

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、インポーチン、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 ファミリーによる輸送経路

核内で働く蛋白質の種類と量は細胞生理に大きく影響し、細胞の活動に伴い多くの蛋白質が核-細胞質間を移動する。核と細胞質は核膜で隔てられており、核蛋白質の多くは 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。高等生物がもつ約 20 種類の importin β ファミリー輸送因子は、それぞれが異なる蛋白質グループの一定方向への輸送を分担し、数千種の蛋白質の輸送が importin β ファミリーに依存すると予想される。(ファミリーのうち importin β だけは 7 種類程度ある importin α の一つをアダプターとして蛋白質と結合できる。) importin β ファミリー輸送因子のそれぞれは、輸送される基質蛋白質の機能を介してさまざまな生命現象と密接に関連している。輸送の基本メカニズムの解明は進み、今後は importin β ファミリーによる輸送の生理的な意義の解明が期待される。

1-a-1 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、今井・Horton ; 産総研)

importin β ファミリー輸送因子は、さまざまな状況に応じた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、核内の反応に関わるさまざまな蛋白質グループを

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 種類のヒト 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。輸送因子を含まない対照実験での非標識/標識分子比で標準化したこの「輸送分子比」が高い蛋白質が基質の候補となる。Orbitrap 型質量分析装置の使用により、約 2 千種類の蛋白質の輸送分子比を決定することが可能である。この SILAC-Tp 法 3 回の繰り返し実験による 12 種類の輸送因子の大規模基質同定実験を本年度までに終了し、結果の解析を行った。既知の基質蛋白質の多くは高い輸送分子比を示し、SILAC-Tp 法の有効性が確認された。同時に、比較的多くの基質が既に知られる transportin の基質同定実験における既知基質の輸送分子比の分布から特異度や感度を算出して、解析目的に応じた基質選別の境界値を設定した。輸送因子と基質候補蛋白質 200 組以上での組換え蛋白質による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、ほぼ全ての輸送因子がリボソーム蛋白質、mRNA スプライシング因子の輸送に関与するが、これらの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。このような輸送基質の機能による輸送因子の役割分担について一覧表を作成して報告した。

1-a-2 Importin β ファミリー輸送因子と基質蛋白質相互作用の多様性の解析 (木村、森中、今井・富井・Horton ; 産総研)

上記の基質決定実験の結果、特定の基質蛋白質を輸送する輸送因子の数はただ 1 種類からほぼ全てまでさまざまであり、輸送因子-基質間の特異性には広く幅があった。輸送因子のうち、その基質蛋白質グループに一次構造上の共通性が報告されるものは少数であり、他の輸送因子には基質の多様な高次構造に応じた多様な特異性決定機構が予想される。また、既知の結晶構造では、一つの輸送因子が異なる部位で異なる基質と結合する例も知られる。ヒト細胞で 20 種類という importin β ファミリー輸送因子の多様性と基質特異性決定に必要な構造上の要請の関係を調べるため、類似性の高い一次構造をもちながら共通の基質は少ない importin13 と transportinSR について、上記で決定した多数の基質との相互作用様式の比較解析を開始した。まず、進化トレース解析と既知の結晶構造から、一方の輸送因子でのみ保存され特異的な基質認識への重要性が予想されるアミノ酸残基を選出し、その置換変異体輸送因子を作製した。また、上記で同定した基質の蛍光融合蛋白質と蛍光顕微鏡画像解析を利用した蛋白質相互作用解析系 (bead halo assay) を設定し、これらの変異輸送因子と基質の相互作用について多検体の解析を進めている。

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。その結果、Hikeshi ノックアウト細胞では、正常温度においても、Hsp70 などの熱ストレスタンパク質(Hsps)の発現が亢進していることが判った。それらの熱ショックタンパク質関連遺伝子の多くは転写因子 HSF1 によって発現誘導されることが知られている。細胞が Proteotoxic stress に曝されると HSF1 が活性化することから、Hikeshi 機能が欠損することで細胞に何らかの Proteotoxic stress が誘導されているのではないかと仮定し、その検証を進めている。

1-b-4 細胞ストレス応答における Hikeshi の機能解析 (プロテアソーム阻害剤 MG132 処理) (小瀬、渡邊)

