

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570215

研究課題名(和文) 個体発生における核 細胞質間蛋白質輸送受容体の機能解析

研究課題名(英文) the mechanism of development regulated by the nucleocytoplasmic transport

## 研究代表者

安原 徳子(垣内徳子)(Yasuhara, Noriko)

独立行政法人医薬基盤研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90423152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚性幹細胞(ES細胞)の分化に関わる核輸送受容体importin のノックアウトマウスを作製して解析し、胚発生過程での核 細胞質間タンパク質輸送の役割を解明する。哺乳類で5~7種類のファミリー遺伝子が存在するimportin に対し、これまでに国内外においてノックアウトマウスの作成が行われ、報告例が数件ある。本研究ではこのimportin ファミリーの内、いまだ作成されていないファミリー遺伝子のノックアウトマウスの作成を試みた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of development regulated by the nucleocytoplasmic transport, we attempted to create a knockout mouse targeting importin alpha, a typical nuclear transport receptor, and succeeded in obtaining the hetero knockout lines, of which the phenotype is now under analysis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核輸送 分化 発生 ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、核 細胞質間の情報伝達は核膜上の核膜孔を介して行われる。核膜孔は自由に通過できる分子サイズが制限され、大きな分子は選択的かつエネルギー依存的に輸送される。核へと運ばれる蛋白質の受容体である importin は、哺乳類では 5-6 種類のファミリー分子が存在し、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 1 が主に発現するが、分化開始後は発現が低下し、他のファミリー分子の発現が上昇する。このファミリー分子発現のスイッチングは、ES 細胞の分化に必須である。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特定の転写因子を輸送する。他に血球系、筋肉への分化や精子形成の過程で importin ファミリー分子の発現レベルが変化するという報告もあり、importin ファミリーは細胞分化に広く関ることが伺える。

核 細胞質間蛋白質輸送システムと分化の関わりは、細胞レベルの解析は行われているものの個体発生に関する研究は進んでいなかった。実際に、これまでに importin 5、3、4、7 のノックアウトマウスが作成された。発生過程では、7 のみに初期卵割の停止が見られたが、それ以外はいずれも生殖系の異常以外に大きな表現系は見出されていなかった。しかし、申請者の研究結果より、importin ファミリー分子の中で、importin 1 は他のファミリー分子とは異なり、独特の機能をもつと考えられる。胚性幹細胞の未分化性に関わる、ある種の転写因子の輸送を阻害する、など、他のファミリー分子には見られない機能があるのだ。従って、個体発生の場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。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞の核 細胞質間蛋白質輸送システムによる胚発生の制御機構を明らかにすることをめざす。マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化に深く関わる輸送受容体 importin に焦点を絞り、ノックアウトマウスの解析を通して胚発生過程での機能を解明する。輸送受容体 importin 1(KPNA2)は、ES 細胞を用いた研究から、動物の初期胚発身に重要な役割を果たすことが示唆されているが、ノックアウトマウスを用いた解析はいまだ行われていない。この課題に取り組み、核 細胞質間蛋白質輸送システムが関わる胚発生機構の解明につなげたいと考えた。そこで、importin 1 のノックアウトマウスを作成し、以下の 3 点に焦点を当て、この可能性を検証し解析することを目的とした。

(1) importin 1 の発現が胚発生のどの段階でインパクトを示すか

(2) importin 1 の発現によりどのような反応系が動くか

これにより、核 細胞質間蛋白質輸送システムを中心とした、動物胚発生の新たな制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

importin 1(KPNA2)のノックアウトマウスの作成を行う。ターゲティングベクターを構築し、マウスに導入する。ゲノタイピングを行い、ヘテロ変異マウスを取得する。ヘテロ欠損マウスを野生型と掛け合わせ、ホモ欠損マウスを得る。ホモ欠損マウスについて、表現型を解析し、importin 1 がかわる組織を特定する。その情報をもとに importin 1 の下流で働く因子について、タンパク質間の相互作用を、タンパク質 pull down assay や免疫沈降法を用いて調べる。

また、ノックアウトマウス作成の後、importin 1 遺伝子組み換え ES 細胞株が樹立でき次第、この細胞株を用いて、importin 1 の下流で働く因子について解析する。importin 1 は未分化な ES 細胞で高発現し、様々な分化に際して発現が低下する。この低下のスピードは分化の方向性により異なることから、分化が始まって一定時期まで活性があると考えられる。培養系で一定方向への分化をさせた際に、importin 1 のノックアウトの有無で分化の度合いや方向性が変化するか調べる。さらに、この ES 細胞を正常胚に戻して発生させ、どのような組織へと分化するか調べる。これにより、importin 1 発現の影響をより強く受ける細胞種を特定する。次に、この細胞種への分化に働く因子で、importin 1 と関係の深いものを同定する。すなわち、分化の過程で、importin 1 のノックアウトを行った際に発現量が変化する遺伝子を、マイクロアレイにより解析する。得られた結果は上述の解析結果と突き合わせ、importin 1 を中心とした発生のメカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

