

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06467

研究課題名(和文) ポストシナプスの核輸送因子インポーチンを介したシナプス可塑性誘導機構の解明

研究課題名(英文) A study on the participation of postsynaptic importin in synaptic plasticity.

研究代表者

板倉 誠 (Itakura, Makoto)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30398581

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)：神経細胞における核輸送因子インポーチン 1の役割について研究を行った。インポーチンファミリーはヘテロ2量体として機能するが、マウスやラット脳ではインポーチン 1は主にインポーチン 3, 4, 7と結合していた。次に結合する転写調節因子を同定したところ、神経疾患の原因遺伝子TDP-43などが含まれていた。インポーチンによる核輸送は低分子量Gタンパク質Ranによって調節されるが、RanのGDP-GTP交換を制御するRCC1およびRanGAP1が神経成長因子シグナルによってリン酸化されることを明らかにした。この結果は様々な神経機能に関わる神経成長因子が神経細胞の核輸送も制御することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会では、加齢による認知症が増加しており、その治療法の開発が求められている。そのためには、記憶や学習の分子レベルでのメカニズム解明が非常に重要である。記憶や学習には、神経細胞間の神経伝達に依存した新規遺伝子の発現が必須であり、その際にはインポーチンファミリーを介した核内へのタンパク質輸送が起きていると考えられる。本研究の研究結果は、記憶や学習に関与する神経成長因子が、インポーチンを介する核輸送も制御している可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The trafficking of proteins between cytoplasm and nucleus through nuclear pore complexes is mediated by importin family. We aimed to clarify the role of importin 1 in neurons. The importin family is known to form heterodimers, and in the rodent brain, importin 1 was mainly bound to importins 3, 4, 7. Identification of transcription factors that bind to importin family in neurons revealed that they contained genes (TDP-43, MeCP2 and rogd1) involved in neurological disorders and neurogenesis. Nuclear transport by importins is regulated by small G protein Ran. It was revealed that RCC1 (RanGEF) and RanGAP1, which control the GDP-GTP exchange of Ran, are phosphorylated by nerve growth factor signaling pathway. This result suggests that nerve growth factors (NGF, BDNF) involved in various neural functions also control the nuclear transport of neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：核輸送因子 インポーチン 神経細胞 転写制御因子 細胞内情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 長期にわたって記憶が成立する(長期記憶)ためには、シナプス伝達が行われた神経細胞の核内で、新規に遺伝子が発現することが必須であるとされている。しかしながら、ポストシナプスにある神経伝達物質受容体から核内への情報伝達を可能とする分子機構は、いまだ十分に理解されているとは言えない。また、長期記憶には、転写調節因子の cAMP response element binding protein (CREB) が重要な働きをしていることは明らかとされているが、他の転写調節因子の関与については不明な点も多い。

(2) 核膜孔を通過するタンパク質の核内への輸送は、インポーチンファミリータンパク質を介して行われることが知られている。我々は、その1つであるインポーチン 1 が、海馬ポストシナプスに局在することおよび AMPA 型グルタミン酸受容体結合膜タンパク質と結合していることを見出していた。そこで、インポーチン 1 が、シナプス入力をポストシナプスから核内へと伝達している有力な候補分子と考え本研究を行った。

## 2. 研究の目的

長期記憶の成立時には、神経細胞のタンパク質組成やシナプス形態の長期的な変化が起こることが知られている。そのためにはシナプス入力を受けた神経細胞が、適切な転写制御により新規に遺伝子を発現することが必要であるが、シナプス入力依存的な核内への情報伝達機構は、いまだ十分には理解されていない。我々は、核輸送タンパク質インポーチン 1 が、微小管を介する逆行性の輸送やシナプスの形態変化に関与する可能性を示す実験結果を得ていた。そこで本研究では、神経細胞のポストシナプスに局在するインポーチン 1 や神経細胞に発現する他のインポーチンファミリー分子が、脳機能において、どのような役割を果たしているのかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ラットおよびマウス脳におけるインポーチン 1 結合タンパク質の同定

ラットおよびマウスから十分な麻酔の後、脳を採取した。採取した前脳あるいは海馬を、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジナイズ溶液は、様々な界面活性剤 (Triton X-100, CHAPS, n-Dodecyl-β-D-maltoside など) を用いて可溶化後、遠心分離によって上清を回収した。回収した上清をサンプルとして、インポーチン 1 抗体を結合した磁気ビーズを用いて免疫沈降実験を行った。免疫沈降されたタンパク質をプロテアーゼ (トリプシン, Lys-C) で切断後、切断したペプチドを質量分析器 (LC-MS/MS, EASY-nLC 1000, Q Exactive, Thermo Fisher Scientific) を用いて解析し、共免疫沈降されてきたタンパク質を同定した。また同定されたタンパク質のウエスタンブロットによる確認も行った。質量分析によるタンパク質の同定は、研究分担者の小寺義男教授にお願いした。