熱ストレス時だけでなく、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理によっても、Hikeshi 依存的な Hsp70 の核内移行が起こることが判った。MG132 で細胞を処理をすると、細胞質にストレス顆粒が形成されることが知られている。しかし、Hikeshi ノックアウト HeLa 細胞では、野生型 HeLa に比べて、顕著にストレス顆粒形成が抑制されており、細胞死もより多く起こることを明らかにした。一般にストレス顆粒形成はアポトーシス誘導を抑制することが知られている。Hikeshi の新しい機能として、アポトーシス誘導との関連性を調べていく予定である。

1-b-5 Hikeshi の機能解析_ノックアウトマウスの利用 (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、生体内での輸送タンパク質としての Hikeshi の働きや、個体発生や生理機能における役割については不明である。熱ストレス時に HSP70s の核 - 細胞質間移行の制御を担う Hikeshi タンパク質が生体の発生過程や生理機能にどのように関与しているのかを明らかにするために、理研 CDB との共同研究により、Hikeshi ホモノックアウトマウスを作成した。

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、褐色脂肪組織に形態異常が見られた。現在生体内における Hikeshi の役割について解析を進めている。Hikeshi ホモノックアウトマウスから褐色脂肪細胞を採取し、各種マーカー因子の発現を調べたところ、エネルギー代謝に関連する因子の発現が野生型に比べて低かった。このことから、Hikeshi は生体内の体温調節などのエネルギー代謝に関与している可能性が予想される。Hikeshi ホモノックアウトマウスの胎生期 14.5 日胚から MEF を採取し解析を行ったところ、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が、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。また老化したヒト正常線維芽細胞 TIG 細胞では若い TIG 細胞に比べて Hikeshi の発現が低かった。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 温度依存的な核-細胞質間輸送の制御機構（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、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ほとんど明らかになっていない。

そこで、誤差 0.1°C 以下の高精度の温度制御下での細胞培養法を構築した。この手法を用いて、様々な温度環境下での核-細胞質間輸送の効率を観察した。その結果、各輸送経路がそれぞれ独立した温度で、抑制または活性化していることを見出した。その中でも、最も主要な核内輸送経路である importin α/β 依存的な輸送経路は、41.5°C から抑制された。一方で他の Ran 依存的輸送経路は、43°C 以上まで変化は見られなかった。

さらに、各輸送因子の温度感受性を *in vitro* 結合実験と *in vitro* 核輸送再構成系を用いて検証した結果、importin α が温度上昇に敏感に応答し、基質タンパク質との結合活性が失われることが明らかになった。このことから、importin α が温度変化を直接感知し、importin α/β 依存的輸送経路のみを選択的に抑制していることを初めて明らかにした。

今後、この選択的抑制が、細胞が温度上昇に対応する上でどのような役割を果たしているのかを明らかにしていく。まず importin α の不活性化を抑制した細胞株を樹立し、野生株との細胞生存率を比較する。また、通常状態で核に局在する蛋白質には、核内移行シグナルと核外移行シグナルの両方を有するものが多く存在する。温度上昇に伴って、これらの蛋白質とそれらに結合した蛋白質群は、核内輸送活性のみを失うことになるため、多くの核蛋白質群がまとめて細胞質へと局在変化することが予想される。そこでこれらを安定同位体標識 (SILAC) 法を用いて同定していく。

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。

2-a 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）

ヒト細胞では、G1 初期では核膜孔複合体は核膜上に不均一に分布し、S 期から G2 期にかけて均一に分布する。この過程で、核膜上に核膜孔複合体が形成される。どちらの現象も、ともに、CDK 依存性キナーゼの活性に依存する。しかし、両者がどのように関わっているのかは具体的にはわかっていない。この問題は、核膜孔複合体が間期の核膜上のどこに形成されるのかといった問題と密接である。そこで、VCAD 画像処理チームと共同研究を開始した。サイクリン依存性キナーゼとともに阻害される核膜孔複合体形成と、pore-free 領域の消失に着目し、両者の関係を、生物学的手法と情報処理・画像処理技術を組み合わせて明らかにすることを目指した。具体的には、細胞周期を同調した HeLa 細胞をサイクリン依存性キナーゼ阻害剤で処理し、複数の核膜孔複合体因子で共染色することで、完成した核膜孔複合体と前駆体と考えられる核膜孔複合体を染め分けた。2500 以上の画像データから、独自のアルゴリズムで pore-free 領域の自動抽出を行うことに成功した (図 13)。抽出した pore-free 領域には核膜孔複合体前駆体と考えられる輝点が検出

