The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Characterization of the nuclear transport of a novel leucine-rich acidic nuclear protein-like protein
Author(s)	松八重, 雅美
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41761
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【8】

氏　　名	松八重　雅　美（まつばえ　まさみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15213　号
学位授与年月日	平成12年3月24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	Characterization of the nuclear transport of a novel leucine-rich acidic nuclear protein-like protein （新規 LANP 様蛋白質の核内輸送機構の解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　田中亀代次　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

【目的】

細胞の核内で機能する蛋白質の多くは、その配列上に塩基性アミノ酸に富んだ核移行シグナル（NLS）を有する。いくつかの核蛋白質は核へ移行するときに、リン酸化等の修飾を受けた後、核へ移行することが報告されている。当研究室では、リン酸化による核蛋白質輸送活性の制御を検討するため、SV40ラージT抗原 NLS を架橋したアルブミンをゼノパス卵の細胞質に注入したところ、ゼノパス卵抽出液中に NLS 特異的にリン酸化される32kDa の蛋白質を見いだした。さらにエールリッヒ腹水癌細胞抽出液を用いて、インビトロでリン酸化アッセイを行ったところ、NLS 特異的にリン酸化を受ける蛋白質を見出した。今回、私はこの NLS 特異的にリン酸化を受ける34kDa の蛋白質を同定し、その性状を明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。

【方法ならびに成績】

(1) 34kDa 蛋白質の精製および同定

NLS 特異的にリン酸価される34kDa 蛋白質を、マウスエールリッヒ腹水癌細胞抽出液より、NLS 特異的なリン酸化を指標とし、DEAE、Hydroxyapatite、ゲルろ過のカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。2断片の部分配列を決定した後、その配列を元に EST データベースでホモロジー検索を行った結果、部分アミノ酸配列と合致するクローンを得た。それを元に6週齢マウス脳 cDNA ライブラリーより34kDa の蛋白質の cDNA をクローニングし、その一次構造を決定した。計算上の分子量が29.6kDa、260個のアミノ酸から構成される新規蛋白質であった。この蛋白質は、Matsuoka らによって同定されたLANP（leucine-rich acidic nuclear protein）と58%の相同性をもつため、mouse LANP－like large protein（mLANP－L）と名付けた。mLANP－L は LANP 同様、N末端にロイシンが多い配列を有し、C末端には酸性アミノ酸が多い配列を有する。また、その配列上には、数箇所 NLS 様配列が見られた。

(2) mLANP－L の NLS の同定

mLANP－L に相同性のある LANP が小脳プルキンエ細胞の核に局在する蛋白質であるという知見より、mLANP－L の核移行活性の可能性を検討した。その結果、生きた細胞内では実際に核内に移行することが明らかになり、その核内への移行は、温度依存性で、小麦胚芽レクチン（WGA）によって阻害を受け Ran に依存していることがわかり、自由拡散で核に移行する大きさではあるが、能動的に核に移行することが示された。そこで mLANP－L の数種類の

欠損変異体を作成し、トランスフェクション法を用いて、 mLANP－LのNLSを同定した。その結果、^{245}DKRKREがNLSとして機能することがわかった。また、この配列はすべてのLAMPファミリーに保存されていた。

(3) mLANP－Lの核移行経路

NLS領域のみ含むレコンビナント蛋白質、GST－mLANP－L NLS－GFPを調製し、マイクロインジェクション法を用いて、その核移行活性を確認した後、このNLS領域のみの蛋白質とSV40ラージT抗原のNLSのペプチドを共にマイクロインジェクションしたところ、GST－mLANP－L NLS－GFPの核移行活性が阻害されたため、SV40ラージT抗原と同じ移行経路を持つと示唆された。さらに、現在、核内輸送因子としてよく研究されているimportinα ファミリーとの結合を検討した。ネイティブ電気泳動法で展開したところ、GST－mLANP－L NLS－GFPは、importinα ファミリーのうち、Rch 1およびNPI－1と結合し、Qip 1とは結合しないことがわかった。

【総括】

1．SV40ラージT抗原のNLSによって特異的にリン酸化が促進される蛋白質mLANP－Lを精製した。その結果、小脳プルキンエ細胞の核に局在する核蛋白質であるLANPと58%の相同性を有する新規蛋白質であることがわかり、mLANP－Lと命名した。

2．さらに、mLANP－Lは能動的に核内に輸送される分子であることがわかった。^{246}KRKRがNLSとして機能することがわかった。この配列はLANPファミリー間において、よく保存された領域であり、他のLANPファミリーもこの領域を用いて、核移行することが示唆された。

3．mLANP－L NLSを含む基質の核移行がSV40ラージT抗原のNLSペプチドによって阻害されること、核内輸送因子importinα ファミリー分子とmLANP－Lとの結合することにより、mLANP－Lはimportinα／β による核移行経路によって輸送されていることが示唆された。さらにimportinα ファミリーのうち、Rch 1およびNPI－1と結合し、Qip 1とは結合しなかったことにより、mLANP－Lは輸送因子に対して特異的を持つ分子である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

核蛋白質の核内輸送機構についての研究は、importinα／β をはじめとする可溶性の輸送因子の同定や、それらの分子と核膜孔複合体構成蛋白質の関連が主に研究されてきた。しかし、それらの輸送装置が様々な生命現象との関わりの中で、どのように制御を受け、核蛋白質の核内輸送が調節されているかということは、ほとんど解明されていない。一方、Kurihara らは、SV40ラージT 抗原の核移行シグナル（NLS）のペプチド存在下で、活性化されるリン酸化酵素が存在することを示し、ある種のリン酸化が核蛋白質輸送の制御に関わっている可能性を示唆する報告を行っている。

本研究は、そのSV40ラージT 抗原のNLSのペプチド存在下で、特異的にリン酸化が促進される34kDa 蛋白質の同定および性状解析を行ったものである。この34kDa蛋白質は新規蛋白質であり、LANP（leucine-rich acidic nuclear protein）に高い相同性を有する蛋白質であったことから、mouse LANP－like large protein（mLANP－L）と名付けた。mLANP－Lは能動的に核内輸送すること、^{246}KRKRがNLSとして機能することが明らかになった。さらに、mLANP－Lがimportinα／β の移行経路で核内に移行することを明らかにし、importinα ファミリー分子中のRch 1とNPI－1に特異的に結合する核蛋白質であることを示した。

このSV40ラージT 抗原のNLSペプチド存在下で、特異的にリン酸化が促進される蛋白質の同定は初めてのことである。また、複数存在することが知られているimportinα ファミリーに属する分子が、それぞれ機能が異なる可能性を示したものであり、importinα が大きなファミリーを形成してる生物学的意義を理解する上で重要な知見と言える。

これらは今後、核蛋白質の核内輸送機構の研究に新たな方向性を提示するものと考える。よって、本研究は学位に値するものと考える。