

学位論文題名

Cellular requirement for CRM1 import and export

(輸送担体 CRM1 の核一細胞質間移行に関する細胞因子)

学位論文内容の要旨

核一細胞質間分子流通の場である核膜孔複合体 (nuclear pore complex: NPC) は約 125MDa にも及ぶ巨大な超分子構造体である。この複合体が核と細胞質の間の厳密なバリアーとして機能し、細胞内の多くの蛋白質はこの核膜孔複合体を自由に通過できない。核膜孔を通過する蛋白質の多くは細胞質から核に局在化するためのシグナル (nuclear localization signal: NLS) や核から細胞質に局在化するためのシグナル (nuclear export signal: NES) を分子内に持つ。NLS や NES を認識して核膜孔を通過する能力をもつ分子群は輸送担体 (transport factor) と呼ばれる。

現在知られている核一細胞質間輸送経路をいくつかのクラスに分類することができる。最も大きなクラスは Importin、Exportin と総称される Importin β 様輸送担体で担われる輸送経路である。Importin β は、細胞質で NLS を持つタンパク質、NLS 受容体である importin α とともに核膜孔ターゲティング複合体を形成し、核内に移行する。移行した複合体は、GTP 結合型の低分子量 GTPase Ran の作用により解離し、運搬されたタンパク質が核内に遊離し、一連の核内輸送が終結する。一方、Exportin に属する CRM1 の場合、核内で NES を持った分子を認識し、Ran とともに三者複合体を生成する。CRM1 の核膜腔タンパク結合活性により三者複合体は核膜孔を通過して細胞質に出ていく。細胞質で GTP 結合型 Ran が GDP 結合型に変換されることが引き金となって複合体は解離し、輸送は終了する。

Importin β 自身は単独で NPC を双方向に移動する能力を持つ分子であることが分かってきたが、CRM1 自身の核内外の移行機構は不明である。本研究では、マイクロインジェクションを利用した *in vivo* 輸送系とセミインタクト細胞を用いた *in vitro* 輸送再構成系を使用し、CRM1 自身がどのように核膜孔を通過するのか調べた。

まず、我々は、蛍光標識したリコンビナント CRM1 をセミインタクト細胞において、氷または 30°C で 30 分間、反応させた。CRM1 は可溶性因子の非存在下ですみやかに核内へと移行した。また、HEL 細胞の細胞質に微量注入した CRM1 は、37°C または氷上で 30 分間反応後、核内に集積した。さらに、CRM1 の核内移行は小麦胚芽レクチンの前処理により阻害された。これらの結果より、CRM1 は温度には関わらずに核膜腔を經由して核内に移行することが示唆された。

次に、CRM1の核内移行におけるATPやGTPの加水分解より生じるエネルギーの必要性を調べた。In vitro 輸送系において、ATP再生系、ATP analogues (AMP-PNP)とATP加水分解酵素 (apyrase)を加えたところ、CRM1はいずれの条件においても同様に核内に集積することが認められた。また、in vivo の系で、NaN₃, 2-deoxyglucose でATPを枯渇させた細胞質にCRM1を注入したところ、正常時と同様に核内へ移行した。RanGTPase依存性を調べるために、in vitro 輸送系に野生型のGTP結合型Ran、およびRanの変異体であるQ69LRanGTPを添加したところ、CRM1はいずれのRanを添加しても、すみやかに核内に集積した。したがって、CRM1の核内移行にはエネルギーを必要としないことが分かった。

CRM1はimportin β とよく似た分子である。両者が同じ経路で核膜孔を通過するのかどうか調べた。In vitro 輸送系で、蛍光標識したCRM1の核内移行が、非標識したCRM1およびimportin β によって競合的に阻害された。逆もまた同じで、importin β の核内集積がCRM1によって阻害された。このことから、CRM1の核膜孔通過経路はimportin β の経路と一致すると考えられる。