従来の方法を用いてノックアウトマウスの作成のための遺伝子コンストラクトの作成を試みた。しかしながら、この方法では当初の予定通りに進まず、importin 1 は従来の方法でノックアウトマウスを作製するのが困難であると判断した。

そこで、最近新たに確立され有効であるとされる、CRISPR を用いた遺伝子改変ツールを使用し、ノックアウトマウスの作成を試みた。なるべく多くのエクソンを欠失するようにいくつかのデザインを構築して実施したと

ころ、KPNA2 遺伝子の片アリールを欠いたヘテロ変異マウスの作成に成功した。

ヘテロ変異マウスを野生型と交配させて系を確立後、ヘテロ変異マウス同士の交配を行い、ホモマウスの出生率、表現型の解析を進めている。現在までに、ヘテロ変異マウスには異常が見られないが、ホモマウスには一定の表現型がみられることを掴んでいる。今後、発生各段階での表現型を明らかにし、importin 1 が個体発生にどのように働くのか明らかにする。

また、ホモロジーモデリングと細胞生物学的手法を合わせ、importin 1 に特定の転写因子の輸送を阻害するという新たな機能があることを見出した。得られた知見を考慮し、発生において importin 1 と相互作用する因子の探索を行っている。ホモマウスの表現型解析完了後に、結果を突き合わせ、importin 1 により阻害的な制御を受ける因子を探索する予定である。

#### 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 4 件)

Ryosuke Fujiki, Akinobu Sato, Katsuhiko Hata, Fumi Tashiro, Noriko Yasuhara, Jun-ichi Miyazaki, Yoshihiro Yoneda, Masashi Fujitani, Toshihide Yamashita. Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 432 (2013) 604-609

Saehae, Choi, Eiki Yamashita, Noriko Yasuhara, Jinsue Song, Se-Young Sona, Young Han Won, Hye Rim Hong, Yoon Sik Shin, Toshihiro Sekimoto, Il Yeong Park, Yoshihiro Yoneda, Soo Jae Lee. Structural basis for the selective nuclear import of the C2H2 zinc-finger protein Snail by importin . *Acta Crystallographica Section D*, 査読有, 70 (2014) 1050-1060

Noriko Yasuhara, Ryosuke Yamagishi, Yoshiyuki Arai, Rashid Mehmood, Chihiro Kimoto, Toshiharu Fujita, Kenichi Touma, Azumi Kaneko, Yasunao Kamikawa, Tetsuji Moriyama, Toshio Yanagida, Hiroki Kaneko, Yoshihiro Yoneda. Importin alpha subtypes determine differential transcription

factor localization in embryonic stem cells maintenance. *Developmental Cell*, 査読有, 26 (2014) 123-135

Yasuhiro Umemura, Nobuya Koike, Tsuguhiko Matsumoto, Seung-Hee Yoo, Zheng Chen, Noriko Yasuhara, Joseph S. Takahashi, Kazuhiro Yagita. Transcriptional program of Kpna2/Importin-2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells. *PNAS*, 査読有, 111 (2014) 5039-5048

[学会発表](計 9 件)

安原 徳子、米田悦啓、Importin regulates the stem cell differentiation、第 45 回日本発生活物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、2012.5.28-31、神戸

木本千裕、安原 徳子、米田悦啓、Recognition mode of basic NLS sequence by importin 1、第 45 回日本発生活物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、2012.12.12、神戸

安原 徳子、山岸良介、木本千裕、金子寛生、米田悦啓、核 細胞質間タンパク質輸送システムによる幹細胞のエピゲノム制御、第 35 回日本分子生物学会年会

Noriko Yasuhara, Yoshihiro Yoneda, The novel role of the nucleocytoplasmic transport system in cell differentiation、核ダイナミクス・染色体ワークショップ合同 meeting、2012.12.20、淡路島

安原 徳子、核 細胞質間分子輸送と細胞分化、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014.6.11-13、奈良

安原 徳子、米田悦啓、The nucleocytoplasmic transport system that regulates the cell fate in stem cells and embryos、熊本医学・生命科学国際シンポジウム、2014.9.5、京都

安原 徳子、米田悦啓、核輸送による遺伝子発現制御と細胞運命決定のメカニズム、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.16、京都

安原 徳子、米田悦啓、核輸送因子 importin による幹細胞未分化維持機構、核ダイナミクス・染色体ワークシ

ヨップ合同会議、2014.12.26、広島

Noriko Yasuhara, The  
nucleocytoplasmic transport system  
regulates cell differentiation,  
RMSC-Korea-2016 Conference,  
2015.3.20. 釜山 (韓国)

〔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：  
出願年月日：  
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)  
国立研究開発法人・医薬基盤・健康・栄養研  
究所・特任研究員  
研究者番号：90423152

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

高岡 勝吉 (TAKAOKA Kastuyoshi)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教  
研究者番号：90551044