

令和元年6月14日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04789

研究課題名(和文) 核輸送因子importin- の多様な細胞内局在に基づく多機能性発現に関する研究

研究課題名(英文) The roles of importin-alpha subfamilies in mammals

研究代表者

米田 悦啓 (Yoneda, Yoshihiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・・・理事長

研究者番号：80191667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は哺乳動物で6-7種類のサブタイプが発現するimportin-alphaファミリー分子の多機能性、ならびにその高次生命現象との関連性、を明らかにすることを目的とした。本研究によってimportin-alphaのサブタイプ特異的な機能が、脳・生殖機能や病態に重要であることが分かった。さらに、核輸送以外のimportin-alphaの機能が、これらの生命現象には重要であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞質から核へのタンパク質の輸送において主に働いていると考えられてきた核輸送因子importin-alphaが、様々な細胞内局在を示しながら、核輸送以外の機能を発揮して哺乳動物の高次生命現象に関わっていることを明らかにした。これらの知見は、がんなどimportin-alphaが高発現する各種病態メカニズムの解明にも有用である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the role of importin-alpha family molecules in mammals, especially focusing on their relationship with various physiological phenomena. Our study demonstrated that the subtype-specific functions of importin-alpha are important for brain development and reproductive function. Furthermore, our data suggested that the non-transport functions of importin-alpha could be critical for normal physiological activity in mammals.

研究分野：細胞生物

キーワード：核輸送 importin がん細胞 ノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では遺伝情報であるゲノム DNA が保持される核と、タンパク質合成の場である細胞質が核膜により隔たれており、機能分子が絶えず核膜孔を介して核細胞質間を行き来している。核細胞質間分子輸送は、核輸送因子 importin-、importin-、RAN、核膜孔構成因子ヌクレオポリンなど、進化上保存された分子によって行われ、その基本メカニズムは酵母からヒトに至るまで保存されている。しかしながら、複雑な組織で構成される哺乳動物では、核輸送因子や核膜孔の多様化により緻密な輸送制御が行われていることが分かってきた。その一例が、核輸送因子 importin- であり、出芽酵母では 1 種類しかないのに対し、哺乳動物では 6 - 7 種類のサブタイプが存在する。哺乳動物の importin- は、組織・発生時期特異的な発現パターンを示し、また輸送基質の特異性を持つ事で物質輸送の多様性を生み出していると考えられる。さらに近年、importin- が細胞核、細胞膜、紡錘体など、様々な細胞内部位に局在し、核輸送以外の細胞内イベントにも関わっている多機能タンパク質であることが分かってきた。

2. 研究の目的

本研究では核輸送因子 importin- の機能と哺乳動物の高次生命機能の関連を明らかにする。さらに、importin- の核輸送以外の機能にも着目し、その多機能性という視点から高次生命機能を理解する。ノックアウトマウスの表現型解析や、様々な細胞内局在を示す importin- と、その多機能性の関連に着目して解析を進める。

3. 研究の方法

(1) Importin- 2 の多様な細胞内局在と相互作用因子

Importin- 2 は、がん細胞で高発現し、核、細胞質、細胞膜など、多様な細胞内局在を示すことが分かっている。そこで様々ながん細胞からプロテオーム手法によって相互作用因子を同定し、細胞核、細胞膜における機能を解析する。

(2) ノックアウトマウスの作製と解析

サブタイプのなかでも高い相同性を示す Importin- 3 と Importin- 4 に着目し、ノックアウトマウスを樹立して、両者の哺乳動物個体における生理機能を明らかにする。

(3) Importin- 4 と脳機能

これまでに SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 解析による Importin- 4 と精神疾患の関連が示唆されている。また精神疾患患者の死後脳組織において Importin- 4 が減少していることが報告されている。そこで、申請者らが作成した Importin- 4 ノックアウトマウスを用いて行動解析や脳組織の解析を行う。

4. 研究成果

(1) Importin- 2 の多様な細胞内局在と相互作用因子

5 種類のがん細胞を用いて、がん細胞種、ならびに細胞画分特異的に Importin- 2 と相互作用する複数の因子を同定した。これらのうち、膜局在することが知られる Importin- 2 相互作用因子については、その遺伝子ノックダウンを行うと、Importin- 2 の細胞外への分泌が促進されることが分かった。また Importin- 2 は、がん細胞で核に局在することが知られているが、核内ではクロマチンと相互作用していることが明らかとなった。

