

# 今本細胞核機能研究室

## Cellular Dynamics Laboratory

主任研究員 今本尚子  
IMAMOTO, Naoko

細胞核は高等真核生物の巨大なゲノムを安定に保持する一方で、同じゲノム情報から機能の異なる分化細胞をつくり出す仕組みを兼ね備えた動的な細胞内器官である。当研究室では、細胞核の機能制御の要となる核-細胞質間輸送、細胞核の機能を支える細胞核構築の仕組み、並びにゲノムを次世代に正確に継承するための分子装置の解析を通して、細胞核の機能と構造の関係を明らかにしようとしている。関与因子群とメカニズムの解析から、これらの個々の素過程が独立した現象ではなく、互いに連携していることがわかってくる。細胞レベルで得られた基礎的研究が生み出す知見を、癌や遺伝病などのヒト疾患や、分化・発生のようなより高次レベルの生命現象の理解へと結びつけることを目標としている。

### 1. 核-細胞質間輸送：細胞質と細胞核の間の情報・物質交換メカニズム

(1) 分化誘導に伴う核-細胞質間タンパク質輸送担体importin bファミリー分子の遺伝子発現変化の解析(小瀬、古田<sup>\*1</sup>、土屋<sup>\*4</sup>、今本)

核-細胞質間の選択的輸送は、主に運搬体importin  $\beta$ ファミリー分子によって行われる。ヒトゲノムには、全21種importin  $\beta$ ファミリー分子と、アダプター分子であるimportin  $\alpha$ ファミリー分子が全6種コードされている。しかし、これらの多様な輸送経路を細胞が持つ生理的意義は明らかになっていない。昨年度に引き続き、分化誘導や増殖停止に伴う核-細胞質間分子輸送システムの変化を解析した。

ヒト細胞株HL-60をレチノイン酸(RA)により顆粒球に分化誘導し、importin  $\beta$ ファミリー分子のmRNA発現量変化を解析した。その結果、マクロファージへの分化とは異なる遺伝子の発現亢進や低下を確認した。このことは、分化誘導に伴う輸送経路システム変化は、獲得する細胞機能によって異なることを示している。また、ヒト正常細胞の増殖停止や細胞老化に伴い、importin  $\alpha$ の特定のサブファミリーに属する遺伝子のみが発現低下していることを確認した。これらのことから、細胞は、個々の細胞機能の獲得や維持のために細胞内輸送経路網を最適化している可能性が考えられ、また、特定の輸送経路によって運搬される分子が特定の細胞機能に非常に重要である可能性を示唆している。

各輸送経路の機能解析を進めるため、輸送基質同定システムの確立に着手した。細胞抽出液から疎水性カラムで運搬体分子群が容易に吸収出来ることを確認した。この運搬体分子欠損細胞抽出液と各運搬体分子のリコンビナントタンパク質を使用することで、セミインタクト細胞によるin vitro輸送系において、各運搬体分子による核-細胞質間分子輸送を再構築出来た。このアッセイ系は、輸送基質がどの運搬体分子によって運ばれるかという核-細胞質間分子流通の基本情報整備に非常に有効である。

(2) ストレス応答に伴う核-細胞質間輸送システムの機能変化の解析(古田<sup>\*1</sup>、小瀬、土屋<sup>\*4</sup>、今本)

環境変化に応答して様々なタンパク質が核と細胞質の間で局在変化することが知られており、核-細胞質間輸送システムが変化する可能性も考えられる。環境変化の一つの代表例として熱ショックストレスをとりあげ、熱ショック応答時と正常時に機能する輸送経路の違いがあるかを調べている。昨年度報告したように、hsc70の核内輸送がRan依存的事から、その輸送担体がimportin  $\beta$ ファミリーである可能性が高い。このためhsc70のin vitro核内輸送活性をもつ細胞質抽出液を、Phenyl sepharoseを用いて分画した。Phenyl sepharoseにはimportin  $\beta$ ファミリーの大部分が結合する。importin  $\beta$ ファミリーを吸収した細胞質抽出液では、hsc70の核内輸送活性が抑制された。この細胞質抽出液にPhenyl sepharose結合画分を戻してやることで、hsc70の核内輸送活性は回復した。importin  $\beta$ ファミリー吸収細胞質抽出液に、リコンビナントimportin  $\beta$ ファミリータンパク質を加えることで、それぞれの輸送担体特異的にIBB、M9のin vitro核内輸送活性が確認できた。このことからこのimportin  $\beta$ ファミリー吸収細胞質抽出液とリコンビナントタンパク質を用いたin vitro実験系が、hsc70の核内輸送因子の同定に有用であると考えられる。13種類のimportin候補のリコンビナントタンパク質の全て精製を行い、構築したin vitroアッセイ系で、hsc70の核内輸送を担う運搬体分子の同定を進めている。

### 2. 細胞核の構築

(1) 核膜孔に注目した細胞周期や分化における核膜動態の解析(前島、矢幡<sup>\*5</sup>、今本)

