

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2004 ～ 2008年度  
 課題番号：16084204  
 研究課題名（和文） 核膜孔複合体の分子動態と核-細胞質間タンパク質輸送制御  
 研究課題名（英文） Molecular dynamics of nuclear pore complexes and regulation of nucleocytoplasmic protein transport  
 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

研究成果の概要：細胞核の重要な構造体である核膜孔複合体に焦点を当て、その分子動態が複雑な生命現象とどのように深く関連しているのかを解析した。その結果、筋芽細胞から筋細胞への分化の過程で、核膜孔複合体構成因子の1つNUP358の発現量が分化に応じて変動し、その変動が筋分化に必須であることがわかった。また、核輸送因子 importin・サブタイプ発現のスイッチングが細胞の分化・未分化決定機構に重要な役割を果たすことを、マウスES細胞を用いて明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	38,200,000	0	38,200,000
2005年度	34,000,000	0	34,000,000
2006年度	32,300,000	0	32,300,000
2007年度	32,300,000	0	32,300,000
2008年度	32,300,000	0	32,300,000
総計	169,100,000	0	169,100,000

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：細胞核、核タンパク質輸送、細胞分化、核膜孔複合体、ES細胞、筋芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

核-細胞質間タンパク質輸送に関する研究は、輸送因子 importin・, importin・や輸送の方向性を決定する分子である低分子量 GTPase Ran の発見を契機にして急速に進み、基本的な輸送メカニズムの理解は進んで

いた。しかし、核膜孔通過の問題は理解が遅れており、特に、1つの核膜孔を、細胞質から核内へ、核内から細胞質へと絶えず両方向に異なる蛋白質が移動するメカニズムやその制御については全く理解されていなかった。また、哺乳動物細胞の核膜孔複合体を構

成する因子（ヌクレオポリン）は、プロテオミクス解析から、約30種類存在するという報告がなされたが、それらの分子動態はほとんど解析されていないのが現状であった。さらに、核—細胞質間タンパク質輸送という機能と関連付けた研究も遅れていた。また、核膜孔をタンパク質が核内外に移行するそれぞれの分子メカニズムについては理解が進んでいたが、それに関わる輸送因子、核膜孔構成因子、輸送システムが、複雑な生命現象とどのように深く関わっているのかは全く理解されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、細胞核の重要な高次構造体の1つである核膜孔複合体に焦点を当て、この複合体の重要な機能である核—細胞質間タンパク質輸送の制御を指標にして、その分子構築ならびに分子動態を明らかにするとともに、核タンパク質輸送システムが、複雑な生命現象とどのように関わり、制御しているのかを知ることを目的とする。近年、核—細胞質間タンパク質輸送に関する研究は急速に進展し、importin $\alpha$ 、importin $\beta$ などの多くの輸送因子が同定され、また、低分子量GTPase Ranの役割などが明らかとなり、輸送の基本的メカニズムの理解はかなり進んだ。しかし、核タンパク質/輸送因子複合体がどのように核膜孔を通過するのか、また、1つの核膜孔をタンパク質が互いに干渉を受けずに両方向性にどのように通過するのかという点はほとんど解析されていない。そこで、本研究では、核膜孔複合体構成因子（ヌクレオポリン）に焦点を当て、個々のヌクレオポリンの分子動態を生細胞で観察するとともに、FRET (fluorescence resonance energy transfer)法などを駆使して、ヌクレオポリン相互の関係が、例えば、細胞周期を通して、どのようにダイナミックに変化して

いるのかを明らかにする。一方、1つの核膜孔を異なるタンパク質が両方向性に通過するための制御機構を解明するため、1つは、核—細胞質間タンパク質輸送の方向性を保証している分子であるRanに着目し、そのサイクルに重要な役割を果たしているRanGAP (Ran GTPase activating protein)がSUMO化を受けて核膜孔に局在することが知られているので、RanGAPに焦点を当て、その分子動態を解析するとともに、核内外の輸送がRanGAPの動態変化に対応してどのように変化するかを解析する。さらに、細胞分化に焦点を当て、核膜孔を介したタンパク質輸送制御が、細胞分化に及ぼす効果を検討することを通して、核—細胞質間タンパク質輸送制御と高次生命現象のつながりを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ヌクレオポリンならびにRanGAPの動態と核—細胞質間タンパク質輸送制御の関連に関する解析

