Osaka University Knowledge Archive

Title	ラット肝単離核を用いた核タンパク質の核内輸送機構の解析
Author(s)	園部, 尚子
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36030
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【9】

氏名・(本籍)	園部尚子（その べ なお こ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8086 号
学位授与の日付	昭和63年3月25日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ラット肝単離核を用いた核タンパク質の核内輸送機構の解析**
論文審査委員	(主査) 教授 内田 驍 (副査) 教授 吉川 寛　教授 岡田 善雄

論文内容の要旨

［目　的］

核内で機能する核タンパク質は細胞質で合成された後，核内に選択的に輸送される。核タンパク質の核内輸送について現在（i）核膜孔を通過して核内に移行する，（ii）移行する核タンパク質には移行するためのシグナルともいうべき特定のアミノ酸配列が存在する，などが明らかにされている。又，核膜孔構成タンパク質がGlcNAcをその分子内に持つ糖タンパク質であるためGlcNAcに特異的なレクチンWGAが核タンパク質の核内輸送を阻害することが最近あきらかにされた。しかし，核移行のシグナルを核側因子の何がどのような機構で認識するのかは未だ明らかではない。本研究では，これらのことを明らかにする目的でラット肝単離核及びヌクレオプラスミンやHMG_1などの核タンパク質を用いてin vitroの実験系を組み立て，これを用いて核タンパク質の核内輸送機構の解析を行った。

［方法ならびに成績］

1．材料の調製　(a)単離核：ラット肝を0.25Mショ糖－3.3mM$CaCl_2$溶液中でホモジナイズし，3,000rpm 10分間遠心，沈査の粗核分画を終末2.3Mショ糖溶液に懸濁，19,000rpm20分間遠心沈査に核を集め，単離核として使用した。(b)ヌクレオプラスミン：Xenopus laevis未受精卵のホモジネートを19,000rpm30分間遠心して得た上清を，DEAE－Cellulose陰イオン交換樹脂，55％硫安塩析，Phenyl Sepharose CL－4B疎水性樹脂を用いて分画し，精製した。(c)Nonhistone chromosomal protein high mobility group 1（HMG_1）：ウシ胸腺クロマチンより0.35M NaClで抽出した分画をCM－Sephadex C－25陽イオン交換樹脂を用いて精製した。

2．In vitro核内輸送実験系の確立

（方　法）ヌクレオプラスミンやHMG$_1$を^{125}Ｉで放射標識し（lacto peroxidase法，比活性1.6×10^{6}cpm／ugタンパク質），これをさまざまな条件下で単離核と一定の時間インキュベーションした後，反応系から核を遠心分離し，その放射活性を調べた。

（結　果）核タンパク質が単離核へ効率よく取り込まれる至適条件は，10mM Hepes pH7.8，0.4mM ＡＴＰ，３mM ＫＨＣＯ$_3$，２mM CaCl$_2$存在下，33℃で反応させることであった。至適条件下では約２×10^{6}の単離核に対し，放射性タンパク質100,000cpmを加えてインキュベーションすると約70,000cpmの放射活性が核に集まった。この反応系からＡＴＰ，ＫＨＣＯ$_3$あるいはCaCl$_2$のいずれかを除くと核の放射活性の増加はなかった。又，反応を４℃で行うと核への集積は認められなかった。アルブミンやイムノグロブリンなどの非核タンパク質は至適条件下であっても単離核へは集まらなかった。

３．ＡＴＰの作用機序の解析。

（方　法）加水分解されないＡＴＰのアナログであるＡＭＰＰＣＰ（β，δ－methylene－adenosin 5′－triphosphate）を反応系に加えその作用を調べた。更に，反応系に加えたヌクレオチドの挙動を知るために反応させた核から0.5ＮＣＩＨＯ$_4$でヌクレオチドを抽出し，高速液体クロマトグラフィー（Toyo Soda ＤＥＡＥ－２ＳＷ）で解析した。

（結　果）ＡＭＰＰＣＰはＡＴＰと同様に核タンパク質を単離核へ結合させる作用があり，高速液体クロマトグラフィーの解析から33℃のインキュベーション中にＡＭＰＰＣＰがＫＨＣＯ$_3$とCaCl$_2$に依存して核へ結合することがわかった。更に，33℃で核とＡＭＰＰＣＰをＫＨＣＯ$_3$とCaCl$_2$存在下でインキュベーションし，あらかじめＡＭＰＰＣＰを核に結合させた後，この核と核タンパク質を反応させたところ，核タンパク質は速やかに４℃でも核に結合することが判明した。ＡＭＰＰＣＰを結合していない核には核タンパク質は結合しなかった。蛍光標識したヌクレオプラスミンを単離核と反応させ，反応後核を蛍光観察した結果，ヌクレオプラスミンと33℃で反応させた核の蛍光は核全体に均一に分布しているのに対し，ＡＭＰＰＣＰを予め結合させた核とヌクレオプラスミンを４℃で反応させた場合には蛍光が核膜上に局在することが分かった。

ＷＧＡがin vitroの反応に及ぼす影響について調べたところ，ＷＧＡはＡＴＰやＡＭＰＰＣＰの核への結合を阻害することが明らかになり，その結果ヌクレオプラスミンやＨＭＧ$_1$が核膜へ結合できなくなることが分かった。

［総　　括］

１．核タンパク質は単離核にＡＴＰや温度に依存して蓄積され，核タンパク質の核内移行は積極的な運搬機構によることが証明された。

２．加水分解されないＡＴＰのアナログであるＡＭＰＰＣＰを用いた解析から，ＡＴＰの要求がエネルギーの供給にあるのではなく，ＡＴＰ分子が核因子に結合すると核タンパク質が核膜に認識され，結合するといった分子機構が働くことが示唆された。

３．本研究で示された核タンパク質やＡＴＰの核側因子との結合が核膜孔タンパク質を認識するＷＧＡによって阻害されることから，ＡＴＰ結合タンパク質を認識する核側因子が核膜孔に存在することが示唆された。

論文の審査結果の要旨

核タンパク質の核内輸送に関与する核側の分子機構は，その解析方法に限りがあるためあまり明らかにされていない。

本研究はラット肝単離核に精製核タンパク質が効率良く核に集積されるin vitroの実験系を組み立てることに成功しており，核側因子の解析を可能にした。更に，この系を用いた解析からＮＴＰ結合タンパク質が輸送に関与していることが示唆された。

粗製の細胞質分画を含まない単純なin vitroの実験系の開発ははじめてであり，この系を用いた解析から引き出された結論も新しい知見である。非常に独創的な研究であり，医学博士の学位に価すると評価できる。