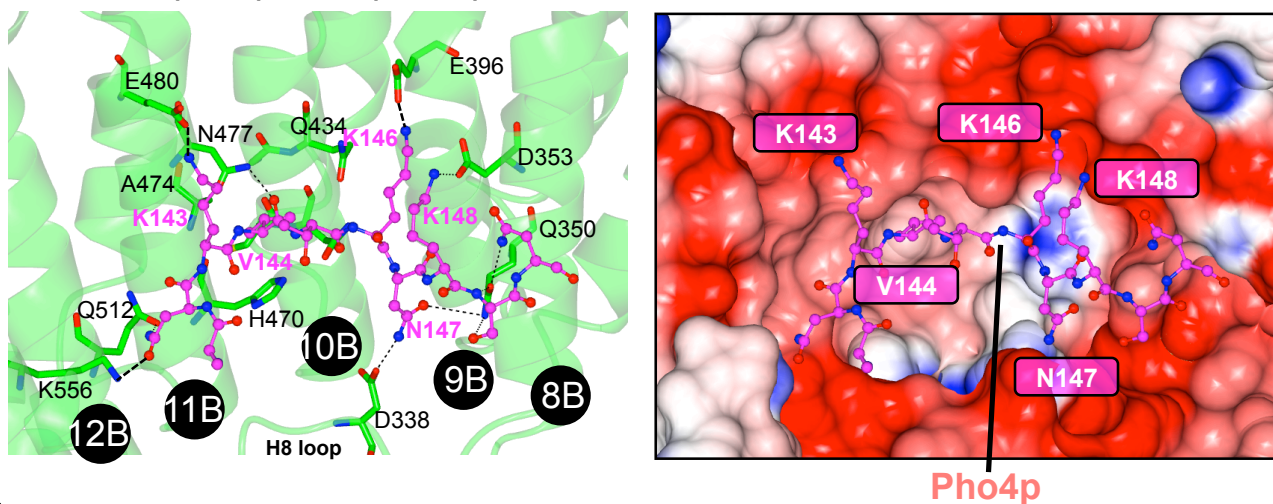


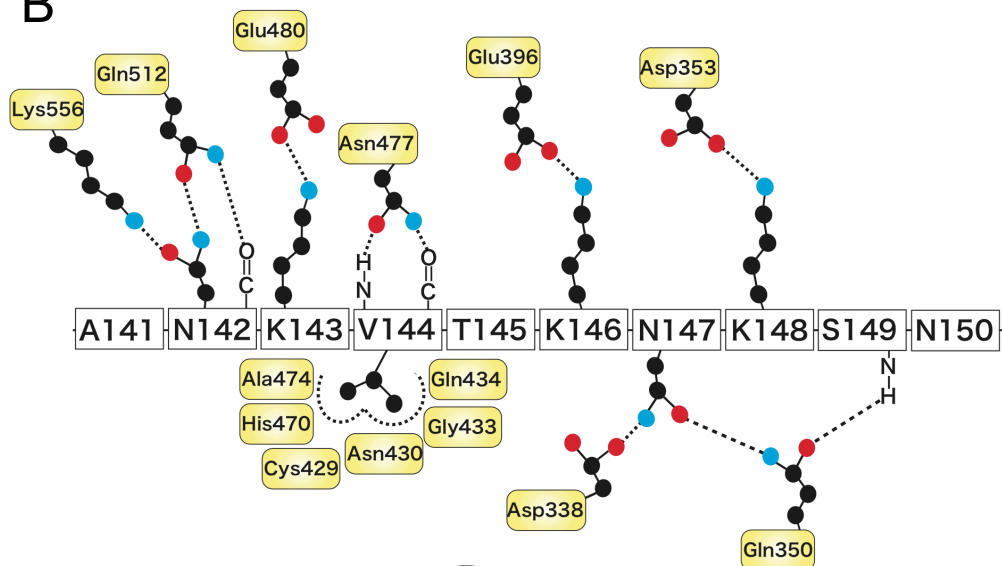
Figure. 3-13 LigprotによるKap121pとSte12pの相互作用の模式図

Kap121pとSte12pの相互作用をLigprotを用いて表示した。炭素原子を黒、酸素原子を赤、窒素原子を青で表示した。Kap121pの共有結合を緑、Ste12pの共有結合を青緑で表示した。水素結合は点線で表示した。

A Kap121p-Pho4p complex



B



C

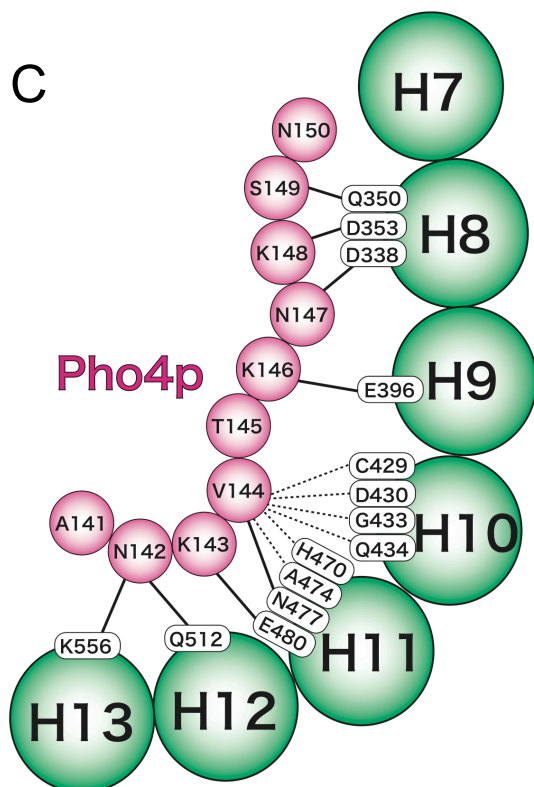


Figure. 3-14 Kap121pとPho4pの相互作用サイト

Kap121pとPho4pの相互作用機構の詳細を表示した。A. Kap121pをリボン表示、緑で、Pho4pをスティック表示、深紅で表示した。Kap121pはPho4pの特定のアミノ酸(K143、V144、K146、N147、K148)の側鎖を特異的に認識していた。右図はKap121pの表面電荷を表示しており、赤色が負の静電ポテンシャルを、青色が正の静電ポテンシャルを示している。B、C. Kap121pとPho4pの相互作用を模式図で表示した。

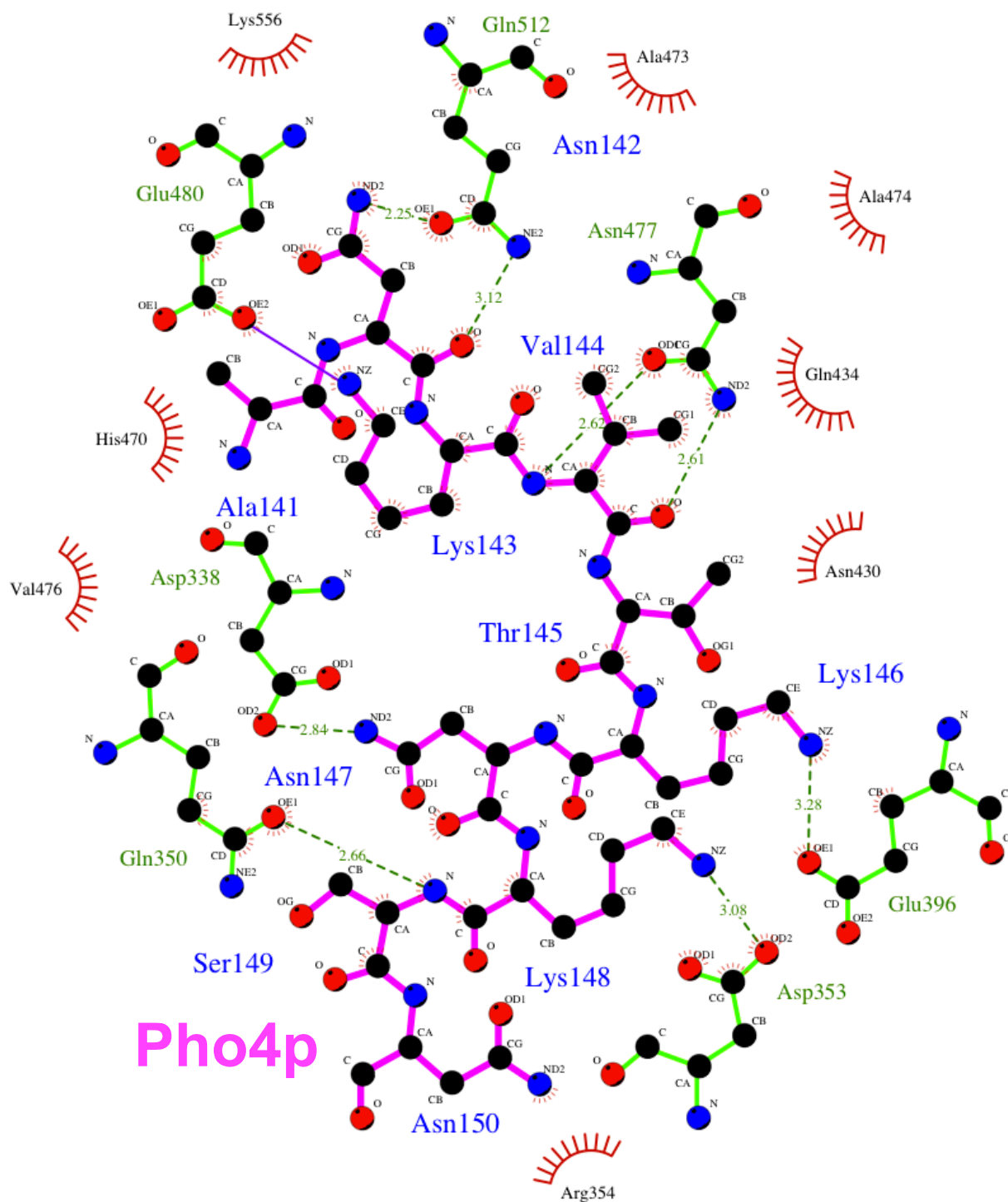


Figure. 3-15 LigprotによるKap121pとPho4pの相互作用の模式図

Kap121pとPho4pの相互作用をLigprotを用いて表示した。炭素原子を黒、酸素原子を赤、窒素原子を青で表示した。Kap121pの共有結合を緑、Pho4pの共有結合を深紅で表示した。水素結合は点線で表示した。