され、その位置情報を定量解析した。その結果、間期核膜孔複合体が形成される核膜上の場を制御するメカニズムの存在を示唆する結果が得られた（投稿準備中）。

3. 細胞核の機能的構造構築

3-a Ki-67 抗原の機能解析（高木）

Ki-67 抗原は細胞増殖マーカーとして汎用されている核小体タンパク質である。分裂期において Ki-67 抗原は染色体周囲に層状の構造を形成し、そこへ多くの核小体タンパク質が集積する（高木ら、2014）。Ki-67 抗原の分裂期における機能を探るために、ヒト HCT116 細胞をゲノム編集により改変し、内在性 Ki-67 抗原の C 末にオーキシン誘導性タグロンを付した。この細胞を細胞周期同調した上でオーキシン処理することで、Ki-67 抗原を細胞周期特異的に迅速に分解除去することが可能となった。この実験系を利用して、Ki-67 抗原が分裂期染色体に特徴的な棒状構造の形成および維持に寄与することを示した。また Ki-67 抗原が分裂期特異的に II 型トポイソメラーゼと相互作用することを生化学的に示した（高木ら、2016）。

3-b 哺乳類細胞のテロメアラギング鎖合成の分子メカニズムの解析（水野）

哺乳類細胞のゲノム恒常性の維持機構を理解する上で重要な染色体末端のテロメアの維持機構に注目し、テロメアのラギング鎖合成の分子機構の解明を目指した。マウスのシェルタリン複合体中の一本鎖結合タンパク質 pot1 と DNA ポリメラーゼ α との相互作用の生化学的理解を進めた。マウスに存在する Pot1 の類縁体の pot1a と pot1b との違いを丁寧に比較したところ pot1b が DNA ポリメラーゼ α の触媒サブユニットの p180 の N 末により強く結合する事が判明した。一方 pot1b の特異的抗体を作成し、p180 と細胞核内で共局在する事を duolink 法により、検出できた。pot1a, pot1b 共に p180 とテロメア上で相互作用する事がわかった。

3c ヒト複製開始機構の解析 Mcm10 の機能ドメインの同定（水野泉仁科加速器センター生物照射）

Mcm10 は出芽酵母で最初に発見された DNA 複製に必須のタンパク質で、種を超えて真核生物で保存されている。ヒトの Mcm10 タンパク質は、DNA に結合するほか、DNA 複製に関わる複数のタンパク質と結合することが報告されていたが、DNA 複製反応の場で他のタンパク質とどのように結合しているのか、また、その機能については統一的理解が得られていなかった。そこでヒト細胞から精製した Mcm10 が、DNA ヘリカーゼと結合していることを発見した。また、様々な Mcm10 断片を用いた解析から、Mcm10 が分子の中央付近の領域で Mcm2-7 複合体と結合していること、Mcm2-7 複合体を介してクロマチンに結合していること、そしてこの領域が DNA 複製反応に重要であることを示した。さらに、細胞内の Mcm10 タンパク質を減少させたところ、DNA 複製開始頻度が低下し、DNA 複製反応の開始に至る複数のステップのうち、最終的なステップで反応が止まっていることが明らかになった。以上の結果から、Mcm10 が細胞内で DNA ヘリカーゼ（Mcm2-7 複合体）と結合し、複製開始反応の最終ステップに関与することが示唆された。

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-a1 Large-scale identification of cargo proteins specific for members of the importin- β family (Kimura, Morinaka; Imai, Horton)

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 to 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 named “SILAC-Tp” 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. The “imported molecule ratio” of a protein is defined as the unlabeled/labeled ratio normalized by that of a control reaction, and proteins with higher imported molecule ratios are candidate cargoes. Using an Orbitrap mass spectrometer, the ratios of as many as two thousands of proteins can be quantified. We have performed three replicates of SILAC-Tp with each of the 12 human import NTRs. Many known cargoes exhibited higher imported molecule ratios, ensuring the validity of the method. We selected candidate cargoes based on the specificity and sensitivity calculated from the distribution of the imported molecule ratios of known cargoes, and biochemically verified many of the novel candidates. The results elucidated the manner of cargo allocation to the NTRs. The redundancy of the NTRs varies depending on the cargo. Cargoes of the same NTR are functionally related to one another, and the cargo cohorts of NTRs include different predominant protein groups. Thus, the NTRs are linked to distinct biological processes by the nature of their cargoes.

