

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、インポートイン、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、熱などのストレス応答時には Importin ファミリーの輸送活性が低下することを、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。その一方で、熱ストレス応答時に分子シャペロン Hsc70/Hsp70 (以下 Hsp70s と記載) は核内に集積することが分子が古くから知られていた。私たちは、熱ストレス応答性の輸送反応を *in vitro* で再構築し、Hsp70s の核内輸送は担う運搬体を生化学的に精製して同定した。同定した因子を Hikeshi(火消)と命名した。

細胞内では、Hsp70s は Hsp40 や Hsp110 などのコシャペロンと共に働き、その ATP サイクルを制御する。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と直接結合することで核膜孔を通過する活性を持つ。これらの性質から、Hikeshi は、熱ストレス応答時に ATP 型 Hsp70s を核に運ぶ運搬体分子であると考えられる。

1-a -1 Hikeshi 輸送の駆動メカニズムの解析 (小瀬 ; 白)

研究年報

熱ストレス時に HSP70 は Hikeshi によって細胞質から核に輸送される。しかし、この輸送システム駆動の詳細な分子メカニズムはまだ明らかではない。我々は、理研佐甲研究室との共同研究により、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利用し、正常時と熱ストレス時の Hikeshi と HSP70 の分子間相互作用解析を行った。リコンビナントタンパク質を使用した *in vitro* での解析から、Hikeshi と HSP70 の分子間相互作用が、37°Cに比べて 43°Cで劇的に上昇することが明らかになった。また、この熱依存的結合活性にに関して、*in vitro* 輸送解析系において、Hikeshi 依存的な HSP70 の核への移行が、熱前処理によって促進されることが判った。これらの結果は、熱そのものが、HSP70 の核への輸送を活性化する重要な要素のひとつである可能性を示唆するものである。

1-a-2 Hikeshi の結晶構造解析 (小瀬、渡邊; Lee, Song)

Lee 研究室(Chungbuk National Univ.,韓国)との共同研究により、ヒト Hikeshi の結晶構造を明らかにした。Hikeshi 分子は、jelly-roll/ β -sandwich 型構造の N 末領域とコイルドコイル様構造をとる C 末領域、そしてその間のフレキシブルなリンカー領域の大きく三つの領域からなる。主に C 末領域とリンカー領域間の作用で、Hikeshi は特徴的な非対称性ホモダイマーを形成していることが明らかになった。この Hikeshi ダイマー形成は、HSP70 との結合ならびに核への輸送に重要であることが示された。また、Hikeshi の N 末側領域には疎水性ポケットとフレキシブルで特徴的なループ構造(E-loop)があるが、この E-loop 内のフェニルアラニン-グリシン(FG)が疎水性ポケットに埋め込まれた形で存在することが確認された。疎水性ポケット周辺や E-loop 内アミノ酸変異により、疎水性ポケットを「オープン」化すると、Hikeshi の核膜孔通過活性が促進した。Hikeshi は幾つかの FG-Nup との相互作用により核膜孔を通過する活性をもつことから、N 末領域の疎水性ポケットが FG-Nup との相互作用に重要であり、E-loop が FG-Nup との相互作用を制御している可能性が示唆された。

1-a-3 HSP70 シャペロンシステムでの Hikeshi の機能 (小瀬、渡邊)

分子シャペロン HSP70 は、多くのコシャペロンの作用により、ATP/ADP 型変換を伴って、タンパク質フォールディングなど様々な機能をもつ。Hikeshi は、ATP 型 HSP70 に強く結合し、ADP 型 HSP70 との相互作用は弱い。よって、Hikeshi が HSP70 の ATPase サイクルを制御する可能性を検討した。変性リシフェラーゼタンパク質を基質とし、サイトゾル中でのリフォールディング活性を解析したところ、Hikeshi がタンパク質フォールディングに抑制的に働くという結果が得られた。Hikeshi が輸送以外の機能をもつ可能性が示唆され、現在、Hikeshi 作用点の詳細な解析を進めている。