A Kap121p-Nup53p complex

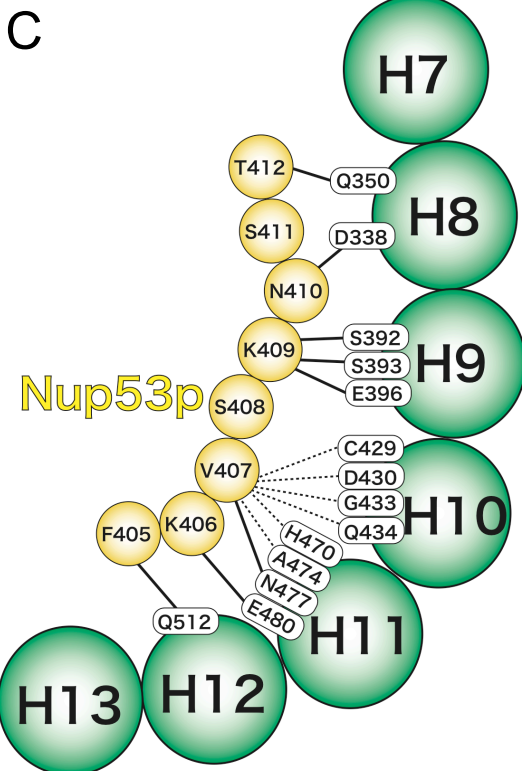
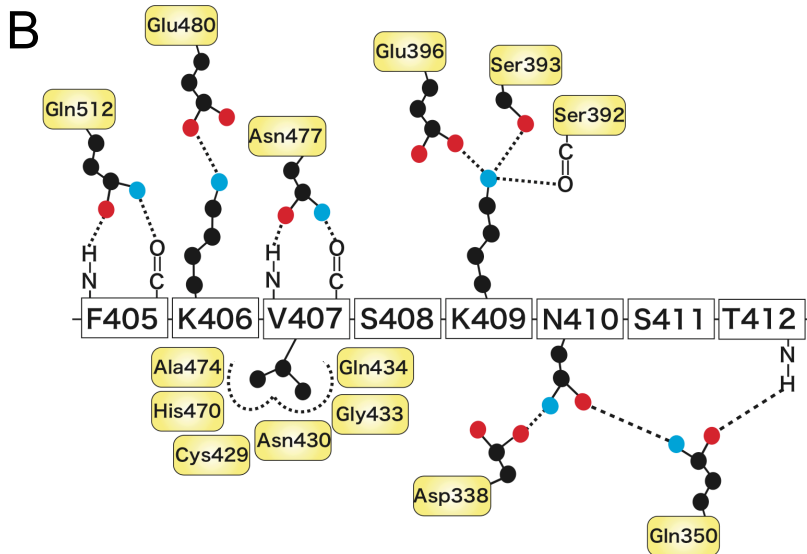
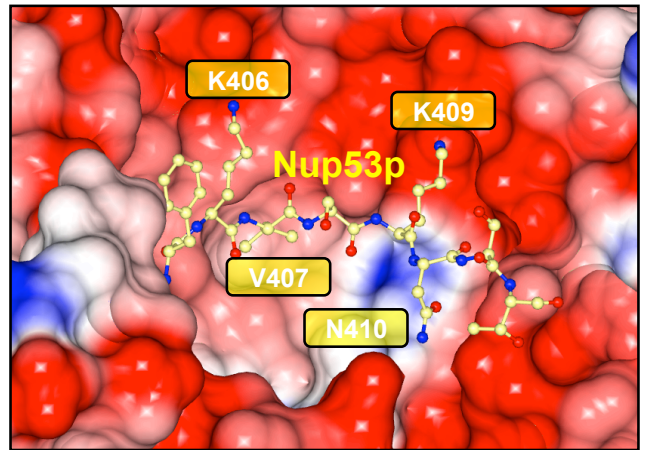
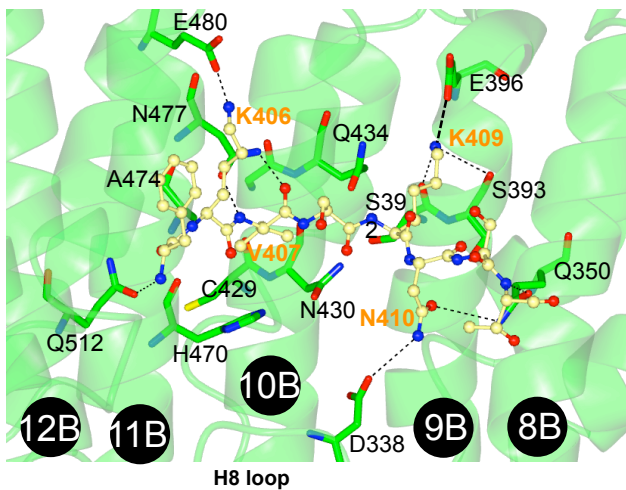


Figure. 3-16 Kap121pとNup53pの相互作用サイト

Kap121pとNup53pの相互作用機構の詳細を表示した。A. Kap121pをリボン表示、緑で、Nup53pをスティック表示、黄で表示した。Kap121pはNup53pの特定のアミノ酸(K406、V407、K409、N410)の側鎖を特異的に認識していた。右図はKap121pの表面電荷を表示しており、赤色が負の静電ポテンシャルを、青色が正の静電ポテンシャルを示している。B、C. Kap121pとNup53pの相互作用を模式図で表示した。

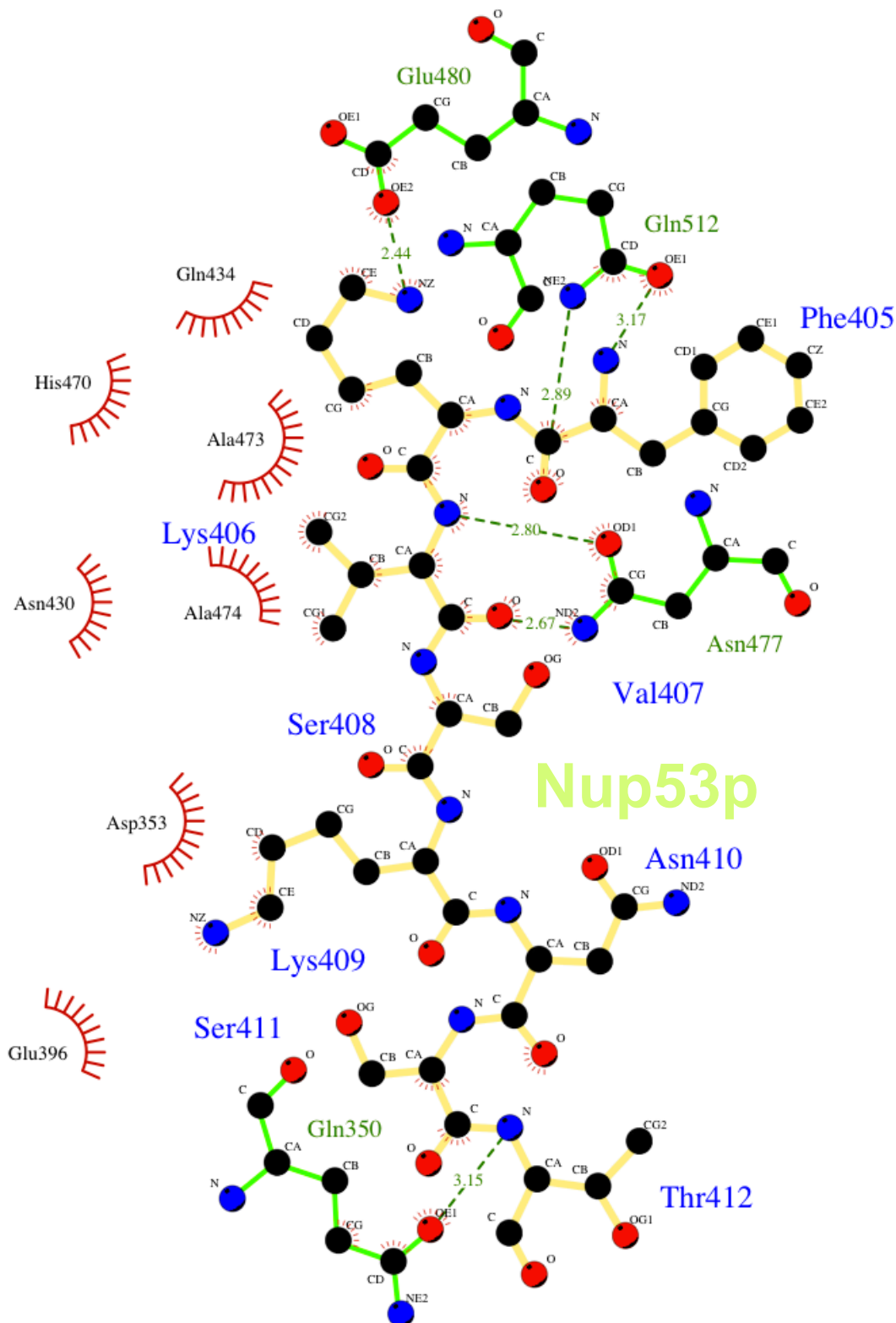
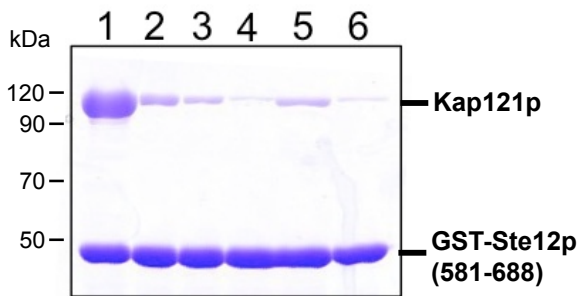


Figure. 3-17 LigprotによるKap121pとNup53pの相互作用の模式図

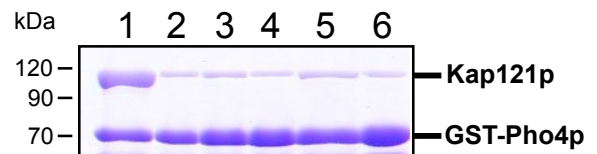
Kap121pとNup53pの相互作用をLigprotを用いて表示した。炭素原子を黒、酸素原子を赤、窒素原子を青で表示した。Kap121pの共有結合を緑、Nup53pの共有結合を黄で表示した。水素結合は点線で表示した。

A



- 1: wild type
 2: D353K
 3: D353K/E396K
 4: D353K/E396K/D438K : 3K
 5: D353A/E396A/D438A
 6: R349A/Q350A/D353A/E396A/N430K/D438A/N477A :7m

B



C

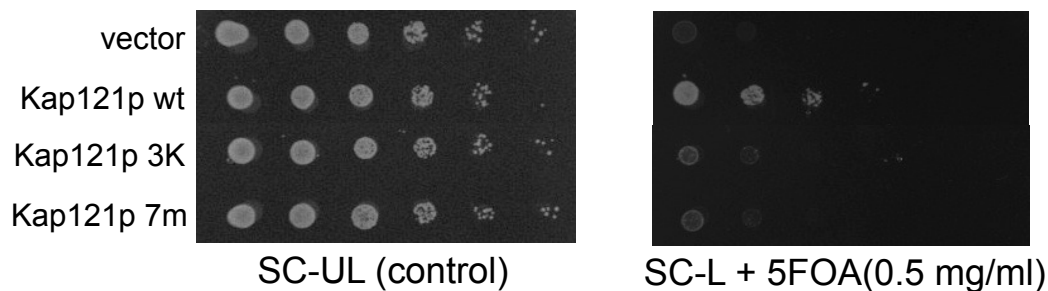
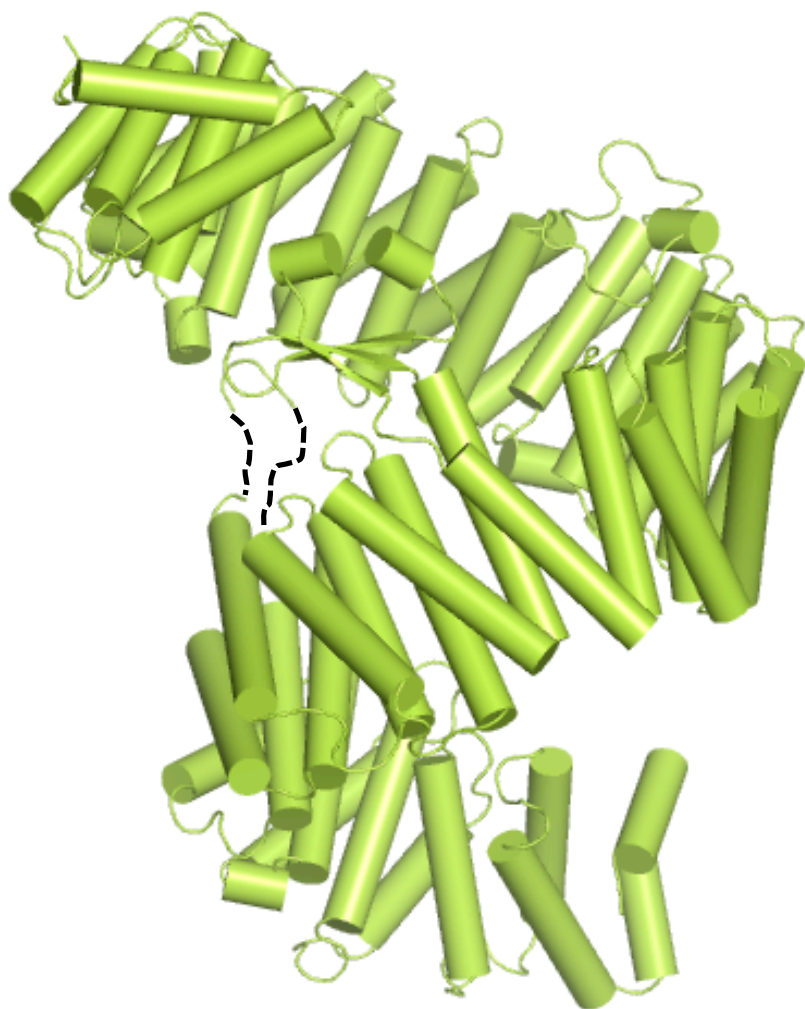


