

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、Hikeshi、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、渡邊愛、原田、宮原)

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。同定した因子を 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。Hsp70s や核膜孔複合体との相互作用を原子レベルで理解するため、Hikeshi の結晶構造解析を現在おこなっている。また、様々な化合物阻害剤を使用して、タンパク質分解やリン酸化などの翻訳後修飾が Hsp70s の熱ストレス時の細胞内局在や正常状態への回復にどのような影響を与えるかを解析している。

1-a-1 Hikeshi 輸送の駆動メカニズムの解析 (小瀬、亀高)

熱ストレス時に Hikeshi による Hsp70s の核内移行が起こる。しかし、この輸送がどのような分子メカニズムで駆動するのか、その詳細はまだ明らかではない。我々は、正常時から熱ストレス時に Hikeshi 輸送システムがどのように変化するのかを時空間的に解析するために、蛍光相関分光法/蛍光相互相関分光法 (FCS/FCCS) などの分子イメージング技術を使って Hikeshi-Hsp70s 分子間相互作用の計測を開始した。細胞抽出液やリコンビナントタンパク質を用いた計測から、Hikeshi-Hsp70s 分子間相互作用に温度依存性があることを見いだした。現在、その分子間相互作用を詳細に解析するとともに、生細胞内での計測を試みている。

1-a-2 Hikeshi の機能解析：線虫の利用 (小瀬、本橋)

ヒトの培養細胞レベルの実験から、Hikeshi は熱ストレスを生き抜く上で重要であることがわかっている。しかし、細胞分化や発生など個体での Hikeshi の機能は明らかではない。Hikeshi 分子は進化的に保存されているため、老化や寿命などの解析が進んでいる線虫をモデル生物として使用し、個体における Hikeshi の機能解析を開始した。線虫 Hikeshi のクローニング、RNAi によるノックダウン解析を行った。Hikeshi をノックダウンすると熱ストレス後の線虫寿命が短くなるなど、Hikeshi の個体における機能も明らかになりつつある。

1-a-2 Hikeshi の機能解析_ノックアウトマウス利用 (儘田、小林健)

熱ストレス応答時に見られる HSP70s の核 - 細胞質間移行を担う Hikeshi は、マウスでは 17Rn6 (lethal chromosome 7 Rinchik 6) とよばれている。ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) ミュータジェネシス解析では Clara 細胞の機能低下で生じるチアノーゼにより出生前後で致死となるという報告もある。

しかしながら、報告のある Hikeshi は点変異であり、因子の包括的機能はマウス個体の中では十分に解析されていない。また、下記に述べるように、Hikeshi は酵母から高等動物細胞に至るまで生体内における輸送タンパク質としての Hikeshi の働きや、個体発生や老化における役割については今だ不明のままであり、熱ストレスという特殊な環境において働く HSP70s の核 - 細胞質間移行制御機構が発生過程においてどのように関与しているのか、その機構を明らかにすることは生体内における輸送タンパク質の役割やストレス応答の機構を明らかにするうえで非常に重要である。そこで本研究では、哺乳類における Hikeshi タンパク質の発生や老化における役割を明らかにするために、理研 CDB 動物資源開発室との共同研究により Hikeshi ノックアウトマウスを作成した。作成した Hikeshi ノックアウトマウスは、5'-非翻訳領域と第一メチオニンを含む第一エクソンを挟むようにバクテリオファージ P1 由来の loxP が挿入されており、部位特異的組換え酵素 Cre によって、loxP で挟まれた Hikeshi の第一エクソンが相同組換えによって除かれるコンディショナルノックアウトマウスであり、これにより部位特異的ノックアウトマウスの作成が可能である。

本年度は、理研 CDB で作成された Hikeshi ノックアウトマウスのキメラマウスから F1 マウスの産仔を得た後に、米国ジャクソン社から購入した EIIa-Cre マウスと交配させて、全身で Hikeshi をノックアウトさせたマウスを作成した。現在、このマウスをから Hikeshi (-) ホモマウスの産仔は得られていないが、12.5 週齢 MEF (マウス胎児線維芽細胞) は得られている。現在、得られた Hikeshi ノックアウトホモマウスの解析を進めるとともに、発生後期のどこに異常をきたすのかについて調べている。

1-a-3 Hikeshi の機能解析_分裂酵母の利用 (木村、小田)

