

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02482

研究課題名(和文)核-細胞質間輸送経路の機能分担による細胞機能制御

研究課題名(英文)Division of cellular function of nuclear transport pathways

研究代表者

今本 尚子 (Imamoto, Naoko)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員

研究者番号：20202145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：核-細胞質間輸送は真核生物遺伝子機能制御の要である。ヒト細胞には多数の Importin ファミリー輸送運搬体とアダプター分子 Importin が存在する。Importin ファミリー輸送運搬体の基質を調べていくと、運搬体には分担した役割があるとともに、一つの運搬体分子が共通配列を持たない多くの輸送基質を運ぶことがわかってきた。本研究では、運搬体と基質構造の多様性を理解するための解析を進めるとともに、細胞モデル系を用いて多様な輸送経路が存在する生理的意義、並びに Importin サブファミリーの熱感受性を明らかにすることで、輸送経路の多様性が細胞機能を制御する仕組みを明らかにすることを旨とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核と細胞質の隔たりは真核生物の基礎であり、その隔たりを制御するのが核膜孔を介した核-細胞質間輸送である。輸送の基本メカニズムが明らかにされる一方で、基本的な問題がわかっていない事項も少なくない。本研究では一つの運搬体分子が多くの基質分子を認識できる機序の解析をした。その結果、運搬体と基質の特異性決定は予想以上に複雑であることがわかり、タンパク質科学一般にも及ぶ新たな問題点を投じることになった。また、輸送システムによる分化発生や老化誘導の制御メカニズムが具体的に明らかにできれば、基礎的生命科学に新たな視点が付与される。また、これまで意識されてこなかった創薬のシーズを将来的に提供できると期待する。

研究成果の概要(英文)：Nucleocytoplasmic transport plays an important role to regulate eukaryotic gene function. Large scale identification of transport cargoes of Importin family members (NTRs) has revealed that each NTRs show division of roles. At the same time, a single NTRs can carry large number of transport cargoes that do not share consensus sequences. In this study, we analyzed (i) a possible mechanistic of individual NTR that recognize diverse cargoes, (ii) physiological significance of diversity of transport pathways using cellular model systems of development and inducing senescent (iii) different thermo-sensitivities of the 7 Importin subfamily members, which is an Importin -specific adaptor molecules, and mechanistic of how cells maintain the importin . The goal of this study was to elucidate the mechanism by which the diversity of transport pathways regulates cell function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核-細胞質間輸送 受性 Importin beta Importin alpha 基質特異的認識 細胞機能 タンパク質の熱感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核と細胞質の隔たりは真核生物の基礎であり、その隔たりを制御するのが核膜孔を介した核-細胞質間輸送である。核-細胞質間輸送はさまざまな細胞プロセスに関わる細胞内反応として、細胞の恒常性維持を支えるとともに、発生・分化や疾患などの高次生命機能に深く影響する。核-細胞質間輸送研究では、輸送反応の基本メカニズムが解明され、最近になって輸送装置である核膜孔複合体の原子レベル構造情報が蓄積されているなど、研究の進展は著しい。その一方で、細胞内に存在する輸送経路多様性の問題は混沌としている。膨大な数の分子が核膜孔を絶え間なく流通しているが、それらが、多数の異なる運搬体で分担されて輸送されている。大部分の分子は Importin ファミリーと総称される運搬体分子群で運ばれると考えられているが、一つの細胞内に何故これほど多くの輸送経路が存在する意味があるのかといった基本的な問題が未だに明らかになっていない。数年前から、基質同定の網羅的解析の報告が我々を含めて少しずつ増えており、一つ一つの運搬体が運ぶ輸送基質の性質がわかってきた。例えば、運搬体には複雑な分担制があることや、一つ一つの運搬体分子が共通配列を持たない多くの輸送基質を運ぶことなどである。我々は、核-細胞質間輸送の“輸送経路多様性”の問題に多角的に取り組むことで、核-細胞質間輸送で制御されるさまざまな細胞プロセスを具体的に示していきたいと考えてきた。

