

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 Importin $\beta$ ファミリーによる輸送経路

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、核蛋白質の多くは importin  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  だけは 7 種類程度ある importin  $\alpha$  の一つをアダプターとして蛋白質と結合できる。) したがって、importin  $\beta$  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。今後期待される importin  $\beta$  ファミリーによる輸送の生理的な意義の解明のためには、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。これに対し我々は、昨年度までに、細胞質から核への輸送を担う 12 種類のヒト importin  $\beta$  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)を確立し、実際に多数の基質を同定して、輸送基質の機能による輸送因子の役割分担について報告した。この結果から生起する課題として今年度は、蛋白質構造の進化を視野に入れた輸送因子と基質蛋白質相互作用の多様性の解析を行い、また、輸送の調節による細胞制御機構の具体例の解析に着手した。

研究年報

### 1-a-1 Importin $\beta$ 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、佐久間、今井・富井・Horton ; 産総研)

上記の基質同定実験の結果、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、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結晶構造として報告される。ヒト細胞で 20 種類という importin  $\beta$  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、多数の基質との相互作用の解析を行った。実験系としては、基質蛋白質と輸送因子の双方を波長の異なる蛍光融合蛋白質として調製し、樹脂ビーズ上での結合量を 2 波長の蛍光強度の比として検出する改良型 bead halo assay 系を設定した。結合解析にあたり、まず、進化トレース法による解析と既知の結晶構造から、importin13 と transportinSR のうち一方でのみ進化的に保存され、かつ、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、その置換変異体を GST 蛍光融合蛋白質として調製した。そして、それらと蛍光融合基質蛋白質とのグルタチオン樹脂上での結合を、蛍光顕微鏡画像から定量解析した。進化トレース法により選出されたアミノ酸残基の多くは基質との結合に重要であることが示されたが、アミノ酸残基ごとの重要性は基質により異なる。これにより、輸送因子が多様な構造をもつ多数の基質との結合能を保持しながら進化した可能性が示唆される。

### 1-a-2 Importin $\beta$ ファミリー輸送因子の生理的機能の解明に向けた発現解析 (木村)

Importin  $\beta$  ファミリーによる輸送の生理的な意義の解明に向け、さまざまな細胞過程での輸送の調節とその作用の解析を開始した。最初の一例として、老化モデル細胞での老化誘導時の importin  $\beta$  ファミリー輸送因子 15 種類、importin  $\alpha$  ファミリーアダプター 6 種類、輸送サイクルを制御する因子 4 種類 (Ran、RanBP1、RanGAP1、RCC1) の発現変動を免疫ブロッティング法により調べた。老化誘導により発現が減少する因子と変化しない因子に大別され、老化誘導に伴い包括的な輸送制御機構が働くことが示唆された。今後、輸送基質に注目して輸送調節の作用の解析を行う予定である。

### 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  $\beta$  ファミリーと総称される運搬体分子群で運ばれると考えられている。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。これまでの我々の解析から、点変異や欠損などで Hikeshi の機能が喪失すると、ヒトやマウスなどの高等真核生物では、生後すぐに致死になったり、致命的なヒト遺伝性疾患を誘発するなど、個体レベルでは重篤な影響が見られることがわかってきた。ここでは、未だ不明な点が多い Hikeshi の細胞機能や、Hikeshi が活性化されるメカニズムを明らかにすることを目指す。

### 1-b-1 転写因子 HSF1 の活性制御における Hikeshi の機能 (小瀬、渡邊、儘田、高木)

RNA-seq 解析によって、Hikeshi ノックアウト細胞では、Hsp70 などの熱ストレスタンパク質(Hsp)の遺伝子発現が、正常温度でも亢進していることが判った。これらの Hsp は一般に転写因子 HSF1 によって誘導されることから、Hikeshi が HSF1 転写活性制御に機能している可能性が示唆された。また、HSF1 応答性プロモーター領域(熱ショック応答エレメント)を用いたレポーター遺伝子発現解析でも、Hikeshi ノックアウト細胞では、正常細胞よりもレポーター遺伝子の発現が亢進していることが確認された。Hsp70 は HSF1 に結合することによって、HSF1 の転写活性を抑制することが知られている。実際、正常温度下においても、Hsp70 は核に少し存在しているが、Hikeshi ノックアウト細胞では、Hsp70 の核集積は確認出来なかった。Hikeshi は正常温度においても、Hsp70 を核に輸送することによって、HSF1 の転写活性を制御している可能性が考えられた。