1-a2 Analysis of the diversity of NTR-cargo interactions (Kimura, Morinaka; Imai, Tomii, Horton)

To understand why a cell provides so many importin- β family NTRs, NTR-dependent differences in the NTR-cargo interaction mode should be analyzed. Consensus NTR-binding sequences on the cargoes have been reported for a limited number of NTRs, and other NTRs should interact with varying structures of cargoes. Flexible structures of importin- β family NTRs may allow an NTR to interact with varying cargoes in different manners, but the possible interaction modes may differ depending on the NTR. As a first example, we started the analysis of the cargo interaction of importin-13 and transportin-SR, which have similar sequences but share only a small number of cargoes. Using evolutionary trace analysis and referring to known crystal structures, we predicted amino acid residues that might be critical for interaction with specific cargoes. These residues were mutagenized and the effects on the interactions with most of the highly-reliable cargoes that we have determined in our previous work are being analyzed by quantitative bead halo assay.

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). These data showed that expression of Heat shock proteins (Hsps) is up-regulated in Hikeshi-knockout HeLa cells even at normal temperature. These Hsps is generally regulated by Heat shock factor 1 (HSF1), which is activated against cellular proteotoxic stresses. Loss of Hikeshi function might induce cellular proteotoxic stress. We are proceeding with the verification.

1-b4 Analysis of Hikeshi function under cellular proteotoxic stress (Kose, Watanabe)

Hikeshi-mediated nuclear accumulation of Hsp70s was induced by treatment with MG132, a proteasome inhibitor. MG132 induced formation of stress granules (SGs) in the cytoplasm. However, this MG132-responded SGs formation was dramatically suppressed in the Hikeshi-depleted HeLa cells, resulting in facilitation of apoptosis. We will further elucidate the relationship between Hikeshi function and apoptosis.

1-b5 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, brain and brown adipose tissues (BAT) at P0, implying that Hikeshi may regulate the lung, brain and BAT formation necessary for survival of mammals. In BAT of Hikeshi-deficient mice, the expression of BAT markers was lower than wild-type. It is expected that Hikeshi may be involved in energy metabolism such as body temperature regulation in vivo. 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. In addition, the expression of Hikeshi in aged human normal fibroblast TIG cells was lower than that in young TIG cells. These results suggest that Hikeshi is involved in not only thermal stress response, but also oxidative stress response and aging in mice.

1-c Temperature dependent control of nucleocytoplasmic transport (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 including temperature rises, the detailed mechanism is unknown. Therefore, we newly developed precise temperature –controlled cell culture method. Using this, we analyzed nuclear transport pathways under various temperatures. As a result, individual transport pathways have different sensitivities to temperature rises. Especially, importin α/β dependent import was inhibited at 41.5°C whereas other Ran dependent transport pathways were not suppressed even at 43°C.

Additionally, *in vitro* studies revealed that the inhibition of importin α/β dependent import is caused by the dysfunction of importin α at much lower temperature than those of other transport factors. Thus, the thermo-sensitivity of importin α mediates selective inhibition of importin α/β dependent import.

Now, we are trying to elucidate the role of selective inhibitions for the cell survival after the stress conditions. First, we establish the cell lines that inhibited the inactivation of importin α , and compare the cell viabilities with wildtype cells. There are many proteins bearing both nuclear localization and nuclear export signals in the nucleus under normal condition. However, after exposed to high temperature, these proteins and the concomitants are expected to be relocalized to the cytoplasm. We are planning to identify these proteins using stable-isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC).

2. Studies of Nuclear Organization Focused on the Nuclear Periphery

2-a Human cells have a nuclear envelope (NE) composed of two-types of subdomains, pore-rich region and pore-free island, defined by the heterogeneous distributions of NE constituents, in particular Nuclear pore complexes (NPCs). NPCs are accumulated preferentially in pore-rich region and this heterogeneous distribution becomes homogeneous with cell cycle progression. Cyclin-dependent kinase (CDK) regulates not only such transition of NPC distribution, but also the interphase NPC assembly. Causal relationship between these two events, however, is still unclear because the solution for understanding their 'landscape' from the biological approach is yet to be reached. We here proposed a novel framework for image-based analysis to automatically determine the detailed landscape of pore-free island from a large amount of images. This resulted in discovering the NPC intermediates, the appearance frequency of which is decreased by CDK inhibition, in pore-free islands. Furthermore, we compared the spatial distribution between simulated and the observed NPC intermediates within the pore-free islands, and found that their distribution has been spatially biased. These results suggest that disappearance of pore-free island is strongly related to *de novo* NPC, and that there exist some regulatory mechanism for spatial arrangement of NPC assembly on interphase NE.

