

今本細胞核機能研究室
Cellular Dynamics Laboratory



主任研究員 今本 尚子 (医博)
IMAMOTO, Naoko (Ph.D)

キーセンテンス：

1. 核—細胞質間分子輸送のメカニズムと輸送経路の多様性の生理的意義
2. 核膜形成と細胞核の機能的構造構築
3. 核膜孔複合体の構造構築
4. 分裂期染色体の構造と機能変化

キーワード：

核—細胞質間輸送、インポーチン、エクスポートイン、低分子量 GTPase Ran、核膜孔複合体、ヌクレオポリン、核膜、核内膜因子、細胞周期、細胞分裂期、分裂期染色体、スピンドル、細胞ストレス、細胞応答、細胞分化、細胞老化

研究概要

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だ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-細胞質間の情報分子の交換の仕組み、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。分子細胞生物学的手法、生化学的手法、イメージング手法、生物物理学的手法を取り入れながら、多角的な解析を行っている。とりわけ、生きた細胞内の反応を無細胞系で再構築していく点、並びに、生細胞操作を駆使する点に当研究室解析手法の特徴がある。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 細胞質間分子流通システムの解析
- 2) 細胞核の機能的構造構築の理解
- 3) ゲノムの複製と分配の解析

1. 核—細胞質間分子流通システムの解析 (小瀬、木村、横山、今本)

1-a 分子シャペロン heat shock cognate 70 (Hsc70)の核内移行機構解析

真核細胞の中には、20 を越える核内外輸送経路が存在する。現在知られている輸送経路は、大きく分けて次の3つに分類され、それぞれが全く異なる性質をもつ運搬体分子を利用する。大部分のタンパク質や各種RNAの核内外輸送を担う importin ファミリー分子群、RanGDPを核内に運ぶp10/NTF2、並びに、mRNAの核外輸送を担う TAP-p15 である。真核生物は多様な核内外輸送経路を使い分けることにより、様々な細胞機能を支えている。

熱ショックなどのストレス応答時に、SV40T 抗原に代表される塩基性 NLS を認識する importin が、核内にリテンションされてリサイクリングできないこと、また、全ての importin ファミリー輸送反応に必須な低分子量 GTPaseRan の活性低下が見られることが、我々を含む複数の研究グループがこれまでに報告してきた。そのため、ストレス応答時には、核内外を往来する大部分のタンパク質輸送を担う importin ファミリーによる輸送反応が低下すると考えられる。その一方で、熱ショック時に、分子シャペロン hsc70/hsp70 のように、核内に強く集積する分子がある。この現象は古くから知られているが、その分子機構は全く明らかにされていない。私たちは、熱ショック応答性の輸送反応を再構築し、hsc70 の核内輸送活性を指標に、その核内輸送に必要な因子を生化学的に精製し、新規因子を同定した。同定した因子は酵母からヒトにかけて広く保存されており、そのリコンビナントタンパク質は in vitro で hsc70 の核内輸送を支えるとともに、その因子を RNAi でノックダウンすると、ストレス応答性の hsc70 の核内移行が生細胞

で阻害された。驚いたことに、同定した因子は、それ自身で核膜孔通過能をもつなど、これまでに知られてきた運搬体としての性質を有することがわかった。現在、同定した因子が、hsc70/hsp70 をストレス応答時に核内に運ぶ、新しい運搬体である可能性について解析している。