1-a-4 Hikeshi の機能解析_ノックアウトマウスの利用 (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 遺伝子は、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肺 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。Hikeshi ホモノックアウトマウスの産仔は得られるものの、生後 48 時間以内に死亡する。また胚生期 14.5 日 (E14.5) の胚から MEF (マウス胎児線維芽細胞) は得られており、Hikeshi

ホモノックアウト MEF では熱ストレス時の HSP70 の核局在が見られない。現在、Hikeshi ホモノックアウトマウスの死因の解析を循環器系を中心に進めるとともに、Hikeshi ホモノックアウト MEF を用いて正常細胞における Hikeshi の機能について調べている。

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)

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り、核内で働く蛋白質の選択は細胞生理に大きく影響する。核と細胞質は核膜で隔てられており、蛋白質の多くは importin β ファミリー輸送因子により核膜にある核膜孔を通して輸送される。ヒトには 20 種類の importin β ファミリー輸送因子が存在し、これ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、生体内で発現量や機能の調節を受けており、また、それぞれ異なる輸送基質蛋白質群を特定方向へ輸送する。したがって、importin β ファミリーが構成する輸送システムは、さまざまな核内の反応に関わる蛋白質グループを必要に応じて供給・除去する働きをもつと予想される。細胞の生理状態の変化や維持へのこの輸送システムの関与を解明するためには、各輸送因子が輸送する基質蛋白質を可能な限り多く知る必要があるが、現在その情報は少ない。我々は、細胞質から核への輸送を担う 12 種類の importin β ファミリー輸送因子を対象に、培養細胞の安定同位体標識 (SILAC) 法、試験管内輸送系、比較定量質量分析法を組み合わせた輸送因子に特異的な輸送基質の大規模決定法 (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個々の蛋白質の非標識/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。SILAC-Tp 法での基質候補蛋白質の同定とその結果の生化学的な確認により、代表的輸送因子である importin β (importin α を伴う) と transportin の新規及び既知の基質が同定可能であることは既に示した。本年度は、基質の同定数の大幅な増加を目的とし、近年開発された Orbitrap 型質量分析装置の運用の検討を行った。試験管内輸送反応後の試料の調整方法を検討した結果、標品中の蛋白質同定数は旧式の質量分析装置を使用した従来法よりも大きく増加した。2-3 千種類の蛋白質の定量が可能となり、その中で非標識/標識分子の量比が際立って高い蛋白質が基質候補となる。通常、このようなハイスループット解析では定量値は不安定とならざるを得ないため、続いて、同定蛋白質中の既知の基質のデータを指標として、高い確度で基質蛋白質を選出するために必要な実験の繰り返し回数とデータ解析法について検討した。ここで定めた方法により、現在 12 種類の輸送因子の基質蛋白質の同定を進めている。

1-c Transport efficiencies and balances of individual nuclear pore complexes (小川)

核-細胞質間輸送は、全て核膜上に数百~千数百個存在する核膜孔複合体を介して行われる。核蛋白質は、細胞質で核内輸送因子 (importin) に認識され、核外移行シグナルを持つ蛋白質や RNA は核内で核外輸送因子 (exportin) に認識され、それぞれ輸送複合体として核膜孔を通過し、核内及び細胞質へ移行する。様々な輸送因子が存在し、絶えず行き来をしているにも関わらず、これまでのところ、通過の場である核膜孔複合体に多様性は報告されていない。そこで、個々の核膜孔複合体の輸送機能に違いを明らかにしていく。そして、個々の核膜孔複合体の機能がどのように細胞全体の核-細胞質間輸送バランスへ繋がるかを明らかにする。これらの目標に向けて、輸送複合体がどの核膜孔複合体を通過するかを可視化する新しい実験手法を開発している。加えて、核内輸送と核外輸送の効率を検出するプローブを観察することにより、個々の核膜孔複合体の機能が細胞全体に対してどのように影響を与えるかを明らかにしていく。

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 : 横田 ; VCAD チーム、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。NPC 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、ヒトでは総分子量 100MDa 以上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) の司令で間期での NPC 形成が起こること、もう一つは、膜貫通型 NPC 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、核内膜へ輸送されることが間期NPC形成の初期ステップになることである。

