

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、インポーション、エクスポート、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・発生のように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

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 (小瀬、渡邊、今本)

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～8,000 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 β 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 Ran 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おらず、また、hsp70s がストレス時に核に集積する生理的意義も明らかにされていなかった。

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。この輸送反応は Ran に依存しない。同定した新規運搬体分子を以下の解析から、Hikeshi(火消)と命名した。

Hsp70s は、その ATPase サイクルが Hsp40 や Hsp110 などのコシャペロンにより制御され、タンパ

ク質フォールディングなど様々な機能を持つ。Hikeshi は、ATP 型 Hsp70s と効率よく結合する活性を持つ。また、幾つかの核膜孔構成タンパク質 FG-Nup と直接結合し、核膜孔を通過する活性を持つ。これらの性質から、Hikeshi は、熱ショック時に ATP 型 Hsp70s を核に運ぶ新しい運搬体分子であることを明らかにした。siRNA により Hikeshi 発現量を低下させた細胞では、熱ショック時においても Hsp70s の核内移行は促進されず、熱ショック後の細胞生存率が顕著に低下した。さらに、正常温度に戻しても、Hsp70 mRNA 発現上昇、HSF1 の核内ストレス顆粒形成や核小体タンパク質の局在変化などのストレス応答状態が長く持続されていることが観察された。また、SV40 ラージ T 抗原の核局在化シグナル結合した Hsc70 を発現させておいた細胞では、siRNA-Hikeshi 処理後に熱ストレスを与えても、細胞生存率は 50%程度上昇した。これらの結果から、熱ストレスからの細胞保護や回復に、Hikeshi 依存的輸送経路が重要な役割を果たしていること、また、ストレス時に Hsp70s が核の中で機能することが細胞をストレス障害から守るために重要であることをはじめて明らかにすることができた。

Hikeshi は進化的に保存されているため、分裂酵母（小田、木村）と線虫（本橋）などのモデル生物で解析する準備を進めている。また、この輸送経路が活性化される機構を解析する一つ的手段として Hikeshi 輸送経路の可視化（亀高）の準備をはじめている。

1-b Importin β ファミリー輸送因子による核-細胞質間蛋白質輸送の分担機構（木村、小瀬、森中、今本：奥村、高尾；大阪大学蛋白質研究所：崎山、今井、富井、Horton；産業総合研究所 CBRC）

細胞の活動には蛋白質の核-細胞質間の移動が不可欠である。核と細胞質は核膜で隔てられており、蛋白質は核膜にある核膜孔を通過する。蛋白質の多くは単独では核膜孔を通過できず、importin β ファミリー輸送因子により核膜の両方向へ輸送される。ヒトでは 21 種類の importin β ファミリー輸送因子が数千種の蛋白質の輸送を分担している。（ファミリーのうち importin β だけは 7 種類の importin α の一つをアダプターとして蛋白質と結合できる。）これらの輸送因子はそれぞれ輸送の特性が異なり、核内の諸反応に関わる特定の蛋白質グループを適時に供給・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。輸送システムの全体像を理解し細胞の生理状態の変化や維持への関与を解明するためには、各輸送因子と輸送される基質蛋白質の対応関係を知る必要があるが、未だその情報は少ない。我々は、培養細胞の安定同位体標識(SILAC)、試験管内輸送系、比較定量質量分析を組み合わせた輸送因子-輸送基質の対応関係の網羅的な決定方法の開発を進めてきた。試験管内輸送系は、核膜構造を維持したまま細胞膜に透過性をもたせたセミインタクト細胞、importin β ファミリーを除去した細胞質抽出液、1 種類の組換え importin β 蛋白質（必要に応じ importin α も）で構成される。安定同位体標識細胞でセミインタクト細胞を調整し、その核内へ非標識の核抽出液中の蛋白質を輸送した後、核内蛋白質を抽出、質量分析法(LC-MS/MS)により蛋白質同定と同時に同一蛋白質の非標識/標識分子の量比を定量する。予備実験による条件設定の後、実際に代表的輸送因子である importin β (importin α を伴う)と transportin の基質同定実験を行い、質量分析において非標識/標識分子の比が高い蛋白質を選択した。これらには、既に報告のある基質蛋白質と新規基質の候補である蛋白質が含まれる。輸送反応後のセミインタクト細胞抽出液中に同定された蛋白質の組換え蛋白質を調整し、importin β /importin α 、transportin との結合を解析した結果、非標識/標識の比が高く基質候補として選択された蛋白質は結合したが、それ以外のものは結合しなかった。したがって、選択された蛋白質は実際に基質であることが証明され、同定方法の有効性も確認されたと言える。同定された transportin の基質の多くは RNA と相互作用する蛋白質であった。これにより、一つの輸送因子の基質群は特定の性質を共有するという予想が支持される。また、同定された transportin の基質中には、従来知られる transportin 結合配列(M9-like PY-NLS)を持たない蛋白質が含まれる。これらの配列解析により、従来ただ 1 例のみが報告されていた Lys/Arg に富む輸送因子結合領域の類似配列が、より多くの基質上で transportin と importin β 両方の結合部位として働くことを予想し、組換え蛋白質の結合実験により、これを証明した。