1-b importin β ファミリー運搬体分子群による核-細胞質間輸送の分担機構の解析

遺伝子機能の場である細胞核が、タンパク質合成の場である細胞質から隔てられた真核生物において、核と細胞質間の情報分子の交換は、細胞の生命活動において必要不可欠である。タンパク質は核膜にある核膜孔複合体を通過する。核膜孔複合体は選択的なバリア機能をもつ疎水性の柔軟な構造で満たされており、ここに進入する性質をもつ分子のみが通過できると考えられている。核へ出入りするタンパク質は数千種と見積られるが、その多くがヒトでは、21種類のimportin β ファミリー群で認識・結合することで核膜孔を通過すると考えられる。多種類のimportin β はその特性の違いに基づき、核内の諸反応に関わる特定のタンパク質グループを適時供給・除去するための輸送システムを構成していると予想される。この、核-細胞質間輸送システムの全体像を理解するため、我々は未だ情報の少ない各importin β とそれらの輸送基質の対応関係を網羅的に決定する方法の開発を進めている。その基本原理は、安定同位体標識(SILAC)法と無細胞系輸送構築系を組み合わせ、“functional”アッセイで基質を同定する手法である。この系では組換え輸送基質を用いた検討により、核内輸送反応の最適条件、反応後の核内タンパク質の抽出方法を設定した後、実際に安定同位体標識した細胞抽出液を用いて反応させた。質量分析法(LC-MS/MS およびMALDI-MS/MS)で回収した核内タンパク質を同定する予備実験を行った。セミインタクト細胞に内在するタンパク質由来の大多数の非標識ペプチドと同時に、核内に輸送されたタンパク質由来の同位体標識ペプチドが同定されることが期待される。予備実験ではimportin β (および α) 依存的に核内輸送された標識ペプチドが少数ながら実際に同定され、本方法の実効性が確認された。今年度は、内在性の核タンパク質の核内移行効率についても検討し、更なる同定効率の最適化を行った。

2. 細胞核の機能的構造構築の理解 (前島、船越、渡邊、飯野、Vedecnik、今本)

2-a 間期核における核膜孔複合体形成解析系の樹立とシグナルの関与

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。その結果、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)。さらに、脳研究センター・神経構築グループの中臣・端川らとの共同研究で、Freeze-fractureしたHeLaS3細胞の核表面の走査電子顕微鏡観察をおこない、核膜上に広がる1つ1つの核膜孔複合体やPore-free islandをイメージングした。

私たちは核膜孔複合体の構築単位となるサブコンプレックスに含まれる代表的な蛋白質に蛍光タグを付け、HeLa細胞内で発現させて安定発現株を作製した。とりわけ、複合体の中で最も安定に存在するNup133-YFPやNup107-YFPの発現株では、488nmレーザーをもちいて核膜表面のある核膜孔領域をbleachすることができ、新たに形成された核膜孔を可視化できるようになった。更に、細胞融合法をベースとした、間期核膜孔複合体形成を可視化する実験系の樹立に成功した。これらの手法と細胞周期の阻害剤を組み合わせることによって、間期の核膜孔形成が、細胞周期によって厳密にコントロールされていることが示された。

2-b 細胞分裂終期における核膜形成過程のリアルタイムイメージングによる解析系の樹立

動物細胞の核膜は細胞周期を通してダイナミックな膜構造体である。核膜を構成する核膜孔は、核-細胞質間の物質輸送をはじめ、転写・翻訳などの核機能にも関与することがわかってきた。核膜孔の構成因子群も核膜と同様、細胞分裂期に崩壊し、分裂期終期になると、姉妹染色体の周辺に集積し、新たな核膜に組み込まれて核膜が再形成されるが、その分子メカニズムはわかっていない。我々は核膜形成過程をイメージング解析するため、核膜タンパク質、核膜孔膜タンパク質に蛍光タンパク質を付加して安定発現株を樹立した。これら細胞株を利用して、分裂期後の核膜再形成の初期段階を再現するin vitroアッセイ系の樹立に成功し、1)核膜タンパク質の染色体への集積には細胞質成分とATPが必要であること、2)細胞質成分の活性が細胞周期によって異なること、3)分裂期中でもanaphase

と telophase では細胞質要求性が異なる場合があることを明らかにした。新たな解析法を利用した核膜形成についての生化学的解析が可能となった。

3. ゲノムの複製と分配の解析 (高木、水野、田原、深瀬、今本)

3-a 核-細胞質間輸送因子 importin と低分子量 GTPase の作用でヒストン H1 はクロマチンにローディングする

核-細胞質間運搬体分子 importin ファミリーは、核膜孔複合体を介した輸送反応を担う以外に、多彩な細胞機能を担うことが明らかにされてきている。例えば、間期では翻訳制御や極性形成、また、分裂期では染色体分配やスピンドル形成などを担う。私たちは最近、importin β と分裂期染色体上で局所的に生成される低分子量 GTPase RanGTP の作用で染色体上にクロモキネシン Kid が積極的に集積する現象を見つけた (Tahara et al., JCB, 2008)。この現象は、importin β と Ran の新しい機能として注目されているが、メカニズムや現象の普遍性についてはわかっていない。私たちは、importin と Ran の作用で染色体にローディングされる第 2 の因子の候補としてヒストン H1 に着目し、その染色体ローディング機構を輸送因子との関係で解析を試みた。間期では、ヒストン H1 は importin β と importin γ と 3 者複合体を形成し、Ran サイクルに依存してはじめて核膜孔複合体を通過して核内に集積することが明らかにされている。驚いたことに、DNA 結合活性をもつヒストン H1 は、コンパクト化したクロマチンとは、それ自身では全く相互作用しない。しかしながら輸送反応と同様に、ヒストン H1 は importin β と importin γ と結合して、更に、Ran サイクルが存在すると染色体上に強く集積していく。この反応は分裂期染色体に限らず、間期核のクロマチンでも同様であった。importin β 、importin γ 、並びに Ran がヒストン H1 特異的なヒストンシャペロンとして機能する可能性について調べている。

