

氏名	小此木 孝仁		
学位（専攻分野）	博士（理学）		
学位記番号	総研大甲第 863 号		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	生命科学研究科 遺伝学専攻 学位規則第 6 条第 1 項該当		
学位論文題目	平面核膜再構築系の開発により明らかになった細胞質・核間輸送の非対称性		
論文審査員	主査	教授	嶋本 伸雄
		教授	廣瀬 進
		教授	吉森 保
		助教授	仁木 宏典
		教授	石島 秋彦（名古屋大学）

論文内容の要旨

細胞質-核間輸送において核膜孔を自由拡散で通過できない巨大な分子(40kDa以上)は、細胞質または核内にある輸送担体と結合し、核膜孔のゲートを通過することができる。細胞には輸送基質の持つそれぞれの特異的シグナル配列を認識する可溶性受容体が核内輸送、核外輸送に合わせてそれぞれ存在するが、核膜孔通過においてその方向性を決めているキープクターは small GTPase である Ran が担っている。これら細胞質-核間輸送の機構の解明には、セミインタクト細胞を用いた観察系が大きく貢献してきた。セミインタクト細胞を用いた assay 系はジキトニンという界面活性剤を用い細胞質膜に小さい穴をあけた細胞に、外部から細胞質-核間輸送を見たい成分を含む溶液を加えその様子を観察する方法である。しかし、このセミインタクト細胞を用いた観察系では、核内の溶液を自由に変えることが困難であった。今回核膜以外の要素を極力除き、核内外の溶液を自由に変えることができる新しい in vitro assay 系を構築するために核膜の再構築を試みた

核内外の溶液を自由に変えることができるようにするために、核膜を溶液が自由に浸透できる直方体のアガロースゲルの片側一面にのみ再構築し、核膜に対して左右に核内外が配置されるように設計した。核膜の再構築は、glutathione-beads 表面に核膜を再構築する方法を応用して、アガロース切片の表面に平面状に核膜を再構築させた。アガロース切片にグルタチオンを化学架橋し、そのグルタチオン-アガロース切片を上下からカバーガラスで挟み込み切片の左右両側に流路を設けた。このときに片側の流路に GST 融合タンパク質として発現させた Ran を固定し、*Xenopus* 卵抽出液を流し込むことでアガロース切片の片側のみに平面状の核膜を再構成させた。

グルタチオン-アガロース切片上に核膜が構築されていることを、脂質の染色と、核膜孔複合体と相互作用する蛋白質の結合から確認した。さらに、IgG-Cy3 を用いて漏れがほとんどないことから、平面状に核膜が途切れることなく構築していることを確認することができた。また、高感度蛍光顕微鏡を用いて平面核膜上の GFP-importin β と結合した単一核膜孔像の輝点像を得ることができた。セミインタクト HeLa 細胞の核膜とほぼ同じ密度で平面核膜上に核膜孔が存在していた。

平面核膜に細胞質-核間輸送活性があることを確認するため核内輸送を行なった。核内を洗わない条件での核内輸送 assay では、輸送基質 MBP-NLS-GFP の核側での蛍光強度の増加が見られ、核膜 $1\mu\text{m}^2$ あたり 2.3 ± 0.3 分子/s の核内輸送がなされ、核膜孔の輸送活性が細胞の核に比べ遜色ない値が得られた。

平面核膜が核内輸送活性を持つことが確認されたので、核内輸送速度と RanGTP 濃度について生化学的に解析した。当研究室で開発した新しい *in vitro* assay 系を用いることで核側の RanGTP 濃度をさまざまに変えることができ、今回初めて直接的に核内輸送速度と RanGTP 濃度の関連について測定することに成功した。輸送基質核内輸送速度は RanGTP 濃度依存的に増加が見られた。

