

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 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全体像の解析 (木村、森中)

細胞の活動に伴い多くの蛋白質が核—細胞質間を移動し、核内で働く蛋白質の種類と量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あり、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、それぞれ異なる輸送基質蛋白質群を特定方向へ輸送し、細胞内では発現量や機能の調節を受けている。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。輸送の調節による細胞活動の制御機構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、その報告例は少ない。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

研究年報

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。代表的輸送因子である importin β と transportin 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、SILAC-Tp 法が有効であることは既に示した。また、近年開発された Orbitrap 型質量分析装置の使用により、従来よりも遙かに多い 2-3 千種類の蛋白質の非標識／標識分子の量比を決定する方法も確立した。この方法により昨年度から 12 種類の輸送因子の大規模基質同定実験を行なっている。このようなハイスループット解析では定量値の誤差が大きいので、各輸送因子それぞれ 3 回の繰り返し実験を計画し、本年度内にほぼ完了している。非標識／標識分子の比が高い基質候補蛋白質中には既知の基質蛋白質が多く見られる。また、組換え蛋白質による輸送因子と同定された基質候補蛋白質の結合実験でも結果の妥当性が支持された。importin β ファミリー輸送因子は輸送基質の選択に関し、重複と一意性を巧みに使い分け、それぞれ特徴のある機能をもつ蛋白質グループの輸送を分担していることが確認された。また、リボソーム蛋白質、mRNA スプライシング因子等のほぼ全ての輸送因子に運搬される蛋白質グループの輸送にも輸送因子間の分担があることが明らかとなった。

1-b 熱ストレスで駆動する Hikeshi 輸送経路

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。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) が核内に集積することが古くから知られていた。私たちは、Hsp70s の核内輸送は担う運搬体を同定し、その因子を Hikeshi(火消)と命名した。Hikeshi は進化的に広く保存されている因子であるが、その機能解析はこれまでは全くおこなわれていなかった。

1-b-1 分子シャペロンシステムにおける Hikeshi の機能解析 (小瀬、渡邊)

タンパク質恒常性維持機構やタンパク質フォールディングにおける Hikeshi の機能解析を進めた。主要なサイトゾル分子シャペロンである HSP70 は、コシャペロンの作用による ATP/ADP 型変換サイクル (ATPase サイクル) と共役して、タンパク質リフォールディングなど様々な機能をもつ。Hikeshi と HSP70 の親和性は HSP70 のヌクレオチド型に依存し、Hikeshi は ATP 型 HSP70 に強く結合するが、ADP 型 HSP70 との結合は弱い。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。リコンビナントタンパク質を用いて、変性ルシフェラーゼタンパク質を基質とするタンパク質リフォールディングアッセイを行ったところ、Hikeshi が HSP70 による分子シャペロンシステムを制御していることが判った。これらの結果は、Hikeshi が核-細胞質間輸送以外にも機能をもつ可能性を示すものである。

1-b-2 Hikeshi 遺伝子変異によるヒト遺伝性疾患の解析 (小瀬、渡邊)

Elpeleg, O(イスラエル)らのグループによって、遺伝性白質脳症患者のエキソーム解析によって、Hikeshi 遺伝子変異(V54L)が明らかとなった。共同研究として、Hikeshi-V54L 点変異体の機能解析を行った。この Hikeshi 点変異体タンパク質は、野生型に比べて、HSP70 と高い親和性を持ち、HSP70 を核に運ぶ活性も強いことが判った。しかし、患者由来線維芽細胞では、内在性 Hikeshi-V54L タンパク質が非常に少なく、熱ストレス時でも HSP70 の核への局在はあまり促進されないことが明らかになった。Hikeshi 遺伝子変異から発症への分子メカニズムは現時点でまだ不明であるが、Hikeshi が熱ストレス時以外にも発生・分化などにも重要な機能をもっていることが示唆された。

1-b-3 熱ストレス応答性遺伝子発現制御における Hikeshi の機能解析 (小瀬、儘田、高木、渡邊)