3-b 分裂期染色体表層に局在する分子が染色体動態を制御する分子機構

私達は分裂期染色体表層に局在するタンパク質 (クマドリン = Ki67) の機能解析を行い、クマドリンが分裂期染色体の適切な動態に寄与する分子であることをこれまでに示した。キネシン様モータータンパク質 Hklp2 は、クマドリンと分裂期特異的に相互作用することを以前に報告したが、正確な局在や具体的な機能が未知のままであった。本年度は、クマドリンと Hklp2 との機能的協調について解析した。特異的抗体を利用し、Hklp2 が分裂期紡錘体および中期染色体の近傍に局在することをまず示した。また、RNA 干渉法により培養細胞から Hklp2 を除去すると細胞分裂過程に重篤な影響を及ぼさないものの、分裂期紡錘体が monastrol (双極性紡錘体形成において重要なキネシン様モーターである Eg5 の活性を阻害する薬剤) に対する高い感受性を獲得し、低濃度の monastrol 処理により容易に崩壊することを示した。

クマドリンを RNA 干渉法により培養細胞から除去すると、Hklp2 の正常な局在性は損なわれ、特に染色体近傍への局在性が失われた。興味深いことに、クマドリン除去細胞における分裂期紡錘体は、monastrol に対する感受性が減じていた。また、monastrol 除去による双極性紡錘体再形成の進行も、対照細胞に較べて顕著に早かった。以上の観察を総合し、Hklp2 は双極性紡錘体の形成または維持において Eg5 と協調して機能する分子であり、クマドリンは Hklp2 を適切に局在させることにより機能的な紡錘体形成に寄与しているものと推察された。本研究は、David Vanneste と Isabelle Vernos 両博士 (Centre de Regulacio Genomica, Spain) との共同研究である。

3-c マウス DNA ポリメラーゼ の品質管理機構

ヒトのゲノムには 14 種類の DNA ポリメラーゼがコードされている。その中で DNA ポリメラーゼ δ は最も古くから単離同定され、複製開始に必要なことが示されてきた。DNA ポリメラーゼ δ はプライマーゼと強固に結合した唯一のポリメラーゼであることから、新生 DNA 鎖の合成開始に不可欠であることが証明されている。しかし、DNA ポリメラーゼ δ の細胞内の動態 (細胞内局在部位やタンパク質合成、分解) に関しては従来の技術では明確に解析されてはいなかった。マウス DNA ポリメラーゼ δ の温度感受性変異体 tsFT20 と EGFP の融合タンパク質のタイムラプス観察、光刺激型 GFP による追跡実験、種々の阻害剤を用いた解析、siRNA による knock down 実験等、を徹底的に行うことで、DNA ポリメラーゼ δ の核内の品質を管理する二つの独立した機構を見いだした。一つの経路は、異常な核内の DNA ポリメラーゼ δ が速やかにユビキチン化され、プロテアソームにより核内で分解されるメカニズムである。もう一つの系路は新たにタンパク質合成された異常な DNA ポリメラーゼ δ には第二サブユニットが結合できず、細胞質に係留

させると言う経路である。DNA ポリメラーゼ の異常によりゲノムの不安定性が誘起されることが報告されており、ゲノムの恒常性を維持する為に異常な DNA ポリメラーゼ (突然変異の結果、構造上異常が生じた分子)やバランスの崩れた複合体の品質が管理される機構が存在するのではないかと考察された

Key Sentence :

1. Molecular mechanism of nucleocytoplasmic transport and diversity of transport pathway
2. Post mitotic nuclear envelope formation and nuclear organization
3. Nuclear pore complex: formation and dynamics
4. Structure and property of mitotic chromosome

