

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. 核膜孔複合体・核膜の構造構築
3. 細胞核の機能的構造構築

キーワード：

核—細胞質間輸送、インポーター、エクスポーター、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、核の品質管理

### 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・核膜孔複合体のダイナミクス解析
- 3) 細胞核の機能的構造構築

### 1. 核—細胞質間輸送システムの解析

1-a 熱ストレスで駆動する Hikeshi 輸送経路の解析 (小瀬、儘田、渡邊、亀高、本橋、木村、小田、小林、原田、宮原、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  $\beta$  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 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

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を付加した Hsc70(NLS-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、マウス(儘田)、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の手段として Hikeshi 輸送経路の可視化(亀高)の準備をはじめている。また、Hikeshi の相互作用タンパク質の探索や翻訳後修飾など、様々な観点からも新しく見つけた Hikeshi 輸送経路の解析をはじめている。

1-b Importin  $\beta$  ファミリー運搬体群による核-細胞質間蛋白質輸送の解析(木村、小瀬、森中、今本:奥村、高尾;大阪大学:崎山、今井、富井、Horton:産業総合研究所)

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  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  だけは 7 種類の importin  $\alpha$  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  $\beta$  ファミリーを除去した細胞質抽出液、1 種類の組換え importin  $\beta$  蛋白質(必要に応じ importin  $\alpha$  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製し、その核内へ非標識の核抽出液中の蛋白質を輸送した後、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。この比が高い蛋白質が基質の候補となる。実際に本方法により代表的輸送因子である importin  $\beta$ (importin  $\alpha$  を伴う)と transportin の基質候補蛋白質を選択した。その中には、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た。組換え蛋白質を用いて、importin  $\beta$ /importin  $\alpha$ 、transportin との結合を bead halo assay により解析した結果、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、比の低いものは結合しなかった。これにより、同定方法の有効性が確認されたと言える。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。これらの配列解析から、従来例外的に知られていた Lys/Arg に富む輸送因子結合領域(BIB domain)の類似配列が、より多くの基質上で transportin と importin  $\beta$  両方の結合部位として働くことを予想し、bead halo assay によりこれを証明した。各輸送因子はそれぞれ基質上の特異的構造を認識すると考えられるが、現在でも認識する基質構造が知られた輸送因子は少数である。本方法はその同定にも有効であると言える。昨年度までの解析では同定された基質蛋白質の数に不満があったが、今年度は、使用する質量分析装置の機種変更により基質同定数が格段に増加することを実際に確認し、これにより、当初の目標とした網羅的な基質の決定が現実味を帯びて来たと言える。

## 2. 核膜、核膜孔複合体のダイナミクス解析

2-a 間期核における核膜孔複合体形成の解析（三村、今本：横田；VCAD チーム、小迫；徳島大学）

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。

昨年度、私たちは、このPom121のN末端領域が、CDK活性依存的に多数のサイトがリン酸化されていることを報告した。この領域は、Pom121自身の核内膜への局在化に必須である核膜（NE）-targeting domainと、核内への輸送に重要な核局在化シグナル（NLS）clusterを含んでおり、さらにNPC構築に重要な2つの Scaffold subcomplex（Nup107-160とNup93-205複合体）の構成因子との親和性を有している。これらの事実から、私たちはCDK活性による間期NPC形成制御において、このPom121のN末端領域のリン酸化が生理学的に重要であると予想し、現在このリン酸化の意義について解析を行なっている。

本年度は、まず、Pom121のN末端領域のリン酸化サイトの網羅的探索を行なった。リコンビナントのCDK1-CyclinBとPom121断片を用いた*in vitro*リン酸化系を利用し、質量分析によってリン酸化サイトの同定を行なったところ、非常に多数のリン酸化サイトを同定することが出来た。興味深いことに、昨年度得られた*in vivo*実験でのリン酸化サイトと、本年度得られた*in vitro*実験でのリン酸化サイトの間のサイトの重複はほとんど認められなかった。次に、*in vivo*と*in vitro*実験から得られたリン酸化サイトと、CDKの標的となるコンセンサス配列がセリン/スレオニン-プロリンであることを踏まえ、Pom121のNE-targeting domainとNLS clusterに含まれる全てのCDKコンセンサスと、実際にリン酸化が確認されている非コンセンサス配列のセリン/スレオニンをアラニンに変異させた非リン酸化変異体の作成を行なった。現在、この変異体の機能解析を行なっている。

