

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23657130

研究課題名（和文） RAN サイクルと細胞老化

研究課題名（英文） RAN cycle and cellular senescence

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（和文）：

本提案者らは Ran や RanBP1 (=Ran binding protein 1)に関する研究を行っている過程で、MEF (=mouse embryonic fibroblast)細胞の細胞老化が進行するにつれて、Ran の発現量が徐々に低下するとともに、細胞老化に伴って Ran の局在が徐々に細胞質に偏在していくことを発見した。これらの知見に基づき、Ran サイクルの変化とそれに伴う核—細胞質間分子輸送機構の変化が、細胞老化進行の根幹となっているのではないかと考え、Ran サイクルと細胞老化の関係を明らかにすることを目的として研究を進めた。正常ヒト細胞を用いて、継代培養を続けると、Ran の発現量が低下し、その局在が細胞質側に偏移していくことが確認でき、その変化に応じて、核輸送因子である importin α の局在が変化するとともに、その発現量が低下して行くことがわかった。また、正常ヒト細胞において、Ran の発現量をノックダウンすると、senescence-associated beta-galactosidase 活性が上昇し、細胞老化が進行することが明らかとなった。以上より、細胞老化と Ran サイクルが密接に関わっていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The small GTPase Ran, Ras-related nuclear protein, plays important roles in multiple fundamental cellular functions such as nucleocytoplasmic transport, mitotic spindle assembly, and nuclear envelope formation, by binding to either GTP or GDP as a molecular switch. During the long-term culture of normal mammalian cells, I found that the endogenous Ran level gradually reduced in a passage-dependent manner. To examine the physiological significance of Ran reduction, I first performed small interfering RNA (siRNA)-mediated abrogation of Ran in human diploid fibroblasts. Ran-depleted cells showed several senescent phenotypes. Furthermore, I found that nuclear accumulation of importin α , which was also observed in cells treated with siRNA against CAS, a specific export factor for importin α , occurred in the Ran-depleted cells before the cells showed senescent phenotypes. Further, the CAS-depleted cells also exhibited cellular senescence. Indeed, importin α gradually accumulated in a passage-dependent manner. Thus, reduction in Ran levels causes nuclear accumulation of importin α , leading to cellular senescence in normal cells. The amount of intracellular Ran may be critically related to cell senescence. The cellular aging process may proceed through gradual regression of Ran-dependent nucleocytoplasmic transport competency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：核輸送、細胞老化、Ran、importin、RanBP1

1. 研究開始当初の背景

1961年、Hayflickらは、ヒトの正常組織から取り出した体細胞を培養すると、ある一定回数の分裂を繰り返した後、細胞分裂を停止して不可逆的な増殖停止状態に入ることを見出し、この現象を細胞老化 (cellular senescence) と呼んだ (Hayflick and Moorhead, *Exp. Cell Res.*, 1961)。その後、多くの研究者がこの現象に着目して研究を進めたが、それらの研究は、主として細胞増殖や細胞周期に直接関与する因子に焦点を当てたものであり、核—細胞質間分子輸送の観点から統合的に進められた研究は全くない。一方、細胞老化の特徴的な性質の1つとして、phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (SA-Erk1/2)の細胞内局在が細胞質に偏るといった現象が知られている (Kim, et al., *J. Biol. Chem.*, 2003)。また、人為的に細胞老化を誘導する実験では、過酸化水素で細胞を処理する系がしばしば用いられるが、本研究では、過酸化水素などで細胞を処理すると、そのストレスに応答して輸送因子の1つである importin α が核に蓄積することを発見するとともに (Miyamoto, et al., *J. Cell Biol.*, 2004)、importin α の核蓄積は、Ranの局在が細胞質側に偏ることが誘因となることを明らかにした (Yasuda, et al., *Exp. Cell Res.*, 2006)。さらには、予備的研究成果として、mouse embryonic fibroblast (MEF) を継代するにつれ、Ranの発現量が低下するとともに、主として核に局在していたRanが徐々に細胞質側に偏在していくことを見出していた。

2. 研究の目的

本研究ではRanに関する研究を行っている過程で、正常細胞の細胞老化が進行するにつれて、Ranの発現量が徐々に低下するとともに、細胞増殖が盛んに行われている際には主として核に存在しているRanが、細胞老化に伴って徐々に細胞質に偏在していくことを見出した。これらの知見に基づき、Ranサイクルの変化とそれに伴う核—細胞質間分子輸送機構の変化が、細胞老化進行の根幹となっているのではないかと考え、Ranサイクルと細胞老化の関係を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Ranが細胞老化に直接的に関与していることを示すため、正常ヒト繊維芽細胞において、Ranに特異的なsiRNAを用いてRanの発現量を低下させた時に、細胞老化が誘導されることを実証する。次に、Ranの発現量低下がど