Key Word :

Nucleocytoplasmic transport, importin, exportin, small GTPase Ran, nuclear pore complex, nucleoporin, nuclear envelope, inner nuclear membrane proteins, cell cycle, cell division, mitotic chromosomes, mitotic spindles, cellular stress, cellular response, cell differentiation, cell senescence

Outline

In eukaryotic cells, most of genomic information is stored in the cell nucleus. The main subject of our laboratory is to understand the mechanism of nucleocytoplasmic transport, particularly focusing on the diversity of transport pathways, and organization of cell nucleus, focusing on the nuclear periphery, 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. Mechanism and Regulation of Nuclear Transport
2. Studies of Nuclear Organization Focused on the Nuclear Periphery
3. Dissection of Mitotic Events and DNA Replication for a Better Understanding of the Interphase Nucleus

1. Mechanism and Regulation of Nuclear Transport (Kose, Kimura, Yokoyama, Imamoto)

1-a Mechanism of the nuclear import of molecular chaperone hsc70/hsp70

Although the conventional nuclear import pathway is down-regulated in heat-shock cells, the nuclear import of molecular chaperone hsc70/hsp70 is up-regulated substantially. To dissect the molecular mechanism of the nuclear import of hsc70, we first set up the experimental system to reproduce the heat-shock-induced nuclear import using permeabilized cells. In our cell free system, GFP-fused recombinant hsc70 proteins efficiently migrated into the nucleus depending on cytosol prepared from heat-shocked cells and ATP, while decreasing the import efficiency of conventional nuclear import pathway as in living cells. We first asked whether importin family proteins are involved in nuclear accumulation of hsc70/hsp70 by using importin-depleted cytosol by phenyl-Sepharose, and adding back each recombinant protein. The results strongly suggested that nuclear migration of hsc70/hsp70 is importin -independent. Purification study identified one protein, whose function is uncharacterized but widely conserved protein throughout eukaryotic cells. Bacterially expressed identified protein supported nuclear accumulation of hsc70 in importin-depleted cytosol. Si-RNA experiment showed inhibition of heat-shock induced nuclear migration of hsc70/hsp70. Since this protein show hydrophobic nature that can transit through NPC on its own, we are currently characterizing whether the protein can possibly function as novel import carrier for hsc70/hsp70.

1-b Biological significance of transport diversities: why so many importin family proteins?

We have been thinking for a long time about the biological significance of the presence of such a large number of importin-β family proteins. The literature reveals some redundancies in the

recognition of cargo proteins, yet carrier proteins show some specificity in cargo recognition. To understand the function of each transport pathway mediated by different transport receptors, one fundamental issue must be overcome. With several databases taken in consideration, approximately 30% of human proteins expressed in cells are expected to be nuclear proteins, suggesting that nucleocytoplasmic transport is the largest trafficking within cells. Apparently, 21 species of importin- β family proteins are encoded in the human genome. Among them, half mediates nuclear import (importins), one-third mediates nuclear export (exportins), one mediates bidirectional transport, and others have not yet been characterized. Therefore, the import of more than a thousand protein species is allotted to about ten species of importins, with some overlap, and conversely, the importins may allocate the nuclear proteins to specific groups. To elucidate the inclusive nuclear transport system, comprehensive information on the importin-cargo correspondence must be acquired. Since only limited examples of cargoes of each importin have been determined so far, and since those reports, if any, are not comparable due to the diversity of methods applied, we are attempting to develop a high-throughput system for the identification of cargoes specific to each importin- β family of proteins by applying a permeabilized cell nuclear transport assay. The main components of the preliminary system included permeabilized cells, cytosol extract, which was depleted of all importin- β family proteins by phenyl-Sepharose (Ribbeck and Görlich, EMBO J., 21, 2664–2671, 2002) and one species of recombinant importin- β family protein. The cytosol extract, from which proteins were to be transported by the added importin- β family protein into the nuclei of the permeabilized cells, was prepared from cells labeled by SILAC (stable isotopic labeling by amino acid in cell culture). Proteins in the nuclei after the transport reaction were to be extracted and the transported proteins with isotope labeling in the extract were to be identified by mass spectrometry. After the conditions were optimized for the importin- α/β -dependent transport of a GFP fusion standard cargo, the preliminary experiments were carried out. By mass spectrometry (LC-MS/MS and MALDI-MS/MS) of peptides from the recovered nuclear proteins, isotope-labeled peptides were detected, albeit in a limited number, in a recombinant importin- α/β -dependent manner, assuring the potency of this methodology. We are currently optimizing the conditions using multiple numbers of natural nuclear proteins. Our initial aim is to allot the 1000 nuclear proteins expected to be identified by one run of the transport and subsequent mass spectrometry analysis, to each importin- β family protein.

