

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07064

研究課題名(和文) importinファミリーが分担する蛋白質核輸送の調節による細胞制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cellular processes that involve the importin family nucleocytoplasmic transport receptors

研究代表者

木村 誠 (Kimura, Makoto)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：00290891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： importin ファミリー蛋白質は核-細胞質間輸送因子であり、多くの核蛋白質の核-細胞質間移行を媒介する。本研究では、安定同位体標識と試験管内核輸送系を応用したSILAC-Tp法により、ヒト細胞で細胞質から核内への輸送を担う12種のimportin(核内輸送因子)の基質蛋白質を大規模同定した。その結果の生物情報解析により、それぞれの輸送因子が基質蛋白質群の機能を介して関与する細胞内プロセスが明らかとなった。また、輸送因子-基質相互作用の特異性決定機構には予想外の多様性があることが示唆されたため、輸送因子2種の変異体と多数の基質蛋白質の結合解析により結合部位の多様性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

importin ファミリー輸送因子は核-細胞質間蛋白質輸送の大半を担うと考えられるが、個々の輸送因子の特異的基質の報告数が不足していたため、輸送因子の役割分担を知ることができず、輸送システム構成の生物学的意義の理解が遅れていた。本研究で行なった12種の核内輸送因子の基質の大規模同定により、核-細胞質間輸送の調節機構とその役割、輸送因子と多様な基質との相互作用機構の解明などに大きく近づいたと言える。

研究成果の概要(英文)： The importin family proteins are nucleocytoplasmic transport receptors that mediate the migration of most nuclear proteins. In this study, we identified the nuclear import cargo proteins of the 12 species of human importins by a high-throughput method called SILAC-Tp that utilizes stable isotope labeling of cells, an in vitro nuclear transport system and mass spectrometry. The results elucidated the cellular processes linked to each importin through the cargoes. The results also suggested an unexpected variety of the modes of importin-cargo interaction, and we analyzed the variation of the cargo-binding sites on two importins by mutagenesis and in vitro binding assays.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核輸送 importin 蛋白質相互作用

1. 研究開始当初の背景

ヒト細胞に 20 種存在する importin ファミリー蛋白質は、核-細胞質間輸送(核輸送)因子であり、核膜上の核膜孔を通路として蛋白質の核内外への移行を媒介する。研究開始当時、ファミリーのうち 10 種が細胞質から核への輸送を担う「核内輸送因子(importin)」、7 種は逆方向の輸送を担う「核外輸送因子(exportin)」、2 種は「両方向性輸送因子」とされ、1 種は未確定であった。高等生物の細胞では、数千種の蛋白質が核内へ移行し、転写や複製などの機能を果たす。importin ファミリーは、これら核蛋白質の大半を分担して輸送すると予想される (Fig.1)。この際、代表的因子である importin のみは、ヒトに 7 種存在する importin を輸送基質との結合アダプターとして利用できる。

この様な核輸送システムの基本的な構成は解明されていたにもかかわらず、ほとんどの核蛋白質は、どの輸送因子によって運搬されるのか判っていなかった。つまり、それぞれの輸送因子の基質蛋白質は、極少数しか知られていなかった。本研究で対象とする核内への輸送では、研究開始時までに報告された特異的基質のほとんどが importin / の基質であり、transportin の基質も 30 種程度は知られていたが、それ以外の輸送因子の基質はそれぞれ数種程度が報告されるのみであった。

生物情報解析による新規基質の予想も、ほとんどの輸送因子で、ほぼ不可能であった。輸送因子-輸送基質間の特異性は基質上のシグナル配列に決定されると考えられており、この配列が解明されれば、より多くの基質が予想できるはずである。多くの輸送因子では、既知の基質が少な過ぎるためこのシグナル配列が特定できていないと考えられていた。

この基質情報の不足のため、核輸送システムのもつ生物学的な意義はほとんど理解できていなかった。様々な細胞プロセスにおいて importin ファミリー輸送因子の発現量や活性の調節が報告され、輸送因子の調節を介して核内の蛋白質が選択される機構があると予想される (文献)。しかし、特定輸送因子の調節により核局在が変化する基質蛋白質が特定された研究例は少なく、また、輸送因子、基質蛋白質とも特定された少例の核局在変化の知見は、ほとんどがその一つの核蛋白質に注目した研究の成果であり、輸送調節の効果の全体像は解析されていない。