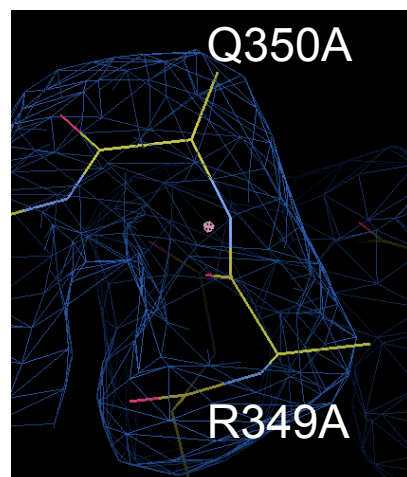
Figure. 3-18 Kap121pの変異体によるin vitroおよびin vivoの機能解析

Cargoとの結合に関わるアミノ酸残基に変異を加えたKap121pを用いてin vitroおよびin vivoで機能解析を行った。A-B Kap121p変異体を用いたpull-down assay。A. 8.5 μ gのGST-Ste12p (581-688)を固定したGSH-Sepharoseに16 μ gの野生型および変異体Kap121pをincubateした。B. 8.4 μ gのGST-Pho4p (101-200)に16 μ gの野生型および変異体のKap121pをincubateした。C. 出芽酵母を用いたKap121p変異体の相補性解析。変異体のKap121pで相補すると出芽酵母は生存が出来なかった(致死性の表現型を示した)。

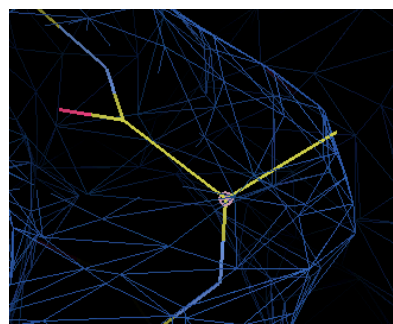
Kap121p 7mt



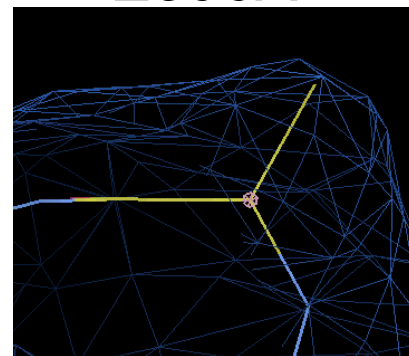
R349A & Q350A



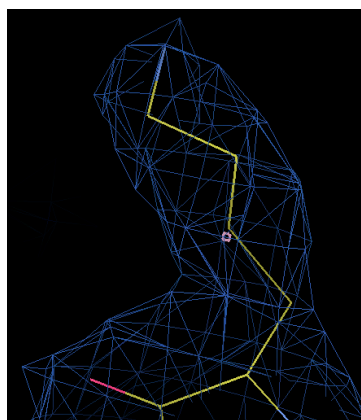
D353A



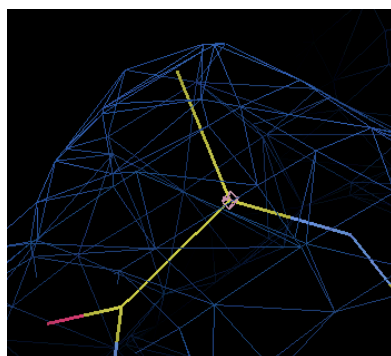
E396A



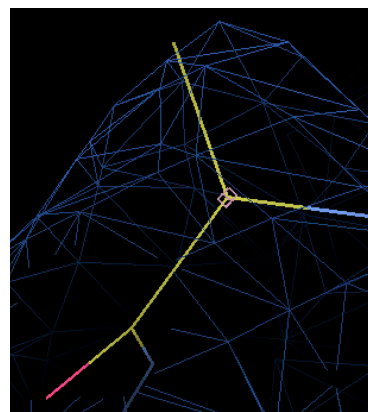
N430K



D438A



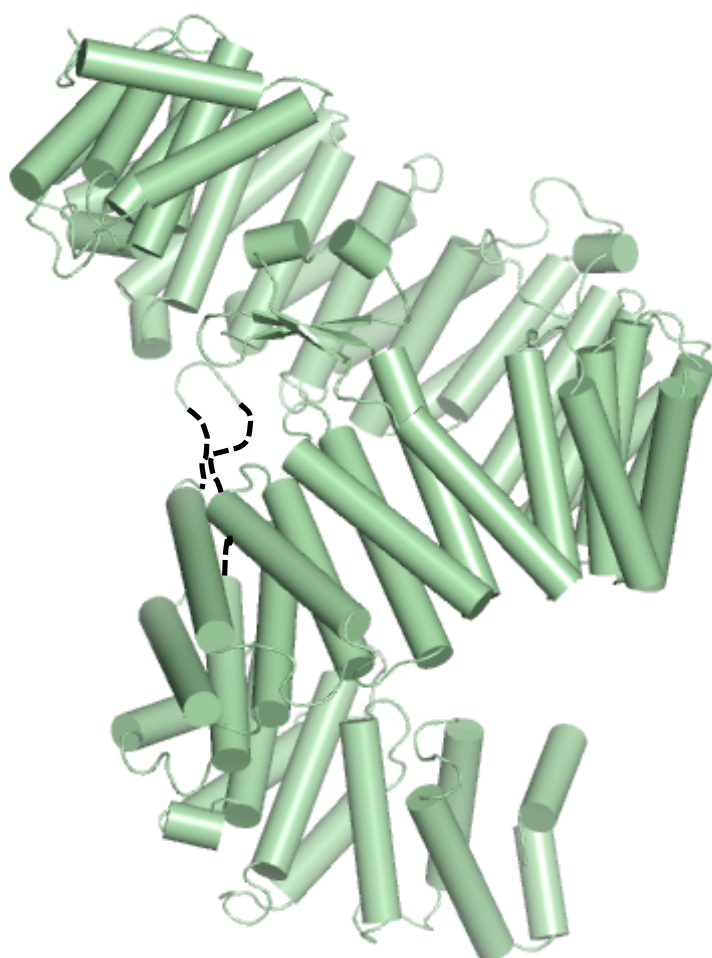
N477A



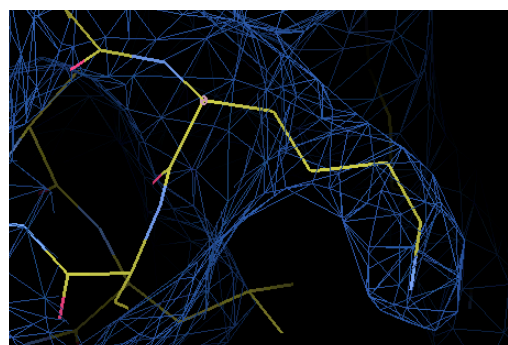
**Figure. 3-19 Kap121pの変異体
(7mt)のX線結晶解析**

Kap121p変異体(7mt : R349A/Q350A/D353A/E396A/N430K/D438A/N477A)の結晶構造。周囲には変異を加えた7つのアミノ酸の電子密度を示すため、2Fo-Fcマップと原子モデルを表示した。電子密度マップ青で、contourレベル0.8 σ で表示した。原子モデル内の炭素原子を黄、酸素原子を赤、窒素原子を青で表示した。

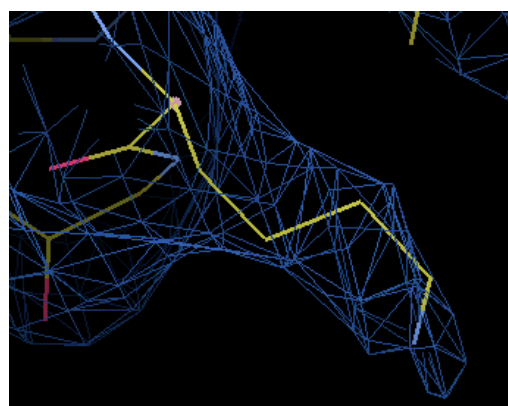
Kap121p 3K



D353K



E396K



D438K

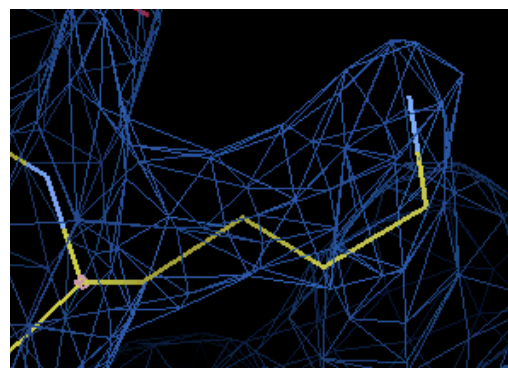


Figure. 3-20 Kap121pの変異体(3K)のX線結晶解析

Kap121p変異体(3K : D353K/E396K/D438K)の結晶構造。周囲には変異を加えた3つのアミノ酸の電子密度を示すため、2Fo-Fcマップと原子モデルを表示した。電子密度マップ青で、はcontourレベル0.8 σ で表示した。原子モデル内の炭素原子を黄、酸素原子を赤、窒素原子を青で表示した。

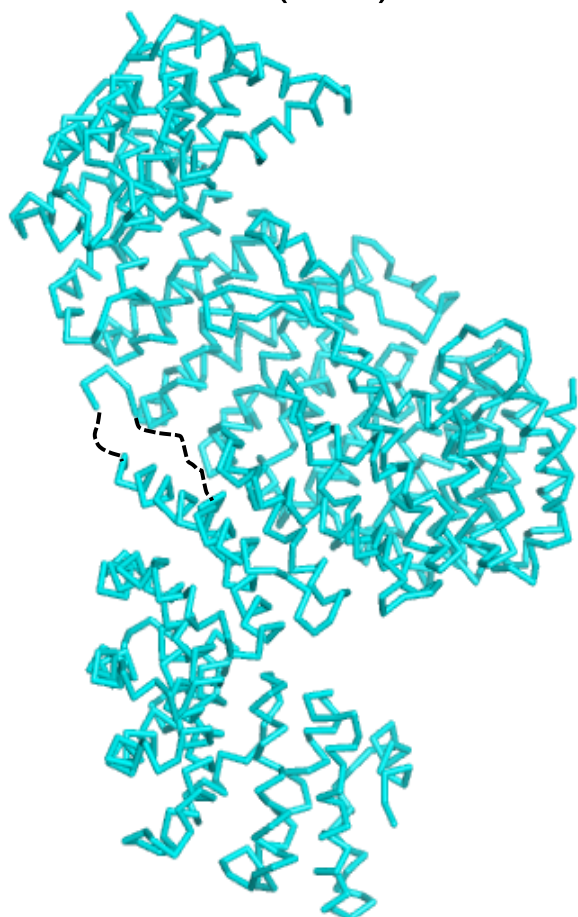
A Wild type



B Mutant (3K)



C Mutant (7mt)