さらに、本年度は間期における核膜の動態を解析するため、横田研究室の竹本智子研究員と共に新規の画像解析法の開発を行なった。間期初期の核膜は、NPCの豊富なPore-rich regionと、NPC未形成領域であるPore-free islandの2つの核膜サブドメインから形成されている（2-bの項参照）。この核膜サブドメインは、細胞周期の進行とともに均一になる。この過程には間期NPC形成が必須であることから、我々は間期における核膜動態を精密に解析することにより、間期NPC形成過程を解析出来ると考えた。これを達成するため、新規の画像解析法の開発を試みた。今回開発したこの解析方法では、画像解析ソフトであるVCADシステムを利用し、核膜表面の免疫蛍光染色画像からPore-rich regionとPore-free islandの2つの核膜サブドメインを自動で認識し、解析を行なうことが出来る。この解析法を利用して、CDK活性阻害条件下と非阻害条件下でのNPCの核膜上での動態と、NPC構成因子であるPom121とNup107の核膜上での動態の解析を行なった。これらの解析の結果、2つの核膜サブドメインはそれぞれ異なる核膜成長速度を有している可能性が示唆された。さらに、Pore-free island内には、NPCの基礎構造を担うPom121やNup107などからなるfociが存在していることが明らかとなった。また、Nup107を含むfociはCDK活性の影響をほとんど受けなかったのに対し、Pom121を含むfociはCDK活性阻害によってその数が減少していた。この結果は、間期NPC形成におけるCDK活性の作用点が、Pom121である可能性を示唆していると考えられる。

2-b 分裂期セミア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。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。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。さらに、核輸送活性を示す核膜を再構築することに成功している。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 と LBR の相互作用 (三村、船越、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に核膜の面積はおよそ2倍に成長する一方で、核膜上の核膜孔複合体の密度は一定に保たれている。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。これまでに私たちは、核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 が、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) と分裂期特異的かつリン酸化依存的に相互作用しており、ELYS/Mel28 のノックダウンによって LBR 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ないことを明らかにした。さらに、通常、間期の LBR は核膜の局在しているのに対し、ELYS/Mel28 ノックダウン細胞では、その局在が細胞質全体に拡散することも明らかにした。これらの結果から、私たちは、ELYS/Mel28-LBR の相互作用が、分裂期終期の核膜の再形成と間期での核膜の恒常性維持に重要であり、この相互作用が核膜と核膜孔複合体を調和させる要なのではないかと考え、解析を行なっている。

LBR は分裂期前期に CDK など分裂期キナーゼ群によってリン酸化されることで核膜から細胞質へ拡散し、分裂期後期に脱リン酸化されることで娘染色体上へリクルートされることから、LBR の細胞内局在は自身のリン酸化状態に大きく依存していると考えられる。本年度は、ELYS/Mel28 のノックダウンによって LBR が細胞質全体に拡散することから、LBR のリン酸化状態への影響について解析を行なった。その結果、ELYS/Mel28 のノックダウンによって LBR の高リン酸化されていることが明らかとなった。現在、LBR のリン酸化サイトの同定と、LBR の局在異常とリン酸化状態の異常との因果関係について解析を行なっている。

