

Title	A monoclonal antibody to the C-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells
Author(s)	檜枝, 美紀
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41694
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	檜 枝 美 紀
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14434 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	A monoclonal antibody to the C-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells (RanのC末酸性領域に対するモノクローナル抗体はRanのリサイクリング、蛋白質の核移行とともに阻害する)
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】

低分子量G蛋白質 Ran は蛋白質の細胞質から核への移行に必須である。またその過程において様々な分子と作用することが、*in vitro*での実験により示されてきた。しかしながら、細胞内において、どのような制御を受け、蛋白質の核移行を可能にしているのか明らかでない。さらに、そのC末端にはRanに特異的な酸性領域を持ちその機能が推測されてきたが、実体は不明のままである。Ranの蛋白質の核移行における役割を明らかにするためには、その機能ドメインを解析することが必須であると考え、以下の実験を行った。

【方法および結果】

Ranの機能ドメインを解析するツールとしてRanに対するモノクローナル抗体を作製した。スクリーニングはウェスタンブロットングおよび蛍光抗体像を指標として行い、1つのモノクローナル抗体を得た。この抗体のエピトープを決めるために、欠変異リコンビナントRanを作製し、ウェスタンブロットングを行った。その結果、この抗体はRanのC末酸性領域を認識することがわかった(以下この抗体をARAN1と呼ぶ)。さらに、ARAN1はGSTとRan C末(197-216)の融合リコンビナント蛋白質を免疫沈降することを確認した。

次に、リコンビナントRanおよび、蛋白質の核への輸送因子の1つであるimportin β を用いて、免疫沈降実験を行った。ARAN1は溶液中に単独で存在するRanは認識できないが、importin β の結合したRanを認識し、その複合体を免疫沈降した。さらに、importin β ファミリーに属する輸送因子であるCAS, transportinの結合した、Ranも認識した。

RanBP1 (Ran binding protein1) はRan-GTP/importin β へ結合し、複合体中のGTPの加水分解に必要であることが示唆されている。また、Ran-GDP/importin β /RanBP1複合体は核移行になんらかの機能を担っていることが示唆されている。そのため、Ran/importin β /RanBP1複合体形成に対してARAN1の影響を溶液中での結合実験で調べた。その結果、ARAN1はRan/importin β /RanBP1の3者複合体形成を阻害した。

このような性質を持つ、ARAN1を培養細胞の核へ微量注入すると速やかに細胞質に移行した。これに対して、細胞質に微量注入したものは、細胞質に留まっていた。また、ARAN1の微量注入により、Ranの局在が核から細胞質へとダイナミックに変化しており、蛋白質の細胞質から核への移行は抑制された。

【総括】

- 1) Ran の C 末酸性領域は importin β ファミリーと結合することにより, ARAN1 と結合可能となる。この結果は「Ran は importin β ファミリーと結合すると, コンフォメーション変化をおこし, その C 末酸性領域が分子表面に露出する」事を強く示唆している。
- 2) Ran の C 末に ARAN1 が結合すると, Ran/importin β /RanBP1 の複合体形成が抑制される。その C 末領域は RanBP1 との結合に必要であることを示している。
- 3) さらに, ARAN1 を用いることにより, *in vivo* において Ran は importin β ファミリーと結合した形で核から細胞質へ移行する事を示した。
- 4) また Ran の細胞質から核へのリサイクリングには Ran の C 末酸性領域が必要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

真核細胞において, 核は細胞質と核膜により区切られている。そのため, 核-細胞間では物質が能動的に輸送がされている。低分子量 G 蛋白質, Ran はこれら輸送に必須の因子である。しかし, 実際にどのようなメカニズムで機能しているのか, ほとんど明らかになっていない。

本申請者は, 低分子量 G 蛋白質 Ran に対するモノクローナル抗体を作製し, 蛋白質の核移行における Ran の機能を解析した。この結果, Ran が核-細胞質間をシャトルする事を生きた細胞で初めて明らかにした。さらに, そのシャトル蛋白質の核への移行に必須であることを示した。また, Ran は C 末に特異的な酸性領域を持つ。この抗体を用いることにより, C 末酸性領域は importin β ファミリーとの結合により, 分子表面に露出する事, さらに Ran は importin β ファミリーとの複合体として, 核から細胞質に移行することを生きた細胞内で示した。また本研究は, RanBP1 が Ran/importin β ファミリー複合体のリサイクリングに関与していることを示唆している。

以上より, 本研究は Ran の核-細胞質間物質輸送における機能を今後詳細に検討していく上で重要な知見を提供するものであり, Ran の挙動を *in vivo* で初めて示したものとして, 学位の授与に値するものと判断する。