

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏名 田岡 洋

指導教官 堀之内 末治

論文題目

分裂酵母転写因子 Pap1 の Crm1 による核外輸送機構と その酸化ストレス応答性に関する研究

真核生物では遺伝情報を保持する DNA が核膜によって細胞質と隔てられており、核と細胞質の間を移動する物質は核膜孔を通過しなければならない。この物質輸送機構は遺伝情報の発現の根幹に関わる非常に重要なステップであるが、分子量が約 40 kDa 以上の物質は核膜孔を自由拡散することが出来ず、能動的な輸送機構を必要とする。既知の能動的な核細胞質間輸送のほとんどは Ran と呼ばれる低分子量 G 蛋白質に依存しており、その典型的なものとして、塩基性残基に富む核移行シグナル (nuclear localization signal; NLS) を持つ蛋白質が importin α/β 二量体によって核内に輸送される機構と、疎水性残基に富む核外移行シグナル (nuclear export signal; NES) 含有蛋白質を Crm1 が核外に排出する機構などが知られている。近年、遺伝情報の発現を制御するシグナル伝達因子や転写因子などの機能が核細胞質間輸送によって制御される例が発見されはじめており、このような蛋白質の機能を解析する上で、その細胞内局在および核細胞質間輸送との関連を検討することは必須であると考えられるようになってきている。

他方、酸素呼吸を行う生物において、酸素分子を還元する過程で生じる活性酸素種などの酸化ストレスからいかに生体を防御するかは、生命を維持する上で重要な課題である。これらに対処する抗酸化酵素は通常発現量が比較的抑制されており、酸化ストレスが生じたときに転写が誘導されるなどにより発現量が増大することが知られている。しかし、酸化ストレスのシグナルを伝達する経路や転写因子などは比較的解析されているものの、酸化ストレスの感知機構に関してはまだあまりよく分かっていない。

我々の研究室で放線菌より発見された抗生物質であるレプトマイシン B (LMB) は、分裂酵母およびヒト Crm1 の機能を阻害することが示されていたが、その後 NES 依存的核外移行を特異的に阻害する物質として再発見され、我々を含む複数のグループにより LMB の標的分子 Crm1 が NES 受容体であることが明らかにされていた。蛋白質の核移行及び核外移行による細胞内局在の制御機構は多種多様であると予想されるが、その詳細は未だに明らかになっていないものが多い。本研究はこれらの細胞内局在の制御機構の一端を明らかにすべく、分裂酵母 AP-1 様転写因子 Pap1 について解析を行ったものである。

1. Pap1 には酸化ストレス応答性の核外移行シグナルが存在する

分裂酵母 *pap1*⁺ 遺伝子は、マルチコピーで薬剤耐性を付与する遺伝子として京大の柳田らによって単離された。出芽酵母転写因子 Yap1 とは、動物細胞の AP-1 サイトと結合可能な N 末領域の bZip 領域、C 末領域の cysteine-rich domain (CRD) と呼ばれる領域に相同性が認められる。Pap1 は Crm1 によってその転写活性化能が負の制御を受けることが知られていたが、Crm1 が NES 受容体であるということ、Yap1 CRD がその細胞質局在に重要であると報告されたことから、Pap1 分子内に Crm1 によって認識される NES が存在すると予想し解析を行った。

分裂酵母において Pap1 と GFP の融合蛋白質を発現させ細胞内局在を観察したところ、細胞質に局在し、LMB の添加によって速やかに核に移行することを見出した。Pap1 の CRD を欠失させ GFP と融合したものは核に局在し、CRD のみを GST-GFP と融合したものは細胞質に局在したことから、CRD 内に NES が存在することが示唆された。そこでこの GST-GFP-Pap1 CRD を大腸菌で発現させ精製し、HeLa 細胞の核に微量注入したところ、細胞質への移行が観察され、この領域に動物細胞でも機能する NES が存在することが明らかになった。Pap1 によって転写制御を受ける遺伝子として *apt1*⁺ が知られているが、この遺伝子産物 p25 の発現を観察したところ、Pap1 を発現させ LMB 処理したものや Pap1 ΔCRD を発現させたものなど Pap1 が核に局在する条件では p25 の発現増加が認められた。さらに NES として機能する最小領域として 19 アミノ酸領域を決定し、Pap1 NES の必須アミノ酸残基を同定したところ、これまで知られていた NES と異なり、疎水性アミノ酸に加えてシステインが必要な新規なものであることが判明した。Pap1 はストレス応答性の転写因子であることから、様々なストレス条件下で細胞内局在の変化を観察したところ、酸化ストレス剤の一種であるマレイン酸ジエチル (*diethyl maleate*; DEM) の添加により Pap1 の核移行が観察された。この応答は NES 領域のみでも認められ、Pap1 NES は酸化ストレスに応答するユニークなものであることが明らかになった。

2. Pap1 の酸化ストレス応答機構は少なくとも 2 種類存在する

酸化ストレスを与える化合物としてよく知られているものに過酸化水素があるが、Yap1 において過酸化水素に応答する機構が明らかにされ、NES 近傍のシステイン残基と N 末側のシステイン残基が過酸化水素処理によりジスルフィド結合を形成することが示された。Pap1 においてこれら 2 つのシステイン残基は保存されているが、DEM 応答に必要な Pap1 NES には含まれないため、Pap1 において過酸化水素と DEM それぞれに対する応答機構を詳細に検討した。

