

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	大塚 正太郎
論文題目	インポーションベータと核膜孔複合体の相互作用の一分子解析		
(論文内容の要旨)			
真核生物において、遺伝子発現やシグナル伝達、細胞周期進行などの細胞の様々な機能には、核と細胞質の間の選択的な物質輸送は不可欠である。核と細胞質は核膜によって隔てられており、核膜上に存在する核膜孔複合体（NPC）が核－細胞質間の物質輸送を媒介している。過去十年以上にわたり、NPCの構造解析や輸送に関わる因子の同定、機能解析が進められてきたが、インポーションβに代表される輸送因子がどのようにNPCと相互作用しながら核内外に移行するのかについては依然不明のままであった。本研究においては、インポーションβのNPC通過の分子メカニズムを解明するために、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた一分子測定技術をインポーションβとNPCの相互作用力測定に応用し、その作用様式の詳細な解析を行った。 NPCを構成するサブユニット（ヌクレオポリン）を大腸菌で発現、精製した後ガラス基板上に吸着させ、GSTタグ付きインポーションβを取り付けたAFMカンチレバーを用いて、インポーションβとヌクレオポリン間の結合力をピコニュートン(pN)のオーダーで計測するシステムを立ち上げた。インポーションβの点突然変異体や異なるヌクレオポリンを用いて計測を行ったところ、インポーションβの4つのヌクレオポリン結合部位は、異なるヌクレオポリンに対しそれぞれ異なる結合特性を示し、輸送制御因子であるRanGTPがインポーションβに結合した際には、4つのうち2つのポケットが不活化された。AFMによる形状イメージングと一分子力測定を組み合わせ、インポーションβと基板上に展開した核膜との相互作用解析を行ったところ、NPCの細胞質側との結合は~40 pNで解離したのに対し、NPCの核質側との結合は~30 pNと~50 pNで解離した。また、RanGTP結合型のインポーションβは、非結合型に比べ、NPCの核質側に対して低い結合力を示した。これらの成果は他の従来の相互作用解析法では得られないものである。 以上の結果から、インポーションβは複数の結合部位を介してNPCと弱く相互作用することで迅速な輸送を実現していること、またインポーションβの輸送方向性はRanGTPが複数の結合部位を選択的に不活化することで制御されていること、が示唆された。本成果は、NPCを介した物質輸送の分子メカニズムの解明にむけ、非常に意義深い知見であると考えている。			

(論文審査の結果の要旨)

核膜上に存在する核膜孔複合体(NPC)は、核 - 細胞質間の物質輸送を制御しており、細胞機能に重要な役割を果たしている。40kDa以上のタンパク質はNPCを受動拡散で通過することはできず、インポーター β に代表される輸送因子の助けをかりてNPCを通過し核内外へ能動輸送される。これまで、インポーター β がどのようにNPCの構成因子であるヌクレオポリンと相互作用しながらNPCを通過するのか、といった基本的な問題は未解決のままであった。その原因の一つとして、インポーター β はヌクレオポリンとの結合部位を複数個有するので、これまで行われてきた結合実験の結果は複数個のFG結合部位とヌクレオポリンの相互作用の総和されたものであったことが挙げられる。

本研究において大塚氏は、インポーター β とヌクレオポリンの相互作用を、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて一分子レベルで測定することにより、従来の相互作用解析では不明瞭であった、インポーター β の個々のヌクレオポリン結合部位について解析を行うことに成功した。その結果、(1) インポーター β の4つの結合部位は30 pNという比較的弱い力でヌクレオポリンと相互作用すること、(2) 各結合部位は異なるヌクレオポリンに対してそれぞれ異なる結合特性を持つこと、(3) 各結合部位は輸送制御因子であるRanGTPにより異なる影響を受けること、が明らかとなった。また、アフリカツメガエルのお母細胞から摘出した核膜を基板に吸着させ同様の一分子力計測を行い、核膜上のNPCとの測定においてもRanGTPによる影響が見られることが確認された。

先行研究により、インポーター β はNPCを一秒あたり約100個通過することが知られていたが、いかにこのような迅速な輸送を実現しているかは不明であった。大塚氏が明らかにしたインポーター β の個々のヌクレオポリン結合部位の結合特性の結果から、インポーター β は複数の結合部位を介して弱くヌクレオポリンと相互作用することでNPCを迅速に通過し、またRanGTPが選択的にインポーター β の結合部位を不活化することでその輸送を制御している、ということが示唆された。このように、本研究から得られた成果はNPCを介した物質輸送の分子メカニズムの解明に大きく貢献するものであった。

以上から、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た。

平成23年1月26日、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た。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日