



(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、インポーター、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) 2021年度成果と今後の研究計画

(A) 新規の核画分タンパク質の取得方法の構築

細胞を生化学的に分画して、細胞質画分と核画分を得ることは多くの研究室で日常的に行われている汎用研究法である。しかし、これまでの方法では、可溶性の核タンパク質を核画分に正確に回収することが困難であった。理由は、1) 細胞膜を可溶化する操作で核膜が傷つくため可溶性核タンパク質が漏れる、2) 細胞を低温で取り扱ふと核-細胞質間輸送が止まるため核内因子が細胞質に漏れる、3) 核膜が傷つかなくとも核膜孔から自由拡散できる小さな分子は細胞質に漏れ出る、の3点が挙げられる。これらの問題を克服するために、従来のホモジナイザーや低張液を用いた方法ではなく、細胞膜に豊富なコレステロール特異的な界面活性剤であるジギトニンを用いた方法を基礎に最適化し、1.5mlチューブ当たり1X10⁷個のHeLaS3細胞を90%以上の効率で透過処理できるまで引き上げることができた(Fig1)。その他、A549やMCF7等の一般的な培養細胞でも同程度の効率で処理できることを確認し、多くの実験への応用が可能であることがわかった。膜を可溶化する操作は室温で行う。さらに、透過処理の際、核膜孔を通して流出する低分子量核タンパク質群を核内に閉じ込めるため、ジギトニンにWGA(小麦杯芽アグルチニン)を加えて処理を行うことにより、細胞膜の透過と核膜孔透過の遮断を同時に行える方法を確立した。得られた核画分の組成を網羅的な質量分析によって分析してみると、WGAの添加によって低分子量タンパク質が本来の局在により

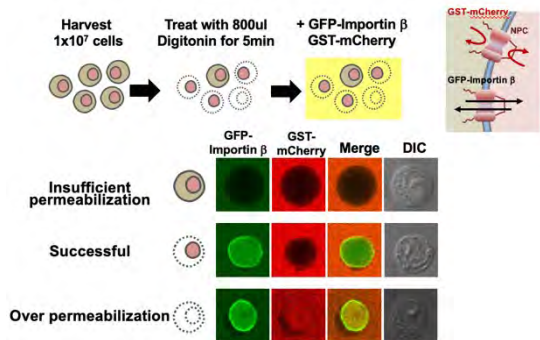


Fig.1 核膜孔通過の性質の違うタンパク質の局在を指標に細胞膜を特異的に透過処理できる条件を設定した。

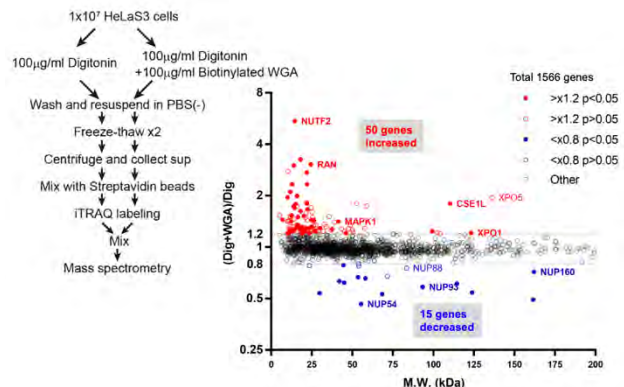


Fig.2 核画分の組成を網羅的な質量分析(左図)によって分析した結果(右図)。WGA添加によって低分子量タンパク質が核画分に回収され、本来の局在を反映する。

得られた核画分の組成を網羅的な質量分析によって分析してみると、WGAの添加によって低分子量タンパク質が本来の局在により

近い状態で分画できることを確認した(Fig2)。市販の分画キットでは、多くの場合可溶性核タンパク質が細胞質画分に流出したのに対し、今回構築した方法では流出を最小限に抑えられていることが分かった。さらに、本来不溶性であるタンパク質の溶出も見られず、より正細胞の状態に近く高純度に核可溶性タンパク質画分が得られた。これらの技術について、理研鼎業を通して、国内と国外の特許出願を行うとともに、投稿論文が受理された。