過酸化水素と DEM をそれぞれ処理したときの各種 GFP 融合蛋白質の局在を観察したところ、Pap1 全長は両者に応答して核に蓄積したが、GST-NLS-GFP-Pap1 NES は DEM には応答したものの過酸化水素には応答せず、Pap1 NES は過酸化水素応答には不十分であることが示された。また、ストレス応答性 MAP キナーゼである Spc1/Sty1 の遺伝子破壊株では Pap1 が過酸化水素に応答しないことが知られていたが、この破壊株でも DEM に応答した Pap1 の核への局在変化および Pap1 依存的転写活性化が観察された。過酸化水素応答には Yap1 と保存されたシステイン残基が必要であり、Yap1 と同様にジスルフィド結合が形成される可能性が示唆されたが、このシステインに変異を導入した Pap1 でも DEM には応答することから、Pap1 の酸化ストレス応答機構は過酸化水素と DEM で異なることが示唆された。

DEM は還元型グルタチオン (GSH) と結合しその細胞内濃度を低下させることにより細胞に酸化ストレスを誘導すると考えられているが、GSH 合成酵素の変異株である MN55 株においても Pap1 の細胞内局在および DEM 応答は野生株と変わらず、DEM の作用機構が GSH 濃度の低下によらない直接的な酸化ストレス誘導であることが示唆された。DEM の分子構造より、マイケル付加反応における電子受容体としてシステイン残基の SH 基との反応性を持つ可能性が考えられたため、Pap1 NES ペプチドと DEM を反応させたところ、マイケル付加反応により DEM と共有結合したペプチドの分子量をもつピークが検出された。さらに *N*-ethylmaleimide など他のマイケル受容体となる化合物でも DEM と同様に Pap1 NES の失活を誘導したことから、Pap1 の酸化ストレス応答機構は過酸化水素によるジスルフィド結合の形成と、DEM などマイケル受容体による Pap1 NES 内のシステイン残基への共有結合による NES の失活という、少なくとも 2 種類の機構が存在することが明らかとなった。

3. Crm1 の中央で保存された領域は NES を認識する領域である

我々の研究室では LMB が Crm1 の機能を阻害することを明らかにしたが、その後 LMB による Crm1 の阻害機構について解析を進め、LMB が分裂酵母 Crm1 の 529 番目のシステイン残基とマイケル付加反応による共有結合を形成し、その結果 Crm1 の機能が阻害されることを明らかにした。このシステイン残基がセリンに変異した *crm1-K1* を発現する変異株は

LMB にまったく感受性を示さない。この株の解析を進めた結果、HIV ウイルス Rev 蛋白質が持つ典型的な NES の核外輸送は正常だが、Pap1 NES の輸送能が低下していることを見出した。1 アミノ酸のみの置換により核外輸送の特異性が変化することから、この残基周辺の種間で高度に保存された領域が NES 認識に関与していると予想し、この領域を central conserved region (CCR) と命名し解析を行った。

CCR にさまざまな点変異を導入し、まず LMB 感受性を検討したところ、予想通りさまざまな変化を見せ、Cys529 以外の周辺の残基も LMB 感受性に関与していることが示唆された。次に各種 GFP レポーター蛋白質を発現させ CCR 変異型 Crm1 の NES 輸送能を検討したところ、Cys529 をアラニンやスレオニンに置換した株では Pap1 NES の輸送能が低下しており、Pap1 NES のシステインのみならず Crm1 のシステイン残基も Pap1 NES の輸送に必須であることが明らかとなった。また保存された疎水性残基をアラニンに置換したものでは Pap1 NES のみならず Rev NES の輸送能も低下しており、これらの残基が疎水性 NES を認識している可能性が考えられた。しかし、Crm1 の N 末領域によって認識されると考えられる Ran 結合蛋白質 Sbp1 の輸送は、いずれの CCR 変異型 Crm1 も野生型 Crm1 との違いは認められなかった。以上より、CCR が Pap1 NES のみならず一般的な疎水性 NES を認識している可能性が強く示唆された。

4. まとめ

本研究では Pap1 の細胞内局在およびその制御機構について解析を行い、Pap1 に酸化ストレス応答性の NES が存在することを発見した。さらにその応答機構について詳細に検討した結果、Pap1 が少なくとも 2 種類の酸化ストレスに対し、異なる機構で応答することを見出した。さらに Pap1 NES の Crm1 による認識機構について解析を行い、Crm1 の中央領域 CCR が Pap1 のみならず一般の NES を認識する領域であることを示唆する結果を得た。

出芽酵母 Yap1 は Pap1 とよく似た機構で細胞内局在が制御されていることが知られているが、いくつかの点で異なっている。特に Pap1 NES の輸送に必須である分裂酵母 Crm1 の Cys529 に対応する残基は出芽酵母ではスレオニンであり、出芽酵母で Pap1 を発現させても、分裂酵母で Yap1 を発現させてもいずれも核外移行できない。本研究では分裂酵母 Crm1 が Pap1 NES を認識するためにシステイン同士の相互作用を介した独自の分子機構をもつ可能性を示した。