## 1-b-2 Hikeshi で制御されるヒト HeLa 細胞とヒト不死化網膜上皮細胞のストレス応答機構の解析 (Rahman, 小瀬、儘田、高木)

Hikeshiを同定した当初は、HeLa細胞のみを使ってその細胞機能を解析していた。HeLa細胞からHikeshiをsiRNAでノックダウンして熱ストレスをかけると、大部分の細胞が死滅することがわかっていた。一方、HikeshiノックアウトMEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞では、熱ストレスをかけると野生株よりも生存率が上がることがわかった。Hikeshiノックアウトで見られたHeLa細胞とMEF細胞のストレス感受性の違いが、ヒトとマウスの違いではなく、癌細胞と正常細胞の違いである可能性を考えて、ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いて、子宮頸がんHeLa細胞と正常細胞に近いhTERT-RPE1細胞 (不死化網膜色素上皮細胞) のHikeshiをノックアウトして、それぞれの細胞のストレス感受性を調べた。両細胞とも、正常時における細胞増殖はHikeshiノックアウトで影響を受けない。また、Hikeshiをノックアウトすると、ストレスで誘導されるHsp70の核局在が強く阻害される。しかし、HikeshiノックアウトHeLa細胞では、熱ストレスをかけると、野生株に比べて生存率が下がってストレス感受性になる。それに対して、HikeshiノックアウトhTERT-RPE1細胞では、熱ストレスをかけると、野生株より生存率が上がってストレス耐性になる。ユビキチン・プロテアソーム阻害剤であるMG132を添加したときも、Hikeshiをノックアウトすると、HeLa細胞は死にやすく、hTERT-RPE1細胞の生存率は上がる。つまり、HeLa細胞とhTERT-RPE1細胞で見られるHikeshi欠損の影響は、熱ストレスだけでなく、タンパク質毒性ストレスに普遍的であることがわかる。

次に、アポトーシス活性を調べた。細胞にMG132を添加して、細胞にタンパク質毒性ストレスをかけると、HikeshiをノックアウトしたHeLa細胞は、野生株に比べてアポトーシス活性が上昇するのに対して、HikeshiノックアウトhTERT-RPE1細胞は、野生株に比べて逆にアポトーシス活性が低下することがわかった。熱ストレスをかけたときも、スタウロsporinで処理したときも、HikeshiノックアウトHeLa細胞は野生株に比べてアポトーシス活性が上昇し、HikeshiノックアウトhTERT-RPE1細胞は野生株に比べてアポトーシス活性が低下する。このことから、タンパク質毒性ストレスをかけると、Hikeshiを欠損したHeLa細胞とhTERT-RPE1細胞のアポトーシス活性が逆転することがわかる。

Hikeshiをノックアウトすると変化する2つのタンパク質に着目した。一つは転写因子 Heat Shock Factor 1 (HSF1)である。一般に、どの細胞でも熱ストレスで転写因子 HSF1 が活性化し、ストレスが鎮まると不活性化する。HikeshiノックアウトHeLa細胞では、熱ストレスをかけると野生株と同様に HSF1 は活性化されるが、熱ストレスを解除しても、野生株のように不活性化されない。一方、HikeshiノックアウトhTERT-RPE1細胞では、HeLa細胞ほどには HSF1 不活性化の遅延は見られない。このことから、hTERT-RPE1細胞では、Hikeshiをノックアウトしても、HeLa細胞のように“ストレス状態”が続かないのかもしれない。もう一つ着目した因子は癌抑制遺伝子 p53 である。Hikeshiをノックアウトすると、HeLa細胞もhTERT-RPE1細胞も、癌抑制遺伝子 p53 の発現が亢進する。ただし、hTERT-RPE1細胞では、p53 の発現亢進に伴って p21 の発現亢進が強く見られるのに対して、HeLa細胞では、p21 の発現亢進は見られない。熱ストレスでも、p53 の発現亢進が HeLa細胞とhTERT-RPE1細胞の両方で見られ、p21 の発現亢進はhTERT-RPE1細胞だけで見られる。この、p53-p21 の発現亢進が、Hikeshi欠損によるストレス感受性・耐性の違いが見られる一つの原因であろうと考えている。transactivation 活性のない p53 が HeLa細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。一方で、hTERT-RPE1細胞では、抗アポトーシス活性をもつ p21 が p53 の作用で誘導されるため、それがストレス耐性になる一因ではないかと考えている。

