

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07069

研究課題名(和文)核細胞質間蛋白質輸送受容体の初期胚発生における役割の解明

研究課題名(英文)The role of the nucleocytoplasmic transport during embryogenesis

研究代表者

安原 徳子(垣内徳子)(YASUHARA, Noriko)

日本大学・文理学部・准教授

研究者番号：90423152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：核細胞質間輸送因子は、動物の胚発生に重要な役割を果たすことが示唆されるが、そのメカニズムは明らかではない。そこで、核細胞質間輸送因子の遺伝子欠損による動物発生の表現型解析を通じた発生過程での機能の解明を目的とした。結果、発生段階で何らかの特異的な変化がみられることを掴んだ。合わせて核細胞質間輸送因子発現操作細胞株の作成と性質の解析を行い、核細胞質間輸送因子の発現抑制が細胞の増殖に関わることを見つけ、分子メカニズムを明らかにしつつある。合わせて核細胞質間輸送因子の特異的アプタマーの作成を試みて成功した。今後は特異的阻害剤として発生過程での核細胞質間輸送因子の機能解析に用いる。

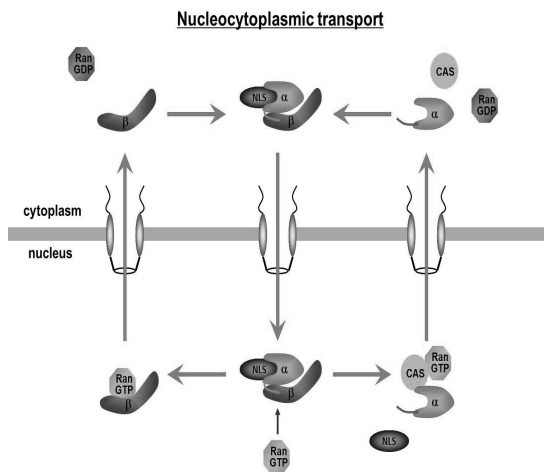
研究成果の概要(英文)：Although the nucleocytoplasmic transport is supposed to be involved in mammalian embryogenesis, not all of the molecular mechanism has been elucidated. We tried to investigate the role of the nucleocytoplasmic transport in mouse embryogenesis via phenotype analysis of transgenic mice. As a result, we found that the transgenic mice exhibited some stage specific phenotype during development. We also tried to characterize the transgenic cell lines of nucleocytoplasmic transport receptors, and revealed that the receptors are involved in proliferation. Additionally, we obtained aptamers that bind specifically to nucleocytoplasmic transport receptor, by which we are planning to use as specific inhibitor when monitoring the activity of the receptors during embryogenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核輸送

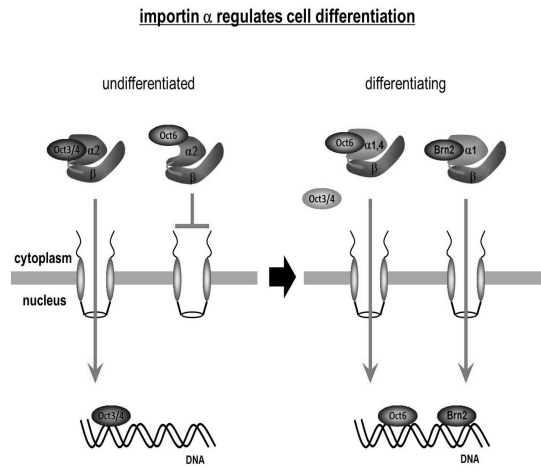
1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、核は脂質二重膜である核膜により覆われ、細胞質と物理的に隔てられている。そのため、核細胞質間の情報伝達の多くは核膜上に存在する核膜孔を介して行われる。脂質二重膜からなる核膜を貫通する核膜孔は巨大な蛋白質複合体であり、中央の網目構造部分は自由に通過できる分子サイズが制限される。イオンなどの小分子は自由に核膜孔を通過するが、40kDa以上の大きな分子は特異的な核細胞質間輸送受容体により選択的かつエネルギー依存的に輸送される。



