

今本細胞核機能研究室 Cellular Dynamics Laboratory

主任研究員 今本 尚子
IMAMOTO, Naoko

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だ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と細胞質間の情報交換の仕組み、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。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。また、核と細胞質間の情報交換を担う分子過程を、様々な細胞機能を制御する1つの大きなシステムとして捉えようとする試みをはじめようとしている。

1. 核 細胞質間分子輸送システム

(1) 核-細胞質間分子輸送システムの新たな作用点：分裂期染色体構築への寄与(田原^{*4}・高木・前島・小瀬・今本)

真核細胞には、核膜で隔てられた細胞質(タンパク質合成の場)と細胞核(遺伝子機能の場)の間で情報分子を流通させるための核-細胞質間輸送システムが存在する。これまで、細胞分裂間期におけるこのシステムの担い手や、分子流通のメカニズムやその制御機構についての解析をおこなってきた。

私たちは最近、importin と importin で核内に輸送される基質として同定したクロモキネシン Kid/Kinesin-10 が、importin を介して importin に結合するとはじめて分裂期染色体にターゲットし、染色体上で局所的に産生される低分子量 GTPase RanGTP に共役して分裂期染色体上に蓄積していくことを見つけた。Kid は DNA 結合活性をもつモータータンパク質で、分裂期染色体腕を分列面へと押し上げる機能があることが知られている。RanGTP の作用は、染色体にターゲットした Kid から importin と importin を解離させることで、染色体上の必要な場所に必要量の Kid を乗せることにあると思われる。全体の反応を見ると、間期で見られるのと全く同じ輸送のサイクルにのって、Kid が分裂期染色体にローディングされることがわかる。これは、核-細胞質間輸送システムが核膜のない細胞分裂期で、染色体の構築と機能の制御に寄与するという、思いがけない可能性を示す最初の例である(Tahara et al., J. Cell Biol., 2008)。

私たちが見つけたこの現象から、核膜のない分裂期細胞内で、運搬体と基質の相互作用がどのように「時空的に制御されるのか」といった疑問が改めて浮かび上がってくる。また、importin ファミリーが、1万分子種にも上る因子と結合することを考えると、様々な因子の分裂期染色体へのローディングにも、Kid の例に見られるように、核-細胞質間輸送システムが積極的に関与するものと思われる。この研究は東大医科研・山本雅教授の研究グループと、阪大微研・今本文男教授の研究グループとの共同研究である)。

(2) 分子シャペロン heat shock cognate 70 (Hsc70)の核内移行の分子機構の解析(小瀬・横山^{*7}・今本)

分子シャペロン hsc70 は、熱ショックなどのストレスに反応して細胞質から核に移行する。我々は、以前、hsc70 が核内に移行することにより、核-細胞質間運搬体分子 importin ファミリー (importin や transportin など)の核から細胞質へのリサイクリングが促進されることを示した(Kose et al., J. Cell Biol. 2005)。しかし、その分子機構は不明であり、hsc70 の核内移行機構の詳細も不明であった。そこで、我々は、hsc70 の熱ショック応答による核内移行を解析する in vitro 系を構築し、hsc70 の核内輸送機構の解析を行ってきた。Hsc70 の核内移行は、細胞抽出液並びに ATP/GTP に依存し、かつ GTP 型 Ran により阻害されることが判った。本年度は、hsc70 の運搬体分子の同定を試みた。

運搬体 importin ファミリー分子は弱いイオン強度下でも疎水性カラムに効率よく吸着する。よって、疎水性カラムを用いると、細胞抽出液から簡便かつ比較的高い選択性で importin ファミリー分子群を吸収することができた。この運搬体分子欠損細胞抽出液に特定のリコンビナント運搬体分子タンパク質を加えることで、任意の輸送経路を in vitro 輸送系で再構築することが可能になった。この解析系を用いて、hsc70 の核内輸送活性を全ての核内運搬体分子について解析した。しかし、どの運搬体分子を加えても、効率の良い hsc70 の核内移行は観られなかった。生化学的な分画実験からも、Hsc70 の核内移行は importin ファミリーに依存しないことが強く示唆された。これらの結果は、hsc70 の核内輸送は、Ran 依存的であるにも関わらず、importin ファミリー非依存的事であることを強く示唆している。このような輸送経路はこれまでに報告がなく、現在、hsc70 の運搬体分子の生化学的分離精製を進めている。

(3) 1分子可視化技術を利用した核膜孔複合体と運搬体分子の相互作用の解析(今本、徳永・十河:理研 RCAI)

