

Title	Importin 4 Is Responsible for Ligand-independent Nuclear Translocation of Vitamin D Receptor.
Author(s)	宮内, 芳輝
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46225">https://hdl.handle.net/11094/46225</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	宮内芳輝
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19921 号
学位授与年月日	平成 18 年 2 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Importin 4 Is Responsible for Ligand-independent Nuclear Translocation of Vitamin D Receptor. (Importin 4 がビタミン D 受容体のリガンド非依存性核移行を担っている。)
論文審査委員	(主査) 教授 大菌 恵一  (副査) 教授 岡本 光弘 教授 吉川 秀樹

#### 論文内容の要旨

##### 〔目的〕

核内受容体の一つであるビタミン D 受容体 (VDR) は、カルシウム代謝をはじめとする多くの生理現象に関わりがあると同時に、それらの異常を伴う病態に対する創薬標的として重要である。VDR が種々の生理現象を制御する際に転写因子として機能することから、本研究は転写制御を行う以前に必須となる核内への移行の分子機構の解明を目的として行われた。

##### 〔方法ならびに成績〕

本研究を行うにあたって、組換え VDR を用いた *in vitro* nuclear transport assay を確立し以降の解析に供した。全長の VDR である VDR[a.a.4-427]は、核移行活性の供与体である細胞質画分の存在下で核移行すること、およびリガンドである 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> は核移行に影響を与えないことを観察した。一方細胞質画分の非存在下ではリガンドの有無に関わらず VDR[a.a.4-427]は核移行しなかった。また VDR の C 端側および N 端側を欠損した組換え変異体、GST-VDR[a.a.4-232]および GST-VDR[a.a.91-427]を用いて同様にアッセイを行ったところ、GST-VDR[a.a.4-232]は VDR[a.a.4-427]と同様に核移行することを観察したが、GST-VDR[a.a.91-427]は細胞質画分とリガンドの存在下でのみ核移行した。さらに VDR[a.a.4-427]および GST-VDR[a.a.91-427]にリガンド結合喪失型変異である R274A を導入して比較検討したところ、この変異は VDR[a.a.4-427]の核移行に影響を与えなかったのに対し、VDR[a.a.91-427]のリガンド存在下での核移行を完全に抑制することを観察した。以上の結果から、VDR の核移行にはその N 末端領域 (a.a.4-232) に細胞質画分に存在する分子が相互作用することが必要であると考えられたため、この領域をベイトにした yeast two-hybrid screening を実施した。ヒト腎 cDNA ライブラリーを探索したところ、importin β-like family のひとつである importin 4 の C 末端 (a.a.824-1081) をコードする cDNA 断片をクローニングした。Mammalian two-hybrid assay によっても VDR と importin 4 は相互作用することが確認され、またリガンドは相互作用に影響を与えないことも示された。GST-VDR[a.a.4-427]を用いた *in vitro* binding assay でも importin 4 がリガンドの有無に関わらず VDR に相互作用することが確認され、他方 importin β は VDR と相互作用しないことも示された。また同じく *in vitro* binding assay により、VDR の DNA-binding domain と importin 4 の C 末端領域が相互

作用していることも示された。そこで組換え importin 4 を調製し、*in vitro* nuclear transport assay により VDR の核移行を再構成することを試みた。その結果、Ran-GDP および NTF2 の存在下で VDR[a.a.4-427]は組換え importin 4 によりリガンド非依存性に核へ輸送されることが示された。同様に GST-VDR[a.a.4-232]および R274A 変異を持つ VDR[a.a.4-427]が importin 4 により輸送されることも確認された。他方 importin  $\beta$  および importin  $\alpha/\beta$  は VDR を核へ輸送することができなかった。さらに生細胞中での VDR の局在を検討したところ、リガンド非存在下で GFP-VDR[a.a.4-427]は核優位な細胞内局在を示したのに対し、importin 4 相互作用領域を欠いた GFP-VDR[a.a.81-427]は細胞全体に均等に分布し、明らかに核への局在化が減退していることを観察した。

〔総括〕

組換え VDR を用いた *in vitro* nuclear transport assay により、VDR の核移行の分子機構を解析した。VDR の核移行にはリガンドに影響されない経路（非依存性経路）およびリガンド存在下で作動する経路（依存性経路）の二経路が存在することが示され、また両者が独立した経路であることが強く示唆された。VDR と相互作用する分子の探索から importin 4 が見出され、相互作用がリガンド非依存性であること、組換え importin 4 が VDR を核へ輸送することが明らかとなり、VDR のリガンド非依存性核移行を実行する分子が importin 4 であることが証明された。リガンド非存在下で VDR が強く核局在化することから、その際の VDR の核での機能について興味を持たれる。またリガンドによる核局在化の制御の観点から、リガンド依存性経路の分子機構の解明が次の課題だと思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

核内受容体の一つであるビタミン D 受容体 (VDR) は、カルシウム恒常性の維持をはじめ多くの生理現象に関与する重要な分子である。VDR の実体は転写因子であり核移行がその機能にとって必須となることから、本研究は VDR の核移行の分子機構を解明することを目的として行われた。その結果 VDR の核移行について、何らかの細胞質性因子を必要とすること、またリガンド非依存性経路とリガンド依存性経路が存在することを明らかにした。さらに VDR の核移行を制御する因子を yeast two-hybrid 法により探索し、核-細胞質間分子輸送担体である importin 4 が VDR に相互作用することを見出した。組換え蛋白質を用いた再構成実験により、importin 4 は VDR をリガンド非依存性に核移行させることが証明された。本研究は VDR の核移行を詳細に解析しその基盤をなす分子の同定に成功したもので、学位の授与に値すると考えられる。