2. 研究の目的

importin ファミリー輸送因子には、組織・時期特異的発現、環境に応じた修飾による機能制御、特定条件下での特異的因子による機能阻害などの報告が多数ある。また、発現抑制や変異体の解析では、それぞれの輸送因子が分担する輸送の遮断により、細胞に様々な異なる影響や表現型が認められる (文献)。今後は、細胞分化や環境変化に応じて個々の輸送因子が調節され、一群の基質蛋白質の核局在変化を介して、細胞の生理的変化が誘導される過程の研究が分野の主流となり、輸送調節が細胞制御機構の一つの階層を構成することの一般性が理解されると予想される。

特定の輸送因子の調節が、一つの基質蛋白質の局在変化を介して、細胞の生理的な変化やがん化を誘導する過程の研究には前例があるが、その数は少ない。今後同様の研究を促し、さらに、一つではなく同時に核移行する一群の蛋白質による細胞制御機構を解析して、核輸送により誘導される細胞内の反応の全体像を解明するためには、輸送因子と細胞の変化を繋ぐ基質蛋白質の大規模な同定が不可欠である。

このような状況を考慮し、以下の目的をもって本研究は計画された。

(1) 研究代表者が以前の研究において確立した核内輸送因子の基質同定方法である SILAC-Tp 法 (文献、研究の方法参照) により、ヒトの 10 種の核内輸送因子と 2 種の両方向性輸送因子に特異的な核内輸送の基質蛋白質を合計 1 千種以上決定する。

(2) importin / や transportin では基質上の結合部位として特異的なシグナル配列がよく知られているが、他の核内輸送因子ではこれが未同定である。これは基質の情報の不足によると考え、本研究で SILAC-Tp 法により同定された基質蛋白質中に共通の構造を見つけ出し、それを利用して、さらに多数の基質を予想・同定する。

(3) 同定された基質蛋白質の生物情報解析により、輸送因子が基質の輸送を介して果たす生物学的な機能を予想する。また、実際に輸送因子の発現調節や機能制御が報告される実験系におい

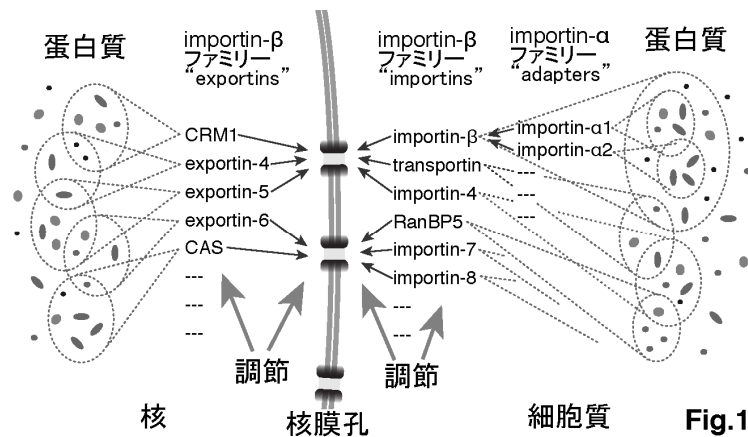


Fig.1

て、輸送の調節による細胞制御機構の実験的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 核内輸送因子特異的基質の大規模同定

培養細胞の安定同位体標識(SILAC)、試験管内核輸送系、質量分析法(LC-MS/MS)を組み合わせた SILAC-Tp 法を用いた(Fig.2)。

試験管内核輸送系は、以下の要素で構成した。

安定同位体アミノ酸を培地に添加して標識した透過性細胞(HeLa)：重い(Heavy)蛋白質で構成される。ジギトニン処理により細胞膜は透過性、核膜の機能は維持。

1 種類の組換え輸送因子

非標識細胞質抽出液：輸送補助因子を含む。非標識 = 軽い(Light)蛋白質を含む。輸送因子は全て除去済。

非標識核抽出液：非標識 = 軽い(Light)基質蛋白質を含む。輸送因子は全て除去済。

ATP 再生系

安定同位体アミノ酸($u-^{13}C_6$ Lys, $u-^{13}C_6$ Arg)で全蛋白質を標識(効率 > 98%)した透過性細胞を使用し、その核内に非標識核抽出液中の蛋白質を輸送する。輸送後、核内蛋白質を抽出して、質量分析法により蛋白質の同定と同時に比較定量する。透過性細胞核内には、内在性の標識蛋白質(Heavy)と輸送された非標識蛋白質(Light)が混在するが、これらは同位体の質量差により区別できるため、両者由来のペプチドの相対的な量比をマススペクトル強度から測定できる。