顕微鏡の視野に細胞の厚みよりも薄い光(厚み 7~10 ミクロン程度)でスポット照明する薄層斜光照明法を開発し、核膜孔複合体と運搬体分子の相互作用を調べた。核膜孔複合体は、500~1000 個のポリペプチド鎖から形成される、総重量~66MD にもおよぶ巨大なタンパク質複合体である。GFP に結合した運搬体 1 分子と、その運搬体を結合させた核膜孔複合体の蛍光強度の定量的解析をおこなった。その結果、アセンブルした1つの核膜孔複合体に、およそ百~2百分子の運搬体分子が結合すること、また、核膜孔複合体と運搬体分子の結合定数が 1nM 以下から数十 nM と極めて高いことがはじめて明らかになった(Tokunaga et al., Nature Methods, 2008)。運搬体分子は数 msec のオーダーで核膜孔複合体を通過すると現在考えられている。強い相互作用をもつ核膜孔複合体の中を、運搬体分子がどのようなメカニズムで素早く通過するのかといった問題を新たに投げかける結果でもある。

(4) importin ファミリー運搬体分子群で核内に輸送される基質分子群の同定に向けて(木村・小瀬・今本)
真核細胞の活動には蛋白質分子の核と細胞質の間の双方向の分子移動が不可欠である。核と細胞質は核膜で隔てられており、蛋白質等の分子は核膜にある核膜孔を通過する。核膜孔は蛋白質複合体で構成され、その通路は選択的なバリア機能をもつ疎水性の柔軟な構造で満たされている。分子量が約5万を超える分子では、ここにしみ込みうる性質をもつもののみが核膜孔を通過できる。核へ入る蛋白質は数千種と見積もられるが、その多くは単独では核膜孔を通過できない。importin 群因子は、多種の蛋白質分子との結合能と核膜孔通過能を合わせもち、蛋白質の核膜孔通過を介助する核輸送因子である。ヒトでは21種類のimportin 群因子が知られ、これが数千種の蛋白質の核輸送を分担している。輸送の基質となる蛋白質にはimportin 群因子と直接結合するものと6種類のimportin 群因子の一つを介して結合するものがあるが、このimportin 群因子は輸送基質の多様性に対処するアダプターであり、核膜孔通過はimportin 群因子の特性による。importin 群因子は輸送の方向性については3つに分類される。これに対し合計21の分子種の存在は、多様な輸送基質に対応する輸送因子の構造に関する問題提起とならび、因子間での輸送の分担機構の重要性を問わされる。それぞれ細胞内濃度と核膜孔通過効率の異なるimportin 群因子の一つを一群の特異的輸送基質蛋白質が共有または競合して一つの核輸送群が構成され、これが複数平行または競合して核膜孔を通過する。この核輸送のシステム構成からは当然、様々な細胞活動に大きく影響する制御機構が推定される。これを解明するためにはまず、基質とimportin 群因子の対応関係を具体的に知る必要がある。しかし現在までに各importin 群因子の特異的基質は0~数種類が報告されているに過ぎず、これが核輸送の包括的理解を目指す研究の隘路となっている。この分野の広範な進展に資するため、本研究室で既に実績のある遺伝子組換えimportin 群蛋白質による試験管内核輸送系を発展させ、各importin 群因子特異的基質を多数同定するための解析系の構築を開始した。組換えimportin 群蛋白質は、培養細胞のジギトニン処理により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の核内に特異的基質を輸送する。この系に加えた細胞抽出液から核に輸送された蛋白質を同定する計画である。細胞抽出液に内在するimportin 群因子は、この因子群が核膜孔の疎水性部位と相互作用する性質に基づき疎水性樹脂への吸着を利用して除去しており、核輸送は加えた組換え因子に依存する。核輸送された蛋白質の同定方法として、培養細胞安定同位体標識法(SILAC)と質量分析法の条件検討を進めている。安定同位体培地で培養した細胞の抽出液を試験管内核輸送系に加えれば、核輸送された蛋白質分子とセミインタクト細胞内在の同種分子は質量差による識別が可能である。これを質量分析法で同定する。本課題は大阪大学蛋白質研究所機能・発現プロテオミクス研究系との共同研究である。

2. 細胞核の構築

(1) 核膜孔に注目した細胞周期や分化における核膜動態の解析(前島・飯野*7・渡辺*3・船越*1・日原*6・今本、中臣・端川; BSI)

細胞核は様々な細胞に即したゲノムの高次構造を維持し、その細胞の機能に応じたゲノムの複製や個々の遺伝子調節を支えている。私たちは核膜上のもっとも顕著な構造体である核膜孔を指標として、細胞核の動的な形成過程の解析をおこなってきた。その結果、核膜新生直後の分裂終期からG1初期の核膜上に、核膜孔が存在しない領域が存在することを明らかにし、あたらしい核膜ドメインとして“Pore-free island”と名付けた(Maeshima et al., J. Cell Science, 2006)。さらに、脳研究センター・神経構築グループの中臣らと共同で、Freeze-fractureしたHeLaS3細胞の核表面の走査電子顕微鏡観察をおこない、核膜上に広がる1つ1つの核膜孔複合体やPore-free islandをイメージングした。