D Overlay

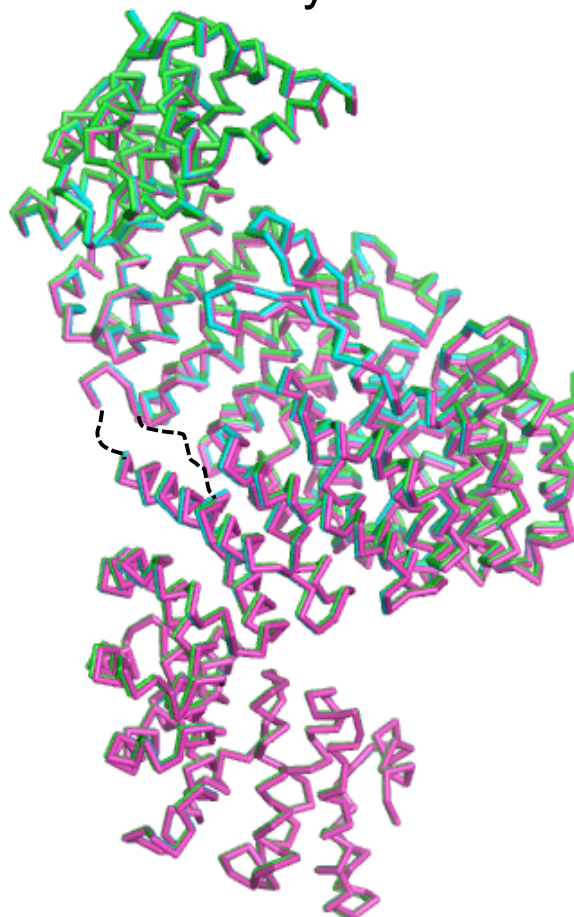


Figure. 3-21 Kap121p野生型と変異体(7mtおよび3K)の構造の比較

A-D. Kap121pの野生型、変異体およびその重ね合わせを表示した。A. Kap121pの野生型の構造(緑)。B. Kap121pの変異体(3K)の構造(深紅y)。C. Kap121pの変異体(7mt)の構造(シアン)。D. Kap121pの野生型および二種類の変異体の重ね合わせ。

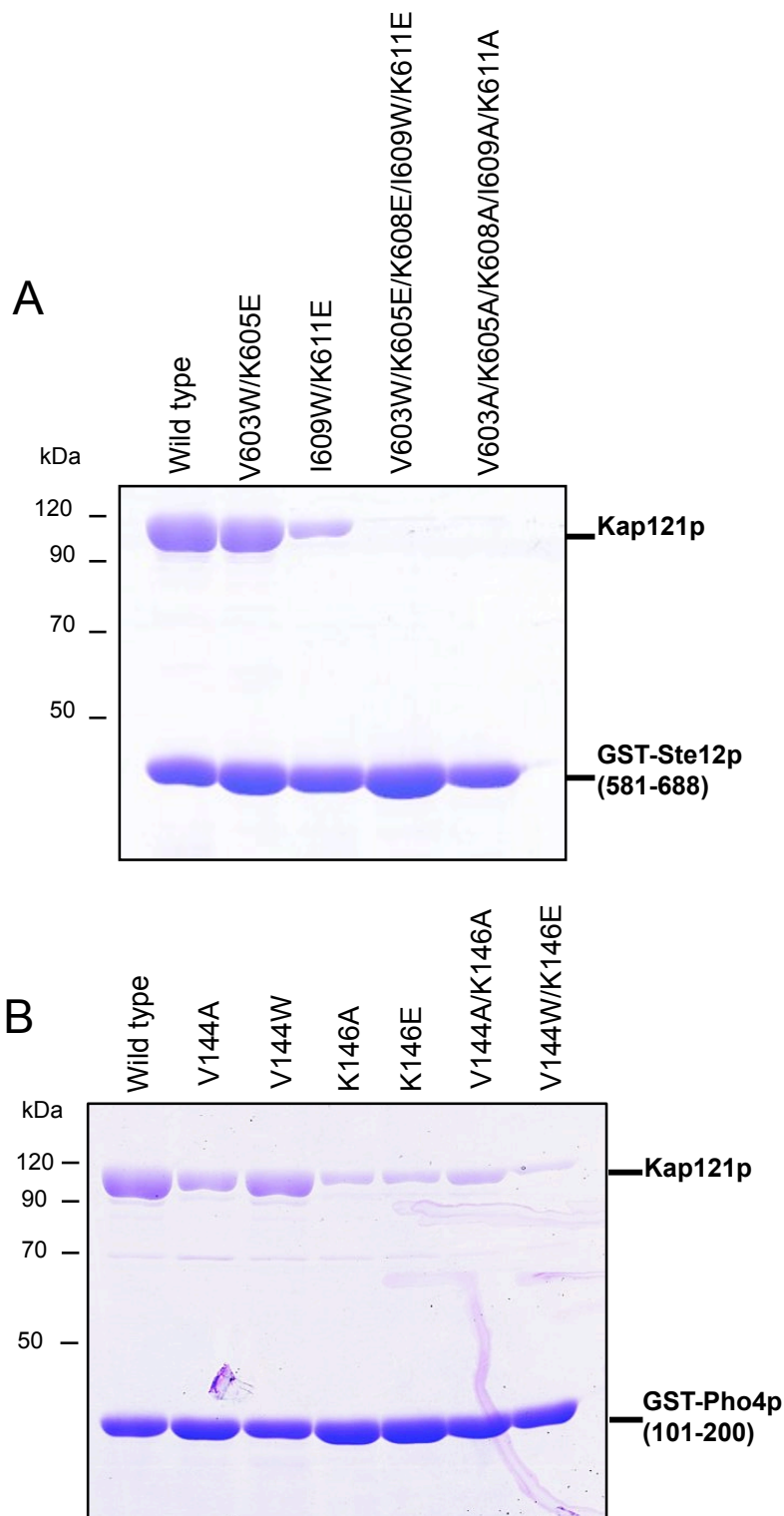


Figure. 3-22 Ste12pおよびPho4pの変異体を用いた機能解析(pull-down assay)

Cargoの変異体を用いたin vitroでの機能解析を記した。A. Ste12p変異体を用いたpull-down assay。8.5 μ gのGST-Ste12p (581-688)の野生型および変異体を固定したGSH-Sepharoseに16 μ gの野生型Kap121pをincubateした。B. 8.4 μ gのGST-Pho4p (101-200)の野生型および変異体を固定したGSH-Sepharoseに16 μ gの野生型Kap121pをincubateした。

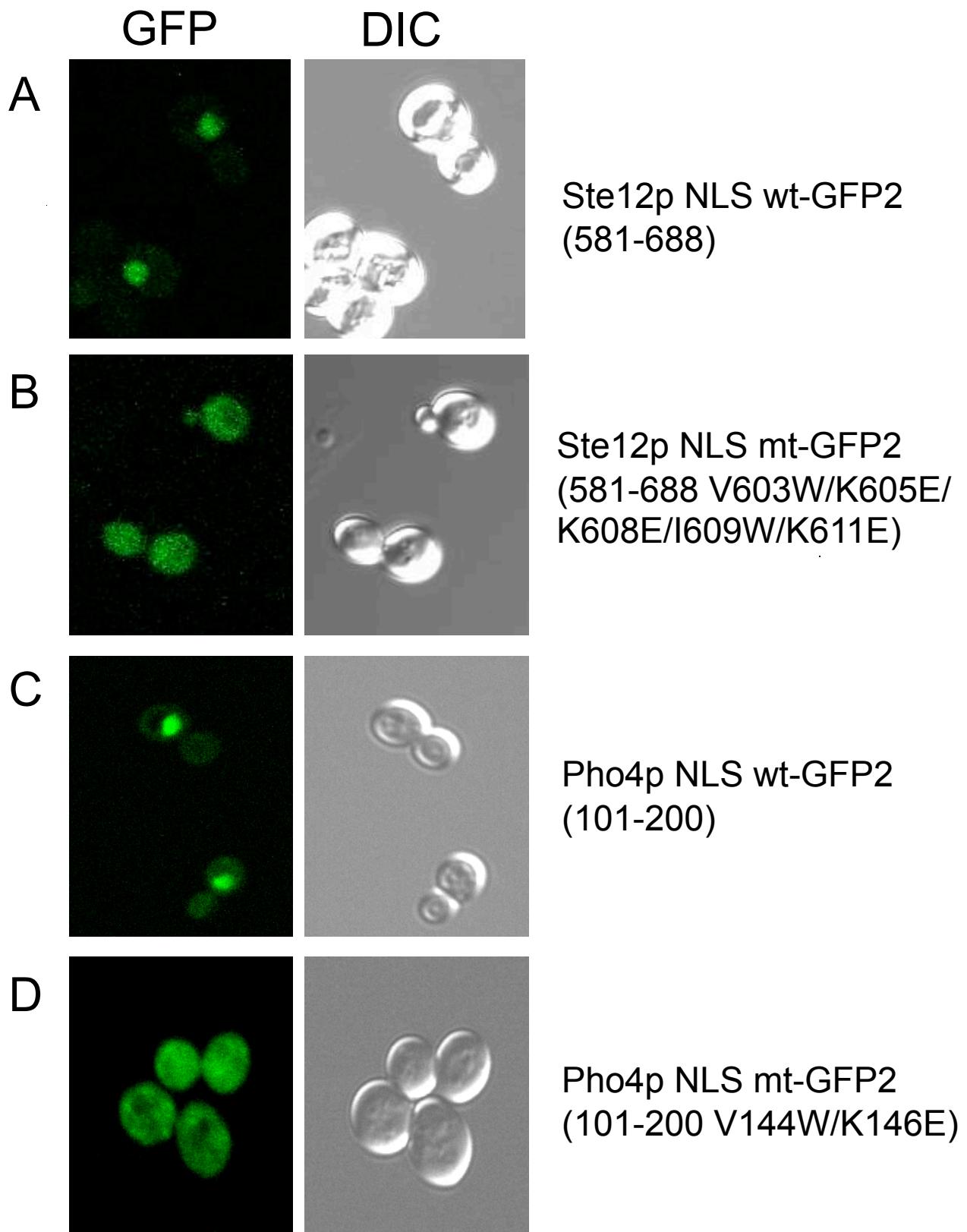


Figure. 3-23 Ste12pおよびPho4pの変異体を用いた機能解析 (in vivo nuclear import assay)

Cargoの変異体を用いたin vivoでの機能解析を記した。A-B. Ste12pの野生型および変異体を用いたnuclear import assay。C-D. Pho4pの野生型および変異体を用いたnuclear import assay。左図はGFP蛍光を、右図は微分干渉(DIC)を示した。その結果、野生型で核に局在したGFP蛍光が、変異体では細胞全体に広がっていた。

Kap121p NLS sequence alignment

Ste12p NLS1	602	S V G K SA K	608
Ste12p NLS2	608	K I S K PL H	614
Pho4p NLS	143	K V T K N K S	149
Nup53p KBD	406	K V S K NST	412
Ulp1p NLS	4	E V D K HR	9
Cdc14p NLS1	541	G I R K IS	546
Cdc14p NLS2	568	S I K K	551
Aft1p	348	N V R K P K S	355
Sas2p	31	K I K K TQ H	39
Yra1p	52	P I R K N T R	149
Ho	295	T I L K FK R	412
Pdr1p	723	K I Y K SWT	730
H3	34	G V K K PH R	42
HTB1,2	43	Y I Y K VL K	50
	46	K V L K Q T H	54
Rpl4p	179	K V L K SK K	187
Rpl15p	172	G I N K GH K	180
Rpl25p	93	Q I K K AV K	101

KV / **I**x**K**₁₋₂**K** / **H** / **R**

Figure. 3-24 Kap121pにより輸送されるcargoの配列比較とKap121pが特異的に認識するコンセンサス名NLS配列

結晶構造から同定したNLS配列から保存性の高いアミノ酸を青および赤で記した。さらに既に知られているKap121pのcargoを比較した。その結果、結晶構造から同定されたNLS配列をその多くが有していた。赤で記したものは完全に保存されていた。青で記したものは持っているものと持っていないものがあった。これらすべての配列比較からKap121pが特異的に認識するコンセンサスなNLS配列を記述した。

