

氏 名	わた なべ み な 渡 邊 未 奈
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2542 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	タンパク質の細胞内局在を制御するシグナル配列の同定とその分子メカニズム

論文調査委員 (主 査)
教授 西 田 栄 介 教授 永 田 和 宏 教授 七 田 芳 則

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物では、核-細胞質間の分子の移動は核膜孔複合体 (nuclear pore complex; NPC) を介して行われる。約 40kDa 以下の分子は NPC を自由に拡散移動することができるが、それ以上の大きさの分子は核移行シグナル (nuclear localization signal; NLS) 配列や核外移行シグナル配列 (nuclear export signal; NES) に依存し、それらの配列を認識する受容体タンパク質、レセプターとスモール G プロテイン Ran の介在により NPC を通過し輸送される。これまでさまざまなタンパク質において NLS 配列や NES 配列が見出されており、細胞内においてそれぞれのタンパク質が時間的・空間的に正しく機能するには、それらのシグナル配列が重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。

本論文において、まず第 1 章では TGF- β スーパーファミリー (細胞の増殖制御や分化およびアポトーシスなどに関与する分泌因子) のシグナル伝達において、その細胞内伝達因子として中枢の機能を担うことが知られている Smad4 の細胞質局在が、NES 依存的な核外移行により規定されることが示唆された。NES 依存的な核外移行の阻害剤である leptomycin B (LMB) で処理すると、Smad4 は核に蓄積することを見出した。Smad4 の分子内に NES 様の配列を見出し、この配列に相当するペプチドを結合させたオブアルブミンを核にインジェクションすると核外に移行した。この NES を破壊した Smad4 のリコンビナントタンパク質は核外移行せず、さらに細胞に発現させると核局在を示した。これらの結果から、Smad4 の細胞質局在は NES 依存的な、核外移行により規定されていることを明らかにした。さらに、Smad4 の NES 配列は TGF- β のシグナルを正しく伝達する上で、生理的にも重要な意義を持つことが示唆された。

第 2 章においては、進化的に保存され mRNA の輸送に関与することが示唆されている hRAE1 (出芽酵母 Gle2 のヒトホモログ) の細胞内局在を解析したところ、hRAE1 タンパク質は 8 アミノ酸残基からなる新規の疎水性核移行シグナル配列によって、その細胞内局在 (核局在) が規定されていることを明らかにした。8 アミノ酸残基内のイソロイシンやフェニルアラニンなどの疎水性残基をアラニンに置換した変異型の hRAE1 を培養細胞に発現させると、その細胞内局在は核から細胞質に変わることから、これらの疎水性アミノ酸残基が hRAE1 タンパク質の核局在を規定していることを示した。また *in vitro* での実験から、この hRAE1 の疎水性核移行シグナル配列の輸送機構は、エネルギーやトランスポーターに依存せず、核膜孔複合体と直接相互作用して核移行する可能性が示唆され、古典的な塩基性アミノ酸残基に富む NLS の核移行機構とは全く異なる新規の輸送機構であることが明らかとなった。また、hRAE1 の核移行シグナル配列と似た配列が Bub3 タンパク質にも存在し、Bub3 の細胞内局在はその核移行シグナル配列によって規定されていることが示された。さらに、I κ B と β -catenin においても疎水性アミノ酸残基に富む配列が核移行シグナルとして機能し、それぞれのタンパク質の細胞内局在を規定していることが示唆された。これらの結果から、疎水性アミノ酸残基に富む配列が核移行シグナルとして機能することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の核-細胞質間輸送は、細胞内シグナル伝達機構の新たな局面として最近その重要性が注目されている。Smadファミリーは、TGF- β スーパーファミリーの細胞内でのシグナル伝達を担う重要な因子であることがこれまでの研究により明らかにされてきたが、Smadの細胞内局在を司る制御機構あるいは核-細胞質間輸送について、その重要性が示唆されていたにも関わらず、その分子メカニズムは不明であった。申請者はさまざまな分子細胞生物学的手法により、TGF- β のシグナル伝達において中心的な役割を果たすSmad4がNES依存的に核外移行することを明らかにした。このことは、TGF- β シグナリングにおけるSmad4の細胞内局在の制御機構を明らかにした初めての例であり、非常に価値が高いと考えられる。

次に申請者は、進化的に保存され、mRNAの核外輸送に関与することが示唆されているhRAE1の細胞内局在の解析を行い、hRAE1が8アミノ酸残基からなる疎水性アミノ酸残基に富む新規の核移行シグナル配列によって、その細胞内局在が規定されていることを明らかにした。マイクロインジェクションによる*in vivo*での実験系と、セミインタクト細胞を用いた*in vitro*での輸送実験から、hRAE1の核移行シグナル配列がレセプターを必要としない、SV40ラージT抗原などに見られる塩基性アミノ酸に富む古典的なNLSとは異なる輸送経路で核移行することを明らかにした。このことは、タンパク質の核輸送機構の新たな局面を示した例であり、今後の核輸送機構の研究の進展において貢献するところが大きい。これまで、核タンパク質や核・細胞質間を行き来するシャトリングタンパク質などで、古典的なNLS配列を持たないものが数多く存在するが、この新規疎水性アミノ酸配列の同定により、タンパク質の細胞内局在や輸送機構を知るヒントにもなりうると考えられ、価値が高い。

さらに申請者は、hRAE1以外にも、疎水性アミノ酸残基に富む配列が、核移行シグナルとして機能しうることをI κ Bや β -cateninなどのタンパク質においても見出し、疎水性アミノ酸配列が、核外移行シグナル(NES)あるいは核移行シグナルとして全く別の機能を果たすことを明らかにし、今後のタンパク質の輸送機構の解析に大いに貢献するものと考えられる。

以上本申請論文は、タンパク質の細胞内局在の制御機構とその分子メカニズムについて解析を行ったものであり、博士(理学)の学位論文として十分に価値あるものとして認められる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認められた。