2. 細胞核の機能的構造構築の理解

2-a 間期核における核膜孔複合体形成の解析（三村、船越、今本：小迫；徳島大学 疾患酵素学研究センター）

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。

私たちの研究室ではこれまでに、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”過程を可視化して解析する実験系を樹立し、それを用いた解析を通して2つの新知見を提唱してきた。一つは、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、もう一つは、膜貫通型核膜孔複合体構成因子Pom121が合成の場である小胞体膜から核膜孔を通過して核内へ輸送されて核内膜にターゲットから核膜孔を通過して核内へ輸送されてことが間期核膜孔複合体形成の第1ステップになることである。

本年度は、間期の核膜孔複合体の形成機序に対するCDKの役割を明らかにするため、CDKリン酸化基質の探索をはじめた。ヘテロカリンを利用した間期核膜孔複合体形成可視化系を利用して解析した結果、CDK阻害剤Roscovitinを作用させると、これまで知られていたNup107の他に、Nup93が新生核膜孔複合体に組み込まれないことがわかった。Nup93は、Nup107とともに核膜孔複合体の基礎構築に重要であることが知られている。そこで、リン酸化タンパク質を捉えることができるPhos-tag法を利用し、Nup107、Nup93、Pom121といった核膜孔複合体の基礎構築となるなどの因子が、間期で、CDKによってリン酸化を受けるかを調べた。その結果、Pom121のみが間期にリン酸化修飾を受けることがわかった。Pom121分子内のリン酸化修飾サイトを調べていくと、Pom121分子内の、核内膜への局在化に重要な核膜 (NE) -targeting domainと、核内への輸送に重要な核局在化シグナル(NLS)clusterに集中していることが質量分析の結果明らかになった。興味深いことに、この両方のdomainはいずれも、Pom121が核膜孔複合体形成を誘引するために必要なPom121の分子内領域である。同定したリン酸化が、核膜孔複合体形成を司令するCDKのターゲットであるかを今後調べていく予定である。また、間期の核膜孔形成が、核膜上の特定の”足場”を必要とする反応である可能性についても解析をしていく。

2-b 分裂期セミインタクト細胞を用いた核膜形成の解析 (船越、今本)

核膜は遺伝情報を司る染色体を取り囲んで核機能の場を形成する膜構造体である。最近では転写制御、核内テリトリー構築など、核機能そのものに寄与することが示されている。核膜は細胞周期を通して変化し、特に動物細胞の分裂期では崩壊と再形成といったダイナミックな挙動を示す。核膜再形成の場である姉妹染色体への核膜タンパク質や核膜孔タンパク質の局在化と集積は、核膜再形成の初期ステップである。HeLa 細胞後期では染色体の中央領域と周辺領域で異なるタンパク質群の集積が観察できる。前者へはEmerinが、後者へは核膜孔、ラミンBやラミンB受容体(lamin B receptor, LBR)が集積する。核膜タンパク質群の排他的な局在は間期核膜平面上でも観察され、核膜孔の密度の異なる”pore-free”と”pore-rich”の2領域が存在し、前者へはラミンAやEmerinが後者へはラミンBとLBRが局在する。pore-free領域は細胞周期の進行の他、がんや細胞分化で変化するため、細胞核の生理的状況を反映しているのではないかと予想されるが、分子レベルでの核膜サブドメイン形成過程のメカニズムは明らかではない。