(2) Importin- 4 と精子形成

Importin- 4 ノックアウトマウスの解析を進めるなかで、雄性不妊傾向があることが明らかとなった。そこでノックアウトマウスの精巣と精子の解析を行った結果、Importin- 4 ノックアウトマウス精子の運動能に異常があることが分かった。精子では Importin- 4 は先体付近に局限して局在していることから、核輸送以外の機能によって精子形成に関与していることが示唆された。一方、Importin- 4 と高い相同性をもつ Importin- 3 のノックアウトマウスでは、その傾向は見られなかった。これまでの研究から精母細胞や円形精子細胞において importin- 3 は細胞質に、importin- 4 は核に局在することが分かっていることから、importin- 4 の核内機能が精子形成に関与している可能性が考えられる。

(3) Importin- 4 と精神疾患

Importin- 4 ノックアウトマウスの行動解析を行ったところ、不安関連行動が見られた。また免疫組織化学解析の結果から、Importin- 4 は複数の脳組織で顕著な核局在を示すことが分かった。通常、Importin- は細胞質に局在して核輸送に備えていると考えられていることから、これら複数の脳組織では、Importin- 4 が核輸送以外の機能を発揮して神経細胞の機能発現に関与している可能性が示唆された。実際に、選択的に Importin- 4 によって核輸送されていると考えられている複数の輸送基質については、ノックアウトマウスにおいても正常に核に輸送されていることが分かった。また興味深いことに、ノックアウトマウスでは、複数の炎症性サイトカインの上昇が見られ、慢性的な炎症が起きていることが示唆された。これらの結果は、Importin- 4 の核輸送以外の機能によって生体の炎症反応が抑えられ、正常な脳活動が支えら

れていることを示唆している。

(4) ヒト Importin- サブタイプ特異的モノクローナル抗体の取得
マウスの Importin- 8 は細胞分裂期の紡錘体に局在することが知られている。ヒト Importin- 8 に対するモノクローナル抗体を取得し、細胞内局在を観察した結果、ヒト Importin- 8 は強く核内に局在するが、紡錘体には局在しないことが分かった。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計8件)

1: Oka M, Yoneda Y. Importin : functions as a nuclear transport factor and beyond. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 査読有、2018、94(7):259-274.
DOI:10.2183/pjab.94.018.

2: Tanaka K, 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 alpha 1. Org Biomol Chem. 査読有、2018、16(24):4456-4463.
DOI: 10.1039/c8ob00706c.

3: Higa M, Oka M, Fujihara Y, Masuda K, Yoneda Y, Kishimoto T. Regulation of inflammatory responses by dynamic subcellular localization of RNA-binding protein Arid5a. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、2018、115(6):E1214-E1220.
DOI:10.1073/pnas.1719921115.

4: Yasuhara N and Yoneda Y. Importins in the maintenance and lineage commitment of ES cells. Neurochem Int., 査読有、2017、105:32-41.
DOI: 10.1016/j.neuint.2017.01.020. 17

5: Fujiwara K, Hasegawa K, Oka M, Yoneda Y, Yoshikawa K. Terminal differentiation of cortical neurons rapidly remodels RanGAP-mediated nuclear transport system. Genes Cells. 査読有、2016、21(11):1176-1194.
DOI: 10.1111/gtc.12434.

6: Miyamoto Y, Yamada K, Yoneda Y. Importin : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. J Biochem. 査読有、2016、160(2):69-75.
DOI:10.1093/jb/mvw036.

7: Moriyama T, Tanaka S, Nakayama Y, Fukumoto M, Tsujimura K, Yamada K, Bamba T, Yoneda Y, Fukusaki E, Oka M. Two isoforms of TALD01 generated by alternative translational initiation show differential nucleocytoplasmic distribution to regulate the global metabolic network. Sci Rep. 査読有、2016、6:34648.
DOI:10.1038/srep34648.

8: Miyamoto Y, Oka M. Data on dimer formation between importin subtypes. Data Brief. 査読有、2016、7:1248-53.
DOI: 10.1016/j.dib.2016.03.080.

〔学会発表〕(計20件)

1: 岡正啓 異所的な核膜孔構成因子 核輸送因子の相互作用がもたらす遺伝子発現異常 第41回日本分子生物学会年会・ワークショップ、横浜、2018年11月28日

2: 宮本洋一、伊藤大一、森田真規子、永井理博、盛山哲嗣、Kate L. Loveland、米田悦啓、疋田貴俊、岡正啓 統合失調症関連症状を示す核輸送分子 importin 4 ノックアウトマウスの解析 第41回日本分子生物学会年会・ポスター発表、横浜、2018年11月29日

3: Oka M, Mura S, Miyamoto Y, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y. The role of Crm1, a nuclear export receptor, in the regulation of gene expression. 第70回日本細胞生物学会・ワークショップ、東京、2018年6月7日

4: Miyamoto Y, Itou T, Morita M, Nagai M, Sasaki M, Moriyama T, Loveland KL, Yoneda Y, Hikida T, Oka M. The nuclear transport factor importin 4 is involved in normal male

fertility and brain development in mouse. 第70回日本細胞生物学会・ポスター発表、東京、2018年6月7日

5: Moriyama T, Yoneda Y, Oka M, Yamada M. Analysis of molecular determinants of estrogen receptor mobility. 第70回日本細胞生物学会・ポスター発表、東京、2018年6月7日

