

## 核たんぱく質の核内移行とそれに関与する因子の研究

### Mechanism of nucleocytoplasmic transport of nuclear proteins

- 代表研究者 大阪大学細胞工学センター教授 内田 驍  
Prof., Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.  
Tsuyoshi UCHIDA
- 協同研究者 大阪大学細胞工学センター助手 米田 悦啓  
Assist. Prof., Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.  
Yoshihiro YONEDA
- 大阪大学細胞工学センター特別研究員 園部(今本)尚子  
Special Research, Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.  
Naoko IMAMOTO-SONOBE
- 大阪大学細胞工学センター大学院生 松岡 洋祐  
Grad. Student, Inst. for Molecular and Cellular Biology, Osaka Univ.  
Yosuke MATSUOKA

Eukaryotic cells are distinguished from prokaryotic cells in many aspects, one of which is that the genomic DNA is sequestered in the nucleus. The nucleus has a double membrane, the nuclear envelope, that divides the cell into two parts, the nucleoplasm and the cytoplasm. Proteins that act in the nucleus are synthesized in the cytoplasm and transported into the nucleus through the nuclear pores. When nuclear proteins are introduced into the cytoplasm of the cells, they migrate rapidly into the nucleus, but it is not clear how the proteins are transported. One of the best-characterized nuclear proteins is simian virus 40 (SV40) large T-antigen. Using an SV40 mutant defective in nuclear transport of this large T-antigen and a point mutation in the large T-antigen gene generated by mixed oligonucleotide mutagenesis, it was found that the sequence Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val can act as a signal for nuclear localization.

We studied the mechanism of transport of proteins into the nucleus using synthetic peptides containing the nuclear location signal sequence of SV40 large T-antigen. The synthetic peptide was conjugated chemically with bovine serum albumin (BSA) and introduced into the cytoplasm of cultured human cells by microinjection. The BSA-synthetic peptide conjugate was found predominantly in the nucleus within 30 min after its introduction into the cells. Conjugates of the synthetic peptide with IgG ( $M_r$  about 150 kD) and with secretory IgA ( $M_r$  about 380 kD) were both found in the nucleus very shortly after their introduction into the cytoplasm. But, since a conjugate of the synthetic peptide with IgM ( $M_r$  about 940 kD) did not migrate into the nucleus, there may be a size limit in nuclear transport of conjugated proteins. Conjugates of the synthetic peptides containing the nuclear location signal sequence of polyoma virus large T-antigen or nucleoplasmin, a nuclear protein of *Xenopus laevis*, with BSA were transported into the nucleus.

Recently, it was found that a new type of glycoprotein, which contains O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) residues, is present in the nuclear envelope. The importance of glycoproteins located in the nuclear envelope in nuclear transport was tested by microinjection of karyophilic proteins into the cytoplasm of cultured human cells together with various lectins. Wheat germ agglutinin (WGA), which recognizes GlcNAc, blocked the nuclear transport of nucleoplasmin and of nonnuclear proteins conjugated with a synthetic peptide containing the nuclear localization signal sequence for SV40 large T-antigen. WGA did not inhibit the passive diffusion of fluorescein isothiocyanate-dextran (average  $M_r$  17,900) into the nucleus. *Wistaria floribunda* agglutinin, concanavalin A and lentil lectin did not block nuclear transport.

*In vitro* association of *Xenopus* nucleoplasm and mammalian nonhistone chromosomal high mobility group 1 (HMG<sub>1</sub>) protein with nuclei isolated from rat liver was examined. Efficient association of nuclear proteins with isolated nuclei requires ATP, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and Ca<sup>2+</sup>. Association occurred at 33°C but not at 4°C. ATP could be replaced by nonhydrolyzable ATP analog. Competition studies showed that these associations were specific. More than 80% of the bindings of nuclear proteins to the nuclear surface were blocked by WGA.

The signal sequence of SV40 large T-antigen for translocation into the nucleus is composed of positively charged amino acids Lys-Lys-Lys-Arg-Lys. "Receptors" that interact with the signal sequence may have a negatively charged region electrostatically complementary to the positively charged signal sequence. The putative signal sequence-binding site might contain either Asp-Asp-Asp-Glu-Asp or Glu-Glu-Glu-Asp-Glu. Rabbit antibodies to synthetic peptides containing the negatively charged amino acid sequences were obtained. Indirect immunofluorescence of the antigens recognized by the antibody to Asp-Asp-Asp-Glu-Asp was punctate at the nuclear rim or the nuclear surface, depending on the plane of focus. The antibody blocked transport of nuclear proteins into the nucleus. The antigens recognized by the antibody were predominantly localized to the nuclear pores. Furthermore, a monoclonal antibody to Asp-Asp-Glu-Asp, which inhibited the nuclear transport, was also obtained. Using these antibodies, we will be able to determine and purify "receptors" that interact with the signal sequence.

