

## 今本細胞核機能研究室

主任研究員 今本 尚子 (Ph.D.)



### (0) 研究分野

分科会: 生物

キーワード: 核-細胞質間輸送、核膜孔複合体、インポートイン、Hikeshi、細胞ストレス

### (1) 研究背景と研究目標

核と細胞質の隔たりは真核生物の基礎であり、その隔たりを制御するのが核膜孔を介した核-細胞質間輸送である。核-細胞質間輸送はさまざまな細胞プロセスに関わる細胞内反応であり、細胞の恒常性維持を支える基礎であるとともに、発生・分化や疾患などの高次生命機能にも深く影響する。核-細胞質間輸送研究では、輸送反応の基本メカニズムが解明されており、最近になって輸送装置である核膜孔複合体の原子レベル構造情報が蓄積されてきているなど、研究の進展は著しい。その一方で、細胞内に存在する輸送経路多様性の問題は混沌としている。膨大な数の分子が核膜孔を絶え間なく流通しているが、それらが、多数の異なる運搬体で分担されて輸送されている。大部分の分子はImportin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が、それぞれの運搬体が何を運び、一つの細胞内に何故これほど多くの輸送経路が存在する意味があるのかといった基本的な問題が明らかになっていない。我々は核-細胞質間輸送の“輸送経路多様性”の問題に多角的に取り組むことで、核-細胞質間輸送で制御されるさまざまな細胞プロセスを具体的に示していきたいと考えている。

### (2) 2020年度成果と今後の研究計画(中長期計画2025年度まで)

#### (A) ヒト細胞におけるImportinファミリー輸送経路の機能解析

私たちは、特定の輸送経路で核内へ輸送される基質タンパク質を同定する技術を使って、12のImportinβファミリー核内輸送運搬体の大規模基質同定を行うことで、Importinファミリーが構成するヒト細胞の核内輸送経路全てを網羅した。その結果、同定された基質候補其々の機能を見ると運搬体には分担制があること、また、一つの運搬体分子が共通配列を持たない多くの輸送基質を運ぶことがわかった。本年度は、昨年度に続いて、一つの運搬体が共通配列を持たない基質を特異的に認識するメカニズムの解析を進めた。基質結合部位の特徴を解析するため、一次構造上の相関性が高いにもかかわらず共通基質が少ないTransportin-SRとImportin-13の2つの運搬体について、基質・運搬体結晶構造と進化トレース法を利用して、

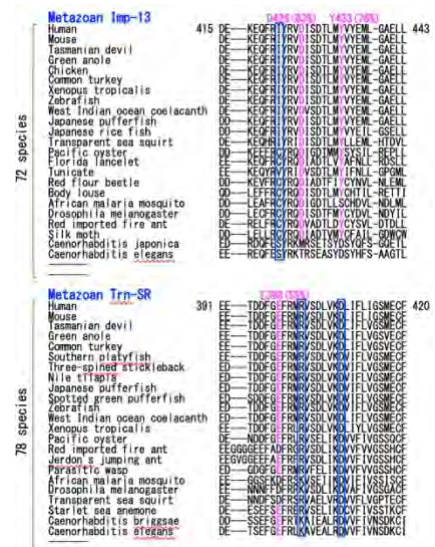
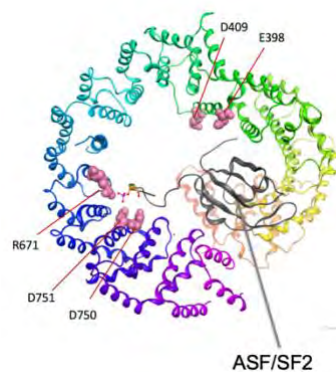


Fig.1 進化トレース 右: 両運搬体の一方にのみに保存されたアミノ酸残基の特定例 (D426, Y433, E398)、高いKL-valueを持つ。左: KL-valueでピックアップしたアミノ酸5個を、既に報告されているTrans-SR・ASF/SF2 (運搬体・基質)の共結晶構造にマッピングした下: KL-valueでピックアップしたアミノ酸5個を、既に報告されているTrans-SR・ASF/SF2 (運搬体・基質)の共結晶構造にマッピングした。

それぞれ運搬体の基質結合に寄与すると考えられるアミノ酸をピックアップした(図1)。そのアミノ酸に変異を加えて、我々が同定した基質候補と総当たりで結合解析を行った。結合に関与する運搬体上のアミノ酸残基の違いによって基質タンパク質をグループ分けして、構造情報を解析した。運搬体-基質の結合様式には、従来考えられていたような基質上の共通配列と運搬体分子上の特定部位の定型的な結合を遥かに超えた多様性があり、運搬体-基質の特異性決定は予想以上に複雑であることがわかった(産業総合研究所との共同研究、論文revise中)。

