

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06235

研究課題名(和文) Importin ファミリー核-細胞質間輸送因子の調節による細胞制御機構の解析

研究課題名(英文) Roles of the importin beta family nucleocytoplasmic transport receptors in cellular regulation systems

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分化誘導が可能な種々の培養細胞で、importin / ファミリー輸送因子の発現量を免疫ブロット法により解析し、顕著な発現変動が見られた単球由来THP-1細胞のマクロファージ様細胞への分化過程のプロテオミクス解析を行った。分化前後の総/核蛋白質の定量質量分析の結果、分化後の核内では蛋白質分解に関与する蛋白質が増加し、DNA合成や染色体構築に関わる蛋白質は減少していた。この過程で発現上昇するimportin 5をsiRNA導入により発現抑制したTHP-1細胞の分化前後の総/核蛋白質を同様に定量し、この過程でimportin /importin 5により核内輸送される蛋白質の候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核輸送の研究分野では、importin / ファミリー輸送因子の発現特異性の観察例と輸送因子特異的基質の同定数の著しい増加を受け、核輸送システムの構成変化を介した核内蛋白質成分の調節による細胞制御機構の重要性が認識され始めた。本研究は、特定の細胞分化過程での輸送因子の発現変動解析と核蛋白質のプロテオミクス解析を合わせて行い、また、その核蛋白質成分変化への一つの輸送因子の寄与を解析した点に新規性をもち、今後発展が予想される輸送調節による細胞制御機構の網羅的解析の先行例となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of the importin / family nucleocytoplasmic transport receptors were analyzed by immunoblotting in several types of culture cells that can be inducibly differentiated. The expression levels altered remarkably in the monocyte-derived THP-1 cells during the differentiation into macrophage-like cells. Mass spectrometry-based quantitative proteomics was performed on the total and nuclear protein extracted before and after the differentiation. Proteins involved in protein degradation were increased in the nuclei of the differentiated cells, whereas those participating in DNA synthesis or chromosome organization decreased, consistent with the nature of this differentiation. Similar quantitative proteomics was done on the THP-1 cells with siRNA knock-down of the importin 5, which increases markedly during the differentiation, and candidate cargoes that may be transported by the importin / 5 heterodimer during the differentiation were identified.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核輸送 importin 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現や染色体制御などに関わる核蛋白質は、細胞の活動に応じて核膜上の核膜孔を通過して核-細胞質間を移行し、その多くは輸送因子に基質として運搬される。主な核-細胞質間輸送因子である importin ファミリー蛋白質はヒトに 20 種存在し、細胞質から核内への輸送を担う importin、逆方向の核外輸送を担う exportin、両方向性輸送因子に分類される。輸送因子には基質特異性があり、各々が一群の蛋白質を分担して、ファミリー全体で数千種の蛋白質を輸送する (Fig.1)。輸送因子は基質と直接結合するが、importin のみは 7 種存在する importin ファミリー蛋白質をアダプターとして、より多種類の基質と結合する。