細胞核は様々な細胞に即したゲノムの高次構造を維持し、その細胞の機能に応じたゲノムの複製や個々の遺伝子調節を支えている。私たちは核膜上のもっとも顕著な構造体である核膜孔を指標として、細胞核の動的な形成過程の解析をおこなってきた。まずヒトHeLaS3細胞において、「核膜孔が核膜表面にどのように分布し、細胞周期でどのように変化するのか？」を蛍光免疫染色で調べた。この結果、核膜新生直後の分裂終期からG1初期の核膜上に、核膜孔が存在しない領域が存在することを明らかにし、あたらしい核膜ドメインとして“Pore-free island”と名付けた(Maeshima et al., J. Cell Science, 2006)。この“Pore-free island”は、細胞周期の進行にしたがって徐々に解消される。さらに、“Pore-free island”にはEmery-Dreifuss型筋ジストロフィーの原因遺伝子産物であるemerinやlamina/Cが高度に濃縮され、lamina/Cのような「核内膜の裏打ち蛋白質」がPore-free islandの形成を含む、核膜孔分布の制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。このようなPore-free islandはCFPやYFPを用いた生細胞観察でも確認され、また、HeLa細胞のような不死化したガン細胞ばかりでなく、ヒト2倍体正常細胞の細胞周期においても観察された。さらに、脳

研究センター・神経構築グループの中臣らと共同で、Freeze-fractureしたHeLaS3細胞の細胞核表面を走査電子顕微鏡で観察すると、1つ1つの核膜孔を「見る」ことができ、核膜上に広がるPore-free islandも確認できた。

上記のような、核膜孔形成過程と核膜構造の関係を調べるためには、複数の蛋白質を同時にラベルする必要がある。このため、2種類以上のcDNAを生細胞へ効率よく同時導入し、安定して共発現させるシステムは必要不可欠である。しかしながら、1つのベクター上に連続した独立転写単位を構成するタンデムcDNAs発現クローンでは、隣接遺伝子間で転写量の著しい差ができる「転写干渉効果」が生じることが知られていた。阪大微研今本グループは、この転写干渉効果の問題を解決するために、隣接遺伝子間にchicken HS4 (cHS4) インスレーターの繰り返し配列構造 (cHS4カセット) を挿入すると、この転写干渉効果を緩和できることを見出した。このメカニズムを調べることは、核内ゲノムにおける高次の遺伝子発現制御を知る上でも非常に興味深い。このため、阪大微研今本グループと共同で、HeLaS3細胞導入後のタンデムcDNAs発現クローンのcHS4付近のクロマチン状態をChIPアッセイで調べた。その結果cHS4の部分のコア領域にCTCFと呼ばれる蛋白質が濃縮していることがわかった。さらにcHS4のコア領域近傍のクロマチンでヒストンのアセチル化がみられ、後方プロモーター部位のヒストンアセチル化の上昇もあわせて観察された。このため、タンデムcDNAs発現クローンのHS4領域にCTCFが結合し、その領域のヒストンアセチル化を上昇させることにより、転写を活性化させ、転写干渉効果を緩和していると考えている。

### (2) 大腸癌における核膜関連因子の解析 (大木本<sup>\*2</sup>、前島、今本)

ガン化した細胞や組織においては、核の形態変化が頻繁にみられることが報告されている。一般にこれらの核は、大型化し、大小不同が強く、形状も不整である。そして、細胞の大きさに変化のない場合であっても核/細胞質比が高くなっている。ガン化した細胞におけるこのような核の形態変化は知られているが、その細胞内における意味については、明らかでない部分が多い。千葉大医学部、朝永グループとの共同研究大腸ガンの組織およびその周辺の正常組織を用い、いくつかの核内タンパク質や核膜のアンカータンパク質の発現量の比較を行なったところ、特にLAP2 $\alpha$  (lamina-associated polypeptide 2) について明確なタンパク質量の違いが見出されたことを昨年度報告した。LAP2 $\alpha$ は培養系のヒト癌細胞でも発現が昂進しており、逆に、低血清培養などで、増殖停止した正常2倍体繊維芽細胞では、その発現が顕著に低下することを確認した。そこで、LAP2 $\alpha$ のガン細胞における役割を明らかにするために、代表的なガン細胞であるHeLa細胞やいくつかの大腸ガン細胞などに対し、siRNAなどを用いてLAP2 $\alpha$ の発現量を抑えたところ、細胞増殖が抑制されることがわかった。以上の結果から、LAP2 $\alpha$ はガン特異的に発現量が増加し、これらの細胞の増殖において重要な役割を担っていることが考えられる。

