

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657135

研究課題名(和文)代謝酵素群の核内局在とその生理的意義の解明

研究課題名(英文)The mechanism and functional significance of the nuclear translocation of metabolic enzymes.

研究代表者

米田 悦啓 (YONEDA, YOSHIHIRO)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：80191667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：トランスアルドラーゼの核輸送メカニズムを解析した結果、そのN末端に存在する核移行シグナルを介してimportin- α (複数種のサブタイプ)およびimportin- β との3者複合体を形成し、核へと運ばれていることが分かった。さらに、核、あるいは細胞質のみに局在化するトランスアルドラーゼの発現による細胞内代謝産物量の変動を解析したところ、トランスアルドラーゼの細胞内局在変化が、様々な代謝経路に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the mechanism and functional significance of the nuclear translocation of transaldolase. Our results show that transaldolase possesses a nuclear localization signal (NLS) at N-terminus, and is imported into the nucleus by multi-subfamily of importin- α in conjunction with importin- β . Further, our analysis revealed that the overexpression of the nuclear or cytoplasmic transaldolase differentially affects the cellular metabolism.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：代謝酵素 核輸送 importin transaldolase

1. 研究開始当初の背景

核細胞質間タンパク質輸送の研究に関しては、これまで核輸送因子 importin-ファミリー、importin-ファミリー、低分子量Gタンパク質 Ran など、輸送に関わる多くの因子が同定され、その基本的な分子メカニズムが明らかになった。しかしながら、機能分子の核細胞質間輸送制御と高次生命現象との関わりは依然として不明な点が多い。我々は哺乳動物における核細胞質間タンパク質輸送制御の全容解明を目指し importin-結合分子の網羅的な同定を進めた。

2. 研究の目的

これまで脳で高発現を示す importin-5 に着目し、脳神経細胞において importin-5 に結合しているタンパクを単離・同定したところ、既知の核タンパク質に加え、従来細胞質で働くと思われていた代謝酵素であるトランスアルドラーゼやクレアチンキナーゼなどが結合することが分かった。この結果をふまえ、本研究によって代謝酵素の核局在の生理的意義を解明することを目指した。

3. 研究の方法

importin-5 に結合する代謝酵素の核輸送メカニズムを解明するために、核移行シグナルの同定、GST pull-down assay および *in vitro* transport assay を行った。さらに、メタボロミクス解析を行い、代謝酵素の細胞内局在と代謝の関連を明らかにする。具体的には内在性のトランスアルドラーゼを siRNA ノックダウンした細胞に核局在する野生型のトランスアルドラーゼ、あるいは核移行シグナルを欠失し細胞質に局在する変異型のトランスアルドラーゼをそれぞれ発現させ、細胞を回収しメタボローム解析を行う。

4. 研究成果

importin-5 に結合するトランスアルドラーゼの核輸送メカニズムを解明するため、様々な欠失変異体の GFP 融合タンパク質発現

ベクターを作成し培養細胞に発現させ、その細胞内局在を観察した。その結果、トランスアルドラーゼの N 末端部位 1 - 10 アミノ酸残基が核移行シグナル (NLS) として機能していることが分かった (図 1)。

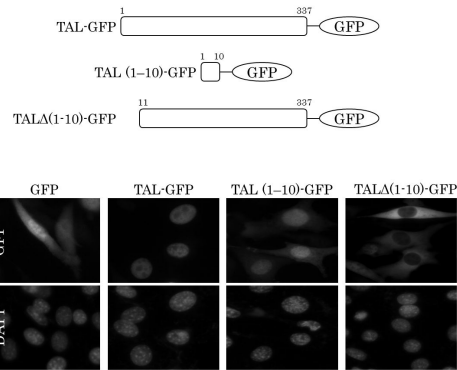


図1 トランスアルドラーゼ(野生型、変異型(ΔTAL))の細胞内局在解析

次に、GST pull-down assay を行った結果、トランスアルドラーゼが N 末端の NLS を介して importin-5 を含む複数の importin アイソフォームと結合することが分かった。さらに *in vitro* transport assay を行ったところ、これらの複数のサブタイプの importin が importin-5 存在下でエネルギー依存的にトランスアルドラーゼを核内へ運んでいることが明らかとなった (図 2)。