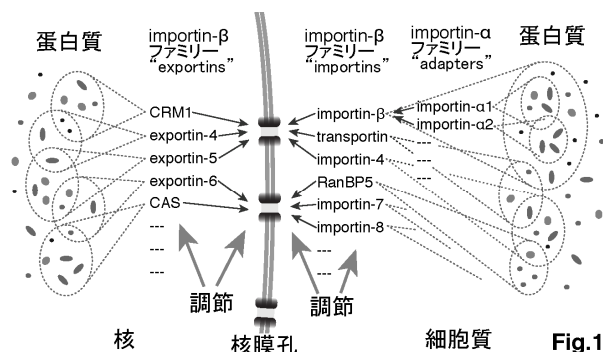


Fig.1

輸送因子の発現の組織・時期特異性、環境に応じた修飾による機能制御、細胞内在性の特異的な阻害因子、疾病での発現異常などが数多く報告される。また、個々の輸送因子の発現抑制や変異体の解析では、細胞や個体に様々な異なる影響や表現型が認められる。これらより、細胞分化や環境応答の過程で核輸送が調節され、一群の蛋白質の核局在変化を介して細胞の生理的变化が誘導される過程が、細胞制御機構の重要な一段階であると予想される。しかし、特異的基質の機能を介して輸送因子が果たす生物学的機能 (発現調節、染色体制御や、分化誘導、環境応答、細胞周期制御など) は、核輸送以外の生命現象の研究で結果的・散発的に発見されてきた。そして、その殆どで輸送因子と生命現象の関連は認められるが、関与する基質蛋白質は特定されておらず、少数の例でただ 1 種類の基質が解析されたに過ぎない。実際には、同時に核移行する一群の蛋白質の機能の総和として細胞活動が誘導され、核移行する蛋白質群の必要に応じた選択のために輸送因子が多数あると予想できる。

核輸送調節による細胞制御機構の研究には、輸送因子の基質の情報が必要であるが、以前は、殆どの輸送因子の基質が極少数しか知られておらず、体系的な解析には不十分であった。これに対し代表者は、独自の核内輸送基質の同定方法 (SILAC-Tp 法、Kimura et al., 2017) により、ヒトの 12 種の核内輸送因子の基質を大規模同定し、輸送因子ごとに信頼性優先で数十種類、同定数優先で 2-300 種類を決定している。輸送因子は基質の機能により、それぞれ異なる複数の核内反応と結び付けられる (Fig.2)。これは、異なる機能をもつ一群の蛋白質の核局在調節で特定の生理的变化が誘導されるという仮説を支持する。複数の研究室で別法による大規模基質同定も進行中であり、さらに多くの基質情報が得られると見込まれていた。ここで、従来、基質上の核移行シグナルとして同一輸送因子の基質に共通する一次配列が特定されてきたが、基質情報の集積に伴い、これが見つからない例が増加し、輸送因子の機能分担を理解する上で、基質認識機構を再考する必要性も生じた。

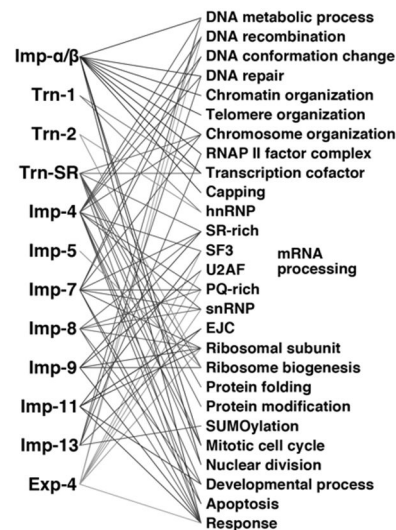


Fig.2 輸送因子と基質の機能の関係

2. 研究の目的

輸送の基本機構の解明の後、核膜孔通過の物理化学的機構、基質認識の構造的基盤などの研究が多く進んだが、核輸送の分野内で輸送の生物学的な意義を問う研究は少ない。輸送因子の生物学的機能は、これ迄、別の分野の特定の蛋白質に注目した研究で発見されてきたため、基質の大多数が無視され、知見は断片的である。本研究は、輸送の調節による一群の蛋白質の核局在の変化を介して細胞の生理的变化が誘導される過程を、複数の異なる核内反応に関与する基質蛋白質の機能的相互作用に注目して理解することを目指す最初の研究である。輸送因子を解析の起点とする細胞制御機構の研究を先導して、知見の体系化を促す。

大規模同定された基質蛋白質は、転写、RNA プロセッシング、複製、修復、組換え、クロマチン制御など、輸送因子ごとに異なる複数の過程に関与する (Fig.2)。これらが同時に核移行し、協働して一つの細胞活動を進める様子の具体的イメージを、遺伝子発現、染色体制御など、あらゆる核内反応の研究へと波及させる。また、得られる知見は輸送因子の異常が見られる多くの疾患の病因解明や輸送因子を標的とする薬剤の開発に役立つことも期待される。