1 種の輸送因子の添加の有/無が異なる 1 対の輸送反応の結果を比較解析した。LTQ-Orbitrap 型質量分析装置の使用により 2 千種前後の蛋白質の定量値が得られた。実験は 3 回繰り返し、測定値の標準化処理の後、既に基質として報告されている蛋白質の測定値から基質選択の特異性・感度を推定して基質候補蛋白質を選定した。

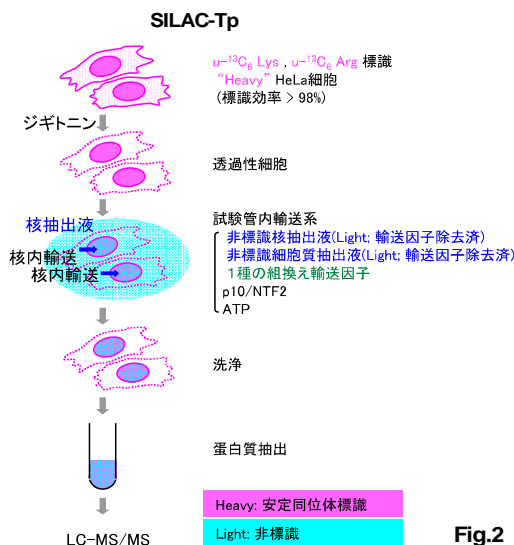


Fig.2

(2) 同定された基質蛋白質群の生物情報解析

遺伝子オントロジーを利用した解析により、基質蛋白質群の機能を推定した。

(3) ビードハ口法による基質蛋白質と輸送因子の結合解析

同定された基質蛋白質を緑色蛍光蛋白質(GFP)融合体として調整し、グルタチオン樹脂ビーズ上でのグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合輸送因子との結合を蛍光顕微鏡で観察した。

基質蛋白質と輸送因子変異体の結合解析では、基質蛋白質を GFP 融合体、輸送因子を GST 及び赤色蛍光蛋白質(RFP)融合体として調整し、GFP、RFP の蛍光強度比を利用した半定量的ビードハ口解析を行なった。

4. 研究成果

(1) SILAC-Tp 法による基質同定実験により、核内への輸送を担う全 12 種の importin ファミリー輸送因子の新規基質蛋白質を多数同定した。既知基質の定量値に基づく見積もりでは、輸送因子ごとに数十種の基質が高い信頼性(85%)で同定され、信頼性の緩和により、それぞれ 200-300 種までの基質候補を得られた。これは目標数を達成しており、過去の報告数を遥かに上回る同定数である。この基質選択の基準の妥当性については、組換え蛋白質を用いた基質と輸送因子 200 組以上での結合実験で評価した。

同定数が十分であることに加え、同一実験条件での多数の輸送因子の基質同定は世界初であり、全 12 種の核内輸送因子の基質蛋白質群を比較するための最初のデータが得られたと言える。遺伝子オントロジーによる解析で、輸送因子は、それぞれの基質蛋白質の機能を介して特定の細胞プロセスに関与することが示された(Fig.3)。この輸送因子-細胞プロセスの対応関係の中では、一つの輸送因子の基質蛋白質群は、関与する細胞プロセスにより複数のグループに分けられる。また、それぞれの輸送因子が基質の機能を介し