分裂期核膜形成機序や核膜サブドメイン形成過程を解析するため、LBRやEmerinなどの核膜タンパク質の挙動を指標とした*in vitro*核膜再構成系を樹立した。この系を利用して、LBRの染色体局在にはATP/GTPと細胞質画分が必要である一方、Emerinの場合には分裂期細胞質を必要とし、それぞれ染色体上の異なる領域へ集積することを示してきた。核膜タンパク質によって染色体局在化に必要な細胞質因子が異なることが予想される。また、LBRの分裂期後期染色体周辺領域への集積は、ATPとGTPの加水分解が必要であるが細胞質因子に依存しないこと、セミインタクト細胞中の脱リン酸化活性が必要であることがわかった。この結果は分裂期の進行状況によって、細胞質因子依存性が異なることを示している。本解析系によって核膜再形成制御機構について、これまでにはなかった培養細胞内の染色体を利用した生化学的解析を進めることが可能となった。

2-c 核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 による核膜サブドメイン形成制御 (Clever、船越、三村、高木、今本)

"open mitosis"を呈する細胞では、核膜と核膜孔複合体は、細胞分裂期に崩壊して分裂終期に再形成する。また、初期G1期から次の細胞分裂期に至る間期の間に核膜の面積はおおよそ2倍に成長するとともに核膜孔複合体の数が倍化する。このように、核膜と核膜孔複合体の崩壊と形成は同時に進行し、また、間期に核

膜が成長するのに伴って核膜孔複合体が形成される。これらの事実から、核膜と核膜孔複合体の間に、その成長や形成を調和させる仕組みが細胞に備わっていると考えられるがその分子機序は不明であった。

私たちは核膜形成と核膜孔複合体形成を調和させる分子機構を明らかにするため、核膜形成過程をライブイメージングする実験系を樹立し、様々な核膜孔複合体構成因子をターゲットとするRNAi法を併用することで、核膜形成を乱す因子のスクリーニングを行った。その結果、核膜孔複合体構成因子ELYS/Mel28のノックダウンにより、sterol reductase活性を有する膜貫通型の核内膜タンパク質LBR (Lamin B receptor) が分裂終期の核膜再形成時に分裂期染色体上にリクルートされて核膜に組み込まれないこと、また、核内膜タンパク質エマリンの核膜形成時の挙動が乱されることがわかった。LBRはB-typeラミンと結合し、エマリンはA-typeラミンと結合することが知られており、それぞれの因子は細胞周期の初期G1期からS期にかけて異なる核膜サブドメイン (“pore-free”と“pore-rich”) に局在する因子である。その核膜サブドメインは、細胞分裂終期の核膜形成時に、“non-core”, “core”と呼ばれる分裂期染色体上の異なる部位に異なる核内膜タンパク質がターゲットして形成される。LBRとエマリンのそれぞれは、分裂期染色体の“non-core”と“core”にターゲットする。一方、ELYS/Mel28は、AT-hookをもつDNA結合タンパク質として同定され、初期には転写因子ではないかと予想されていた。その後の機能解析で、ELYS/Mel28は細胞分裂終期に分裂期染色体上で核膜孔複合体が形成される際に、分裂期染色体に結合して巨大な核膜孔複合体を形成するための土台をつくる機能があると考えられてきた因子である。