3. 研究の方法

(1) 輸送因子発現変動の解析：分化誘導可能な培養細胞において、importin / ファミリー輸送因子 23 種、輸送関連因子 5 種、および、各分化マーカーの細胞分化過程での蛋白質レベルでの発現変動を免疫ブロットング法により解析した。対象は、マウス筋芽細胞 C2C12 の筋管様細胞への分化、マウス胎児精巣由来 F9 細胞の内胚葉様細胞への分化、ラット副腎由来 PC12 細胞の神経様細胞への分化、ヒト肺由来老化モデル細胞 SVts8 の老化、ヒト白血病由来 HL60 細胞の顆粒球様およびマクロファージ様細胞への分化、ヒト白血病由来 K562 細胞の赤芽球様および単球・巨核球様細胞への分化、ヒト単球性白血病由来 THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化である。

(2) 核局在変化のプロテオミクス解析：THP-1 細胞の分化誘導前後で、それぞれ総蛋白質、核蛋白質を調製し、ラベルフリー定量質量分析法(LC-MS/MS)により解析した。核蛋白質分画法は、代表的な核蛋白質・細胞質蛋白質の特異抗体を用いた免疫ブロットング法により検討して、最適化した。また、ラベルフリー定量は、3~5 回の繰り返し実験により、データの信頼性を確保した。

(3) siRNA 法による輸送因子発現抑制の影響の解析：THP-1 細胞分化過程で siRNA 導入方法と時期を検討し、最適化した。THP-1 細胞分化過程での発現上昇が顕著な輸送因子(importin 5)を発現抑制して、分化誘導前後で(2)と同様のプロテオミクス解析を行った。

(4) 変異輸送因子(transporinSR、importin13)と基質の結合のビードハロ解析：既知の結晶構造に加え、transporinSR と importin13 は一次構造の類似性が高いにも関わらず共通の基質が少ないことを利用した進化トレース法により、これらの輸送因子上の基質結合部位を予想した。その部位にアミノ酸置換変異を導入した輸送因子を赤色蛍光蛋白質(mCherry)およびグルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質として発現・精製した。また、以前に大規模基質同定された基質蛋白質(Kimura et al., 2017)を緑色蛍光蛋白質(GFP)との融合蛋白質として発現する大腸菌の抽出液を調製した。グルタチオン樹脂上に GST-mCherry 融合輸送因子を固定し、大腸菌抽出液中の GFP 融合基質の結合を共焦点顕微鏡で観察し、画像の GFP/mCherry の蛍光強度比から結合強度を半定量した。

4. 研究成果

(1) 免疫ブロット法による培養細胞分化過程での輸送因子の発現解析では、importin / ファミリーとも細胞と分化過程により異なる少数の因子の発現変動が見られた。例えば、PC12 細胞の神経様細胞への分化では importin 5 が発現上昇し、その他はほぼ一定であったが、C2C12 細胞の筋管様細胞への分化では importin 5 は一定で、importin 1 と importin ファミリーの importin4、13、exportin1、2、5 が減少した。また、K562 細胞の赤芽球様細胞への分化では importin 5 が減少したが、単球様細胞への分化では一定である。同様に、HL60 細胞の顆粒球様細胞とマクロファージ様細胞への分化では、数種類の輸送因子の発現変動が異なっていた。検証した 9 つの分化過程では発現変動の見られない輸送因子も多く、限られた輸送因子のみが必要に応じた発現調節を受けるとする仮説が支持される。何れかの分化過程で発現変動の見られた輸送因子は、importin 1、3、4、5、6、importin ファミリーの importin4、5、8、9、11、13、exportin1、2、5、RanBP17 であった。輸送の駆動に関わる因子である RCC1、RanGAP1、RanBP1、NTF2 も分化過程ごとに異なる発現変動を示した。