### (3) 核膜孔複合体膜タンパク質POM121の機能解析 (船越<sup>\*1</sup>、前島、今本)

真核細胞において、細胞質と細胞核を隔てる核膜は細胞周期を通してダイナミックに変化し、それとともに核膜孔も崩壊と再構築を繰り返している。核膜孔複合体は約30種の異なるタンパク質から成る巨大タンパク質複合体であるが、各構成因子がどのようにして構築されるのかといった構築過程の分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。核膜孔複合体構成因子中でも膜タンパク質が複合体構築や膜上での安定化に寄与すると考えられていた。核膜孔複合体膜タンパク質Pom121は、核膜孔複合体構築過程を追跡するプローブ候補の1つと考えられたが、ヒト細胞中における機能については明らかではなかった。Pom121の全長ヒトcDNA情報が現存していたデータベースに存在していないことを見だし、クローン化した欠失領域がPom121の機能発現に必須な領域をコードすることを昨年度報告した。ヒトPOM121遺伝子は7番染色体のWilliams-Beuren症候群と深く関連する、進化上で複雑な重複を繰り返した遺伝子座に存在している。私たちは、ゲノム情報の比較によって、ヒトをはじめとする霊長類はPOM121遺伝子を2つ有していること、これらは重複の繰り返しによって生じた可能性のあることに気付いた。2つの全長ヒトPom121遺伝子が共にHeLa細胞中で転写されていることを確認した。HeLa細胞中のPom121をRNAiでノックダウンすると、核膜孔複合体そのものの減少が見られたことから、核膜孔複合体構築過程においてPom121が重要な機能因子であることが確認された。また、Pom121のRNAiによるPom121の減少によって核の変形と共にラミンA/Cの局在が変化することを見いだした。これらの結果は、核膜孔複合体と核内膜タンパク質との構造的繋がりを示唆するものである。

## 3. ゲノムの複製と分配

### (1) 複製を経た姉妹染色体の対合に寄与する酵素の解析 (高木、今本)

姉妹染色体は間期核におけるクロマチン複製により生成され直後に対合する。本研究では姉妹染色体対合において機能することが酵母において示されているEco1について、そのアフリカツメガエルホモログの同定と性状解析を行った。アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞系を利用することにより、Eco1の具体的な作用機序の理解を目指した。2つのホモログ分子を同定したが、そのうち一方について十分な解析を行うことができず、Eco1の作用機序を総合的に理解するには至らなかった。本研究では一方で、ヒトEco1が細胞がん化と密接に関わる分子と相互作用する可能性を見いだした。

### (2) 分裂期染色体の正確な分配に関わる新たな因子の解析 (高木、今本)

細胞分裂期に姉妹染色体を均等分配する過程は、増殖細胞の恒常性を保つために厳密な制御を受けている。前年度の研究で、分裂期染色体を包みこむように局在するタンパク質 (Ki67抗原) が分裂期染色体の正確な分配に関わる因子であることを示し、これまでに具体的な機能が示されてこなかった特殊な細胞内領域 (染色体表層領域) が染色体分配に貢献するという新たなコンセプトを提出した。今年度は、Ki67抗原が機能発現するための分子基盤を明らかにするために同タンパク質を含む複合体の解析を行い、Ki67抗原がRNA代謝に関わる酵素、脱ユビキチン化酵素およびRNA分子などを含む巨大複合体を形成していることを示した。更にこれらの酵素群がKi67抗原と協調して機能することも示唆した。個々因子の性状についての理解を深め、Ki67抗原が複合体として機能発現する機構を統合的に理解するための素地を築いた。

### (3) 細胞分裂期におけるimportin $\alpha/\beta$ の新たな制御機構: クロモキネシンhKidをモデル分子とした解析 (田原<sup>\*4</sup>、小瀬、高木、前島、今本)

私たちは、核-細胞質間輸送担体分子 importin  $\beta$ が、核膜の無い細胞分裂期においても、タンパク質の局在制御に機

能している可能性を、ヒトクロモキネシン hKid に対する作用から示してきた（昨年度報告）。importin  $\beta$ による、分裂期細胞における hKid の局在制御が実際に生細胞内で行われているのかについて、Venus-hKid の安定発現株を用いた実験から検討を行った。また importin  $\beta$ の挙動についても digitonin 処理したセミインタクト分裂期細胞を用いて観察を行った。Venus-hKid の安定発現株を用いた FRAP (fluorescence recover after photobleaching) 解析から、hKid の核局在化シグナルに変異を入ると、bleach した染色体上の venus-hKid の蛍光の回復が、早くなることがわかった。また、一時的な GTP 結合型 Ran の過剰発現により、内在性 hKid の染色体への局在が低下することを確認した。これらの結果から、hKid と importin $\beta$ の相互作用が、hKid を染色体にローディングするのに必要なこと、更に、その importin  $\beta$ の作用が Ran の制御下にあることを示唆するものである。

セミインタクト分裂期細胞を用いた実験から、importin  $\alpha/\beta$ は hKid と共に分裂期染色体上に局在し、Ran の GTPase cycle 存在下では、hKid を染色体上に残したまま、importin  $\beta$ が染色体から解離することがわかった。hKid の染色体へのローディングが、importin  $\beta$ に依存すること、さらに Ran の GTPase 存在下では hKid の染色体上への局在が亢進することから、hKid の染色体への局在には、importin  $\beta$ との一時的な相互作用が必要であり、Ran cycle による importin  $\beta$ の解離が、効率的な hKid の染色体への局在に必要であると考えられる。