2. 研究の目的

核-細胞質間輸送は真核生物遺伝子機能制御の要である。ヒト細胞には 20 種類以上の Importin ファミリー輸送運搬体、7 種類のアダプター分子 Importin が存在して、それぞれが個別の核-細胞質間輸送経路を担っている。これほど多くの輸送経路が細胞に存在する意義はわかっていない。ヒト細胞の Importin ファミリーが担う核内輸送経路の全てをカバーする 12 種類の Importin ファミリーの基質タンパク質候補を大規模に同定した結果、一つの運搬体は少なくとも 100 から 400 種類の分子を特異的に認識して輸送すること、同定した基質候補の機能と性質から輸送経路が複雑に役割分担していることがわかった。本研究では、運搬体と基質構造の多様性を理解するための解析を進めるとともに、細胞モデル系を用いて多様な輸送経路が存在する生理的意義を理解することを目指す。また、Importin サブファミリーには物理化学的性質の違いがある。それぞれのサブファミリーの物理的特性(ここでは温度感受性)を明らかに、その生物学的意義を明らかにしたい。これら知見を踏まえて、本研究では輸送経路の役割分担と性質の違いを明らかにし、それによって細胞機能が制御される仕組みの理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) 運搬体と基質構造の多様性を理解するための解析:

我々の解析で、一次構造上の相同性が高いにもかかわらず少数の共通基質しか持たないことがわかっていた Transportin-SR (TrnSR) と Importin-13 (Imp13) の 2 つの運搬体分子に着目して、一つの運搬体が共通配列を持たない基質を特異的に認識する仕組みの解析を進める。具体的には、それぞれの運搬体について、報告されている運搬体-基質の共結晶構造の情報と、進化トレース法で高い KL-value を持つアミノ酸を、基質が結合するアミノ酸と考えてピックアップしていく。

(2) 多様な輸送経路の生理的存在意義の解析:

老化・分化の様々な細胞モデル系を検討し、その中で Importin α/β ファミリー輸送因子の発現量が再現性よく大きく変動するモデル系を選別する。次に質量分析法によるプロテオミ

クス解析で、分化前後で変動する核タンパク質を同定する。同定したタンパク質の、発現変動した Importin ファミリー分子の関係と、機能解析を行う。

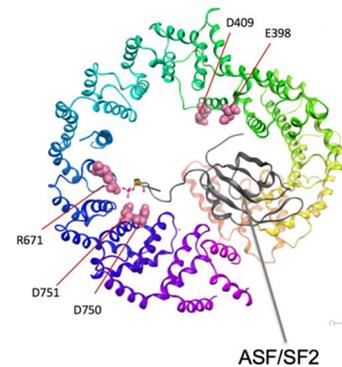
(3) Importin サブファミリーの物理化学的性質の解析:

ヒトに存在する7種類全ての Importin ファミリーについて、thermal shift assay を行い、それぞれの温度感受性や温度耐性を調べる。温度感受性または耐性であることの生理的意義を考える。

4. 研究成果

(1) 運搬体と基質構造の多様性を理解するための解析

私たちは、特定の輸送経路で核内へ輸送される基質タンパク質を同定する技術を使って、12のImportinβファミリー核内輸送運搬体の大規模基質同定を行うことで、Importinファミリーが構成するヒト細胞の核内輸送経路全てを網羅した(Kimura et al., eLife 2017)。その結果、同定された基質候補それぞれの機能解析から運搬体には分担制があること、また、一つの運搬体分子が共通配列を持たない多くの輸送基質を運ぶことがわかった。そのことに着目して、ここでは一つの運搬体が共通配列を持たない基質を特異的に認識するメカニズムの解析を進めた。基質結合部位の特徴を解析するため、一次構造上の相同性が高いにもかかわらず共通基質が少ないTransportin-SR(TrnSR)とImportin-13(Imp13)の2つの運搬体について、運搬体-基質の共結晶構造と進化トレース法を利用して、運搬体の基質結合に寄与すると考えられるアミノ酸をピックアップした(図1)。そのアミノ酸に変異を加えて、我々が同定した基質候補と総当たりで結合解析を行った。具体的には、

