

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15044

研究課題名（和文）核 - 細胞質間の輸送因子による脳機能制御と精神疾患の発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism in neuropsychiatric disorders by nuclear-cytoplasmic transport factors

研究代表者

盛山 哲嗣 (Moriyama, Tetsuji)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：50627990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：精神疾患のほとんどは、原因となる分子機構が未だ不明確である。本研究の目的は、importin-1による脳機能の制御機構を理解し、その発現低下が引き起こす精神疾患に似た行動異常の発症機序を明らかにすることである。本研究では特にエストロゲン受容体（Estrogen receptor- α ；ER α ）の細胞内分布とシャトリングに着目した。本研究により、importin-1とTransportin-2はER α の核 - 細胞質間シャトリングと細胞質保持を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ER α は、主に核に存在する核内受容体であるが、核 - 細胞質間を常にシャトルしており、そのシャトルがエストロゲンシグナル伝達経路にとって非常に重要である。また、エストロゲンは、脳の海馬で高濃度に存在しており、スパインの密度と構造の変化を引き起こすことで認知機能を高める作用があることが報告されている。本研究により、ER α の核 - 細胞質間シャトリングメカニズムの解明や乳がん及び精神疾患の治療法の開発や創薬への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In most of the neuropsychiatric disorders, their pathogenic mechanisms are still unclear. Our aim is to clarify the regulation of brain function by importin-1 and the pathogenesis of psychiatric-like behavioral abnormalities caused by its decreased expression. In this study, we mainly focused on the subcellular distribution and shuttling of estrogen receptor- α (ER α). Our research has demonstrated that Transportin-2 controls ER α nucleocytoplasmic shuttling by cytoplasmic retention and inhibition of importin-1-dependent nuclear import, and thus plays a critical role in the proper regulation of the biological functions of ER α .

研究分野：分子生物学

キーワード：核 - 細胞質間輸送因子 エストロゲン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

記憶や学習などの高次脳機能を発現及び維持するためには、個々の神経細胞の細胞体にある核と末端のシナプス部位との情報伝達により、シナプス可塑性を生み出すことが非常に重要となる。細胞の内部では、外界環境からのシグナルは多種多様なシグナル伝達経路を経て、細胞質から核へと伝えられる。転写因子や核の構成因子など、核で働くタンパク質の多くは、その分子内に核内移行配列を持っている。そして、その配列を受容体である importin α (karyopherin α : KPNA) が認識する。さらに、輸送担体 importin β 1 が結合することで三者複合体を形成し、エネルギー依存的に核へと選別輸送される。これまでに importin ファミリーは、約 30 種類同定されており、膨大な情報分子に対して各々の輸送因子が特異的に輸送を行う。その中で importin α ファミリーは、神経細胞でスパイン上に存在し長期増強の誘導などで核内へ移動することから、シナプス部位の情報分子を核内へ伝達する役割を持つことが示唆される。以前、importin α 1 (別称: karyopherin α 1) に着目し、importin α 1 遺伝子欠損マウスを作製して行動解析を行った。その結果、importin α 1 ホモ及びヘテロ欠損マウスは、薬物や社会ストレス負荷により、ヒトの認知症、学習障害、うつ病、統合失調症などの精神疾患と似た行動異常を呈した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、importin α 1 による脳機能の制御機構を理解し、その発現低下が引き起こす精神疾患に似た行動異常の発症機序を明らかにすることである。これまでに importin α 1 遺伝子欠損マウスが、エストロゲンシグナル経路の活性低下により雌生殖器の低形成や出産異常を示すことを明らかにした。エストロゲンは脳機能の改善作用を有することから、本研究では特にエストロゲン受容体 (Estrogen receptor- α : ER α) の細胞内分布とシャトリングに着目した。

