Osaka University Knowledge Archive

Title	Differential Modes of Nuclear Localization Signal (NLS) Recognition by Three Distinct Classes of NLS Receptors
Author(s)	宮本, 洋一
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42572
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【7】

氏　　名	宮本洋一（みやもと よういち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16014　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Differential Modes of Nuclear Localization Signal (NLS) Recognition by Three Distinct Classes of NLS Receptors （3種の核移行シグナル受容体分子は異なる基質特異性を示す）
論文審査委員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　近藤　寿人　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

【目的】

核で働く蛋白質の多くが、その分子内に核へ移行するためのシグナル「核移行シグナル」(Nuclear Localization Signal : NLS)」を有している。核蛋白質はこのNLSを認識する分子（importin－α）と核膜孔への結合能をもつ分子（importin－β）との3者の複合体：核膜孔ターゲティング複合体（nuclear pore-targeting complex : PTAC）を形成して細胞質から核膜孔まで運ばれる。Importin－αは生物種を超えて保存されていること、酵母では1種類しか見つかっていないがヒトやマウスなど哺乳類では細胞中に少なくとも2種類（Rag cohort 1 : Rch 1／PTAC58、nucleoprotein interactor 1 : NPI－1）存在していることが分かっている。

近年、東北大学の榎本らのグループにより、大腸菌RecQLのヒトホモログであるDNAhelicaseQ 1に結合する分子として、HeLa細胞cDNAライブラリーよりDNAhelicaseQ 1 interacting protein 1 : Qip 1と呼ばれる因子がクローニングされた。Qip 1はその分子内にimportin－α分子に特徴的なアルマジロ構造を有し、Rch 1／PTAC58やNPI－1のいずれに対してもアミノ酸レベルで約50%の相同性を示す分子であった。そこで私はこのQip 1がNLS受容体活性をもつ第三番目のimportin－α分子であるかどうかを検討し、さらに各importin－αは異なる複数のNLSに対して認識特異性を示すのかを知ることを目的とした。

【方法ならびに成績】

(1)まずQip 1がRch 1／PTAC58やNPI－1と同様にNLS結合活性があるかどうかを検討するため、大腸菌からレコンビナント蛋白質を精製し、helicaseQ 1のNLSをはじめとする数種の代表的NLS（SV40T－NLS、helicase Q 1－NLS、nucleoprasmin－NLS、cap binding protein 80－NLS）との結合実験を行った。その結果、Rch 1／PTAC58やNPI－1は調べた限り活性あるすべてのNLSに効率良く結合したが、Qip 1はhelicaseQ 1のNLSとその上流19アミノ酸配列を有する基質にのみ非常に強い結合活性を示した。また、SV40T抗原のNLSにそれ自身の上流配列を付加した基質に対してはほとんど結合しなかったが、T抗原のNLSにhelicase Q 1のNLS上流配列を付加した基質に対しては非常に強い結合活性を示した。

(2)次に、界面活性剤であるジギトニンで培養細胞を処理した*in vitro*核蛋白質輸送系を用いてQip 1の基質輸送活性を調べた。その結果、Rch 1／PTAC58やNPI－1は活性あるすべてのNLS基質を効率良く核へ輸送する一方、Qip 1はhelicaseQ 1の上流配列を持つNLS基質のみを輸送することがわかった。この実験結果は上記(1)で

の生化学的な結合実験の結果と一致した。以上の結果、Qip 1 は NLS を認識するために helicaseQ 1 の NLS 上流配列を必要とする新しいタイプの importin－α であることが明らかとなった。

(3)最後に *in vitro* assay 系で見られた NLS 結合能が、細胞内においても同様に発揮されているのかどうかを検討した。HeLa 細胞粗抽出液を使って各 NLS 基質に結合してくる内在性の importin－α を Western blotting で調べた。その結果、内在性の NPI－1 は SV40T 抗原の NLS に対する結合活性が極端に減少していた。この結果は、レコンビナント蛋白質を用いた生化学的な NLS 結合実験や *in vitro* assay 系でみられた結果とは一致しないことになる。これらの結果は、細胞中では importin－α がその分子内に本来持っている NLS 結合活性がなんらかの形で制御されている可能性があることを示唆している。

【総括】

本研究では、酵母で 1 種類しか見つかっていない importin－α が、ヒト由来の細胞中には少なくとも 3 種類存在していることを明らかにした。また、新たに見つかった Qip 1 の NLS 認識には、DNAhelicaseQ 1 の NLS 上流配列が必要であることが明らかとなり、この分子がこれまでにない新しいタイプの NLS 受容体であることを示した。さらに、細胞中では importin－α 自身が持つ NLS 結合活性が制御されている可能性があり、生体における核蛋白質の核内移行は、importin－α の輸送基質に対する認識特異性とその認識制御機構によって調節されている可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、核－細胞質間蛋白質輸送機構の主要構成因子である importin－α 分子群に着目し、様々な核移行シグナルに対する認識特異性の解析とその細胞内制御機構へアプローチしたはじめての研究である。

今回新たに報告された Qip 1 は、これまで解析されていた 2 種類の importin－α（Rch 1／PTAC58や NPI－1）とは基質認識に関して全く異なり、極めて基質特異性の高い分子であることを証明した。そして、マウスやヒトといった哺乳類の 1 個の細胞中に、少なくとも 3 種類の importin－α が共存し、各々が核移行シグナルへの異なる認識特異性を示すことを生化学的、細胞生物学的手法を駆使して明らかにした。

さらに、細胞中では importin－α 自身が持つ核移行シグナルへの結合活性が抑制されている可能性があり、生体における核蛋白質の核内移行は、importin－α の輸送基質に対する認識特異性とその認識制御機構によって調節されている可能性を示唆した点は、核－細胞質間の蛋白質輸送機構が非常に複雑なバランスのもとに構成されていることを示す有用な情報を提供する意義深い研究である。

以上の点から、本研究は学位の授与に値すると考えられる。