

# 論文の内容の要旨

論文題目 Study of the inner-nuclear membrane protein Nemp1  
as a binding protein of the nuclear transport regulator Ran GTPase

(核輸送制御因子 Ran GTPase と結合する核内膜蛋白質 Nemp1 に関する研究)

氏名 柴野 卓志

核膜は細胞質と核を分ける真核細胞に特徴的な構造である。核膜蛋白質はこれまでに約 80 種類が同定され、その多くは核膜構造の保持や細胞分裂における核膜の消失や再構築という観点でよく研究されてきた。一方、核内膜蛋白質の MAN1 や emerin などが、BMP/TGF- $\beta$ , Wnt といった細胞内シグナル伝達の制御や胚発生にも関与していることが報告されている。当研究室の儘田らは神経板に発現する新規遺伝子の中から、核膜蛋白質を探索し、*nemp1* を同定した。Nemp1 は III 型膜蛋白質で、シグナルペプチド (SP) と 5 回膜貫通領域 (5TMs) をもち、核内膜に局在する。それ以外に既知のドメインは存在しないが、線虫からヒトまで進化的に保存された領域が 2 箇所あり (A と B と命名)、それぞれ 5TMs 内とその C 末端側に存在する。*Xenopus* (アフリカツメガエル) 胚を用いた過剰発現及び機能低下実験において、共に眼の形成が特異的に阻害され、また眼胞特異的遺伝子 (*tbx3*, *rax*, *pax6*) の発現も阻害された。この眼形成阻害活性には、5TMs の直ぐ下流にある KR 配列、ならびに領域 A と領域 B が必要であった。このように Nemp1 が眼の発生に関わることが示唆されたが、Nemp1 の核内膜における機能は未知であった。そこで本研究において、私は Nemp1 の分子機能を解明するため、Nemp1 結合蛋白質を同定し、それらを介してどのように眼発生に関

与しているかを解析した。

まず Nemp1 の核内膜上での局在位置を検討するため、核膜の裏打ち蛋白質の lamin あるいは核膜孔蛋白質 Nup153 と共免疫染色した。その結果、Nemp1 は lamin と良く共局在した。Nemp1 の欠失変異体を用いることで、lamin との共局在には領域 A が重要であることが示された。次に、核内膜蛋白質間の相互作用について、タグ付き蛋白質を *Xenopus* 胚に共発現し、共免疫沈降法 (Co-IP 法) で検討した。その結果、Nemp1 は MAN1 と emerin に比べ、自身とより強く会合した。このホモ多量体の形成には Nemp1 の 5TMs が重要であった。以上、Nemp1 は内膜上でホモ多量体を形成し、領域 A を介して lamin と共局在することが示唆された。

次に Nemp1 の領域 B への結合蛋白質を同定するため、マウス *nemp1* をクローニングし、酵母 2 ハイブリッド法によりマウス cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、結合蛋白質候補として低分子量 G 蛋白質 Ran を同定した。領域 B と Ran との結合は Co-IP 法により確認され、さらに、大腸菌で合成し、精製した領域 B の組換え蛋白質を用いた GST-pull down 法でも結合が示されたことから、Nemp1 と Ran は直接結合すると考えられる。次に核内膜上での Ran との結合を検討するため、全長 Nemp1 を用いた Co-IP 法と共免疫染色で検討した。その結果、全長 Nemp1 を用いた Co-IP でも領域 B と同様に結合が確認された。また Nemp1 と Ran のタグ付きコンストラクトを培養細胞に共発現させて調べたところ、Nemp1 と Ran は核膜上で共局在した。以上より、Nemp1 が領域 B を介して核内膜上で結合する蛋白質として Ran が同定された。

Ran は importin  $\beta$  と共に核輸送を担う蛋白質として知られ、GTP 結合型は核に、GDP 結合型は細胞質に局在している。この分布は核に局在する RanGEF の RCC1 と細胞質に局在する RanGAP1 とその共役因子 RanBP1 と RanBP2 によって維持される。importin  $\beta$  は核内に所定の「積荷」蛋白質を輸送する担体であり、核内に入ると RanGTP と結合することで、「積荷」は importin  $\beta$  から解離する。また Ran は核輸送だけでなく、importin を介して、紡錘体の形成や核膜の再構成にも関与する。そこで Nemp1 が RanGTP と RanGDP のどちらに結合するかを検討するため、GTP 結合型変異体 Q69L と GDP 結合型変異体 T24N を用いて Co-IP 実験を行った結果、Nemp1 は Q69L と複合体形成することが示された。したがって核内膜上の Nemp1 は領域 B を介して RanGTP と結合することで、核内膜付近の RanGTP の濃度を高め、核輸送を効率化していることが予想される。