核膜孔複合体は、数個のサブコンプレックスから形成されることが近年明らかになっている。このため、私たちは各サブコンプレックスに含まれる代表的な蛋白質に蛍光タグを付け、HeLa細胞内で発現させて安定発現株を作製した。これらの安定発現株では核膜孔がラベルされ、そのダイナミクスをライブ観察することが可能となった。とりわけ、複合体の中で最も安定に存在するNUP133-YFPの発現株では、488nmレーザーをもちいて核膜表面のある核膜孔領域をbleachすることができ、新たに形成された核膜孔を可視化できるようになった。この手法と細胞周期の阻害剤を組み合わせることによって、間期の核膜孔形成が、細胞周期によって厳密にコントロールされていることが示された。前述の走査電顕観察では、増殖期細胞において、核膜孔の形成過程らしき前駆体構造も得られている。このような前駆体は脳のプリキンエ細胞など、分化細胞では観察されなかった(投稿準備中)。

上記のような、核膜孔形成過程と核構造の関係を調べるためには、複数の蛋白質を同時にラベルする必要がある。このため、2種類以上のcDNAを生細胞へ効率よく同時導入し、安定して共発現させるシステムは必要不可欠である。阪大微研今本グループと私たちは、ゲノム上でパーティション(区画化)の役割をするインスレーター(cHS4)を用いて、タンデムにつないだcDNAの安定発現システムを構築した(Yahata et al., J. Mol. Biol., 2007)。さらにこのシステムを用いることによって、このcHS4領域に、ゲノムを束ねる機能をもつコヒーシ複合体が結合していること、さらにはコヒーシ複合体がゲノム上の転写単位の区画化に重要な働きをすることを明らかにした(東工大白髭グループとの共同研究、Wendt et al., Nature, 2008)。この知見はゲノムの高次構造が遺伝子発現制御に関与する例として極めて興味深い。

(2) 核膜孔複合体膜タンパク質Pom121の機能解析(船越*1・前島・今本、矢幡*5・今本; 大阪大学、菅野; 東京大学)
核膜は染色体を内包した二重膜構造体で、核質と細胞質を隔てることで核機能の場を形成している。核膜孔は核膜の主要構成因子であるとともに、核-細胞質間の物質輸送の場を提供することで、細胞の機能発現の一端を担っている。核膜は一見静的であるが細胞周期を通して変化するダイナミックな膜構造体で、細胞周期依存的な崩壊と再構築が行われている。核膜の構造変化にともない核膜孔も再構築される。核膜孔複合体は約30種の異なるタンパク質から成る巨大タンパク質複合体であるが、各構成因子が細胞のどこでどのようにして構築されるのかといった構築過程の分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。核膜孔複合体の膜タンパク質は複合体の核膜上での安定化に重要であると予想され注目されてきた。本研究室では核膜孔複合体構成因子の1つである膜タンパク質Pom121の全長cDNA情報が、現存していたデータベースに存在していないことを見だし、欠失領域を単離してPom121の機能発現に必須な領域をコードすることを示した。ヒトPOM121遺伝子は7番染色体のWilliams-Beurenシンドロームと深く関連する、進化上複雑な重複が繰り返された遺伝子座に存在しており、ヒトをはじめとする霊長類のゲノムは2つのPOM121遺伝子を持つことを確認した。これら2つの異なるPom121遺伝子産物をmRNA、タンパク質レベルで検出し、双方の遺伝子発現を確認した。Pom121は核膜孔複合体の構築過程や、構築後の核膜上での安定化に寄与すると考えられていたが、ヒト細胞における役割については未解決であった。HeLa細胞中のPom121のノックダウンによって核膜上の核膜孔複合

体が減少することから、Pom121 が核膜孔複合体の構築過程もしくは安定化に重要な因子であると結論した。また、Pom121 を減少させると核の形態異常が引き起こされることから、膜内膜系との相互作用の可能性が示された。以上の結果をまとめ誌上発表を行った (Funakoshi et al., FEBS Lett. 2007)。

(3) 大腸癌におけるLAP2 (lamina-associated polypeptide 2) の過剰発現およびガン化との関連性 (大木本^{*2}・前島・今本)

