

1. 研究題目

(和文) 核タンパク質輸送におけるhsc70の役割とそれに基づく輸送の分子機構の
解明

(英文) Functional analysis of the role of hsc70 in nuclear protein
transport.

2. 研究者

今本 尚子
Naoko Imamoto

大阪大学医学部解剖学第3講座 助手
Research Associate, Medical School, Univ. of Osaka

3. 英文サマリー

Nuclear protein import is a receptor-mediated active process and many molecules are considered to be involved in this process. In this study, we examined a role of 70kDa heat-shock cognate protein (hsc70) using in vitro assay, a role of Ran/TC4 in living cells, and identified molecules sufficient to promote nuclear-pore binding step of the transport.

4-1. 研究目的

細胞質-核間の情報伝達に大きな役割を果たす核タンパク質輸送は、真核生物にとって基本的な生命現象の一つであり、その分子機構を明かにすることは生理的に重要な意味がある。輸送には、核タンパク質が細胞質で認識されてから、核膜孔を通過するまでの間に多くの細胞質及び核膜孔構成因子が関与すると考えられている。その中に、我々がこれまでに同定した構成的に発現する70kDa熱ショックタンパク質(hsc70)をはじめ、低分子量GTP結合タンパク質Ran/TC4や核局在化シグナル(NLS)に結合する細胞質因子などが同定されている。本研究は、核タンパク質輸送におけるhsc70の役割や、輸送を担う因子の解析を行うことにより、核タンパク質輸送の分子機構を明かにすることを目的とする。

4-2. 研究経過および成果

(i) in vitro系を用いた核タンパク質輸送におけるhsc70の役割の解析

本研究者は、NLSに結合活性をもつ分子量69kDaのタンパク質を同定・精製し、その部分アミノ酸配列を決めたところ、このタンパク質が構成的に発現する70kDa熱ショックタンパク質(hsc70)であることを見いだした。高純度にアフィニティ精製した抗hsc70ウサギ抗体を培養細胞の細胞質に核タンパク質とともに微小注入すると、注入した核タンパク質の核内輸送が強く阻害され、hsc70が核タンパク質輸送に関与することが強く示唆された⁽¹⁾。hsc70が核タンパク質輸送に関与することを確認するため、digitonin処理で作製したsemi-intact cellを用いたin vitro核タンパク質輸送系を導入した。輸送反応に必要な細胞質抽出液(cytosol)からhsc70/hsp70を抗hsc70抗体により吸収すると、cytosolの輸送活性が低下し、この吸収cytosolに精製hsc70を加えると輸送活性が回復することがわかった。更に、このin vitro系の解析で、cytosol中のhsc70は輸送される核タンパク質と細胞質から核内までco-localizeすることを見いだした⁽²⁾。

(ii)核タンパク質輸送を担う他の細胞質因子の解析

in vitro系の解析から、hsc70単独を系に加えただけでは輸送反応は起こらず、hsc70の他にも細胞質因子が輸送に必要であることが示唆された。これらの因子の同定を、in vitro系の輸送に必要なcytosolを分画し、活性を追跡することにより行った。cytosolをイオン交換クロマトグラフィーで分画した結果、核タンパク質の核膜孔への結合のステップを担う一つの分画を得た。この分画中の複数の因子は核タンパク質と安定な複合体を形成し、この複合体が核膜孔への結合活性をもつことが判明した。この複合体を構成する複数の細胞質因子を同定した⁽³⁾。

(iii)核タンパク質輸送における低分子量GTP結合タンパク質Ran/TC4の役割の解析

低分子量GTP結合タンパク質Ran/TC4の核タンパク質輸送における役割を、Ran/TC4のGTP/GDP交換反応を促進するRCC1の遺伝子に点変異をもつBHK細胞由来の温度感受性変異株tsBN2細胞を用いて解析した。非許容温度下において、tsBN2細胞の細胞質に核タンパク質を微小注入し、その核内移行を調べたところ、核タンパク質輸送の効率が著しく低下していることがわかった。tsBN2細胞と親株のBHK細胞とを融合させて作製したヘテロカリオンの細胞質に微小注入した核タンパク質は、非許容温度下において、融合直後はBHK細胞由来の核には効率良く移行し、tsBN2

細胞由来の核には効率良く移行しなかった。しかし、融合後3時間が経過するとどちらの核への移行効率も低下した。一方、tsBN2細胞と核局在化シグナルを欠損したRCC1を細胞質に発現させた△8-29tsBN2細胞とを融合させると、非許容温度下にもかかわらず、tsBN2細胞由来の核へのタンパク質の輸送効率が回復した。また、in vitro系の解析で、正常細胞由来の細胞質抽出液存在下にもかかわらず、非許容温度下で培養したtsBN2細胞で作製したsemi-intact cellの核内には核タンパク質の集積が見られなかった。これらの結果は、非許容温度下ではtsBN2細胞の核側の輸送装置の活性が低下し、細胞質には輸送に阻害的に作用する因子が蓄積することを示唆し、RCC1-Ran/TC4系が核と細胞質の両方の場で核タンパク質輸送の効率を調節する可能性を示唆する⁽⁴⁾。

4-3. 発表論文リスト

- (1) Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S., and Yoneda, Y. Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit nuclear import of karyophilic proteins. *J. Cell Biol.* 119, 1047-1061. (1992).
- (2) Okuno, Y., Imamoto, N., and Yoneda, Y. 70-kDa heat-shock cognate protein colocalizes with karyophilic proteins into the nucleus during their transport in vitro. *Exp. Cell Res.* 206, 134-142. (1993).
- (3) Imamoto, N., Tachibana, T., Matsubae, M., and Yoneda, Y. A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. in preparation.
- (4) Tachibana, T., Imamoto, N., Seino, H., Nishimoto, T., and Yoneda, Y. Loss of RCC1 leads to the suppression of nuclear protein import in living cells. *J. Biol. Chem.*, in press.