

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06670

研究課題名（和文）輸送因子importin の熱感受性と新規ストレス応答機構の探索

研究課題名（英文）Stress response mechanism through temperature sensitivity of Importin alpha

研究代表者

小川 泰（Ogawa, Yutaka）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：70624956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：真核細胞では、必要な物質のみを選択的に核または細胞質へ輸送する仕組みが備わっている。申請者は、温度領域を外れるとImportin / 依存的な核内輸送経路は、他の輸送経路よりも低い温度閾値で停止することを見出した。これは、細胞がストレスに対応するために、選択的に停止させていると考えられる。この温度閾値を決定する要因は、Importin の温度感受性であり、恒温動物においてはその体温に応じて変性温度が変化することを見出した。また、輸送制御によって変化する核内タンパク質群を網羅的に正確に分析するために、これらを解析するために必要な新規の核タンパク質分画法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、単純にタンパク質を核内へ輸送するだけのシステムと考えられていた核内輸送が、熱ストレスに対し段階的に輸送制御を行うことを明らかにした。そして、その仕組みを分子の熱安定性の観点から明らかにした。また、核内タンパク質をより正確に取得する手法を確立した。これらの成果は、環境ストレスに対し様々な細胞内タンパク質が局在変化をして応答する仕組みの解明につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Eukaryote cells have capabilities to translocate their intracellular proteins into the nucleus or the cytoplasm according as needed. We found that Importin / dependent nuclear import pathway is arrested at a lower temperature threshold under heat stress conditions, and this temperature threshold was determined by the temperature at which Importin denatures. Interestingly, denaturing temperatures of thermo-sensitive Importin subtypes in warm-blooded animals changed according to their body temperatures. Next, we established new methods to separate nuclear soluble fractions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核-細胞質間輸送 熱ストレス 核画分分画法

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、必要な物質のみを選択的に核内または細胞質へ輸送する仕組みが備わっている。これにより、核内に隔離されたゲノムから必要な遺伝子発現を行うことができる。申請者らは、正常な温度領域を外れると段階的に輸送経路が停止していくことを見出した。特に Importin α/β 依存的な核内輸送経路は、他の輸送経路よりも低い温度閾値で停止することから、細胞がストレスに対応するために、選択的に停止させていると考えられる。そこで、この輸送停止が細胞にもたらす影響を明らかにし、新規のストレス応答機構を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

ヒトを含む多くの生物の細胞は、非常に狭い温度領域において、恒常性や増殖能を維持している。熱ストレスなど、その温度領域を外れると、細胞は様々な分子応答を介して、このタンパク質毒性環境に対応する。申請者は、細胞の機能維持に必須である核-細胞質間輸送システムが温度上昇に対し、段階的に調整されることを発見した。その中で輸送因子 Importin α ファミリーの熱変性が大きな役割を果たすことを見出した。本研究では、Importin α の熱感受性と体温の関係、そして Importin α の熱感受性が細胞にもたらす影響を明らかにし、新規のストレス応答機構を明らかにしていくことを目的として研究を行った。

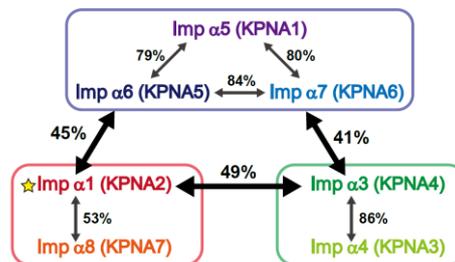


図1 ヒト Importin α ファミリー

本研究では、Importin α の熱感受性と体温の関係、そして Importin α の熱感受性が細胞にもたらす影響を明らかにし、新規のストレス応答機構を明らかにしていくことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

主な実験手法は以下の2つである。

サーマルシフトアッセイ：Importin α ファミリーの熱安定性を明らかにするために用いた。これは、タンパク質の疎水領域に結合し蛍光を発する SYPRO-Orange 存在下で対象タンパク質溶液の温度を上昇させ、蛍光量の変化を、リアルタイム PCR 装置を用いて測定し、変性温度を決定する手法である。

新規核画分画法：従来の手法では正確に分画できなかった核画分を取得する方法を構築した。詳細は「4. 研究成果」に記載した。

4. 研究成果

体温の異なる動物における Importin α ファミリーの熱感受性

Importin α による選択的な輸送経路の遮断は、Importin α ファミリーが6~7種類に分岐した高等生物でのみ備わった機構であると予想される(図1)。適正温度から数°C高い温度で Importin α が変性することが細胞にとって重要であれば、それぞれの生物種の体温に応じて変性温度が異なるはずである。そこで、体温が40~42°Cとヒトより4°C程度高いニワ