研究代表者の過去の研究から、核細胞質間蛋白質輸送が、転写因子の輸送調節を通し、細胞分化に重要な役割を果たすことが示唆された(1)。核へと運ばれる蛋白質の受容体である importin は、哺乳類では6-7種類のファミリー分子が存在し(2,3)、成体の組織ごとに発現パターンが異なる。マウス ES細胞では importin 2 が主に発現するが、分化開始後は importin 2 の発現が低下し、他のファミリー分子の発現が上昇する。上昇するファミリー分子の種類は細胞種により異なり、神経分化では importin 1 や importin 3 などが上昇する。このようなファミリー分子発現のスイッチングは、抑制すると分化が阻害されることから、ES細胞の分化に必須であるといえる。さらに、分化の過程で importin ファミリー分子は、それぞれの基質特異性により、POU ファミリーなど特定の転写因子を輸送する。

Importin 2 の低下は幹細胞分化に必要であり、importin 2 を恒常的に発現させると ES細胞は分化せずに死ぬ。これは、importin 2 が Oct3/4 などの転写因子を核へと運ぶ一方、Oct6 や Brn2 の輸送を特異的に阻害することで ES細胞の未分化維持に働いており、分化の際にはこの活性を抑える必要がある



ことを示す。このような活性は、他の importin ファミリー分子には無く、importin 2 は他のファミリー分子とは異なり、幹細胞の維持に関わる独特の機能をもつ。このことより、importin 2 は個体発生においても何らかの重要な役割を担っている可能性が高いと考えられた。

これまでに国内外で importin 1、importin 3、importin 4、importin 6、importin 7 のノックアウトマウスが作製され、報告されている。表現型としては、importin 7 の雌の卵割期での停止による低出生率(5)、importin 6 ノックアウトマウスの雌の不妊と、importin 1 ノックアウトマウスの1系統に雌の分娩異常がみられた(6)。このうち、importin 1 ではノックアウトマウスの脳組織において importin 3 が野生型よりも高発現しているのが観察されたことから、importin 1 と importin 3 の相補性が示された(7)。このように、importin ファミリーにはそれぞれに特異的な機能があり、組織や細胞の種類に応じて特定のファミリー分子間での相補性があることがうかがえた。一方、importin ファミリー分子の中で幹細胞の維持に関わる独特の機能を持つ importin 2 のノックアウトマウスは国内外いずれにおいてもまだ作製されておらず、胚発生における機能も解析されていなかった。

引用文献

(1)N.Yasuhara et al., Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin-alpha. Nature Cell Biology, 1, 72-79 (2007)
 (2)DS. Goldfarb et al., Trends Cell Biol., Importin : a multipurpose nuclear-transport receptor. 14, 505-514 (2004)
 (3)Y.Yoneda, Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell

function. *Genes Cells*, 5, 777-787, (2000)
(4)N.Yasuhara et al., Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance. *Dev. Cell*, 26, 123-35 (2013)
(5)F. Rother et al., Importin 7 is essential for zygotic genome activation and early mouse development. *PLoS One*, 6, e18310 (2011)
(6)Hu J et al., Novel importin-alpha family member Kpna7 is required for normal fertility and fecundity in the mouse. *J Biol Chem*, 43, 33113-22 (2010)
(7)T. Shmidt et al., Normal brain development in importin-alpha5 deficient-mice. *Nature Cell Biology*, 9, 1337-8 (2007)

2. 研究の目的

本研究では importin を中心に、核 細胞質間蛋白質輸送が胚発生においてどのような役割を果たすのかを明らかにするのが大きな目標であった。このような核 細胞質間蛋白質輸送が細胞分化に果たす役割を真に理解するには、個体による解析が不可欠であった。importin ファミリーのノックアウトマウスの解析は行われているものの、importin 2 のノックアウトマウスは存在しなかった。また、核輸送因子の個体レベルの研究は世界的に数が少なく、核 細胞質間蛋白質輸送が発生にどのように働くか明らかではなかった。よって、核輸送因子 importin 2 の機能を個体レベルで解析しようとする本研究は、当該分野の展開には欠かせないものであると考えた。