ELYS/Mel28を除去したときのLBRやエマリンに対する作用はELYS/Mel28に特異的であり、ELYS/Mel28を除去することによって核膜孔複合体が形成されないためではないことが確認された。生化学的な解析から、ELYS/Mel28はリン酸化に依存してLBRと結合することがわかった。そのため、ELYS/Mel28のLBRに対する作用は、ELYS/Mel28とLBRの分子間相互作用に基づくものであることが示された。このことから、核膜孔複合体形成に対する作用も含め、ELYS/Mel28の分裂期染色体の“non-core”領域における核膜形成は1対1の分子間相互作用に基づくものであると考えられる。一方、ELYS/Mel28を除去することで影響を受ける“core”領域の核内膜因子は、エマリンだけでなく、Lap2a, barrier-to-autointegration factor (BAF)、A-typeラミンなどの複数因子に及ぶことが判明した。その分子基盤を探るために解析を続けると、ELYS/Mel28を除去すると、細胞分裂期のAurora Bキナーゼの活性低下やchromosome passenger complex (CPC) 構成因子の局在が乱されることが示唆された。このことから、ELYS/Mel28は細胞分裂期進行に必要なシグナリングカスケードに作用し、その作用を通して分裂期染色体の“core”領域に集積してくる核内膜因子群の挙動を制御すると推察される。

これら解析により ELYS/Mel28 には、これまでに知られていなかった多角的な機能があること、また、核膜孔複合体形成と核膜形成を調和させる分子機構が細胞に備わっていること、の2点を明らかにした。本研究で影響が見られた核内膜因子のそれぞれは、様々な遺伝子疾患の原因因子 (例 LBR: Pelger-Huët anomaly, emerin: Emery-Dreifuss muscular dystrophy, A-type lamin: Hutchinson-Gilford progeria) としても知られており、その観点からもこれら因子の機能/挙動制御には興味を持たれる。

3. ゲノムの分配と複製の解析

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 (高木、西山、田口、今本)
増殖細胞は分裂の際に、ゲノムが高次に折り畳まれた「分裂期染色体」と呼ばれる構造を構築する。分裂期染色体を適切に構築することは、ゲノムを正しく継承するために重要である。分裂期染色体を構築するためにコンデンシン複合体が主要な役割を果たすことがこれまでに示されてきた。私たちは染色体構造の内部に局在するコンデンシン複合体とは別に、染色体の表層領域に局在するKi67抗原もまた分裂期染色体構築に関与することを示した。Ki67抗原が機能発現する分子機構を解析することで、分裂期染色体構築過程の未知局面が理解されると期待される。今年度は特に、Ki67抗原とコンデンシン複合体との空間的・機能的な関係性について理解を得た。またKi67抗原と脱リン酸化酵素PP1との相互作用について詳細を解析し、これを伸展することで分裂期染色体構築の微調整について理解が得られるであろうとの視座を得た。また分裂期染色体の形態変化を定量的に評価する新手法の開発に着手した (VCAD横田秀夫チームとの共同研究)。また以上の研究とは別に、Song独立主幹研究グループとの共同研究で、X線回折顕微鏡法 (coherent X-ray diffraction microscopy : CXDM) を利用して、間期細胞核の構造情報を引き出す試みをおこなっている。

3-b DNA ポリメラーゼ α の品質管理を新たに提唱 (水野、檜垣、渋谷、今本)

哺乳類細胞核内の染色体複製の分子機構の解明を目指し、マウス DNA ポリメラーゼ α の温度感受性変異体 tsFT20 を利用し、ポリメラーゼ α の細胞内動態を解析した。温度感受性変異株由来のポリメラーゼ α をモデルとして、一過性過剰発現させたポリメラーゼの制限温度下(39.5°C)での分解を阻害する薬剤を探索した。その結果 HSP90 の阻害剤 novobiocin が核内のポリメラーゼ α の分解を阻害することを見いだした。さらに異なる作用機序の HSP90 の阻害剤である geldanamycin や coumermycin, HSP70 の阻害剤 PES 等でも制限温度下での p180tsFT20 の核内の分解が阻害された。この結果は HSP90 の siRNA によるノックダウン実験により確認された。一方、研究室ではストレスに応じて核内に分子シャペロンが蓄積する事を見出し、その知見も合わせて核内の品質管理機構は分子シャペロンに依存したタンパク質分解系により担われていることが推測された。

