

Title	Importin α transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin β
Author(s)	小寺, 一平
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46229
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名 小 寺 一 平

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19703 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 4 月 28 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 Importin α transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin β
(Importin α は CaMKIV を importin β 非依存的に核内へ輸送する)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 米 田 悦 啓

(副査)

教 授 近 藤 寿 人 教 授 田 中 亀 代 次

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) は細胞核内でカルシウム依存的に cAMP-responsive element binding protein (CREB) の 133 番目のリジンリン酸化する酵素であり、LTP や LTD 等の神経ネットワークの高次機能と細胞内での分子機能との関係を直接的に示す数少ない遺伝子の一つである。CaMKIV は、細胞質で Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) によるリン酸化を受けて活性化し、核内へ移行して CREB をリン酸化することで、シナプス/細胞質から核内への情報伝達を担うと考えられている。しかし情報伝達の物理的なプロセス、すなわち CaMKIV の細胞質から核内への移行は、様々な実験的試みにも関わらず未解明のままであった。そこで、この酵素の核内移行の分子メカニズムを解明し、神経回路の高次機能における CaMKIV の役割と生理的意義に迫ろうと考えた。

〔 方法ならびに成績 〕

CaMKIV の輸送機構の基本的性質を解明するため、リコンビナント CaMKIV を哺乳動物細胞の細胞質へ微量注入した。その結果、CaMKIV の核内移行は、classical 輸送と比較して有意に遅いが、WGA の同時注入により阻害される事が明らかになった。このことから、CaMKIV の核内移行は classical 輸送経路以外の能動輸送であることが示唆された。

細胞をジギトニン処理して細胞質の可溶性因子を洗い流し、様々なリコンビナントタンパク質を添加して輸送基質の局在を追跡することで classical 輸送のメカニズムが解明されてきた。この方法を応用して CaMKIV の輸送因子を探索したところ、importin β と積荷タンパク質との間のアダプター分子と考えられてきた importin α が、単独で CaMKIV を核内へ輸送していることが示唆された。さらに importin β への結合部位を欠損した importin α (importin α - Δ IBB) も同様に CaMKIV を核内へ輸送することから、微量に残留している内在性の importin β の関与も否定された。また、importin β や classical NLS (cNLS) ペプチドの添加により importin α 単独による CaMKIV の核内輸送が阻害された。最近の報告で、cNLS ペプチドは importin α の単独核内移行を阻害することが

明らかになっており、importin α 単独による CaMKIV の核内輸送と、importin α の単独核内移行は同様の分子メカニズムであることが示唆された。

リコンビナントタンパク質の溶液中の結合実験では、CaMKIV は importin α の C 末端領域に直接結合したが、CaMKIV は importin α/β との三量複合体を形成しなかった。また、importin β の過剰添加により CaMKIV と importin α の相互作用が阻害された。これらの結果は、ジギトニン処理した細胞における核内輸送の実験結果と一致する。すなわち、CaMKIV は importin α 単独によって輸送されるが、importin β は importin α と CaMKIV との相互作用を阻害するため、importin α による CaMKIV の輸送を阻害すると推察された。

importin α - Δ IBB は classical 輸送に対し dominant negative に作用するため、importin α - Δ IBB と classical NLS を細胞質に同時微量注入すると classical NLS の核内移行は阻害される。しかし importin α - Δ IBB と CaMKIV の同時微量注入では CaMKIV の核内移行は阻害されず、逆に CaMKIV の核内移行速度が有意に促進された。この結果は、*in vivo* においても importin α が単独で CaMKIV を核内に輸送することを強く示唆した。

[総 括]

これらの結果から、CaMKIV の核内移行は importin α 単独によって輸送されていることを示した。これは、importin α が単独で積荷タンパク質を核内に輸送する最初の実例であり、また CaMKIV の核内移行の分子メカニズムを明らかにした初めての報告である。

論文審査の結果の要旨

本研究では、カルシウム・カルモジュリン依存的タンパク質リン酸化酵素である CaMKIV の核内移行に着目し、CaMKIV の核内移行メカニズムについて解明を試みた。申請者は、セミインタクト細胞および生細胞を用いた実験から、これまでアダプター分子と考えられてきた importin α が単独で CaMKIV を核内へ輸送することを示した。これは、タンパク質核内輸送において importin β と Ran の絶対的な必要性を覆す重要な発見である。また、このような importin β 非依存的な新しい経路が CaMKIV 以外の基質においても存在する可能性があり、核-細胞質間タンパク質輸送の多様性を考える上でも重要である。さらに、神経細胞のシナプスから核へ至るシグナル伝達経路において、これまで全く未知であった CaMKIV の核内移行を明らかにしたことで、CaMKIV のシグナル分子としての役割と生理的意義の解明につながることを期待される。以上のような理由から、申請者の研究は博士（医学）の学位に値すると認められる。