今後の計画 確立した分画手法を用いて、昨年度までおこなっていた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を進める。また、核輸送因子Importin α の熱感受性によって影響を受ける輸送基質の同定と、Importin α の安定性に寄与する因子の同定を進める予定である。

(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は真核生物に進化的に保存されている因子だが、その機能が明らかにされていない。私たちは、主にヒト培養細胞を用いてHikeshi機能の解析を進めているが、Hikeshiの機能(Hsp70の核内機能)を包括的に理解するため、分裂酵母を利用したHikeshiと合成致死になる遺伝子のスクリーニングをおこなった。分裂酵母のおよそ4000のnon-essential genesを対象に、ハイスループット遺伝子相互作用マッピング(PEM)システム(Roguev他、Cold Spring Harb. Protoc. 2018)を利用した。

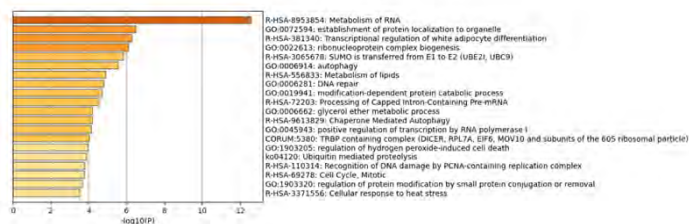


Fig.3 同定した238遺伝子のGO解析結果 (Metascape)

Hikeshiと合成致死になる遺伝子は予想に反して多かった。2つのHikeshiノックアウト株を用いて一通りの解析を終えたときに、ポジティブとしてピックアップした合成致死候補遺伝子は334であった。その中で、ライブラリーに記載されたこれらの合成致死候補遺伝子を確認した上で、その遺伝子が合成致死になることを再度の解析で再現性を確認した。その結果、238合成致死遺伝子を同定した。その多くにヒトホモログが存在することも確認した。GO解析を行うと、RNAメタボリズム関連遺伝子が濃縮されていた (Fig3)。

今後の計画 同定した合成致死遺伝子のヒトホモログを用いて、ヒト細胞でHikeshiとの関係を明らかにしていく。また、昨年度明らかにした、核内Hsp70によるHSF1の活性制御メカニズムの解析を終える。また、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と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に踏み込みたい。

(3) 研究室メンバー

(2021年度)

(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

(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

- Kimura M, Imai K, Morinaka Y., Hosono-Sakuma Y., Horton P., Imamoto N. “Mutations in importin- β family nucleocytoplasmic transport receptors transpotin-SR and importin-13 differentially affect binding to respective cargoes.” *Sci. Rep.* 11, 15649, 2021.
- Ogawa Y, Imamoto N. “Methods to separate nuclear soluble fractions reflecting localizations in living cells” *iScience*, 24, 103503, December 17, 2021.
- Sung D., Takagi M, Jung C, Lee H, Cho DH, Shin JY, Ahn K, Hwang J, Nam D, Kohmura Y, Ishikawa S, Noh DY, Imamoto N, Jeon JH, Song C. “Stochastic chromatin packing of 3D mitotic chromosomes revealed by coherent X-rays.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2109921118, 2021.
- Mizuno T., Hirabayashi K., Miyazawa S., Kobayashi Y., Shoji K., Kobayashi M., Hanaoka F., Imamoto N., Torigoe H. “The Intrinsically disordered N-terminal region of mouse DNA polymerase

alpha mediates its interaction with POT1a/b at telomeres” *Genes Cells* 26, 360-380, 2021.

Laboratory Homepage

https://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_dyn/index.html , <http://www2.riken.jp/celldynamics/index.html>