分子シャペロンは細胞質においてはタンパク質の変性を防ぎ、むしろ分解に拮抗する役割を担うと考えられており、核の中においては事なる役割を担うのではないかという想定外の結果が得られた。この結果がポリメラーゼ α に特異的な現象かどうかは今後の大きな課題と考えられた。核内においてシャペロンに依存して分解される第2の例を見出す事が一般化に重要と考えられた。現在、いくつかの有力な候補因子を見出し、HSP90 に依存した核内の分解系が関与しているかどうかを解析中である。この結果を合わせて、分子基盤を伴った核内品質管理機構を提唱したい。

一方マウス RPA と YFP との融合タンパク質を精製し、YFP の蛍光を利用してスライドガラス上に固定化させた一本鎖 DNA を可視化した。複製工場の1分子観察の基礎技術として発表した。

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

1-a Regulation of nucleocytoplasmic transport under cellular stress: Identification of novel import pathway for Hsp70s during heat-shock stress and its functions (Kose, Watanabe, Imamoto)

During heat-shock stress, the importin β family-mediated nucleocytoplasmic trafficking is downregulated, whereas nuclear import of the molecular chaperone Hsp70s is upregulated. Here, we identified a nuclear import pathway that operates during heat-shock stress, mediated by an evolutionarily conserved protein named “Hikeshi”, which does not belong to the importin- β family. Hikeshi binds to FG-Nups and translocates through nuclear pores on its own, showing characteristic features of nuclear transport carriers. In reconstituted transport, Hikeshi supports the nuclear import of the ATP-form Hsp70s, but not the ADP- form, indicating the importance of the Hsp70s ATPase cycle in the import cycle. In living cells, depletion of Hikeshi inhibits heat-shock-induced nuclear import of Hsp70s, reduces cell viability after heat-shock stress, and significantly delays the attenuation and reversion of multiple heat-shock-induced nuclear phenotypes. Nuclear Hsp70s rescues the effect of Hikeshi-depletion at least in part. Thus, Hsp70s counteract to the heat-shock stress damages by acting inside the nucleus.

1-b Identification of cargo proteins specific to members of the importin- β family (Kimura, Kose, Okumura, Furuta, Sakiyama, Imai, Tomii, Horton, Imamoto)

Nucleocytoplasmic transport of proteins is essential for cellular processes. The human importin- β family consists of 21 nucleocytoplasmic transport carrier proteins, and they are responsible for the transport of thousands of proteins across the nuclear envelope through nuclear pores. However, the cargo allocation of each carrier, which is necessary to understand the physiological context of transport, has not been studied well yet. To address this issue, we developed a method to identify the cargoes of carriers by applying stable isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC), the in vitro transport system and quantitative mass spectrometry. In the first step of our method, cells are labeled by stable isotope and the cell membranes are permeabilized. Then, nuclear proteins prepared from unlabeled cells are transported into the nuclei of the permeabilized cells by a particular importin- β family carrier of interest. Finally, proteins in the nuclei are extracted and quantitatively identified by mass spectrometry. We used this method to identify cargo proteins of the importin- β (accompanied by importin- α as an adapter to bind to the cargo proteins) and the transportin. As expected, the identified candidate cargo proteins included previously reported specific cargoes and also new potential cargoes, which we corroborated by in vitro binding assays using the recombinant proteins. Interestingly, the identified transportin cargoes are predominately RNA-interacting proteins, suggesting that cargoes allotted to the same carrier may share some characteristics. In addition, we found that the transportin cargoes possess at least two classes of signal sequences, i.e., the well characterized M9-like PY-NLS specific for transportin and Lys/Arg-rich segments capable of binding to both transportin and importin- β . Thus, our method will be useful to link a carrier to features shared among its cargoes and to the specific nuclear localization signals.