## 1-b-3 Hikeshi の機能解析\_ノックアウトマウスの利用 (儘田、米野)

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 (以下 Hikeshi KO) マウスを作成した。

Hikeshi KO 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。Hikeshi KO 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。また、Hikeshi KO マウスの胎生期 14.5 日胚から MEF を採取し解析を行っている。Hikeshi KO MEF では、熱ストレス時の HSP70s の核局在が見られなかった。細胞増殖能を調べると、20%酸素濃度 (大気) 培養下では野生型 MEF と比べて

Hikeshi KO MEF の細胞増殖能の低下が見られるものの、3%酸素濃度（低酸素）培養下では野生型 MEF の細胞増殖能と同程度であった。一旦、3%酸素濃度で培養していた MEF を 20%酸素濃度下で培養すると、野生型では培養後 3 時間後には HSP70s がわずかに核に局在することがわかった。しかし Hikeshi KO MEF では、このような酸素濃度の上昇による HSP70s の核局在は見れなかった。20%酸素濃度培養下では Hikeshi KO MEF は野生型 MEF よりも PDL が低下して、早期に老化マーカーである Senescence-associated beta-galactosidase が検出された。さらに老化したヒト正常線維芽細胞 TIG 細胞では、熱ストレスによる Hsp70 の核局在がおこらない。これらの結果から Hikeshi は熱ストレス応答だけでなく酸化ストレス応答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℃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。まず、HSP70s の核移行がより低い温度で開始し、続いて importin  $\alpha/\beta$  依存的輸送の停止、さらに高温において他の Ran 依存的輸送が抑制された。

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  $\alpha 1$  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  $\alpha 1$  が温度変化を直接感知し、importin  $\alpha/\beta$  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（投稿中）。

これまでに解析を行った importin  $\alpha 1$  は HeLa 細胞のような癌細胞では最も発現していることが分かっているが、importin  $\alpha$  はヒトにおいて 7 種類のサブタイプが存在する。そこで、これらの温度感受性を Thermal shift assay を用いて検証した。その結果、2 種類のサブタイプだけが、非常に熱安定性が高いということが分かった。このことから、この 2 種類のサブタイプが熱などのストレス応答に重要な働きをしていることが示唆された。現在、これらに特異的に輸送される核蛋白質の同定を試みている。

## 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や dynamics の解析を進めている。

### 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、小川：横田、竹本、西村；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。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。このような、膨大な画像データから自動解析する定量的画像解析フレームワークの確立を誌上発表した。

### 3. 細胞核の機能的構造構築

#### 3-a Ki-67 抗原が分裂期染色体構築に寄与する分子機構（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デグロンを付した。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 抗原を細胞周期の特定のタイミングで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）。Ki-67 抗原が分裂期染色体構築に寄与する分子機構をより具体的に理解するために、今年度は Ki-67 抗原とコンデンシン複合体との関係性に焦点を当て研究を展開した。ここでもゲノム編集およびオーキシン誘導性デグロンを活用し、個々の関連因子を単独で、または複数の関連因子群を同時に分解除去できる細胞株を多数樹立した。Ki-67 抗原とコンデンシン複合体とを同時に除去することにより、分裂期染色体の特徴的な棒状の形態が失われ、また個々の染色体間の境界が識別できなくなった。この時の染色体形態が Ki-67 抗原またはコンデンシン複合体のみを除去した際に構築される分裂期染色体の形態とは異なることを、機械学習アルゴリズムの利用により定量的に示した（高木ら、2018）。分裂期染色体の構築が「コンデンシン複合体により内側から、Ki-67 抗原により外側から支持されている」というモデルを提出した。

#### 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  $\alpha$  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  $\alpha$  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、pot1b はマウス NIH3T3 細胞核内でテロメアに局在することをテロメア FISH と同時染色により見出した。さらに、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。

