The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	転写調節因子myocardinの核内移行制御
Author(s)	中村, 誠志
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49776
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

【14】

氏　　名	中　村　誠　志（なかむらせいし）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２２８３６　号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**転写調節因子 myocardin の核内移行制御**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　矢谷　博文 （副査） 教　授　上﨑　善規　　准教授　小川　裕三　　准教授　松本　　憲

論　文　内　容　の　要　旨

[目的]

転写調節因子 myocardin (Mycd)は serum response factor (SRF)に依存した平滑筋細胞遺伝子の転写活性を促進し，平滑筋細胞分化において重要な役割を果たす．細胞内において Mycd は核に局在するが，Mycd の核内移行のメカニズムは依然不明である．Olson らは basic domain を欠失させた Mycd が細胞質に局在することから，Mycd が核に局在するには basic domain が必要であると結論づけたが，彼らの解析に用いた Mycd は N 末 128 アミノ酸を欠いたものであった．本研究では Mycd 全長を用いて Mycd のどの領域が核局在制御に重要であるか解析を行った．

核局在化シグナル (nuclear localization signal ; NLS)をもつ蛋白質は，分子量に関係なく細胞質から核内へ移行できる．最初に同定された NLS は PKKKRKV といった塩基性アミノ酸に富んだ配列からなり, このような NLS は classical NLS (cNLS)と呼ばれている．cNLS の核内輸送は輸送担体 importin α と β の相互作用によることが知られている．

Mycd が塩基性アミノ酸に富んだ領域である basic domain を有することから, Mycd の核内移行は basic domain を介した importin α / β の相互作用により制御されている可能性が推測される．本研究はこの観点から, Mycd の核内移行のメカニズムを解明することを目的として解析を行った．

[方法]

Mycd の N 末 128 アミノ酸の領域にも basic domain が存在することから，それを N terminal basic domain (NB) (98aa-103aa)とし，また，Olson らが解析した領域を central basic domain (CB) (243aa -260aa)とした．

Mycd 全長の N 末端に FLAG-tag を導入した発現ベクターFLAG-Mycd を構築し，この FLAG-Mycd から以下の変異体を構築した：すなわち，1) N 末 128 アミノ酸を欠失させた ΔN128，2) NB を欠失させた ΔNB, 3) NB を置換変異させた mNB，4) CB を欠失させた ΔCB，さらにそれらを組み合わせた 5) ΔN128ΔCB，6) ΔNBΔCB および 7) mNBΔCB の 7 種類の変異体である．COS7 細胞にこれらの発現ベクターを発現させ，抗 FLAG 抗体を用いた免疫細胞染色法により細胞内局在を検討した．

次に，内在性 importin β 1 を siRNA によりノックダウンした NIH3T3 細胞に FLAG-Mycd を発現させ，免疫細胞染色法により細胞内における Mycd の局在を解析した．

さらに, FLAG-Mycd, HA-importin α 1 および importin β 1 を in vitro translation により合成し，免疫沈降法によりこれらの蛋白質間の結合を検討した．

[結果]

COS7 細胞において，ΔN128 よりも ΔN128ΔCB の方が細胞質に局在する細胞が増加したことから，CB に関する Olson らの解析結果が支持された．FLAG-Mycd および ΔCB が核に局在するのに対し，ΔNB および mNB は細胞質に局在し，ΔNBΔCB および mNBΔCB はさらに多くの細胞で細胞質に局在した．

NIH3T3 細胞において，内在性 importin β 1 の発現をノックダウンすることにより，FLAG-Mycd は細胞質に局在した．

さらに，*in vitro* における結合実験より，FLAG-Mycd，HA-importin α 1 およ

び importin β 1 では３者による複合体が形成されたのに対し，FLAG-Mycd mNB ΔCB ではこの複合体形成が抑制された．

[考察]

COS7 細胞を用いた免疫細胞染色の結果より，Mycd の basic domain のうち，特に NB の方が NLS として働き，Mycd が核内移行することが示唆された．NB のこの機能についての報告は今までになされていない．CB は NB がない時に NLS としての機能をもつと考えられ，2 つの basic domain に優先順位があることがはじめて示された．

NIH3T3 細胞での importin β 1 のノックダウンの結果より，Mycd の核内移行に importin β 1 が関与していることが示唆された．

さらに，*in vitro* における結合実験の結果より，Mycd, importin α 1 および importin β 1 は 3 者複合体を形成し，その複合体形成には basic domain (特に NB) が必要であることが示された．

以上のことから，Mycd の核内移行制御は Mycd の basic domain のうち特に NB が主体となって NLS として機能し，importin α / β に依存した核内移行制御を受けている可能性が示唆された．

論文審査の結果の要旨

本研究は，平滑筋細胞分化において重要な転写調節因子である myocardin(Mycd) の核内移行のメカニズムの解明を試みたものである．

その結果，Mycd の核局在化シグナルとして機能する basic domain には優先順位があり，今回新たに発見した N 末にある basic domain が特に強く Mycd の核内移行に関与していることが明らかとなった．さらに，Mycd の核内輸送は importin α 1/ β 1 の相互作用により核内に輸送される可能性が示された．

以上の結果は，平滑筋組織の再生に有用であり，博士（歯学）の学位取得に値するものと認める．