The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Retinoblastoma Binding Protein 4-Regulated Classical Nuclear Transport Is Involved in Cellular Senescence
Author(s)	辻井, 聡
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55803
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	辻井　聡
論文題名 Title	Retinoblastoma Binding Protein 4-Regulated Classical Nuclear Transport Is Involved in Cellular Senescence　（RBBP4による核-細胞質間輸送制御と細胞老化との関連）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

核タンパク質は細胞質で合成されたのち、核膜上の核膜孔を通って核内へと輸送されることで、初めて機能を発揮できる。タンパク質の核輸送には様々な経路が存在するが、その中でもimportinα/β依存的な経路が最もよく研究されている。importinαは核タンパク質の核局在化シグナル（NLS）を認識・結合し、さらに輸送担体であるimportinβと三者複合体を形成して核膜孔を通過する。核内では、GTP結合型Ranの作用によりimportinαとimportinβが解離し、さらに核タンパク質とimportinαが解離することで、核輸送のプロセスが完了する。興味深いことに、我々が新規importinα結合タンパク質としてプロテオーム解析により同定したヒストン結合タンパク質Retinoblastoma Binding Protein 4(RBBP4)には、塩基性アミノ酸クラスターで構成されるNLS様の配列が存在しないことが分かった。そこで、両者の結合様式や生理的意義について詳細に検討した。また、両者ともに細胞老化のプロセスで発現量が減少することが近年報告されていることから、その細胞老化との関連についても検討を加えた。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず実際にimportinαとRBBP4が結合することを、GST pull-down assayやimmunoprecipitation assayにより確認した。次に*in vitro* transport assayを用いてRBBP4の核輸送にimportinαが関わっているか検討した。その結果、細胞質画分溶液を用いたassayではRBBP4の核移行が確認されたにも関わらず、importinα/βの輸送因子のみを加えたassayにおいては核移行を認めなかった。この結果は、RBBP4がimportinα/β以外の輸送経路で核へと運ばれていることを示すと同時に、importinαとRBBP4の結合が、通常の“輸送因子と輸送基質”の関係ではないことを示唆している。そこで、両者の結合部位を同定するため、変異体を用いた結合実験を行った。その結果、RBBP4がimportinαのN末端に存在するimportinβ binding (IBB)ドメインに結合することを突き止めた。このIBBドメインに結合するタンパク質はこれまでimportinβ以外には知られていないことから、RBBP4－importinα間の結合がimportinα－importinβ間の相互作用や核輸送にどのように影響するのかを検討した。まずIBBドメインにあらかじめimportinβを結合させた後に、核内に存在するRan-GTPを加えると、過去の報告通りIBBドメイン－importinβ間の相互作用が減少することを確認した。つぎに、同様の状況でRan-GTPに加えてRBBP4を加えるとIBBドメイン－importinβ間の結合がさらに弱くなることが分かった。つまり、核内に存在するRBBP4がRan-GTPと協調的に働く事で、importinαとimportinβの解離のステップを促進していると考えられた。さらに、実際にRBBP4をノックダウンした細胞では、importinα/β依存的な核輸送の効率が低下することを、*in vitro* transport assayを用いて確認した。

次に、得られた知見と細胞老化との関連を明らかにするために、ヒト線維芽細胞TIG-1細胞を用いた実験を行った。まず、TIG-1細胞の老化過程においてもRBBP4の発現量が減少することを確認した。また、TIG-1細胞のRBBP4をノックダウンすることで、老化マーカーとして知られるSA β-gal陽性細胞の増加やp21、p53、p16の発現上昇を認め、細胞老化が誘導されることを確認した。細胞老化とともに核輸送能自体が低下するという報告が散見されることから、実際に老化細胞におけるimportinα/β依存的核輸送の効率をmicroinjection assayを用いて確認した。その結果、TIG-1細胞の老化に伴い、輸送効率が低下することを確認した。以上のことから、核輸送制御因子であるRBBP4の発現量が減少することにより、importinα/β依存的な核輸送効率の低下が起こり、細胞老化が誘導されたと考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

RBBP4がimportinαのIBBドメインに結合すること、そして核輸送制御因子としてimportinα/β依存的な核輸送において機能することを突き止めた。さらにRBBP4の発現をノックダウンすると、核輸送効率の低下、および細胞老化の誘導が起きることを明らかにした。実際に、老化した細胞ではRBBP4発現量の減少、核輸送効率の低下が起きることから、細胞老化を誘導する要因として“核輸送能の低下”が存在することを強く示唆する結果と考える。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）		辻井　聡	
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	吉森　保
	副　査	大阪大学教授	菊池　章
	副　査	大阪大学教授	原口　彰宏

論文審査の結果の要旨

本論文は、核-細胞質間輸送と細胞老化との関連について新たな知見を報告するものである。
核-細胞質間輸送については、importin α/β経路がもっともよく知られているが、このimportinαのIBBドメインに結合する新規タンパク質としてRetinoblastoma binding protein 4 (RBBP4)を発見した。RBBP4はRan-GTP依存的にimportinα1とβ1の解離を促進する作用をもっていることを突き止め、このRBBP4遺伝子のノックダウンにより核輸送効率が低下することも発見した。さらにRBBP4遺伝子単独のノックダウンにより正常線維芽細胞（TIG-1細胞）が老化誘導されることを見出し、この結果は核輸送効率の低下が誘因の1つになっていることを示した。
審査では、in silico modelについても参照し、IBBドメインとimportinβ1の結合様式と、Ran-GTP、RBBP4の作用についての説明を加えた。RBBP4のクロマチン制御に関わる側面についても検討した上で、RBBP4ノックダウンの細胞老化誘導が核輸送効率低下に起因していることを論理的に示しており、本論文は学位に値するものと認める。