2. Studies of Nuclear Organization Focused on the Nuclear Periphery

2-a Analysis of interphase nuclear pore complex formation. (Mimura, Funakoshi, Kosako, Imamoto)

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. We developed interphase NPC assembly assay, based on cell-fusion assay and photobleaching. Using this assay, we demonstrated that 1) cyclin-dependent kinases (Cdks), especially Cdk1 and Cdk2, conduct interphase NPC formation, and 2) 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 β via importin α 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) is crucial for its NPC targeting. In order to determine early recruiting nucleoporin for interphase NPC assembly, and which nucleoporins require Cdk activity to become incorporated into newly assembled interphase NPC, we first established cell lines stably expressing fluorescently tagged different nucleoporins, and then analyzed using cell-fusion based analysis in the presence or absence of roscovitine. We found Nup107 and Nup93 are roscovitine sensitive. We are currently examining which nucleoporins, including Nup107 and Nup93, are phosphorylated by Cdk during interphase.

2-b Mechanism of post-mitotic nuclear envelope assembly in a new *in vitro* reconstitution system (Funakoshi, Imamoto)

The nuclear envelope (NE) is a dynamic membrane structure in eukaryotes through cell cycle, particularly in eukaryotic cells that display open mitosis, as disassembling and reassembling take place at prophase and telophase of each cell division. Reassembly of the NE is crucial to organize a functional nucleus and to ensure proper progression of cell cycle. Through observation of nuclear pore complex (NPC) on the NE, we found NE subdomains, pore-rich and pore-free region: the former enriched with A-type lamin and emerin, and the other enriched B-type lamin and lamin B receptor (LBR). These subdomains observed at anaphase and early telophase, just when NE reassembly occurs. However, molecular basis of NE and NE subdomain assembly process is still not clear.

In order to analyze molecular mechanism of NE formation, we reconstituted a cell-free system using semi-intact mitotic human cells expressing NE proteins and visualize NE subdomain formation. Using this system, we found that early step of NE and NPC reassembly is ATP/GTP and cytosol factor(s)-dependent process, and that the cytosol-dependency changes depending on mitotic stage of chromosome. It is also shown that the cytosol-independent NE membrane accumulation to anaphase is positively regulated by phosphatase activity retained in the semi-intact cell. This *in vitro* analysis system allows us to elucidate mitotic stage specific regulatory factor(s) for NE formation.

2-c The Nucleoporin ELYS/Mel28 regulates nuclear envelope subdomain formation in HeLa cells (Clever, Funakoshi, Mimura, Takagi, Imamoto)

In open mitosis, the nuclear envelope (NE) reassembles at the end of each mitosis. This process involves the reformation of the nuclear pore complex (NPC), the inner and outer nuclear membranes, and the nuclear lamina. In human cells, cell cycle-dependent NE subdomains exist, characterized as A-type lamin-rich/NPC-free or B-type lamin-rich/NPC-rich, which are initially formed as core or noncore regions on mitotic chromosomes, respectively. Although postmitotic NE formation has been extensively studied, little is known about the coordination of NPC and NE assembly. Here, we report that the nucleoporin ELYS/Mel28, which is crucial for postmitotic NPC formation, is essential for recruiting the lamin B receptor (LBR) to the chromosomal noncore region. Furthermore, ELYS/Mel28 is responsible for focusing of A-type lamin-binding proteins like emerin, Lap2 α and the barrier-to-autointegration factor (BAF) at the chromosomal core region. ELYS/Mel28 biochemically interacts with the LBR in a phosphorylation-dependent manner. Recruitment of the LBR depends on the nucleoporin Nup107 which interacts with ELYS/Mel28, but not on nucleoporin Pom121, suggesting that the specific molecular interactions with ELYS/Mel28 are involved in the NE assembly at the noncore region. The depletion of the LBR affected neither the behavior of emerin nor Lap2 α indicating that the recruitment of the LBR to mitotic chromosomes is not involved in formation of the core region. The depletion of ELYS/Mel28 also accelerates the entry into cytokinesis after recruitment of emerin to chromosomes. Our data show, that ELYS/Mel28 plays a role in NE subdomain formation in late mitosis.

