

核膜孔複合体の構造・機能とその動的変化の解析

A study of the structure and function of nuclear pore complex and its dynamics

研究代表者 大阪大学医学部解剖学第3講座教授 米田 悦啓
Prof., Department of Anatomy and Cell Biology, Osaka
University Medical School
Yoshihiro Yoneda

共同研究者 大阪大学微生物病研究所助教授 中西 真人
Assoc. Prof., Research Institute for Microbial Diseases, Osaka
University
Mahito Nakanishi

名古屋大学医学部解剖学第1講座助教授 千田 隆夫
Assoc. Prof., Department of Anatomy I, School of Medicine,
Nagoya University
Takao Senda

大阪大学医学部解剖学第3講座助手 松岡 洋祐
Assist. Prof., Department of Anatomy and Cell Biology, Osaka
University Medical School
Yosuke Matsuoka

The nucleus, in which the genomic DNA is sequestered, consists of a double membrane, the nuclear envelope. Nuclear (karyophilic) proteins are synthesized on ribosomes in the cytoplasm and transported precisely and actively by a selective, mediated process to the nucleus through the nuclear pore complexes (NPCs) present in the nuclear envelope. The process is mediated by a nuclear localization signal (NLS) which is contained in the karyophilic proteins. We found that a karyophile forms a stable complex in the cytoplasm to target the nuclear pores. Since this complex shows nuclear pore-binding activity, we have referred to it as the nuclear pore-targeting complex (PTAC). The translocation of the karyophile through the nuclear pores requires at least two soluble factors, a small GTPase Ran and its interacting protein p10/nuclear transport factor 2 (NTF2), along with NPC components. Furthermore, data concerning extracellular signal-dependent nuclear protein import pathway are now accumulating. Considering all these observations, one should be able to attain an understanding of the mechanism of intracellular information transduction between cytoplasm and the nucleus and the functional organization of the NPC.

研究目的

真核細胞が正常にかつ秩序正しく機能していくためには、核と細胞質との緊密なコミュニケーション

が必要である。核は、核膜と呼ばれる2層の脂質二重膜によって細胞質と隔てられており、核膜には核膜孔と呼ぶ小孔が開いている。その核膜

孔を通して核からは RNA の形で情報が細胞質に送られ、細胞質で合成された蛋白質のうち、核内で働く蛋白質（核蛋白質）が選択的に核に運ばれて細胞質の情報を核内に伝える。すなわち、核膜孔は核と細胞質間のコミュニケーションの媒体となる、細胞にとって極めて重要な構造体の1つである。本研究の目的は、核膜孔を取り囲む蛋白質複合体である核膜孔複合体に焦点を当て、その構造と機能および動的变化を分子レベルで明らかにしつつ、核と細胞質間のコミュニケーションのメカニズムを解明していくことである。