それぞれのヌクレオポリンの動態と核—細胞質間タンパク質輸送の関連、特に、核内外の輸送制御の関係を解析する。具体的には、1つは、GFPに核局在化シグナルと核外輸送シグナルの両方を付加した融合遺伝子を作成し、輸送のレポーター分子として培養細胞で発現させる。この分子の挙動は、例えば、細胞周期の進行に依存した核内外輸送の効率の変化に対応して細胞内の局在が変化する可能性が考えられる。このレポーター分子の局在変化とヌクレオポリンの挙動変化に相関関係が見られた場合、そのヌクレオポリンは、核内外タンパク質輸送の制御に関わる候補分子と考える。もう1つは、ある種のヌクレオポリンの挙動が、例えば、細胞周期や細胞分化に依存して大きく変動することがわかったものについて、その変動の時期に核局在化シグナルを持つタンパク質あるいは

核外輸送シグナルを持つタンパク質をインジェクションすることにより、輸送効率が変わっているか否かを解析する。さらに、レポーター分子としての工夫として、異なるシグナルの組み合わせで作成した、複数のレポーター分子を利用し、複数の輸送経路についても解析を進める。一方、RanGAPに着目した研究として、RanGAPがどのようなダイナミクスで核膜孔複合体と結合したり解離したりしているかという動態解析をGFP融合タンパク質を利用して行う。その動態と核-細胞質間タンパク質輸送制御機構との関連を知るための解析は、上記ヌクレオポリンの解析で用いたものと同様のレポーター分子を利用する。

(2) 核膜孔複合体の分子動態と細胞分化との関連性に関する解析

核膜孔複合体のダイナミックな動態と高次生命機能の関連を解析するための実験系として、1つは、細胞分化の観点からの研究を考える。具体的には、筋芽細胞であるC2C12細胞や多能性幹細胞であるES細胞を用い、細胞を未分化状態で増殖を続けさせた場合と、分化誘導させた場合とで比較し、核膜孔複合体構成因子であるヌクレオポリンの発現量や細胞内局在がどのように変化するかを網羅的に解析する。また、核膜孔全体の構築や形態が変化するかを、原子間力顕微鏡システムを駆使することにより解析する。もし、発現量の変化するヌクレオポリンが同定できた場合、その発現量を人工的に変化させた場合に、細胞の分化にどのような影響があるかをRNAi法や強制発現法などを用いて解析する。また、細胞内局在が変化するヌクレオポリンが存在すれば、その局在変化に必要なドメインを同定し、そのドメインを欠く変異体を発現させた場合、細胞分化にどのような

影響を及ぼすかを解析し、その局在変化の重要性を知る。

#### 4. 研究成果

(1) 核膜孔複合体が細胞の環境変化に応答してどのように動態変化を示すかを明らかにするため、細胞間接着に応じて核膜孔が変化するかどうかを解析できる実験系の構築を目指した。その結果、MDCK細胞を用いることにより、細胞接着の有無により核膜孔の動態を解析できる系の開発に成功した。さらに、核-細胞質間タンパク質輸送の方向性を保証している分子であるRanに着目し、そのサイクルに重要な役割を果たしているRanGAP (Ran GTPase activating protein)がSUMO化を受けて核膜孔に局在することが知られているので、RanGAPに焦点を当て、その分子動態を解析するとともに、核内外の輸送がRanGAPの動態変化に対応してどのように変化するかを解析した。その結果、RanGAPがcasein kinase IIによってリン酸化を受けることを発見し、リン酸化がRanGAPの細胞内局在に変化を与える可能性が示された。このリン酸化はSUMO化と直接関係ないこともわかり、RanGAPがリン酸化によっても動態が調節されていることを示唆する興味深い結果が得られた。今後、このリン酸化によるRanGAPの動態変化と核膜孔物質通過効率との関連を追及する研究が展開されれば、核タンパク質輸送制御と核膜孔複合体との関連の理解に向けた大きな展開が期待できる。