#### (4) 分裂期染色体構造の解析（前島、渡辺\*3、今本）

染色体は細胞が分裂する際、複製された遺伝情報（DNA）を2つの娘細胞に正確に分配するために必要な構造体である。それでは、分裂期染色体はどのようにして1本の長いクロマチン繊維から折り畳まれているのだろうか？これまで、分裂期染色体の高次構造解明のために、主として電子顕微鏡を用いた構造解析がなされてきた。しかしながら、顕微鏡観察は試料中における観察範囲が限定され、内在する規則性構造の全体像を捉えることが非常に困難である。このため、我々は播磨研究所の伊藤らと共同で、X線小角散乱解析(SAXS)をおこなうことにした。X線小角散乱は、計測したい非結晶試料にX線を照射し、その散乱パターンからその試料に内在する構造や規則性を知る手段である。したがって染色体中の規則性構造の検出に非常に適していると考えられる。Spring-8での試料をセットする装置や予備的な実験は終了し、現在までに染色体中に6nm, 12nm, 30nmの散乱のピークを検出している。これらはそれぞれ、コアヒストンの幅、ヌクレオソームの直径、30nm繊維に相当すると考えられる。

#### (5) 哺乳類細胞の複製前複合体の分子機構（水野、柳\*2、今本）

ORC (origin recognition complex) 複合体は出芽酵母のDNA複製開始点(origin)に結合する因子として同定された。出芽酵母ではoriginにORC複合体が特異的に結合しており、そこへCdc6, Cdt1, Mcm2-7 がロードされて複製前複合体が形成されると考えられているが、高等真核生物では複製前複合体上にOrc1, Cdc45, Gins複合体がロードされ、pre-Initiation Complexが形成されたのちにヘリカーゼが活性化され、DNAポリメラーゼがロードされ、複製フォークが形成される、と考えられている。

我々は、哺乳類細胞の複製前複合体の形成および制御機構を解明するために、マウスの Orc サブユニットの機能解析を進めてきた。これまでにマウス Orc1, Orc2, Orc3 に splicing variant が存在することを見出し、それら variant の解析を通じて Orc1 の核移行シグナル、タンパク質分解に重要な領域に関して報告した (Miyake et al., JBC, 2005)。これまでに Orc1 を一過性過剰発現させた場合、Orc1A はプロテアソームにより速やかに分解されるのに対して、Orc1B は分解されず安定に細胞質に局在することを見出している。この分解には、Orc1B が欠失している領域に含まれる 276 番目のセリン残基(Ser-276)のリン酸化が関与していることが示唆された。このリン酸化部位特異的抗体を作製したところ、過剰発現させた Orc1A は認識され、脱リン酸化処理した Orc1A および Orc1B は検出されず、Ser-276 のリン酸化を特異的に認識することが確認された。また、Ser-276 のリン酸は上流の Cy モチーフ (233-235 アミノ酸) に依存する事も明らかにした。核へ移行できない変異型 Orc1A (mOrc1A:KRR(266-268)NQQ) や、N 末領域を欠失した変異体が高リン酸化状態にあることを見いだした。ヒト Orc1 の N 末領域の BAH ドメインは HP1 $\alpha$  と相互作用する事が報告されている。そこで、マウス Orc1 の N 末領域の BAH ドメインもマウスの HP1 $\alpha$  と相互作用する事を GST-プルダウンアッセイにより明らかにした。pre-RC, pre-IC 構成因子の中で、Orc1 の N 末領域の BAH ドメインと相互作用する因子があるのではないかと推測し、精製タンパク質を用いて、タンパク質間相互作用の有無を探索した。精製した ORC1-5, ORC2-5 コアサブユニット、Cdc6, Cdt1 と GST-BAH ドメインとの相互作用は見いだされなかった、しかし、NIH3T3 中に一過性過剰発現させた、Cdc45 と相互作用する事が GST-プルダウンアッセイにより見出した。以上の結果から Ser-276 のリン酸化はヘテロクロマチン中では、HP1 が BAH ドメインと相互作用しているため、M 期までリン酸化されずにおり、Pre-IC 中では Cdc45 が相互作用しており、複製開始に伴い、Cdc45-Orc1-BAH ドメイン間相互作用が解消されると Ser-276 がリン酸化され Orc1 は、クロマチンから遊離し、skp2 を介したプロテアソーム系により分解されるのではないかと、というモデルが示唆された。