ストレス応答による細胞防御や機能獲得における Hikeshi の新たな機能を探る目的で、新学術領域研究「ゲノム支援」の協力を得て、熱ストレス時における網羅的遺伝子発現を RNA-seq により解析した。CRISPR-Cas9 システムを用いて Hikeshi ノックアウト HeLa 細胞を作成し、正常時、熱ストレス時、熱ストレスからの回復時における遺伝子発現を野生型 HeLa 細胞と比較した。両細胞間で、熱ストレスタンパク質や代謝関連遺伝子発現などでストレス応答性に違いが見られるなど、幾つかの興味深い結果が得られており、現在さらに解析を進めている。

1-b-4 Hikeshi の機能解析_ノックアウトマウスを利用 (儘田、小林健、米野)

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, Chr 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得られた Hikeshi ミュータントマウスは肺 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 (Fernández-Valdivia R et al. Genetics. 2006;172(1):389-99)。

しかしながら、この Hikeshi の変異は点変異であり、因子の包括的機能はマウス個体では十分に解析されておらず、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不明である。熱ストレスという特殊な環境において働く Hikeshi を介した 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。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 との共同研究により、Hikeshi の 5'-非翻訳領域と第一メチオニンを含む第一エクソンが Cre-loxP システムによって除かれる flox マウスを作成した。

本年度は、このマウスと米国ジャクソン社から購入した EIIa-Cre マウスを交配させ、全身で Hikeshi がノックアウトされたマウスを用いて解析を行った。Hikeshi ホモノックアウトマウスは、産仔は得られるものの、生後 48 時間以内に 100% 死亡し、肺や脳に形態異常が見られた。現在 Hikeshi ホモノックアウトマウスの死因について調べており、生体内における Hikeshi の役割について解析を進めている。また胎生期 14.5 日胚 (E14.5) から MEF (マウス胚性線維芽細胞) を採取し、Hikeshi ホモノックアウト MEF を用いて解析を行った。Hikeshi ホモノックアウト MEF では、Hikeshi をノックダウンさせた HeLa 細胞と同様に熱ストレス時の HSP70 の核局在が見られなかった。さらに 20% 酸素濃度 (大気) 培養下では野生型 MEF と比べて Hikeshi ノックアウト MEF の細胞増殖能の低下が見られた。しかし 3% 酸素濃度 (低酸素) 培養下では野生型 MEF の細胞増殖能との違いは見られなかった。20% 酸素濃度培養下では Hikeshi ノックアウト MEF は野生型 MEF よりも早期に老化マーカーである Senescence-associated beta-galactosidase が検出された。これらの結果から Hikeshi は熱ストレスだけでなく酸化ストレスや老化にも関与している可能性がある。今後 Hikeshi ホモノックアウト MEF を用いて様々なストレス応答や老化現象における Hikeshi の機能について解析を行う。

1-c 様々な環境下での核-細胞質間輸送効率 (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。核-細胞質間輸送は、浸透圧や温度の変化など、細胞をとりまく様々な環境に対応し効率を調整していると考えられるが、詳細なメカニズムはまだ分かっていない。そこで各条件下での輸送効率の変化と輸送因子の局在変化を調べている。

まず輸送効率の変化を検出するために、核内移行シグナルと核外移行シグナルの両方を持つ幾つかの蛍光プローブ遺伝子を作製した。その中の 2 種類は、微妙な輸送効率変化を検出できる可能性があった。通常、核と細胞質の両方に局在するが、核外及び核内輸送の効率バランスが変化すると局在が変化する。今後、これらのプローブを用いて様々な環境下において個々の細胞レベルでの効率の違いを見出していく。

また、幾つかの輸送因子の局在変化も見出している。特に、主な核-細胞質間輸送経路を制御している、Ran の局在が細胞の接着状態に依存して変化することを見出した。加えて、浸透圧や熱ショックによって敏感に局在を変化する輸送因子 importin α の局在変化が、浮遊状態では起こらないことも見出した。このことから、細胞外からの刺激を何らかの方法で感知し、細胞膜から離れた核への輸送を調整していることが示唆される。今後、接着状態や細胞骨格との関係性についても検証していく。