(2) 核膜孔のダイナミックな動態と高次生命機能との関連性を解析するための実験系として、主として細胞分化の観点からの研究を進めた。具体的には、筋芽細胞であるC2C12細胞や未分化ES細胞を用い、細胞を未分化状態で増殖を続けさせた場合と分化誘導させた場合とで比較した場合、核膜孔複合体がどの

ように変化するか、また、変化するのであれば、その動態を個々のヌクレオポリンに着目して解析するとともに、発現量、局在が変化するヌクレオポリンがあるかどうかを網羅的に解析を進めた。その結果、C2C12細胞を血清除去により筋細胞に分化させた場合、ヌクレオポリンの1つであるNup358の発現量が増加するとともに、その局在が、核全体から核膜孔部分に大きく変化することが明らかとなった。また、原子間力顕微鏡を用いて、核膜孔複合体の構造変化も解析したところ、分化に応じて、NUP358が局在していると思われる、核膜孔の細胞質側の直径が大きくなることを発見した。この時、同時に、蛋白質の核外輸送に関わる因子であるCrm1も核膜孔に強く局在することがわかり、核外輸送の効率が增加することがわかった。さらに、RNAiの手法を用いてNUP358の発現を抑制すると、筋芽細胞から筋細胞への分化が抑制されることがわかり、ヌクレオポリンの変動が、核内外のタンパク質輸送のバランスを変化させ、細胞分化に重要な役割を果たしているという興味深い成果が得られ、核膜孔複合体研究に大きなインパクトを与えた。一方、未分化ES細胞に分化を誘導して、いくつかのヌクレオポリンに対する抗体を用いて、その局在変化、発現量変化を解析したところ、Nup62が、未分化状態ではほとんど核膜に局在しているにも関わらず、分化に伴って核内、特にヘテロクロマチン領域に局在するようになることが明らかとなった。未分化ES細胞が分化するに際し、クロマチンの凝集が進むと考えられており、その制御にNup62が関与する可能性が示唆されるという興味深い成果が得られ、今後の研究の進展が期待される。

(3) 核膜孔複合体のみならず、核輸送因子に着目し、核—細胞質間タンパク質輸送制御とES細胞の細胞分化に関わる研究に着手し、マウスでは5種類存在すると考えられている importin のサブタイプの発現パターンが、細胞分化に応じてスイッチすることを発見した。そのスイッチングが細胞分化に果たす役割を解明するため、未分化ES細胞から神経細胞への分化に着目して研究を進めた。その結果、importin のサブタイプの発現がスイッチすることにより、細胞の分化・未分化を決定する転写因子の発現パターンが変化し、細胞分化が誘導されることが明らかとなった。このように、核輸送因子が、細胞分化に極めて重要な役割を果たすことを見出し、細胞分化における核輸送因子 importin の果たす重要性を世界に先駆けて提唱することができた。さらに、importin が、ある種の転写因子の核への輸送に対して抑制的に働く場合があるという、importin の新しい生理機能を見出した。この importin の抑制的機能が、細胞の運命決定を制御している可能性が見えてきており、細胞運命決定制御機構の理解に新しい展開を提唱する研究へと展開することが大いに期待される。

## 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48件)

主な論文

①Katahira, J., Inoue, H., Hurt, E. and Yoneda, Y. Adaptor Aly and co-adaptor

Thoc5 function in the Tap-15-mediated nuclear export of HSP70 mRNA.

EMBO J., 28: 556-567 (2009) 査読あり

②Yudin, D., Hanz, S., Yoo, S.,

Iavnilovitch, E., Willis, D., Gradus, T.,

Segal-Ruder, Y., Ben-Yaakov, K., Hieda, M.,

Yoneda, Y., Twiss, J. L. and Fainzilber, M

Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve.