## 研究目的

真核細胞は、原核細胞と異なり、その細胞内がさらに数種類の小器官に分かれており、それぞれの小器官が役割を分担し、細胞全体として統一された多彩な機能を発揮するように構築されている。このような小器官の中でも、核は、転写や複製など細胞にとって重要な反応の起こる場であり、核膜とよばれる2層の脂質二重膜によって細胞質と隔てられている。この核内で働く核たんぱく質は、細胞質で合成された後、核膜に存在する核膜孔を通して核内に輸送される。本研究は、遺伝子の発現や複製に関与している核たんぱく質が、細胞質で合成された後、どのような経路を通り、どのようなメカニズムによって核内に輸送されるかを明らかにすることを目的とする。核たんぱく質の核内移行機構を明らかにすることは、細胞内でシグナルがどのように伝わるかという細胞内情報伝達を知る上で必須であり、さらには、発癌や細胞の分化、増殖に関する膜を介しての調節系の研究にとっても重要な研究テーマとなりうると思われる。

## 研究経過

核たんぱく質の核内移行機構を明らかにするためには、二つの方面からのアプローチが必要である。一つは、核たんぱく質自身もつべき性質に

ついて研究していくことであり、もう一つは、その核たんぱく質を認識し核内に輸送する核側(細胞側)の因子について研究することである。本研究では、まず、核たんぱく質が核内に移行するためには、どのような性質をもつことが必要であるかについて焦点をあて、明らかにし、その後、その核たんぱく質を運搬して核内に入れる核側因子について明らかにしていく。

### I. 核局在化シグナル配列を含む合成ペプチドを用いた研究

核たんぱく質が核内に局在化していくメカニズムとして、核膜に存在する核膜孔を通して受動拡散によって核内にはいり、DNAや核マトリックスなどの核内構成成分に対する親和性によって核内にとどまり、核内に蓄積していくという考え方が根強く存在していた。この考え方では、受動拡散で核内に移行しうる物質の大きさから推定される核膜孔の直径を超える分子量をもつ核たんぱく質は、核膜孔を通過する時、コンフォーメーションを変化させることによって通過可能な形になるのではないかと推定されていた。これに対し、核たんぱく質は、能動的に輸送され、積極的に核内に輸送されるメカニズムが存在することが徐々に明らかにされてきた。それは、SV40のウイルスゲノムがコードするたんぱく質の一つである

表 1. 核局在化シグナル配列

SV40 large T 抗原	Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Glu-Asp
ポリオーマウイルス large T 抗原	Asp-Pro-Pro-Arg-Thr-Pro-Val-Ser-Arg-Lys-Arg-Pro-Arg-Pro-Ala
ヌクレオプラスミン	Arg-Pro-Ala-Ala-Thr-Lys-Lys-Ala-Gly-Gln-Ala-Lys-Lys-Lys
アデノウイルス Ela	Lys-Arg-Pro-Arg-Pro
酵母ヒストン 2B	Gly-Lys-Lys-Arg-Ser-Lys-Ala
酵母 MAT $\alpha$ 2	Met-Asn-Lys-Ile-Pro-Ile-Lys-Asp-Leu-Leu-Asn-Pro-Gln

核内で働く核たんぱく質は、核内に移行するために、ある特定のアミノ酸配列が必要である。これらの配列は、ウイルスの変異株や遺伝子工学的手法を用いて明らかにされてきた。