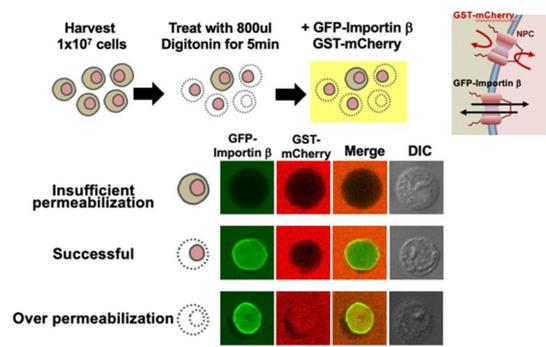


TrnSRは5変異体に対して41基質、Imp13は10変異体に対して40基質、と総数605の組み合わせで結合を解析する必要があった。そのため、小規模培養でタンパク質を取得して、ハイスループット解析が可能なBeads halo assayを利用することにした。それぞれの組み合わせについて、bindingアッセイを3回ずつ行い、結果の再現性を確認した。結合に関与する運搬体上のアミノ酸残基の違いによって結合する基質タンパク質群をグループ分けして、それぞれの構造情報(disorder領域、配列や構造類似性など)を解析した。その結果、運搬体のどの変異で結合する・しない、という結合様式と、基質の配列・構造には関係性がないことがわかった。これらのことから運搬体-基質の結合様式には、従来考えられていたような基質上の共通配列と運搬体分子上の特定部位の定型的な結合を遥かに超えた多様性があり、運搬体-基質の特異性決定は予想以上に複雑であることがわかった(産業総合研究所との共同研究、Kimura et al., Scientific Rep 2021)。

Fig.1 進化トレース 右: 両運搬体の一の方にのみに保存されたアミノ酸残基の特定例 (D426, Y433, E398): 高いKL-valueを持つ。左: KL-value でピックアップしたアミノ酸5個を、既に報告されているTrans-SR・ASF/SF2 (運搬体・基質)の共結晶構造にマッピングした下: KL-value でピックアップしたアミノ酸5個を、既に報告されているTrans-SR・ASF/SF2 (運搬体・基質)の共結晶構造にマッピング

(2) 新規の核画分タンパク質の取得方法の構築

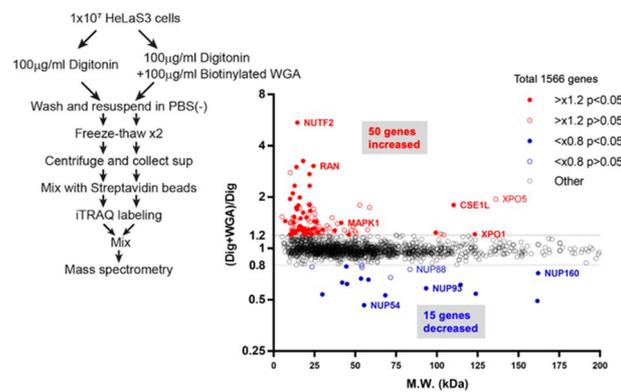
細胞を生化学的に分画して、細胞質画分と核画分を得ることは多くの研究室で日常的に行われている汎用研究法である。しかし、これまでの方法で、可溶性の核タンパク質を正確に核画分に回収することができていなかった。理由は 1) 細胞膜を可溶化するとき、核膜が傷ついて核の可溶性タンパク質が漏れてしまう、2) 分画の際に細胞を低温で取り扱っていると核-細胞間輸送が止まる溜め、核内因子が細胞質に移行する、3) 核膜



に傷がつかなくても核膜孔から分子量 1 ~ 2 万の小さな分子が核から細胞質もれる、の 3 点が挙げられる。これらの問題を克服するために、従来のホモジナイザーや低張液を用いた方法ではなく、細胞膜に豊富に存在するコレステロール特異的な界面活性剤ジギトニンを用い

方法を採用した。処理条件を最適化することで、1.5ml チューブ 当たり 1X10⁷ 個の HeLaS3 細胞を 90% 以上の効率で透過処理できるまで引き上げることができた (Fig2)。HeLa 細胞 S3 の他に、A549 や MCF7 細胞等の一般的な培養細胞でも同程度の効率で処理できることを確認し、多くの実験への応用が可能であることがわかった。操作は室温で行う。さらに、透過処理の際、核膜孔を通

Fig.2 核膜孔通過の性質の違うタンパク質の局在を指標に細胞膜を特異的に透過処理できる条件を設定した。



って流出する低分子量核タンパク質群を核内に閉じ込めるため、ジギトニンに WGA (小麦杯芽アグルチニン) を加えて処理を行うことにより、細胞膜の透過と核膜孔通過の遮断を同時に行える方法を確認した。得られた核画分の組成を網羅的な質量分析によって分析してみると、WGA の添加によって低分子量タンパク質が本来の局在により近い状態で分画できることを確認した (Fig3)。市販の分画キットでは、多くの場合可溶性核タンパク質が細胞質画分に流出したのに対し、今回構築した方法では流出を最小限に抑えられていることが分かった。さらに、本来不溶性であるタンパク質の溶出も見られず、より正細胞の状態に近く高純度に核可溶性タンパク質画分を得られた。これらの技術について、理研鼎業を通して、国内、国外の特許出願を行うとともに、投稿論文として受理された (Ogawa & Imamoto, iScience 2021)。

