

テトラヒメナの核選択的ヌクレオポリン Nup98 は核輸送のバリアとして働く

岩本 政明¹, 森 知栄¹, 小坂田 裕子¹, 梶田 浩孝², 小布施 力史², 平岡 泰^{1,3,4}, 原口 徳子^{1,3,4}

(¹情報通信研究機構・未来 ICT 研究センター, ²北大・先端生命, ³阪大・生命機能,

⁴阪大・院理・生物)

Nucleus-selective nucleoporin Nup98s act as a barrier against misdirected nuclear transport in ciliate *Tetrahymena thermophila*

Masaaki IWAMOTO¹, Chie MORI¹, Hiroko OSAKADA¹, Hirotaka MASUDA², Chikashi OBUSE², Yasushi HIRAOKA^{1,3,4} and Tokuko HARAGUCHI^{1,3,4}

(¹Kobe Advanced ICT Research Center, NICT, ²Grad. Sch. of Life Science, Hokkaido Univ., ³Grad Sch. of Frontier Biosciences, Osaka Univ., ⁴Dept. of Biol. Sci., Grad Sch. of Science, Osaka Univ.)

SUMMARY

Ciliated protozoa have two distinct nuclei, a macronucleus (MAC) and a micronucleus (MIC). In *T. thermophila*, the nuclear pore complexes (NPCs) of MAC and MIC were composed of a different set of Nup98 nucleoporin, whereas other components found to date have been common. Two macronuclear Nup98s contain typical Gly-Leu-Phe-Gly (GLFG) repeats, however two micronuclear Nup98s contain novel Asn-Ile-Phe-Asn (NIFN) repeats. This fact implies that nuclear transport via Nup98 is biased or nucleus-specific. To investigate the relation between the exclusive Nup98s and the transport of either nucleus-specific protein, we prepared mutant cells expressing a chimeric Nup98 bearing GLFG repeats but localizing to the MIC or an opposite chimera bearing NIFN repeats but localizing to the MAC. Inco-

rect localization of characteristic repeat sequences did not induce additional transport of opposite nuclear proteins. However, interestingly, the GLFG localizing to the MIC obstructed the nuclear accumulation of MIC-specific nuclear proteins. Furthermore, the NIFN localizing to the MAC obstructed the nuclear accumulation of MAC-specific nuclear proteins. These results suggest that Nup98s act as a barrier to misdirected localization of the nucleus-specific proteins. Our findings provide clear evidence that the exclusive Nup98s contribute to the nucleus-selective transport in the ciliated protozoa.

【目的】核膜上に存在し、核内と細胞質を結ぶ唯一の連絡路である核膜孔は、核膜孔複合体 (nuclear pore complex; NPC) によって形成されている。約 30 種類の NPC 構成タンパク質 (ヌクレオポリンと総称される) のうち、約 3 分の 1 は Phe-Gly の繰り返し配列 (FG リピート) を持つ FG ヌクレオポリンであり、このリピート領域が importin β などの核輸送担体との結合能力を持つことで核輸送を促進すると考えられている。最近の研究により、繊毛虫テトラヒメナにおける大核と小核の NPC は、構成するヌクレオポリンの一部が異なることが分かった (1, 2)。FG ヌクレオポリンの一種である Nup98 は、大核専用のものと小核専用のものが 2 種類ずつ存在するが、大核 Nup98 のリピートモチーフが Gly-Leu-Phe-Gly (GLFG) であるのに対し、小核 Nup98 は Asn-Ile-Phe-Asn (NIFN) で、両者のアミノ酸配列は決定的に異なることも明らかになった (2)。したがって、両者の核輸送担体に対する結合特性には違いがあるはずで、このことが核選択的タンパク質の選別輸送に深く関わっているのではないかと考えた。このことを確かめるため、GLFG リピートを小核 NPC に、NIFN リピートを大核 NPC にそれぞれ異所局在させるキメラ分子を発現させ、核タンパク質の選別輸送に対する影響を調べた。本研究では、これらの解析から明らかになった核選択的なタンパク質輸送の新たな仕組みとして、ヌクレオポリンが核輸送のバリアとして働くことを報告する。

【材料と方法】Nup98 のリピート領域は N 末側に、核膜孔局在化領域は C 末側にそれぞれ存在するので、MacNup98A (大核型) の N 末側に MicNup98A (小核型) の C 末側を繋いだキメラ (BigMic) と、その逆のキメラ (BigMac) を発現するコンストラクトをそれぞれ作成した。両者の N 末端には mCherry を融合し、MTT1 プロモーターにより発現を誘導した。H1 (大核リンカーヒストン)、MLH (小核リンカーヒストン)、H2B、NLS (核局在化シグナル) などの核タンパク質は、N 末端に GFP を融合し、*rpl29* プロモーターにより発現を誘導した (コンストラクト構築の詳細は 2 を参照)。核タンパク質の

核内蓄積量は、共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像から GFP の蛍光量を測定して見積もった。

【結果と考察】Nup98 のキメラ分子の局在化は、その C 末側領域に従い、BigMic は小核 NPC に、BigMac は大核 NPC にそれぞれ局在した。BigMic (GLFG リピート) が局在する小核には、大核特異的タンパク質 (H1, NLS) は輸送されなかった。同様に、BigMac (NIFN リピート) が局在する大核には、小核特異的タンパク質 (MLH) は輸送されなかった。したがって、Nup98 のリピート領域だけでは核選択的な輸送を引き起こすことはできないことが分かった。一方、BigMic (GLFG リピート) が局在する小核では MLH の蓄積量が著しく減少し、同様に、BigMac (NIFN リピート) が局在する大核では、H1 や NLS の蓄積量が著しく減少した。しかしながら、両核共通成分である H2B のそれぞれの核における蓄積量は、キメラ Nup98 の局在に影響されなかった。したがって、大核 GLFG リピートは小核特異的な核輸送を選択的に阻害し、小核 NIFN リピートは大核特異的な輸送を選択的に阻害することが分かった。これらの解析結果は、FG ヌクレオポリンは、importin β と相互作用することによって核タンパク質の核移行を促進するという機能だけでなく、タンパク質によっては核移行のバリアとして働きうることを示している。

このような核選択的なバリア機能は、テトラヒメナのように 2 種類の核をもつ生物では極めて重要と考えられる。選択的な核移行能が、二核性の維持に決定的な役割を果たしている可能性が高いためである。今後は、大核と小核が分化する際に、これらのヌクレオポリンが、どのような仕組みで大核・小核にだけ取り込まれ、ひいては大核・小核を特徴付けていくのかを検討する必要がある。

【文献】

- 1) Malone, C.D. et al. (2008) Eukaryot. Cell 7, 1487-1499.
- 2) Iwamoto, M. et al. (2009) Curr. Biol. 19, 843-847.