

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—細胞質間分子輸送システムの解析
2. 核細胞質間輸送とストレス応答
3. 核膜孔複合体・核膜の構造構築
4. ゲノムの分配と複製

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、DNA 複製、ストレス応答、分子シャペロン、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) 核膜・核膜孔複合体の構造構築の解析
- 3) ゲノムの分配と複製の解析

#### 1. 核—細胞質間分子流通システムの解析 (小瀬、渡邊、木村、小田、今本)

##### 1-a ストレス応答時における核-細胞質間分子輸送機構とその機能

真核細胞の中で核—細胞質間を流通する分子種は細胞内で発現しているタンパク質の 1/3 にも相当する ~ 10,000 種類にもものぼると考えられている。その大部分のタンパク質は、importin $\beta$ ファミリーと総称される運搬体分子群で運ばれると考えられている。このファミリー分子で担われる輸送反応の駆動力は低分子量 GTPase Ran の GTPase サイクルであることがわかっている。

一方、熱ショックなどのストレス応答時には低分子量 GTPaseRan の GTPase サイクルに支障が見られることを、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、importin ファミリーによる既知の輸送反応全般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 (以下 hsp70s と記載) 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、hsp70s 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 hsp70s 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 hsp70s の核内移行が生細胞で阻害された。同定した因子は、それ自身で核膜孔通過能をもち、また、濃度勾配に逆らって hsp70s を細胞質から核に集積することを可能にするため、新規に同定した因子と hsp70s の相互作用は hsp70 の ATPase サイクルを制御する co-chaperone によって制御されること

研究年報

がわかった。これらの結果から、同定した因子がこれまでに全く知られていない新規運搬体分子であること、さらに、ストレス応答時には正常時に働く核—細胞質間輸送経路が遮断されて、Ran の GTPase サイクルを駆動力としない全く新規の輸送経路が出現することがはじめてわかった。現在、ヒト細胞において、この新規輸送経路の細胞機能を解析している。

また、上で同定した因子の分裂酵母ホモログは核膜に局在することがわかり、現在、その破壊株を用いて分子シャペロン hsp70s の細胞内局在制御の変化をはじめとして調べており、新規運搬体分子の遺伝学的解析に向けた準備を開始している。

#### 1-b importin $\beta$ 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、核と細胞質の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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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。組換え輸送基質を用いた検討、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の設定を終え、安定同位体標識した細胞抽出液を用いて反応させ、質量分析法(LC-MS/MS および MALDI-MS/MS)で解析した。Importin  $\beta$ ファミリー分子の1つである transportin を用いて得られた結果について詳細な解析を行った。質量分析の解析で上位にきた候補分子を、生化学的に解析したところ、これまで報告されていなかった分子種も含め、10~20 種類のタンパク質を基質として同定することに成功した。今後、パイオインフォマティクスの情報も取り入れ、この同定系の有用性を示していきたいと考えている。

## 2. 細胞核の機能的構造構築の理解 (船越、Clever、三村、芳本、内田、前島、今本)

### 2-a 間期核における核膜孔複合体形成系の樹立と細胞周期エンジン CDK による制御の解析

核膜孔複合体は核と細胞質を往来する全ての物質の唯一の通り道である。核膜孔複合体は酵母からヒトまで保存された 8 角対称の幾何学的構造をもち、総重量 100MDa にも及ぶ巨大なタンパク質複合体である。この大きな構造体が 2 層の脂質膜から成る核膜上に形成される“間期の核膜孔複合体形成”過程を解析することはこれまで技術的に困難であった。私たちは生細胞で核膜孔複合体を可視化し、細胞融合法で作成したヘテロカリオンの中で間期の核膜孔複合体形成を可視化できる実験系の樹立に成功した。具体的には、まず、核膜孔に安定に存在する核膜孔複合体因子“scaffold Nup<sup>1</sup>”の1つである Nup133 または Nup107 に蛍光タンパク質 Venus (YFP) をつなぎ、それを安定に発現する細胞株を取得することで、核膜孔複合体を生細胞で可視化できるようにした。この細胞を donor 細胞、ヒストン H2B を CFP 標識した細胞を acceptor 細胞に用いて融合し、Venus シグナルが acceptor 細胞の核膜上に出現するのを新規核膜孔複合体形成の指標とした。Photobleach 法を併用することで、間期でおこる核膜孔複合体形成が細胞周期エンジンとして知られているサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の司令で厳密に制御されていることがわかった。興味深いことに、CDK は分裂終期におこる核膜孔複合体形成は阻害しないことがわかった。つまり、分裂期染色体を足場とする分裂終期の核膜孔複合体形成と、核膜を足場とする核膜孔複合体形成の開始反応に大きな違いのあることが示唆される。現在、CDK の基質となる分子を絞り込む方法を検討している。