輸送因子の最も顕著な発現変動が観察されたのは、HL60 及び THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化過程で、どちらも importin9、11、13、RanBP17 の発現が上昇し、importin 1、4、6、importin4、8、exportin2 の発現が低下したが、importin 5 のみは、HL60 で減少したのに対し、THP-1 では顕著に増加した。importin 1 と 5 の交代が見られる(Fig.3)THP-1 細胞を以後の詳細な解析の対象とした。

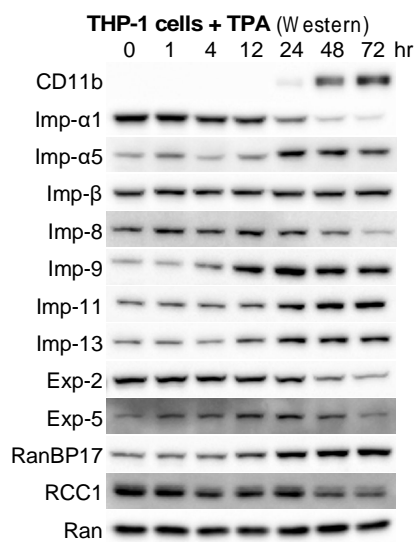


Fig. 3 THP-1 細胞分化誘導時の発現変動

(2) THP-1 細胞の単球様細胞からマクロファージ様細胞への分化は、浮遊細胞から接着細胞への著しい形態変化を伴い、細胞の物理的強度も変化するため、分化前後で代表的な核・細胞質蛋白質が同等に分離される核/細胞質の分画条件を検討して設定した。分化前後の総蛋白質、核蛋白質のプロテオミクス解析の結果、分化後の核内で相対量が 2 倍以上 ($p < 0.05$) に増加した 225

種の蛋白質には蛋白質分解に関与する蛋白質が多く含まれ、0.5 倍以下 ($p < 0.05$) に減少した 139 種の蛋白質には DNA 合成や染色体構築に関わる蛋白質が多く含まれていた (Fig.4)。また、後者は総蛋白質中でも減少していた。THP-1 細胞の分化誘導過程で見られる速やかな細胞増殖停止と核輸送調節の密接な関連が示唆される。

(3) THP-1 細胞の分化過程では importin 5 の発現が上昇する (Fig.3)。分化誘導と同時に siRNA を導入し、importin 5 を発現抑制した細胞で (1) と同様に総蛋白質、核蛋白質のプロテオミクス解析を行った。importin 5 を標的とする 2 種類の siRNA を用いた解析を行い、そのどちらにおいても核内で 0.5 倍以下 ($p < 0.05$) に減少した蛋白質 40 種類を同定した。これらは、この分化過程で importin /importin 5 ヘテロダイマーにより核内輸送される蛋白質の候補である。

また、THP-1 細胞のマクローファージ様細胞への分化過程で発現が減少する importin 1 (Fig.3) の発現誘導が可能な THP-1 細胞の安定細胞株の樹立が完了しており、今後、同様の解析を行う予定である。

(4) 本研究以前に大規模同定された (Kimura et al., 2017) transportinSR の基質中には、核移行シグナルとされる SR ドメインや RSY セグメントをもつもの (Fig.5 の*) は少なく、また、importin13 の基質には核移行シグナルの候補となる共通の配列が見つかっていない。少数ながら報告のある基質との共結晶構造から、これらの輸送因子は多量の基質と様々な異なる部位で結合する可能性があるため、3. 研究の方法 (4) に記した実験法で、これを検証した。

野生型および 4 種の transportinSR 変異体と 36 種の基質蛋白質、また、野生型および 8 種の importin13 変異体と 28 種の基質蛋白質の結合強度の半定量に成功した。どちらの輸送因子においても、結合の低下が見られる変異部位は、それぞれの基質により様々な異なっており、同一輸送因子の基質であっても基質ごとに異なる配位で輸送因子と結合することが示唆された。各変異輸送因子への結合強度の類似性に基づいた基質のクラスター分析 (Fig.5) では、基質をいくつかの境界の曖昧なグループに分けることも可能ではあるが、概して、結合強度の分布は連続的であった。この結果により、共通の核移行シグナル配列をもたない基質の結合配位には、予想以上の多様性があり、基質ごとに異なることが示唆された。

引用文献

Kimura, Morinaka, Imai, Kose, Horton, Imamoto. *eLife* 2017, 10.7554/eLife.21184.

