

# 川勝美穂 論文内容の要旨

主 論 文

Nuclear translocation of glutathione S-transferase  $\pi$  is mediated by a non-classical  
localization signal

グルタチオンS-トランスフェラーゼ $\pi$ の核移行は非古典的な局在化シグナルによって  
制御される

川勝美穂、後藤信治、吉田貴子、浦田芳重、李 桃生

(Biochemical and Biophysical Research Communications, in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻  
(主任指導教員：李 桃生 教授)

## 【緒 言】

グルタチオンS-トランスフェラーゼ $\pi$  (GST $\pi$ ) は、GSTファミリーの一種であり、細胞の構成分子を親電子性化合物や酸化ストレスから防御する多機能酵素である。なかでもGST $\pi$ は、前がん病変やがん細胞において発現が亢進することが知られている。我々は、従来から細胞質に局在するとされてきたGST $\pi$ が、核やミトコンドリアにも存在し、ある種のがん細胞においては核への局在が増加することを見出した。

一般に、細胞質から核に移行するタンパク質には、核移行に必須の古典的あるいは非古典的なシグナル (NLS) があることが知られている。しかし、GST $\pi$ にはそれらと一致するNLSは存在せず、GST $\pi$ の核移行のメカニズムに関してはこれまで全く不明のままであった。そこで我々は、GST $\pi$ のNLSを同定し核移行機構を明らかにする目的で研究を行った。

## 【対象と方法】

- 1) 細胞株：大腸癌由来 HCT8 細胞、アフリカミドリザル腎由来 COS-1 細胞及び子宮癌由来 HeLa 細胞を使用した。
- 2) GST $\pi$ の細胞内局在の観察：抗 GST $\pi$ 抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- 3) GST $\pi$ NLS の同定：GST $\pi$ の全長及び種々の断片と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質を細胞内で発現させ、GFP の細胞内局在性を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、GST $\pi$ 全長及びアミノ酸の部分的欠失体を Flag タグ付きタンパク質として細胞内で発現させ、抗 Flag 抗体を用いた免疫染色を行い、細胞内局在を観察した。

- 4) タンパク質の発現量の測定：GST $\pi$ 及び種々の融合タンパク質の発現量は、Immunoblot 法を用いて測定した。
- 5) 核移行機構の解析：組み換え GST(*Schistosoma japonicum*)-GFP- GST $\pi$ NLS 融合タンパク質を調製し、これを輸送基質とした、*in vitro* nuclear transport assay を行った。

#### 【結 果】

- 1) HCT8 及び COS-1 において、GST $\pi$ は核にも局在することが確認された。
- 2) 細胞に GST $\pi$ の N 末端側に GFP を融合した GFP - GST $\pi$ と C 末端側に GFP を融合した GST $\pi$  - GFP を発現させた結果、GFP - GST $\pi$ は核移行するが GST $\pi$  - GFP は移行しないことが観察され、移行には C 末端側が必須であることが示唆された。
- 3) GST $\pi$ の C 末端側の種々の断片と GFP との融合タンパク質及び Flag タグ付き C 末端欠失タンパク質の細胞内局在を解析した結果、GST $\pi$ の C 末端側のアミノ酸配列のうち 195-208 領域に NLS があることが明らかになった。
- 4) *in vitro* nuclear transport assay の結果、195-208 領域が NLS として機能すること、また、この融合タンパク質の核移行には、細胞質画分と ATP が必要であることが確認された。

#### 【考 察】

GFP - GST $\pi$ は核移行するが GST $\pi$  - GFP は移行しないこと、さらに GST $\pi$ が細胞質には存在するものの核局在性を示さないがん細胞が存在することから、GST $\pi$ の核移行は細胞質からの単なる拡散によるものではないことが明らかとなった。また、GST $\pi$ NLS と同定した C 末端の 195-208 配列は、古典的な NLS にあるリジンやアルギニンといった正荷電のアミノ酸残基を含まないことや他の非古典的な NLS とは配列上の類似性がないことなどから、新規の非古典的 NLS であると考えられた。加えて、*in vitro* nuclear transport assay の結果、GST $\pi$ の核移行には、細胞質画分と ATP の存在が必須であったことから、GST $\pi$  NLS を認識するタンパク質で構成される、GST $\pi$ 特異的な核移行機構が存在することが示唆された。

今回、GST $\pi$ は、単一遺伝子からコードされる成熟タンパク質の N 末端側にミトコンドリア移行シグナルを、C 末端側に NLS を有することが明らかとなった。このことは、遺伝子のスプライシングやアミノ酸の切断といった翻訳後修飾なしに、GST $\pi$ の細胞内局在を調節する機構が存在することを示唆している。GST $\pi$ の核移行や細胞内局在を調節する機構、並びに核局在性 GST $\pi$ の機能の解明は、抗がん剤を用いたより効果的ながん治療の確立に役立つ可能性があると考えられた。