

核—細胞質間蛋白質輸送制御と細胞核ストレス応答

Regulation of nucleocytoplasmic protein transport and nuclear stress response

米田 悦啓 (YONEDA YOSHIHIRO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授



研究の概要

核—細胞質間蛋白質輸送に関する研究は、輸送因子や核膜孔複合体構成因子の同定・性状解析などが進み、基本メカニズムの理解が進んだ。しかし、核—細胞質間蛋白質輸送が、細胞分化、個体発生、細胞周期などの複雑な生命現象にどのように関連しているか不明である。本研究では、細胞核が様々なストレスにどのように応答するのかを、核—細胞質間蛋白質輸送制御の観点から解明を進めた。

研究分野：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、ストレス応答、核蛋白質輸送、核輸送因子、importin

1. 研究開始当初の背景

核—細胞質間蛋白質輸送機構に関する研究は、輸送担体である importin β ファミリー分子、importin α ファミリーを代表とするアダプター分子、低分子量GTPaseである Ran の発見ならびに性状解析が精力的に進められ、輸送機構に関する基本的な分子メカニズムのモデルが提唱される段階にまで研究は進展した。しかし、核—細胞質間蛋白質輸送が、個体発生、細胞分化・増殖、細胞周期といった様々な生命現象とどのように深く関連しているのか、単に必要因子を輸送しているだけなのかという疑問についてはほとんど研究が進んでいなかった。

2. 研究の目的

アダプター分子として機能する importin α が、importin β に結合することなく単独で核内に移行するという活性の生理的意義を解明する目的で解析を進める過程で、細胞が紫外線照射や熱ショック、酸化ストレスなどの様々なストレスを受けた時に、そのストレスに応答して速やかに importin α が核内に集積するという興味深い現象を見出した。そこで、importin α のストレス依存性細胞内局在変化の分子メカニズムを明らかにするとともに、細胞核がストレスに応答してどのように反応し、ストレスに対処するのかを、核—細胞質間蛋白質輸送制御の観点から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 細胞核ストレス応答最初期反応の解析：
importin α の核内集積は、ストレスを負荷して数分以内に観察され始める非常に早い反応であるので、その分子メカニズム、反応カスケードを解明することにより、細胞核ストレス応答の最初期段階でどのようなことが起こるのかを知る。
- 2) Ran のストレス依存性細胞内局在変化の分子基盤の解明：ストレス負荷によって、速やかに Ran の局在が細胞質側に偏るという結果の分子基盤を FRET 法などを用いて知る。
- 3) ストレス依存性核—細胞質間蛋白質輸送制御機構の解明：細胞がストレス負荷を受けた場合に、細胞質から核内に輸送されるべき蛋白質の種類や量に変化がある可能性が考えられ、核—細胞質間蛋白質輸送装置がストレスにどのように応答して制御されるかを知る。
- 4) ストレス応答時における細胞核内での importin α の生理的役割の解析：核内集積した importin α が、輸送因子としての役割以外の機能を果たしているかを解明する。

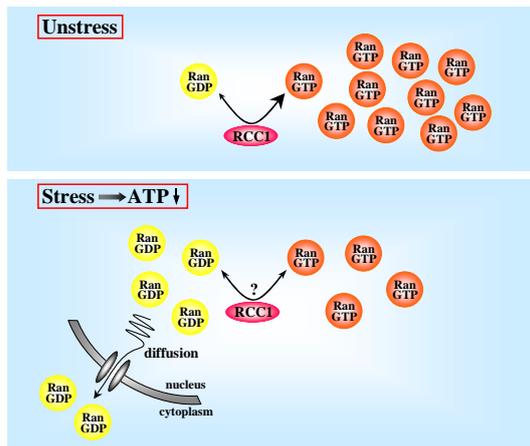
4. 研究の主な成果

(1および2) 細胞核ストレス応答最初期反応の解析と Ran のストレス依存性細胞内局在変化の分子基盤の解明

細胞がストレスに晒されると、まず、細胞内 ATP 量が低下し、続いて GTP 量の低下が誘導される。細胞内 GTP 量が低下すると、GDP/GTP 交換反応による GDP 結合型 Ran

[4. 研究の主な成果 (続き)]

から GTP 結合型 Ran への変換が効率よく行なえなくなり、核内に GDP 結合型 Ran が増加する。その結果、受動拡散により GDP 結合型 Ran が細胞質に漏出する。核内の GTP 結合型 Ran が低下することにより、正常時には、importin α の核外輸送因子である CAS と GTP 結合型 Ran の働きにより核外に運び出されていた importin α が核から運び出されなくなり、importin α の核内蓄積が進行することがわかった。



(3) ストレス依存性核-細胞質間蛋白質輸送制御機構の解明

ストレス条件下の細胞に、典型的な核蛋白質である SV40 T 抗原の核局在化シグナルを持つ基質をインジェクションしたところ、その輸送効率が著しく低下していることがわかった。一方、同じ条件下で、ストレスに応じて核へ移行することが知られている分子シャペロンの hsc70 や ERK2 は核内へ速やかに移行することがわかった。これらの結果は、ストレスに対応して、細胞は、数多く存在すると思われる核輸送経路のうち、importin α/β による通常の核輸送経路を抑制し、ストレス応答性の分子を効率よく核へ輸送できる状態に制御する機構があることを示唆している。

(4) ストレス応答時における細胞核内での importin α の生理的役割の解析

核を DNase I で処理することにより遊離してくる分画に importin α は多く含まれていることから、核内集積 importin α の核内での存在様式として、クロマチンに結合していることが推測できた。また、importin α には、DNA と直接結合する活性があることもわかった。そこで、核内で遺伝子発現に影響を及ぼす可能性を考え、核外輸送されない importin α の変異体を発現させ、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、2 倍以上発現が変動する遺伝子が数多く同定され、遺伝子発現調節に関与している可能性が強く示唆された。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

核内集積した importin α は、様々な遺伝子の発現を制御することで、ストレス応答反応の一翼を担っていることが明らかとなった。これは、importin α の新規機能を示唆する世界で初めての結果であり、今後の発展が大いに期待される、独創性の高い研究成果と言え、新しい概念の創出として、細胞生物学の幅広い分野に大きなインパクトを持つ。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- 1) Yasuhara, N., Shibasaki, N., Tanaka, S., Nagai, M., Kamikawa, Y., Oe, S., Kamachi, Y., Kondoh, H. and **Yoneda, Y.** Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin- α . *Nature Cell Biol.*, 9: 72-79 (2007)
- 2) Bradatsch, B., Katahira, J., Kowalinski, E., Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgärtel, 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)
- 3) Yasuda, Y., Miyamoto, Y., Saiwaki, T. and **Yoneda, Y.** Mechanism of the stress-induced collapse of the Ran distribution. *Exp. Cell Res.*, 312: 512-520 (2006)
- 4) Kose, 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)
- 5) Kotera, I., Sekimoto, T., Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Nagoshi, E., Sakagami, H., Kondo, H. and **Yoneda, Y.** Importin α transports Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) to the nucleus without utilizing importin β . *EMBO J.*, 24: 942-951 (2005)
- 6) 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 α and cause a conventional nuclear import block. *J. Cell Biol.*, 165: 617-623 (2004)

他原著論文 39編

ホームページ等

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