#### (6) 複製因子の品質管理機構（水野、柳\*2、水野\*1、今本）

DNAポリメラーゼ  $\alpha$  (Pol.  $\alpha$ ) は新生DNA鎖の合成開始を司る唯一のポリメラーゼである。最近、Pol.  $\alpha$  の変異に伴い、染色体の二重鎖切断、テロメア長の増加、クロマチン構造の変化等、染色体の不安定化が誘発されることが報告され、染色体の恒常性維持に於ける Pol.  $\alpha$  の役割が注目されている。私達はマウス Pol.  $\alpha$  に変異を有する温度感受性変異株 tsFT20細胞を用いて、Pol.  $\alpha$  の細胞内局在、タンパク質分解、サブユニット間相互作用を解析した。EGFPと融合させた tsFT20由来の Pol.  $\alpha$  (p180<sup>tsFT20</sup>) をマウス NIH3T3細胞へ一過性過剰発現させたところ、許容温度下では野生型と同様に核に局在したが、非許容温度下では細胞質に蓄積することを見出した。細胞質に留まった p180<sup>tsFT20</sup> を許容温度下に戻すと、速やかに核へと移行し、局在部位の変化は可逆的であった。Time-lapse観察、photoactivatable GFPを用いた観察、及び様々な阻害剤を用いた実験により、非許容温度下での p180<sup>tsFT20</sup> の細胞質への局在は、1) *de novo*に合成された p180<sup>tsFT20</sup> が細胞質に留まること、2) 核内の p180<sup>tsFT20</sup> がプロテアソームにより分解されること、という二種類の過程が合わさって生じることが示された。さらに、tsFT20細胞中の内在性 p180<sup>tsFT20</sup> も非許容温度下では分解され、細胞質に留まることが判明した。以上の結果から、細胞には Pol.  $\alpha$  の品質を管理する機構が存在し、異常な Pol.  $\alpha$  を核内で分解すると同時に細胞質に貯留することで結果的に核内から排除し、ゲノムの恒常性を維持している可能性が示唆された。

#### (7) 複製開始制御機能の解析（柳\*2、水野、今本）

出芽酵母やツメガエル卵抽出液等をモデルとした解析から、真核生物の複製開始から伸長反応に至る機構の大筋が明らかとなってきた。まず、複製開始点上にOrc1-6、Cdc6、Cdt1、Mcm2-7からなる複製前複合体が形成され、その後、複製装置がクロマチン上にロードされるというものである。しかしながら、複製前複合体形成の詳細な分子構築は明らかとなっていない。さらに、複雑な核構造をもつ高等真核生物においては未だに複製開始点は定かではなく、複製前複合体がゲノム中のどこに、どのように形成されるか不明である。そこで、本研究においては高等真核生物の複製機構を解明するために、核構造と連携した新しい複製系の開発を試みる。そのために、精製タンパク質による個々の因子の性状解析と、哺乳類細胞単離核を用いた複製前複合体の再構成を行う。

これまでに、我々はマウス及び線虫Cdt1を中心とした解析から、gemininがCdt1とMcm6の結合を抑制するという多細胞生物に保存された分子メカニズムを明らかにしてきた。そこでCdt1の複製前複合体形成における役割をさらに解析するため、以前より酵母two-hybrid法により見出していたCdt1とOrc2間の相互作用に着目した。大腸菌で発現、精製したGST-Cdt1とN末端236アミノ酸を欠失したOrc2 (Orc2 $\Delta$ N)およびOrc1-5複合体を用いた共沈降実験から、Cdt1とOrc2の相互作用が確認された。さらに、欠変異体による解析からCdt1、Orc2それぞれの中央領域が相互作用に必要であることが示された。このCdt1の中央領域はgeminin結合領域と一致していた。一方で、Cdt1とOrc2の相互作用はgeminin存在下で阻害された。以上の結果からCdt1がOrc2及びMcm6との相互作用を介して、ORC-Cdc6ヘリカーゼローダーとMCMとの橋渡し役を担っていることが示唆された。現在、Mcm2-7についても組換えタンパク質の精製を完了しており、ゲルシフト法によるDNA上での複製前複合体形成を解析している。

---

\*1協力研究員、\*2基礎科学特別研究員、\*3協力技術員、\*4研究補助、\*5訪問研究員

In eukaryotic cells, most of genomic information is stored in the cell nucleus. The main subject of our laboratory is to understand the nucleocytoplasmic transport and organization of cell nucleus to uncover new aspects and principles on regulation and maintenance of nuclear function. Our current effort has been focused on dissecting the dynamic behavior of nucleocytoplasmic transport machinery, transport pathways, and functional relation between nuclear envelope and chromatin structure in the context of live cells and cell-free reconstituted systems. We are taking cell biological, molecular biological, and biochemical approaches coupled with newly developed imaging techniques.

## 1. Nucleocytoplasmic transport

### (1) Regulation and function of nucleocytoplasmic transport system during differentiation.

We investigated how the gene expressions of human importin  $\alpha/\beta$  family, which function the carrier of nucleocytoplasmic transport, are regulated during differentiation and proliferation of cultured cell line. Retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells toward granulocyte exhibited mRNA expression change of a distinct set of transport receptors from the case of PMA-induced differentiation toward macrophage, suggesting that a specific transport receptor-mediated transport pathway(s) may play a important role in a specific cell differentiation. To examine the function of individual transport pathway, we are advancing to develop a systematic in vitro transport assay using the importin-depleted cell extract.