Neuron, 59:241-252 (2008) 査読あり

③Yasuhara, N., shibazaki, N., Tanaka, S.,

Nagai, M., Kamikawa, Y., Oe, S., Kamachi, Y., K

ondoh, H. and Yoneda, Y.

Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin- $\alpha$

Nature Cell Biol., 9:72-79 (2007) 査読あり

④Bradatsch, B., Katahira, J.,

Kowalinski, E.,

Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgrtel, V

., Boese, G., Bassler, J., Wild, K., Peters, R.

, Yoneda, Y., Sinning, I. and Hurt, E.

Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S pre-ribosomal subunit.

Mol. Cell, 27:767-779 (2007) 査読あり

⑤Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H.,

Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H.,

Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe,

M., Tanaka, S., Shiota, K. and Nakano, T.

PGC7/Stella as a protector against DNA demethylation in early embryogenesis.

Nature Cell Biol., 9: 64-71 (2007) 査読あり

⑥ Shibata, S., Sasaki, M., Miki, T.,

Shimamoto, A., Furuichi, Y., Katahira, J.,

and Yoneda, Y. Exportin-5 orthologues

are functionally divergent among species.

Nucl. Acids Res., 34: 4711-4721 (2006) 査読あり

⑦ Kotera, I., Sekimoto, T., Miyamoto, Y.,

Saiwaki, T., Nagoshi, E., Sakagami, H.,

Kondo, H. and Yoneda, Y. Importin

transports  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent

protein kinase type IV (CaMKIV) to the

nucleus without utilizing importin

EMBO J., 24: 942-951 (2005) 査読あり

⑧Kose, S., Furuta, M., Koike, M., Yoneda, Y.

and Imamoto, N.

The 70 kDa heat shock cognate protein

(hsc70) facilitates the nuclear export of the import receptors.

J. Cell Biol., 171:19-25 (2005) 査読あり

⑨ Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J.,

Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta,

M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., and

Yoneda, Y.

Cellular stresses induce the nuclear

accumulation of importin  $\alpha$  and cause a conventional nuclear import block.

J. Cell Biol., 165:617-623 (2004) 査読あり

⑩ Sekimoto, T., Fukumoto, M., and Yoneda,

Y. 14-3-3 suppresses the nuclear

localization of threonine

157-phosphorylated p27<sup>Kip1</sup>.

EMBO J., 23: 1934-1942 (2004) 査読あり

〔学会発表〕（計120件）

主な学会発表

①米田悦啓

核蛋白質輸送と生命機能

BMB2008第31回日本分子生物学会年会・

第81回日本生化学会大会合同大会

2008.12.9-2008.12.12 神戸

②Asally, M., Yasuda, Y.,

Oka, M., Otsuka, S., Yoshimura, S. H.,

Yoneda, Y. Nuclear pore dynamics

during skeletal myogenesis.

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting

on Dynamic Organization of Nuclear

Function

2008.9.17-2008.9.21 N.Y./USA

③Yoneda, Y.

Nuclear protein import and its

significance to cell function

2nd International SOX Meeting

2008.9.16-2008.9.17 兵庫

④Yoneda, Y.

Importin alpha has multiple functionsEMBO

Workshop on Mechanisms of

Nucleocytoplasmic Transport

October 27-31, 2007 Italy

⑤米田悦啓

核-細胞質間分子流通機構と生命機能の調節

第71回日本生化学会中部支部会

2007年5月19日 名古屋

〔図書〕（計4件）

①浅利宗弘、米田悦啓

「分子生物学イラストレイテッド第3版」

（羊土社）

2009年 348ページ

②片平じゅん、米田悦啓

「標準細胞生物学」（医学書院）

2008年 358ページ

③Saiwaki, T. and Yoneda, Y.

“Nuclear Dynamics”

(Springer-Verlag Inc)

2007年 279ページ

④米田悦啓、他

「細胞核の世界ーダイナミクスから病態まで」（共立出版）

2007年 383ページ

〔その他〕

ホームページ

<http://www.anat3.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 悦啓 (YONEDA YOSHIHIRO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：80191667

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし