OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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、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

【6】

氏名	小瀬真吾
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 15211 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、ジギトニンを用いた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っ

た。また、このimportinβ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、importinβ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importinβ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、importinβ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importinβの解析を行った。その結果、1）importinβは、その分子内に、核蛋白質輸送に関与する分子であるimportinα、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）importinβ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）importinβ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、importinβ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importinβ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importinβ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importinβ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importinβ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importinβの核膜孔通過の解析から、importinβ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、importinβ内の核膜孔構成因子との結合領域に依存し、importinα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、importinβ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考えられる。