

氏 名	田原 清志
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第 865 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	Characterization of interaction between importin $\alpha/\beta$ complex and kinesin-like DNA binding protein (Kid)
論文審査員	主 査 教授 吉森 保 教授 荒木 弘之 助教授 仁木 宏典 助教授 深川 竜郎 教授 米田 悦啓（大阪大学）

Importin  $\beta$  mediates nuclear import of a variety of cargo proteins in many different ways. In the course of screening importin  $\beta$  binding proteins, I identified human kinesin-like DNA binding protein (hKid). Kid is a chromokinesin that possesses microtubule binding motor domain and DNA binding domain, and generates a polar ejection force that pushes chromosome arms away from spindle poles. Kid is essential for chromosome alignment on metaphase plate. In this study, I functionally characterized the interaction between importin  $\alpha/\beta$  complex and hKid, and mapped the essential sites for interaction of importin  $\alpha/\beta$  complex and hKid. hKid bound to importin  $\alpha$  directly and formed trimeric complex with importin  $\alpha/\beta$  heterodimer. When examined using digitonin permeabilized cell-free transport assay, hKid migrated into nucleus, and the migration depended on trimeric complex formation with importin  $\alpha/\beta$  heterodimer. hKid lost the binding to importin  $\alpha$ , when critical residues on the surface of NLS-binding pockets of importin  $\alpha$  were mutated, and nuclear import of hKid was competitively inhibited by classical basic NLS substrate. Therefore, for mapping the NLS(s) of hKid, I focused on the basic amino acids clusters present in hKid protein. hKid possesses a putative basic NLS site 556RKRKL560, previously reported as a NLS in Jun (Jun-like NLS). However, introduction of point mutations in this putative NLS region reduced, but did not abolish the binding of full-length hKid to importin  $\alpha/\beta$  complex in solution binding assay. By searching the conserved basic amino acid region through the sequence comparison with human Kid and *Xenopus* Kid, I found the second putative basic NLS site of hKid in 400KRAR403 residue. Introduction of point mutations in this second putative NLS region, in addition to the mutations introduced in the Jun-like NLS region, abolished the binding of full-length hKid to the importin  $\alpha/\beta$  complex in solution binding assay. Solution binding assay using mutant hKid proteins, in which mutations were introduced in the either of each NLS sites, showed that the affinity with importin  $\alpha$  of Jun-like NLS is stronger than that of second NLS. In digitonin permeabilized cell free transport assay, introduction of mutation in either of each NLS reduced the nuclear migration activity of hKid, but did not inhibit the transport completely in the presence of recombinant importin  $\alpha/\beta$ , Ran, and energy sources. In contrast, when mutations were introduced in both NLS sites, hKid failed to accumulate into the nucleus. In the expression experiments in living cells, I confirmed that introduction of mutation in either of each NLS did not inhibit the nuclear migration of hKid, but introduction of mutations in both NLS sites abolished the nuclear migration of hKid. These results showed that the 400KRAR403 and 556RKRKL560 residues of hKid are both functional basic NLS sites which are essential for interaction with importin  $\alpha/\beta$  complex, and these two NLSs are likely to function cooperatively. However interestingly, in the presence of crude cytosolic extracts, introduction of mutation in either of each NLS prevented nuclear migration of

hKid in digitonin-permeabilized cell-free import assay. This indicates that importin  $\alpha/\beta$  binding to hKid regulates the association of some component(s), which is present in the crude extract, with hKid. Such regulation mediated by importin  $\alpha/\beta$  could be important for function of Kid. GTPase cycle of Ran plays an essential role in mitosis by mediating binding and releasing of importin  $\alpha/\beta$  complex from target proteins. My present data showing that the hKid functionally associate with importin  $\alpha/\beta$  complex raise a strong possibility that Kid is an another target protein in mitosis that could be regulated by GTPase cycle of Ran. Two NLS sites identified in this study locate at the outside of known functional domains of hKid, such as the kinesin-like motor domain, the coiled-coil domain and the helix-hairpin-helix DNA binding domain. Inactivation of either or both NLS seems not to disrupt the known function of hKid except for its importin  $\alpha/\beta$  binding activity. Present characterization of the interaction of hKid and importin  $\alpha/\beta$  complex, and the use of NLS-inactivated hKid proteins constructed in this study, would help us to provide further information to understand the mechanism of regulation and function of Kid during mitosis, as well as unknown function of this protein during interphase.