のようなメカニズムで細胞老化を誘導するかを明らかにするため、Ranの発現量低下によって引き起こされる細胞内現象について、活性酸素種の発生やそれに伴って引き起こされると言われている cell death の現象などに着目しながら明らかにしていく。一方、Ranの局在に影響を与えると思われる因子

(RCC1=RanGEF, RanGAP, RanBP1, RanBP2)に着目し、細胞老化に応じてどのように時間的・空間的に変動するかを明らかにする。さらに、importin α を含む核輸送因子に着目し、それらの発現量や局在について、細胞老化に応じた時間的・空間的変動を解析し、細胞老化に最も影響を及ぼす可能性のある輸送因子を同定する。

4. 研究成果

正常ヒト繊維芽細胞(TIG-1)を用いて、ヒトRanに対するsiRNA-oligonucleotideによる遺伝子ノックダウンを行ったところ、Ranの発現量が低下した細胞は、細胞増殖が急速に停止し、細胞の形態が平坦化するという、老化細胞に特徴的な性状を示した。また、それらの細胞では、細胞老化の一般的マーカーである senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal)の活性上昇がみられた。さらに、細胞周期を負に制御する因子である p16, p21, p53 の発現上昇がみられるとともに、同じく細胞老化のマーカーとなる MnSOD の活性上昇がみられた。これらの結果より、Ranをノックダウンした細胞は細胞老化が進行することが明らかとなった。

次に、Ranの発現が低下した細胞では、Ranの機能低下により、本来はGTP結合型Ranに依存して速やかに核外に輸送されるべき importin α が、核外に移行できず、核に集積するのではないかと考え、importin α の細胞内局在を調べたところ、確かに、Ranをノックダウンした細胞では、importin α が核内に集積していくとともに、通常の細胞でも培養を重ねるにつれて、importin α が徐々に核内に集積していくことがわかった。つまり、importin α が核内に集積していくという現象と細胞老化が密接に関連していることがわかってきた。

そこで、人為的に importin α が核内に集積していく状況を作り出した場合、細胞老化にどのような影響を及ぼすかを調べた。つまり、importin α の核外輸送因子である CAS の発現をノックダウンさせ、importin α が核内に留まってしまう状況を再現した。その結果、CASをノックダウンした細胞では、SA- β -gal活性が上昇するなど、典型的な細胞老化の表現型を示すことがわかった。

これらの結果から、正常細胞では、分裂を

繰り返すうちに Ran の発現量が低下し、その結果、核輸送因子 importin α の核内集積が起こり、核輸送能が全般的に低下していくことが引き金となって、細胞老化が進行するのではないかという仮説を提唱することができた。

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 20 件)