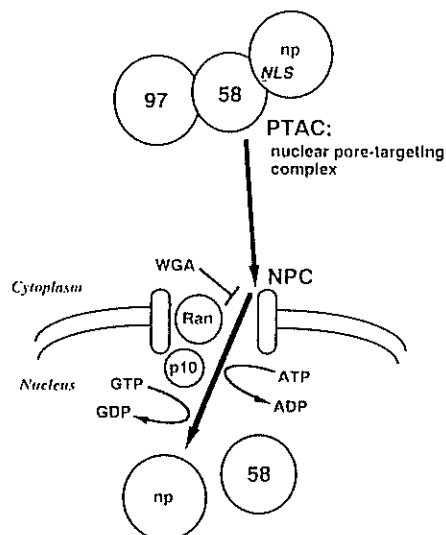
研究経過と研究成果

核膜孔複合体の機能を理解するため、主として核膜孔を介した細胞質から核への蛋白質輸送のメカニズムに焦点を当てて研究を進めた。生きた培養細胞へのマイクロインジェクション法による *in vivo* 解析系と、ジギトニンという界面活性剤を利用したセミインタクト細胞 *in vitro* 解析系を駆使して、核蛋白質輸送に必要な因子の同定と、その詳細な性状解析を行った。その結果、第1の成果として、核蛋白質は細胞質において、その核局在化シグナルを中心に大きな安定な複合体を形成して核膜孔にまで到達することを明らかにした。核蛋白質を核膜孔にまでターゲットする複合体という意味で、核膜孔ターゲティング複合体(PTAC; nuclear pore-targeting complex)と名付けた。続いて、この複合体を構成する2つの必須因子の同定に成功し、それぞれの推定分子量から、PTAC58, PTAC97と呼んだ。PTAC58はアルマジロ構造と呼ばれる特徴的な繰り返し配列を持つ分子で、核局在化シグナルを認識する。一方、PTAC97は核局在化シグナルを認識できないが、PTAC58と複数の核膜孔複合体構成因子に結合する能力を有しており、PTAC58を介して核蛋白質と3者複合体を形成して、核膜孔にまで核蛋白質を運ぶ。核膜孔に結合したPTACは、低分子量G蛋白質Ranと、二量体となってRanに結合するp10/NTF2と呼ばれる分子の働きにより、ATP/GTPの加水分解を利用して核膜孔を通過する。この時、PTACは、PTAC97分子を介して核膜孔複合体構成因子と相互作用しながら核膜孔を通過していくが、その詳細なメカニズムはまだ明らかではない。さらに、PTAC97は、それ自身単独でRanの助けを借りることなく、細胞質から核内へ移行することがわかり、核蛋白質の方向性を持った細胞質から核への動きに、PTAC97分子が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、PTAC97はRanと結合する能力も持っているため、Ran、核膜孔複

合体とPTAC97、さらにはこれらに相互作用する他の因子を総合的に捉えた研究を進展させることにより、核蛋白質が複合体となって核膜孔を通過するステップの詳細なメカニズムがより明らかとなっていくであろう。以上の知見を簡単にまとめたモデル図を以下に示す。

NLS-Mediated Nuclear Transport

- >requires several cytoplasmic factors
- >requires ATP/GTP hydrolysis
- >inhibited by WGA



図：核膜孔ターゲティング複合体の形成とその核膜孔通過のモデル。核膜孔通過のステップには、低分子量G蛋白質であるRanが重要な役割を果たす。np:核蛋白質、WGA:小麦胚レクチン、NLS:核局在化シグナル、NPC:核膜孔複合体

以上の成果はすべて、基質としてSV40ウィルスのlarge T抗原の核局在化シグナルを用いて得られてきた。SV40 large T抗原は、細胞質で合成された後、構成的に核内に輸送される蛋白質の代表と言える。一方、核内で働く蛋白質の中には、通常は細胞質に存在し、細胞外の刺激を受けて初めて核内に移行するものもある。そこで、転写因子の1つであるStat1に着目し、細胞がinterferon- γ の刺激を受けて初めてリン酸化され二量体を形成して核内に移行するStat1分子の輸送に関わる因子の同定を試みた。大腸菌で発現されたレコンビナントのStat1を培養細胞にインジェクションし、interferon- γ で刺激するという方法を用いて *in vivo* 系を確立し、それを用いて解析を行ったところ、Stat1の核内移行には、われわれが同定したPTAC58は全く関与せず、PTAC58とア

ミノ酸レベルで約50%の同一性を持つNPI-1と呼ばれる分子が重要な役割を果たすことが明らかとなった。NPI-1分子は、SV40 large T 抗原の輸送にも働くが、活性化された Stat1 が結合するNPI-1の領域はSV40 large T 抗原の核局在化シグナルを認識する領域とは異なることも明らかとなった。さらに、Stat1の核内移行には、PTAC97, Ranが必要であることがわかり、SV40 large T 抗原と Stat1 の輸送を比べた場合、核蛋白質輸送の一番最初のステップ、つまり核局在化シグナルが認識される段階で厳密な種分けを行うメカニズムが存在し、その後は共通の経路を利用するという興味深い可能性が示唆された。