#### 3-c 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。そして、Mcm10 を siRNA によりノックダウンしたところ、複製開始頻度が低下したが、複製フォークの伸長速度には変化がなかった。また、このときに、Orc、Mcm2-7、DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$ 、Cdc45 のクロマチン結合量は変化しなかったが、複製開始後にリクルートされる RPA や DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  のクロマチン結合量は顕著に低下した。以上の結果は、Mcm10 が CMG 複合体形成の後にクロマチンにリクルートされ、複製開始に関与していることを示唆している。（泉ら、2017）

-----  
**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 Diversity of importin- $\beta$  family nucleocytoplasmic transport receptor (NTR)-cargo interactions (Kimura, Sakuma; Imai, Tomii, Horton)

The human genome encodes 20 species of importin- $\beta$  family NTRs, and they transport most nuclear proteins across the nuclear envelope. Since the nucleocytoplasmic transport of proteins is essential for various cellular processes, the cargo allocation to each NTR should be clarified in order to understand the physiological significance of the transport. Until last year, we had 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, and identified cargoes specific to each of the 12 human NTRs. The results elucidated the manner of cargo allocation to the NTRs, in which the redundancy of the NTRs varies depending on the cargo, and it raised a new question on NTR-dependent differences in the NTR-cargo interaction mode. Actually, 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. As a representative 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 had identified were analyzed by quantitative bead halo assay, in which the binding between a GFP-cargo and a GST-mCherry-NTR on GSH-Sepharose beads is analyzed by fluorescence microscopy. Many of the examined mutations on the NTRs affected the binding differently, and the significance of the residues varied depending on the cargo, indicating the diversity of the binding modes.

### 1-a2 NTR protein expression levels in model cell systems (Kimura)

The results of our cargo identification showed that the cargoes of the same NTR are functionally related to one another, and that 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. As the first step to demonstrating the significance of transport regulation in cellular processes, we began to analyze the protein levels of NTRs using model cell systems. For example, we analyzed the levels of importin- $\beta$  family NTRs, importin- $\alpha$  adapters, and regulatory factors during senescence induction by immuno-blotting. The result suggested a global regulation of transport activity during the induction. We are planning to analyze on the cellular localization of cargoes during the induction.

### 1-b1 Functional regulation of Hikeshi in the transcription activity of HSF1 (Kose, Watanabe, Mamada, Takagi)

We have previously investigated gene expression profiles during heat stress and recovery in wild type and Hikeshi-knockout HeLa cells by RNA-seq. These data showed that expression of Heat shock proteins (Hsps) such as Hsp70 is up-regulated in Hikeshi-knockout HeLa cells even at normal temperature. These expressions of Hsps is generally regulated by Heat shock factor 1 (HSF1). In the reporter gene expression analysis using the HSF1 responsive promoter region, it was also confirmed that the expression of the reporter gene in Hikeshi-knockout cells was higher than that in normal cells. It is known that Hsp70 inhibits the HSF1 transcriptional activity by binding to HSF1. Hikeshi may control the transcriptional activity of HSF1 by transporting Hsp70 to the nucleus even at normal temperature.

### 1-b2 Analysis of mechanism of Hikeshi modulating stress sensitivity in human HeLa and hTERT-RPE cell (Rahman, Kose, Mamada, Takagi)

Hikeshi mediates the heat stress-induced nuclear import of heat shock protein 70 (HSP70s: HSP70/HSC70). Dysfunction of Hikeshi causes some serious effects in humans, however, the cellular function of Hikeshi is largely unknown. Here, we investigated the effects of Hikeshi depletion on the survival of human cells after proteotoxic stress, and found opposite effects in HeLa and hTERT-RPE1 (RPE) cells; depletion of Hikeshi reduced the survival of HeLa cells, but increased the survival of RPE cells in response to proteotoxic stress. Hikeshi depletion sustained heat shock transcription factor 1 (HSF1) activation in HeLa cells after recovery from stress, but introduction of a nuclear localization signal-tagged HSC70 in Hikeshi-depleted HeLa cells downregulated HSF1 activity. In RPE cells, the HSF1 was efficiently activated, but the activated HSF1 was not sustained after recovery from stress, as in HeLa cells. Additionally, we found that p53 and subsequent upregulation of p21 was higher in the Hikeshi-depleted RPE cells than in the wild-type cells. Our results indicate that depletion of Hikeshi renders HeLa cells proteotoxic stress-sensitive through the abrogation of the nuclear function of HSP70s required for HSF1 regulation. Moreover, Hikeshi depletion upregulates p21 in RPE cells, which could be a cause of its proteotoxic resistant.