2. 核膜、核膜孔複合体のダイナミクス解析

核膜孔複合体 (Nuclear pore complex, NPC) は、核膜 (NE) 上に存在する、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、NPC が核膜上に形成される分子機構の解析から、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、タンパク質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。これら 2 点を手掛りとし、(2-a) 間期での NPC 形成過程の解明と、(2-b) 間期 NPC 形成解析のための新規解析法の開発を行っている。また、2-c では、NPC 構成因子 ELYS が、核内膜タンパク質 LBR の細胞内局在を制御している可能性について検討を行っている。

2-a 間期核における核膜孔複合体形成の解析 (三村)

これまで当研究室で得られた手掛りから、まず、POM121 が CDK の直接的な基質である可能性を検討した。POM121 の N 末端領域は、NE-targeting domain と核局在化シグナル(NLS) cluster を含み、NPC 構築に重要な NUP107-160 複合体と NUP93-205 複合体との親和性も有しているため、NPC 形成に重要な役割を担うと予想される。LC-MS/MS を用いてリン酸化修飾について解析を行った結果、POM121 の N 末端領域で多くの CDK リン酸化サイトを同定することに成功した。同定した POM121 のリン酸化の生理的機能を解析するため、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の樹立を行った。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、細胞質に Annulate lamellae 様の構造が認められた。今後、この変異体を用いて間期 NPC 形成の効率等を検証していく予定である。

2-b 画像処理を利用した新規核膜/核膜孔解析法の開発 (三村 : 横田・竹本 ; VCAD チーム、立花 ; 大阪府立大学)

間期初期の核膜には Pore-rich region と Pore-free island の 2 つの NE サブドメインが存在する。これら 2 つの NE サブドメイン間には多くの構造的差異が存在し、特に NPC の分布が顕著に異なる。Pore-rich region には多くの NPC が認められる一方、Pore-free island には NPC がほとんど形成されていない。これまでの当研究室の解析結果から、Pore-free island は非常にダイナミックな NE サブドメインであり、細胞周期の進行と間期 NPC 形成によって消失する。このことは、Pore-free island が新生 NPC 合成の場であることを示唆しており、我々は、その動態解析から間期 NPC 形成機構の一旦を解明できると考えた。そこで我々は、Pore-free island を定量的に解析するため、VCAD チーム竹本智子研究員と共同で、画像処理を利用した新規核膜/核膜孔解析法の開発を行った。この方法では、まず、POM121, NUP107, NUP93 といった、間期の NPC 形成および構造に重要な構成因子と、Pore-rich region (完成した NPC) の共染色画像を取得する。次に、Pore-rich region 染色像から Pore-free island との境界線を作製し、Pore-free island 領域を抽出する。さらに、抽出した Pore-free island 領域内の POM121, NUP107, NUP93 などの分布の解析を行う。この新規解析法により、Pore-free island は、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しており、これら NPC 前駆体は Pore-rich region と Pore-free island の境界近傍に多く見られる傾向があることが明らかとなった。このことは、Pore-free island は、端から中央に向けた NPC 形成によって徐々に消失していく事を示唆している。

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、細胞周期間期での LBR のリン酸化が亢進し、その局在は核膜から放れ、ER へ拡散するようには見えた。我々は ELYS ノックダウンによる LBR の核膜局在阻害が、リン酸化の亢進に起因している予想し、すでに報告されている LBR の 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た。LBR の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、ELYS は LBR の脱リン酸化反応に関与しており、ELYS ノックダウン条件下では、LBR の脱リン酸化が抑制され、CDK および SRPK1/2 によるリン酸化が相対的に亢進することが明らかになった。さらに、非リン酸化型および恒常的リン酸化型の LBR 変異体は、ともに NE 局在が抑制され、ER へ拡散してい

た。以上の事から、ELYSノックダウンによるLBRの核膜局在阻害は、ELYSによるLBRの脱リン酸化制御の喪失によるリン酸化の亢進がその一因であると結論付けた。また、LBRの脱リン酸化はPP1によって制御されていることから、ELYSがPP1活性を介してLBRの脱リン酸化を制御している可能性が示唆され、今後のNPC研究の重要な課題だと考えている。

