

テトラヒメナの大き核と小核は異なる核膜孔複合体をもつ

岩本 政明¹, 武内 史英¹, 平岡 泰^{1,2}, 原口 徳子¹

(¹情報通信研究機構・未来 ICT 研究センター・バイオ ICT, ²阪大院・生命機能)

Identification of nucleoporins in the binucleated protozoan *Tetrahymena thermophila*

Masaaki IWAMOTO¹, Fumihide BUNAI¹, Yasushi HIRAOKA^{1,2} and Tokuko HARAGUCHI¹
(¹Bio-ICT, Kansai Advanced Research Center, NICT, ²Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka Univ.)

SUMMARY

The structure of the nuclear pore complex (NPC) has never been understood in binucleated ciliated protozoa. To disclose nucleoporins of *Tetrahymena thermophila*, we selected 23 new nucleoporin-like genes from the database and identified their 21 product proteins as nucleoporin. We then identified the locations of these nucleoporins in the nuclear rim. The majority of the nucleoporins were located in the rim of both the macro- and micronucleus. However, some nucleoporins were located in the rim of either the macronucleus or the micronucleus. The latter macro- and micronuclear-specific nucleoporins were all functional components of a nuclear transport mechanism. These results mean that the structures of the NPC in *T. thermophila* are differentiated according to the nuclei and that these distinct NPCs may control nuclear transport qualitatively and/or quantitatively between two the nuclei.

【目的】 繊毛虫類は、大核および小核と呼ばれる形態と機能の異なる2種類の核をもつ。これらの核が分化し、異なる性質を維持するには、それぞれの核に対する選択的な物質輸送が不可欠と考えられる。

Tetrahymena thermophila においては、両核に共通する成分のコアヒストン H4 は、大核 S 期には大核特異的に、小核 S 期には小核特異的に輸送されるが、一般的な核輸送シグナルをもつタンパク質は細胞周期を通じて大核にのみ輸送され、小核に運ばれることはない(1)。このように、繊毛虫の選択的核輸送の存在は示されているが、その分子メカニズムについては不明のままである。

選択的核輸送が成立するためには、物質輸送の通路である核膜孔の構造が両核間で異なっていて、輸送因子に対する親和性または透過性を異にする必要がある。核膜孔は、分子量約 125 MDa (動物細胞の場合)の巨大なタンパク質複合体であり、約 30 種類の核膜孔タンパク質(ヌクレオポリン)によって構成されている(2)。ヌクレオポリンには、核膜孔複合体の骨格を形成する構造的なもの、核輸送に関与する機能性のものが存在する。多くの機能性ヌクレオポリンの分子内には、Phe-Gly の繰り返し配列(FG リピート)が存在し、その領域で輸送因子複合体内の Importin β と結合し、輸送物質を核内へ運搬する(3)。繊毛虫においては、ヌクレオポリンはこれまで何ひとつ同定されておらず、大核と小核の核膜孔構造の違いは明らかになっていない。そこで我々は、繊毛虫の選択的核輸送システムの分子基盤となりうる核膜孔複合体に注目し、その構成成分であるヌクレオポリンの同定と、それらの両核における局在性について検討をおこなった。

【材料と方法】 繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* の大核ゲノムのデータベースから、ヌクレオポリンと予想される遺伝子を選別した。それらの cDNA を RT-PCR 法で増幅し、GFP 発現ベクターである pVGF-1 ヘクローニングした。作製したコンストラクトは、CU427×CU428 のペア細胞に対してエレクトロポレーションで導入した。96穴プレート中で選択薬剤のパロモマイシンを加えて数日間培養し、増殖した細胞を蛍光顕微鏡で観察して GFP を発現しているクローンを選別した。いくつかのヌクレオポリンに対

しては合成ペプチドを抗原とした特異的抗体を作製し、間接蛍光抗体法とイムノプロットをおこなった。

【結果と考察】 データベースから保存性領域や、機能性ドメインをもとに23種類のヌクレオポリン様遺伝子を選別し、これらの GFP 融合タンパク質の細胞内局在を観察した。これらのうち、構造的なヌクレオポリンに分類される6種類は全て大核と小核の両方に存在した。さらに機能性ヌクレオポリンのうち、核膜孔の中心チャンネルを構成すると考えられる5種類の FG ヌクレオポリンが両核に存在した。このことは、核膜孔の基本骨格と輸送チャンネルの構成は両核で共通であることが示唆している。

一方、機能性ヌクレオポリンには、大核専用のものが4種類と小核専用のものが2種類存在した。中心チャンネルの出入り口付近に位置し、双方向の輸送に重要な働きをもつ3種類の FG ヌクレオポリンと、mRNA の核外輸送因子である Tt-RAE1 が、大核特異的に局在した。mRNA の核外輸送を担う成分が大核特異的に局在し、小核に局在しなかったのは、小核に転写活性がないことを支持している。これに対し、小核特異的な局在を示したものは、大核特異的な FG ヌクレオポリンのうちの2種類と共通なドメインをもつ類似タンパク質で、大核専用の2種類に対する小核用のカウンターパートであると考えられる。しかしながら、これら2種類の小核専用ヌクレオポリンには、FG リピートが存在しなかった。したがって、小核の核膜孔は Importin β に対する親和性が無いか、あるいは非常に小さいと予想され、小核における Importin β を介する核輸送の活性は、大核のそれに比べて非常に低いと考えられる。このような両核間での核膜孔構成の違いは、それぞれの核への選択的輸送システムが核膜孔構造の違いに依存している可能性を示すものである。

【文献】

1. White, E. M. et al. (1989) *J. Cell Biol.*, 109: 1983-1992.
2. Fahrenkrog, B. and Aebi, U. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 757-766.
3. Bayliss, R., Littlewood, T. and Stewart, M. (2000) *Cell*, 102: 99-108.