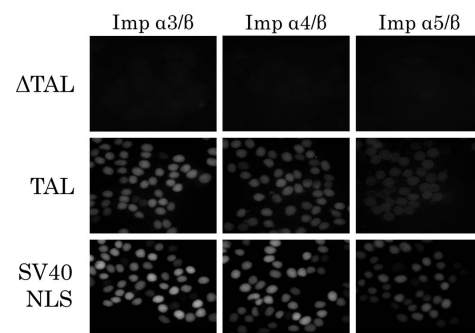


図2 トランスアルドラーゼ、SV40NLSの*in vitro* transport assay

本研究では次に、トランスアルドラーゼの細胞内局在の違いによる細胞内代謝物の変動を網羅的に解析するため、メタボローム解析を行った。解析は、内在性のトランスアルドラーゼを siRNA 処理でノックダウンした細胞に、核、あるいは細胞質へ局在するトランスアルドラーゼ GFP 融合タンパク質を過剰発現させ、細胞を回収し解析を行った。siRNA

ノックダウンにより内在性トランスアルドラーゼの発現量は約 30%まで抑制され、さらに内在性トランスアルドラーゼの約 2 倍量の GFP 融合タンパク質が発現したことを確認した。これらサンプルから代謝物を抽出後、HPLC/IP/MS 分析を行った。

本解析では 85 種類の代謝物が検出された。トランスアルドラーゼを核に局在させたサンプルと細胞質に局在させたサンプルの間では S - アデノシルメチオニン、パントテン酸、3 - ホスホグルセリン酸、などの代謝産物量が大きく変動していた。細胞質にトランスアルドラーゼを局在化させることで、S - アデノシルメチオニン、パントテン酸は蓄積した。さらに、3 - ホスホグルセリン酸の存在量は、内在性トランスアルドラーゼ siRNA ノックダウンで蓄積したものの、トランスアルドラーゼを核に局在化させることで、蓄積が解消した。そして、トランスアルドラーゼを細胞質に局在化させることで、その存在量は減少することがわかった。これらの結果から、トランスアルドラーゼの細胞内局在変化が様々な代謝産物量に影響を与えることが明らかになった。本研究の以上の結果から、代謝酵素 トランスアルドラーゼは、importin によって核に運ばれ、核内で代謝酵素としての機能を担っているが、その局在を細胞質に移動させた場合、他代謝経路に影響し、その経路で生成される代謝物の細胞内存在量が変動することが示された。今後、トランスアルドラーゼが核から細胞質へと輸送されるメカニズムの解明、トランスアルドラーゼの細胞質局在と他代謝経路の活性化および不活性化が引き起こす表現型との関連性を明らかにしていくことで、その新たな機能解明につながることを期待される。本研究を端緒として、細胞内局在という新たな視点から他の代謝酵素の機能を改めて探ることが重要であると考えられる。

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 10 件)

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.

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.

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

Tanaka S, Nakano 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

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

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.

Fujiki R, Sato A, Hata K, Tashiro F, Yasuhara N, Miyazaki J, Yoneda Y, Fujitani M, 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

Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, Watanabe T, Sakabe S, Daidoji T, Nakamura S, Kadowaki A, Ohto T, Nakanishi H, Taguchi R, Nakaya T, Murakami M, Yoneda Y, Arai H, Kawaoka Y, Penniger JM, Arita M and Imai Y. 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

Young JC, Ly-Huynh JD, Lescesen H, Miyamoto Y, Browne C, Yoneda Y, Koopman P, Loveland KL, Jans DA. The Nuclear import factor importin alpha 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.

Nagai M and Yoneda Y. Downregulation of the small GTPase Ras-related nuclear protein accelerates cellular aging. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830, 2813-2819, 2012 査読有

DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.001

6 . 研究組織

(1)研究代表者

米田 悦啓 (YONEDA, Yoshihiro)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号：80191667