今後の課題と発展

残された大きな問題の1つに、核膜孔ターゲティング複合体が、どのように方向性を持って核膜孔を通過するのかという点がある。これには、主として、Ran, PTAC97, 核膜孔複合体構成因子が関与すると思われるが、現在では核膜孔を機能的に再構成する技術がなく、完全な理解には様々な困難が予想される。すなわち、核膜孔複合体を構成する因子1つ1つの理解と、それらが複合体を形成した場合のダイナミックな構築の理解がますます要求されるであろう。一方、PTAC58分子の方は、大きなファミリーを構成していることが徐々に明らかとなってきた。さらに、個々の分子の組織レベルでの発現を調べてみると、それぞれに異なる組織特異性を示すことも明らかとなってきた。つまり、単細胞生物である酵母には1種類しか存在しないと思われるPTAC58に相当する分子が、高等真核生物では複数存在し、それぞれが異なる働きをすることが本研究によって示されたわけで、個体レベルで核蛋白質輸送を考えていく場合に、PTAC58 ホモログの果たす役割は重要であると思われる。それぞれの組織で、あるいは発生の様々な段階で、核蛋白質輸送が、核局在化シグナル認識のステップで制御されている可能性があり、組織の分化や個体発生、細胞増殖との関係からこれらの分子の役割を解明していくという方向に研究が大きく発展していく可能性がでてきた。また、個々のPTAC58ファミリー分子がどのような核蛋白質を輸送しているのかを明らかにすることも大きな問題であろう。最後に、核と細胞質のコミュニケーションという問題を考えた場合、細胞質に存在する様々なオルガネラ、つまり、ミトコンドリアや小胞体などから核へどのような分子がどのように輸送されてそれぞれのオルガネラと核の間の情報交換を行っているのかを解明するこ

とにより、核を中心とした細胞内情報伝達ネットワークの全体像に迫る研究を進展させることができると思われる。

発表論文リスト

- (1) Matsuoka, Y., Takechi, S., Nakayama, T., and Yoneda, Y. Exogenous histone H1 injection into mitotic cells disrupts synchronous progression of mitotic events by delaying chromosome decondensation. *J. Cell Sci.* 107: 693-701 (1994)
- (2) Kato, K., Yoneda, Y., Okada, Y., Kiyama, H., and Shiosaka, S. Gene transfer and the expression of a foreign gene in vivo in post-mitotic neurons of the adult rat brain using the hemagglutinating virus of Japan-liposome method. *Mol. Brain Res.* 25: 359-363 (1994)
- (3) Tachibana, T., Imamoto, N., Seino, H., Nishimoto, T., and Yoneda, Y. Loss of RCC1 leads to suppression of nuclear protein import in living cells. *J. Biol. Chem.* 269: 24542-24545 (1994)
- (4) Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., and Kishimoto, T. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80: 353-361 (1995)
- (5) Imamoto, N., Tachibana, T., Matsubae, M., and Yoneda, Y. A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. *J. Biol. Chem.* 270: 8559-8565 (1995)
- (6) Imamoto, N., Shimamoto, T., Takao, T., Tachibana, T., Kose, S., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., and Yoneda, Y. *In vivo* evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *EMBO J.* 14: 3617-3626 (1995)
- (7) Umemoto, M., Sakagami, M., Fukazawa, K., Ashida, K., Kubo, T., Senda, T., and Yoneda, Y. Hair cell regeneration in the chick inner ear following acoustic trauma: ultrastructural and immunohistochemical studies. *Cell Tissue Res.* 281: 435-443 (1995)
- (8) Imamoto, N., Shimamoto, T., Kose, S., Takao, T., Tachibana, T., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., and Yoneda, Y. The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. *FEBS Lett.* 368: 415-419 (1995)