large T 抗原を利用したもので、このたんぱく質は、細胞のトランスフォーメーションに関与する核たんぱく質である。large T 抗原が核内に移行できなくなったウイルスの変異株や、large T 抗原をコードする遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて変異させたものを用いて、large T 抗原が核内へ移行するためにはある特定のアミノ酸配列が必要であることが証明され、核局在化シグナルと呼ばれるようになった。これは、リジンやアルギニンといった塩基性アミノ酸に富んだ特徴的な配列をしていることが分かった。この発見を契機にして、同様な方法を用いて、表 1 に示すようなポリオーマウイルス large T 抗原、アデノウイルス E1a たんぱく質、Xenopus Oocyte の核たんぱく質であるヌクレオプラスミン、酵母ヒストン 2B などの核局在化シグナルも次々と同定されてきた。しかし、これらの実験は、ウイルスの変異株や、遺伝子工学的に作製された DNA の細胞内での transient expression を利用した実験から明らかになってきたものであるため細胞周期の影響を無視できない。つまり、細胞周期の分裂期に核膜が消失した時に、DNA などの核内構成成分に結合し、核膜再形成後も核内にとどまったという可能性が考えられた。そこで本研究では、まず、核局在化シグナルとして証明されたアミノ酸配列を含むオリゴペプチドを合成し、それを本来は核に移行しないたんぱく質、例えば、ウシ血清アルブミンなどに化学的に結合させ、得られるペプチド-たんぱく質結合物を利用して、核局在化シグナルがすなわち核移行シグナルであることを証明した。つまり、図 1A に示すようにペプチド-たんぱく質結合物を培養細胞の細胞質にマイクロイン

ジェクションし、ある一定時間（通常 30 分）経過後、固定し、抗体を用いた間接蛍光抗体法によって結合物の細胞内局在を見たところ、図 1B から明らかなように、合成ペプチドを結合させたたんぱく質は、細胞分裂を経過することなく、速やかに核に移行することがわかった。さらに、ポリオーマウイルス large T 抗原、ヌクレオプラスミン、酵母ヒストン 2B の核局在化シグナル部分の合成ペプチドを用いて調べたところ、酵母ヒストン 2B 以外のペプチドはすべて哺乳動物の培養細胞において核移行活性のあることがわかった。また、これらの合成ペプチドによってどれくらいの分子量のたんぱく質が核内に輸送されるのかを知るために、ウシ血清アルブミン（分子量 68,000 ダルトン）以外に免疫グロブリン G (IgG: 分子量約 150,000 ダルトン) 分泌型免疫グロブリン A (sIgA: 分子量約 380,000 ダルトン)、免疫グロブリン M (IgM: 分子量約 950,000 ダルトン) に結合させ、培養細胞の細胞質に導入した。すると、IgM 以外の結合物はすべて核内に速やかに移行した。

II. *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) を認識するレクチンである wheat germ agglutinin (WGA) は、核たんぱく質の核内移行を阻害する。

I で明らかなように、核たんぱく質が核内に移行するためには、ある特定のアミノ酸配列が必要で、それが核移行シグナルとして働いていることが分かった。そこで、本研究はつづいて、そのシグナルを認識し、核たんぱく質を核内に輸送する核側因子の解析に向けられていった。