**今後の計画** 細胞の分化や老化が誘導できる様々な細胞モデル系を用いて、運搬体の発現情報と、発現変化する運搬体の基質情報を組み合わせて解析することで、輸送の制御による細胞分化・細胞老化誘導のメカニズムを明らかにする。

### (B) Hikeshi輸送経路の機能解析

私たちは、Importin核-細胞質間輸送が低下するときストレス時に、分子シャペロンHsp70を核に運ぶ運搬体分子を見つけてHikeshiの名付けた。Hikeshiは酵母から高等動植物に至るまで、真核生物で広く保存されたタンパク質だが、どの生物種においてもその機能は明らかにされてこなかった。ヒトとマウスのHikeshi機能の解析を進めると、Hikeshiの機能が損なわれることで、細胞と個体レベルで様々な影響が見られることがわかった。例えば、Hikeshiが欠損すると細胞の正常な熱ストレス応答が崩れ、Hikeshiノックアウトマウスは致死になり、Hikeshiの点変異は、白質ジストロフィーというヒト遺伝子疾患を誘引することがわかった。Hikeshiが何故こうした多彩な影響を及ぼすのかを知るヒントを得るため、

様々なHikeshiノックアウト細胞（Hikeshi KO HeLa細胞、hTERT RPE 1細胞、MEF細胞）の遺伝子発現プロファイルをRNA seqで解析した。その結果、Hikeshiをノックアウトするだけで、ストレスをかけなくても転写因子HSF1のターゲット遺伝子群が緩やかに発現上昇することがわかった（図2）。正常時のHsp70の細胞内局在を注意深く観察すると、熱ストレスをかけなくてもHikeshiは正常時でもHsp70を核に運ぶことがわかった。Hsp70にSV40T抗原の核局在化シグナルを付加して、Hsp70を人為的に核に送り込むと、Hikeshiノックアウトで発現上昇するHSF1のターゲット遺伝子群の発現が低下する。また、Hikeshiノックアウトで活性化したHSF1の活性が、Hsp70を核に送り込むことで低下することも確認した。Hikeshiが欠損すると、ストレスをかけなくてもタンパク質の恒常性（proteostasis）が緩やかに崩れると考えられる。

**今後の計画** 1) 核内Hsp70がHSF1の活性制御に寄与するメカニズムを明らかにする。2) タンパク質毒性ストレスでHikeshi輸送経路が活性化する分子メカニズムを明らかにしていく。3) ゲノムワイドにHikeshi遺伝子と相互作用する遺伝子を同定する。4) 疾患モデルマウスの作成を通して、Hikeshi点変異で白質ジストロフィーが誘発されるメカニズムを明らかにする。

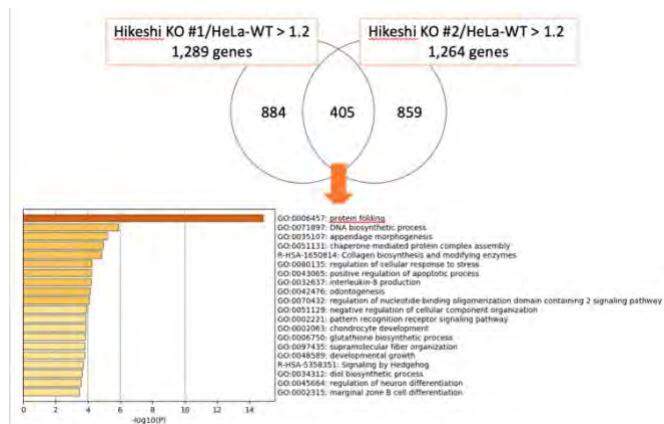


Fig. 2 Hikeshiが欠損するとHSF1ターゲット遺伝子群の発現が緩やかに上昇する。GO解析すると、これらの遺伝子の多くはprotein folding 遺伝子であることがわかった。

### (3) 研究室メンバー

(主任研究員)

今本尚子

(専任研究員)

小瀬真吾、高木昌俊、木村誠、水野武

(研究員)

小川泰

(2020年度)

(テクニカルスタッフ)

渡邊愛、米野久栄、本橋祥子

(アシスタント)

徳久有子、高野雅栄

### (4) 発表論文等

1. Imamoto N, Kose S “Functional Analysis of Nuclear Transport Factor Hikeshi” in Symposium, a new frontier in stress-responsive signal transduction 第43回日本分子生物学会年会 (MBSJ2020)
2. Ogawa Y 特許申請管理番号: 09215-JP、発明の名称: 核可溶性タンパク質の新規分画法、出願番号: 2020-200641、出願日: 2020/12/2

Laboratory Homepage

[https://www.riken.jp/research/labs/chief/cell\\_dyn/index.html](https://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_dyn/index.html) , <http://www2.riken.jp/celldynamics/index.html>