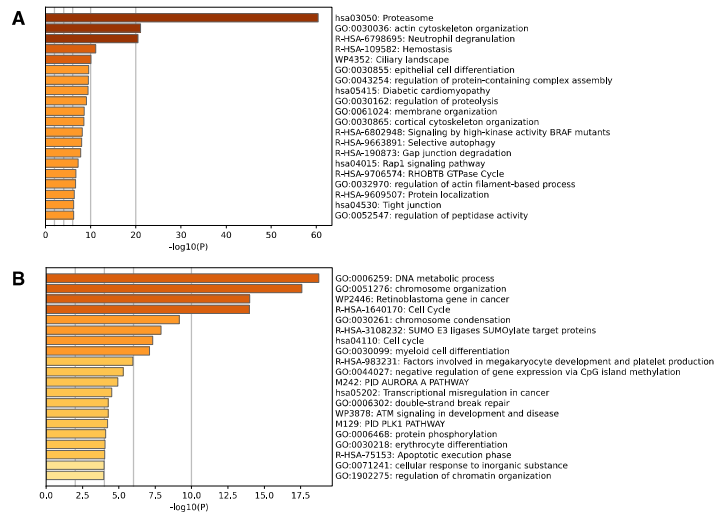


Fig. 4 THP-1細胞分化後の核内で増加(A)・減少(B)した蛋白質の機能エンリッチメント解析(Metascape)

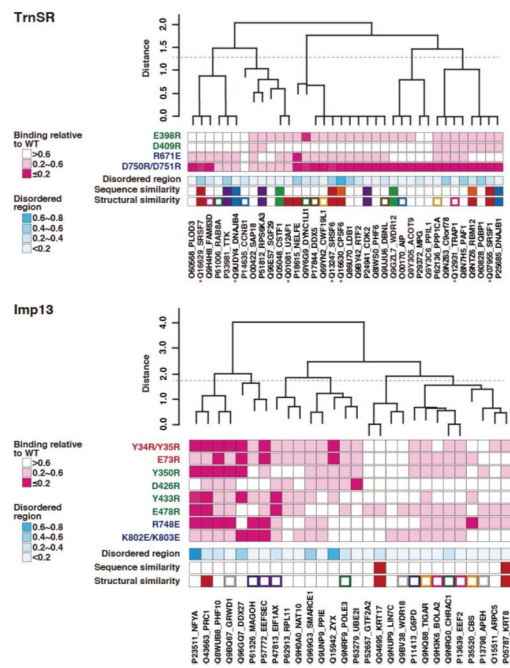


Fig. 5 transportinSR, importin13のアミノ酸置換変異の基質結合への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kimura Makoto, Imai Kenichiro, Morinaka Yuriko, Hosono-Sakuma Yoshiko, Horton Paul, Imamoto Naoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct mutations in importin- family nucleocytoplasmic transport receptors transportin-SR and importin-13 affect specific cargo binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94948-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shotaro Yamano, Makoto Kimura, Yu Chen, Naoko Imamoto, Rieko Ohki	4. 巻 386
2. 論文標題 Nuclear import of IER5 is mediated by a classical bipartite nuclear localization signal and is required for HSF1 full activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2019.111686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今本尚子、木村誠、今井賢一郎
2. 発表標題 核-細胞質間輸送の多様性と役割分担
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------