Fig.3 核画分の組成を網羅的な質量分析 (左図) によって分析した結果 (右図)。WGA 添加によって低分子量タンパク質が核画分に回収され、本来の局在を反映する。

(3) 多様な輸送経路の生理的存在意義の解析:

様々な分化誘導系と老化誘導系の細胞モデルで試した結果、単球由来 THP-1 細胞のマクロファージ分化系が、Importin α / β ファミリー輸送因子の発現量が再現性よく大きく変動するモデル系であることを判断し、この系を用いた解析を進めた。分化前後の総タンパク質と核内タンパク質を、質量分析法によるプロテオミクス解析を行った。その結果、分化後の核内では多くのプロテアソームサブユニットタンパク質や数種類の E3 ユビキチンリガーゼを含む多数のタンパク質が増加していること、逆に、細胞分裂や DNA 合成に関与する蛋白質が減少していることを見出した。この分化過程における輸送因子の顕著な発現変動のひとつは、Importin α 5 (KPNA1) の発現上昇であるため、siRNA により Importin α 5 の発現を抑制した THP-1 細胞でも同様に分化

前後のプロテオミクス解析を行い、Importin α 5 発現変動の影響を確認した。また、同分化過程では、Importin α 1 (KPNA2) の顕著な発現減少も見られるため、Importin α 1を発現誘導することで、分化過程の際にImportin α 1の減少が起こらないTHP-1安定細胞株を作製し、発現誘導有無の両条件下で分化誘導した細胞の分化前後の総蛋白質、核蛋白質のプロテオミクス解析を行った。

Importin α 1を発現誘導しない場合と比べ、高発現下で分化誘導した細胞の核内に多く存在するタンパク質には、細胞分裂やDNA合成に関わるものが多く含まれることが判明し、分化誘導に伴うこれら因子の減少がImportin α 1の発現減少であるためであることが確認された。また、細胞の蛍光免疫染色、総タンパク質、核タンパク質のウエスタンブロット解析により、分化誘導前後のタンパク質の細胞内局在を解析し、分化時のプロテオソームサブユニットタンパク質やユビキチンリガーゼの核局在を確認した。(論文投稿準備中)。

(4) Importin サブファミリーの物理化学的性質の解析

私たちは精密な温度制御が可能なサーマルサイクラーを利用して、細胞内に存在する多様な輸送経路それぞれの温度依存性を調べた。その結果、核-細胞質間輸送システムは、多段階のメカニズムで温度上昇に応答することがわかった

(Ogawa & Imamoto, J. Cell Biol. 2017)。その中で Importin / 輸送経路がRan依存的な輸送経路の中で最も熱感受性であることがわかった。調べた結果、importin が核-細胞質間輸送因子の中で極端に熱感受性であることが判明した。そこで、ヒトに存在する全てのImportin サブファミリー(7種類)の熱感受性を、thermal shift assayで調べた。その結果、7種類Importinファミリーの中で、KPNA1, 2, 7の3種類が顕著に熱感受性であること、KPNA3, 4の2種類が顕著に熱耐性であることを確認した。驚いたこと

とに、熱感受性のファミリー分子は、試験管内で10~30%程度37°Cで変性することが示された。しかし一方で、これらのタンパク質は細胞内で安定に存在する。このことから、細胞内には未知のImportin α 安定化機構が存在すると考えらる。Importin が熱感受性であるという脆弱性を持つことが、老化や環境ストレスにおける輸送の制御に寄与している可能性が新たに考えられる(論文投稿準備中)。

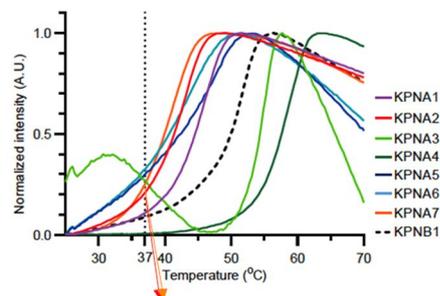


Fig.4 7種類の Importin サブファミリーの thermal shift アッセイの結果。KPNA1, 2, 7は熱感受性であり、KPNA3, 4は熱耐性である。熱感受性サブファミリー分子の10~30%は37°Cで試験管内で変性する(矢印)。