6: 米田悦啓 核と細胞質の対話を担う分子からの遺伝子の機能を探る 新学術領域「動的クロマチン構造と機能」一般公開シンポジウム「遺伝子研究の最前線」 東京、2018年1月8日

7: 岡正啓、村苑子、野上順平、前原一満、大川泰行、木村宏、米田悦啓 Nup98 融合遺伝子産物による Hox 遺伝子活性化のメカニズム ConBio2017、神戸、2017年12月6日

8: 盛山哲嗣、田中秀、福本昌宏、辻村賢二、山田幸司、中山泰宗、馬場健史、福崎英一郎、米田悦啓、岡正啓 翻訳開始点の異なる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69回日本細胞生物学大会、仙台、2017年6月13日

9: 宮本洋一、Penny A.F. Whiley, 岡正啓、Kete 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回日本細胞生物学大会、仙台、2017年6月13日

10: 岡正啓、村苑子、山田幸司、Percival Sangel, 大川恭行、木村宏、米田悦啓 ヌクレオポリン融合タンパク質 Nup98-HoxA9 の機能解析 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日~12月2日

11: 山田幸司、米田悦啓、岡正啓 Extracellular released importin 1 stimulates proliferation of cancer cells 第75回日本癌学会学術総会、横浜、2016年10月6日~8日

12: 岡正啓 核 - 細胞質間輸送ネットワークと高次生命現象および疾患 日本医療研究開発機構 (AMED) 研究費 難治性疾患実用化研究事業 「筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 新規治療法開発をめざした病態解明」H28 年度 ALS 病態解明班 ワークショップ、東京、2016年9月30日

13: 米田悦啓 核輸送因子同定からその新機能発見へ 第89回日本生化学大会 Meet the Expert、仙台、2016年9月25日~9月27日

14: 山田幸司、宮本洋一、岡正啓、米田悦啓 Novel function of nuclear transport factor in cancer <cell surface localization of importin 1 affects cancer cell proliferation by regulating FGF 1 signalling> 第41回内藤コンファレンス、札幌、2016年7月5日~7月8日

15: 盛山哲嗣、田中秀、福本昌宏、辻村賢二、山田幸司、中山泰宗、馬場健史、福崎英一郎、米田悦啓、岡正啓 異なる核細胞質間分布を示す2つの Transaldolase 1 アイソフォームによる代謝ネットワークの制御 第68回日本細胞生物学会大会、京都、2016年6月15日~6月17日

16: 山田幸司、世良田聡、岡正啓、藤本譲、仲哲治、米田悦啓 寒冷刺激は強皮症患者由来抗核抗体の生物活性を惹起する 第68回日本細胞生物学会大会、京都、2016年6月15日~6月17日

17: 生野雄大、山田幸司、宮本洋一、米田悦啓、岡正啓 細胞外放出される importin 1 の生物活性の解析 第68回日本細胞生物学会大会、京都、2016年6月15日~6月17日

18: 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、神戸、2016年5月21日

他

〔図書〕(計4件)

1: 宮本洋一、岡正啓、米田悦啓 タンパク質・RNA の核細胞質間輸送、阻害剤・活性化剤ハンドブック (羊土社) (2019) in press

2: 宮本洋一、米田悦啓 核 - 細胞質間蛋白質輸送と創薬研究, 医学の歩み (医歯薬出版), vol.267, No.13, 966-970 (2018)

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

4: 山田幸司、米田悦啓、岡正啓 核輸送因子インポーター 1 の新たな機能 次世代がん治療 - 発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス、診断法まで - NTS pp.285-294 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：フラビウイルス感染に対する抗ウイルス治療

発明者：宮本洋一、岡正啓、米田悦啓、岡本徹、徳永詢、松浦善治

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2019/020916

出願年：令和元年

国内外の別：国際

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：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2018/005019

出願年：平成 30 年

国内外の別：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

米田 悦啓 (YONEDA, Yoshihiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

研究者番号：80191667

(2)研究分担者

岡 正啓 (OKA, Masahiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所、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

(3)研究協力者

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、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

山田 幸司 (YAMADA, Kohji)

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、特任研究員

研究者番号：90570979

盛山 哲嗣 (MORIYAMA, Tetsuji)

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、特任研究員

研究者番号：50627990

疋田 貴俊 (HIKIDA Takatoshi)

大阪大学、たんぱく質研究所、教授

研究者番号：70421378

朝長 毅 (TOMONAGA Takashi)

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 創薬デザイン研究センター、
上級研究員

研究者番号：80227644

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。