

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24247036

研究課題名(和文)核輸送因子インポーター研究を基盤とする高次生命機能制御の統合的理解

研究課題名(英文)An integrative understanding of physiological processes based on the functional analysis of nuclear transport factors, importins

研究代表者

米田 悦啓 (Yoneda, Yoshihiro)

独立行政法人医薬基盤研究所・その他部局等・その他

研究者番号：80191667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は高等真核生物で多様化が見られる「核 細胞質間輸送制御」の視点から様々な高次生命現象を理解することである。特に高等真核生物で多種類存在する核輸送因子importin ファミリー分子の多機能性に着目して研究を行い、核輸送制御が細胞老化、細胞分化、細胞内シグナル伝達など多くのプロセスにおいて、重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In higher eukaryotes, the nucleocytoplasmic transport of proteins is fine-tuned by multiple mechanisms, including the diversification of transport pathway. Here, we examined various physiological phenomena in mammals through the point of view of the nucleocytoplasmic transport mediated by importin family, which is comprised of multiple subtypes. Our analysis revealed that the nuclear transport mediated by importin family plays essential roles in fundamental cellular processes such as signal transduction, cell differentiation and aging.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核 細胞質間輸送 核輸送因子 インポーター 細胞核 高次生命機能

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、ゲノム DNA を保持し、RNA 転写の場となる細胞核と、タンパク質を合成する場である細胞質が、核膜という2重の脂質膜で隔てられている。細胞が正常に機能するためには、mRNA や転写因子などの機能分子が核膜上にある核膜孔を通して、核細胞質間を移動することが必須である。核細胞質間タンパク質輸送に関する研究分野では、輸送因子である importin ファミリー分子、importin ファミリー分子、輸送の方向性を制御する低分子量 GTPase Ran など、輸送に関わる多くの因子が同定されている。そして、これまでにそれぞれの因子の機能解析が行われ、輸送の基本的なメカニズムが提唱されている。このメカニズムは、酵母から哺乳動物に至るまで進化上、幅広く保存されていることがわかっている(Yoneda, Genes Cells, 2000)。しかしながら、一方で、生物が進化するにしたがって輸送因子の多様化がみられることが明らかとなった。例えば importin は出芽酵母では1種類しか存在しないのに対し、哺乳類細胞では6~7種類のサブタイプが存在する。また、ヒトの importin ファミリーは、22種類のホモログからなることが知られている。これらのことは、高等真核生物では核細胞質間輸送がより緻密に制御されていることを示唆している。これまで研究代表者は、importin サブタイプの基質特異性の発見(Sekimoto et al., EMBO J. 1997)を端緒として、importin サブタイプのスイッチングによる細胞分化制御の解析(Yasuhara et al., Nature Cell Biol 2007)や、importin ノックアウトマウスの機能解析(Moriyama et al. FEBS J., 2011)を通して、核輸送因子 importin の多様化による核輸送制御が実際に生命機能の発現に重要であることを明らかにしてきた。しかしながら、多種多彩な輸送因子により生みだされる核細胞質間輸送の制御機構と、初期発生から老化、最後は死に至るまでに起こる複雑な生命現象の関連は依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、高次生命現象における核細胞質間のタンパク質輸送制御の重要性を明らかにすることを目的とする。特に、高等真核生物でサブタイプの多様化が見られる importin ファミリー分子の機能に着目し、その細胞内シグナル伝達、細胞老化、細胞分化、脳機能との関わりに焦点を絞り、核輸送因子による輸送の制御という

視点から統合的に生命機能を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 輸送因子によるエストロゲン受容体の機能制御

これまでに importin サブタイプの一つである importin 5 の遺伝子欠損雌マウスではエストロゲンシグナル経路の抑制とともに、卵巣の成熟段階の卵胞数の減少や子宮内膜の発育不全がみられることが分かっている(Moriyama et al. FEBS J., 2011)。そこで、エストロゲンシグナル経路に重要なエストロゲン受容体に着目し、核輸送因子がどのようにエストロゲン受容体の核細胞質間輸送を制御しているか、各種エストロゲン受容体変異体の細胞内動態やシグナル依存的動態制御の解析を行い、明らかにする。