ヒト Nemp1 において、領域 B 内のセリンが分裂期特異的にリン酸化修飾されることが報告されている。このリン酸化修飾が領域 B で起こっていることから、Nemp1 と Ran との結合が細胞周期依存的に調節されていることが予想された。そこでまず *Xenopus* 胚で Nemp1 のリン酸化修飾が起きているかをウエスタンブロットにより検討した。その結果、卵割が盛んな胞胚期に Nemp1 の修飾バンドが見られ、これは発生の進行と共に減少した。さらに、*in vitro* での脱リン酸化酵素処理により、修飾バンドが消失した。これらの結果は、*Xenopus* 胚においてもヒトで報告された様に、Nemp1 の分裂期特異的なリン酸化修飾があることを

示唆している。次にこのリン酸化修飾が、Ran との結合を制御しているか、非リン酸化型変異体 5SA、疑似リン酸化型変異体 5SE を用いて解析した。その結果、両方の変異体において Ran との結合が大幅に低下した。このことから、分裂期特異的にリン酸化修飾されるセリンが Ran と Nemp1 の結合を調節している可能性が考えられた。

Ran は、基本的にどの細胞でも発現しているが、神経胚期では、前方神経版、尾芽胚期では頭部全体に強く発現しており、この発現パターンは、Nemp1 の発現パターンと類似していた。そこで Nemp1 と Ran との機能的関連性を調べるため、アンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) 注入による両者の機能低下実験を行ったところ、Nemp1 と Ran の機能低下は眼の形成を協調的に阻害した。細胞増殖への影響を調べるため、原腸胚後期から神経胚前期 (st.12.5~st.13) において検討した結果、Nemp1 の過剰発現と機能低下の両方において細胞密度が有意に減少した。さらに Nemp1 と Ran を同時に機能低下させることにより、Nemp1 単独よりも細胞密度の減少が強まった。これら機能低下実験における MO の特異性は、*nemp1* mRNA 注入や *nemp1* と *ran* の mRNA 共注入により、細胞密度の減少がそれぞれ有意に回復、または回復する傾向が見られたことで示された。この際、分裂細胞の割合も低下する傾向がみられた。この結果から、核内膜上での Nemp1 の適切な量と Ran が細胞周期の進行に必要であることが示唆された。将来眼を形成する神経外胚葉で細胞増殖が盛んであることが知られており、また分裂中の細胞では核輸送が活発であることも報告されている。したがって Nemp1 は、Ran と相互作用することで、細胞増殖が盛んな組織において、核輸送を活発化させていると予想される。

最後に、*nemp* 遺伝子の有無を真核生物内で調べたところ、*nemp* は二胚葉動物のイソギンチャクだけでなく後生動物の起源とされる襟べん毛虫、さらに植物からも見つかった。植物のシロイヌナズナでは、*nemp* ホモログは、*At\_nemp\_A*、*At\_nemp\_B*、*At\_nemp\_C* の三種類が存在した。そこで、植物 Nemp と Ran の結合を Co-IP 法で検討した結果、植物 *At\_Nemp\_A* が *At\_Ran* と複合体を形成することが示された。この結果は、Nemp と Ran の相互作用が真核生物内で保存されていることを示唆している。

本研究により核内膜蛋白質 Nemp1 は 5TMs を介して自身と会合し、領域 A を介して lamin と共局在し、核質側の領域 B を介して RanGTP と直接結合すること、また機能低下実験において Nemp1 と Ran は協調的に機能することが示された。また Nemp と Ran の相互作用は真核生物で保存されていた。Ran は核輸送に関わる因子であることより、核内膜の Nemp1 は Ran を核ラミナに集積させることで、核輸送を活発化し、細胞増殖や眼の発生に関与することが考えられる。今後、更なる Nemp1 の研究により、核内膜近傍における新たな核輸送制御機構が明らかになることが期待される。