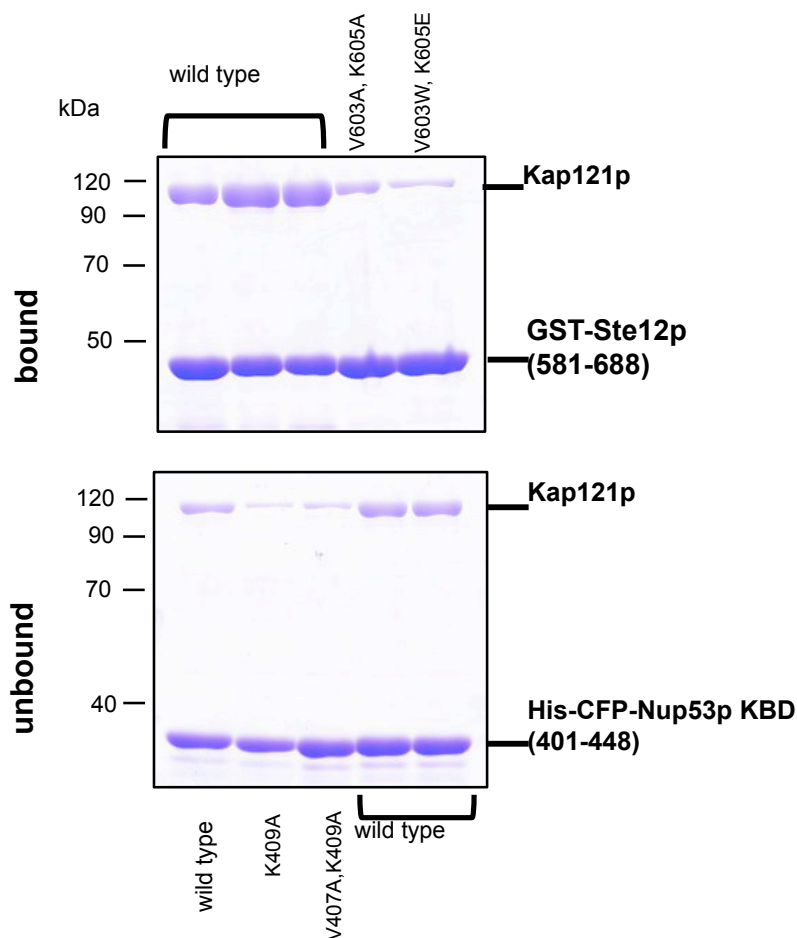


Figure. 3-25 In vitro competition assay

Nup53pおよびcargo (Ste12p) のin vitroでの機能解析 (competition assay) を記した。8.5 μ gのGST-Ste12p (581-688)の野生型および変異体を固定したGSH-Sepharoseに16 μ gの野生型Kap121pをincubateした。そこへ16 μ gのHis-CFP-Nup53p (401-448)の野生型および変異体を加えてincubateした。その結果、Nup53pはSte12pと競合して、Kap121pと結合した。データは載せていないがnegative controlとしてHis-CFPでincubateしても競合は起こらなかった。

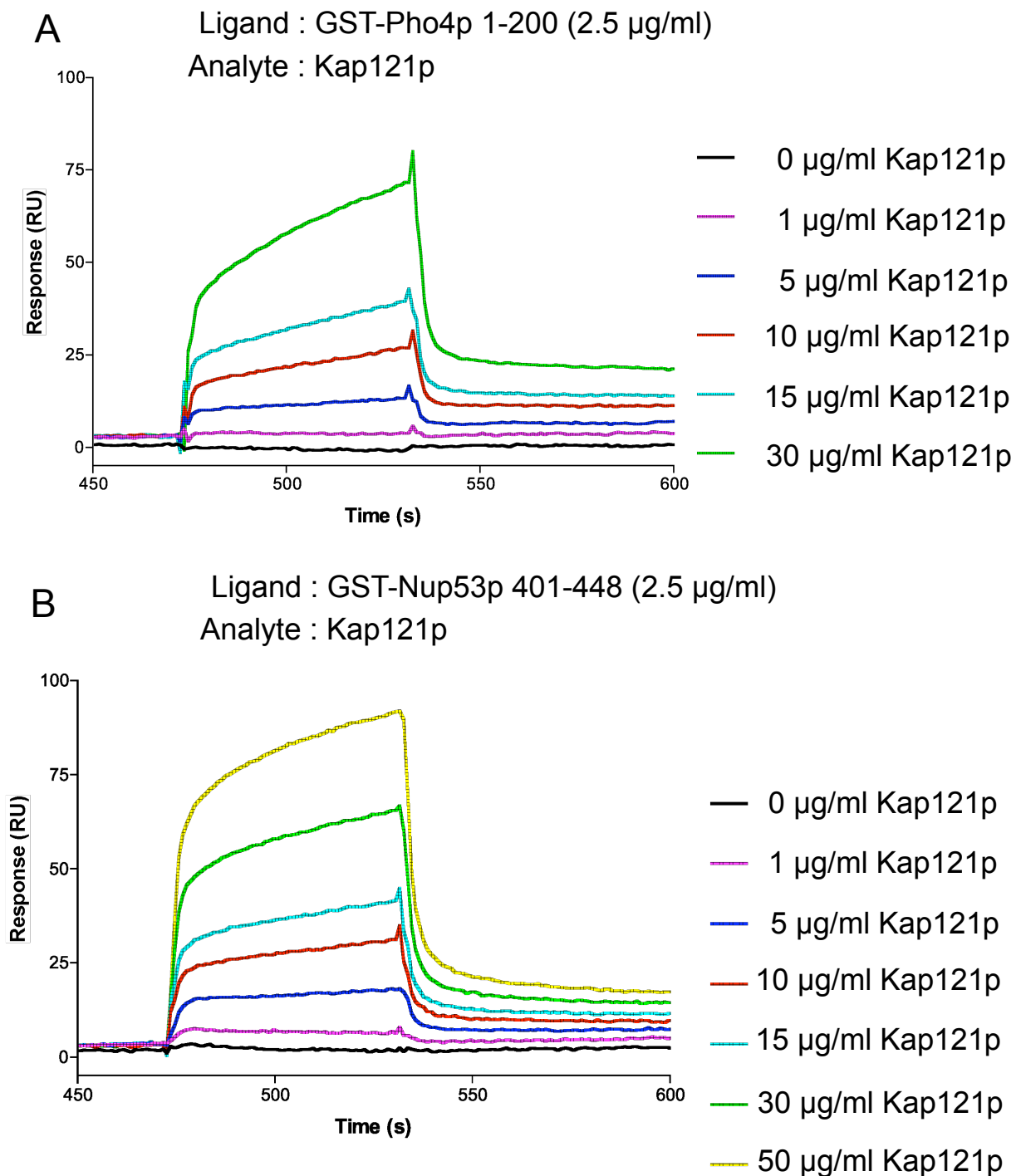


Figure. 3-26 Biacoreを用いたSPR解析

Biacoreを用いた表面プラズモン共鳴解析。GST-Pho4p(1-200)またはGST-Nup53p(401-448)をLigandとし、Kap121pをanalyteとして測定を行った。A. GST-Pho4pとKap121pの相互作用測定。Kap121pの濃度を0～30 $\mu\text{g/ml}$ まで、6段階に分けて測定を行った。それぞれのピークは色分けし、右に示した。B. GST-Nup53pとKap121pの相互作用測定。Kap121pの濃度を0～50 $\mu\text{g/ml}$ まで、7段階に分けて測定を行った。それぞれのピークは色分けし、右に示した。