そこで、代表者らが得ていた importin 2 ノックアウトマウスの表現型解析を行い、以下の3つの点に焦点を当て、細胞の核 細胞質間蛋白質輸送による胚発生の制御機構を明らかにすることを目指した。

- (1) 発生での importin 2 の機能
- (2) importin 2 の発現により動く反応系
- (3) importin ファミリー間の相補性

3. 研究の方法

importin 2 ヘテロ欠損マウスを使用し、表現型の解析を中心に行い、importin 2 がどのような組織の形成に関わるか明らかにする。また、分離細胞を用いたアプローチをする。importin 2 ノックアウト細胞を単離した後に正常マウスに移植し、どのような組織の形成に至るか解析する。さらに、importin 2 が細胞増殖を促進する可能性を

探る。さらに、動物胚および分離細胞において、importin 2 のターゲットとなる下流因子を、次世代シーケンスを用いて解析する。importin 2 との関連性が強い可能性が高い候補因子について、分子生物学的、細胞生物学的手法を用い、importin 2 との相互作用や、その相互作用が発生に果たす役割を明らかにする。また、他の ファミリーが機能を相補する可能性について、importin 2 ノックアウト胚の、他の ファミリーの遺伝子発現上昇を解析し、明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、importin 2 のヘテロ欠損マウスを作製したのちにホモ欠損マウスを得た。その表現型を解析してマウス胚発生過程での importin 2 の機能を解析し、発生段階で何らかの特異的な変化がみられることを掴んだ。

合わせて、核 細胞質間輸送因子発現の意義を調べるため、核 細胞質間輸送因子の発現操作を施した細胞株を作成した。これまでに、その性質の解析を行い、核 細胞質間輸送因子の発現抑制が細胞の増殖に関わることを見つけている。現在、この増殖における核 細胞質間輸送因子の機能に関わる分子メカニズム解析をめざし、核 細胞質間輸送因子がいかんして細胞増殖に働くかの一端を明らかにしつつある(論文投稿準備中)。合わせて細胞や組織での importin 2 発現の意義を調べるため、importin 2 特異的アプタマーの作成を試みて成功した(Aptamers that bind specifically to human KPNA2 (importin- 1) and efficiently interfere with nuclear transport. *Journal of Biochemistry*, 2016, Noriko Yasuhara, Penmetcha Kumar)。今後は importin 2 の特異的阻害剤として発生過程での importin 2 の機能解析に用いることができる。

核 細胞質間輸送因子には動物種に応じて構造や性質の類似した複数のファミリー分子が存在するが、それぞれに組織特異的発現を示すため、胚発生においても異なる機能を果たすと考えられる。そのため、今後はこれまでの研究結果を踏まえ、ファミリー分子間の差異を明らかにする。

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 2件)

(1) Noriko Yasuhara, Yoshihiro Yoneda: Importins in the maintenance and lineage

commitment of ES cells: Neurochem Int., 106, 14-23, 2017, 査読あり

(2) Noriko Yasuhara, Penmetcha Kumar: Aptamers that bind specifically to human KPNA2 (importin- 1) and efficiently interfere with nuclear transport: J Biochem., 160, 259-268, 2016, 査読あり

〔学会発表〕(計 2件)

(1) 浅野僚二、安原徳子、柴崎典子、地引和也、石畑雄太郎、海江田愛奈美
「細胞増殖における核輸送因子の働き」
生命科学系学会合同年次大会 2017年12月6日、神戸

(2) 地引和也、山本達郎、中尾光善、斉藤典子、安原徳子
「ER 陽性乳がん細胞における核輸送受容体 importin 2の働き」
生命科学系学会合同年次大会 2017年12月6日、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安原 徳子 (YASUHARA Noriko)
日本大学・文理学部・准教授
研究者番号：90423152

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()