ヌクレオプラスミンをコロイド金粒子に結合さ

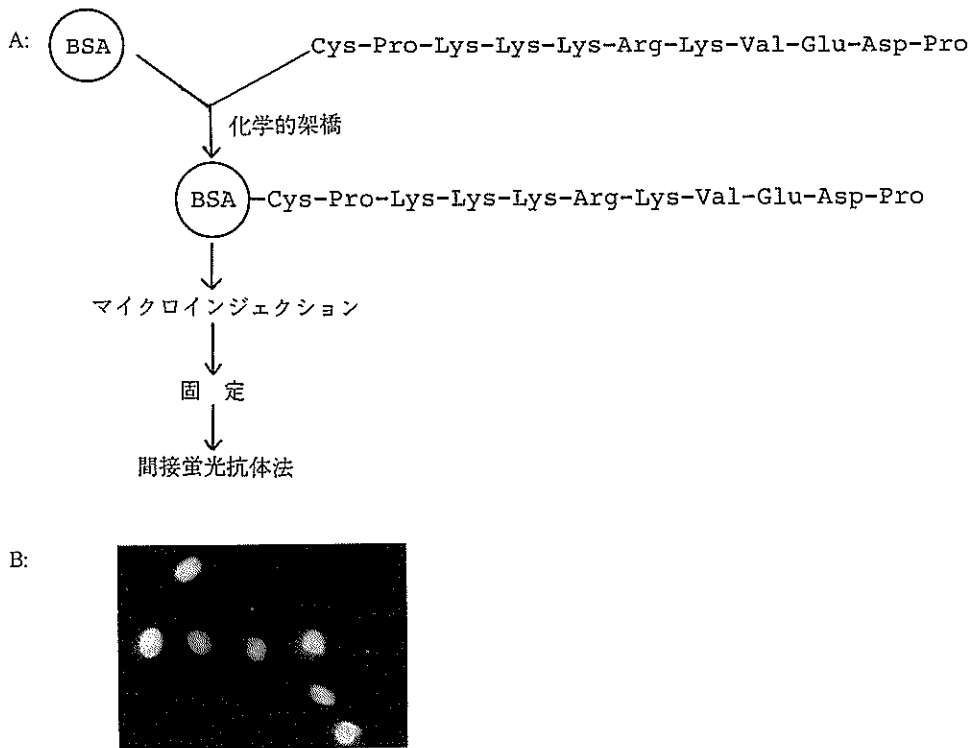


図1. 核局在化シグナル配列を含む合成ペプチドを用いたたんぱく質の核内移行

A に示すように、SV40 large T 抗原の核局在化シグナル配列を含むオリゴペプチドを合成し、本来は核に移行しないたんぱく質、例えばウシ血清アルブミン (BSA) と化学的に結合させる。得られるペプチド-BSA 結合物を、培養細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、一定時間 (通常 30 分) 経過後、細胞を固定し、抗 BSA 抗体を用いた間接蛍光抗体法によって結合物の細胞内局在を観察すると、B に示すように、核に局在することが分かる。

せてできる粒子を *Xenopus* Oocyte の細胞質にマイクロインジェクションした後、その粒子の細胞内局在を電子顕微鏡で観察すると、核膜に存在する核膜孔を通して核内に移行していることが明らかにされていた。また近年、核膜には *O*-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) を持つ糖たんぱく質が存在することが示され、そのたんぱく質の機能が何であるかが興味の焦点となっていた。

そこで本研究では、GlcNAc を認識するレクチンである wheat germ agglutinin (WGA) が核たんぱく質の核内移行にどのような影響を及ぼすかを調べた。ヌクレオプラスミンや、核移行シグナル部分の合成ペプチドを結合させたウシ血清アルブミンと、WGA を同時に培養細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、ある一定時間後の核

たんぱく質の細胞内局在を見ると、ヌクレオプラスミンも、合成ペプチドの結合したウシ血清アルブミンとともに細胞質に局在したままであり、核たんぱく質の核内移行は、WGA によって阻害されることが分かった。WGA による核たんぱく質の核内移行阻害は、図 2 に示すように WGA の濃度に依存して増加し、かつ GlcNAc 以外の糖鎖を認識するレクチンでは全く阻害されないことが分かった。また、WGA は、分子量約 20,000 ダルトンのデキストランが核内に受動拡散によって移行することは阻害しないことから、核膜孔を物理的に閉鎖することによって阻害しているのではないことが分かった。

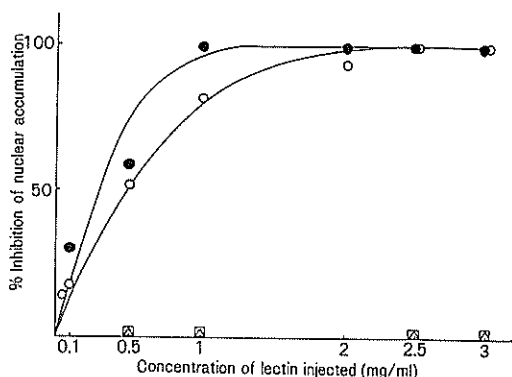


図2. 核たんぱく質の核内移行に及ぼすレクチンの効果

さまざまな濃度のレクチンと精製ヌクレオプラスミンあるいはSV40 large T抗原の核移行シグナル配列を含む合成ペプチド (Tペプチド) と蛍光たんぱく質フィコエリスリン (PE) の結合物 (T-PE) の混合液を培養細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、ヌクレオプラスミンまたはT-PEの核内移行が阻害されるかどうかを観察した結果を示している。

- : T-PE+WGA
- : ヌクレオプラスミン+WGA
- : ヌクレオプラスミン+コンカナバリンA
- △—△: ヌクレオプラスミン+WFA

### III. ヌクレオチド三リン酸 (NTP) が核たんぱく質の核内移行には必要である。

核たんぱく質が核へ移行するために必要な核側因子の解析や、生化学的な解析をするためには、分離核へ効率よく核たんぱく質が移行する *in vitro* 系の開発が必須である。本研究では、ラット肝の分離核を利用して *in vitro* 実験系の開発に成功し、その系を利用することによって以下の事実を明らかにした。