### (2) インポーチン 3, 4, 7 に結合する転写調節因子の同定

インポーチン 3, 4, 7 の部分ペプチドを化学合成し、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) にコンジュゲーションした。これを抗原としてウサギに免疫を行った。次に、ウサギから得た抗血清から、それぞれの抗原ペプチドを結合したセファロースを用いて、抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を精製した。得られた抗体を用いて、(1)と同様にそれぞれのインポーチン結合タンパク質を免疫沈降実験と質量分析によって同定した。

### (3) リン酸化プロテオームによる核輸送関連タンパク質のリン酸化部位の同定

マウス大脳皮質および線条体を、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートした。得られたホモジネート溶液を界面活性剤により可溶化した後、遠心分離を行い、上清を回収した。次に、上清に含まれるタンパク質をプロテアーゼ (トリプシン, Lys-C) でペプチドに切断した後、リン酸化されているペプチドを Titansphere Phos-TiO キット (ジーエルサイエンス) を用いて濃縮・回収した。回収したリン酸化ペプチドを、LC-MS/MS を用いて分析した。質量分析によるペプチド配列の同定は、研究分担者の小寺義男教授にお願いした。

### (4) 低分子量 G タンパク質 Ran 制御因子の翻訳後修飾の解析

神経モデル細胞 PC12 細胞を、神経成長因子 NGF (100 ng/ml) で 30 分間処理した。また PI3 キナーゼ阻害剤 (500 nM Wortmannin), MAPK キナーゼ阻害剤 (5 μM U0126) を添加した後に、NGF 処理を行った PC12 細胞も用意した。それぞれの細胞をリン酸バッファーで洗浄後、抽出液を用いて回収し、ウエスタンブロットによる解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ラットおよびマウス脳におけるインポーチン 1 結合タンパク質の同定

インポーチンファミリーは、ヘテロ二量体として機能すると考えられている。インポーチン 1 抗体による免疫沈降物を LC-MS/MS で解析したところ、ラットやマウスの海馬では、主にインポーチン 3, 4, 7 とインポーチン 1 が二量体を形成していることがわかった。インポーチン 1 とインポーチン 4 の結合を、ウエスタンブロットで確認した結果を示す (図 1)。

またインポーチン 1 は、バッファー中に GTP S を添加することで低分子量 G タンパク質 Ran の構造を GTP 結合型に維持すると、Ran, RanGAP1, Ranbp2 (SUMO E3 ligase) といった Ran 関連タンパク質と安定な複合体を形成することがわかった。これに対し GDP を加えて Ran を GDP 結合型にすると複合体は解離した。

また、RanGAP1 は SUMO 化されるタンパク質と知られているが、インポーチン 1 抗体による免疫沈降物には、UBC9 (SUMO E2 ligase) も含まれていた。

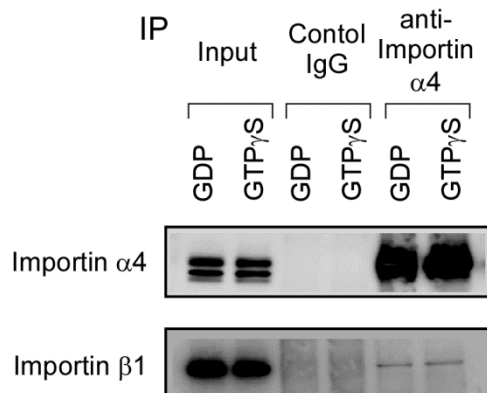


図1. マウス脳サンプルの免疫沈降実験

### (2) インポーチン 3, 4, 7 に結合する転写調節因子の同定

神経細胞において、インポーチン 1 を含むヘテロ 2 量体が、核内へ輸送しているタンパク質 (転写調節因子など) を同定するために、インポーチン 3, 4, 7 抗体による免疫沈降物の LC-MS/MS による解析を行った。

インポーチン 4 抗体の免疫沈降物には、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症に関連する RNA 結合タンパク質 FUS および転写やスプライシングの調節因子である TDP-43 が含まれていた。また、ヒストンや多くの RNA スプライシングに関与するタンパク質も含まれていた。さらに、ヒストンを脱アセチル化する酵素である Sirtuin 2 も含まれており、エピゲノムの調節因子である Sirtuin 2 もインポーチンを介して核内へと輸送されていることが示唆された。

インポーチン 3 抗体の免疫沈降物には、脆弱 X 症候群の原因遺伝子 FMR1 に結合する転写促進因子 Pur-alpha や神経発生に関与している転写調節因子 rogd1 などが含まれていた。また、インポーチン 4 と同様に、ヒストンやスプライシング関連タンパク質も含まれていた。

次に、インポーチン 7 抗体による免疫沈降物を解析したところ、リン酸化タンパク質に結合して、細胞内情報伝達系を制御している 14-3-3 タンパク質が 5 種類含まれていた。また、インポーチン 3, 4 とは異なり、転写調節因子やスプライシング関連タンパク質はあまり含まれていなかった。この結果は、核内へ輸送される積荷タンパク質は個々のインポーチンごとにかなり異なっていることを示唆している。