### 2-b 核膜孔膜タンパク質 Pom121 と核内膜の相互作用が間期核膜孔複合体形成に果たす役割の解析

核膜孔は、核-細胞質間の物質輸送の場を提供するだけでなく転写や複製制御などにも関与することが報告され機能の多様性が示されている。核膜孔は、約 30 種の構成因子 (Nucleoporin, Nup) から成る巨大複合体である。分裂期染色体を足場とした分裂終期の核膜孔形成と、核膜を足場とした間期核膜孔形成では、形成の開始が異なると想像できるが具体的には明らかにされていない。間期核膜孔形成時には核内膜と核外膜の膜融合を伴うため、膜タンパク質の関与も予想される。動細胞では 3 種の膜タンパク Nup が知られており、その1つである Pom121 についてこれまで解析を進めてきた。RNAi による Pom121 の減少は、

核膜上の核膜孔の減少や凝集、核の変形を引き起こすことを示してきたが、Pom121 が間期核膜孔形成に必須であるかは不明であった。当研究室で、蛍光標識した Nup107 安定発現株を用いた細胞融合を利用して、間期核膜孔形成を可視化する系の構築に成功した。この系で Pom121 RNAi で間期核膜孔形成が阻害されることを明らかにした。私たちは、Pom121 分子内に複数の核移行シグナル (NLS) と核内膜と相互作用する領域が存在することを見つけ、この 2 要素が Pom121 の間期の核膜孔局在に必要であることがわかった。その一方で分裂終期に形成される核膜孔局在に NLS は必須ではなかった。Pom121 NLS は Imortin  $\alpha$  介して Imortin  $\beta$  と結合し、RCC1 の温度感受性変異株 tsBN2 細胞を用いた解析から、Pom121 が Ran 依存的に核膜に局在することがわかった。以上の結果に加え、Pom121 の核内膜相互作用領域は核内膜タンパク質 lamin B receptor と結合すること、全長 Pom121 が核内膜へ局在することから、Pom121 が合成の場である小胞体から核膜孔を通過して核内へ輸送されて核内膜と相互作用することが間期核膜形成の第 1 ステップになるというモデルを提唱した。

### 3. ゲノムの分配と複製の解析 (高木、水野、西山、今本)

#### 3-a 分裂期染色体表層に局在する分子が染色体構築に果たす役割の解析

分裂期染色体の構築において、コンデンシン複合体が必須の役割を果たすことがアフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞系において示された (Hirano et al., 1997)。その一方で、近年、ヒト培養細胞を含めた多くの細胞において、コンデンシン複合体を除去しても一見正常な分裂期染色体が構築されることが報告されている。コンデンシン複合体と同等の機能を果たす「第二の因子」が存在すると考えられるが、その実体についてはこれまでは僅かな手掛かりしかなかった。細胞を理解する上での本質的な問いである。私達が解析してきた Ki67 抗原は、分裂期染色体の表層を縁取るように局在し (Takagi et al., 1999)、クロマチンの高次構造を変換する強い活性をそなえており (Kametaka et al., 2004)、また染色体構造の調節との密接な関与が示唆されている脱リン酸化酵素 PP1 と直接相互作用する (未発表) ことから、「第二の因子」の有力な候補であると考えた。実際に Ki67 抗原をコンデンシン複合体と同時除去すると HeLa 細胞の分裂期染色体の形成がはじめて大きく崩れた。さらに II 型トポイソメラーゼ  $\alpha$  (トポ II $\alpha$ ) を同時に除去すると、染色体の形態はさらに崩れ、もはや個々の染色体を識別することができなかった。互いに異なる局在性を示す Ki67 抗原 (染色体表層) とコンデンシン複合体 (染色体軸) は染色体構築において相補的な機能を果たすものと考えられ、トポ II $\alpha$  も含めた三者の関係性を明らかにすることで、分裂期染色体の構築原理に鋭く迫れるのではないかと予想された。現在、三者の時空的な関係性に焦点をあてた解析を進めており、分裂期染色体の構築原理について新たな視点から考えていくための基礎を築いていく。