POM121はN末端側に核膜(NE)-targeting domainと、核内への輸送に重要な核局在化シグナル(NLS) clusterを含む領域をもつ。解析の結果、これら2つの領域に間期でのCDKリン酸化の標的が含まれていた。このN末端領域はNPC構築に重要なNUP107-160とNUP93-205複合体との親和性を有していることから、このリン酸化が間期NPC形成において重要である予想する。これを検証するため、同定したリン酸化サイトに非リン酸化変異を導入したPOM121変異体を作成し、その安定発現細胞株を樹立した。内在性POM121の影響を除くため、新たにPOM121の3'-UTRに対するsiRNAを作製し、それを利用してPOM121変異体の解析を行った。結果、野生型に比べ、リン酸化変異体はNPCへのターゲットが著しく抑制された。一方で、CDKを用いて*in vitro*でPOM121のN末端領域をリン酸化し、HeLa細胞抽出液を用いてタンパク質相互作用の変化を調べた。今のところ、リン酸化の有無によって既知のタンパク質相互作用の変化は確認できておらず、未知の相互作用パートナーを考慮に入れた検証が必要であると考えられる。

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。結果、Pore-free islandにはmAb414抗体で認識されない、POM121やNUP107, NUP93等を含む“NPC前駆体”と考えられる構造体が多く存在する事を明らかにした。今後、超解像光学顕微鏡等を用い、この前駆体の形態を評価していく。また本年度は、Pore-rich region内のNPC密度を計測するプログラムの作製に成功した。このプログラムによって、今まで計測困難であった間期NPC形成の評価が容易になり、研究進度が加速するものと考えている。

2-b 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、細胞分裂期前期に崩壊し、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膜因子の相互作用とその生理学的意義を調べている。

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のリン酸化は亢進し、その局在は核膜から放れ、ERへ拡散するようになった。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行った。結果、非リン酸化LBRでは分裂期における核膜へのターゲットが減弱し、恒常的リン酸化LBRでは野生型とほぼ同様の挙動を示した。このことから、分裂期におけるLBRの核膜ターゲットには、自身のリン酸化を介したELYSとの相互作用が重要であることが示唆された。間期での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とその生理的意義を解析している。

1. 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抗原とコンデンシン複合体を同時に除去すると分裂期染色体の形態が著しく乱されることを示した。どちらか一方の除去ではより穏やかな影響しかなかった。また両者の染色体における局在が大きく異なる (Ki67抗原は染色体表層に、コンデンシン複合体は染色体コアに局在する) ことから、両者は分裂期染色体を形作る際にリダundantに、しかし異なる機構で機能していると考えられた。続いてKi67抗原の作用機構を明らかにするために、Ki67抗原のC末領域にあるLRドメイン (DNA結合活性を持ちKi67抗原の正しい局在に必須なドメイン) の性状解析を行った。LRドメインを他のDNA結合モチーフに置き換えた変異型Ki67抗原が本来の局在を失うことを見いだした。また生化学的解析により、LRドメインがヒストンタンパク質群と直接相互作用することを示した。染色体表層に特異的に存在する未知のヒストンコードがあり、それをLRドメインが「読む」ことによりKi67抗原が分裂期染色体表層に局在するものと予想された。Ki67抗原と共免疫沈降するタンパク質群から同定したリジンアセチル化酵素(KAT)について性状解析を行い、このKATが染色体表層特異的なヒストンコードを樹立する機構の一部である可能性を示した。

3-b 細胞核の品質管理 (水野、石田：小林百、荘司、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可能性を見つけた。CHIPの細胞内局在を詳細に検討したところ、通常の状態では主に細胞質に局在していたが、塩化コバルト処理をして、低酸素応答を誘発すると核内に局在する割合が増加することを見いだした。現在、CHIPと核内タンパク質品質管理機構の関係を解明しようとしている。

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と、tin2に依存してpot1-tppl-tin2の3者複合体が核に移行することを、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 1 Analyses of heat-stress-induced nuclear transport mediated by Hikeshi (Kose ; Perk)

We analyzed the molecular interaction between Hikeshi and HSP70 using the fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and the fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) and showed their interaction was more facilitated at higher temperature. Further, in vitro transport assays revealed that Hikeshi-mediated nuclear import of HSP70 is promoted by pre-heat-incubation of recombinant proteins. These results suggest that heat itself might be one of factors facilitating nuclear import of HSP70 under heat stress conditions.