さらに、神経モデル細胞である PC12 細胞から核分画を調製し、インポーチン 1 抗体で免疫沈降実験を行ったところ、レット症候群の原因遺伝子 Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) や最初期遺伝子 c-Fos のプロモーター領域に結合する Interleukin enhancer-binding factor 2 (ILF2) などの転写調節因子が免疫沈降物に含まれていた。

### (3) 核輸送因子インポーチンファミリーや核タンパク質のリン酸化部位の同定

リン酸化は、細胞機能を可逆的に制御しているタンパク質翻訳後修飾の 1 つである。そこでインポーチンを介する核への輸送もまたリン酸化によって制御されていると考え、脳タンパク質の網羅的なリン酸化部位の同定を行った。マウス大脳皮質からはリン酸化ペプチドを約 3000 種類、線条体からは約 1000 種類同定した。

インポーチンファミリーでは、インポーチン 4 のリン酸化部位を 2 ヶ所同定できた。インポーチンファミリーと共免疫沈降してきたタンパク質としては、RanGAP1, Ranbp2, Sirtuin 2, MeCP2, Serine/arginine repetitive matrix protein 1 (SRRM1), Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Hnrnpk), RNA-binding motif protein, X chromosome (Rbmx) などがマウス脳内でリン酸化されていることを明らかにした。

これらのタンパク質のリン酸化が、シナプス伝達に依存して変動するのか、またインポーチンファミリーとの結合を制御しているかについては今後検討する必要がある。

### (4) PC12 細胞を用いた低分子量 G タンパク質 Ran 制御因子の翻訳後修飾の解析

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF) の作用により神経突起を伸ばして神経細胞様の形態を形成するため神経細胞モデルとして用いられている。そこで PC12 細胞を NGF で 30 分間処理後に、Ran の GDP-GTP 交換を制御している RCC1 (RanGEF) および RanGAP1 の翻訳後修飾が変化するかをウエスタンブロットにより検討した (図 2)。

RCC1, RanGAP1 を示すシグナルは、NGF 処理によって上方にシフトすることがわかった。また、

このシフトは PI3 キナーゼ阻害剤および MAPK キナーゼ阻害剤によって見られなくなることから、TrkA 受容体を介する細胞内情報伝達系の下流で RCC1 および RanGAP1 はリン酸化されると考えられる。この RCC1 と RanGAP1 に起きるリン酸化が、Ran の GDP-GTP 交換を制御しているかについては今後検討する必要がある。

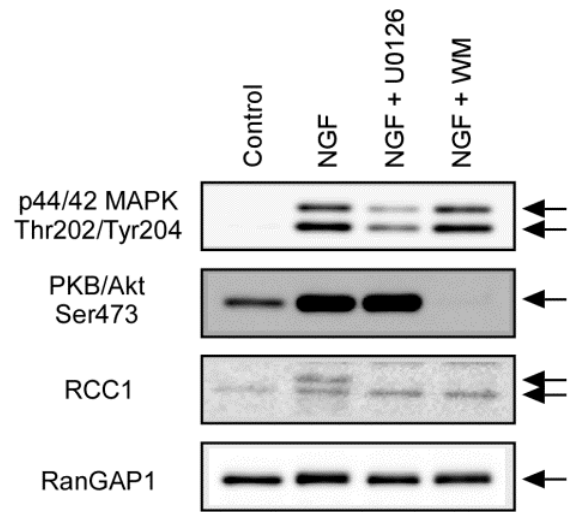


図2. NGF処理PC12細胞のウェスタンブロット

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Konno Ryo, Matsui Takashi, Ito Hiroaki, Kawashima Yusuke, Itakura Makoto, Koderu Yoshio	4. 巻 550
2. 論文標題 Highly accurate and precise quantification strategy using stable isotope dimethyl labeling coupled with GeLC-MS/MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 37 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.101	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 -

1. 著者名 Nakagawa Yuzuru, Matsui Takashi, Konno Ryo, Kawashima Yusuke, Sato Toshiya, Itakura Makoto, Koderu Yoshio	4. 巻 548
2. 論文標題 A highly efficient method for extracting peptides from a single mouse hypothalamus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 155 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.041	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 紺野 亮, 伊藤 大晃, 樋口 雅崇, 松井 崇, 佐藤 俊哉, 板倉 誠, 小寺 義男
2. 発表標題 水中拘束ストレスマウスの大脳皮質を対象とした包括的なタンパク質存在様式の比較分析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会、日本電気泳動学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田 貴樹, 紺野 亮, 板倉 誠, 松井 崇, 小寺 義男
2. 発表標題 脳の機能状態モニタリングを目指した脳脊髄液の詳細な比較分析への取り組み
3. 学会等名 日本プロテオーム学会、日本電気泳動学会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	小寺 義男  (Kodera Yoshio)  (60265733)	北里大学・理学部・教授    (32607)	

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
---------	---------