

氏名	和田 淳 ^{あつし}
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第1989号
学位授与の日付	平成10年5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	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	アクチンの核外移行

(主査)

論文調査委員 教授 西田栄介 教授 永田和宏 教授 米原 伸

論文内容の要旨

アクチンは真核細胞に普遍的に存在する、細胞質分裂や細胞の運動、形態変化、構造維持などに必須のタンパク質である。真核細胞には高濃度のアクチンが存在し、重合-脱重合の動的平衡を示していると考えられている。単量体のアクチン(Mr=42kDa)の多くは、サイモシン(Mr=5kDa)やプロフィリン(Mr=16kDa)のような低分子量アクチン結合タンパク質と、複合体を形成していると考えられている。これらの複合体は、拡散で核膜孔を通過しうる大きさであるにもかかわらず、アクチンは通常は主に細胞質に分布する。アクチンの細胞質中の局在制御については、これまでにいくつかの報告がある。しかしこれまで、アクチンが、核ではなくおもに細胞質に局在する理由について検討した報告はなかった。

本論文で申請者はまず、アクチンの細胞質局在を規定する何らかの機構がある可能性を考えた。この観点からアクチンの一次配列を見直し、分子の中央付近に2カ所、核外移行シグナル配列(nuclear export signal, NES)と考えられる配列があることに気づいた。これら二つの配列は、NESの機能に重要な疎水性残基の間隔が、PKI α やMAPKKなどの典型的なNES配列と完全に一致しており、また酵母からヒトまで、進化的にも完全に保存されていた。これらの配列のペプチドを合成し、オボアルブミンと結合して細胞の核へ微量注入すると核外へと移行すること、またこの核外移行が、NES依存的な核外移行の特異的阻害剤であるレプトマイシンB(LMB)によって阻害されることから、申請者は、これらの配列がNESとして働きうることを示した。

そこで、アクチン分子が実際にNES依存的に細胞質局在するかどうかを検討した。単量体アクチンを細胞の核へ顕微注入したところ、核外へと移行することが示された。顕微注入したアクチンの核外移行はLMBによって阻害された。細胞をLMB処理すると、内在性アクチンが核へ局在するようになった。NES変異アクチンを作成し、培養細胞内で過剰発現させたところ、二つのNES配列のうち一方だけに変異のあるアクチンは弱く、両方に変異のあるアクチンは強く核に局在した。以上の結果から、申請者は、アクチンがNESによって細胞質局在を規定されていることを、はじめて明らかにした。

次に申請者は、アクチンが核外移行し、NESを失ったアクチンは核に局在するという今回の結果から、アクチンが細胞質-核間を往復している可能性を考えた。まず熱ショックによるアクチンの核移行に対するLMBの影響を検討したところ、LMBによるアクチンの核移行の増大が見られたことから、熱ショック条件下でアクチンが細胞質-核間を往復していることが示唆された。次に、通常の生育条件下でアクチンが細胞質-核間を往復している可能性を検討するために、抗HA抗体とHAタグを付加したアクチンのプラスミドを、培養細胞の核内に微量注入する実験を行った。この仮説が正しければ、細胞質で合成されたHA-アクチンが核内で抗HA抗体と結合し、抗HA抗体を核外へ移行させるはずである。実験の結果、抗HA抗体の核外移行が観察されたので、アクチンが細胞質-核間を往復していることが示された。

以上、本研究で申請者は、アクチンに進化的に保存された核外移行シグナル配列があることを見だし、(1)アクチンが核外移行シグナル(NES)によって細胞質局在を規定されており、(2)アクチンが細胞質-核間を往復している、ということを示した。

論文審査の結果の要旨

すべての真核細胞の生存に必須の細胞骨格タンパク質であるアクチンは、細胞質分裂や細胞の運動、形態変化、構造維持など、細胞質で重要な役割を果たしている。真核細胞には高濃度のアクチンが存在し、その大部分は細胞質に分布する。アクチンの細胞質中の局在制御については、これまでにいくつかの報告があるが、アクチンが、核ではなくおもに細胞質に局在する理由については、これまでまったく検討されていなかった。

申請者はまず、アクチンの細胞質局在を規定する何らかの機構がある可能性を考え、アクチン分子の中央付近に2カ所、核外移行シグナル配列 (nuclearexport signal, NES) と考えられる配列があることに気づいた。これら二つの配列は、NESの機能に重要な疎水性残基の間隔が典型的なNES配列と完全に一致しており、また進化的にも完全に保存されていることがわかった。これらの配列のペプチドを合成し、オボアルブミンと結合して細胞の核へ微量注入すると核外へと移行すること、またこの核外移行が、NES依存的な核外移行の特異的阻害剤であるレプトマイシンB (LMB) によって阻害されることから、申請者は、これらの配列がNESとして働きうることを示した。

また申請者は、アクチン分子が実際にNES依存的に細胞質局在するかどうかを検討した。単量体アクチンの細胞核への顕微注入実験から、アクチンが核外移行することを示した。このアクチンの核外移行はLMBによって阻害された。また、細胞をLMB処理すると、内在性アクチンが核へ局在するようになった。さらに、NES変異アクチンを作成し、培養細胞内で過剰発現させたところ、二つのNES配列のうち一方だけに変異のあるアクチンは弱く、両方に変異のあるアクチンは強く核に局在した。以上の結果から、申請者は、アクチンがNESによって細胞質局在を規定されていることを、はじめて明らかにした。

アクチンはこれまで、細胞質にあることが当たり前だと考えられ、その細胞質局在の理由についてまったく注意されてこなかった。それにもかかわらず申請者は、アクチンの細胞質局在が何らかの機構によるものだと気づき、アクチンが自身のNESにより細胞質局在を規定されていることを見いだした。この発見はきわめて独創的である。また、アクチンという細胞内でもっとも多量に存在する細胞骨格タンパク質の一つにNESが発見されたことは、NESの普遍的意義を改めて認識させるという点でも重要であると思われる。

さらに申請者は、アクチンが細胞質-核間を往復している可能性を考え、熱ショック条件下、および通常の生育条件下で、アクチンが細胞質-核間を往復していることをはじめて示した。この発見は、これまで細胞質のみで働いていると思われてきたアクチンが、核内で機能する可能性を示唆するものであり、今後のアクチンとアクチン結合タンパク質の研究に新たな視点を与えるという点でも重要であると思われる。

以上、本申請論文は、アクチンが進化的に保存された核外移行シグナル配列 (NES) によって細胞質局在を規定されており、アクチンが細胞質-核間を往復している、という新しい概念を提示したものであり、博士 (理学) の学位論文として十分な価値の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、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認められた。