

Title	$\beta$ -catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner
Author(s)	横屋, 史彦
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41657">https://hdl.handle.net/11094/41657</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</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	横 屋 史 彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14435 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	$\beta$ -catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner ( $\beta$ -cateninの核移行メカニズムの解明)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓  (副査) 教授 祖父江憲治 教授 高井 義美

## 論文内容の要旨

【目的】  $\beta$ -catenin は、細胞間接着分子であるカドヘリンの細胞内領域に結合する因子として同定され、細胞膜裏打ち蛋白質の構成因子の一つとして認識されていた。しかし近年、Wingless (Wg)/Wnt のシグナルに応じて  $\beta$ -catenin が核内に蓄積することが示され、核内で機能するシグナル伝達因子として注目を集めてきた。核内では Lef1 (lymphoid enhancer binding factor)/TCF (T-cell-specific factor) ファミリーと呼ばれる DNA 結合蛋白質と複合体を形成し、ターゲットとなる遺伝子の転写活性を調節することが明らかにされている。ここで、 $\beta$ -catenin のアミノ酸の一次配列上には、既知の NLS 配列が見られない。一方、 $\beta$ -catenin が結合する Lef1 は典型的な塩基性 NLS 配列が見られる。当初、Lef1/TCF を過剰発現させると内在性の  $\beta$ -catenin が核内に局在することや、ショウジョウバエにおいて TCF を過剰発現させると Wg シグナルを ON にした時と類似した反応を示すことから、 $\beta$ -catenin は細胞質で Lef1/TCF と結合し、Lef1/TCF の NLS によって核内に運ばれると考えられてきた。しかし、Lef1/TCF に結合しない  $\beta$ -catenin が核に局在したり、Lef1/TCF の細胞内の量が少ないにもかかわらず高発現した  $\beta$ -catenin が核内に蓄積することから、 $\beta$ -catenin が Lef1/TCF を介して核内に移行するかどうかは疑問であった。そこで、 $\beta$ -catenin が核へ移行するメカニズムを調べた。

【方法ならびに成績】 大腸菌で発現させた Recombinant の  $\beta$ -catenin を培養細胞の細胞質に微量注入すると速やかに核内に移行する。この核内移行は、コムギ胚レクチン WGA で阻害されるため、 $\beta$ -catenin が核膜孔の能動輸送の場である gated channel を通過して核内に移行することがわかる。これは、分子量 92kDa の  $\beta$ -catenin が、自由拡散で核膜孔を通過するには大きいことと一致する。ここで、現在同定されている importin  $\beta$  ファミリーを輸送担体とする輸送反応は全て Ran を必要とするので、 $\beta$ -catenin の核内輸送における Ran の要求性を調べた。その結果、 $\beta$ -catenin の核内移行が生きた細胞内と *in vitro* 輸送系の両方で GTPase 活性を持たない点変異 Ran (G19V Ran や Q69L Ran) によって阻害されないことと、RCC1 に、点変異を持つ tsBN2 細胞の非許容温度下において全く影響を受けないことが分かった。つまり、 $\beta$ -catenin の核内移行は Ran を必要とせず、また、これまで知られているような importin  $\beta$  ファミリー輸送担体によって運ばれて核内に移行するのではないといえる。また、*in vitro* 輸送系において、 $\beta$ -catenin の核内移行は importin  $\beta$  やそのファミリーである transportin によって競合阻害される。このことから、 $\beta$ -catenin が核膜孔を通過する際に importin  $\beta$  やそのファミリー分子が相互作用する同じ核膜

孔複合体構成因子と相互作用しながら通過すると予想される。

$\beta$ -catenin が核内に移行する様子を調べてみると、特定の輸送担体を必要とせずどの細胞においても速やかに核内に移行するよう見える。しかし、 $\beta$ -catenin は、発現しているすべての細胞で核内に蓄積しているわけではない。個体の発生過程において  $\beta$ -catenin の局所的な核内移行がアフリカツメガエル、ゼブラフィッシュなどで報告されている。アフリカツメガエルの初期発生において  $\beta$ -catenin は、その蛋白量の変動はないが胞胚期に局所的に一過性な核内への蓄積が見られる。また、大腸癌細胞において、 $\beta$ -catenin の核内の蓄積が報告されている。そこで、importin  $\beta$  とよく似た挙動で核内に移行する  $\beta$ -catenin が、核内から細胞質へ移行する可能性について検討した。培養細胞を、センダイウィルス (HVJ) で融合させ多核の細胞を作成しその細胞の 1 つの核の中に  $\beta$ -catenin を Texas Red で標識したウシ血清アルブミン (BSA) とともに微量注入した。BSA は核膜孔を通過せず核の中だけにとどまるため、注入した核の指標になる。その結果、1 つの核に注入した  $\beta$ -catenin は同じ細胞の別の核に局在するのがみられた。これは、 $\beta$ -catenin が核内から細胞質へ移行してふたたび核内に移行するためであり、この蛋白が核から細胞質へ核外移行能を持つ因子であることを示している。 $\beta$ -catenin の核外移行は、温度依存性を示し、WGA で阻害される。しかし、疎水性アミノ酸に富んだ NES (nuclear export signal) を持つタンパク質の核外輸送を阻害する物質 Leptomycin B に感受性を示さない。この結果から  $\beta$ -catenin はこれまで報告されているタンパク質の核膜輸送経路とは異なる機構で核-細胞質間をシャトルする分子であることが示唆される。

【総括】 本研究では、 $\beta$ -catenin は速やかに核内に移行すること、その核内移行は輸送担体として知られている importin  $\alpha$  や importin  $\beta$ , Ran などの細胞質因子を必要としないことを明らかにした。 $\beta$ -catenin のような重要なシグナル伝達因子が Ran による制御や輸送担体を利用せずに、それ自身が核膜孔通過能を持つ分子であることの生理的利点を考える必要がある。また、 $\beta$ -catenin が核-細胞質間をシャトルする分子であることから、 $\beta$ -catenin の核内蓄積は核内輸送と核外移行のバランスによって制御されている可能性を示唆している。

#### 論文審査の結果の要旨

$\beta$ -catenin は、Wnt/Wingless シグナルに応じて核内に移行することが示され、核内で機能する因子として注目を集めている。また、ある大腸ガン細胞や個体の発生初期において局所的に  $\beta$ -catenin が核内に蓄積する事が観察されている。これまで、 $\beta$ -catenin の核移行メカニズムは未知のままであった。

本研究では、 $\beta$ -catenin の核内外移行の解析をおこないそこで得られた結果は以下の通りである。これまでの核移行の研究において核膜を介したタンパク質の輸送には、輸送担体である importin  $\beta$  が必要であり、更に GTP-Ran の核-細胞質間の極端な濃度勾配が移行の方向性を決めている重要な要素の 1 つであると考えられている。ここで、 $\beta$ -catenin の核内移行は、輸送担体として importin  $\beta$  ファミリーや Ran の濃度勾配を利用した移行ではない事を *in vitro*, *in vivo* の実験で証明している。このことは、核タンパク質の核内移行の研究において新たな移行メカニズムが存在する可能性を示唆している。また、 $\beta$ -catenin は、核内移行する因子であるだけでなく核外移行能を持つ因子であることを示した。この知見は今後、個体の形態形成や癌における  $\beta$ -catenin の細胞内での局在の変化を考える上でたいへん重要な発見であり、医学的な臨床応用につながることを考えられる。以上の理由から本研究は博士の学位に値する。