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

3-a Functional analysis of Ki67 antigen (Takagi)

Ki-67 is a nucleolar protein widely appreciated as a cell proliferation marker. During mitosis, Ki-67 is localized around mitotic chromosomes and constitutes a perichromosomal layer to which many nucleolar proteins are targeted

(Takagi et al., 2014). To assess the mitotic function of Ki-67, we generated HCT116-based cell lines in which endogenous Ki-67 was degraded conditionally and acutely via an auxin-inducible degron (AID). Using the cell lines, we demonstrated that Ki-67 aids the finalization of mitotic chromosome assembly and the maintenance of rod-shaped chromosome structures, possibly through its interaction with topoisomerase II α (Takagi et al., 2016). To address the question how the perichromosomally localized proteins such as Ki-67 might functionally cooperate with the axially localized proteins such as condensins to build individual chromosomes, we next generated a panel of HCT116-based cell lines expressing Ki-67 and/or condensin subunits that were fused with AID for their conditional degradation and with fluorescent proteins for imaging. Remarkably, ball-like chromosome clusters with no sign of discernible thread-like structures were observed in mitotic cells depleted of both Ki-67 and condensins. The observations argue that Ki-67 and condensins, which localize to the external surface and the central axis of mitotic chromosomes, respectively, have independent yet cooperative functions in supporting the structural integrity of mitotic chromosomes in mammalian cells.

3-b Molecular mechanism of telomere lagging strand synthesis to maintain telomere homeostasis (Mizuno)

Telomeric DNA at the ends of eukaryotic linear chromosomes consists of tandemly repeated G-rich sequences with a single-stranded 3'-overhang. The length of the telomeric DNA is strongly related to cellular aging and cancer. However, the detailed molecular mechanism to maintain the telomere length is still unknown. In mouse, a single-stranded telomeric DNA-binding protein mPot1a and mPot1b are involved in telomere-end protection and telomere-length regulation. Mouse DNA polymerase α (mPol α)-primase elongate telomere lagging strands. We analyzed the interaction between mPot1 and mPol α .

We found an interaction between mPot1a(314-640aa) and mPol α (1-330aa) by using yeast two-hybrid analysis as well as GST-pull down assay. In addition, circular dichroism spectra showed that the purified mPol α (1-330aa) was an intrinsically disordered protein. Next, we cloned cDNAs for mouse Pot1a and Pot1b and generated anti Pot1a or Pot1b specific antibodies. During cDNA expression experiments, we noticed that nuclear translocation of Pot1a/b is dependent on other shelterin components Tpp1 and Tin2. We, therefore, undertook immunoprecipitation experiments with shelterin subcomplex containing Pot1a/b and Tpp1 and Tin2 and polymerase p180. Finally, in order to detect *in vivo* interaction of Pot1a/b and p180, we attempted to detect co-localization of mPot1 and mPol α on telomere in NIH3T3 cells using proximity ligation assay as well as FISH. Full-length Pot1a/b interacted with full-length p180 *in vitro* and *in vivo*. Taken together, we identified pivotal molecular interactions for lagging strand synthesis at telomere in mammalian nucleus.

3-c The Mcm2-7-interacting domain of human Mcm10 protein is important for stable chromatin association and origin firing (Mizuno, Izumi)

The protein Mcm10 was originally identified as an essential yeast protein in the maintenance of mini-chromosome plasmids. Subsequently, Mcm10 has been shown to be required for both initiation and elongation during chromosomal DNA replication. However, it is not fully understood how the multiple functions of Mcm10 are coordinated or how Mcm10 interacts with other factors at replication forks. Here, we identified and characterized the Mcm2-7-interacting domain in human Mcm10. The interaction with Mcm2-7 required the Mcm10 domain that contained amino acids 530–655, which overlapped with the domain required for the stable retention of Mcm10 on chromatin. Expression of truncated Mcm10 in HeLa cells depleted of endogenous Mcm10 via siRNA revealed that Mcm10's conserved domain (amino acids 200–482) is essential for DNA replication, whereas both the conserved and the Mcm2-7-binding domains were required for its full activity. Mcm10 depletion reduced the initiation frequency of DNA replication and interfered with chromatin loading of replication protein A, DNA polymerase α , and proliferating cell nuclear antigen, while the chromatin loading of Cdc45, and DNA polymerase ϵ was unaffected. These results suggest that human Mcm10 is bound to chromatin through the interaction with Mcm2-7 and involved in the initiation of DNA replication after loading of Cdc45 and DNA polymerase ω .

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

K.M. Zulfiker Rahman

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
荘司 健太 Kenta Shoji