## 3. 細胞核の機能的構造構築

### 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、田口、今本)

Ki67 抗原が機能発現する分子機構を解析し、分裂期過程の未知局面の理解を目指した。第一に Ki67 抗原と脱リン酸化酵素 PP1 $\gamma$  との相互作用について詳細を解析し、分裂後期における PP1 $\gamma$  の染色体への急速な集積の一部が、この相互作用に依存していることを示した。続いて、この相互作用により染色体上にリクルートされた PP1 $\gamma$  の基質探索を行い、Ki67 抗原自身が基質の一つであることを示した。これには本研究において作成したリン酸化型 Ki67 抗原に対する特異的抗体を利用した。また Ki67 抗原と共沈降する因子を新たに同定し、その中から Ki67 抗原に依存して染色体表層領域に局在する酵素群を見いだした。これを受け、Ki67 抗原が作る染色体表層領域が、多くの生化学反応を時空的に制御する「反応場」である可能性を提唱した。

### 3-b 細胞核の品質管理 (水野、渋谷、今本：宮澤、鳥越、東京理科大学)

温度感受性変異株由来の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  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  $\alpha$  の分解を阻害することを見いだした。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。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集積することの生理的重要性を見いだしており、その知見も合わせて核内の品質管理機構が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も考えられる。核内の変成タンパク質除去に働く分子を明らかにする為、核内に局在するユビキチン-プロテアソーム系に含まれる因子で HSP90 と相互作用する因子を免疫沈降法で検索した。その結果プロテアソーム活性化因子 PA28gamma と C terminus of Hsc70 interacting protein (Chip) が HSP90 と相互作用し、novobiocin に依存して核小体に共局在することを見出した。

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ことも考えられる。DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  で得られた結果が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。

また、テロメア維持機構がゲノム恒常性の維持機構と密接に関わっていることが示唆されていることから、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  とテロメア結合タンパク質 Pot1 が細胞核内で相互作用していることを、東京理科大との共同研究で解析した。

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

1. Analysis of nucleocytoplasmic transport system
2. Biogenesis of nuclear pore complex and nuclear envelope
3. Functional organization of cell nucleus

**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, nuclear quality control

**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. Studies of Nuclear Organization Focused on Intra-nuclear Structures

### 1. Mechanism and Regulation of Nuclear Transport

1-a Analyses of heat-stress-induced nuclear transport mediated by Hikeshi (Kose, Mamada, Watanabe,

Kametaka, Motohashi, Kimura, Oda, Harada, Miyahara, Imamoto)

During heat-shock stress, the importin  $\beta$  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- $\beta$  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. We are further examining biochemical properties of Human Hikeshi, as well as its mouse, c-elegance and yeast homologues.

1-b Identification of cargo proteins specific for members of the importin- $\beta$  family (Kimura, Kose, Morinaka, Imamoto; Okumura, Sakiyama, Imai, Tomii, Horton)

Nucleocytoplasmic transport of proteins is essential for cellular processes. The human importin- $\beta$  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), an 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- $\beta$  family carrier of interest. Finally, proteins are extracted and quantitatively identified by mass spectrometry. We used this method to identify cargo proteins of the importin- $\beta$  (accompanied by importin- $\alpha$  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. Examining sequences of the identified transportin cargoes, we found that they 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- $\beta$ . Thus, our method will be useful to link a carrier to features shared among its cargoes and to the specific nuclear localization signals. Finally, we affirmed that the cargo candidates drastically increase in number with the use of a latest equipment of LC-MS/MS, promising a high-throughput identification of specific cargoes.

## 2. Studies of Nuclear Organization Focused on the Nuclear Periphery

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

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 demonstrated that interphase NPC assembly is required for the activity of cyclin-dependent kinases (CDKs) and Pom121, a vertebrate-specific integral membrane nucleoporin. Pom121 contains two functional domains in the N-terminus: nuclear envelope (NE)-targeting domain, which is required for inner nuclear membrane targeting, and nuclear localization signal cluster, which is required to translocate oneself to the nucleus. Furthermore, both domains in Pom121 are crucial for its NPC targeting. We analyzed whether crucial components for interphase NPC assembly were phosphorylated in a CDK-dependent manner, and found that N-terminus of Pom121 containing these domains is phosphorylated. We are currently addressing physiological importance of this phosphorylation.