#### 3-b DNA ポリメラーゼ の品質管理を新たに提唱

ヒトを含めた高等多細胞生物の染色体の複製は DNA ポリメラーゼ (DNA 合成酵素)、 $\alpha$ 、 $\beta$  の 3 種類の B 型 DNA ポリメラーゼにより行なわれることが明らかになっている。この中でポリメラーゼ  $\beta$  は、唯一プライマーゼ (プライマー RNA の合成を行なう酵素) と複合体を形成しており、新生 DNA 鎖の合成を司る。よって、複製開始、及びラギング鎖合成 (不連続合成される DNA 鎖) に必須であることが証明されている。私たちは最近、GFP (green fluorescent protein) 融合タンパク質の継時観察や、光刺激型 GFP (450nm 近くの光を照射して初めて緑色の蛍光を発生する改良型 GFP) を用いた観察実験等により、ポリメラーゼ  $\beta$  の核内の品質管理する機構が存在することを見いだした (C. Eichinger, T. Mizuno et al., *J. Biol. Chem.*, 2009, 下図)。即ち、ポリメラーゼ  $\beta$  の温度感受性変異株 tsFT20 細胞を利用することで、異常な構造を生じたポリメラーゼ  $\beta$ 、もしくはサブユニットの構成が崩れたポリメラーゼ  $\beta$  は細胞質に係留され、更に、核内では異常なポリメラーゼ  $\beta$  が速やかにユビキチン化 プロテアソーム系により分解されるという二つの独立した経路により核内のポリメラーゼ  $\beta$  の品質が管理されていることが結論された。このようにポリメラーゼ  $\beta$  の詳細な機能解析の結果、タンパク質の合成、翻訳、サブユニット間相互作用、細胞内輸送、タンパク質分解という、各ステップにおけるポリメラーゼ  $\beta$  の代謝の実態に関して新しい知見が得られた。ポリメラーゼ  $\beta$  の品質管理機構は、染色体の遺伝情報の恒常性を維持する役割を担っており、疾病、老化等の高次な生命現象との関係に興味を持たれる。この成果は、理解が遅れている核内のタンパク質品質管理の重要性を新たに提唱していく上で一歩になるものである。現在、核内のタンパク質品質管理機構という新しい概念の提唱に取り組み、その分子実態を解明するために核内 E3 分子 (ユビキチンリガーゼと考えられている未知因子) の同定を試みている。

#### 3-c マウスの licensing factor Cdt1 の機能解析

私たちは、一回のS期において一度の複製を保証するクロマチンのライセンス化において重要な役割を担う Cdt1(cdc10 dependent transcript)を標的とし、機能解析に取り組んでいる。まず、NMR(核磁気共鳴)法によりC末領域がwinged turn helix (WH)という特徴的な構造をとることを見いだした。(J.Jee, T. Mizuno *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010)。次に、この構造にもとづきMcm(minichromosomal maintenance)との結合に重要なアミノ酸残基を同定することに成功した。さらに構造上の相同性を検索した結果、Cdt 1のC末領域のWHが古細菌のCdc6のC末領域のWHと類似性を有すること、またCdt1の中央領域のWHとも類似性を有することを見いだした。これらの相同性と機能解析を通じて、複製前複合体の形成に働くWHの分子基盤を提唱するに至った。複製前複合体の構成因子の中には複数のWHドメインが存在すると予測されている。各WHドメインは、これまで考えられていたDNA結合ドメインとして働くのではなく、タンパク質間相互作用の足場として機能することが推測される。これらの結果は、複製前複合体の統合的な理解につながるかと考えている。

-----  
**Key Sentence :**

1. Analysis of nucleocytoplasmic transport system
2. Stress response and nucleocytoplasmic transport.
3. Biogenesis of nuclear pore complex
4. Chromosome segregation and replication

**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, molecular chaperones, 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, Watanabe, Oda, , Imamoto)**

