

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870341

研究課題名(和文)核-細胞質間輸送関連因子の減少がおよぼす精神・神経疾患機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the role of the depression of nucleocytoplasmic transport relative factor for neuropsychiatric disorder

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトは年を重ねるにつれて、記憶力・集中力が低下していく。しかし、老化による記憶障害の仕組みは、ほとんど分かっていない。本研究では、精神・神経疾患の候補因子と報告されている核-細胞質間輸送因子に着目した。その結果、importin 1 (KPNA1) 遺伝子欠損マウスは、ストレス負荷によって行動異常を呈するストレス脆弱性を有することが分かった。さらに、importin が新たな生体機能因子の輸送に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：As humans get older, their memory and concentration will decline. However, the mechanism of memory disturbance due to aging is hardly understood. In this study, we focused on some nuclear-cytoplasmic transport factors reported as candidate factors for neuropsychiatric disorders. As the result, it was found that importin 1 (KPNA1) gene deficient mice had stress vulnerability exhibiting behavioral abnormalities due to stress load. Furthermore, it became clear that importin is involved in the transport of new biofunctional factors.

研究分野：分子生物学、細胞生物学、神経科学

キーワード：神経科学 核-細胞質間輸送 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、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 (karyopherin : KPNA) が認識する。さらに、輸送担体 importin 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。importin 遺伝子は、ヒトでは7種類存在することが確認されている。そして、それぞれの importin は、輸送基質特異性を持ち、生物の発生時期・組織特異的に核タンパク質の輸送が制御されている。

加齢に伴う記憶・学習能力の低下は、誰しも共通する悩みであり、高齢者が増加の一途を辿る先進国では、切実な問題になっている。しかし、老化による記憶力低下の仕組みは、ほとんど分かっていない。また、統合失調症や認知症などの精神・神経疾患についても、原因となる分子機構が未だ不明確であり、異なる複数の遺伝的・環境的要因が関与すると考えられている。記憶や学習の過程で、シナプス部位で生じた情報を核へと伝える必要がある。importin は、シナプス部位に局在し、グルタミン酸刺激、長期増強の誘導をおこなうと核内へ移動する。そして興味深いことに、統合失調症やアルツハイマー病、うつ病、小脳奇形の患者で、importin の発現低下や異常な核集積、変異などが見つかっている。加えて、老化にともなって神経細胞の核-細胞質間輸送制御機構の衰退がみられる。これらのことから、加齢や輸送因子の発現低下、変異などの原因で核-細胞質間輸送の機能低下することにより、様々なシグナル因子の輸送異常を生み出すことで、高次脳機能に重大な障害をもたらす要因の一つになっているのではないかと推測される。

2. 研究の目的

脳機能において核-細胞質間輸送は、記憶・学習、情動などの高次情報に関わるシグナル因子を核内へと速やかに伝えるという重要な働きをしている。本研究の目的は、加齢や変異、欠損などによる核-細胞質間輸送の機能低下が、高次脳機能へどのように影響するのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

精神・神経疾患の候補因子と報告されているいくつかの核-細胞質間輸送因子に着目し、遺伝子欠損マウスを作製した。そして、作製したマウスについて、病理学的解析や様々な行動解析、社会孤立ストレスや薬物ストレスの負荷後の行動解析、血漿中のコルチコステロン濃度測定、脳内のモノアミン濃度などを行った。精神・神経疾患患者の臨床データや既存のモデルマウスの解析データを基に、新

規モデルマウスとなるのかを検討した。さらに、質量分析法によって核-細胞質間輸送因子の結合因子を同定し、*in vitro* 結合実験や、*in vitro* transport アッセイなどの分子生物学・生化学的解析を行うことで、その分子機構の解明を行った。

4. 研究成果

核輸送因子 importin 遺伝子欠損マウスを用いた行動解析を行った結果、中でも importin 1 (KPNA1) 遺伝子欠損マウスが、様々な障害を持っていることが確認された。

マウスの記憶学習を評価するため、新規物体認識試験を行った。新規物体認識試験は、げっ歯類の新奇性を好むという特性を利用した記憶学習試験の一つである。この試験では、同一の形状、色及び大きさの2つの物体を置いた箱内に、マウス入れ探索させた (Training)。一旦、マウスをホームケージにしばらく戻した後、2つの物体の内1つが異なる新規物体に置き換えられた箱内にマウスを入れ、探索させた (Retention)。Training と Retention の間の行動を解析し、2つの物体を探索する時間の差を求めた。通常飼育したヘテロノックアウト及びホモノックアウトマウスでは、野生型マウスとは異なり、Training と Retention での2つの物体の識別率に有意差が見られなかった。このことは、通常飼育したヘテロノックアウト及びホモノックアウトマウスは、新規物体を識別できない、すなわち認知機能が低下していることを示している。

ヘテロノックアウト及びホモノックアウトマウスは、通常飼育した場合は上記以外についてほとんど行動異常を示さない。精神・神経疾患は、様々な要因が重なり合うことで引き起こされると考えられている。環境的要因からくるストレスに対する脳の脆弱性が一因となって発症すると考えられている。そこで、このマウスに対して、社会孤立ストレスを負荷させた後に行動解析を行った。社会孤立ストレスは、マウスを、生後5週から8週にかけて、小ケージの周囲に白い紙を巻き、孤立飼育を行うことによる。

