The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin α
Author(s)	古田, 満衣子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45439
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

【5】

氏　　名	古　田　満衣子（ふるた　まいこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　18911　号
学位授与年月日	平成16年4月15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	Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin α （熱ショック応答で誘導されるimportin αの挙動変化：核内リテンションとリサイクリングの抑制）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　内山　安男　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

〔目　　的〕

近年、核－細胞質間の情報交換の重要性が認識され、核膜を介したタンパク質輸送機構の分子レベルでの解析は、セミインタクト細胞を用いたin vitro核タンパク質輸送実験系の開発に伴って急速に進んでいる。現在、多細胞生物では20種類以上の輸送担体importin βの存在が示唆されている。さらにそのアダプター分子importin αが少なくとも7種類存在する。生物がこのように多種多様な輸送経路をもつことは、各々の輸送経路に役割分担をさせることで、異なる組織や環境におかれた細胞が適応性を高めることを可能にしているのではないかと考えられる。しかしながら、細胞のおかれたさまざまな環境変化に応答して機能変化する核－細胞質間輸送経路を同定しようとする研究は、これまでにほとんど行われていない。ストレスといった環境変化に応答した核－細胞質間輸送機構の解明は、生物が多種多様な輸送経路をもつことの生理的意義について理解するのにも有用であると考える。このため本研究では、環境変化の一つの代表的な例として熱ショック応答をとりあげ、熱ショック時と正常時に機能変化する輸送経路や輸送因子を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

〔方法ならびに成績〕

まず最初に熱ショック時と正常時に機能する核－細胞質間輸送機構に違いがあるかを知るため、複数の輸送基質を細胞内にマイクロインジェクションして各々の輸送効率を調べた。その結果、分子シャペロンhsc70（hsc70：70 kDa heat shock cognate protein）は熱ショック時に強い核内移行活性を示すのに対して、正常時には強い核内移行活性をもつ塩基性核局在化シグナル（塩基性NLS：nuclear localization signal）をもつタンパク質が、熱ショック時にその核内移行活性が低下することを見いだした。このことから、熱ショック時には、正常時とは異なる核－細胞質間輸送制御機構が機能している可能性が考えられ、塩基性NLSの輸送因子に何らかの変化がある可能性が示唆された。

正常時と熱ショック時で塩基性NLSの輸送因子にどのような違いがあるかを知るため、内在性輸送因子の細胞内局在を調べた。間接蛍光抗体法から、正常時には塩基性NLSのアダプター分子importin αの大部分が細胞質に局在するのに対して、熱ショック時には強く核に集積することがわかった。また生化学とcytologicalな細胞分画実験では、

importin αが正常時の細胞内では可溶性であるのにたいして、熱ショック時にはDNase Iや高塩濃度存在下でも抽出されないことがわかった。このことから、熱ショック時には importin αが核内に集積し、核内構造に強く結合することが示唆された。これに対して importin β、importin αの核外輸送担体CAS、低分子量GTPase Ranの局在には大きな変化は見られなかった。

GFP-importin α（GFP：green fluorescent protein）を細胞内にマイクロインジェクションして、fluorescence loss in photobleaching (FLIP)と fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)を用いて生細胞で importin αの動態を解析した。その結果、熱ショック時に importin αが核内構造に結合して動きにくいこと、リサイクリング効率が低下することがわかった。これらのことから、熱ショック時に塩基性 NLS の核内移行活性が低下する１つの原因は、importin αが核内構造に結合してリサイクリングが抑制されるためであることがわかった。

〔総　　括〕

様々なストレスによって細胞はダメージを受け、その状態を生き抜くため細胞内生理は大きく変動する。熱ショック応答系は、非常に強力な遺伝子制御系を備えていることが知られており、転写をはじめとするゲノム機能が大きく変動する。また、熱ショック応答時には細胞周期が一過的に休止することが知られている。転写因子や細胞周期制御因子のいくつかはimportin α/β輸送経路によって核内移行し、その局在によって機能制御されていることが知られている。本研究から、熱ショックに応答して importin α/β輸送経路の核内輸送活性が抑制されること、importin αの挙動変化がその一因であることがわかった。importin α/β輸送経路の活性低下は熱ショック応答時の細胞周期停止や遺伝子発現制御に寄与することが推察される。熱ショック時には様々なタンパク質が局在を変えることが知られており、他にも様々な核－細胞質間輸送経路が正常時とは異なる制御をうけている可能性が考えられる。熱ショック時における核－細胞質間輸送制御が、環境変化に適応するための細胞の新たな制御系の一端を担うことを意味する。

論文審査の結果の要旨

本研究では、正常時と熱ショック時に機能変化する核－細胞質間輸送因子の解析を行っている。正常時に核に局在しないストレスタンパク質が、熱ショック時に効率良く核に集積すること、正常時に機能する importin α/β輸送経路が熱ショック時に抑制されることをみいだした。輸送因子の１つである importin αが熱ショック時に核に集積して核内構造に強く結合すること、また核内構造に結合した importin αの動きが顕著に低下してリサイクリングが抑制されることが明らかになった。importin αの挙動変化が、熱ショック時に importin α/β輸送活性の低下を引き起こすと考えられる。これは核－細胞質間輸送制御が、細胞の環境変化に適応するための制御系の一端を担うという新たな発見であり、学位に値するものと考える。