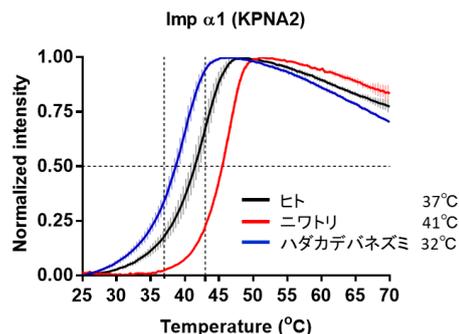


図2 体温の異なる動物の Importin α 1 の熱安定性

トリの KPNA2 の変性温度を測定すると、ヒトより 4~5°C 高いことが分かった。また、ヒトより体温が 5°C 低いハダカデバネズミの KPNA2 の変性温度は、ヒト KPNA2 よりも 4°C 低かった。このことから、Importin α ファミリーの熱感受性は、適正体温に応じて進化的に保存されていることが示唆された。

ニワトリ Importin α 発現ヒト細胞株の熱ストレス条件下での核内タンパク質組成の解析

40~42°C 程度の熱ストレス環境下において熱感受性 Importin α サブタイプは変性してしまうため、一部の核タンパク質の核内輸送が選択的に停止すると考えられる。具体的にどのようなタンパク質がそれに該当するかを調べるため、ヒトまたはニワトリの Importin α を発現する細胞株を樹立した。図 2 のようにニワトリ Importin α を発現する細胞株では、熱ストレス環境下でも変性せず Importin α/β 依存的輸送にほとんど影響がないはずである。43°C で 1 時間保温した際の、これらの細胞株の核内タンパク質を網羅的に定量し比較した。しかし、ほとんど違いは見出せなかった。これは、今回、用いた市販の核タンパク質の分画法では、局在が変化することが期待される可溶性核タンパク質の多くが失われるためであることが分かった。

従来の核画分取得法の問題点と新しい手法の確立

そこで、細胞膜に豊富なコレステロールに特異的な界面活性剤である Digitonin を用いた新規の核画分の分画法を開発した。核画分の分画法は一般的に、細胞膜の選択的透過処理を行い、次に細胞質画分の除去を行う。最後に核膜を破壊し、核内の画分を取り出すという、シンプルな手順で行われる。しかし、以下の 3 点の大きな問題点がある。①分画を低温で行うとその間に一部の核タンパク質の局在が変化する可能性がある。②細胞膜の透過処理を行う際、核膜の完全性を維持する必要がある。③核膜の完全性が維持できても絶えず核膜に存在する核膜孔複合体から核内タンパク質が作業過程で流出してしまう。そこで、①と②の問題を解決するため、細胞膜透過処理に用いる Digitonin 溶液の濃度と温度、そして処理する細胞密度を検討し、最適化を行った。その結果、生理的温度に近い温度条件下において 90% 以上の細胞で核膜の完全性を維持しつつ細胞膜だけを透過処理できる条件を決定できた(図 3)。この

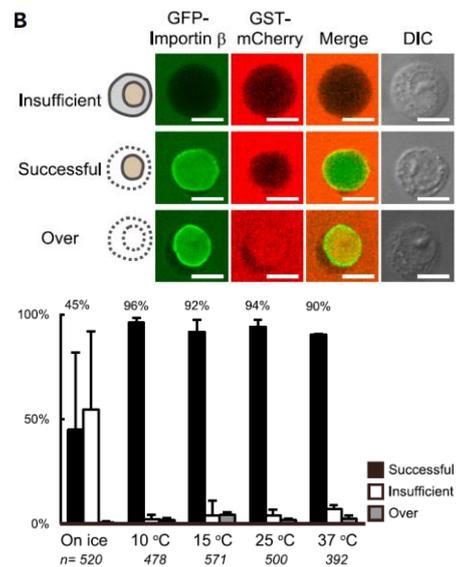


図 3 選択的細胞膜透過処理の条件検討
Ogawa and Imamoto 2021 より転載

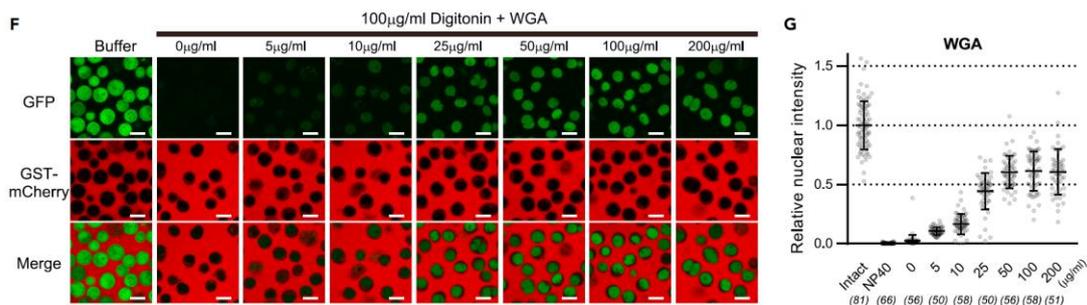


図 4 WGA による GFP の核外漏出の抑制効果
Ogawa and Imamoto 2021 より転載

手法により、従来の市販の分画キットによる分画と比較して、より細胞内局在を反映した分画が可能になった。

次に、③の問題にも取り組んだ。核膜孔複合体を介した核内からの漏出は、たとえ核膜の完全性が保たれていても、分画作業過程で起こる。そこで、コムギ胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin WGA) というレクチンを用いて、核膜孔複合体の物質通過を抑制する方法を考案した。細胞膜透過に用いる Digitonin 溶液に WGA を加えることにより、細胞膜透過と同時

