The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Loss of RCC1 leads to the suppression of nuclear protein import in living cells.
Author(s)	立花, 太郎
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3109920
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏　　名	立花太郎（たちばなたろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12351　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Loss of RCC1 leads to the suppression of nuclear protein import in living cells. （RCC1の失活により細胞内で核蛋白質輸送能は低下する）
論文審査委員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　高井　義美

論文内容の要旨

（目的）

細胞内小器官の1つである核は，遺伝情報であるDNAが存在し，DNAの複製や遺伝情報のRNAへの転写といった細胞にとって最も重要な機能を担う場所である。核が正常に機能するためには核で働く蛋白質（核蛋白質）が正確に秩序正しく核内に輸送されることが必要不可欠である。遺伝情報の維持および正確な発現は，生物が生命活動を営む上で基本となるものであり，核蛋白質輸送機構の解明は細胞の機能ひいては生命活動を理解するための重要な課題である。

すべての核蛋白質は細胞質で合成された後，その機能の場である核内へ移行する。核蛋白質の核内移行はATPを必要とする能動輸送によることが明らかになっている。低分子量GTP／GDP結合蛋白質Ranは *in vitro* 実験系を用いて核蛋白質輸送に関与することが示唆されている因子の一つであるが，その生理的役割についてはあまりよくわかっていない。RanのGDP結合型からGTP結合型への変換反応はRCC1とよばれるクロマチン結合蛋白質により促進される。

本研究では，RCC1の温度感受性変異株等の培養細胞を用い，核蛋白質輸送におけるRanの生理的役割を明らかにすることを目的とした。

（方法ならびに成績）

RCC1遺伝子に変異をもつ温度感受性変異株tsBN2細胞内では非許容温度下でRCC1蛋白質が完全に失活する。非許容温度下で，tsBN2細胞の細胞質に核蛋白質を微量注入して核蛋白質輸送効率を調べたところ，RCC1の失活に伴い，核蛋白質輸送効率が低下することがわかった。しかし，RCC1の機能が失われているにもかかわらず，核蛋白質輸送が完全に止まってはいないことから，RCC1は直接，核蛋白質輸送に関与しているのではなく，Ranを介して影響を及ぼしていると考えられた。そこでRCC1が失活した細胞にGTP結合型Ranを微量注入したところ，核蛋白質輸送能が回復した。GTPの非加水分解アナログであるGTPγSを結合させたRanを用いても輸送能は回復せず，また野性株の細胞にGTPγS結合型Ranを微量注入すると核蛋白質輸送が強く抑制されることから，核蛋白質輸送にはRanに結合したGTPの加水分解が必要であることが明らかとなった。

次に細胞融合能をもつHVJ（センダイウイルス）を用いて，非許容温度下でRCC1が失活したtsBN2細胞と野性株であるBHK細胞との融合雑種細胞を作製し，融合細胞における核蛋白質輸送能を調べた。その結果 tsBN2

細胞由来核への輸送能が回復しないばかりでなく，野性株であるＢＨＫ細胞由来核への輸送効率がかなり低下していた。このことからＲＣＣ１が失活した細胞の細胞質には核蛋白質輸送を抑制する因子が蓄積することが示唆された。ＲＣＣ１機能の欠損はＧＤＰ結合型Ranの蓄積を引き起こすので，抑制因子はＧＤＰ結合型Ranであると考えられた。そこで野性株の細胞質にＧＤＰ結合型Ranを微量注入したところ，核蛋白質の輸送効率が低下し，細胞質に存在するＧＤＰ結合型Ranが核蛋白質輸送に抑制的に働くことが確かめられた。

さらに抗Ran抗体を作製し，野性株の細胞質に微量注入したところ，核蛋白質輸送が非常に強く阻害され，Ranは核蛋白質輸送の必須因子であることがわかった。

（総括）

これまでのRanに関する研究はほとんとが*in vitro*実験系を用いたものであったが，本研究では培養細胞を用いて生理的条件下で核蛋白質輸送におけるRanの役割の解析を行った。その結果，Ranは核蛋白質輸送の必須因子であり，細胞内ではＧＤＰ結合型RanとＧＴＰ結合型Ranのバランスにより核蛋白質輸送効率が調節を受けていることが示唆された。以上のことから，これまで全く知られていなかった核蛋白質輸送の効率を制御する機構が細胞内に存在することがはじめて示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は核蛋白質輸送における低分子量ＧＤＰ／ＧＴＰ結合蛋白質Ranの役割を明らかにするためにRanのＧＤＰ／ＧＴＰ変換反応促進因子であるＲＣＣ１の温度感受性変異株等の培養細胞を用いて，細胞への微量注入や細胞融合など細胞工学的手法を駆使し，生理的条件下で解析を行った。

その結果，ＲＣＣ１の失活に伴い，細胞内の核蛋白質輸送能が低下し，また細胞質に核蛋白質輸送を抑制する因子が蓄積することを示した。さらにＧＴＰ，ＧＤＰ，GTPγSなどの各ヌクレオチド結合型Ranを用い，ＧＴＰ結合型RanのＧＴＰ加水分解反応が核蛋白質輸送に必須であり，一方，細胞質に存在するＧＤＰ結合型Ranが核蛋白質輸送効率を抑制することを明らかにした。この事はＧＤＰ結合型とＧＴＰ結合型Ranのバランスにより，核蛋白質輸送効率が調節を受けていることを示唆している。以上のことから，これまで全く知られていなかった核蛋白質輸送の効率を制御する機構が細胞内に存在することがはじめて示唆された。

上記の研究結果はこれまでほとんど明らかにされていなかった核蛋白質輸送におけるRanの生理的役割を明らかにしたのみならず，今後，この研究をもとに核蛋白質輸送効率の調節機構という新しい研究分野が展開することが予想される。よって，本研究は核蛋白質輸送機構を解明するうえで非常に価値ある業績であり，学位に値するものと考えられる。