マウスの感覚運動統合能力を測定するため、プレパルスインヒビション (PPI) 試験を行った。この試験は、驚愕音刺激に先行して微弱な刺激音 (プレパルス) を与えて、驚愕音刺激時の驚愕反応を測定した。プレパルスのある試験と無い試験とを比較して、驚愕反応がどの程度抑制されたか PPI (%) を調べた。統合失調症患者や統合失調症モデルマウスでは PPI の低下がみられる。importin 1 マウスに社会孤立ストレスを与えた場合、驚愕反応に差はなかったが、PPI (%) は、野生型、ヘテロノックアウト、ホモノックアウトマウスの順で低下が見られた。このことは、社会孤立ストレスを与えた importin 1 ヘテロノックアウト及びホモノックアウトマウスは、感覚運動統合の障害があることを示して

いる。

マウスのうつ様行動の程度を測定するため、強制水泳試験を行った。この試験は、水を入れた容器にマウスを入れ、無動状態の時間を測定した。社会孤立ストレスを与えたホモノックアウトマウスでは、有意に強制水泳試験における不動時間の増加がみられた。このことから、社会孤立ストレスを与えたホモノックアウトマウスは、うつ傾向が強いことを示している。

マウスのストレス量を測定するため、血漿中のコルチコステロン濃度を測定した。社会孤立ストレスを与えたホモノックアウトマウスでは、有意にコルチコステロン濃度の増加が見られた。

薬物負荷ストレスとして、マウスに依存性薬物として知られるフェンシクリジン塩酸塩(PCP)を、対照群には生理食塩水を7日間連日投与した後、オープンフィールド試験を行った。薬物投与後の行動量は、野生型、ヘテロノックアウト、ホモノックアウトマウスの順で有意に増加した。このことは、薬物ストレスを与えたホモノックアウトマウスは、PCPに対する感受性が増加していることを示している。

これらのことから、作製した importin 1 遺伝子欠損マウスは、ストレス負荷によって行動異常を呈するストレス脆弱性を有することが分かった。本マウスは、統合失調症、学習障害、認知症、うつ病、薬物依存症などの精神疾患に対して、遺伝因子と環境因子を考慮した新しい動物モデルとして有用であると考え、特許出願を行った。

importin 遺伝子欠損マウスで異常を示すシグナル経路と関連する因子の同定するため、importin と結合する因子の質量分析法による網羅的同定・解析も進めた。同定した因子の中で、転写調節因子である Tripartite motif-containing 28 (TRIM28) が importin により輸送されていること、さらに TRIM28 の importin との結合領域が、核内のヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たす Heterochromatin protein 1 (HP1) と TRIM28 との結合領域と重なっており、TRIM28 と importin の結合に HP1 が競合することを発見した。このことは、importin が核内輸送としてだけでなく、核内で HP1 の多いクロマチン領域に効率よく引き渡す働きをしている可能性を指摘した(雑誌論文)。さらに、近年発見された卵子及び初期胚時期のみに発現が確認されている importin 8 が、他の importin と同様に核内へ輸送する活性を持つだけでなく、輸送基質特異性を持っていることも発見した(雑誌論文)。興味深いことに、同定した因子の中には、核内輸送される基質だけでなく、核内で輸送基質を importin 輸送複合体から取り外す因子 retinoblastoma binding protein 4 (RBBP4)を見出し、さらに細胞老化とともにその因子が減少することが

importin による核内輸送能の低下へと至るといふ、新しい細胞老化メカニズムの一端を解明した(雑誌論文)。さらに、ペントスリン酸経路で働く代謝酵素の1つであるトランスアルドラーゼ(TALD01)が、細胞内では異なる翻訳開始点を持つ2種類の TALD01 が存在し、その違いである N 末端の 10 アミノ酸残基が核局在に必須であること、さらには TALD01 の細胞内の局在が、他の代謝経路に影響を及ぼすことを明らかにした(雑誌論文)。このことは、生体内では2種類の TALD01 の発現を調整することにより、核と細胞質の存在比を変化させて、糖代謝全体を調整している可能性を示唆している。

このように、遺伝子欠損マウスを用いた病理学的解析及び様々な行動解析、質量分析、分子生物学・生化学的解析を行うことにより、輸送因子と様々な生体機能との新たな関係性を明らかにできた。しかしながら、同定した因子群と高次脳機能との関係性を解き明かすまでに至らなかった。今後は、これらの因子群の細胞内局在制御と高次脳機能の関連性について更に深く明らかにしてゆく予定である。

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 5 件)

Two isoforms of TALD01 generated by alternative translational initiation show differential nucleocytoplasmic distribution to regulate the global metabolic network.

Moriyama T*, Tanaka S*, Nakayama Y, Fukumoto M, Tsujimura K, Yamada K, Bamba T, Yoneda Y, Fukusaki E, Oka M. *Sci Rep*. 2016 Oct 5;6:34648. * equal contribution. 査読有
doi: 10.1038/srep34648.