(2) 核輸送制御と細胞老化

哺乳動物の体細胞は、ある一定回数の細胞分裂を起こした後、細胞老化と呼ばれる増殖停止状態に入る。この細胞老化と核細胞質間輸送制御が、どのように関わっているか明らかにするため、ヒト正常繊維芽細胞である TIG-1 細胞を用いた解析を行う。若い TIG-1 細胞(継代数の少ない細胞)と、老化した TIG-1 細胞(継代数の多い細胞)で輸送効率の比較解析を行うとともに、核輸送因子 importin に結合し、老化と関連することが報告されているヒストン結合タンパク質 RBBP4 に着目し、両者結合の生理的意義、細胞老化との関わりに焦点を絞り、解析を進める。

(3) importin 8 の機能解析

近年報告された卵母細胞特異的に発現する importin 8 に着目し、その機能解析を行う。これまで importin 8 は分子構造上 importin ファミリーに分類されているが、実際に輸送活性を持つ分子であるかどうか、まだ証明されていない。そこでまず、importin 8 が核輸送因子として機能するかを明らかにする。その上で、importin 8 結合因子のプロテオーム解析を行い、その輸送基質の同定を行う。さらに、in vitro 結合実験、および in vitro 輸送解析を行い、importin 8 がどのような輸送基質を核へと輸送しているか、明らかにする。また、その卵細胞機能との関わりを検証する。

(4) 細胞核輸送と脳機能

核輸送因子 importin がどのように高次脳機能の発現に関与しているか、importin 各サブタイプのノックアウトマウスを作成し、解析する。

(5)核輸送因子 importin が細胞分化・未分化の運命決定に果たす役割の解明

Importin サブタイプ間の細胞分化・未分化維持における機能的相違について解明する。マウス未分化 ES 細胞において高発現を示す importin 1に着目し、細胞の未分化維持機構との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1)輸送因子によるエストロゲン受容体の機能制御

エストロゲン受容体は importin 1とは結合せず、importin 5、および importin 3と結合し、さらに importin 1の三者複合体を形成することで核内へ輸送されていることが分かった。また、核移行シグナル(NLS)を欠失したエストロゲン受容体の変異体は、エストロゲン添加により急速に細胞質側へと移動することが明らかとなった。さらに、importin ファミリーのノックダウン実験を行った結果、その核外輸送は特定の importin ファミリーによって行われていることを見出した。加えて、ヒートショックプロテインがエストロゲン受容体の核外輸送に関与していることが明らかになった。これらの結果は、エストロゲン受容体の能動的な核内輸送、核外輸送による核細胞質間シャトリングが多様な因子により制御されていることを示唆している。

(2)核輸送制御と細胞老化

SV40 T 抗原の NLS と緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質(GFP-SV40T-NLS)を核内輸送されるマーカータンパク質として、細胞質へマイクロインジェクションにより注入することで、若い細胞と老化した細胞における輸送効率の比較解析を行った。その結果、細胞老化に伴い核移行効率が顕著に低下することが明らかとなった。さらに、老化との関連が報告されている importin 結合タンパク質 RBBP4 について、その分子相互作用のメカニズム及び生理的意義の解析を進めた。その結果、RBBP4 は importin に結合するものの、importin 依存的には核に輸送されないことが分かった。また、RBBP4 は importin の N 末端に位置する importin 結合領域(IBC ドメイン)に結合することが分かった。そして、RBBP4 は importin と importin 1の解離を促進する働きを持ち、核輸送効率を上げていることが分かった。そして、RBBP4 をノックダウンすると核輸送効率の低下が見られると共に、細胞老化マーカーである