- 1) Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Oka, M. and Yoneda, Y. The interaction between importin-alpha and Nup153 promotes importin-alpha/beta-mediated nuclear import. *Traffic*, in press (2012) 査読有
- 2) Sekimoto, T. and Yoneda, Y. Intrinsic and extrinsic negative regulators of nuclear protein transport processes. *Genes Cells*, in press (2012) 査読有
- 3) Nagai, M. and Yoneda, Y. The small GTPase Ran and Ran-binding proteins. *BioMol. Concepts*, in press (2012) 査読有
- 4) Miyamoto, Y., Loveland, K. L. and Yoneda, Y. Nuclear importin α and its physiological importance. *Commun. Integ. Biol.*, 5:220-222 (2012) 査読有
- 5) <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.360>
- 6) Oka, M. and Yoneda, Y. The role of Rael in Nup98-fusion mediated leukemogenesis. *Cell Cycle*, 10: 12 (2011) 査読有
<http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.12.15759>
- 7) Katahira, J. and Yoneda, Y. Nucleo-cytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs. *Traffic*, 12: 1468-1474 (2011) 査読有
doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01211.x.
- 8) Yasuda, Y., Miyamoto, Y., Yamashiro, T., Asally, M., Masui, A., Loveland, K.L. and Yoneda, Y. Nuclear retention of importin α coordinates cell fate through changes in gene expression. *EMBO J.*, 31: 83-94 (2011) 査読有
doi: 10.1038/emboj.2011.360.
- 9) Miki, T., Kurono, S., Kaneko, Y., Katahira, J. and Yoneda, Y. Cell type-dependent gene regulation by Stauf2 in conjunction with Upf1. *BMC Mol. Biol.*, 12: 48 (2011) 査読有
doi: 10.1186/1471-2199-12-48
- 10) Miyata, Y., Yoneda, Y. and Yahara, I. Stimulation of CK2-dependent Grp94 phosphorylation by the nuclear localization signal peptide. *Mol. Cell. Biochem.*, 356: 191-200 (2011) 査読有
- DOI: 10.1007/s11010-011-0944-9
- 11) Kamikawa, Y., Yasuhara, N. and Yoneda, Y. Cell type-specific transcriptional regulation of the gene encoding importin- α 1. *Exp. Cell Res.*, 317: 1970-1978 (2011) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.024>
- 12) Moriyama, T., Nagai, M., Oka, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Yoneda, Y. Targeted disruption of one of the importin α family members leads to female functional incompetence in delivery. *FEBS J.*, 278: 1561-1572 (2011) 査読有
doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08079.x.
- 13) Mizuguchi, C., Moriyama, T. and Yoneda, Y. Generation and characterization of a monoclonal antibody against importin α 7/NPI-2. *Hybridoma*, 30: 307-309 (2011) 査読有
doi:10.1089/hyb.2011.0006
- 14) Moriyama, T., Mizuguchi, C. and Yoneda, Y. Generation of rat monoclonal antibody specific for mouse importin α 8. *Hybridoma*, 30: 303-306 (2011) 査読有
doi:10.1089/hyb.2011.0004.
- 15) McConville, J. F., Fernandes, D. J., Churchill, J., Dewundara, S., Kogut, P., Shah, S., Fuchs, G., Kedainis, D., Bellam, S. K., Patel, N. M., McCauley, J., Dulin, N. O., Gupta, M. P., Adam, S., Yoneda, Y., Camoretti-Mercado, B. and Solway, J. Nuclear import of serum response factor in airway smooth muscle. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 45: 453-458 (2011) 査読有
doi: 10.1165/rcmb.2008-0393OC
- 16) Sekimoto, T., Miyamoto, Y., Arai, S. and Yoneda, Y. Importin α protein acts as a negative regulator for Snail protein nuclear import. *J. Biol. Chem.*, 286: 15126-15131 (2011) 査読有
doi: 10.1074/jbc.M110.213579
- 17) Fukumoto, M., Sekimoto, T. and Yoneda, Y. Proteomic analysis of importin α -interacting proteins in adult mouse brain. *Cell Struct. Funct.*, 36: 57-67 (2011) 査読有
doi:10.1247/csf.10026
- 18) Nagai, M., Moriyama, T., Mehmood, R., Tokuhira, K., Ikawa, M., Okabe, M., Tanaka, H. and Yoneda, Y. Mice lacking Ran Binding Protein 1 are viable and show male infertility. *FEBS Lett.*, 585: 791-796 (2011) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.002>,
- 19) Ohara, R., Hata, K., Yasuhara, N., Mehmood, R., Yoneda, Y., Nakagawa, M. and Yamashita, T. Axotomy induces

axonogenesis in hippocampal neurons by a mechanism dependent on importin β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405: 697-702 (2011) 査読有
doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.108

- 20) Asally, M., Yasuda, Y., Oka, M., Otsuka, S., Yoshimura, S. H., Takeyasu, K. and Yoneda, Y. NUP358, a nucleoporin, functions as a key determinant of the nuclear pore complex structure during skeletal myogenesis. *FEBS J.*, 278: 610-621 (2011) 査読有
doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07982.x.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 永井理博、米田悦啓 The involvement of small GTPase Ran in cellular aging. 第34回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011.12.13-16, パシフィコ横浜 (横浜市)
- 2) Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Oka, M. and Yoneda, Y. Importin alpha mediates biased translocation through nuclear pores in conjunction with Nup153. 第34回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16, パシフィコ横浜 (横浜市)
- 3) Kimoto, C., Yasuhara, N. and Yoneda, Y. The mechanism to determine a nuclear transport pathway by NLS sequence. 第34回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16, パシフィコ横浜 (横浜市)
- 4) Moriyama, T., Oka, M. and Yoneda, Y. Role of nucleocytoplasmic shuttling of estrogen receptor. 第34回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16, パシフィコ横浜 (横浜市)
- 5) Yasuhara, N., Yamagishi, R., Arai, Y., Yanagida, T., Kaneko, H. and Yoneda, Y. The nucleocytoplasmic transport system regulates the stem cell differentiation. 第34回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2011.12.13-16, パシフィコ横浜 (横浜市)

[その他]

ホームページ等

URL: <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・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