

Title	Nucleocytoplasmic transport of proteins and poly(A)+ RNA in reconstituted Tpr-less nuclei in living mammalian cells
Author(s)	柴田, 理志
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43759
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	柴田 理志
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16802 号
学位授与年月日	平成14年3月25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	Nucleocytoplasmic transport of proteins and poly (A) ⁺ RNA in reconstituted Tpr-less nuclei in living mammalian cells (核膜孔複合体相互作用蛋白質 Tpr 消失核における核-細胞質間物質輸送)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓 (副査) 教授 高井 義美 教授 田中亀代次

論文内容の要旨

【目的】

真核生物では核と細胞質は核膜により隔てられており核-細胞質間の物質輸送は核膜孔複合体 (Nuclear Pore Complex: NPC) を介して行われている。細胞質から核に移行する蛋白質の多くは核移行シグナル (Nuclear Localization Signal: NLS) を、核から細胞質に移行する蛋白質の多くは核外移行シグナル (Nuclear Export Signal: NES) を有しており、これらのシグナルが輸送蛋白質により認識され核内、核外に運ばれることが知られている。また、核内で転写された RNA も NPC を介して核外へ輸送されることが知られている。近年では pre-mRNA のスプライシング反応が mRNA の核外輸送効率を上昇することが明らかとなり、核内での pre-mRNA の修飾反応等が mRNA 核外輸送と深く関係していることが分かってきた。

Tpr (Translocated Promoter Region) は NPC から核内に向かったのびるフィラメント構造を構成している 270 kDa の核蛋白質である。Tpr の機能はその構造・局在等から核-細胞質間の物質輸送や核内で起る様々な反応に関与していると考えられているがその詳細は明らかではない。私は生きた培養細胞の核から Tpr を除去することに成功し、その Tpr 消失核を用いた実験により、Tpr の機能の一端を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法ならびに成績】

Tpr 消失核の作成は、Tpr を特異的に認識するポリクローナル抗体を分裂間期の培養細胞の細胞質に注入し分裂期を経過させることで可能となった。

(1) まず Tpr 消失核の核内膜・NPC 蛋白質の局在に異常が無いかを核膜の裏打ち蛋白質である LaminA/C に対する抗体や NPC に対する抗体を用いて蛍光抗体法で観察した。その結果 LaminA/C や NPC の局在に異常は認められなかった。

(2) 次に Tpr 消失核に蛋白質の核内・核外輸送活性があるかを調べた。培養細胞の細胞質に Tpr に対するポリクローナル抗体を注入し分裂期を経過させた後、SV40T 抗原の NLS を含むレポーター蛋白質を細胞質に、HIV Rev 蛋白質の NES を含むレポーター蛋白質を核に注入し、これらのレポーター蛋白質の核内・核外移行活性を観察した。その結果 NLS を含むレポーター蛋白質は核に、NES を含むレポーター蛋白質は細胞質に移行していることが明らかとなり、Tpr 消失核では蛋白質の核-細胞質間輸送に異常は認められなかった。

(3) 次に Tpr 消失核の mRNA 核外輸送活性を調べるために poly (A)⁺ RNA の局在を oligo-dT 50mer プローブを用いた In Situ ハイブリダイゼーションで観察した。その結果 Tpr 消失核に poly (A)⁺ RNA が蓄積していることが明らかとなった。

(4) 最後に pre-mRNA スプライシング因子 SC35 の Tpr 消失核における局在を調べた。SC35 は多くのスプライシング因子が存在するスプライソソーム等のスペクル状構造体に局在化していることが知られている。Tpr 消失核では SC35 スペクルは大きくなりその数の減少が観られた。この様な SC35 スペクルの形態変化は細胞を転写阻害剤等で処理することで観察される。そこで転写活性の指標となる BrUTP の取込みを Tpr 消失核で観察した。その結果、Tpr 消失核では BrUTP が取り込まれていることが明らかとなり Tpr 消失核で観られた SC35 スペクルの形態変化は転写活性の低下により引き起こされたのではないことが分かった。

【総括】

Tpr 消失核では核内膜蛋白質や NPC の局在、蛋白質の核-細胞質間輸送には異常が認められなかったことから核内膜や NPC に機能構造上の大きな変化は無いことが分かった。一方、Tpr 消失核では poly (A)⁺ RNA が蓄積しており、さらに転写活性を失うことなく SC35 の形態変化を引き起こしていたことから、Tpr の機能は、mRNA 核外輸送やスプライシング反応等を含む核内 mRNA ダイナミズムに関与していることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は細胞核の核膜孔複合体から核質内に向かって伸びるフィラメント様構造体に含まれる蛋白質 Tpr に着目し、核内のフィラメントが核の機能にいかに関与しているかを生細胞で解析した研究である。

今回、Tpr に対するポリクローナル抗体を作製し、これらの抗体を生細胞に注入することで細胞核から Tpr を除去することに成功しており、Tpr の細胞核からの消失が細胞の機能に及ぼす影響を生きた哺乳動物細胞内で探った初めての研究である。

また、本研究は Tpr の消失した細胞核を用いて蛋白質や RNA の核-細胞質間輸送活性や核の機能構造体の局在変化を調べることで、Tpr の機能が mRNA のスプライシングや核内輸送等の mRNA 核内ダイナミズムに関係していることを明らかにした。

現在までにこのような核内フィラメントの機能はあまり明らかに成っておらずその機能の一端を明らかにしたことは細胞核の機能研究に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。