

平成30年6月14日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07068

研究課題名(和文) Importin-1 の多機能性に着目したがんの遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of gene expression regulation mechanism in cancer cells focusing on multifunctionality of Importin-alpha

研究代表者

宮本 洋一 (MIYAMOTO, Yoichi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・サブプロジェクトリーダー

研究者番号：10379084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核-細胞質間タンパク質輸送に関わる分子 Importin-1 に着目し、その機能ががん細胞特異的な遺伝子発現にどのように関与しているかを明らかにするものである。解析の結果、Importin-1 は複数の異なる乳がん細胞亜形株で発現が亢進し、顕著に核局在していることを明らかにした。また、クロマチン免疫沈降シーケンスやマイクロアレイ解析により、Importin-1 ががん細胞中で高度にクロマチンと相互作用し、核輸送とは異なる遺伝子発現制御機能を発揮していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand how Importin-1, the nuclear-cytoplasmic transport factor, contributes specific gene expression in cancer cells. Our results reveal that Importin-1 highly expresses in several breast cancer cell lines, and specifically localizes in the nucleus. Using the chromatin immunoprecipitation sequence and microarray analysis, we demonstrate that Importin-1 interacts with chromatin and involves in gene regulation of cancer cells in addition to the nuclear transport function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核輸送 インポーチン がん 転写調節 核局在化シグナル クロマチン

1. 研究開始当初の背景

核膜孔を介した核-細胞質間物質輸送の研究は、この20数年間で飛躍的に進み、基本的な分子メカニズムについては共通に理解されるレベルに達している。Importin-1は核局在化シグナル(Nuclear Localization Signal: NLS)受容体として同定され、ヒトでは7種類の亜型が存在して異なる基質特異性や、組織や細胞での異なる発現パターンを示す。近年、Importin-1(KPNA2とも呼ぶ)が複数のがん組織で高発現することが多く報告されている(Christiansen and Dyrskjot, Cancer Lett., 2013)。がんの種類は乳がん、前立腺がん、肺がん、卵巣がんなど上皮性細胞由来の悪性腫瘍を中心に広範囲にわたっている。一方で、Importin-1が(1)なぜ特定のがん細胞で発現亢進するのか、(2)どういった基質をがん特異的に核輸送しているのか、(3)どのような分子メカニズムで核内に移行し集積するのか、(4)核内で何をしているのか、といった細胞生物学的知見は全くない。申請者は最近、Importin-1が酸化ストレスなど複数の細胞ストレスに応答してすみやかに核内に集積し、特にSerine Threonine Kinase 35(STK35)のプロモーター制御領域に結合して転写を直接制御することを初めて発見した(Yasuda and Miyamoto et al., EMBO J., 2012)。興味深いことに、核にとどまるように設計したImportin-1変異体を発現したHeLa細胞内では、ストレスの暴露に関係なくH2AやH2Bなどのヒストンの発現やGADD45A、HARAKIRIといったストレス応答や細胞死に関連する遺伝子の発現が変動した。このことは、核に局在するImportin-1が、STK35以外にも転写制御に寄与していること意味している。さらに我々は、Importin-1のC末端領域が、新たな分子認識領域として機能することを独自の結合予測アルゴリズムを開発することで証明した(Arjomand et al., FASEB J., 2014)。重要な点は、この領域を介した相互作用は必ずしも核輸送に機能する訳ではないことである。

以上のように、Importin-1は単なるNLS受容体ではなく、局在に依存して「転写制御機能」も発揮する多機能分子であることがわかる。この特性は、がん細胞で高発現しているImportin-1が「核輸送」と「転写制御」の少なくとも2つの機能によりがんの進展や悪性度の獲得に関与していることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、核輸送分子として知られるImportin-1の多機能分子としての特性に着目し、がん細胞特異的な「転写制御機能」の解明を目指すものである。近年、乳がんや前立腺がんなど複数のがん組織で、Importin-1の発現が顕著に上昇し、その発現率とがんの悪性度とに密接な相関がある

ことが報告されている。さらに、通常、細胞質に多く存在するImportin-1が、がん細胞では主に核に局在していることから、輸送とは異なる「核内機能」を発揮することが、がんの生存、進展に寄与している可能性が示唆されている。

本研究は、Importin-1が転写制御に働くとする申請者ら独自の発見を基盤に、「核輸送」と「転写制御」の2つの機能的側面から、がん細胞、特に乳がん細胞に特異的な遺伝子発現の制御メカニズムを解明しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、乳がんを題材に以下の2つのプロジェクトを柱に遂行して行く。

