



Title	Ran-unassisted Nuclear Migration of a 97-kD Component of Nuclear Pore-targeting Complex
Author(s)	小瀬, 真吾
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41824
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	小 瀬 眞 吾
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 2 1 1 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	Ran-unassisted Nuclear Migration of a 97-kD Component of Nuclear Pore-targeting Complex (核膜孔ターゲティング複合体を構成する97kD 因子の Ran 非依存的核内移行)
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】

核内で機能する蛋白質は、その分子内に、核局在化シグナル (nuclear localization signal : NLS) として機能するアミノ酸配列をもつ。しかし、それらのシグナルが、どのような分子により認識され、どのような分子機構で核内に移行するかは不明であった。私達は、NLSを認識し、核蛋白質を核膜孔 (nuclear pore complex : NPC) に移行させる複合体を同定し、その遺伝子をクローニングした。この複合体は、importin α/β と呼ばれる2つの因子からなっている。リコンビナント蛋白質を用いた解析から、NLSはimportin α により認識されることが判った。また、importin β は、NLSとは結合せず、importin α と NPC 構成因子の両方に結合することにより、核蛋白質を NPC に移行させる分子であることが判った。しかし、この NLS を含む複合体がどのような分子機構で NPC を通過するかは、ほとんど判っていない。そこで、本研究では、importin β の機能について、生化学的、細胞生物学的方法を用いて、NPC 通過機構の解析を行った。

【方法ならびに成績】

importin β は876アミノ酸からなり、NLS受容体である importin α と NPC 構成因子、並びに低分子量G蛋白質 Ran と結合する。そこで、importin β の欠失変異体を用いて、その結合領域の同定を試みた。リコンビナント蛋白質を用いた結合実験から、450から876番目のアミノ酸領域で importin α と、1から449番目のアミノ酸領域で GTP 型の Ran と結合した。また、ジグトニンを用いた in vitro 核蛋白質輸送系における NPC への移行活性から、145から449番目の領域が、NPC 構成因子との結合領域であることが判った。

間接蛍光抗体法により、importin β の細胞内局在を調べると、細胞質、核膜、及び核質に存在していた。そこで、HA や GFP を tag として持つリコンビナント importin β 蛋白質を、培養細胞にインジェクションし、その局在を観察した。細胞質にインジェクション後、30分以内に、importin β は速やかに核内に移行した。この核内移行活性が、どのような分子との相互作用が必要かを調べる為、いろいろな importin β 欠失変異体の核内移行活性も同様にして解析した。その結果、importin β の核内移行活性は、この分子の importin α や Ran との結合領域は必要とせず、NPC 構成因子との結合領域に依存していることが判った。

これらの結果を、さらに in vitro 核蛋白質輸送系を用いて解析した。核蛋白質の核内移行には、importin α/β や Ran などの可溶性因子を必要とするのに対し、importin β 自身の核内移行には、他の可溶性因子を必要としなかつ

た。また、この importin β の核内移行活性は、in vivo のデータと同様、この分子の NPC 結合領域に依存した。

以上の結果から、importin β 分子は、この分子単独で核内移行活性をもち、その活性は、NPC 構成因子との直接的な相互作用によるものと考えられる。さらに、in vitro 核蛋白質輸送系において、Ran を加えなくても importin β は核内移行すること、並びに、Ran との結合活性を欠いた変異体でも核内移行活性を有することから、importin β 自身の核内移行に Ran は必要としないことが判明した。

【総括】

本研究では、核蛋白質輸送機構を分子レベルで理解するために、核膜孔ターゲティング複合体構成因子のひとつである importin β の解析を行った。その結果、1) importin β は、その分子内に、核蛋白質輸送に関与する分子である importin α 、Ran、並びに NPC 構成因子とそれぞれ結合する 3 つの機能領域を持つこと、2) importin β 分子自身が、核内移行活性を持ち、その活性は NPC 構成因子との結合領域が必要十分であること、3) importin β の NPC 通過反応に Ran は必要でないこと、を明らかにした。以上の結果は、当時予想されていた NPC 通過過程における Ran の必要性を否定するものであり、importin β 分子そのものに NPC 通過能があることを示している。

最近、様々な輸送経路において、輸送担体として機能する importin β に相同性のある分子が次々と同定されている。これらの分子もまた、NPC 通過能をもつことから、この NPC 通過能は、輸送担体として機能する importin β ファミリー分子の共通の性質であることが判ってきた。今後、これらの importin β ファミリー分子の NPC 通過機構を解析することにより、核蛋白質輸送における NPC 通過機構がさらに解明されていくと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、核蛋白質輸送担体として機能する蛋白質 importin β の核膜孔通過機構の解析を行ったものである。

これまで、核蛋白質の核膜孔通過過程には、低分子量 G 蛋白質 Ran の作用が必要と考えられてきたが、その詳細な分子機構は全く不明であった。しかし、本研究における importin β の核膜孔通過の解析から、importin β 分子自身に単独で核膜孔を通過する活性があることが判った。さらに、この核膜孔通過活性は、importin β 内の核膜孔構成因子との結合領域に依存し、importin α や Ran の結合領域は必要としなかった。これらの結果は、核蛋白質輸送における核膜孔通過過程が、importin β の核膜孔通過活性によるものであり、低分子量 G 蛋白質 Ran の必要性を否定するものである。

以上より、本研究は、核蛋白質輸送機構の解明に大きく寄与するものであり、学位の授与に値すると思われる。