

論文審査の結果の要旨

氏名 柴野 卓志

本論文は一部構成で、要旨、序論、結果、考察、方法、結論、図表、文献からなり、核内膜タンパク質 *Nemp1* の分子機構について、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) と培養細胞を用いた詳細な解析を行った結果を述べている。

細胞核は遺伝情報をコードする DNA を保持する真核細胞の特徴的な細胞小器官であり、核膜によって核と細胞質が隔てられている。核膜タンパク質は、これまで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。しかし近年、核膜タンパク質が核内膜周辺でのクロマチンや遺伝子の制御に関与していることが報告され、さらに核膜タンパク質の発生における役割も示唆されている。柴野氏が所属していた研究室の先行研究により、アフリカツメガエルの神経板に発現する新規の核内膜タンパク質 *Nemp1* が同定された。*Nemp1* は、シグナルペプチド (SP) と 5 回膜貫通領域 (5TMs) をもち、それ以外に既知のドメインはないが、線虫からヒトまで進化的に保存された領域が 5TMs 内とその C 末端側の 2 箇所にあり、それぞれ領域 A、領域 B と命名された。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た。この眼形成阻害活性には、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。本論文では、まず領域 A あるいは領域 B と相互作用するタンパク質を探索した。その結果、領域 B への結合タンパク質として、核輸送を制御する重要な低分子量 G タンパク質 *Ran* が見出された。そこで *Ran* との相互作用についてさらに詳細に解析すると共に、*Nemp1* と *Ran* の相互作用がカエル胚において眼の発生と細胞増殖に関わることが示された。これらの研究成果は、国際誌上で発表され、本学位審査会でも高く評価された。詳細は以下の通りである。

本研究ではまず、*Nemp1* と相互作用する可能性のある既知のタンパク質について検討するため、培養細胞を用いた共免疫染色とカエル胚を用いた共免疫沈降法 (Co-IP 法) が行われた。その結果、*Nemp1* は領域 A を介して核内膜の裏打ちタンパク質の *lamin* と共局在すること、また 5TMs を介して核内膜タンパク質の *MAN1* と *emerin* と共免疫沈降すると共に自身とも強く共免疫沈降することが示された。これらの結果より、*Nemp1* は核内膜上でホモ多量体として、他の核内膜タンパク質や *lamin* と会合することが示唆された。

次に領域 B への結合タンパク質を同定するため、酵母 2 ハイブリッド法によりスクリーニングした。その結果、結合タンパク質候補として低分子量 G タンパク質の *Ran* を同定した。Co-IP 法と GST-pull down 法により、全長の *Nemp1* または領域 B が GTP 結合型の *Ran*

(RanGTP) と相互作用することが示され、さらに培養細胞を用いた実験で、Nemp1 と Ran が核膜上で共局在することが示された。以上より、Nemp1 と結合するタンパク質として Ran が同定された。RanGTP と結合するタンパク質としては、これまで核輸送に直接関わるタンパク質だけが知られていたが、この発見により Ran に対する新たな制御因子が見出されたことになり、大変意義あるものである。

Nemp1 と Ran との機能的関連性については、カエル胚でアンチセンスモルフォリノを用いた機能低下実験を行った。その結果、眼の形成に対しては、Nemp1 と Ran の機能低下は協調的な阻害効果を示した。前方神経板の細胞増殖への影響では、Nemp1 単独あるいは Nemp1 と Ran を同時に機能低下させると細胞密度がそれぞれ有意に減少した。Nemp1 の過剰発現実験でも細胞密度の低下が認められた。これらの結果から、核膜上での Nemp1 の適切な量と Ran が、正常な細胞周期の進行に必要であることが示唆された。予定眼胞領域では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 の役割として、細胞増殖が盛んな組織において、Ran と相互作用することで核輸送を活発化させていることが重要ではないかと考えられた。

nemp 遺伝子は、二胚葉動物のイソギンチャクや、後生動物の起源とされる襟べん毛虫、さらに緑色植物からも見出された。そこで植物の Nemp について Co-IP 法で相互作用を検討した結果、植物の Ran と複合体を形成することが示された。したがって Nemp と Ran の相互作用は真核生物に共通の事象と考えられる。

このように、Nemp1 と Ran は、核輸送や細胞増殖といった真核生物に共通の細胞機能に関与すると共に、カエル胚においては眼の形成にも関わっていることが示された。本論文で得られた結果は、これまで報告がない新しいものであり、核膜による発生過程の制御の一端を明らかにするもので、核内膜近辺における新たな制御機構の解明にもつながることが期待され、高く評価できる。

なお、本論文に記載されている解析は全て論文提出者が主体となって分析および検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。