

Title	X-ray structural analysis of the pre-microRNA nuclear export machinery
Author(s)	岡田, 千真理
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58005
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	岡田千真理
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 23442 号
学位授与年月日	平成21年12月16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 structural analysis of the pre-microRNA nuclear export machinery (pre-microRNA核外輸送複体のX線結晶構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 中川 敦史 (副査) 教授 原田 明 教授 後藤 祐見 教授 栗栖 源嗣 名誉教授 月原 富武

論文内容の要旨

真核細胞では、核と細胞質が核膜で隔てられており、核膜に存在する核膜孔を介してさまざまな分子が機能する場に輸送されている。核膜孔の排除限界以上の大きさを持つ蛋白質や核酸が、核膜孔を通過するためには、分子量にかかわらず、通過に必要なシグナルを持つ必要がある。そのシグナルを認識して輸送する因子が、importin- β family である。importin- β family は、細胞質から核への輸送を担う importin と核から細胞質への輸送を担う exportin に分類される。またその輸送の制御に深く関わるのが低分子量 G 蛋白質 Ran である。Ran は他の G 蛋白質と同様にエフェクター分子によって GDP 結合型(RanGDP)と GTP 結合型(RanGTP)に変換される。GDP 結合型に変換するのが RanGAP や RanBP1/2 であり、GTP 型に変換するのが RCC1 の作用による。基質分子と複合体を形成して核に移行してきた importin は、RanGTP と結合すると基質分子を解離する。一方 exportin は RanGTP 存在下の基質と結合し細胞質へと輸送する。細胞質では RanGAP などの作用により RanGTP が RanGDP に加水分解されると exportin は基質を解離する。RanGAP や RanBP1/2 が細胞質に RCC1 は核内に局在することで、Ran は細胞質では GDP 型で核内では GTP 型となり、importin- β family の基質の結合解離をうまく調整している。

核-細胞質間の分子流通を考える場合、蛋白質の流通だけでなく RNA の輸送も重要である。RNA 輸送因子としては、importin- β family に属する Exportin-1(CRM1)、Exportin-t、Exportin-5(Exp-5)ならびに mRNA 輸送に関わる importin- β family に属さない TAP という分子が知られている。RNA の核外輸送は、RNA の転写やプロセッシングと密接に関わる反応である。近年、動物、植物、ウイルスに至るまで、広範な生物種において microRNA (miRNA) が発見された。miRNA は、相補的な配列を有する標的 mRNA の安定性や翻訳効率を制御するほか、染色体に影響を与えることで発生や分化に関与する種々の遺伝子の発現を調整することが知られている。miRNA ははじめに核内で数百塩基からときには数千塩基にも及ぶ長さを持つ pri-miRNA として転写される。Pri-miRNA は核内 RNase III の Drosha によって 3'末端 2 塩基突出ステム-ループ構造を持つ pre-miRNA(~65nt)になり RanGTP 存在下において輸送因子 Exp-5 によって細胞質へと輸送される。輸送された pre-miRNA は細胞質で miRNA となり機能することができる。

本研究では、Exp-5 が pre-miRNA を核外に輸送するメカニズムを明らかにすることを目的とし、Exp-5:RanGTP:pre-miRNA 複合体を 2.9Å分解能でX線結晶構造解析をおこなった。構造解析をするために

Exp-5:RanGTP の発現方法、三者複合体の精製方法、結晶化の確立、および回折測定実験、構造決定を行った。

構造解析の結果、Exp-5:RanGTP 複合体は、野球のファーストミットのような構造をとりそのミットの内側は塩基性アミノ酸が集り RNA との相互作用が可能な構造であることがわかった。その構造は細胞内にたくさん存在する RNA 分解酵素から pre-miRNA を保護することが可能である。またミットの底の部分にはトンネル構造があり、pre-miRNA の 3'末端の 2 塩基突出した部分が収まっていた。このトンネル構造は 3'末端と強く相互作用することで pre-miRNA が輸送される際に解離しにくい構造であり、また 3'末端突出型 RNA と 5'末端突出型 RNA の違いを認識している。しかし pre-miRNA の塩基配列には依存せず様々な pre-miRNA との結合が可能であり、pre-miRNA だけでなく 3'末端突出構造をとる tRNA や小さい RNA(例、humanY1、adenovirus VA1 RNA) も結合可能なことを結合予測により証明することができた。

論文審査の結果の要旨

真核細胞では、核と細胞質が核膜で隔てられており、核膜に存在する核膜孔を介してさまざまな分子が機能する場に輸送されている。核膜孔の排除限界以上の大きさを持つ蛋白質や核酸が、核膜孔を通過するためには、分子量にかかわらず、通過に必要なシグナル（核外輸送シグナル：NES）を持つ必要があり、そのシグナルを認識して輸送する因子が、importin- β family タンパク質である。importin- β family の中で、核から細胞質への輸送を担うタンパク質は exportin と呼ばれている。exportin は、GTP 結合型 Ran (RanGTP) 存在下で NES を認識して基質分子と結合し、複合体を形成することにより核外へと輸送される。

近年、動物、植物からウイルスに至る広範な生物種において生命現象に重要な分子として microRNA (miRNA) が発見された。miRNA は、相補的な配列を有する標的 mRNA の安定性や翻訳効率を制御するほか、染色体に影響を与えることで発生や分化に関与する種々の遺伝子の発現を調整することが知られている。miRNA は、核内で数百塩基からときには数千塩基にも及ぶ長さを持つ pri-miRNA として転写された後、核内 RNase III の Drosha によって 3' 末端 2 塩基突出ステム-ループ構造を持つ pre-miRNA (〜65nt) になり、RanGTP 存在下において輸送因子 Exportin-5 (Exp-5) によって細胞質へと輸送される。輸送された pre-miRNA は細胞質で miRNA となって機能する。

本研究では、不安定な RNA 分子を含む三者複合体の調製条件を決定し、さらに X線結晶構造解析に適した結晶を得ることに成功した。この結晶を用いて、2.9Å 分解能の Exp-5:RanGTP:pre-miRNA 複合体の構造を明らかにした。本研究で得られた Exp-5:RanGTP:pre-miRNA 複合体の原子構造から、細胞内にたくさん存在する RNA 分解酵素から pre-miRNA を保護する仕組みや基質となる RNA の構造の認識機構を明らかにすることができた。

原子レベルでの Exportin による基質認識機構の解明は世界で初めてのものであり、本研究により、核膜孔を介した物質輸送を理解する上での非常に重要な知見が得られ、今後、本分野でのさらなる発展につながる成果であると言える。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。