1-a Identification of novel nuclear import pathway that operate during stress response. Many molecular chaperones are expressed to protect cells against protein damages, which occur in various cellular compartments leading to lethal effects under environmental stresses. Hsc70/Hsp70 belongs to a major family of molecular chaperones involved in highly conserved protective systems. Previous studies suggest that the conventional nucleocytoplasmic transport is down-regulated whereas nuclear import of Hsc70/Hsp70 is up-regulated during stress response. Properties of Hsc70/Hsp70 as chaperones in protein homeostasis are well investigated, however, their nuclear function and mechanism of nuclear migration under stress remain elusive. Here we report that a heat-shock-induced nuclear import of Hsp70s is mediated by a novel receptor, which does not belong to well-characterized members of importin family. Using in vitro transport assays, a soluble

protein was biochemically purified as an essential factor for heat-shock-induced nuclear import of Hsp70s. The molecule identified is an evolutionarily conserved protein from yeast to human with unknown function. The binding of the molecule to Hsc70/Hsp70 is regulated to allow cargo proteins to accumulate into the nucleus against chemical concentration gradient. Importantly, this molecule binds directly to FG-Nups and translocate through the nuclear pore complex (NPC) by itself, showing characteristic features common to all known nuclear transport receptors. In living cells, depletion of this molecule potentially inhibits heat-shock-induced nuclear migration of Hsc70/Hsp70. We thus conclude there exist novel pathways for Hsc70/Hsp70 that operate during heat-shock-induced stress response.

#### 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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  family proteins by phenyl-Sepharose (Ribbeck and Görlich, EMBO J., 21, 2664–2671, 2002) and one species of recombinant importin- $\beta$  family protein. The cytosol extract, from which proteins were to be transported by the added importin- $\beta$  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- $\alpha/\beta$ -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- $\alpha/\beta$ -dependent manner, assuring the potency of this methodology. We have optimized the conditions of this assay and applied to identify cargo molecules of transportin. We biologically confirmed that the identified molecules indeed behave as cargo molecules of transportin. Our initial aim would usefulness of our approach to allot nuclear proteins to each importin- $\beta$  family protein.

## 2. Studies of Nuclear Organization Focused on the Nuclear Periphery (Funakoshi, Clever, Mimura, Uchida, Yoshimoto, 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 that 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 Localization of Pom121 to the inner nuclear membrane is required for an early step of interphase NPC assembly

The nuclear pore complex (NPC) is a large protein assembly that mediates molecular trafficking between the cytoplasm and the nucleus. NPCs assemble twice during the cell cycle in metazoans: post-mitosis and during interphase. In this study, using siRNA in conjunction with a cell fusion-based NPC assembly assay, we demonstrated that Pom121, a vertebrate-specific integral membrane nucleoporin, is indispensable for an early step in interphase NPC assembly. Functional domain analysis of Pom121 showed that its nuclear localization signals, which bind to importin  $\beta$  via importin  $\alpha$  and likely function with RanGTP, play an essential role in targeting Pom121 to the interphase NPC. Furthermore, a region of Pom121 that interacts with the inner nuclear membrane (INM) and lamin B receptor was found to be crucial for its NPC targeting. Based on these findings and on evidence that Pom121 localizes at the INM in the absence of a complete NPC structure, we propose that the nuclear migration of Pom121 and its subsequent interaction with INM proteins are required to initiate interphase NPC assembly. Our data also suggest, for the first time, the importance of the INM as a seeding site for “pre-pores” during interphase NPC assembly.

### 3. Dissection of Mitotic Events and DNA Replication for a Better Understanding of the Interphase Nucleus (Takagi, Mizuno, Nishiyama, Imamoto)

3-a Exploration of Secrets of Mitosis through Dissection of Ki-67.

Ki-67 is a nuclear and nucleolar protein, whose expression is tightly associated with cell proliferation. Ki-67 relocates to the periphery of chromosomes early in prophase of mitosis, when chromosomes are beginning to condense, and has accumulated on the perichromosomal layer by metaphase and remains associated there until telophase (Fig. 1). Depletion of Ki-67 from tissue culture cells caused abnormal behavior of mitotic chromosomes (Fig. 2), indicating that Ki-67 has functions in the progression of mitosis. In our laboratory, we have been trying to reveal the molecular mechanism on which Ki-67 functions and its relevance for mitosis.