Project 1: Importin-1の発現、局在プロファイリングと細胞亜型の選定

まず、Importin-1の動態(存在量、分布、局在)を正確に把握し、「発現上昇」や「核局在」を厳密に定義する。乳がんは遺伝子発現により悪性度の異なる複数の細胞亜型に分けられ、治療標的が異なるがんであるが、細胞亜型ごとにImportin-1の存在量を詳細に解析した例はない。そこで、最新の質量分析法を用いて複数の乳がん細胞株中でのImportin-1のタンパク質量を定量解析する。また、異なる細胞亜型を含む乳がん組織切片を用いた免疫組織化学的解析を行い、Importin-1の組織内分布を申請者ら自身で正確に把握する。これらImportin-1の発現、局在プロファイルをもとに、細胞亜型との関係を明確にし、実験に用いる細胞株を選定する。

Project 2: 乳がん細胞におけるImportin-1の包括的機能解析

Importin-1と相互作用する分子の中には、「輸送基質」と「輸送されない分子」とが存在する。そこでImportin-1と相互作用する分子を質量分析法により同定し、輸送の有無により分類する。「輸送基質」については、結合分子の機能解析を通してImportin-1の輸送機能が乳がんの進展や悪性度の獲得にどう寄与するかを解明する。「結合するが輸送されない分子」については、Importin-1との結合がどのような遺伝子の発現に寄与するかを知る目的で、結合領域を過剰発現し結合阻害を誘導した細胞を用いたマイクロアレイを実施し、影響を受ける遺伝子を同定することでImportin-1との結合の生物学的意義を明らかにしていく。さらに、抗Importin-1抗体によるクロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーを組み合わせたchromatin immunoprecipitation sequence (ChIP-Seq)によりImportin-1が制御する遺伝子配列を同定する。

4. 研究成果

本研究は、核輸送因子 Importin- 1 の発現上昇とその多機能性が、乳がんの進展や悪性度、がん細胞特異的な遺伝子発現にどのように関与しているかを明らかにするものである。

本研究課題は、がん細胞で高発現し、かつ核内に多く局在する核局在化シグナル(NLS)受容体分子 Importin- 1 に着目し、特に乳がんの進展や悪性度、がん細胞特異的な遺伝子発現にどのように関与しているかを明らかにするものである。これまでに、異なる乳がん細胞亜型株(MCF7、SK-BR-3、MDA-MB-231、MRK-nu1)、並びに正常乳腺上皮細胞株(MCF10A)における7種のヒト Importin- サブタイプの発現状況を iTRAQ (isobaric tagging for relative and absolute quantitation)法、ウエスタンブロット法により解析した。さらに、Importin- ファミリー分子群や Ran 及び Ran 制御分子など核輸送関連分子についても、タンパク質発現プロファイルを作製した。これらの結果、複数の Importin- サブタイプを含む多くの核輸送関連分子で乳がん細胞亜型株での発現亢進が見られ、がん細胞では核輸送システムが亢進している可能性が示唆された。また、Importin- がクロマチンと相互作用するとする独自の知見をもとに、特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンズ(ChIP-seq)を行った。実験では、抗体ロットや細胞培養条件ごとでの違いが生じないように、Importin- の異なる領域を認識する複数の抗体と、異なるリソースより入手した同一細胞株を組み合わせて検討を行い、Importin- が結合するゲノム領域の詳細な情報を取得した。さらに、MCF-7 細胞を Importin- 1 siRNA を用いてノックダウンし、発現の変化する遺伝子をマイクロアレイ解析により明らかにした。以上の結果から、Importin- 1 がクロマチン上でどのような複合体を形成することが、がん特異的な遺伝子発現に影響を与えるか明らかにした。

上記に加えて、本研究課題で着目している Importin- 1 とアミノ酸配列の相同性が高い分子として新たに同定された Importin- 8 (KPNA7)について、その機能解析も行った。Importin- 8 は他の Importin- と異なり核内に特異的に局在すること、すい臓がんで顕著な発現の亢進がみられることが知られている。機能解析の結果、Importin- 8 は Importin- 1 とは異なる基質特性を示すことが明らかとなった (Kimoto et al., BBA-MCR, 2015)。さらに、Importin- 1 や 8 は、サブタイプごとでヘテロ二量体を形成する活性があり、Importin- 8 はヘテロ二量体形成活性が非常に強い分子であることを証明した (Kimoto et al., BBA-MCR, 2015; Miyamoto and Oka, Data Brief, 2016)。加えて、このヘテロ二量体形成活性は、核内での積み荷の積み下ろしに関与していることも示した (Miyamoto and Oka, Data Brief,

2016)。

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)

Tanaka T., Kasahara Y., Miyamoto Y., Takumi O., Kasai T., Onodera K., Kuwahara M., Oka M., Yoneda Y., Obika S. Development of oligonucleotide-based antagonists of Ebola virus protein 24 inhibiting its interaction with karyopherin 1. *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 2018, in press doi: 10.1039/c8ob00706c.

