

低酸素応答因子 HIF-1 α の核移行シグナルと importin- α 1 の共結晶構造 Crystal structure of importin- α 1 bound to HIF-1 α NLS

松浦能行^{1,2,*}, 宮脇和也²

¹国際医療福祉大学薬学部, 〒324-8501 栃木県大田原市北金丸 2600-1

²名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻, 〒464-8602 名古屋市千種区不老町

Yoshiyuki MATSUURA^{1,2,*} and Kazuya MIYAWAKI²

¹Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, International University of Health and Welfare, 2600-1 Kitakanemaru, Ohtawara City, Tochigi 324-8501, Japan

²Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

1 はじめに

固形癌には、がん細胞の無秩序な増殖と血管新生の不均衡に起因する低酸素環境が存在する。このような低酸素環境にあるがん細胞では、その劣悪な環境に適応するために、有酸素条件とは異なるさまざまな遺伝子の発現が誘導され、その結果、がんの悪性化が促進される。低酸素誘導因子 1 (HIF-1)は、このような低酸素ストレス応答を司るマスター転写因子である[1]。

大多数のヒトがんにおいて、HIF-1 の α サブユニット(HIF-1 α)が過剰発現しており、HIF-1 α の核移行(細胞質から核への移行)は、HIF-1 による標的遺伝子群転写活性化のために必須のプロセスである。HIF-1 α の核移行のために必要な核移行シグナル(residues 718-756)が同定されており、核移行シグナル内部の 28 アミノ酸残基(residues 724-751)の削除により HIF-1 α の核局在が阻害されることが知られている[2]。

本研究では、核移行受容体による HIF-1 α 核移行シグナル認識機構を明らかにするため、importin- α 1 と HIF-1 α 核移行シグナルの共結晶構造解析を行った。

2 実験

ヒト HIF-1 α の核移行シグナル(野生型あるいは Δ 724-751 変異体)を GST との融合タンパク質として大腸菌で大量発現し、これとは別にマウス importin- α 1 のアルマジロリピートドメインも大腸菌で大量発現した。これら 2 種類の大腸菌ペレットを混ぜて懸濁して超音波破碎し、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより importin- α 1 と HIF-1 α 核移行シグナルの複合体を精製した(GST タグは精製途中に TEV プロテアーゼによって除去した)。この複合体をハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化した。

高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory ビームライン BL-17A で X 線回折データを収集し、マウス importin- α 1 の構造をサーチモデルとした分子置換法により結晶構造を解いた。

3 結果および考察

本研究では、まずマウス importin- α 1 とヒト HIF-1 α 核移行シグナル(野生型)の複合体の結晶化に成功し、1.8 Å 分解能で結晶構造を解いた(*R*-free 19.8%まで構造精密化した)[3]。結晶構造において、HIF-1 α 核移行シグナル(NLS)の二箇所の領域(717-QRKRKM-722 および 751-SWKRVKG-757)が importin- α 1 の表面の溝に結合し明瞭な電子密度が観察され、importin- α 1 による HIF-1 α 核移行シグナル認識機構が原子レベルで詳細に明らかになった。これら二箇所のうち上流の配列(717-QRKRKM-722)は minor-NLS binding site に結合し、下流の配列(751-SWKRVKG-757)は major-NLS binding site に結合する。インシリコの結合エネルギー計算により、HIF-1 α 核移行シグナルを構成するアミノ酸残基のうちで特に K719, R720, K753 は importin- α 1 との結合に対するエネルギー的寄与が大きいことが示唆された。

次に本研究では、マウス importin- α 1 とヒト HIF-1 α 核移行シグナル(Δ 724-751 変異体)の複合体の結晶化にも成功し、1.9 Å 分解能で結晶構造を解いた(*R*-free 20.8%まで構造精密化した)[3]。この変異体との共結晶構造では、HIF-1 α の電子密度は importin- α 1 の major-NLS binding site にのみ観察された。すなわち、 Δ 724-751 変異により、major-NLS binding site と minor-NLS binding site の両方に同時に HIF-1 α が結合することができなくなっていた。

本研究で得られた知見は、核移行シグナルの構造機能相関の理解を深めるための基盤となるものである。

参考文献

- [1] G. L. Semenza, *Cell* **148**, 399 (2012).
- [2] J. C. Luo and M. Shibuya, *Oncogene* **20**, 1435 (2001).
- [3] Y. Matsuura and K. Miyawaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **652**, 1 (2023).

* ymatsuura@iuhw.ac.jp