さらに、CRM1がどのように核-細胞質間のシャトルするかを調べるために、HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan; センダイウイルス)を用いて、HEL細胞を融合し、多核細胞を調製した。蛍光標識したCRM1を一つの核に注入し、37℃で、30分間反応させ、CRM1局在の変化を観察した。反応後CRM1は融合細胞内の全ての核内に検出された。すなわち、CRM1は核外移行してから、再び核内に移入した。次に、NaN₃, 2-deoxyglucoseによりATPを枯渇させた融合細胞にCRM1をインジェクションし、その細胞内局在を観察するとCRM1は注入された核のみに留まった。GTP結合型RanやNES-BSA等をCRM1と共に注入しても、CRM1の核外移行は回復しなかった。さらに、単独のCRM1とCRM1-NES-RanGTP三者複合体を区別するため、NESとの結合阻害剤であるレプトマイシンB(LMB)で処理してから、CRM1を注入した。やはり、CRM1の核外移行が見られなかった。従って、核内移行と異なり、CRM1自身の核外移行にはATPが必要であった。

以下のように要約できる。CRM1はimportin β 経路により、単独で核内移行する能力を持つ。CRM1の核内移入にATPは必要ないが核外移行には必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 志 田 嘉 利

学 位 論 文 題 名

Cellular requirement for CRM1 import and export

(輸送担体 CRM1 の核-細胞質間移行に関する細胞因子)

本論文では CRM1 自身の核内外の移行機構の解析を目的として、マイクロインジェクションを利用した *in vivo* 輸送系とセミインタクト細胞を用いた *in vitro* 輸送再構成系を使用し、CRM1 自身がどのように核膜孔を通過するのか調べた。*in vitro* 輸送再構成系または *in vivo* 輸送系において、CRM1 核内移行における温度依存性を調べた結果、CRM1 は温度には関わらずに核膜腔を経由して核内に移行することが示唆された。*In vitro* 輸送系で、CRM1 は ATP 再生系、ATP analogues (AMP-PNP) と ATP 加水分解酵素 (apyrase) を加えたいずれの条件においても核内に集積することが認められた。また、*in vivo* の系で、ATP を枯渇させた細胞質に注入された CRM1 が、正常時と同様に核内に移行した。*in vitro* 輸送系に野生型の GTP 結合型 Ran、および Ran の変異体である Q69LRanGTP を添加したところ、CRM1 はいずれの Ran を添加しても、すみやかに核内に集積した。したがって、CRM1 の核内移行には ATP や GTP の加水分解より生じるエネルギーを必要としないことが分かった。さらに、*In vitro* 輸送系で、蛍光標識した CRM1 の核内移行が、非標識した CRM1 および importin β によって競合的に阻害されたことより、CRM1 の核膜孔通過経路は importin β の経路と一致すると考えられた。さらに、CRM1 がどのように核-細胞質間のシャトルするかを調べるために、HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan; センダイウイルス) を用いて、多核細胞を調製した。蛍光標識した CRM1 を一つの核に注入し、CRM1 局在の変化を観察した。CRM1 は複数の核内に移行した。この結果は、CRM1 が核外移行してから、再び核内に移入したことを示している。次に、ATP を枯渇させた多核細胞に CRM1 を注入して局在を観察すると、CRM1 は注入された核にのみ留まった。GTP 結合型 Ran や NES-BSA 等を CRM1 と共注入しても、CRM1 の核外移行は回復しなかった。さらに、単独の CRM1 と CRM1-NES-RanGTP 三者複合体を区別するため、NES との結合阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) で細胞を処理してから、CRM1 を注入し

た。やはり、CRM1の核外移行が見られなかった。従って、核内移行と異なり、CRM1自身の核外移行にはATPが必要である事が分かった。発表の後、長嶋和郎教授から「ATP-independentな核内移入の例と機構」「核外移行におけるATP要求性の理由」について質問があった。また、志田壽利教授から「ウイルスの研究における核内外移行の基礎研究の意義」、田中一馬教授から「CRM1単独、またNESとの複合体のそれぞれの場合の核外移行時のATP要求性」の質問があった。申請者はImportin β の例やRibbeckとGorlichの“Selective phase model”を引用し、かつ自身の考えを交えて答えた。質疑に対する応答は概ね妥当であった。

この論文は、顕微注射を利用した*in vivo*輸送系とセミインタクト細胞を用いた*in vitro*輸送再構成系を使用し、CRM1自身がどのように核膜孔を通過するのか調べた点が高く評価され、HIV等の増殖分子機構の解明並びに新たなウイルス治療法に対して役立つと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。