The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-Zip) -containing transcription factor occurs through the direct interaction of importin β with HLH-Zip
Author(s)	名越, 絵美
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41780
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

【7】

氏　　名	名　越　絵　美（なごし　えみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15212　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	Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-Zip) -containing transcription factor occurs through the direct interaction of importin β with HLH-Zip （bHLH－Zipを有する転写因子SREBP－2はHLH－Zipにimportin βが結合して核内に輸送される）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　高井　義美　　教　授　平野　俊文

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

細胞内のコレステロール量を抑制する転写因子SREBP－2（sterol regulatory element-binding protein－2）は通常は2カ所の膜貫通領域を介して小胞体膜および核膜外膜に膜蛋白質として存在している。細胞内のコレステロール量が低下するとプロセッシングを受けてbHLH-Zipモチーフを有するN末端側が切り出され、これが核内に移行して、コレステロール合成系の諸酵素やLDL受容体の遺伝子の転写を活性化する。切り出されたN末端断片（成熟型SREBP－2）はコレステロールレベルに非依存的に核内に輸送されることが知られているが、既知の核移行シグナル（NLS）に類似したアミノ酸配列は持たず、どのような機構で核内に輸送されるかは全く理解されていない。

そこで本研究では、成熟型SREBP－2が細胞質から核内に輸送される機構を研究した。

【方法ならびに成績】

(1) SREBP－2の核内移行に必要な細胞内因子の同定

成熟型SREBP－2を組換え蛋白質として大腸菌体内で発現させ、精製して、培養細胞へのマイクロインジェクションと、in vitro輸送実験に供し、SREBP－2が細胞質内の可溶性の輸送因子によって能動的に核内に輸送されることを見い出した。in vitro輸送系における核内移行は、SV40T抗原のNLSを持つ基質を過剰に加えても競合阻害されなかったため、SREBP－2がT抗原型NLSの輸送機構とは異なる経路で核内に輸送されることが示唆された。T抗原型NLSはimportin α と直接結合するので、SREBP－2がimportin α と複合体を形成するかどうかをエールリッヒ細胞抽出液とGST－SREBP－2を用いたpull-down実験で調べたところ、予想通りimportin α はSREBP－2と相互作用しないことが明らかになった。

次に、GTPase活性を持たず、GTP型に固定された変異体であるG19VRan－GTPとSREBP－2を培養細胞の細胞質にco-injectionしたところ、SREBP－2の核内移行は完全に阻害された。このことは、SREBP－2がimportin β ファミリーに属する輸送因子を利用して、Ranに依存して核内に輸送される可能性を示唆している。そこでSREBP－2がimportin β ファミリーの因子と結合するかどうかを免疫沈降法で検討したところ、細胞抽出液中のimportin β がSREBP－2と供沈することが分かった。次いでリコンビナント同士の結合実験を行い、SREBP－2はimportin β と直接結合すること、SREBP－2／importin β 複合体はGTP結合型Ranによって解離することを見い出した。以上の知見に基づいて、細胞質抽出液の代わりにリコンビナントの輸送因子を用いてin vitroの輸送実

験を行い、SREBP－2の核内輸送はimportinβとRan、およびRanのGTPaseサイクルを調節する因子p10／NTF 2の存在下で再構築されることを明らかにした。

(2) SREBP－2のNLSの決定

SREBP－2の欠失変異体を数種類作成し、importinβとの結合実験を行った。これらの変異体をin vivo、in vitroの輸送実験に供し、輸送の活性を検討した。その結果、importinβはSREBP－2のHLH－Zip領域に直接結合すること、HLH－Zipが核内移行に必要十分なNLSとして機能することを見い出した。

【総括】

膜から遊離した成熟型SREBP－2がimportinαを介さずにimportinβに直接結合し、Ranに依存して核内に輸送されることを明らかにした。さらに、SREBP－2のimportinβ結合領域はHLH－Zipにあり、この領域が核内移行に必要十分なNLSとして機能することを見い出した。本研究において、2量体形成を司るモチーフとして知られているHLH－ZipがNLSとして機能する例が初めて明らかになり、NLSの多様性が示唆されると同時に、他種類のシグナルを認識できるimportinβの機能の多様性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は小胞体膜から核内へ移行する転写因子SREBP－2の核内輸送の分子機構を解析したものである。膜から遊離した成熟型のSREBP－2を大腸菌で組換え蛋白質として作製し、培養細胞へのマイクロインジェクションやin vitroの輸送系を用いて輸送因子の要求性を明らかにし、importinα／βヘテロダイマーに仲介される輸送経路とは異なる機構で輸送されることを見い出した。SREBP－2を輸送する因子を同定するために、結合実験や免疫沈降法を行い、SREBP－2はimportinβと直接結合することを明らかにした。さらにリコンビナントの輸送因子を用いたin vitroの輸送実験を行い、importinβがSREBP－2がimportinαのようなアダプターを介さずに直接結合し、Ranのサイクルに依存して核内に輸送することを明らかにした。また、SREBP－2の欠失変異体を作製して、HLH－ZipがimportinβのNLSとして機能していることを示した。

以上のように、本研究は蛋白質の核内輸送機構全般に関する理解に貢献するとともに、転写因子の活性化機構においても重要な知見を示しており、学位の授与に値すると考えられる。