

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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	名 越 絵 美
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importin β とRan、およびRanのGTPaseサイクルを調節する因子p10/NTF2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、importin β 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、importin β 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importin α を介さずにimportin β 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importin β 結合領域はHLH-Zipにあり、この領域が核内移行に必要な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importin β 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、importin α/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importin β 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、importin β がSREBP-2がimportin α 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importin β の結合領域であり、同時に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。