分裂酵母には Hikeshi 相同遺伝子が保存されるが、その研究報告は皆無である。一方、出芽酵母では、

Hikeshi 相同遺伝子の変異によりイノシトールの産生が上昇することが唯一報告されており、この表現型に従い同遺伝子は *OPI10* と命名されている。このため、分裂酵母でも同遺伝子は *opi10* と脚注される。哺乳類 Hikeshi と機能を比較するため、分裂酵母(*Sp*)Hikeshi/*Opi10* の機能解析を行なった。*Sp*Hikeshi/*Opi10* 蛋白質は、酵母内で核膜上に存在し、Hsp70 相同蛋白質 Ssa2 と結合することを確認した。また、*Sp*Hikeshi/*Opi10* は、動物細胞を利用した試験管内再構成輸送系において、Ssa2 を核内に輸送した。したがって、*Sp*Hikeshi/*Opi10* は哺乳類 Hikeshi と類似した Hsp70 ファミリー蛋白質の核輸送因子としての生化学的機能をもつ。しかしながら、分裂酵母では哺乳類細胞と異なり、Ssa2 は適温下でも既に核（及び細胞質）に存在しており、熱ストレスにより核に集積されなかった。また、*opi10* 遺伝子破壊株でも Ssa2 のこの細胞内局在には変化が認められなかった。さらに、*opi10* 破壊株は野生型株と同等の高温耐性を持ち、遺伝子発現(DNA microarray)や熱ショック転写因子 Hsf1 の核移行の解析では、熱ショック応答にも差が認められなかった。ただし、*opi10* 破壊株は熱ストレス前後の遺伝子発現が野生型株とは異なり、等に適温下で特定のストレス応答遺伝子の発現が低下していた。*opi10* 破壊株は、特定のストレス応答を誘導する低グルコース条件下での増殖が遅く、遺伝子発現との関係に興味もたれる。*Sp*Hikeshi/*Opi10* は、哺乳類 Hikeshi とは異なる生理的機能を果たすと予想される。

1-b Importin β 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、森中、小瀬：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 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 20 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、核内外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、現在でもその情報は少ない。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(SILAC-Tp 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 ファミリー蛋白質(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 β (importin α 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 β /importin α 、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 β 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。SILAC-Tp 法はその同定にも有効であると言える。また、同定された importin β /importin α の基質の多くは importin α 結合配列(cNLS)を持ち、importin α を介して importin β と結合すること、及び、cNLS を持たない基質は直接 importin β と結合するものと他の基質蛋白質との複合体として importin β /importin α に結合するものに分けられることを bead halo assay により明らかにした。SILAC-Tp 法は輸送因子との結合様式によらず基質蛋白質の同定に有効であることが示された。近年著しく性能進化した質量分析装置の運用を意図し、新式(Orbitrap 型)装置による解析方法の検討を行った結果、蛋白質同定数を一桁増加させることに成功した。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。

1. 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：横田；VCAD チーム、小迫；徳島大学、立花；大阪府立大学）

核膜孔複合体 (Nuclear pore complex, NPC) 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、ヒトでは総重量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、NPCが2層の脂質膜から成る核膜上に形成される分子機構を解析し、2つ成果を得ている。一つは、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) の司令で核膜孔複合体形成がおこること、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importin α/β に依存してNPCを通過して核内膜へ輸送されることが間期核膜孔複合体形成の初期ステップになることである。

POM121には、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を含む領域がN末端にあり、この2つの領域がNPC形成に必要なCDKリン酸化の標的となっていることを示唆してきた。このN末端領域はNPC構築に必要な2つのScaffold subcomplexes (NUP107-160とNUP93-205複合体) との親和性を有していることから、そのリン酸化が間期NPC形成において重要な可能性がある。このことを検証するため、昨年度から本年度にかけて、POM121のN末端領域の非リン酸化変異体を作成し、その変異体のC末端側に蛍光タンパク質Venusを融合したタンパクを安定に発現する細胞株の作製をおこなった。内在性POM121の影響を避けるため、siRNA抵抗性変異を有する変異体を作製し、siRNAと併用することで置き換えを試みている。さらに、POM121非リン酸化変異体の機能解析を、細胞生物学的見地からだけでなく、生化学的見地からも検証するための準備を進めている。

VCADチーム竹本智子研究員と共同で開発した新規画像解析法を用いて間期NPC形成過程の解析を行う試みを行っている。間期初期の核膜に見られるPore-rich regionとPore-free islandの2つの核膜サブドメインは、細胞周期の進行に伴って均一化される私たちは、Pore-free islandが“新生NPC合成の場”なのではないかと予想し、核膜サブドメインの動態を画像解析からの解析を試みている。POM121, NUP107, NUP93といった、間期の核膜を形成する上で土台となる構成因子の特異抗体を用いて染色し、画像解析に付した。

2-b 分裂期セミンタクト細胞を用いた核膜形成の解析（船越）

核膜は細胞周期を通して変化する。動物細胞の細胞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繰り返す。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 や A-type ラミンが、後者へは核膜孔複合体や B-type ラミンやラミン 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核膜 形成直後から初期 G1 でも観察される。核膜孔の密度が異なるそれぞれの領域を、“pore-free”と“pore-rich”とよび、前者へは A-type ラミンや Emerin が後者へは B-type ラミンと LBR が濃縮される。pore-free 領域は細胞周期の進行の他、細胞老化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 が必要である一方、Emerin の染色体局在には ATP/GTP の他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。さらに、この核膜構築系で形成された核膜は、核-細胞質間輸送送活性を有することが明らかになった。本系で因子の挙動を解析すると、核膜孔複合体構築を誘引する最初の反応は、metaphase/anaphase transition の際に、ELYS/Mel28 が染色体のキネトコアから染色体偏縁部に局在を変えることに起因するように考えられる。この反応は metaphase/anaphase transition のときに変化するキナーゼ・ホスファターゼのバランスで制御されることがわかってきた。

