The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	X-ray crystal structural analysis of uncomplexed importin-β deletion mutant
Author(s)	李, 守宰
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43597
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【11】

氏　　名	李　　守　宰（り　す　ちぇ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　16597　号
学位授与年月日	平成13年12月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学　位　論　文　名	X－ray crystal structural analysis of uncomplexed importin－β deletion mutant （マウスインポティン・ベータ変異体のX線結晶構造解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　月原　冨武 （副査） 教　授　原田　　明　　教　授　後藤　祐児　　助教授　中川　敦史

論文内容の要旨

真核細胞では、細胞質と核が核膜により隔てられている。核はDNA複製、RNA転写、プロセシングなど、遺伝子機能発現の場である。核内で働く蛋白質は細胞質にあるリボソーム上で合成された後、核内へ輸送されなければならない。また逆に核から細胞質にRNAや蛋白質が輸送される。核と細胞質の間で行われる物質輸送は、核膜に存在する核膜孔複合体（Nuclear pore complex;NPC）を通して行われる。NPCは50-100種類もの蛋白質からなり、イオンや低分子量の蛋白質（分子量20-40K以下）を自由拡散で通過させる。しかし、これよりも大きな分子はNPCを自由に通過できない。そこで分子量の大きなものは、その分子内にシグナル配列をもち、NPCの通過が許可される仕組みがある。シグナル配列には、細胞質から核へ移行するために必要な“核移行シグナル”と核から細胞質へと移行するために必要な“核外移行シグナル”がある。“核移行シグナル”（Nuclear Localization Signal;NLS）を持つ蛋白質は、NLSがimportin-αにより認識され、その後さらにimportin-βがimportin-αと結合し、三者の複合体としてNPCへターゲットする。本発表ではマウスimportin-β変異体の精製、結晶化及び構造解析と機能に関して述べる。

マウスimportin-β変異体（全長876残基のうちN末端の449アミノ酸の領域；impβ449）はpGEX-2T GST-fusion systemでクロニングされて大量培養の後Glutathion Sepharose-4B affinity columnとMonoQ columnにかけることによって、純粋な蛋白質を得る事ができた。結晶化は4℃でハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行った。10%のグリセロールと10mMのメルカプトエタノールを入れたpH7.0の25mM燐酸緩衝液に蛋白質を40mg/mlに調整し、15%PEG4000を含むpH5.5 50mMカコジル酸緩衝液をそれぞれ3 μlずつ混ぜると1ケ月で最大1.0×0.5×0.05mmまで成長した。セレノーメチオニン誘導体の結晶もnativeの結晶とほぼ同じ条件で作成することができた。Imp β449の結晶は空間群$P2_12_12_1$に属し、格子定数はa=81.8Å、b=103.8Å、c=126.9Åで非対称単位に2分子含まれていた。

Imp β449の結晶は外的環境変化、すなわち温度、pHなどの変化に敏感であり、こうした結晶の性質に鑑みて重金属誘導体の作成が容易でないと判断し、セレノーメチオニン誘導体の結晶を用い、Seの異常散乱効果を利用する多波長異常散乱法（Multiwavelength Anomalous Diffractiion method;MAD）を適用した。X線回折強度測定はSP ring-8 BL45XUのtrichromatorを利用し、2.6Åの分解能でpeak, edge, remoteの3波長のデータセットを得る事ができた。位相決定は、プログラムSHELXSにより、まずpeak波長のデータによる異常散乱差Patterson関

数から7個のSeの位置を拾い上げた。プログラムMLPHAREにより、このSeの位置から計算される初期位相を得て、差フーリエ合成図からさらに別のSeの位置を拾い上げ、このサイクルを繰り返して次々Seの位置を決定し、最終的に24個のSeを決定し位相を求めた。プログラムDMにより溶媒領域平滑化と蛋白質領域の電子密度を得て、非対称単位中の約900残基のアミノ酸をモデル構築し、プログラムCNSにより結晶構造は分解能2.6ÅにてR＝21.5%、R_{free}＝27.0%まで精密化した。

Impβ449はuncomplexed formで10個のHeatリピート構造からなり、importin-β-IBBドメイン複合体、importin-β-RanGTP複合体に見られる対応する部分と基本的に同じ構造である。蛋白質-蛋白質相互作用に伴う構造変化を調べるため、Impβ449と他の2つのimportin-βを比較してみると、N末端のリピート1，2に大きな構造変化があり、リピート4-7の所でも構造変化が見られた。また、非対称単位中の2分子間の温度因子の変化を調べてみるとループ部分が温度因子の変化が大きいという事はimportin-β分子はループ部の動きによって分子の柔軟性を表していると見られる。Heatリピートヘリックスの積み重なりがもたらす構造の可変性を視覚化する事を目的とし、impβ449、importin-β-IBBドメイン複合体、importin-β-Ran-GTP複合体の1-449残基までで仮想的な超らせん構造を構築してみると、超らせんの直径とピッチはそれぞれ106Å，31Å（impβ449）,102Å,42Å（importin-β-IBB）と96Å,94Åimportin-β-Ran-GTP）であった。Impβ449は最も直径が大きくてピッチは短い、3者の中で超らせんの内径が最もオープンなコンフォメーションをとっている事を示唆している。シグナル伝達因子として興味がもたれているβカテニンは、最近の研究でそれ自身でNPCを単独通過することが分かり、NPC通過という共通の機能を持つβカテニンとimportin-βの構造の比較をして見た。βカテニンのNPCを単独通過領域のAPMリピート10-12はimportin-βのHeatリピート6-8の領域と立体構造がよく重なることが分かった。

結論的にマウスimportin-β変異体の結晶構造解析はその結晶が外的環境変化に敏感であって、重金属誘導体の作成が容易でないと判断し、SeのMAD法を適用した。小さい非対称単位の中に26個のSe atomが存在しているため、Seの位置の決定が難しいと思われたが、構造解析することができた。Impβ449はuncomplexed formであり、importin-β-IBBドメイン複合体、importin-β-Ran-GTP複合体などの複合体の結晶構造と比較することによって、importin-βの機能とコンフォメーションとの相関関係を推測できた。

論文審査の結果の要旨

李君の論文は、核膜孔を介して細胞質から核への蛋白質輸送に関与するインポーテインベータの構造と機能に関するものである。マウスインポーテインベータの膜透過に必須の領域を結晶化し2.6Å分解能のX線結晶構造解析を行った。19本のαヘリックスが右巻に超ラセン構造をとる特徴的な構造をしている。別に構造決定されたインポーテインベータとインポーテインアルファの一部との複合体の構造と比較して、分子全体がバネのように構造を変えて運搬すべき蛋白質を結合する機構を明らかにした。この研究は、蛋白質輸送に関する研究として画期的研究である。よって、この論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。