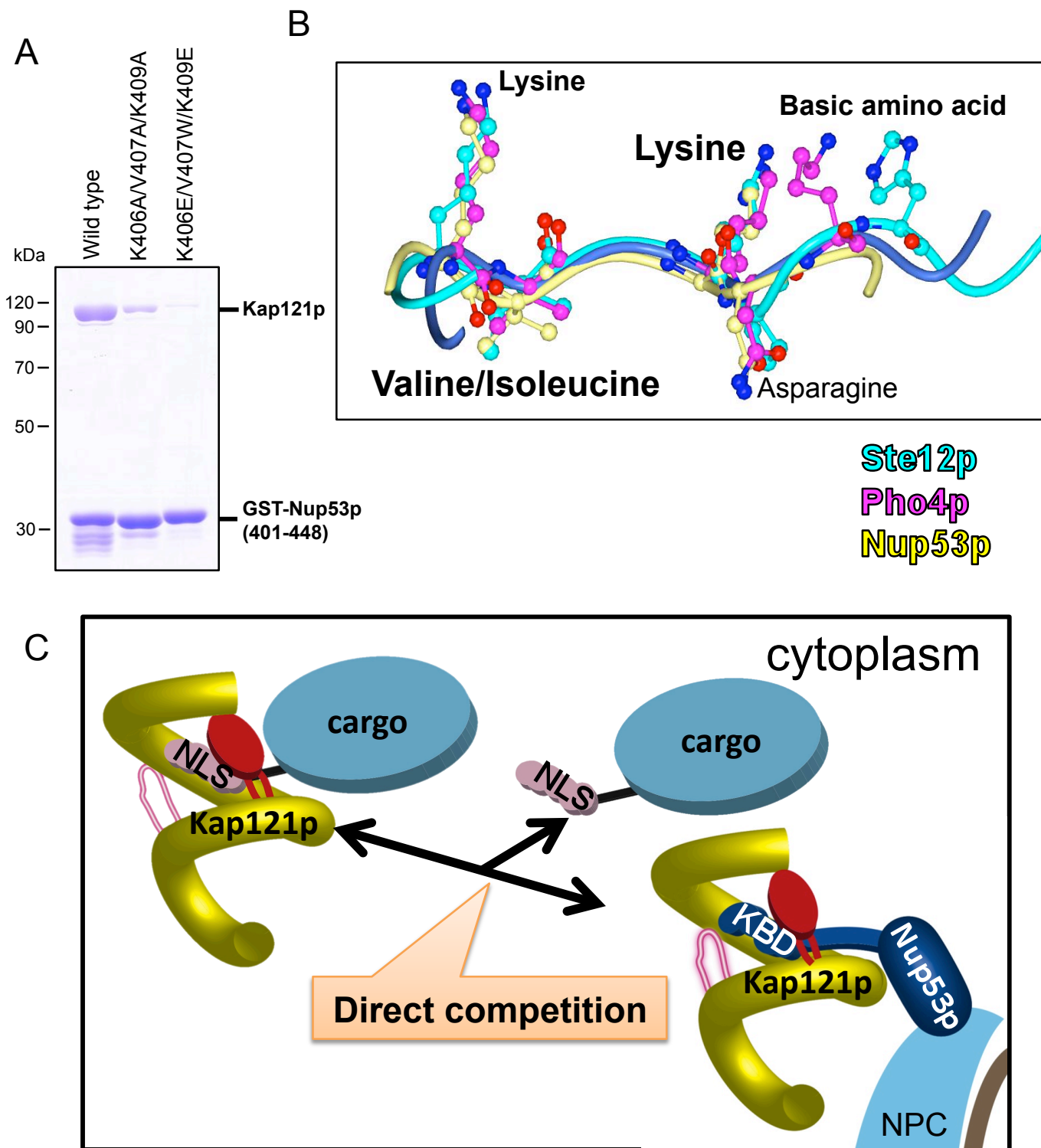
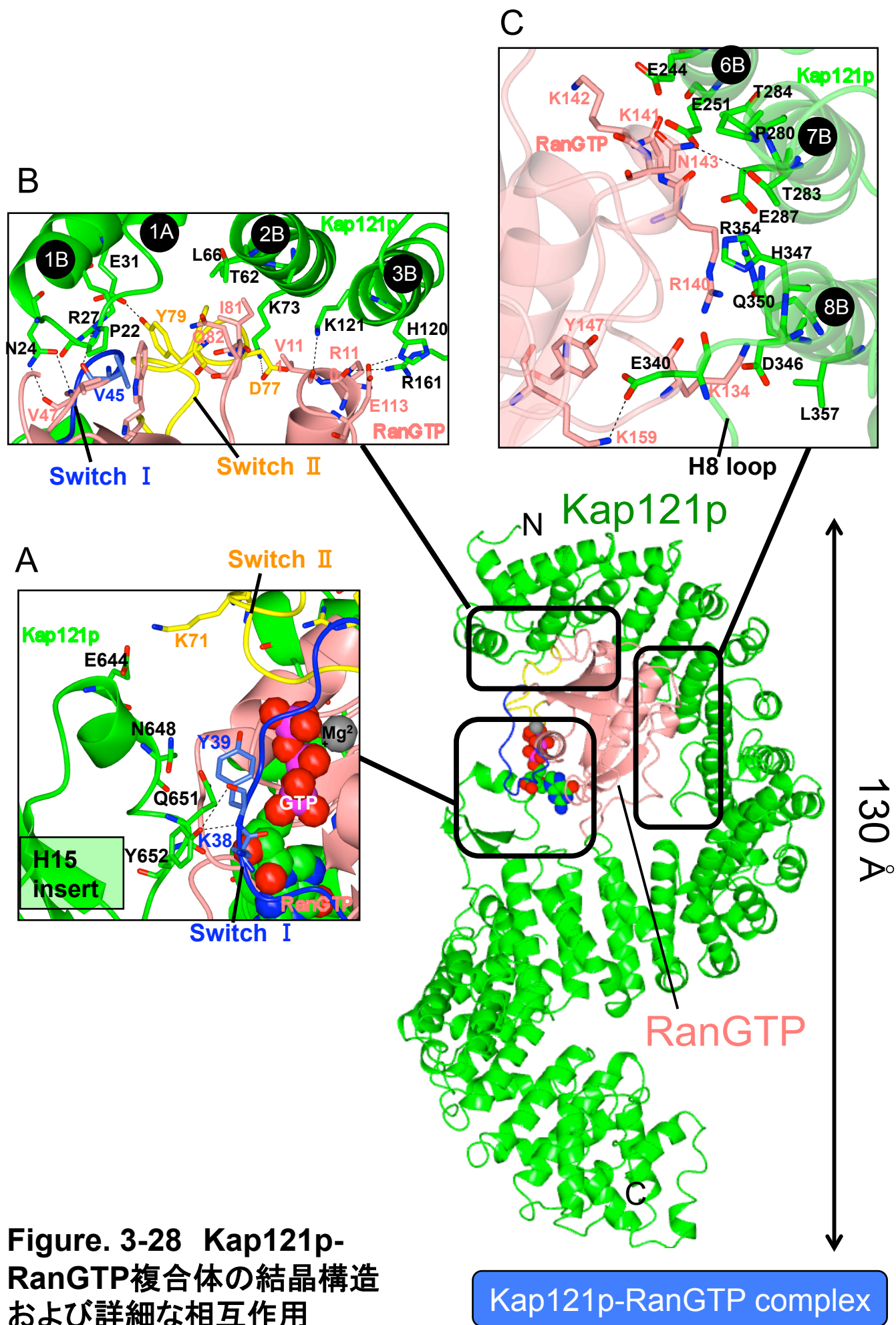
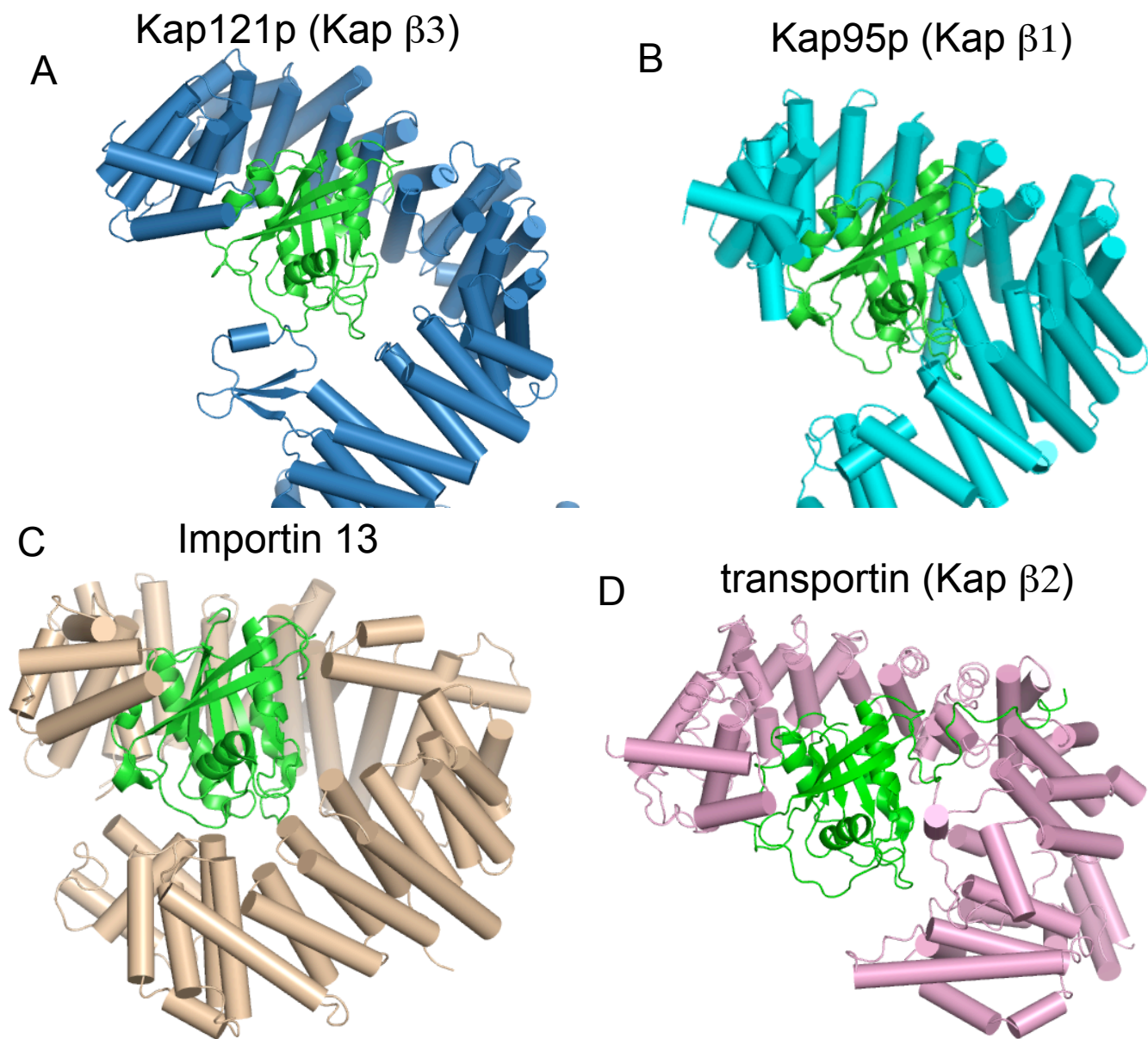


Figure. 3-27 Nup53pによる核移行阻害機構のモデル

Nup53pによる核移行阻害はcargoとの直接競合することによって起こった。A. Nup53p変異体を用いたpull-down assay。8.5 μ gのGST-Nup53p (401-448)の野生型および変異体を固定したGSH-Sepharoseに16 μ gの野生型Kap121pをincubateした。B. cargo (Pho4p、Ste12p)とNup53pのKap121p相互作用領域の重ね合わせ。全体部分はいくぶん重なった。特にバリンまたはイソロイシン、1アミノ酸あけてリシンの並びは完全に重なった。C. Nup53pの直接競合によるKap121p依存的核移行阻害機構の模式図。



Kap121p-RanGTP複合体の結晶構造の全体像(リボン表示)とKap121p(緑)とRanGTP(ピンク)の相互作用を詳細に表示した。主な相互作用は3ヶ所で、その位置を黒線の四角枠で囲んだ。さらにその拡大図および詳細な相互作用をA-Cに表示した。Switch I 領域を青で、Switch II 領域を黄色で表示し、結合に関わるアミノ酸残基をスティック表示で示した。A. HEAT 15 insert (Kap121p)とSwitch I およびSwitch II (RanGTP)の相互作用。Kap121pのE644がSwitch II のK71と静電相互作用しており、Kap121pのN648、Q651、Y652がSwitch I のG20、K38、Y39と水素結合および分子間力により相互作用していた。B. Kap121pのHEATs 1B-3BとRanGTPのSwitch I およびSwitch II が数多くの水素結合、疎水性相互作用および分子間力により結合していた。C. Kap121pのHEATs 6B-8BとRanGTPのbasic patchが水素結合および静電相互作用により結合していた。



Kap121p	Kap95p	Importin 13	transportin
RanGTP switch2との結合領域			
H1-H3	H1-H4	H1-H3	H1-H3
RanGTP basic patchとの結合領域			
H6-H8, H8 loop	H7-H8, H8 loop	H9	H7-H8, H8 loop
RanGTP switch1との結合領域			
H15 insert	H13-H15	H16-H18	H14-H15

Figure. 3-29 ImportinとRanGTPの相互作用機構の比較

ImportinとRanGTPの相互作用機構の保存性を検証するために今回解いたKap121p-RanGTP複合体の構造と今まで解かれたImportin-RanGTP複合体の構造と比較した。A-D Importin-RanGTP複合体の構造比較。全体をリボン表示で、RanGTP(緑)で表示した。A. Kap121p(Kap β 3)-RanGTP複合体の構造。Kap121pを青で表示した。B. Kap95p(Kap β 1)-RanGTP複合体の構造(Lee et al., 2005)。Kap95pをシアンで表示した。C. Importin 13-RanGTP複合体の構造(Bono et al., 2010)。Importin 13を肌色で表示した。D. Kap β 2-RanGTP複合体の構造(Chook and Blobel, 1999)。Kap β 2をピンクで表示した。それぞれのImportinのRanGTP結合領域を下の表に記載した。