次に、溶液中に RanGTP を必要とせず単独に核膜孔を通過する β -catenin あるいは importin α に関し、核内移行と核外移行を比較した。今回構築した *in vitro* assay 系に、 β -catenin あるいは importin α 単独を細胞質側に加えた時の核内移行、また核側に加えた時の核外移行を観察した。コントロールとして、核膜孔と相互作用せず自由拡散で通過できる GFP は、細胞質側、核側どちらに加えた場合でも、核内外の濃度が約 90 分で平衡に達した。また、核膜孔を自由拡散できない GFP タンデムテトラマーでは、核内外の両方の移行で同じ様に核膜通過は制限された。GFP 標識した importin α を細胞質側に加えると、核側への通過が制限され、測定開始から 240 分経過しても細胞質側と核側とで濃度が平衡に達しなかった。これは importin α 特異的に観られた。他方、核側へ加えた時の細胞質側への通過は、importin α 、 β -catenin とともに測定開始から 120 分程度で核内外の濃度が平衡に達した。また、importin α は核膜への結合が観察されたが、その結合にも核内移行と核外移行で結合に違いが見られ核内移行時に大きな結合が見られた。そして、このような結合の非対称性は、importin α が核膜孔に対し相互作用できなくなる NLS を含む条件では見られなかった。さらに核内移行時において、importin α の核膜への結合と核膜孔通過の間に相関があり importin α の核膜孔通過は核膜孔への結合の強さによって制限されることがわかった。Ran-GTP のエネルギーが関係しない単独で核膜孔を通過するタンパク質分子において通過や核膜への結合が核内移行と核外移行で非対称的であるという生物物理的に面白い現象が見られた。

論文審査結果の要旨

小此木君は、細胞質と核との間の輸送の研究において、研究手段の開発を行った。核膜輸送の研究において、いままで用いられてきた研究手段は、生細胞そのものを用いた観察か、細胞膜の透過性を高めた処理をしたセミインタクトセルを用いた系であり、輸送の機構を同定するために、核側に人為的な摂動を導入することが困難なものである。また、in vitro 再構成系として数年前に開発されたものは、アガロース樹脂ビーズの表面に核膜複合体を再構成したもので、これも、核側の溶液を変えることが出来ないものであった。

そこで小此木君は、核側の溶液を変えることができる再構成系を作るために、アガロース樹脂の直方体の一面に核膜複合体を再構成し、膜の両側流路をもつシステムを開発した。まず、0.14 mm 厚に調製したアガロースに、1,4buthandiol diglycidyl ether でエポキシ基を導入、つぎにグルタチオンを導入した。得られたグルタチオン-アガロースを 1 mm 幅に切って直方体にして、長径の両側に流路が出来るように観測チャンバーを作製した。一方の流路に glutathione-S-transferase と融合した RanGDP を流して結合させ、そこに Newport/Lohka の方法で調製したアフリカツメガエル卵抽出液を加えて、平面状に核膜を再構成して、洗浄後漏れの無いものを選んで、観測に用いた。

形成された平面状核膜上の核膜孔の密度を、核膜孔結合する GFP-importin β で染色して求めたところ、HeLa のセミインタクトセルの核と同程度で有ることが確認された。核移行シグナルを持つマルトース結合タンパク質と GFP の融合体の核内輸送活性は、2 分子/ $1 \mu\text{m}^2\text{s}$ 程度で、これも核膜輸送の標準的な速度を再現した。また通常核と同様に、小麦胚芽アグルチニンで輸送の阻害が見られ、外部から加えた RanGTP の濃度に依存して輸送速度は増加し飽和した。

核膜孔を自由に通過できることが知られている GFP 単量体は、再構成核膜のどちらに加えても 2 h 後には、膜の両側でほぼ同じ濃度に平衡した。また、通過が制限される GFP 融合 4 量体は、2h 後も平衡しなかった。RanGTP に依存せず核内移行することが知られている β -catenin と importin α の移行を GFP 融合体を用いて調べてみると、 β -catenin は、予想通り 2 h 程度で平衡したが、驚いたことに importin α は長時間放置しても核膜の両側で濃度が等しくならなかった。また、importin α に限っては、核膜孔への結合がみられ、核内移行時のほうが核外移行時よりより多く結合し、核移行シグナル配列をを導入した BSA を加えると、核内移行時特有の結合は消滅した。

以上の結果は、再構成された平面状核膜は、細胞質・核間輸送の in vitro 系として利用可能であることを示すと共に、いままでの細胞質・核間輸送の知見では説明できない現象も研究できる可能性があることを示し、学位論文の水準に達していると、判断された。

提出された学位論文と口頭発表の基づいて、審査員一同と小此木君との質疑応答による試験が行われた。多くの質疑があったが、応答の内容は学問的知識、思考力、及び判断力を備えていると思われるものであった。また、本研究の始めから終わりに至るまで、困難な再構成系の構築に、主体的に研究を進めたことがよく伺われた。以上により、小此木君には学位に相当する研究能力が有ると判断した。英語力については、英語で書かれた学位論文の英文要約から、水準を満たしていると判断した。

以上を総合判断し、審査員一同、小此木君の学位論文試験結果を合格とした。