### (2) Mechanism of stress-induced nuclear accumulation of hsc70

Hsc70 is localized in the cytoplasm and nucleus, but strongly accumulates into the nucleus during heat-shock. We examined the transport of hsc70 in living cells, both under normal and stress-induced condition, and reconstituted the stress-mediated transport of hsc70 in vitro using digitonin-permeabilized cells. Based on observation that hsc70 accumulates in the nucleus in a Ran-dependent but importin  $\alpha/\beta$  or transportin independent pathway, we are systematically analyzing whether any of importin  $\beta$  related receptors could mediate stress-induced nuclear import of hsc70 using importin-depleted cytosol and 13 members of importin  $\beta$  related recombinant proteins.

## 2. Nuclear envelope and chromatin structure

### (1) Nuclear pore dynamics during cell cycle

Nuclear pores are sophisticated gateways on the nuclear envelope that control macromolecular transport between cytoplasm and nucleoplasm. So far the structural and functional aspects of nuclear pores have been extensively studied, but their behavior such as distribution and density, which might reflect nuclear organization and function, remain unknown. We demonstrated a cell cycle-dependent dynamics of nuclear pores. Large distinct subdomains lacking nuclear pores are present on the nuclear surface of HeLaS3 cells in early cell cycle stages. Such "pore-free islands" gradually become dispersed in G1-to-S phase. Surprisingly, the islands are enriched with inner nuclear membrane proteins lamin A/C and emerin, but exclude lamin B. Our analyses demonstrated that lamin A/C plays an essential structural and regulatory role in the nuclear pore distribution and the formation of pore-free islands. These data thus provide strong evidences that nuclear pore dynamics are regulated by the reorganization of inner nuclear structures.

### (2) Analysis of inner nuclear membrane proteins of clinical colorectal cancer tissues.

Genetic instability in human cancers appears to be widely accepted. In most cancers, this instability is observed at the chromosomal level, which is predominantly the gain or loss of entire chromosomes, known as aneuploidy. In addition, abnormal nuclei are observed in many human cancer cells. However, the change in nuclear envelope

morphology has not been investigated yet. We examined inner nuclear membrane proteins of clinical colorectal cancer tissues, and found that LAP2 $\alpha$  was overexpressed in all the cases examined. To examine roles of LAP2 $\alpha$  in cell proliferation, knockdown experiments of LAP2 $\alpha$  in HeLa, RKO, and HCT116, were carried out. As a result, LAP2 $\alpha$ -knockdown arrested the growth of HeLa, RKO, SW480 and HCT116 cells. We then observed the arrested HeLa cells by immunofluorescence. Abnormal shapes of the nuclei were often observed by LAP2 $\alpha$ -knockdown, suggesting that such deformation on nuclei proceeds to cell death. Our results suggest that overexpression of LAP2 $\alpha$  in cancer cell is correlated with cell proliferation and LAP2 $\alpha$ -knockdown could cause cell death.

### (3) Characterization of human POM121.

Pom121 is thought to serve as the anchoring sites of the vertebrate NPC to the lipid bilayer of the NE via its N-terminal transmembrane region, and thus could become one good target for examining the nuclear envelope and NPC assembly process in human cells. We examined the genetic loci of human POM121 on the chromosome 7 that underwent complex gene duplications during human evolution. We found that two human full-length POM121 are encoded by two distinct genetic loci, both of which are transcribed in HeLa cells. In HeLa cells, the efficient depletion of Pom121 by RNAi significantly reduced immunostaining signals of the NPCs, showing that this protein is indispensable for the formation and assembly of an NPC on the nuclear envelope. Furthermore, Pom121-depletion also induced aberrant nuclear morphologies, and a partial depletion of Pom121 affected the localization of lamin A/C on the nuclear surface, indicating a possible connection between Pom121 and inner nuclear membrane structures.

## 2. Chromosome segregation and replication

### (1) Analysis of Eco1, an acetyltransferase putatively involved in the establishment of chromatid cohesion

Cohesion of sister chromatid is established during S phase after replication forks. This process is mediated by cohesin complex, whose action seems to be precisely controlled by other factors including Eco1 acetyltransferase. Aiming to analyze the action of Eco1 using the cell-free system based on *Xenopus* egg extracts, we cloned two *Xenopus* homologues of Eco1. We have not reached to collective understanding of Eco1's action, mainly because the analysis of one of two homologues was bitterly delayed. Along with the analysis of *Xenopus* homologues, we found the interaction between human Eco1 and a molecule known to be involved closely with carcinogenesis.