1-a2 Analysis of crystal structure of Hikeshi (Kose, Watanabe; Lee, Song)

We revealed the crystal structure of human Hikeshi. Hikeshi consists of three domains, the N-terminal domain (NTD), a flexible linker region, and the C-terminal domain (CTD). The crystal structure of Hikeshi represented a unique asymmetric homodimer, induced by the linker region and CTD. This dimer formation of Hikeshi is an important for both binding and nuclear import of HSP70. NTD contains hydrophobic pockets in a jelly-roll/ β -sandwich fold structure and a unique extended loop (E-loop). The crystal structure showed that a phenylalanine in E-loop is fully buried in the hydrophobic pocket, which resembles the FG-Nup binding site. Mutation analyses of the phenylalanine in E-loop or amino acids around the hydrophobic pocket showed that the hydrophobic pocket contributes the NPC-passage of Hikeshi and the E-loop might participate in the regulation of interaction between Hikeshi and FG-Nup.

1-a3 Analysis of Hikeshi function affecting Hsp70 chaperone system (Kose, Watanabe)

Binding of Hikeshi to HSP70 is coupled with the ATPase cycle of HSP70. In vitro protein refolding assay showed Hikeshi negatively regulates re-folding of chemically denatured-luciferases, suggesting that Hikeshi might function in the HSP70-mediated protein folding system

1-a4 Analysis of Hikeshi Knockout mice (Mamada, Kobayashi)

I7Rn6 (lethal gene on chromosome 7 Rinchik 6 protein) gene is mouse ortholog of Hikeshi. In an ENU mutagenesis analysis, I7Rn6 mutants (Y181X) exhibited severe emphysematous enlargement of the distal respiratory sacs at birth and I7Rn6^{4234SB} homozygotes died within 48 hr after birth (Fernández-Valdivia R et al. Genetics. 2006;172(1):389-99). However, the function of mouse Hikeshi in a developmental process of other organs is largely unknown. To explore in vivo requirements for Hikeshi (I7Rn6), we have generated a mice carrying a targeted disruption of the Hikeshi gene and analysis the function of Hikeshi during development and aging. hitherto, We demonstrated that all

pups of Hikeshi (17Rn6) homozygotes died within 48 hr after birth. However, the cause of death is unknown. We are examining by histology, immunohistology, and biochemistry of lung, heart, and other organ tissues of pups of Hikeshi (17Rn6) homozygotes.

1-b Identification of cargo proteins specific for members of the importin- β family (Kimura, Morinaka,)

Nucleocytoplasmic transport of proteins is essential for various cellular processes. The human importin- β family consists of 20 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 NTR, 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 nuclear import cargoes of NTRs 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 the 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. By this method, we have actually identified novel and known cargoes of importin- β (accompanied by importin- α as an adapter to bind to the cargo proteins) and transportin, and biochemically corroborated it. In this year, we set the condition for using Orbitrap LC-MS system and succeeded in increasing the number of the candidate cargoes drastically. We also set the number of experimental replicates and a data processing procedure to attain highly reliable cargo identification in this high-throughput method, in which the data values inevitably deviate. Now we are carrying out the identification of the cargoes specific to the twelve NTRs that import proteins into the nuclei.

1-c Transport efficiencies and balances of individual nuclear pore complexes (Ogawa)

All nucleocytoplasmic transport is mediated through a few thousand nuclear pore complexes (NPCs), which span the nuclear envelope. On the one hand, importin family recognizes nucleoproteins at the cytoplasm, and imports into the nucleoplasm. On the other hand, exportin family recognizes proteins bearing a nuclear export signals and RNAs, and exports to the cytoplasm. Whereas various transport complexes passes through the NPCs at every moment, it has not been reported the differences among individual NPCs in a single cell. Therefore, aiming to elucidate whether the structures and functions of NPCs are identical or different, we are trying to develop new techniques for imaging which NPC transport complexes are passing through. In addition, imaging probes for detecting efficiencies of nuclear import and export, we will elucidate how functions of individual NPCs affect whole nucleocytoplasmic traffics.