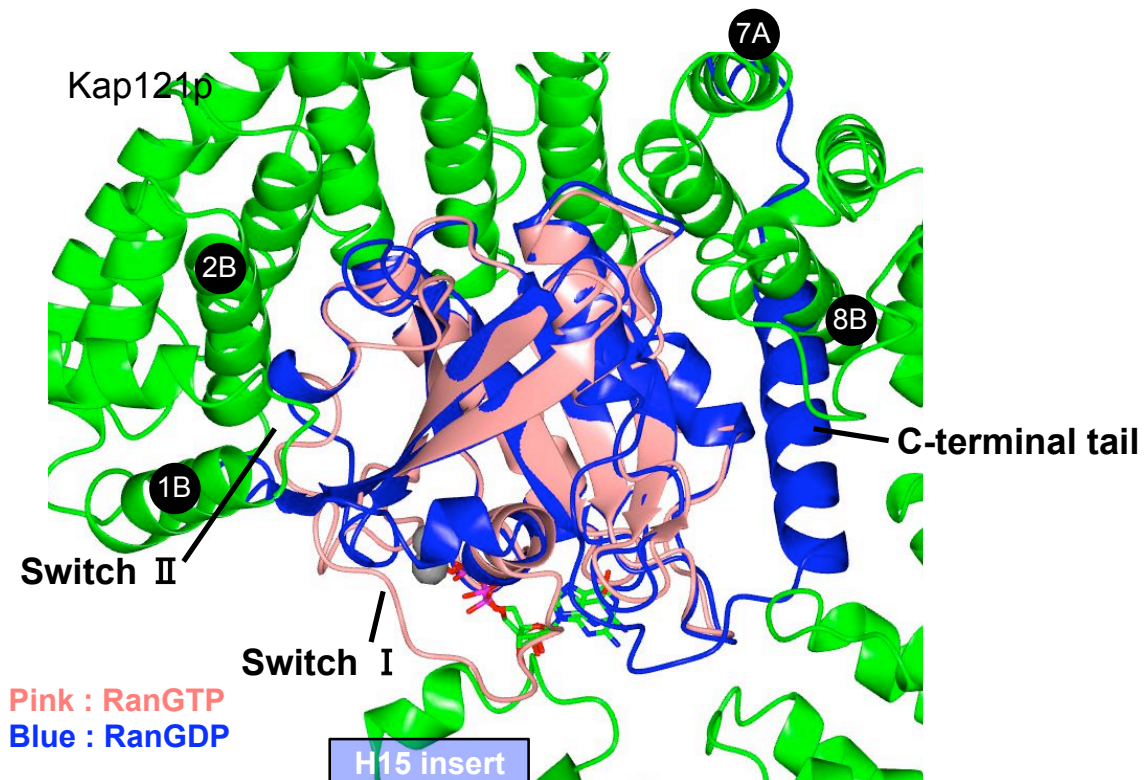
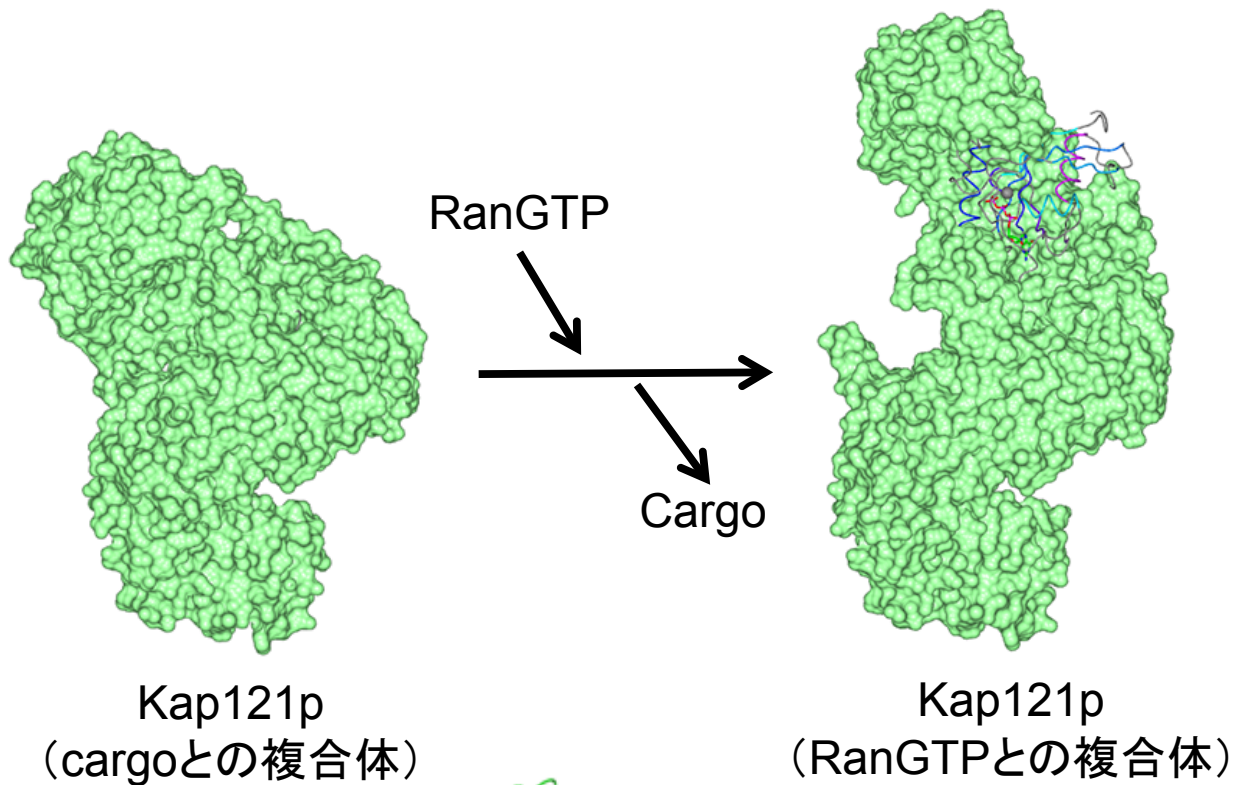


Figure. 3-30 RanGDPではKap121pとclashを起こす

RanGTPの加水分解がどのようにKap121pとの相互作用を消失させ、解離させる方向へ導くのかを検証するために、Kap121p-RanGTP複合体のRanGTPにRanGDPの構造を重ね合わせることで検証した。その結果、RanGTPが加水分解されてRanGDPになるとSwitch I、Switch IIおよびC-terminal tailで構造変化が起こり、Kap121pと接触してしまうため、相互作用することができなくなり、解離するということが明らかになった。

A



B

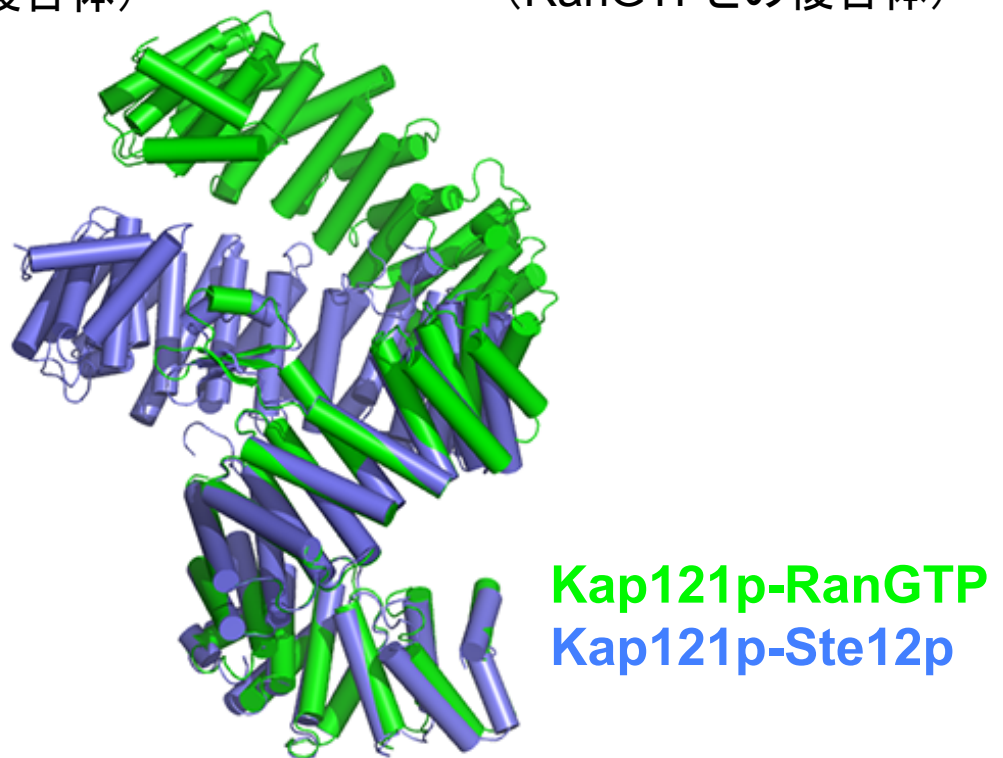


Figure. 3-31 RanGTPによりKap121p超らせん構造は大きく構造変化する。

Kap121pはRanGTPの結合により大きく構造変化する。A. Kap121p-Ste12p複合体およびKap121p-RanGTP複合体のKap121pの構造を表面表示で(緑)、RanGTPをリボン表示(シアン)で示した。B. Aでの二つの複合体のKap121pをC末半分のアーチ(HEATs 12-24)で重ね合わせた。RanGTP複合体を緑で、Ste12p複合体を青で示した。

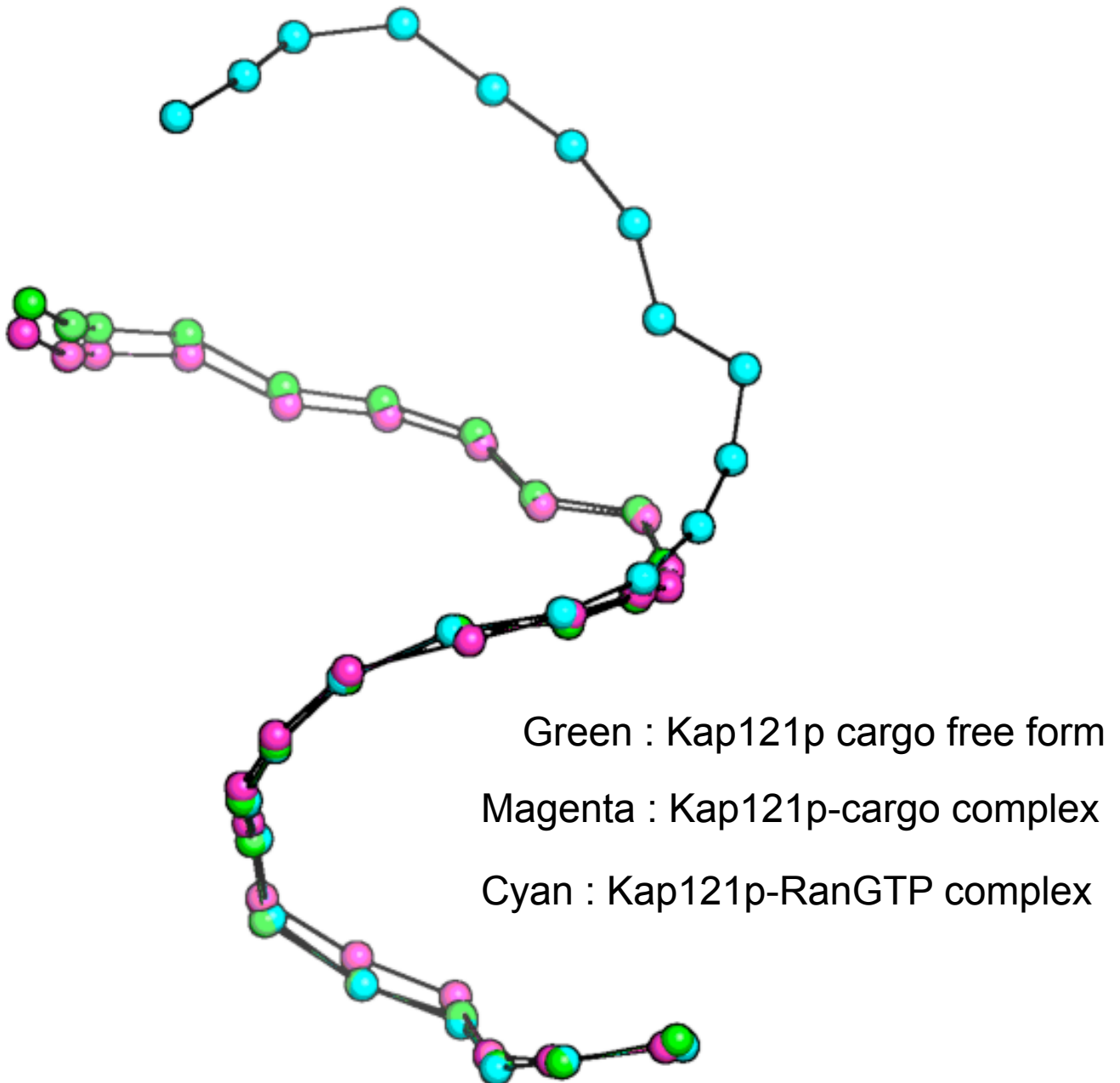


Figure. 3-32 Kap121p単独、cargoとの複合体およびRanGTP複合体の構造比較の模式図

今回解いた三種類のKap121p単独およびcargoまたはRanGTPとの複合体のKap121pの構造を模式図で示した。このそれぞれの球一つ分がKap121pのそれぞれのHEATリピート一つ分を示しており、球の位置はHEATモチーフの中心部分を表している。Kap121p単独の構造を緑で、Kap121p-cargo (Ste12p) 複合体の構造を深紅で、Kap121p-RanGTP複合体の構造をシアンで表示した。