Major A.T., Miyamoto Y., Lo C., Jans D.A., Loveland K.L. Development of a pipeline for automated, high-throughput analysis of paraspeckle proteins reveals specific roles for importin proteins. *Sci. Rep.*, 査読有, 7, 2017, 43323 doi: 10.1038/srep43323.

Miyatake H., Sanjoh A., Murakami T., Murakami H., Matsuda G., Hagiwara K., Yokoyama M., Sato H., Miyamoto Y., Dohmae N., Aida Y. Molecular Mechanism of HIV-1 Vpr for Binding to Importin- . *J. Mol. Biol.*, 査読有, 428, 2016, 2744-2757 doi: 10.1016/j.jmb.2016.05.003.

Miyamoto Y., Yamada K., Yoneda Y. Importin : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. *J. Biochem.*, 査読有, 160, 2016, 69-75 doi: 10.1093/jb/mvw036.

Miyamoto Y., Oka M. Data on dimer formation between importin subtypes. *Data Brief*, 査読有, 7, 2016, 1248-1253 doi: 10.1016/j.dib.2016.03.080.

Yamada K., Miyamoto Y., Tsujii A., Moriyama T., Ikuno Y., Shiromizu T., Serada S., Fujimoto M., Tomonaga T., Naka T., Yoneda Y., Oka M. Cell surface localization of importin 1/KPNA2 affects cancer cell proliferation by regulating FGF1 signalling. *Sci. Rep.*, 査読有, 6, 2016, 21410 doi: 10.1038/srep21410.

Loveland K.L., Major A., Butler R., Young J., Jans D.A., Miyamoto Y. Putting things in place for fertilization: Discovering roles for importin proteins in cell fate and spermatogenesis. *Asian J. Androl.*, 査読有, 17, 2015, 1-8
doi: 10.4103/1008-682X.154310.

Tsujii A., Miyamoto Y., Moriyama T., Tsuchiya T., Obuse C., Mizuguchi K., Oka M., Yoneda Y. Retinoblastoma Binding Protein 4-Regulated Classical Nuclear Transport Is Involved in Cellular Senescence. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 290, 2015, 29375-29388
doi: 10.1074/jbc.M115.681908

Kimoto C., Moriyama T., Tsujii A., Igarashi Y., Obuse C., Miyamoto Y., Oka M., Yoneda Y. Functional characterization of importin 8 as a classical nuclear localization signal receptor. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 査読有, 1853, 2015, 2676-2683
doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.017.

宮本洋一「創薬ターゲットとしての核 - 細胞質間物質輸送」*バイオサイエンス&インダストリー*, 査読無, Vol 73, 2015, 288-291

[学会発表](計 5件)

宮本洋一, Penny A.F. Whiley, 岡正啓, Kate L. Loveland 「生殖細胞形成とストレス応答における STK35L1 の役割」第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年

Miyamoto Y., “Regulation mechanism of a classical nuclear protein transport through importin ” International Symposium on Biomolecular Sciences、2015 年 (招待講演)

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 $\alpha 8$ の機能解析」BMB2015、2015 年

Miyamoto Y., Moriyama T., Kimoto C., Tsujii A., Igarashi Y., Obuse C., Oka M., and Yoneda Y. “Functional analysis of a novel nuclear localization signal receptor importin $\alpha 8$ ”, BMB 2015: The 38th

Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2015

Miyamoto Y.. “A novel regulator of a classical nuclear transport pathway and cellular senescence” Nuclear Transport Meeting, 2015

[図書](計 1件)

Miyamoto Y., Yoneda Y., Oka M. Academic press, Protein Transport Between the Nucleus and Cytoplasm *Nuclear Architecture and Dynamics*, 2018, Chapter 17, 387-403

[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、国際

[その他]

ホームページ等
<http://www.oka-lab.info/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 洋一 (MIYAMOTO, Yoichi)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・サブプロジェクトリーダー
研究者番号: 10379084

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 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・医薬基盤研究所 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

米田 悦啓 (YONEDA, Yoshihiro)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研

研究所・医薬基盤研究所・研究所長
研究者番号：80191667

藤井 誠志 (FUJII, Satoshi)
国立研究開発法人国立がん研究センター,
先端医療開発センター・ユニット長
研究者番号：30314743

朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研
究所, 医薬基盤研究所・プロテオームリサ
ーチプロジェクト・プロジェクトリーダー
研究者番号：80227644

白水 崇 (SHIROMIZU, Takashi)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：00582678

(4)研究協力者

()