3. 細胞核の機能的構造構築

3-a タンパク質即時分解系を利用した培養細胞解析手法の導入（遺伝研・鐘巻研究室より）（高木）
植物由来の E3 ユビキチンライゲース (OsTIR1)を安定発現させたヒト培養細胞株 HCT-116 をベースにして、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集技術により、解析対象とするタンパク質 (POI) の C 末端にオーキシン応答性タグ (AID タグ) を付した細胞を樹立する。オーキシン添加に応じて、かつ短時間で POI の分解を導くことができる。この手法の導入により、必須因子の解析や細胞周期依存的な現象の解析を効率よく行うことが可能となった。

3-b Ki67 抗原の機能解析（高木）

上述の手法をKi67抗原に適用した。またAIDタグの下流にさらにGFPを融合することでKi67抗原の生細胞観察（動態観察および分解の可視化）を可能にした。樹立した細胞において、さらなるゲノム改変により関連因子 (TopoII α , CENP-Aなど)のC末端にmCherryを融合し、これらの因子とKi67抗原の同時観察も可能にした。細胞周期同調とKi67抗原分解誘導とを組み合わせる解析し、分裂期染色体の構築および維持の双方にKi67抗原が関与することを示した。さらに上述の手法を、Ki67抗原と共免疫沈降する因子の一つであるアセチル基転移酵素NAT10に適用した。NAT10がKi67抗原に依存して分裂期染色体表層領域に局在することを確認し、またNAT10の分解除去により間期細胞におけるRNA polymerase I活性が著しく損なわれることを示した。前年度までの知見 (Ki67抗原が形成する分裂期染色体表層領域が、次の間期におけるNORの再活性化に必要であること) の分子基盤の一端が、今後のNAT10解析により明かされる可能性が強く示唆された。

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）

核内でのポリメラーゼ α の変性と HSP90, ユビキチン化、分解との関係を詳細に明らかにするために、p180tsFT20 を novobiocin 存在下で、制限温度下 3 時間処理し、可溶性画分と不溶性画分に分けた。novobiocin 存在下で制限温度では大部分が不溶性画分に移行し、ユビキチン化はされていない。部可溶性画分に残っていた p180tsFT20 はグリセロール密度勾配遠心により沈降係数が 7.1S から 12S 以上のチューブのボトムに沈降し、変性していることが分かった。これらの結果から、1 アミノ酸の変異を有する p180tsFT20 は制限温度下で構造変化を生じ、不溶性たんぱく質へと変性し、その不溶性タンパク質の変性を HSP90 が防いでいることが分かった。HSP90 により可溶性に保たれたタンパク質がポリユビキチン化され分解に至るといった経路が明らかとなった。

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。しかし、CHIP を siRNA によりノックダウンしても細胞染色のシグナルは減少せず、非特異的シグナルを見ていた可能性が示唆され、光刺激型 GFP タンパク質と CHIP の融合タンパク質の安定発現細胞により細胞内局在を解析中である。

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-tpp1-tin2 の 3 者複合体が核に移行すること、さらに、pot1 とポリメラーゼ α との相互作用を免疫沈降反応と Proximity ligation assay により調べた結果、マウスの pot1a が pot1b、tpp1-tin2 が結合した三者複合体より強くポリメラーゼ α に結合することを見いだした。テロメアのラギン鎖合成の制御機構を示唆する知見が得られた。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 Large-scale 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 receptors (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 one of the NTRs. Finally, proteins are extracted and quantitatively identified by mass spectrometry. By this method, we have actually identified novel and known cargoes of importin- β and transportin, and biochemically corroborated it. We have also set the condition for using an Orbitrap mass spectrometer and succeeded in increasing the number of the candidate cargoes drastically. Since last year, we have performed large-scale identification of cargoes specific for the twelve import NTRs by the established method. As this type of high throughput quantitation is susceptible to error, we planned three replicates of the experiment, and have almost finished them in this year. The identified candidate cargoes include many reported ones, and the novel candidates were examined biochemically, demonstrating the validity of our method. Our results of SILAC-Tp illustrate the intricately configured and partially redundant transport pathways in which each NTR carries protein groups with related functions.