2-c 核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 と LBR の相互作用（三村）

"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される。一方で、初期G1期から次の細胞分裂期に至るまでの間、核膜上の核膜孔複合体の密度はほぼ一定に保たれたまま、核体積の倍加に伴い核膜が成長する。この二つの核膜形成過程において、核膜孔複合体と核内因子の相互作用を調べている。

私たちは、核膜孔複合体構成因子ELYS/Mel28と、sterol reductase活性を有する膜貫通型の核内膜タンパク質LBRとの相互作用を見つけた。ELYSノックダウン細胞ではLBRはリン酸化フォームになり染色体や核膜からはなれ、ERへ拡散するよう見える。このことから、見つけた相互作用はリン酸化に依存し、分裂期でも間期でも見られると考えられる。LBR N末端領域のCDKおよびSRPK1/2の標的であるリン酸化サイトに着目し、リン酸化サイトの恒常的リン酸化および非リン酸化変異体を作成し、それらの挙動の解析を現在行っている。ELYSノックダウン細胞において、核膜に局在していたLBRはERに拡散するが、CDKとSRPK1/2の活性を阻害すると、LBRが核膜へ再局在することがわかった。このことから、間期におけるLBRの異常なリン酸化が、LBRのERへの拡散の原因であることが考えられる。現在、分裂期と間期のELYSとLBRリン酸化反応との関係や、その生理的意義について調べている。

2. 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、渡邊彩)

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 γ 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 γ 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、内在性Ki67抗原をPP1 γ と相互作用できないように変異したKi67抗原に置き換えた。これによりKi67抗原に依存したPP1 γ 局在を阻害したところ、分裂後期における染色体動態が乱された。これを受けて、Ki67抗原との相互作用により染色体上にリクルートされるPP1 γ の基質因子探索を行い、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プローブとして利用した。Ki67抗原のリン酸化状態制御の意義について直接的に考察するために、同定に成功したリン酸化部位に変異導入し生細胞における挙動をFRAP法などにより解析した。野生型Ki67抗原の挙動と較べて顕著な差異は見られず、より重要なリン酸化部位を見落としている可能性が示唆された。一方で前年度までに、Ki67抗原と共沈降する因子を新たに同定し、その中からKi67抗原に依存して分裂期染色体表層領域に局在する酵素群を見いだした。今年度は、この内の一つについてGFP融合タンパク質を安定発現する細胞株の樹立などを行い、Ki67抗原に依存した挙動を生細胞においても確認した。以上とは独立に、多くの核小体因子がKi67抗原に依存して分裂期表層領域に局在することが共同研究により示された。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てきたが、それに加え、核小体因子群の集合を助ける場でもある可能性を示した。

3-b 細胞核の品質管理 (水野、渋谷：小林百、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 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。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PA28 γ 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可能性を見つけ、現在、立証しようとしている。

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 α 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 α 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, Kobayashi)

During heat-shock stress, the importin β family-mediated nucleocytoplasmic trafficking is downregulated, whereas nuclear import of the molecular chaperone Hsp70s is upregulated. We identified a new nuclear import pathway that operates during heat-shock stress. This transport pathway is mediated by an evolutionarily conserved protein named “Hikeshi”, and do not utilize small GTPase Ran like importin- β family members. 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- β family (Kimura, Morinaka, Kose: Okumura, Sakiyama, Imai, Tomii, Horton)

Nucleocytoplasmic transport of proteins is essential for various cellular processes. The human importin- β family consists of 21 nucleocytoplasmic transport carriers (NTRs), and they are responsible for the transport of thousands of proteins across the nuclear envelope. 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 by digitonin. Then, nuclear proteins prepared from unlabeled cells are transported into the nuclei of the permeabilized cells by a particular importin- β family NTR of interest. Finally, proteins 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. The identified candidate cargo proteins included previously reported specific cargoes and also potentially new 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- β . 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: Takemoto, Yokota, Kosako, Tachibana)

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. Takemoto in Dr Yokota's 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 of NUP107, POM121 and NUP93 automatically and would provide us a data set that explains where the interphase NPC assembly takes place on NE.

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

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)

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, Watanabe)

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 γ (protein phosphatase 1 gamma) and showed that the rapid accumulation of PP1 γ on anaphase chromosomes was partly mediated by this interaction. We next revealed that Ki67 itself is one of PP1 γ 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, Kobayashi, 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 that inhibit degradation of aberrant nuclear 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 α 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
小川 泰 Yutaka Ogawa
三村 恭弘 Yasuhiro Mimura
儘田 博志 Hiroshi Mamada
渡邊 愛 Ai Watanabe
本橋 詳子 Shoko Motohashi
亀高 愛 Ai Kametaka

Students

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
小田 由美 Yumi Oda

Assistant

森中 祐理子 Yuriko Morinaka
高野 雅栄 Masae Takano
渡邊 彩花 Ayaka Watanabe

Visiting Members

前島 一博 Kazuhiro Maeshima
船越 智子 Tomoko Funakoshi
小林百合香 Yurika Kobayashi