3. 研究の方法

ER α の核-細胞質輸送に必要な領域を探るため、ER α の欠失変異体やアミノ酸置換変異体を発現する発現ベクターを作製した。さらに、GST-pulldown assay などを用いて importin ファミリーと ER α の相互作用と、in vitro transport assay を用いた importin α による ER α の核内輸送活性を調べた。一方で ER α の細胞質局在については、約 20 種類ある importin β ファミリーをターゲットとした siRNA を用いて ER α の細胞質局在に必要な因子の特定を目指した。

4. 研究成果

ER α の核局在化シグナル (NLS) は、DNA-binding domain と hinge region の範囲にある。ER α の核内輸送に必要な不可欠なアミノ酸を調べるために、GFP タグをつけた ER α と NLS のアミノ酸を置換した変異体の発現ベクターを作製した。その結果、野生型 ER α は主に核に局在し、一方で NLS 内に 3 箇所ある塩基性アミノ酸クラスターのうち、両末端をアラニンに置換した変異型 ER α (ER α -mNLS) は細胞質側に多く確認された。しかしながら、HA タグをつけた ER α -mNLS は、核で多く確認された。以上の結果から、ER α は積極的な輸送と受動的な拡散により、核と細胞質間をシャトルしていることが示唆された。

次に、ER α の積極的な核内輸送をさらに調べた。ER α の核内輸送に NLS の塩基性アミノ酸が重要であることから、ER α は塩基性アミノ酸に富んだ NLS を認識する importin α ファミリーを介した核内輸送されることが予想された。そこで ER α と代表的な importin α (importin α 1、 α 2、 α 4) との相互作用を GST-pulldown assay により調べた。その結果、ER α は importin 4 と特に強く結合し、importin α 1 とは 17 β -estradiol (E2) 依存的な相互作用が確認された。一方で、ER α -mNLS と importin α との結合能は低下していた (図 1)。さらに in vitro transport アッセイにより ER α の NLS 領域の核内輸送活性を調べたところ、importin α 4/importin β 1 により核内へ輸送されていることが確認された。一方で、変異型 NLS は核内輸送が確認されなかった。以上の結果から、importin α 4 が ER α の NLS 領域の塩基性アミノ酸クラスターを介して認識し、ER α /importin α 4/importin β 1 を形成して、積極的な核内輸送されることが明らかになった。

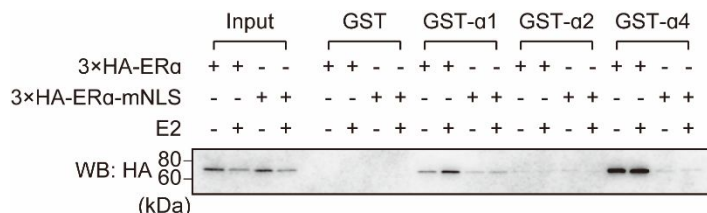


図 1. GST-pulldown assay による importin α と ER α の相互作用

E2 添加による ER α の細胞内分布への影響を調べた。HA-ER α は、E2 添加後も核局在を示したが、HA-ER α -mNLS は添加前の主に核分布から細胞質分布へと変化が確認された。ER α の核外輸送因子として importin β ファミリーの CRM1 が報告されていることから [1]、CRM1 と HA-ER α -mNLS の結合と CRM1 阻害剤である leptomycin B (LMB) 存在下での HA-ER α -mNLS の細胞内分布を調べた。その結果、両者の結合は E2 により強化されるが、LMB による HA-ER α -mNLS の細胞内分布の変化に阻害効果は確認されなかった。そこで、他の importin β ファミリー

ーが E2 依存的 ER α -mNLS の細胞質分布に関与することが考えられることから、importin β ファミリーをターゲットとした siRNA を用いて、各輸送因子が発現抑制された細胞内で HA-ER α -mNLS の挙動を観察した。その結果、Transportin 2 (TNPO2) が発現抑制された細胞で、ER α -mNLS の細胞質分布の抑制がみられることがわかった (図 2)。