1-b1 Functional analysis of Hikeshi in the molecular chaperone system (Kose, Watanabe)

Major cytosolic molecular chaperone HSP70 has diverse functions including protein folding, degradation, translocation. These functions of HSP70 are coupled with its ATPase cycle, which is regulated by many co-chaperones. We previously showed that Hikeshi binds to ATP-form HSP70 efficiently. To investigate whether or not Hikeshi regulates ATPase cycle of HSP70, we performed in

vitro protein re-folding assay using chemically denatured-luciferases. The results indicate that Hikeshi regulates the HSP70-mediated protein folding potentially.

1-b2 Analysis of human inherited leukoencephalopathy associated with a point-mutation in Hikeshi gene (Kose, Watanabe)

Elpeleg, O., et al. identified that a missense mutation (V54L) in Hikeshi gene is linked to human inherited leukoencephalopathy. Our in vitro assays showed that Hikeshi-V54L has a higher affinity to HSP70 than wild type Hikeshi, and it carries HSP70 into the nucleus more efficiently. However, in the patients' fibroblasts, protein level of Hikeshi-V54L is very low, and the efficient nuclear accumulation of HSP70 did not occur during heat stress conditions. Although the molecular mechanism of how Hikeshi mutation induces leukoencephalopathy is still unknown, these results suggest that Hikeshi not only functions during heat stress, but also has important roles in development and differentiation.

1-b3 Functional analysis of Hikeshi on cellular gene expressions responsive to heat stress (Kose, Mamada, Takagi, Watanabe)

To explore new function of Hikeshi on cellular protections against stress and functional acquisitions, we are investigating gene expression profiles during heat stress and recovery in wild type and Hikeshi-knockout HeLa cells by RNA-seq. This work was supported by MEXT KAKENHI (No.221S0002).

1-b4 Analysis of Hikeshi Knockout mice (Mamada, Kobayashi, Yoneno)

17Rn6 (lethal, Chr 7, Rinchik 6) gene is mouse ortholog of Hikeshi. In an ENU mutagenesis analysis, 17Rn6 mutants (Y181X) exhibited severe emphysematous enlargement of the distal respiratory sacs at birth and 17Rn6^{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 (17Rn6), we have generated mice carrying a targeted disruption of the Hikeshi gene and analyzed the function of Hikeshi during development and aging. The Hikeshi (17Rn6) homozygous mutant mice showed no obvious abnormality in external morphology at postnatal day 0 (P0). However, after birth, the Hikeshi homozygous mutant mice died within 48 hours. To clarify causes of the death, we have performed histological analysis of Hikeshi-deficient mouse. We observed morphological abnormalities in lung and brain at P0, implying that Hikeshi may regulate the brain and lung formation necessary for survival of mammals. We next examined the stress response of Hikeshi-deficient MEF cells. The heat shock-induced nuclear accumulation of Hsp70 is strongly inhibited in Hikeshi-deficient MEFs, which show a crucial role for Hikeshi in the heat shock-induced nuclear import of Hsp70s in living cells. Next, we examined oxidative stress response. Under 20% oxygen culture conditions, the growth rate of Hikeshi-deficient MEFs was decreased compared with wild-type cells. In addition, Hikeshi-deficient MEFs was stained with senescence-associated beta-galactosidase, a biomarker of senescent and aging cells, in early phase compared with normal MEFs. On the contrary, under 3 % oxygen culture conditions, growth rate of Hikeshi-deficient MEFs did not decline, nor accelerated senescence. These results suggest that Hikeshi is involved in not only thermal stress response, but also oxidative stress response and aging in mice.

1-c Transport efficiencies and balances in a variety of environments (Ogawa)

All nucleocytoplasmic transport is mediated through a few thousand nuclear pore complexes (NPCs), which span the nuclear envelope. 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. Although it seems that nucleocytoplasmic transport is modulated according to the surrounding environments, in many cases, detailed mechanism is unknown. We are trying to examine nuclear transport efficiencies and localization of transport factors under a variety of environments.

To detect changes in nuclear transport efficiencies, we generated a variety of fluorescent protein

probes fused with nuclear import and export signal peptides. As a result, two probes of them may successfully function. Whereas the probes are equally distributed in both nucleus and cytoplasm in the steady state, the probes are localized into nucleus or cytoplasm when nuclear import or export efficiencies change. We will check the localization of these probes under various conditions. In addition, we have found localization changes of some transport factors. Especially, the localization of Ran, which controls main nucleocytoplasmic transport pathways, changes in an adhesion-dependent manner. On the other hand, importin α , which has been known to be sensitive to external stimuli like osmotic stress and heat shock, does not react in suspension culture. These results imply that nucleocytoplasmic transport is modulated by sensing extracellular adhesions and cytoskeletons. We will further elucidate these relationships.