核としては、ラット肝から分離したものを用い、核たんぱく質として  $^{125}\text{I}$  で標識したヌクレオプラスミンまたは哺乳動物の核たんぱく質の一つである HMG-1 を用いた。核たんぱく質の核内移行は、反応液中に  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , ATP の存在する条件下で温度を  $33^\circ\text{C}$  にして反応させた時に起こった。また ATP は、GTP などの他のヌクレオチド三リン酸 (NTP) におきかえることができた。さらに NTP の役割を明らかにするために加水分

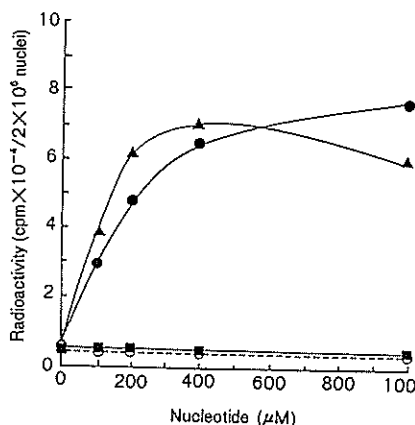


図3. 分離核を用いた *in vitro* 実験系

ラット肝より分離した核を、 $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  存在下で  $^{125}\text{I}$ -ヌクレオプラスミンと混ぜ、 $33^\circ\text{C}$  で反応させる。この時、さまざまな濃度の ATP あるいは ATP のアナログを加えておき、2時間の反応時間中に、核に蓄積した  $^{125}\text{I}$ -ヌクレオプラスミンのカウントを測定した。

- : ATP
- ▲—▲: AMPPCP (ATP アナログ)
- : AMPCP (ADP アナログ)
- : ATP, 但し核をあらかじめ1% Triton X-100 (界面活性剤) で処理

解されないアナログである AMPPCP に置き換えても、核たんぱく質の核内移行は観察された。このことは、ATP はエネルギーとして用いられるのではなく、三リン酸の形で結合することが必要であると考えられた (図3)。実際に完全反応系で核を保温し、よく洗浄した後に酸で抽出してくると AMPPCP は検出されたが、完全反応系より  $\text{HCO}_3^-$  または  $\text{Ca}^{++}$  を除いた場合あるいは低温で反応させた場合には AMPPCP は検出されなかった。このことから NTP は核へ結合することにより核を活性化し、核たんぱく質を核へ取り込むことのできる状態にすることが明らかになった。核を AMPPCP と共に完全反応系で一定時間保温し、AMPPCP を核へ結合させ、 $4^\circ\text{C}$  でヌクレオプラスミンまたは HMG-1 と反応させると、これら核たんぱく質の核への結合が観察されたが、この場合、蛍光たんぱく質と結合させたヌクレオプラスミンを用いて形態的に観察した場合にも明らかのように、 $4^\circ\text{C}$  で反応させた場合は核の表面

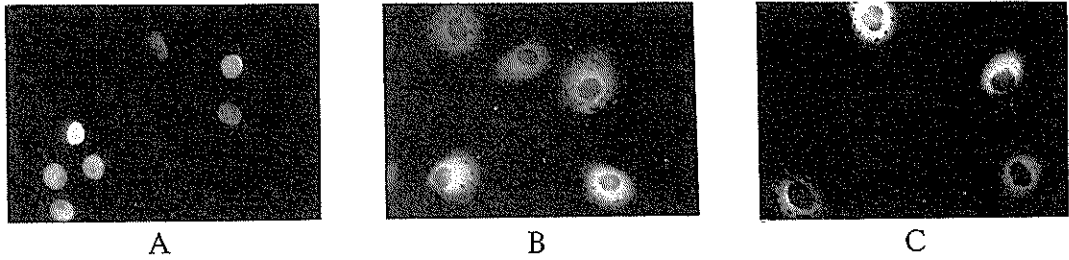


図4. 核たんぱく質の核内移行に及ぼす抗 DDEDED 抗体の効果

Asp-Asp-Asp-Glu-Asp (DDEDED) に対するアフィニティー精製抗体と、核たんぱく質の混合液を培養細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、30 分経過後、固定し、用いた核たんぱく質に対する抗体による間接蛍光抗体法を行ったものである。

A: 正常ウサギ IgG+ヌクレオプラスミン

B: 抗 DDEDED 抗体+ヌクレオプラスミン

C: 抗 DDEDED 抗体+T-BSA (SV40 large T 抗原の核移行シグナル配列を含む合成ペプチドをウシ血清アルブミンに結合させたもの)