2. Studies of Nuclear Organization Focused on the Nuclear Periphery (Maeshima, Funakoshi, Vedecnik, Iino, Watanabe, Imamoto)

2-a Cyclin dependent kinase conduct interphase nuclear pore complex formation.

The nuclear volume and the number of nuclear pore complexes (NPCs) on the nucleus almost doubles during interphase in dividing cells. However, how these events are coordinated with the cell cycle is poorly understood, particularly in mammalian cells. We report here, based on the novel imaging techniques for NPC formation, that cyclin-dependent kinases (Cdks), especially Cdk1 and Cdk2, conduct interphase NPC formation, but not nuclear growth, in human dividing cells. Cdk-inhibition disturbed proper expressions and localizations of AT-hook-containing transcriptional factor Elys/MEL-28, which was reported to be essential for post-mitotic NPC assembly, implying that Cdks drive very early step of NPC formation. Generation of the “baby pores”, which we identified as immature NPCs under the formation process, was also inhibited. Since Cdk-inhibition in mitotic cells rapidly induced post-mitotic NPC assembly, the interphase NPC formation and post-mitotic NPC assembly have distinct regulatory systems during the cell cycle.

2-b Real time imaging system to analyze the post-mitotic nuclear envelope assembly

The nuclear envelope is a dynamic membrane structure in eukaryotic cells that disassembles and reassembles during each cell cycle. However, molecular basis of nuclear envelope assembly process is still unclear. In order to analyze molecular mechanism of nuclear envelope formation, we initially established human cell lines expressing several nuclear envelope proteins tagged with fluorescence

proteins. We next succeeded to reconstitute a nuclear envelope formation in a cell-free system using semi-permeabilized human cells. Using this system, we found that 1) both cytosolic factor(s) and ATP are necessary to initiate the nuclear envelope reassembly, 2) cytosol prepared from interphase and mitotic cells have different contribution to nuclear envelope assembly 3) requirement of cytosol is different between before and after anaphase on-set.. This unique experimental system, combined with live cell imaging, allows us a biochemical manipulation of nuclear envelope formation process.

3. Dissection of Mitotic Events and DNA Replication for a Better Understanding of the Interphase Nucleus (Takagi, Mizuno, Tahara, Kitamura, Fukase)

3-a Function of importin and small GTPase Ran for mediating chromosome loading of DNA-binding proteins.

Nucleocytoplasmic transport factors mediate various cellular processes, including nuclear transport, spindle assembly, and NE/pore formation. Throughout the course of searching for factors that interact with importin- β , we have identified chromokinesin human kinesin-like DNA-binding protein (hKid) as an import cargo of the importin- α/β transport pathway and have determined its NLSs. Since Kid has been reported to function in mitosis, we examined whether the loss of NLSs affects the function or dynamics of hKid during mitosis. Upon the loss of its functional NLSs, hKid exhibited reduced interactions with the mitotic chromosomes of living cells when examined by fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) and fluorescent loss in photobleaching (FLIP). In digitonin-permeabilized mitotic cells, hKid was bound only to the spindle and not to the chromosomes themselves. However, surprisingly, hKid bound to importin- α/β was targeted efficiently to mitotic chromosomes. The addition of Ran-GDP and an energy source, which generates Ran-GTP locally at mitotic chromosomes, enhanced the importin- β -mediated chromosome loading of hKid. Our results indicate that the association of importin- α and - β with hKid triggers the initial targeting of hKid to mitotic chromosomes and that local Ran-GTP-mediated cargo release promotes the accumulation of hKid on chromosomes. As a second example, we have found that histone H1 cannot load onto mitotic chromosome by itself, but its loading is significantly stimulated upon addition of importin α , importin β and small GTPase Ran. Thus, our study demonstrated a novel nucleocytoplasmic transport factor-mediated mechanism for targeting proteins to mitotic chromosomes could be applied to different proteins. From this study, we learned that the functions of importin(s) are probably not only to carry its cargo molecules into the nucleus through the NPC, but that they may be also required to release their cargoes at their destined "working place". Such regulation may even exist within the interphase nucleus.