Cell surface localization of importin 1/KPNA2 affects cancer cell proliferation by regulating FGF1 signalling.

Yamada K, Miyamoto Y, Tsujii A, Moriyama T, Ikuno Y, Shiromizu T, Serada S, Fujimoto M, Tomonaga T, Naka T, Yoneda Y, Oka M. *Sci Rep*. 2016 Feb 18; 6:21410. 査読有
doi: 10.1038/srep21410.

Retinoblastoma-binding Protein 4-regulated Classical Nuclear Transport Is Involved in Cellular Senescence.

Tsujii A, Miyamoto Y, Moriyama T, Tsuchiya Y, Obuse C, Mizuguchi K, Oka

M, Yoneda Y.
J Biol Chem. 2015 Dec
4;290(49):29375-88. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M115.681908.

Functional characterization of importin 8 as a classical nuclear localization signal receptor.
Kimoto C*, Moriyama T*, Tsujii A, Igarashi Y, Obuse C, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y.
Biochim Biophys Acta. 2015 Oct;1853(10 Pt A):2676-83. * equal contribution. 査読有
doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.017.

Identification and characterization of a nuclear localization signal of TRIM28 that overlaps with the HP1 box.
Moriyama T*, Sangel P*, Yamaguchi H, Obuse C, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y.
Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jul 3;462(3):201-7. * equal contribution. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.108.

[学会発表](計 9 件)

盛山 哲嗣、田中 秀、中山 泰宗、福本昌宏、辻村賢二、山田幸司、馬場 健史、米田 悦啓、福崎 英一郎、岡 正啓
Alternative translational initiation generates two isoforms of TALD01 that show differential nucleocytoplasmic distribution and regulation of global metabolic network
第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 15 日-17 日、京都テルサ(京都府京都市)

盛山 哲嗣、田中 秀、中山 泰宗、福本昌宏、辻村賢二、山田幸司、馬場 健史、米田 悦啓、福崎 英一郎、岡 正啓
異なる細胞内局在を示す 2 つのトランスアルドラーゼが糖代謝全体に影響を及ぼす
第 63 回日本生化学会近畿支部例会、2016 年 5 月 21 日、神戸薬科大学(兵庫県神戸市)

山田 幸司、宮本 洋一、辻井 彰、盛山 哲嗣、生野 雄大、世良田 聡、仲 哲治、米田 悦啓、岡 正啓
核輸送因子インポーチン 1 の細胞膜局在は FGF シグナルを増強し細胞増殖を亢進させる
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

宮本 洋一、盛山 哲嗣、木本 千裕、辻井 聡、五十嵐 芳暢、小布施 力史、岡 正啓、米田 悦啓
新規核局在化シグナル受容体 importin 8 の機能解析
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

盛山 哲嗣、田中 秀、中山 泰宗、馬場 健史、福崎 英一郎、米田 悦啓、岡 正啓
Subcellular localization of Transaldolase 1 affects regulation of metabolic network
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

辻井 聡、宮本 洋一、盛山 哲嗣、土屋 裕子、小布施 力史、水口 賢司、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生理的意義
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Tetsuji Moriyama, Percival Sangel, Hiroki Yamaguchi, Chikashi Obuse, Yoichi Miyamoto, Masahiro Oka and Yoshihiro Yoneda
Identification and characterization of a nuclear localization signal of TRIM28 that overlaps with the HP1 Box
第 67 回日本細胞生物学会大会、2015 年 6 月 30 日-7 月 2 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

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、2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

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、2014 年 10 月 15 日-18 日、国立京都国際会館(京都市)

[図書](計 2 件)

盛山 哲嗣、岡 正啓
医学書院、増大特集 細胞シグナル操作
法、核 細胞質間輸送、2015年10月15
日発行日、生体の科学 66巻 5号

宮本 洋一、盛山 哲嗣
特集「核-細胞質間分子輸送システム：基
本分子メカニズムの理解とその応用」、イ
ンポートイン ファミリーと高次生命機
能 2015年2月25日発行日、生化学 87(1),
16-21

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：精神疾患モデル動物およびその製造方
法

発明者：岡 正啓、盛山 哲嗣、米田 悦啓、
宮本 洋一、辻井 聡、疋田 貴俊、森田 真
規子

権利者：国立研究開発法人 医薬基盤・健康・
栄養研究所、国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2017-026027

出願年月日：平成 29年 2月 15日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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 ホームページ

<http://www.oka-lab.info/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

盛山 哲嗣 (MORIYAMA Tetsuji)

国立大学法人 福井大学学術研究院医学系
部門 助教

研究者番号：50627990

(2)研究協力者

辻井 聡 (TSUJII Akira)

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

木本 千裕 (KIMOTO Chihiro)

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

疋田 貴俊 (HIKIDA Takatoshi)

国立大学法人 京都大学大学院医学研究科

森田 真規子 (MORITA Makiko)

国立大学法人 京都大学大学院医学研究科