に結合しているのであって、核内には取り込まれていないことが分かり、33°Cの場合と異なることが分かった。33°Cの場合の核への取り込みも、4°Cの場合の核表面への結合も、どちらの場合も非標識核たんぱく質を大量に加えることによって競合阻害されることから、特異的な反応であることが分かった。

さらに、この *in vitro* 系で WGA の効果を調べると、*in vivo* と同様に核たんぱく質の核内移行は WGA によって阻害された。この阻害は、WGA によって ATP が核へ結合することが阻害されるためにおこるということも明らかになった。

#### IV. 核たんぱく質の核内移行を阻害する抗体の分離とそれを用いた解析

II および III の研究から、核膜に存在する WGA 結合性の糖たんぱく質が、核たんぱく質の核内移行に重要な役割を果たすことが示されたわけであるが、核たんぱく質の側には、核内に移行するためのシグナルの存在が明確になったわけであるから、それを認識するたんぱく質が核表面の核膜孔を形成するたんぱく質の中に存在するであろうと推定される。そのたんぱく質を見いだすために、全く新しいアプローチによって核たんぱく質の核内移行に関与するたんぱく質に対する抗体を得ることを試みた。つまり最も典型的と思われる SV 40 large T 抗原の核移行シグナルが Lys-Lys-

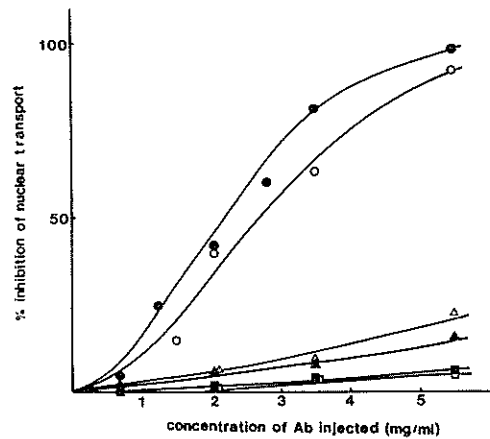


図5. 抗 DDEDED 抗体のも阻害活性の濃度依存性

図4と同様の方法を用いて、さまざまな濃度の抗体が核たんぱく質の核内移行をどの程度阻害するかを調べたものである。

●—●: 抗 DDEDED 抗体+ヌクレオプラスミン

○—○: 抗 DDEDED 抗体+T-BSA

▲—▲: 抗 EEEEE 抗体+ヌクレオプラスミン

△—△: 抗 EEEEE 抗体+T-BSA

■—■: 正常ウサギ IgG+ヌクレオプラスミン

□—□: 正常ウサギ IgG+T-BSA

Lys-Arg-Lys という塩基性アミノ酸の特徴的な配列を持つことに注目し、それを認識し、核内に輸送するのに働く“受容体たんぱく質”は、静電的に逆の電荷をもつ酸性アミノ酸の並びから成るのではないかと仮定した。そこで、Asp-Asp-Asp-Glu-Asp (DDDED) という配列を持つペプチドと、Glu-Glu-Glu-Asp-Glu (EEEDE) という配列をもつペプチドを合成し、それぞれをヘモシアニンに結合させ、ウサギに免疫することにより抗血清を得た。免疫に用いたペプチドを用いたアフニティクロマトグラフィーにより精製した抗体を用いて、培養細胞を間接蛍光抗体法により染色すると、抗 DDED 抗体は、細胞核を斑点状に染めることが分かった。この抗 DDED 抗体とヌクレオプラスミンあるいは、SV40 large T 抗原、ポリオマウイルス large T 抗原の核移行シグナルの結合したウシ血清アルブミンの混合液を、培養細胞の細胞質にマイクロインジェクションしたところ、図 4 に示されるようにヌクレオプラスミンあるいは核移行シグナルの結合したウシ血清アルブミンの核内移行は、抗 DDED 抗体によって阻害された。また、図 5 から明らかなように、核たんぱく質の核内移行の阻害は抗体濃度に依存して起こり、抗 EEEEE 抗体とは明確に区別されることが分かる。また、抗 DDED 抗体は、RNA が核内から細胞質に遊出するのを阻害することはなかった。さらに、受動拡散による低分子物質の核内への移行は全く阻害しなかった。

この抗 DDED 抗体の認識する抗原を同定するため、細胞、特に核を様々な分画に分け、どの分画で抗体の活性が最もよく吸収されるかを調べたところ、核膜孔複合体たんぱく質に富む分画に、抗体の活性を吸収するたんぱく質が最も多く含まれていることが分かった。抗原たんぱく質の局在は、間接蛍光抗体法の結果も考慮して、核膜孔複合体であることが強く示唆されるわけである。