With collaboration with Dr. Yokota laboratory, we developed a method for dissection of the NE dynamics using VCAD. The developed method enables us to recognize distinct NE-subdomains from immunofluorescence images automatically and provide us a vast amount of data set.

#### 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 disassembly and reassembly events 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. We previously reported that there exist cell-cycle specific NE subdomains in human cells, namely, the pore-rich and pore-free regions: the former subdomain is enriched with A-type lamin and emerin, while the latter is enriched with B-type lamin and lamin B receptor (LBR). These subdomains form after anaphase onset 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 fluorescently labeled trans-membrane NE proteins. Using this newly developed 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. We also found that the NE membrane accumulate to anaphase chromosomes in a cytosol independent manner, and that this accumulation 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 Interaction of Nucleoporin ELYS/Mel28 and INM protein LBR in HeLa cells (Mimura, Funakoshi, 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 as described above. Although postmitotic NE formation has been well studied, still little is known about the coordination of NPC and NE assembly. Our group recently reported 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, we found that ELYS/Mel28 biochemically interacts with the LBR in a phosphorylation-dependent manner in mitosis extracts but not in interphase extracts, and regulated the localization of LBR during telophase to interphase. We analyzed the phosphorylation status of LBR, because LBR localization in mitosis was reported to regulate by its phosphorylation/unphosphorylation balance. We are currently examining phosphorylation sites of LBR, and addressing role of ELYS on this phosphorylation.

### 3. Studies of Nuclear Organization Focused on Intra-nuclear Structures

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

Aiming to explore the secrets of mitosis, we analyzed the molecular mechanism on which Ki67 functions during mitosis. We first analyzed the detail of interaction between Ki67 and PP1 $\gamma$  (protein phosphatase 1 gamma) and showed that the rapid accumulation of PP1 $\gamma$  on anaphase chromosomes was partly mediated by this interaction. We next revealed that Ki67 itself is one of PP1 $\gamma$  substrates. For this analysis, we utilized newly raised antibodies specific to phosphorylated Ki67. On the other hand, we identified several enzymes that target to the perichromosomal region in a manner dependent on Ki67. We therefore advocated the new concept that the perichromosomal region consisted mainly of Ki67 might serve as a 'reaction field' regulating various chemical reactions spatiotemporally.

#### 3-b Protein quality control of cell nucleus (Mizuno, Shibuya, Imamoto; Miyasawa, Torigoe)

DNA polymerase alpha (Pol-alpha) is essential in the onset of eukaryotic DNA replication. Due to a single point mutation in the Pol-alpha 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 at 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-alpha complex or simple protein aggregation. To further analyze the mechanism of nuclear degradation of aberrant Pol-alpha, 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. To further analyze the mechanism of nuclear degradation of aberrant Pol-alpha, 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. To identify molecule participate in nuclear protein quality control, we carried out co-immunoprecipitation analysis, and found that proteasome activator PA28 gamma and Chip (C terminus of Hsc-70 interacting protein) associated with HSP90 and colocalized in the nucleolus in the presence of novobiocine. Taken together, we have a working hypothesis that nuclear protein quality control mechanism involves nuclear HSP90.

Besides above studies, we examined the interaction between DNA polymerase  $\alpha$  and Pot 1 biochemically, as well as in living cells, from aspects of genome integrity maintenance.



### ***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  
儘田 博志 Hiroshi Mamada  
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***

西山 裕子 Yuko Nishiyama  
小田 由美 Yumi Oda  
小林 健太郎 Kentaro Kobayashi  
渋谷 麻実 Asami Shibuya  
原田 昌彦 Masahiko Harada  
宮原 めぐみ Megumi Miyahara

### ***Assistant***

森中 祐理子 Yuriko Morinaka  
高野 雅栄 Masae Takano

### ***Visiting Members***

前島 一博 Kazuhiro Maeshima  
宮澤 沙絵 Sae Miyasawa