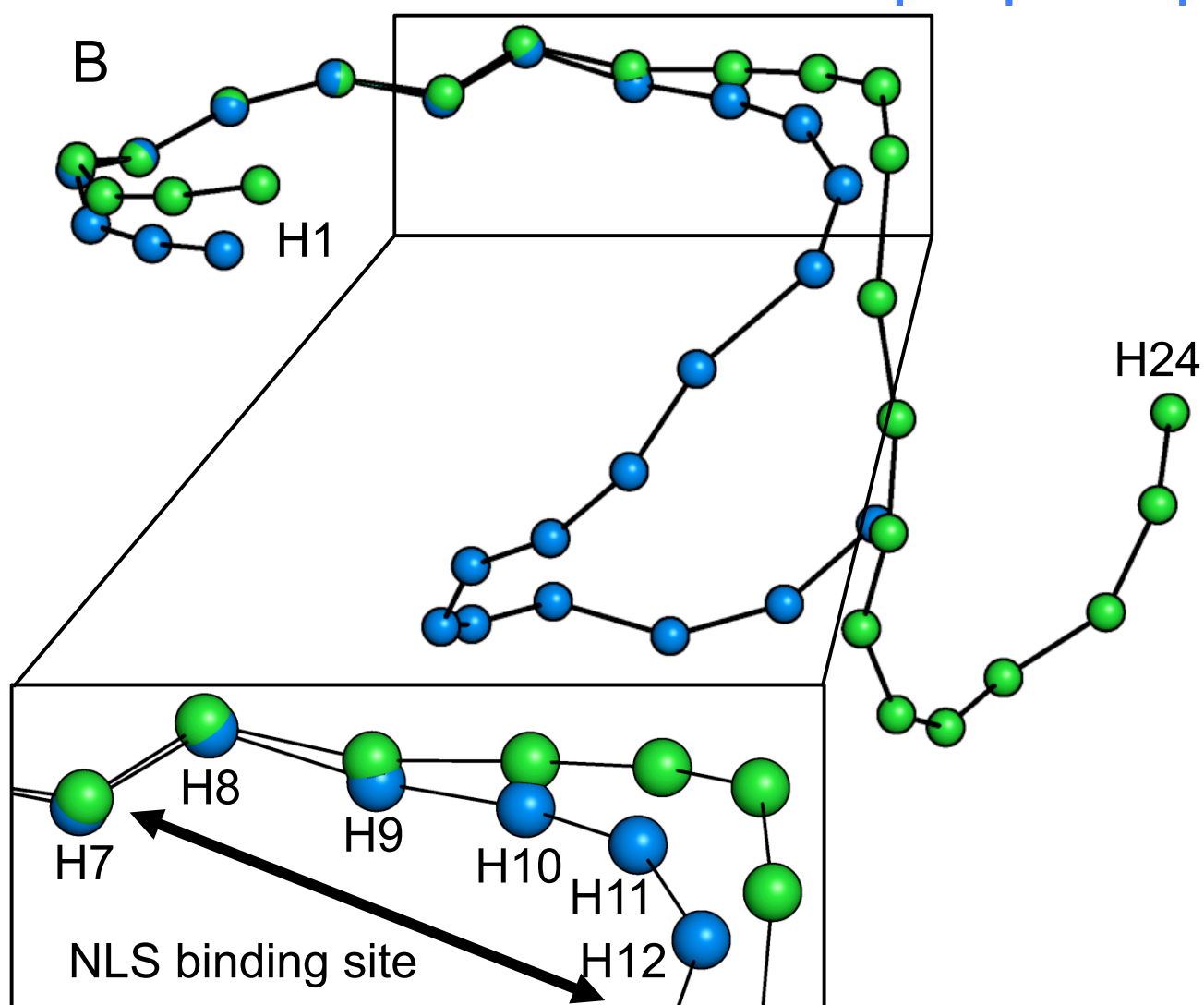
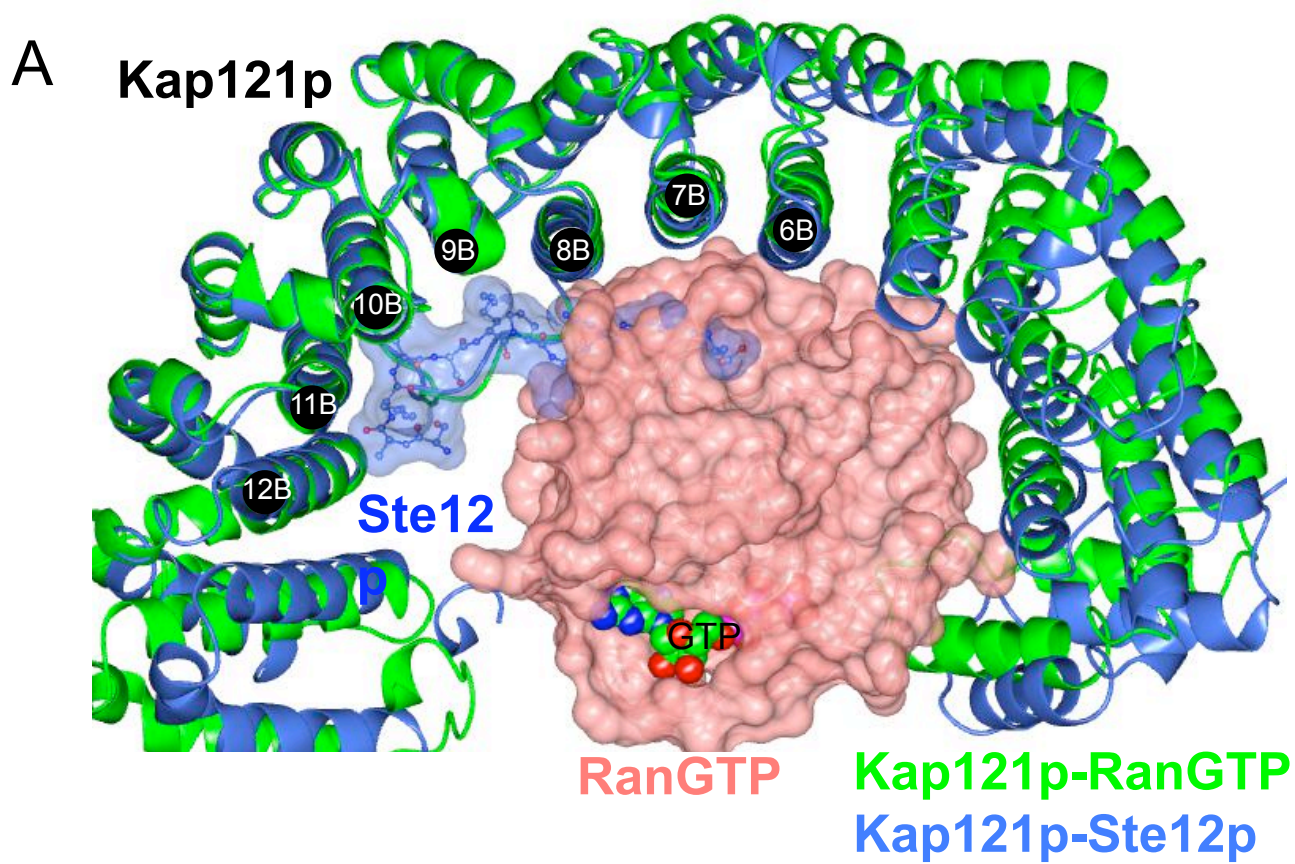


Figure. 3-33 Kap121p-Ste12p複合体とKap121p-RanGTP複合体の重ね合わせによる構想比較

Kap121p-Ste12p複合体(青)の構造とKap121p-RanGTP複合体(緑)の構造をN末側のアーチ(HEATs 2-10)で重ね合わせた。A. Kap121p-Ste12p複合体のKap121pをリボン表示で、Ste12p NLSをスティック表示で示した。Kap121p-RanGTP複合体のKap121pをリボン表示で、RanGTP(ピンク)を表面表示で示した。Ste12pとRanGTPは一部が重なって存在しており、立体障害が起こるため、RanGTPとSte12pは同時にKap121pと結合できないと示唆される。B. それぞれのHEATモチーフを一つの球で示した模式図。下に構造変化の起点部分の拡大図を示した。構造変化の起点はHEAT 8にあたる部分である。ここはちょうどcargoのNLSが結合する部分であった。

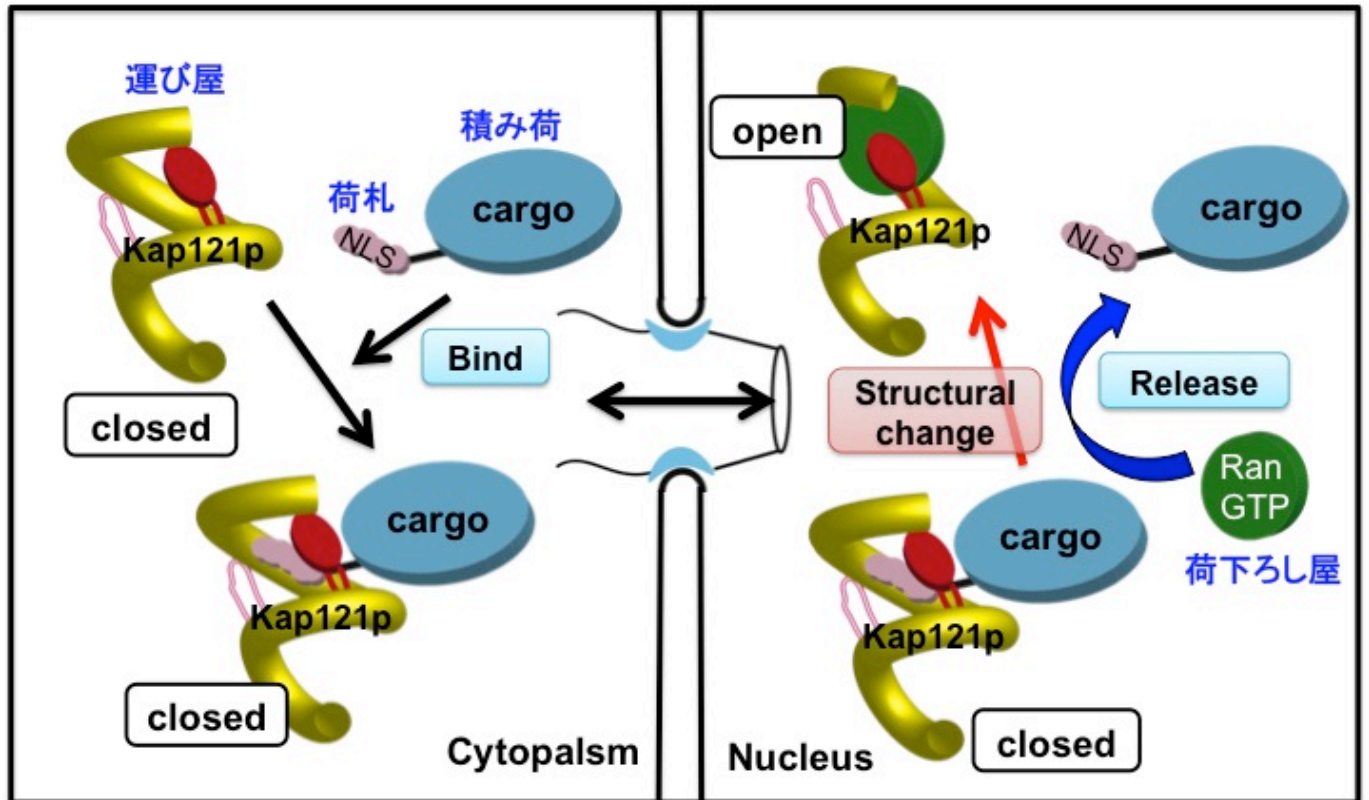


Figure. 3-34 結晶構造から示唆されたKap121pによる物質の核移行サイクル

結晶構造に基づいてそれぞれの構造を模式図で示した。Kap121pを黄色で(HEAT 15 insertを赤、HEAT 18 loopをピンクで示した)、cargoをシアン、NLSを灰色、Ranを緑で示した。Kap121pは単独ではHEAT 15 insertおよびHEAT 18 loopによる分子内相互作用により閉じた構造に安定化していた。細胞質でcargoと直接結合するが、その際Kap121pの全体構造はほとんど変化しない。核内に移動後、RanGTPはKap121pのN末側のアーチと相互作用することでcargoを核内に解離させる。この結合の際、今まで形成されていたKap121p内の分子内相互作用が崩壊し、Kap121pの構造は大きく変化する。HEAT 15 insertはRanGTPと結合し、HEAT 18 loopはその電子密度が確認できなくなり、完全にdisorderしていると示唆される。