さらに、DDDED に対するモノクローナル抗体も数種類得られた。そのうちの一つは、間接蛍光抗体法による蛍光像および免疫電子顕微鏡法による像、イムノブロッティング法による抗原分子同

定のための実験結果から判断して核膜孔複合体に存在することが示されたが、ポリクローナル抗体と同様にして、核たんぱく質の核内移行を阻害する活性があるかどうかを調べたところ、濃度に依存して阻害活性をもつことが分かった。

つまり、核たんぱく質の核移行シグナルを認識する“受容体たんぱく質”ともいべき核側因子は、これらポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の認識する抗原分子であり、その活性中心は、DDDED あるいはその一部であることが分かった。

### 研究成果

核たんぱく質が核内に移行するために必要である核たんぱく質側の性質およびそれを運搬する核側の因子に関して、以下のような研究成果が得られた。

(1) 遺伝子工学的に明らかにされてきた核たんぱく質がもつ核局在化シグナルは、その部分のアミノ酸配列を含む合成ペプチドを利用した研究から、核内に能動的にかつ速やかに移行するための核移行シグナルであることが分かった。この合成ペプチドを利用することにより、任意のたんぱく質を細胞質から核内に効率良く導入することができることを明確にできた。

(2) GlcNAc を認識するレクチンである WGA が核たんぱく質の核内移行を阻害することを明らかにし、核膜に存在する糖たんぱく質の重要性を示すことができた。

(3) WGA の効率を見る時、核たんぱく質として、ヌクレオプラスミンを用いた場合も核移行シグナル部分の合成ペプチドを結合させたたんぱく質を用いた場合も、ほぼ同様に阻害活性が見られたことから、それぞれの核たんぱく質は、共通の経路を通るか、あるいは WGA の認識する共通の糖たんぱく質の関与を必要とするかいずれかの可能性があることを示唆することができた。

(4) 生化学的な解析を可能にする、ラット肝の分離核を利用した核たんぱく質の核内移行の *in vitro* 実験系を確立した。

(5) この *in vitro* 実験系を利用して、核たんぱく質の核内移行には、ヌクレオチド三リン酸が必

要であり、またこのヌクレオチド三リン酸はエネルギーとして用いられるのではなく、核に結合することによって核を活性化させるために働くことが明らかになった。

(6) WGA は、この *in vitro* 実験系でも阻害活性をもち、ヌクレオチド三リン酸が核に結合することを阻害することによって核たんぱく質の核内移行を阻害することが分かった。

(7) 核たんぱく質がもつ核移行シグナルが SV 40 large T 抗原に代表されるように、塩基性アミノ酸の特徴的な配列をもつことに注目し、そのシグナルを認識する“受容体たんぱく質”の活性中心は、静電的に逆の電荷をもつ酸性アミノ酸の並びから成るのではないかと仮定した。仮定どおり、Asp-Asp-Asp-Glu-Asp (DDDED) に対する抗体は、核たんぱく質の核内移行を阻害した。このことから、核たんぱく質の核移行シグナルを認識する“受容体たんぱく質”の存在が明らかとなり、その活性中心が、Asp-Asp-Asp-Glu-Asp かあるいはその一部という酸性アミノ酸の並びから成ることが証明できた。

(8) 抗 DDED 抗体の認識する抗原たんぱく質は、核膜孔複合体構成たんぱく質の一つであることが強く示唆された。

#### 今後の課題と発展

(1) 核たんぱく質は、核内に速やかに移行するための核移行シグナルをもつことが明らかにされたが、それぞれの核たんぱく質で、その配列は少しずつ異なり、すべてに共通した一般的な配列が存在するかどうかはこれからの課題である。すなわち、ある一定の共通な配列が存在すれば、それを認識し、核内に輸送する核側因子も共通なたんぱく質の関与が推定され、核側因子に関する理解にとっても重要と考えられるからである。この核移行シグナル配列を含む合成ペプチドを、例えば核内構成成分に対する抗体に結合させれば、その結合物を細胞質に導入するだけで核内に移行し、その抗体活性を生きた細胞の核の中で観察することが可能となり、研究の幅はさらに広がっていくことが予想される。また、すべての核移行シグナルが同程度の核移行活性をもつのか、つまり免疫