2. Studies of Nuclear Organization Focused on the Nuclear Periphery

2-a Analysis of interphase nuclear pore complex formation. (Mimura)

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 for its nuclear import. 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.

2-b Development of a novel image processing-based geomorphological analysis system (Mimura: Takemoto, Yokota, Tachibana)

With collaboration with Dr. Takemoto in Dr Yokota's laboratory, we developed a method for dissection of the NE dynamics using image processing. 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-c 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 is required for the NE localization and proper phosphorylation of LBR during interphase. Because LBR is phosphorylated at its N-terminus by CDK and SRPK1/2, we constructed the unphosphorylated and constitutively phosphorylated mutants of LBR with regard to the phosphorylation sites by both kinases. As a result of biochemical and cell biological analyses using both mutants, ELYS depletion promotes the phosphorylation of LBR by CDK and SRPK1/2. Moreover, the NE localization of both mutants was suppressed. Therefore, we conclude that ELYS regulates the NE localization of LBR via controlling phosphorylation signaling.

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

3-a Introduction of a novel cellular system for analyzing functions of POI by degrading it conditionally and immediately (Takagi)

A novel cellular system called the AID system was introduced from the Kanemaki Laboratory in the

National Institute of Genetics. In this system, human colon carcinoma HCT-116 cell is first engineered to express OsTIR1, an E3 ubiquitin ligase derived from a plant, and then the genome is edited by CRISPR/Cas9 so that the POI (protein of interest) is fused to the AID (auxin-inducible degron) tag at its C-terminal end. Upon addition of auxin to the cell culture, the POI tagged with AID is swiftly degraded by proteasome. This system enables us to dissect the cellular functions of essential proteins efficiently, and the cell-cycle specific events as well.

3-b Functional analysis of Ki67 antigen (Takagi)

The AID system was applied for the functional analysis of Ki67 antigen. For making it possible to dissect the behavior (localization and degradation) of Ki67 antigen in living cells, GFP was tagged downstream of AID. For some specific experiments, cells were further engineered so that related factors such as TopoII α and CENP-A were C-terminally fused to mCherry again via CRISPR/Cas9-mediated genome editions. Through the analysis coupling the cell-cycle synchronization and the conditional degradation of Ki67 antigen, we showed that Ki67 antigen is involved both in the assembly and the maintenance of mitotic chromosomes. We next applied the AID system for analyzing the function of a KAT (lysine acetyl transferase) that was co-immunoprecipitated with Ki67 from the cell extracts. The KAT was shown to localize on the periphery of mitotic chromosomes in a manner dependent on Ki67 antigen. The forced degradation of this factor in interphase cells caused the striking loss of RNA polymerase I activity. These observations provided us a clue for understanding the molecular basis behind the necessity of mitotic perichromosomal layer composed mainly of Ki67 for the reactivation of NORs (nucleolar organizing regions) in the subsequent G1 phase.

3-b Protein quality control of cell nucleus (Mizuno, Ishida: Kobayashi, Shoji, Torigoe)

To clarify relationship between HSP90 and ubiquitination and degradation, cells overexpressing p180tsFT20 were incubated with novobiocine and shifted up to restricted temperature. Proteins were extracted in soluble and insoluble fractions, and were examined by Western blot as well as glycerol density gradient ultracentrifugation analysis. In the presence of novobiocine, most p180tsFT20 were in insoluble fraction without polyubiquitination. Soluble p180tsFT20 in the presence of novobiocin was sedimented in the bottom of glycerol gradient indicating that without HSP90 activity, p180tsFT20 was misfolded at restricted temperature.

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. In addition, mouse pot1a associated with polymerase alpha more strongly than pot1b did, suggesting that control mechanism of lagging strand synthesis on the telomere.

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
米野 久栄 Hisae Yoneno
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