文献

1. Kimura, M., Imai, K., Morinaka, Y., Hosono-Sakuma, Y., Horton, P., Imamoto, N.(2021) Distinct mutations in importin- β family nucleocytoplasmic transport receptors transportin-SR and importin-13 affect specific cargo binding. *Sci. Rep.* 11, 15649
2. Ogawa, Y., Imamoto, N. (2021) Methods to separate nuclear soluble fractions reflecting localizations in living cells. *iScience* 24, 103503.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Imamoto Naoko	4. 巻 in press
2. 論文標題 Functional analysis of Hikeshi reveals physiological significance of nuclear Hsp70	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Opinion Cell Nucleus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Funakoshi Tomoko, Imamoto Naoko	4. 巻 in press
2. 論文標題 Reconstitution of nuclear envelope subdomain formation on mitotic chromosomes in semi-intact cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kose Shingo, Ogawa Yutaka, Imamoto Naoko	4. 巻 in press
2. 論文標題 Thermal stress and nuclear transport	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Springer Nature “Thermal Biology”	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kose Shingo, Imai Kenichiro, Watanabe Ai, Nakai Akira, Suzuki Yutaka, Imamoto Naoko	4. 巻 5
2. 論文標題 Lack of Hikeshi activates HSF1 activity under normal conditions and disturbs the heat-shock response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Yutaka, Imamoto Naoko	4. 巻 24
2. 論文標題 Methods to separate nuclear soluble fractions reflecting localizations in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103503 ~ 103503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sung Daeho, Lim Chan, Takagi Masatoshi, Jung Chulho, Lee Heemin, Cho Do Hyung, Shin Jae-Yong, Ahn Kangwoo, Hwang Junha, Nam Daewoong, Kohmura Yoshiki, Ishikawa Tetsuya, Noh Do Young, Imamoto Naoko, Jeon Jae-Hyung, Song Changyong	4. 巻 118
2. 論文標題 Stochastic chromatin packing of 3D mitotic chromosomes revealed by coherent X-rays	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2109921118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kimura Makoto, Imai Kenichiro, Morinaka Yuriko, Hosono-Sakuma Yoshiko, Horton Paul, Imamoto Naoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct mutations in importin- family nucleocytoplasmic transport receptors transportin-SR and importin-13 affect specific cargo binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94948-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mizuno Takeshi, Hirabayashi Kei, Miyazawa Sae, Kobayashi Yurika, Shoji Kenta, Kobayashi Masakazu, Hanaoka Fumio, Imamoto Naoko, Torigoe Hidetaka	4. 巻 26
2. 論文標題 The intrinsically disordered N terminal region of mouse DNA polymerase alpha mediates its interaction with POT1a/b at telomeres	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 360 ~ 380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小瀬真吾, 渡邊愛, 今本尚子
2. 発表標題 HikeshiによるHSP70核輸送：温度依存性、転写制御・核タンパク質恒常性機維持における役割
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小瀬真吾, 今本尚子
2. 発表標題 Understanding cellular homeostasis through nuclear transport studies
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小瀬真吾, 渡邊愛, 今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70の核輸送が適切なHSF1転写制御とタンパク質恒常性維持に重要である
3. 学会等名 第16回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小瀬真吾, 渡邊愛, 今本尚子
2. 発表標題 Hikeshiによる分子シャペロンHSP70核輸送：HSF1転写制御と核タンパク質恒常性機構における役割
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川泰, 今本尚子
2. 発表標題 生細胞の局在を反映した核・細胞質可溶性画分の分画法
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Imamoto
2. 発表標題 Hikeshi regulates activity of Heat Shock Factor (HSF) 1 through mediating nuclear import of Hsp70s
3. 学会等名 14th International Conference on Nucleocytoplasmic Transport (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shingo Kose, Naoko Imamoto
2. 発表標題 核-細胞質間輸送の多様性と役割分担
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoko Imamoto
2. 発表標題 Understanding aging through nuclear transport studies
3. 学会等名 RIKEN Aging Project Annual Meeting Online (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今本尚子
2. 発表標題 核-細胞質間輸送経路の多様性と細胞機能
3. 学会等名 2021年日本生化学会関東支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Nuclear Fractionation	発明者 Yutaka Ogawa	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/44140	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

理化学研究所 主任研究室 今本細胞核機能研究室 https://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_dyn/ 理化学研究所 開拓研究本部 今本細胞核機能研究室 http://www2.riken.jp/celldynamics/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 誠 (Kimura Makoto) (00290891)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------