- (9) Terada, K., Ohtsuka, K., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Mori, M. Role of heat shock cognate 70 protein in import of ornithine transcarbamylase precursor into mammalian mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3708-3713 (1995)
- (10) Fukuda, M., Gotoh, Y., Tachibana, T., Dell, K., Hattori, S., Yoneda, Y., and Nishida, E. Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene* 11: 239-244 (1995)
- (11) Shimamoto, T., Tanimura, T., Yoneda, Y., Kobayakawa, Y., Sugawara, K., Hanaoka, F., Oka, M., Okada, Y., Tanaka, K., and Kohno, K. Expression and functional analyses of the *Dxpa* gene, the *Drosophila* homolog of the human excision repair gene *XPA*. *J. Biol. Chem.* 270: 22452-22459 (1995)
- (12) Yoneda, Y. Nuclear export and its significance in retroviral infection. *Trends Microbiol.* 4: 1-2 (1996)
- (13) Kawahire, S., Tachibana, T., Umemoto, M., Yoneda, Y., Imai, N., Saito, M., Ichimura, T., Omata, S., and Horigome, T. Subcellular distribution and phosphorylation of the nuclear localization signal binding protein, NBP60. *Exp. Cell Res.* 222: 385-394 (1996)
- (14) Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumano, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W.-Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N., and Kishimoto, T. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukine 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 407-411 (1996)
- (15) Kurihara, T., Hori, M., Takeda, H., Inoue, M., and Yoneda, Y. Partial purification and characterization of a protein kinase that is activated by nuclear localization signal peptides. *FEBS Lett.* 380: 241-245 (1996)
- (16) Tachibana, T., Hieda, M., Sekimoto, T., and Yoneda, Y. Exogenously injected nuclear import factor p10/NTF2 inhibits signal-mediated nuclear import and export of proteins in living cells. *FEBS Lett.* 397: 177-182 (1996)
- (17) Yoneda, Y. Nuclear pore-targeting complex and its role on nuclear protein transport. *Arch. Histol. Cytol.* 59: 97-107 (1996)
- (18) Sekimoto, T., Nakajima, K., Tachibana, T., Hirano, T., and Yoneda, Y. Interferon- γ -dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran TC4. *J. Biol. Chem.* 271: 31017-31020 (1996)
- (19) Kajikawa, H., Umemoto, M., Mishiro, Y., Sakagami, M., Kubo, T., and Yoneda, Y. Expression of highly polysialylated NCAM (NCAM-H) in developing and adult chicken auditory organ. *Hearing Res.* 103: 123-130 (1997)
- (20) Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tachibana, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. Essential role of active nuclear transport in apoptosis. *Genes Cells* 2: 55-64 (1997)
- (21) Yoneda, Y., Imamoto, N., Tachibana, T., Sekimoto, T., Kose, S., Matsubae, M., and Shimamoto, T. Molecular mechanism of nucleocytoplasmic transport of proteins through the nuclear membrane. *Membrane Proteins* (eds. Hamasaki, N. and Mihara, K.) S. Karger AG (Switzerland) pp. 9-16 (1997)
- (22) A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1 β is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J. Biol. Chem.* 272: 17640-17647 (1997)
- (23) Yoneda, Y. How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J. Biochem.* 121: 811-817 (1997)
- (24) Kajikawa, H., Umemoto, M., Taira, E., Miki, N., Mishiro, Y., Kubo, T., and Yoneda, Y. Expression of neurite outgrowth factor and gicerin during inner ear development and hair cell regeneration in the chick. *J. Neurocytol.* in press (1997)
- (25) Miyamoto, Y., Imamoto, N., Sekimoto, T., Tachibana, T., Seki, T., Tada, S., Enomoto, T., and Yoneda, Y. Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS-receptors. *J. Biol. Chem.* in press (1997)
- (26) Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N., and Yoneda, Y. Identification of novel homologues of mouse importin α , the α subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue specific expression. *FEBS Lett.* in press (1997)
- (27) Kose, S., Imamoto, N., Tachibana, T., Shimamoto, T., and Yoneda, Y. Ran-unassisted nuclear migration of a 97 kDa component of nuclear pore-targeting complex. *J. Cell Biol.* in press (1997)