SA-β-galactosidase 活性やp21 発現の上昇が見られた。以上のことから、細胞老化と核輸送効率の低下の密接な関連が示唆された。

(3)importin 8の機能解析

importin 8が、他の importin と同様に輸送基質と importin とを結ぶアダプターとしての機能を持つのかを調べるため、in vitro 結合実験を行った。その結果、核内輸送されるマーカータンパク質である SV40T-NLS と importin との三者複合体を形成できることが分かった。さらに、in vitro 輸送系を用いた解析により、リコンビナント importin 8が、GFP-SV40T-NLSを核へと輸送することが確認されたことから、他の importin と同様の機能を持った核内輸送因子であることを明らかにした。また、HEK 細胞抽出液を用いた免疫沈降法を行い、importin 8と相互作用する因子を質量分析法により解析したところ、179種類のタンパク質を同定することが出来た。importin ファミリー内で importin 8と相同性の最も高い配列を持つ importin 1の結合因子群と比較解析した結果、117種類ものタンパク質が importin 8 特異的な結合を示すことが分かった。さらに、その中に含まれた輸送基質候補因子 DDB2 (damage-specific DNA binding protein 2)について、in vitro 結合実験及び in vitro 輸送系を用いて詳細に解析を行ったところ、importin 8に直接的に結合し、核へと輸送されることを確認した。以上のことから、importin 8が、他の importin と同様の性質を持った核内輸送因子であり、しかも、これまで知られていた3つの importin サブファミリーとは発現様式や輸送基質特異性の大きく異なる、新たな importin サブファミリーである可能性を示した。

(4)細胞核輸送と脳機能

脳の高次機能における核輸送因子 importin の重要性を明らかにするために importin ノックアウトマウスを用いた行動解析を引き続き行っており、運動能力や認知性など様々な脳の高次機能における importin の役割について解析を進めている。

(5)核輸送因子 importin が細胞分化・未分化の運命決定に果たす役割の解明

importin 1による Oct6の輸送阻害のメカニズムを明らかにするため、importin 1と Oct6のリコンビナントタンパク質を作製し、分子相互作用を詳細に解析した。その結果、典型的核移行シグナルを持つ輸送基質は、アルマジロリピート部

位に結合するのに対して、Oct6 は importin 1 のアルマジロリピート部位よりもさらに C 末端の領域に結合することが分かった。また、シミュレーション解析によって、その結合に重要な Oct6 および importin 1 のアミノ酸残基を特定することが出来た。さらに ES 細胞に存在する importin 1 結合因子のスクリーニングを質量分析法により解析した結果、約 200 種類の importin 1 結合タンパク質を同定することが出来た。現在、これらと importin 1 の結合の生理的意義に関して解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計15件)

1. Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology*, 54(2): 349-58. (2015) (査読有) (doi: 10.1093/rheumatology/keu325.)
2. Umemura Y., Koike N., Matsumoto T., Yoo S.H., Chen Z., Yasuhara N., Takahashi J.S. and Yagita K. Transcriptional program of Kpna2/Importin-2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(47): E5039-5048. (2014) (査読有) (doi: 10.1073/pnas.1419272111.)
3. Choi S., Yamashita E., Yasuhara N., Song J., Son S.Y., Won Y.H., Hong H.R., Shin Y.S., Sekimoto T., Park I.Y., Yoneda Y. and Lee S.J. Structural basis for the selective nuclear import of the C2H2 zinc-finger protein Snail by importin . *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 70: 1050-1060. (2014) (査読有) (doi: 10.1107/S1399004714000972.)
4. Sangel P, Oka M, Yoneda Y. The role of Importin- s in the maintenance and lineage commitment of mouse embryonic stem cells. *FEBS Open Bio.*, 4:112-120 (2014) (査読有) (DOI: 10.1016/j.fob.2014.01.001.)
5. Yasuhara N., Yamagishi R, Arai Y, Mehmood R, Kimoto C, Fujita T, Touma K, Kaneko K, Kamikawa Y, Moriyama Y, Yanagida T, Kaneko H and Yoneda Y. Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance. *Dev. Cell*, 26: 123-135 (2013) (査読有) (DOI: 10.1016/j.devcel.2013.06.022.)
6. Mizuguchi-Hata C, Ogawa Y, Oka M and Yoneda Y. Quantitative regulation of nuclear pore complex components by O-GlcNAcylation. *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research*, 1833:2682-2689 (2013) (査読有) (DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.06.008)
7. Young JC, Ly-Huynh JD, Lescesen H, Miyamoto Y, Browne C, Yoneda Y., Koopman P, Loveland KL, Jans DA. The Nuclear import factor importin 4 can protect against oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research*, 1833: 2348-2356 (2013) (査読有) (DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.06.007.)
8. Katahira J, Okuzaki D, Inoue H, Yoneda Y., Maehara K and Ohkawa Y. Human TREX component Thoc5 affects alternative polyadenylation site choice by recruiting mammalian cleavage factor 1. *Nucleic Acids Res.*, 41: 7060-7072 (2013) (査読有) (DOI:10.1093/nar/gkt414)
9. Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K and Yoneda Y. Differential role for transcription factor Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, 288: 15085-15097 (2013) (査読有) (DOI:10.1074/jbc.M112.448837.)
10. Tanaka S, Nakao K, Sekimoto T, Oka M and Yoneda Y. Cell density- dependent nuclear accumulation of ELK3 is involved in suppression of PAI-1 expression. *Cell Struct. Funct.* 38: 145-154 (2013) (査読有) (DOI:10.1247/csf.13007)

11. Morita M, et al. (22人中、17番目) The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell*, 153, 112-125 (2013) (査読有) (doi: 10.1016/j.cell.2013.02.027.)
12. Fujiki R, Sato A, Hata K, Tashiro F, Yasuhara N, Miyazaki J, Yoneda Y, Fujitani M and Yamashita T. Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 430, 604-609. (2013) (査読有) (doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.106.)
13. Hayakawa K., et. al. (20人中、19番目) An overview of multidisciplinary research resources at the Osaka University Center for Twin Research. *Twin Res. Hum. Genet.*, 16: 217-220 (2013) (査読有) (doi: 10.1017/thg.2012.141.)
14. Nagai M and Yoneda Y. Downregulation of the small GTPase Ras-related nuclear protein accelerates cellular ageing. *Biochim Biophys Acta.*, 1830, 2813-2819 (2012) (査読有) (doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.001.)
15. Ogawa Y, Miyamoto Y, Oka M and Yoneda Y. The interaction between importin-alpha and Nup153 promotes importin-alpha/beta-mediated nuclear import. *Traffic*, 13, 934-946 (2012) (査読有) (doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01367.x.)

(学会発表) (計 21 件)