### 1-b3 Analysis of Hikeshi Knockout mice (Mamada, 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<sup>4234SB</sup> 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 concentration culture conditions, the growth rate of Hikeshi-deficient MEFs was decreased compared with wild-type cells. However, under 3% oxygen concentration culture conditions, the growth rate of Hikeshi KO MEFs were similar to that of WT MEFs. When culture conditions were changed from 3% oxygen concentration to 20% oxygen concentration, the nuclear translocation of HSP 70s was observed after 3 hours in WT MEF cells, but in Hikeshi KO MEF cells that was not. 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. Nuclear translocations of molecular chaperon HSP70s occur at a much lower temperature than the inhibition of Ran-dependent transport. Subsequently, importin  $\alpha/\beta$  dependent import ceases at a lower temperature than other Ran-dependent transport, suggesting that these are controlled by independent mechanisms. Additionally, *in vitro* studies revealed that the inhibition of importin  $\alpha/\beta$  dependent import is caused by the dysfunction of importin  $\alpha 1$  at much lower temperature than those of other transport factors. Thus, the thermo-sensitivity of importin  $\alpha 1$  mediates selective inhibition of importin  $\alpha/\beta$  dependent import (Now submitting).

Importin  $\alpha$  family has 7 subtypes in human. Importin  $\alpha 1$  is known as a most highly expressed subtype in cancer cells like HeLa cells. We next tried differences of thermo-sensitivities of importin  $\alpha$  subtypes using a thermal shift assay. As a result, only two subtypes were much more stable than other subtypes under high temperatures. This implies that these two subtypes play important roles for stress responses. Now, we are trying to identify the specific import cargoes.

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

2-a A statistical image analysis framework for pore-free islands derived from the heterogeneity distribution of nuclear pore complexes (Mimura, Takemoto, Tachibana, Ogawa, Nishimura, Yokota)  
Nuclear pore complexes (NPCs) maintain cellular homeostasis by mediating nucleocytoplasmic transport. Although NPC assembly in interphase is dictated by cyclin-dependent kinases (CDKs), it is unclear where NPCs are assembled on the nuclear envelope. CDKs also regulate the disappearance of pore-free islands, which are nuclear envelope subdomains; this subdomain gradually disappears in response to CDK activity, as NPC distribution becomes homogeneous. However, a causal relationship between pore-free islands and NPC assembly remains unclear. Here, we elucidated mechanisms underlying NPC assembly from a new perspective by focusing on pore-free islands. We proposed a novel framework for image-based analysis to automatically determine the detailed ‘landscape’ of pore-free islands from a large quantity of images, leading to the discovery that NPC intermediates appear in pore-free islands with an increased frequency in response to CDK activity. Comparing the spatial distribution between simulated and the observed NPC intermediates within the pore-free islands, we found that their distribution was spatially biased. These results suggested that the disappearance of pore-free islands is strongly related to *de novo* NPC assembly and indicated the existence of specific



regulatory mechanisms for the spatial arrangement of NPC assembly on nuclear envelopes.

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

#### 3-a Functional analysis of Ki67 antigen (Takagi)

#### 3-a The molecular mechanism on which Ki-67 antigen contributes to mitotic chromosome assembly (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 $\alpha$  (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 (Takagi et al., 2018). 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  $\alpha$  (mPol $\alpha$ )-primase elongate telomere lagging strands. We analyzed the interaction between mPot1 and mPol $\alpha$ .

We found an interaction between mPot1a(314-640aa) and mPol $\alpha$ (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 $\alpha$ (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 $\alpha$  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  $\alpha$ , and proliferating cell nuclear antigen, while the chromatin loading of Cdc45, and DNA polymerase  $\epsilon$  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  $\epsilon$  (Izumi *et al.* 2017).

***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  
儘田 博志 Hiroshi Mamada  
渡邊 愛 Ai Watanabe

***Students***

Rahman Khondoker MD Zulfiker

***Assistant***

佐久間 (細野) 美子 Yoshiko Sakuma  
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