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 Interaction of Nucleoporin ELYS/Mel28 and INM protein LBR in HeLa cells (Mimura)

In open mitosis-exhibiting cell, the nuclear envelope (NE) reassembles at the end of every mitosis. This process involves the reformation of the nuclear pore complex (NPC), the inner nuclear membrane (INM) proteins, 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 previously 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 in mitosis. Furthermore, we found that ELYS/Mel28 biochemically interacts with the LBR in a phosphorylation-dependent manner in mitosis extracts but not in interphase extracts. First, We analyzed the phosphorylation status of LBR, because LBR localization in mitosis was reported to regulate by its phosphorylation/unphosphorylation balance. In ELYS-depleted cells, the phosphorylation of LBR by CDK and SRPK1/2 is promoted. We revealed that the phosphorylation in N-terminus of LBR via CDK and SRPK1/2 during mitosis is required for the interaction with ELYS and the targeting to the chromosome surface. In addition, the phosphorylation of LBR at the same sites is participated in the proper localization of LBR during interphase. We are currently addressing an understanding of the phosphorylation/dephorylation mechanisms of LBR depending on the ELYS.

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

3-a Exploration of Secrets of Mitosis through Dissection of Ki-67 (Takagi)

Aiming to explore the secrets of mitosis, we analyzed the functions of Ki67 during mitosis. We found that simultaneous depletion of condensin and Ki67 from tissue culture cells caused severe anomaly in the shape of mitotic chromosomes, which was hardly seen after depletion of either protein only. While condensin is localized at the core, Ki67 is localized at the periphery of mitotic chromosomes. Taken together, condensin and Ki67 seem to function redundantly but in different mechanisms. To gain insights in the mechanism how Ki67 accomplishes this function, we carried out the characterization of the C-terminal DNA-binding region of Ki67 (LR domain) whose essential contribution to the perichromosomal localization of Ki67 was previously demonstrated. The mutant Ki67 in which the LR domain was replaced with histone H2B failed to be localized to the perichromosomal regions, indicating that the LR domain has unique property beyond merely DNA-binding. Biochemical analysis revealed that the LR domain interacts directly with histone proteins. We forecast the existence of histone code that shows high affinity with the LR domain. Such a code might be generated and/or maintained by histone modifiers that cohabit in cells with Ki67. In good agreement with this scenario, we found that a lysine acetyltransferase (KAT) was coimmunoprecipitated with Ki67 and localized on mitotic chromosomes in a manner dependent on Ki67. Furthermore, the KAT was revealed to mediate acetylations of histone proteins *in vitro* and modulate the loading of Ki67 on mitotic chromosomes *in vivo*. Further characterization of the histone code preferred by the LR domain is the subject to be continuously addressed.

3-b Protein quality control of cell nucleus (Mizuno, Ishida: Kobayashi, Shoji, 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. We further examined subcellular distribution of CHIP and HSP90 in NIH3T3 cells. Endogenous as well as transiently overexpressed CHIP localized mainly in the cytoplasm, whereas in the presence of cobalt chloride, CHIP accumulated in nucleus significantly. Taken together, we have a working hypothesis that nuclear protein quality control mechanism involves nuclear HSP90 and CHIP.

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. In addition, we found that Tin2 dependent nuclear translocation of sub shelterin complex which is composed of Tpp1, pot1, and Tin2

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

Students

小林 健太郎 Kentaro Kobayashi

Assistant

森中 祐理子 Yuriko Morinaka
高野 雅栄 Masae Takano

Visiting Members

前島 一博 Kazuhiro Maeshima
船越 智子 Tomoko Funakoshi
片平じゅん Jun Katahira
小林百合香 Yurika Kobayashi
荘司 健太 Kenta Shoji