## 論文の審査結果の要旨

申請者は、核内輸送運搬体 importin  $\beta$  に結合するタンパク質を yeast two hybrid 法を用いてスクリーニングを行い、その一つとしてクロモキネシン Kid (kinesin-like DNA binding protein) を同定した。Kid は polar ejection force と呼ばれる、分裂期染色体腕を中期板の方向に向かわせる力を生み出すことで、染色体の中期板への整列を担っているモーター分子である。

近年、核-細胞質間輸送因子の1つである低分子量 GTPase Ran が、核膜が崩壊した細胞分裂期に、微小管のダイナミクスや紡錘体形成に重要な役割を担っていることが報告され、細胞分裂期に Ran の制御下で機能する因子の同定が現在勢力的に進められている。申請者は、Ran 制御下で機能する細胞分裂期の因子が、核膜が存在する間期には Ran 依存的な核内運搬体 importin  $\beta$  に対し被輸送基質となっている可能性に着目し、importin  $\beta$  と Kid の結合様式の解析を行なった。ヒト Kid をクローニングし、大腸菌で発現させたリコンビナントタンパク質を精製し、精製 importin  $\beta$ 、精製 importin  $\alpha$ 、並びに核局在化シグナル結合活性を失った importin  $\alpha$  の点変異体を用いて結合実験を行なった。その結果、Kid は importin  $\alpha$  を介して importin  $\beta$  に結合すること、また、importin  $\alpha$  が Kid の塩基性核局在化シグナルを認識していることが示唆された。セミインタクト細胞を用いた *in vitro* の輸送構築系では、Kid が importin  $\alpha$ 、importin  $\beta$ 、並びに Ran に依存して核内に輸送されることを示し、Kid/importin  $\alpha$ /importin  $\beta$  の3者複合体形成が Ran で制御される機能的なものであることを確認した。さらに Importin  $\alpha$  で認識される Kid の領域決定を行い、ヒト Kid は核局在化に関わる可能性のある2つの塩基性配列をもつことを正確に示した。それらの塩基性配列各々に点変異をもつヒト Kid を用いて、輸送因子との結合実験、*in vitro* 系並びに生細胞による輸送活性の測定を行い、それらがともに核局在化シグナルとして機能していることを強く示唆する結果を得た。

本研究は、すでに確立されている方法論や輸送の解析系を使ったものであるが、Kid というタンパク質は、その機能の重要性からいくつかのグループがこれまで精力的に研究を進めているにもかかわらず、本研究のような詳細な解析はこれまで行われていない。発現条件、並びに精製条件にかなりの試行錯誤があり、その結果、活性を保った状態で全長ヒト Kid リコンビナントタンパク質を生化学的解析に持ち込むことに成功しており、この因子の機能制御を考える上で重要な知見を得ている。

Kid が importin  $\alpha$  / $\beta$  で Ran の制御下で会合することを示した本研究の成果から、この分子が細胞分裂期において、Ran の新しいターゲットであることが強く示唆される。Kid の「塩基性核局在化シグナルの同定」は、輸送シグナルのリストの項目を増やしただけでなく、核局在化シグナルの生物学的意味を広げる可能性がある。間期核において、核局在化シグナルは、細胞質から核へ移行するためにあるが、分裂期で Kid が Ran の制御下で機能する場合、Kid の核局在化シグナルは、微小管のダイナミクスや紡錘体形成を制御するシグナル構造となりうる。

本研究は、今後の微小管ダイナミクス、紡錘体形成、染色体分配の解析に大きく貢献しうる可能性のある研究として、博士論文の水準に達していると判断された。また、審査会における応答から申請者が自己の研究内容並びに学問的背景を十分に把握しており、それ

に基づき考察する能力を備えていることが判明した。本論文は、明快な英語で書かれており、語学能力も十分なレベルにあると考えられた。

以上を総合判断し、審査員一同、申請者の学位論文試験結果を合格とした。