グロブリン M などの巨大分子をも核内に移行させるシグナルが存在するののかといったこともこれからの進展が期待できる。

(2) これまで利用されてきた核移行シグナルはたんぱく質として合成された後、すみやかに核内に移行する核たんぱく質に関するものばかりであるが、それ以外にも何らかの外界の刺激に反応してはじめて細胞質から核へ移行するたんぱく質もあり、それらのたんぱく質の核移行シグナルがどのような性質をもつものであるのかを知ることは、これまで知られている核移行シグナルとの対比の上で非常に興味深い問題である。

(3) WGA によって認識される核膜に存在する糖たんぱく質のうち、どのたんぱく質が、核たんぱく質の核内移行に重要な役割を果たすのかを同定することが課題である。

(4) 本研究で開発した *in vitro* 実験系では、ヌクレオプラスミンや HMG-1 といった本来の精製核たんぱく質は効率良く核に結合することが観察されるが、核移行シグナル配列を含む合成ペプチドを結合させたウシ血清アルブミンなどの結合物は、核移行活性が観察できないことが今後の課題である。この系に、例えば細胞質たんぱく質を添加することによって、核移行シグナル配列を含む合成ペプチドを結合させたたんぱく質が核内に移行できるようになれば、細胞質にも核たんぱく質の核内移行に関与する重要なたんぱく質が存在することが示され、その因子の同定にこの *in vitro* 実験系は大きく寄与できると思われる、生化学的な解析とともに今後の進展が期待できる。

(5) 抗 DDED 抗体によって、核たんぱく質の核内移行が阻害されることから、核移行シグナルを認識する核側のたんぱく質が存在することが明確にされた意義は大きく、このポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を用いれば、核たんぱく質の核内移行に重要な役割を果たす核側のたんぱく質因子の同定に大きな進展がもたらされると思われる。また、さらに研究が進み、核側因子のたんぱく質が精製され、それをコードする遺伝子がクローニングされていけば、核たんぱく質の核内移行機構はさらに分子レベルでの解析が可



能となっていくであろう。

(6) 抗 DDED 抗体を利用すれば、現在ほとんど分かっていない細胞質から核内へのシグナル伝達の分子機構解明に向けて新しい展開が見られるものと思われる。つまり、抗 DDED 抗体によって、ある種のシグナルが阻害され反応が起こらないような事象が観察されるかもしれないからである。

以上のように、本研究では、核たんぱく質の核内移行機構に関して、当初の計画であった二つの面からのアプローチ、つまり核たんぱく質の側からのアプローチも、核側因子解明のためのアプローチも十分な成果が上がり、核たんぱく質の核内移行を阻害する抗体（抗 DDED 抗体）を利用して、核側因子が分離・精製されていけば、さらに分子レベルでの解析が可能となり、ますますの進展が予想される。

#### 発表論文

- 1) Yoneda, Y., Arioka, T., Imamoto-Sonobe, N., Sugawa, H., Shimonishi, Y. and Uchida, T.: Synthetic peptides containing a region of SV

- 40 large T-antigen involved in nuclear localization direct the transport of proteins into the nucleus. *Exp. Cell Res.*, **170**, 439-452 (1987).
- 2) Yoneda, Y., Imamoto-Sonobe, N., Yamaizumi, M. and Uchida, T.: Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. *Exp. Cell Res.*, **173**, 586-595 (1987).
- 3) Imamoto-Sonobe, N., Yoneda, Y., Iwamoto, R., Sugawa, H. and Uchida, T.: ATP-dependent association of nuclear proteins with isolated rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3426-3430 (1988).
- 4) Yoneda, Y., Imamoto-Sonobe, N., Matsuoka, Y., Iwamoto, R., Kiho, Y. and Uchida, T.: Antibodies to Asp-Asp-Glu-Asp can inhibit transport of nuclear proteins into the nucleus. *Science*, **242**, 275-278 (1988).
- 5) 米田悦啓, 内田 驍: 核蛋白質の核内移行とそのシグナル. *実験医学*, **6**, 715-720 (1988).
- 6) 今本・園部尚子, 内田 驍: 核蛋白質の核局在化機構. *生体の科学*, **39**, 570-574 (1988).
- 7) 米田悦啓: 核蛋白質の核移行シグナル. *細胞*, **21**, 79-83 (1989).
- 8) 松岡洋祐, 内田 驍: 核タンパク質の核内移行機構. *細胞工学*, **8**, 107-115 (1989).
- 9) 米田悦啓, 内田 驍: RNA と蛋白質の核膜通過機構. *実験医学*, **7**, 500-505 (1989).