1. 安原徳子、米田悦啓 「The nucleocytoplasmic transport system regulates cell differentiation」 RMSC-Korea-2015、釜山(韓国)、2015年3月19日
2. 安原徳子、米田悦啓 「核輸送因子 importin による幹細胞未分化維持機構」染色体ワークショップ・核ダイナミクス研究会、広島、2014年12月16日
3. 岡正啓、Sangel P、山田幸司、木村宏、米田悦啓 「ヌクレオポリン Nup98-Hox 融合タンパク質による発がんメカニズムの解析」第37回日本分子生物学会、ワークショップ、横浜、2014年11月25-27日
4. 辻井聡、宮本洋一、盛山哲嗣、岡正啓、米田悦啓 「核内輸送因子 Importin とヒストン結合タンパク RBBP4 の非典型的結合とその結合意義」第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月25-27日
5. 安原徳子、米田悦啓 「核輸送による遺伝子発現制御と細胞運命決定のメカニズム」日本生化学会、京都、2014年10月16日
6. 辻井聡、宮本洋一、盛山哲嗣、岡正啓、米田悦啓 「核内輸送因子 Importin とヒストン結合タンパク RBBP4 の非典型的結合」第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月15-18日
7. 岡正啓、Sangel Percival、村苑子、山田幸司、木村宏、米田悦啓 「Nup98-Hox 融合タンパク質による細胞がん化メカニズム」第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月15-18日
8. 田中秀、中山恭宗、馬場健史、岡正啓、福崎英一郎、米田悦啓 「核局在化する代謝酵素トランスアルドラーゼの機能解明」第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月15-18日
9. 安原徳子、米田悦啓 「The nucleocytoplasmic transport system that regulates the cell fate in stem cells and embryos」熊本医学・生命科学国際シンポジウム、熊本、2014年9月5日
10. 安原徳子、米田悦啓 「核輸送による遺伝子発現制御と細胞運命決定のメカニズム」第66回日本細胞生物学会、奈良、2014年6月11日
11. 辻井聡、盛山哲嗣、岡正啓、米田悦啓 : Importin によるヒストン結合タンパク RBBP4 の核内移行: 第65回日本細胞生物学会、6月19 - 21日、ウインクあいち、愛知(2013)
12. Yasuhara N、Yoneda Y: The novel role of the nucleocytoplasmic transport system in cell differentiation. 染色体ワークショップ・核ダイナミクス研究会(招待講演)、淡路島、2013年12月20日~22日
13. 安原徳子、山岸良介、木本千裕、金子寛生、米田悦啓: 核細胞質間タンパク質輸送システムによる幹細胞のエピゲノム制御、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2013年12月11日~14日

14. 盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦啓:
Estrogen receptor の核 - 細胞質間移動
機構とその生理的意義の解明、第 36 回日
本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月
3 日 ~ 6 日
15. Sangel P, Oka M, Yoneda Y: Comparative
Expression/Functional Analysis of
Karyopherin- s in Mouse Embryonic
Stem Cells and Differentiated Cells.
International Conference on Life Science &
Biological Engineering, Mar 13-15, Tokyo,
Japan (2013)
16. Moriyama T, Oka M, Yoneda Y :Estrogen
receptor Subcellular Distribution and
Functions. 第 35 回日本分子生物学会年
会、福岡、2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日
17. 木本千裕, 安原 徳子, 米田 悦啓 :
importin 1 による塩基性核局在シグナル
配列の認識様式 第 35 回日本分子生物
学会年会、福岡、2012 年 12 月 11 日 ~ 14
日
18. Kimoto C, Yasuhara N, Yoneda Y.:
Recognition mode of basic NLS sequence
by importin 1. 第 64 回日本細胞生物学
会、5 月 28 - 31 日、神戸国際会議場、神
戸 (2012)
19. Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K,
Yoneda Y: Differential role for Oct4
nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell
reprogramming and self-renewal of
embryonic stem cells. 第 64 回日本細胞生
物学会、5 月 28 - 31 日、神戸国際会議場、
神戸 (2012)
20. Yasuhara N, Yamagishi R, Kaneko H,
Kimoto C, Yoneda Y.: Importin
regulates the stem cell differentiation. 第 6
4 回日本細胞生物学会、5 月 28 - 31 日、
神戸国際会議場、神戸 (2012)
21. Moriyama T, Oka M, Yoneda Y.:
Nucleocytoplasmic shuttling of estrogen
receptor . 第 64 回日本細胞生物学会、
5 月 28 - 31 日、神戸国際会議場、神戸
(2012)

(図書) (計 2 件)

1. プログレッシブ生命科学 編集: 米田悦啓、
岡村康司、金井好克、西田幸二 南山堂

- 2014 年
2. 生命科学から創薬へのイノベーション 編
集: 米田悦啓、堤康央、石井健 南山堂 2
014 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 悦啓 (YONEDA YOSHIHIRO)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研
究所、研究所長
研究者番号: 80191667

(2) 連携研究者

岡 正啓 (OKA MASAHIRO)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研
究所、細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト、プ
ロジェクトリーダー
研究者番号: 40432504

安原 徳子 (YASUHARA NORIKO)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研
究所、細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト、
特任研究員
研究者番号: 90423152

(3) 研究協力者

なし