3. Dissection of Mitotic Events and DNA Replication for a Better Understanding of the Interphase Nucleus

3-a Exploration of Secrets of Mitosis through Dissection of Ki-67 (Takagi, Nishiyama, Taguchi, Imamoto)

Proliferating cells fold up their genome into the structure called "mitotic chromosomes" during mitosis, the process essential for faithful transmission of genomic information. Besides the established roles of condensin complexes in the process, we showed that Ki67 antigen also plays a unique role in the same process. In analyzing the molecular mechanisms where Ki67 functions, new aspects of the process will be revealed. This year, we focused our effort mainly on dissecting the functional and spatial relationships among Ki67 antigen and condensin complexes. We also studied the nature of molecular interaction between Ki67 antigen and PP1 phosphatase, leading to believe that novel insights on the fine-tuning of mitotic chromosome condensation will be obtained as an extension of this study. Moreover, we started developing the new method for evaluating the morphology of mitotic

chromosomes quantitatively, as a joint research with the Yokota Bio-research Infrastructure Construction Team.

Besides the studies above, we are trying to examine internal structure of interphase cell nuclei by using X-ray diffraction microscopy (CXDM), as a joint research with the Song Initiative Research Unit.

3-b Molecular biological analysis of DNA polymerase α (Mizuno, Higaki, Shibuya, Imamoto)

DNA polymerase α (Pol- α) is essential in the onset of eukaryotic DNA replication. Due to a single point mutation in the Pol- α subunit p180, the temperature-sensitive (ts) cell cycle mouse cell line tsFT20 reveals heat-labile DNA polymerase activity at non-permissive temperature. We show that the EGFP-tagged tsFT20 mutant protein (p180tsFT20) is localized in the cytoplasm at non-permissive temperature while its wild-type counterpart enters the nucleus. Time-lapse fluorescence microscopy and the use of different chemicals revealed that the changes in protein localization after shifting to a non-permissive temperature are due to two processes: a rapid de novo synthesis of p180tsFT20 in the cytoplasm and a protease-dependent degradation of nuclear localized protein, suggesting that a general conformational change in p180tsFT20 being responsible for its inability to enter the nucleus rather than a disassembly of the Pol- α complex or simple protein aggregation. To further analyze the mechanism of nuclear degradation of aberrant Pol- α , we have searched chemicals which inhibit degradation of nuclear aberrant p180. We found that novobiocin, an HSP90 inhibitor, inhibits degradation of p180tsFT20 at non-permissive temperature in nucleus. Moreover, we found that other HSP90 inhibitors (geldanamycin and coumermycin) have weak but similar effect on nuclear degradation of aberrant proteins. Finally, knock down of HSP90 by siRNA exhibit inhibition of nuclear degradation of p180tsFT20. Taken together, we have a working hypothesis that nuclear protein quality control mechanism involves nuclear HSP90.

Besides the study above, we successfully visualized ssDNA directly in collaboration with Dr. Katsura's group, Gunma university) as follows: we prepared a fusion protein consisting of the 70 kDa DNA-binding domain of mouse replication protein A and YFP (RPA-YFP). Finally, dsDNA was stained by SYTOX Orange and ssDNA by RPA-YFP, and we succeeded in staining ssDNA and dsDNA by using RPA-YFP and SYTOX Orange simultaneously.

)

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
本橋 詳子 Shoko Motohashi
亀高 愛 Ai Kametaka
田口 温子 Atsuko Taguchi

Students

小林 健太郎 Kentaro Kobayashi
Michaela Clever
西山 裕子 Yuko Nishiyama
小田 由美 Yumi Oda
渋谷 麻美 Asami Shibuya

Assistant and Part-timer

森中 祐理子 Yuriko Morinaka
檜垣 美和 Miwa Higaki
高野 雅栄 Masae Takano

Visiting Members

前島 一博 Kazuhiro Maeshima