

氏名	ばんばちさ 馬場千紗
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第29号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究科統合生命科学専攻
学位論文題目	細胞分裂期における低分子量 GTPase Ran の機能解析

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 石川 冬木 教授 米原 伸

論文内容の要旨

Ran は Ras スーパーファミリータンパク質の一つである低分子量 GTPase であり、多細胞動物や酵母で広く保存されている。他の GTPase と同様に Ran には GTP 結合型 (RanGTP) と GDP 結合型 (RanGDP) が存在し、guanine nucleotide exchange factor である RCC1 と Ran GTPase activating protein である RanGAP によって Ran の GTP 結合と GDP 結合が制御される。これらの Ran 活性制御因子は RCC1 は核内、RanGAP は細胞質、という際立った細胞内局在をしており、このため RanGTP は主に核に、RanGDP は主に細胞質に局在すると考えられている。核細胞質間物質の輸送において輸送シグナル受容体である Importin β ファミリーに属する分子は RanGTP と RanGDP に対する親和性が異なっており、Ran は間期細胞において核細胞質間物質の輸送の方向の決定因子であることが知られている。近年になって、アフリカツメガエルの卵母細胞抽出液等を用いた *in vitro* 実験で細胞質基質中、あるいは染色体の周辺において、Ran が微小管重合や紡錘体形成、核膜形成を促進する機能をもつことが示された。その後、この Ran の新しい機能について Importin β が Ran の下流因子として紡錘体形成を制御し、核細胞質間輸送と同様のメカニズムが採用されているのではないかと、やはり *in vitro* 系で得られた結果をまとめた報告もあった。しかしながら、実際の Ran の機能について知るためには *in vivo* での解析が不可欠である。そこで申請者は線虫 *C. elegans* の初期胚において RNAi を用いて Ran や Ran 活性制御因子の機能を解析した。まず NLS (核内移行シグナル) を有するタンパク質の核への局在が Ran, RCC1 および RanGAP それぞれの RNAi による欠失体で消失し、Ran およびその活性制御因子がタンパク質の核内輸送に機能することを見出した。次に Ran の RNAi 初期胚で、紡錘糸上での染色体の配向が著しく異常になることを見出した。RCC1 と RanGAP の RNAi 初期胚でも同様の表現型が見られた。また野生型胚で、Ran が核膜崩壊後中期から後期にかけて姉妹染色体の動原体に局在することを見出した。これらの結果から Ran が紡錘体と動原体の相互作用に関与し染色体の正常な配向に必要であることを示した。また Ran の RNAi 初期胚で核膜形成が正常に起こらないこと、また野生型胚で Ran が間期において核膜に局在し、終期において核膜へ再局在することを示し、Ran が M 期終期における核膜再形成に必要であることが示した。RanGTP-RanGDP サイクルの下流因子として、RanGTP と結合する RanBD (Ran Binding Domain) をもつ一連の RanBPs (Ran Binding Proteins) が存在することが知られている。線虫においては RanBD, FXFG リピートおよび FG リピートをもち nucleoporin である RanBP2 が存在する。申請者は線虫 RanBP2 の M 期における機能についても解析を行い、RanBP2 の RNAi 胚で紡錘糸上での染色体の配向が著しく異常になり、また核膜形成が正常に起らなくなることを見出した。これらの結果から、RanBP2 が Ran の下流因子として染色体の配向、核膜形成に機能することを示した。

論文審査の結果の要旨

Ran は Ras スーパーファミリータンパク質のひとつである低分子量 GTPase であり、多細胞生物や酵母で広く保存されている。Ran は核細胞質間物質輸送において輸送の方向を決定する因子であることがよく知られている、近年では *in vitro*

系において Ran が微小管重合や紡錘体形成を促進する、あるいは核膜形成を促進するといったことが報告されており、Ran が細胞分裂期においても機能を持つことが示唆されていた。Ran の nucleotide exchange factor として RCC1, GTPase activating protein として RanGAP が存在し、また Ran の下流因子として RanBD (Ran Binding Domain) を持つ一連の RanBPs (Ran Binding Proteins) が存在することが報告されている。申請者は線虫 *C. elegans* において RNA 干渉法 (RNAi) が確立され、目的遺伝子を knock down できること、および線虫の初期胚細胞分裂の分裂系譜が詳細に知られていることに着目し、Ran の生体内での実際の機能を解析した。本論文においてまず、申請者は線虫においても Ran や Ran 活性制御因子が多種のオーソログ遺伝子と保存されていることを見だし、NLS (核内移行シグナル) タンパク質の核内輸送が Ran サイクルに制御されていることを示した。これは生体内で Ran サイクルが物質輸送を制御していることを初めて示した成果である。次に申請者は Ran, RCC1, および RanGAP を RNAi で knock down させたとき初期胚細胞分裂において染色体の配向の異常、その結果として生じる染色体の不均衡分配が生じることを示した。また Ran を knock down させたとき核膜形成に異常が生じることを示した。次に Ran が metaphase, anaphase において動原体に局在することを示し、Ran サイクルが動原体と紡錘糸との相互作用を介して染色体の正常な配向を制御していることを明らかにした。さらに Ran が間期において核膜に局在し、telophase において核膜に再局在することを示し、Ran が核膜形成を制御していることを明らかにした。また申請者は線虫 RanBP2 オーソログ遺伝子を同定し、RanBP2 についても RNAi によって解析を行い、RanBP2 が Ran の下流因子として染色体の配向、核膜形成を制御していることを示した。これらの結果は Ran が生体内で染色体の正常な配向、核膜形成を制御し、RanBP2 がその制御に関与することを明らかにした成果である。

以上のように、本論文で述べられた成果は非常に重要であり、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認められる。さらに、平成17年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問の結果、合格と認めた。