We originally cloned a Ki-67 equivalent protein, termed chmadrin, from rat-kangaroo cells, and thereafter a Ki-67 homolog also from *Xenopus*. Through the primary sequence analysis, Ki-67 equivalents are found only from vertebrate species; meanwhile existence of its functional equivalents in invertebrate species is still probable. Taking advantage of rather low similarities among Ki67 homolog from different species, we efficiently identified potential functional motifs within the conserved regions (Fig. 3). In order to obtain clues for understanding the actual roles of Ki-67, we subsequently identified proteins that interact physically with these regions. The motif found in the C-terminal region of Ki-67, termed LR for its several pairs of leucine and arginine residues, binds to all three members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family, and induces premature chromosome condensation when overexpressed, indicating clearly that Ki-67 is linked to chromatin structure. In the N-terminal region of Ki-67, there exists a forkhead-associated (FHA) domain, a known phosphopeptide recognition domain. The FHA domain of human Ki-67 interacts specifically with kinesin-like motor protein Hklp2 during mitosis in a manner dependent on phosphorylation of Hklp2. Since Hklp2 is mainly localized on mitotic spindles, Ki-67 is likely to regulate spindle dynamics as well as chromatin structure. In addition, we recently noticed that other conserved region of Ki-67 interacts specifically with certain protein phosphatases during mitosis. Taken these observations together, it became highly probable that Ki-67 is involved in the progression of mitosis in the layer underappreciated so far. We believe that digging the layer will shed new light for the better understanding of mitosis.

We have revealed that Ki-67 actually regulates spindle dynamics via modulating the steady state distribution of Hklp2 on spindles and chromosomes (Vanneste et al., 2009). We are currently focusing our efforts on analyzing the possible contribution of Ki-67 to the establishment and/or maintenance of higher order structure of mitotic chromosomes.

### 3-b Molecular biological analysis of DNA polymerase

The highly conserved DNA polymerase  $\alpha$ -primase complex is the only eukaryotic DNA polymerase that can initiate DNA synthesis de novo. Thus, its recruitment is a crucial step in the tightly regulated stepwise assembly of functional replication machineries in eukaryotic cells.

Using GFP-tagged plasmid constructs, we over-expressed p180<sup>tsFT20</sup> in NIH3T3 or COS-1 cells and showed that the mutant, in contrast to its wild-type counterpart, accumulates in the cytoplasm at non-permissive temperature. These alterations in the phenotype are due to a defect in nuclear entry as well as degradation of nuclear localized p180<sup>tsFT20</sup> protein and occur in a rapid, temperature-dependent and convertible way. Presumably, the single point mutation results in conformational changes and in an altered hydrophobic character of the protein surface which finally leads to an inability to bind import factors and leads, in turn, to the recognition by the proteasome-dependent degradation machinery. Our findings thus not only offer a key step in the understanding of the cellular properties of the original tsFT20 cell line, but also present a mammalian cell system in which the subcellular turn-over, the nuclear transport and the quality control of aberrant DNA polymerase  $\alpha$  can be studied. (*J. Biol. Chem.* 2009, **284**, 30604-30614, C.S, Eichinger, T. Mizuno *et al.*)

### 3-c Molecular biological analysis of mouse licensing factor Cdt1

In eukaryotes, DNA replication is fired once in a single cell cycle before cell division starts to maintain stability of the genome. This event is tightly controlled by a series of proteins. Cdt1 is one of the licensing factors and is involved in recruiting Mcm2-7 proteins into the pre-replicative complex together with Cdc6. In Cdt1, the C-terminal region serves as a binding site for Mcm2-7 proteins, although the details of these interactions remain largely unknown. We identified the structure of the region and the key residues for binding to Mcm proteins. We determined the solution structure of the C-terminal fragment, residues 450-557, of mouse Cdt1 by NMR. The structure consists of a winged-helix domain and shows unexpected similarity to those of the C-terminal domain of Cdc6 and the central fragment of Cdt1, thereby implying functional and evolutionary relationships. Structure-based mutagenesis and an in vitro binding assay enabled us to pinpoint the region that interacts with Mcm proteins. Moreover, by performing in vitro binding and budding yeast viability experiments, we showed that approximately 45 residues located in the N-terminal direction of the structural region are equally crucial for recognizing Mcm proteins. Our data suggests the possibility that winged-helix domain plays a role as a common module to interact with replicative helicase in the DNA replication licensing process. (*J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 15931-15940. J-G.JEE. T. Mizuno *et al.*)

### ***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  
三村 恭弘 Yasuhiro Mimura  
船越 智子 Tomoko Funakoshi  
渡邊 愛 Ai Watanabe

### ***Students***

小林 健太郎 ~~Tomomi~~  
~~Yokoyama~~ Kentaro Kobayashi  
Michaela Clever  
西山 裕子 Yuko Nishiyama

### ***Assistant and Part-timer***

内田 理絵 Rie Uchida  
小田 由美 Yuumi Oda  
芳本 昌子 Masako Yoshimoto  
高野 雅栄 Masae Takano

### ***Visiting Members***

前島 一博 Kazuhiro Maeshima