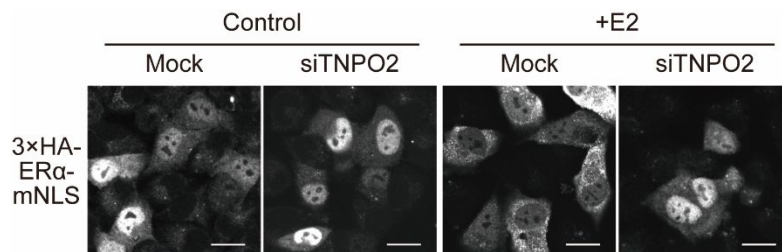


図 2. Transportin 2 の発現抑制が E2 依存的 ER α -mNLS の細胞質分布に与える影響

TNPO2 は、核-細胞質間輸送での核内への輸送因子として報告されている[2]。E2 依存的に TNPO2 と ER α -mNLS の結合量増加が確認されたが、核内で豊富に存在する RanGTP を加えると両者の結合の低下がみられることから、TNPO2 が ER α -mNLS を細胞質側に輸送していないことがわかった。しかしながら、TNPO2 と結合できない ER α -mNLS の変異体や競合阻害ペプチドでも細胞質分布の抑制がみられることから、TNPO2 は細胞質側で E2 依存的に ER α -mNLS を留める働きを持つことが示唆された。また、TNPO2 と野生型 ER α の GST-pulldown assay の結果、TNPO2 が ER α の NLS 領域で importin α と競合して結合することもわかった。細胞内の ER α の細胞内分布を調べると、TNPO2 の強制発現によりコントロールと比べると核内 ER α 量の低下がみられ、一方で siRNA を用いた TNPO2 の発現抑制により核内 ER α 量の増加が確認された。

以上のことから、importin α /importin β 1 と Transportin 2 が ER α の核-細胞質間の輸送制御に関与していることが明らかになった。今後は、本研究結果を基にして脳機能と importin ファミリーによる ER α の核-細胞質間シャトリングとの繋がりをさらに明らかにする予定である。

引用文献

- [1] Maruvada, P., Baumann, C. T., Hager, G. L. & Yen, P. M. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* **278**, 12425-12432, doi:10.1074/jbc.M202752200 (2003).
- [2] Twyffels, L., Gueydan, C. & Kruys, V. Transportin-1 and Transportin-2: Protein nuclear import and beyond. *Febs Lett* **588**, 1857-1868, doi:10.1016/j.febslet.2014.04.023 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Moriyama Tetsuji, Yoneda Yoshihiro, Oka Masahiro, Yamada Masami	4. 巻 10
2. 論文標題 Transportin-2 plays a critical role in nucleocytoplasmic shuttling of oestrogen receptor-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18640-18640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75631-3	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 盛山 哲嗣、米田 悦啓、岡 正啓、山田 雅己
2. 発表標題 Analysis of molecular determinants of estrogen receptor mobility
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本 洋一、伊藤 大一、森田 真規子、永井 理博、盛山 哲嗣、Kate L. Loveland、米田 悦啓、疋田 貴俊、岡 正啓
2. 発表標題 核輸送分子importin 4ノックアウトマウスが示す統合失調症関連症状の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Moriyama T, Yoneda Y, Oka M, Yamada M.
2. 発表標題 Analysis of molecular determinants of estrogen receptor mobility
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakurai K, Itou T, Morita M, Moriyama T, Miyamoto Y, Oka M, Hikida T
2. 発表標題 Adolescent stress exacerbates behavioral deficits in Kpna1 knockout mice
3. 学会等名 The 12th Federation of European Neuroscience Societies Forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井 航輝, 宮本 洋一, 盛山 哲嗣, 森田 真規子, 伊藤 大一, 岡 正啓, 疋田 貴俊
2. 発表標題 核輸送因子Kpna1ノックアウトマウスにおける行動異常の環境による増悪
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Moriyama T, Yoneda Y, Oka M, Yamada M.
2. 発表標題 Transportin-2 plays a critical role in nucleocytoplasmic shuttling of oestrogen receptor-
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------