### (2) Novel mechanisms involved in proper behavior of mitotic chromosomes

In our previous studies, we showed that Ki67 antigen, a perichromosomal protein, had a role in proper behavior of mitotic chromosomes. Here, we purified the protein complex containing chmadrin (*Xenopus* homologue of Ki67) from *Xenopus* egg extracts and revealed that the complex contained various enzymes whose involvement in mitosis has not been described. Furthermore we showed that human counterparts of these enzymes had certain roles during mitosis as well as Ki67, suggesting the possibility that Ki67 might contribute for the progression of mitosis by serving as a scaffold for various enzymes at the periphery of chromosomes.

### (3) Mitotic function of importin $\beta$

We identified a human kinesin-like DNA binding protein (hKid) as importin  $\alpha$  binding protein that forms a trimeric complex with importin  $\beta$ . We mapped two basic nuclear localization signals (NLSs) of hKid, and confirmed that this protein migrates into the nucleus in an importin  $\alpha/\beta$ - and Ran-dependent manner. To investigate whether importin  $\alpha/\beta$  and Ran regulate the mitotic function of hKid, we analyzed the effect of these nucleocytoplasmic transport factors on the mitotic behavior of hKid. In living cells, FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) analysis, using cell lines stably transformed with YFP-tagged hKid proteins, revealed that the mutation in its NLSs reduced the interaction of hKID with mitotic chromosomes. This is consistent with our in vitro findings that hKid by itself only binds to mitotic spindle, but not to the mitotic chromosomes in the absence of importin  $\alpha/\beta$ . While addition of Q69LRan-GTP, a mutant Ran defective in its GTP hydrolysis, disrupted the interaction of hKid with importin  $\beta$  and thus disrupted the importin  $\beta$ -mediated chromosome loading of hKid, addition of RanGDP and energy sources, that is supposed to generate RanGTP locally at mitotic chromosomes by the action of RCC1, stimulated chromosome loading of hKid. Importin  $\beta$  was not found on chromosomes in the same setting. These results show that transient association of importin  $\beta$  is necessary for initial targeting of hKid to mitotic chromosomes and that local reaction mediated by RanGTP on chromosomes supports efficient accumulation of hKid there.

### (4) Analysis of mitotic chromosome architecture

Mitotic chromosomes are essential structures for the faithful transmission of the genetic information at each cell division. Although more than 100 years have passed since chromosomes were found out, how the two meters of DNA that is present in each human cell is packaged into compact mitotic chromosomes (a 10,000-fold shortening) remains largely unknown. To know the mitotic chromosome structure, we are investigating possible hierarchical regularities of chromosome structure using small angle X-ray scattering analysis (SAXS) at RIKEN SPring-8. SAXS makes it possible for us to detect internal regular structures in non-crystal materials in solution.

### (5) Cell Cycle-dependent Chromatin Association, Phosphorylation, and Degradation of Mouse Orc1

Loading of the origin recognition complex (ORC) onto the chromatin is essential for the assembly of the pre-replicative complex. To examine physiological functions of the mammalian ORC, we cloned cDNAs of Orc subunits from mouse NIH3T3 cells and found novel variant forms of Orc1, Orc2, and Orc3, each generated by

alternative RNA splicing (Miyake et al., J. Biol. Chem. **280**: 12643, 2005). The novel variant form of Orc1 (Orc1B) lost 35 amino acid residues in the exon 5 and mainly expressed in thymus. We further characterized Orc1A and Orc1B using cDNA over-expression system with mammalian cultured cells. When Orc1B is transiently expressed in COS-1 cells, its degradation occurs in a proteasome-independent manner, whereas Orc1A is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. Degradation of Orc1A is dependent on phosphorylation of Ser<sup>276</sup>, which is conserved in vertebrates and is included in the sequence that Orc1B lacks. In addition, transiently over-expressed Orc1B localized in the cytoplasm while Orc1A localized in the nucleus. Thus, characterization of Orc1A and Orc1B allowed us to identify the domain of Orc1, which is essential for nuclear translocation, phosphorylation, and degradation. To further clarify the role of Orc1A phosphorylation in DNA replication, we generated an antibody against phospho-peptides containing Ser<sup>276</sup> and found that transiently over-expressed Orc1A as well as endogenous Orc1A are actually phosphorylated. Endogenous Orc1A protein is predominantly phosphorylated during G2/M phase in mouse FM3A cell line. In addition, small amount of phosphorylated Orc1A gradually increases during S phase, while most of Orc1A remains unphosphorylated and bound to chromatin. All of the phosphorylated Orc1A is extracted in chromatin-unbound fraction containing 100 mM NaCl, suggesting that chromatin-association and phosphorylation might be closely related. Transiently expressed Orc1A is partially phosphorylated in the nucleus while nuclear translocation-deficient Orc1 mutant is extensively phosphorylated, suggesting that association of Orc1 with chromatin may interfere phosphorylation of Ser<sup>276</sup>. We found that phosphorylation of Ser<sup>276</sup> is dependent on conserved cyclin-docking (Cy) motif located in amino acid residues 233-235 of Orc1A, just beside amino-terminal bromo adjacent homology (BAH) domain. Orc1 BAH domain has been shown to act as a binding site with Sir1 in *S. cerevisiae* or HP1 in *Drosophila* and Human. Taken together, we conclude that mouse Orc1 is regulated at least by phosphorylation of Ser<sup>276</sup> residue throughout the cell cycle. At G1 phase, unphosphorylated Orc1A bound to chromatin and localized mainly on heterochromatin. During S phase, Orc1A is gradually released from chromatin, and released Orc1A is phosphorylated by CDK/cyclin A through Cy motif at amino-terminal region. Phosphorylated Orc1 is degraded by Skp2-dependent degradation pathway during S phase. In contrast, at G2/M phase, phosphorylated Orc1 is not degraded but re-associates with heterochromatin after dephosphorylation. We are currently trying to understand whether Cy motif is masked by amino-terminal BAH domain on chromatin through interaction with HP1 or other chromatin factors.