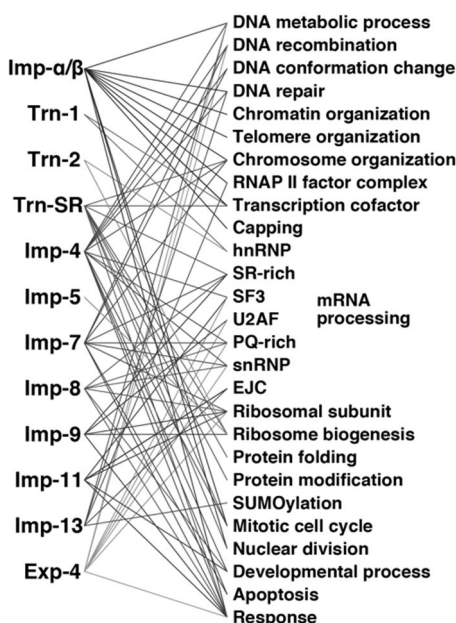


Fig. 3 輸送因子と基質の機能の関係

て関与する細胞プロセスは、部分的には重複しながらもそれぞれが異なる組み合わせである。さらに、一つの基質蛋白質の輸送因子は、ただ1種の場合からほとんど全ての場合まであり、輸送因子特異性には大きな幅がある。これらの詳細な情報は、今後の核輸送の生物学的意義の研究の基礎的知見となる。

(2) 大規模同定された基質のアミノ酸配列を解析したが、期待された新たなシグナル配列は見つからなかった。他の研究者により少例ながら報告された構造解析からも、輸送因子の基質結合はシグナル配列ではなく全体的な高次構造に依存する場合があること、また、輸送因子はその柔軟な構造により多様な形態で基質と結合することが示されていたため、その一般性を実験により検証した。importin ファミリー輸送因子 transportinSR と importin13 は一次構造の相同性が高いにもかかわらず、同定された基質に共通のものが少ない。この2つの輸送因子のうち一方にのみ生物種を超えて保存されるアミノ酸残基を進化トレース法で選択し、その置換変異体を作製して、それぞれ数十種類の同定基質との結合を半定量的ビードハロ解析で調べた。その結果、片方の輸送因子でのみ保存性の高いアミノ酸残基は基質との結合に関与するが、その変異の影響は、アミノ酸残基により、また、基質蛋白質により大きく異なることが明らかとなった。また、基質蛋白質は、結合に関与する輸送因子側のアミノ酸残基によりグループ分けが可能である。以上から、一つの輸送因子の様々な基質との結合形態には予想を超えた多様性があり、その結合様式は数種類に分類できると言える。この新しい見解により、シグナル配列を中心に進められてきた輸送因子-基質相互作用の研究は、基質の高次構造の多様性に対応した相互作用機構の研究へと発展すると期待される。

<引用文献>

- M. Kimura and N. Imamoto. Biological significance of the importin- family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways. *Traffic* 15, 727-748 (2014).
木村 誠、インポーター ファミリータンパク質が媒介する核-細胞質間輸送、*生化学* 87-1, 7-15 (2015).
M. Kimura, K. Thakar, S. Karaca, N. Imamoto, and R. H. Kehlenbach. Novel approaches for the identification of nuclear transport receptor substrates. *Methods in Cell Biology* 122, 353-378 (2014).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Makoto Kimura, Yuriko Morinaka, Kenichiro Imai, Shingo Kose, Paul Horton, and Naoko Imamoto. Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 importin pathways. *eLife* 2017,10.7554/eLife.21184 (2017). (査読あり)

[学会発表](計4件)

木村 誠、森中 祐理子、今井 賢一郎、小瀬 真吾、Paul Horton、今本 尚子、細胞質から核への蛋白質輸送を担う12種類の importin- ファミリー輸送因子の基質の同定、生命科学系学会合同年次大会、2017年
今本 尚子、木村 誠、Importin- ファミリーが構成するヒト細胞の核内輸送経路を網羅した基質蛋白質の解析、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2017年
木村 誠、森中 祐理子、今井 賢一郎、小瀬 真吾、Paul Horton、今本 尚子、細胞質から核への蛋白質輸送を担う12種類の importin- ファミリー輸送因子の基質の大規模同定、第34回染色体ワークショップ・第34回核ダイナミクス研究会、2017年
木村 誠、小瀬 真吾、今本 尚子、SILAC法と蛋白質核輸送再構成系による importin- ファミリー輸送因子の輸送基質の大規模同定、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 2015年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

[その他]

理化学研究所プレスリリース、核タンパク質の輸送経路を大規模決定 - 輸送調節による細胞制御のメカニズム解明に向けて -、2017年2月2日、
http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170202_1/
The nuclear transport option. The identification of substances entering the nuclei of human cells reveals that import molecules have distinct biological roles. *RIKEN RESEARCH*, Fall 2017, p25.

6. 研究組織

- (1) 研究分担者
なし。
- (2) 研究協力者
なし。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。