3-b The role of Hklp2 and Ki67 (chmadrin) in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity (the work was done in collaboration with Prof. Isabelle Vernos, CRG, Spain)

Chmadrin/Ki-67 is a nuclear and nucleolar protein whose expression is tightly associated with cell proliferation. Chmadrin/Ki-67 relocates to the periphery of chromosomes early in prophase of mitosis, when chromosomes are beginning to condense and accumulate on the perichromosomal layer by metaphase and remains associated there until telophase. Naturally, it has been speculated that Chmadrin/Ki-67 may have functions in the progression of mitosis. We have previously found that Chmadrin/Ki67 specifically interact with phosphorylated form of Hklp2. Consistent with this evidence, we recently reported formally that the depletion of Ki-67 from tissue culture cells caused abnormal behavior of mitotic chromosomes. In the course of studying the molecular basis for the observed abnormalities, we further analyzed Hklp2 and succeeded in manifesting the role of this motor protein in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. We began with a reexamination of the localization of Hklp2 using newly raised antibodies and showed that Hklp2 localized along spindle microtubules and in the proximity of the aligned chromosomes. Although Hklp2 silencing exhibited no major consequences on cell division, it promoted a higher percentage of spindle collapse upon partial inhibition of the kinesin-5 motor protein Eg5 by monastrol. Next, we found that Hklp2 localization was lost from the chromosome area in metaphase cells lacking Ki-67. Consistently, Hklp2 localization was

similarly altered in Ki-67 silenced cells treated with monastrol. Moreover, these cells were more resistant to a collapse of the poles than control cells.

In addition, Ki-67-silenced cells having monopolar spindles reestablished a bipolar spindle after monastrol washout faster than the controls. We propose that Hklp2 participates in the establishment or maintenance of spindle bipolarity. In addition, our data suggest that Ki-67 participates in the establishment of a functional spindle via modulating the steady-state distribution of Hklp2 between the spindle microtubules and the chromosomes.

3-c Aberrant DNA polymerase alpha is excluded from the nucleus by defective import and degradation in the nucleus.

DNA polymerase alpha is essential for the onset of eukaryotic DNA replication. Its correct folding and assembly within the nuclear replication pre-initiation complex is crucial for normal cell-cycle progression and genome maintenance. Due to a single point mutation in the largest DNA polymerase alpha subunit, p180, the temperature-sensitive mouse cell line tsFT20 exhibits heat-labile DNA polymerase alpha activity and S phase arrest at restrictive temperature. In this study, we have shown that an aberrant form of endogenous p180 in tsFT20 cells, p180tsFT20, is localized strictly in the cytoplasm, while its wild-type counterpart enters the nucleus. Time-lapse fluorescence microscopy with EGFP-tagged or photoactivatable GFP-tagged p180tsFT20 variants and inhibitor analysis revealed that the exclusion of aberrant p180tsFT20 from the nucleus is due to two distinct mechanisms: first, the inability of newly synthesized (cytoplasmic) p180tsFT20 to enter the nucleus, and second, the proteasome-dependent degradation of nuclear-localized protein. The nuclear import defect appears to result from an impaired association of aberrant *de novo* synthesized p180tsFT20 with the second subunit of DNA polymerase alpha p68. In accordance, we demonstrated that RNA interference of p68 results in a decrease of the overall p180 protein level and a specific increase of cytoplasmic localized p180 in NIH3T3 cells. Taken together, our data suggest two mechanisms that prevent the nuclear expression of aberrant DNA polymerase alpha.

Principal Investigator

今本 尚子 Naoko Imamoto

Research Staff

小瀬 真吾 Shingo Kose
高木 昌俊 Masatoshi Takagi
水野 武 Takeshi Mizuno
木村 誠 Makoto Kimura
田原 清志 Kiyoshi Tahara
船越 智子 Tomoko Funakoshi
渡邊 愛 Ai Watanabe

Students

横山 知美 Tomomi Yokoyana
Michaela Vedecnik
北村 裕子 Yuko Kitamura

Assistant and Part-timer

深瀬 明子 Akiko Fukase
吉川 啓子 Keiko Yoshikawa

Visiting Members

前島 一博 Kazuhiro Maeshima