(6) Sequestration of aberrant DNA polymerase alpha in the cytoplasm suggests a quality control mechanism  
DNA polymerase alpha is essential for the onset of eukaryotic DNA replication. Due to a single point mutation in the DNA polymerase alpha p180 subunit, the temperature-sensitive mouse cell line tsFT20 exhibits heat-labile DNA polymerase alpha activity and S phase arrest at restrictive temperature. We show that p180<sup>tsFT20</sup> localizes in the cytoplasm at restrictive temperature while its wild-type counterpart enters the nucleus. Time-lapse fluorescence microscopy with EGFP-tagged or photoactivatable GFP-tagged p180<sup>tsFT20</sup> variants and inhibitor analysis revealed that the changes in protein localization after temperature up-shift are due to the inability of newly synthesized p180<sup>tsFT20</sup> to enter the nucleus and to the proteasome-dependent degradation of nuclear-localized protein. Moreover, p180<sup>tsFT20</sup> synthesized de novo at restrictive temperature does not associate with the second subunit of DNA polymerase alpha, p68. Finally, we show that RNA interference of p68 results in a decrease of the overall p180 protein level and in a specific increase of cytoplasmic localized p180. Taken together, our data suggest the presence of a quality control mechanism that prevents the nuclear expression of aberrant DNA polymerase alpha.

(7) Analysis of pre-replicative complex assembly  
The assembly of pre-replicative complexes (pre-RCs) at origins of DNA replication is highly regulated and conserved in eukaryotic cells. From yeast to human, pre-RC assembles in a stepwise manner. At first, the origin recognition complex (ORC) is loaded on the origin, then Cdc6 and Cdt1, and finally Mcm2-7 associate sequentially. Pre-RC assembly is inhibited by geminin, which is a negative regulator of DNA replication in metazoan cells. To uncover the molecular mechanism of pre-RC formation, it is essential to reveal protein-protein interactions between pre-RC components. We have previously shown that geminin inhibits Cdt1-Mcm6 interaction through a strong binding with the Cdt1 central region. Here, we further investigated the interaction between Cdt1 and ORC proteins. Using yeast two-hybrid analysis, we found that mouse Cdt1 associates with Orc2. To confirm physical interaction between Cdt1 and Orc2, biochemical characterization was carried out using recombinant proteins. Mouse Cdt1 tagged with GST and Orc1-5 complex were expressed and purified from bacterial cells. We found by pull-down analysis that Orc1-5 complex is co-precipitated with Cdt1. In addition, Cdt1-Orc2 interaction is inhibited by geminin. Taken together, we conclude that Cdt1 functions as a molecular tether that connects putative ORC-Cdc6 helicase loader to MCM helicase via interactions with Orc2 and Mcm6.

#### *Staff*

#### *Head*

Dr. Naoko IMAMOTO

#### *Members*

Dr. Kose SHINGO

Dr. Masatoshi TAKAGI

Dr. Kazuhiro MESHIMA  
Dr. Takeshi MIZUNO  
Dr. Maiko FURUTA\*<sup>1</sup>  
Dr. Tomoko FUNAKOSHI\*<sup>1</sup>  
Dr. Keigo BUNAI\*<sup>2</sup>  
Dr. Kei OHKIMOTO\*<sup>2</sup>  
Dr. Kenichiro YANAGI\*<sup>2</sup>  
Dr. Kiyoshi TAHARA\*<sup>4</sup>  
Ms Rika TSUCHIYA\*<sup>4</sup>  
Ms Ai WATANABE\*<sup>3</sup>  
Ms Masae TAKANO\*<sup>4</sup>

---

\*<sup>1</sup>Contract researcher, \*<sup>2</sup>Special Postdoctoral Researcher, \*<sup>3</sup> Contract Technical Scientist, \*<sup>4</sup> Technical Assistant

*Visiting Members*

Mr. Kazuhide YAHATA (Fac. Pharm., Osaka Univ.)

*Trainees*

Mr. Haruki IINO (Fac. Science, Saitama Univ.)