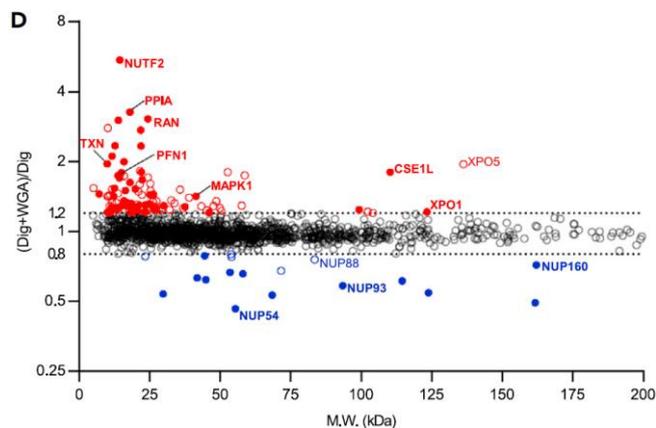


図5 WGAによる低分子量タンパク質の核外漏出の抑制効果
Ogawa and Imamoto 2021 より転載

に核膜孔複合体の物質通過も抑制する(図4)。用いる WGA はビオチン化したものを用いることで、最終的に取得した核画分から除去することもできる。比較定量質量分析により、WGA 添加の効果を確認すると図5のように、低分子量タンパク質の核外への流出が抑制されたことが確認できた。この方法により、可溶性核タンパク質群を高効率で短時間に取得することができるようになった。

Importin α 安定化因子の探索

細胞内の安定化因子を同定するために、細胞質において Importin α に結合するタンパク質を質量分析により網羅的に同定した。その結果、Importin β に次いで、特異的に結合する因子をいくつか発見したが、Importin α を安定化させる機能を見出すことが出来なかった。今後も引き続き、解析を進めたいと思う。次に、タンパク質安定化に寄与することが報告されている低分子化合物群に着目した。その結果、ポリアミンが Importin α の失活を抑制する化合物を見出した(図6)。

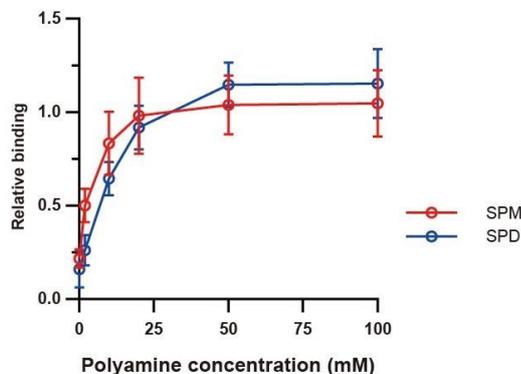


図6 ポリアミンによる Importin α の安定化

まとめ

これまでのところ、Importin α の熱感受性により影響を受ける核タンパク質の同定は完了していないが、それに必要な技術を構築することが出来た。一方で、Importin α を安定化する因子としてポリアミンのような低分子化合物の働きも明らかになった。ポリアミンは癌細胞で数 mM ~ 数十 mM と高濃度で存在することが知られている。この結果は、細胞の種類によって Importin α の安定性に大きな違いがあることを示唆している。今後の課題としては、Importin α の安定性に影響を与えるタンパク質の同定と、Importin α/β 依存的核内輸送のストレス応答によって影響を受ける核タンパク質の群の同定と、細胞への影響を引き続き明らかにしていく必要がある。

引用文献

Ogawa Y, Imamoto N. Methods to separate nuclear soluble fractions reflecting localizations in living cells. *iScience*. 2021 24,103503.

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 Ogawa Yutaka, Imamoto Naoko	4. 巻 24
2. 論文標題 Methods to separate nuclear soluble fractions reflecting localizations in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103503 ~ 103503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103503	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 小川 泰	4. 巻 4月号 Vol.40 No.6
2. 論文標題 生細胞での局在を反映した核可溶性画分の分画法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 933-939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 泰, 今本 尚子
2. 発表標題 生細胞の局在を反映した核・細胞質可溶性画分の分画法
3. 学会等名 第74 回細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Ogawa, and Naoko Imamoto.
2. 発表標題 Establishment of a new nuclear extraction protocol
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 泰, 今本 尚子
2. 発表標題 Importin ファミリーによる温度依存的な核 - 細胞質間輸送制御
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学第71回日本細胞生物学会合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡 咲恵, 小瀬 真吾, 小川 泰, 今本 尚子
2. 発表標題 熱ストレス時における運搬体分子Hikeshi とHSP70の結合メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 核可溶性タンパク質の新規分画方法	発明者 小川 泰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/44140	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 核可溶性タンパク質の新規分画方法	発明者 小川 泰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-200641	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------