癌細胞や組織において、核は正常細胞より大型化し、大小不同が強く、形状も不整である。私たちは、ヒト大腸癌組織における数種の核膜内タンパク質の変化 (癌組織と周辺正常組織とを比較) を、千葉大医学部・朝永教授の研究グループらとの共同研究で検討した。その結果、調べた核内膜タンパク質の中で、LAP2 が癌組織において、顕著に発現亢進していることを見いだした。培養細胞レベルにおいても、正常細胞に比べて、大腸癌細胞で LAP2 の明確な発現亢進が認められた。LAP2 (lamina-associated polypeptide 2) は、核内膜タンパク質の1つである A-type ラミンに結合することが知られているが、その細胞内の機能については、必ずしも明確にされていない。複数種のヒト癌細胞で、Lap2 を RNAi によりノックダウンしたところ、強い増殖抑制が見られた。細胞の形態変化を観察したところ、LAP2 の Knock down によって多核化が誘引されることに気づいた。現在、多核化が引き起こされるメカニズムについて解析を進めている。

(4) ヒト分裂期染色体構造の解析 (前島・渡辺^{*3}・日原・今本、伊藤; 播磨高田研、西野・石川; 播磨石川研)

染色体は細胞が分裂する際、複製された遺伝情報 (DNA) を2つの娘細胞に正確に分配するために必要な構造体である。それでは、分裂期染色体はどのようにして1本の長いクロマチン繊維から折り畳まれているのだろうか? これまで、分裂期染色体の高次構造解明のために、主として電子顕微鏡を用いた構造解析がなされてきた。しかしながら、顕微鏡観察は試料中における観察範囲が限定され、内在する規則性構造の全体像を捉えることが非常に困難である。このため、私たちはSPRING-8 BL45XUでX線小角散乱解析(SAXS)をおこなっている (播磨研究所の伊藤らと共同研究)。SAXSは、計測したい非結晶試料にX線を照射し、その散乱パターンからその試料に内在する構造や規則性を知る手段である。現在までに染色体中に、コアヒストンの幅、ヌクレオソームの直径に相当する6nmと11nmの散乱のピークを検出したが、それ以上の大きな構造は検出できなかった。このことから私たちは、染色体内には古くからのモデルが提唱するような明確な階層構造は存在しないのではないかと考えている (投稿準備中)。さらに、播磨理研の西野らと共同で、SPRING-8 BL29XULのコヒーレントX線による単一のヒト染色体のイメージングもおこなっている (CXDM)。私たちは最近、このCXDMを用いてヒト染色体の3次元電子密度マップの作製に成功した (投稿中)。

(5) ナノイオンビームによる細胞小器官の機能解析 (前島・渡辺^{*3}・今本、岩井・池田・山崎; 山崎原子物理)

細胞内の部位特異的な不活化は、細胞小器官の機能を調べる上で、非常に強力な手段となりうる。最近、山崎原子物理グループは、細胞マイクロインジェクション用のガラスキャピラリーをもちいてイオンビームをミクロン以下に絞ることに成功した。そして、ガラスキャピラリーに蓋をすることにより、液中でのビーム照射が可能となった。この手法を用いると、細胞内のある特定の空間の不活化が可能となる。私たちは細胞核を蛍光ラベルした細胞に、ナノイオンビームを実際に照射し、細胞核の一部分の蛍光が確かに褪色することを確認した (Iwai et al. Apply Phys. Lett, 2008)。今後、生細胞のさまざまな細胞小器官の照射し、その機能解析のために用いる予定である。

3. ゲノムの複製と分配

(1) 分裂期染色体の正確な分配に関わる新たな分子メカニズムの解析 (高木・深瀬^{*6}・今本)

前年度までの研究で、分裂期染色体を包み込むように局在するタンパク質 (Ki67 抗原) が分裂期染色体の正確な分配に関わる因子であることを示した。また同タンパク質と機能的複合体を構成する因子の同定を行い、RNA 分解酵素や脱ユビキチン化酵素などの酵素が分裂期染色体動態の制御において機能する可能性を新たに提示した。今年度は、Ki67 抗原とこれらの酵素群とが協調的に機能するための分子基盤を、生化学および細胞生物学的手法により解析した。またこれら酵素群の生理的標的分子の探索に取り組み、Ki67 抗原と染色体分配を担う既知因子との接点を模索した。何れの取り組みも途上であり、十分な成果を得るに至っていない。以上の取り組みとは独立に、Ki67 抗原が分裂期染色体の凝縮、紡錘体微小管ダイナミクスなどの制御にも関わる可能性を見いだした。Ki67 抗原が複数の機能領域を持つ巨大分子であることに符合する知見であり、Ki67 抗原が染色体動態制御に関わる多様な反応を協調的に行う場を提供している可能性を示唆するものである。

(2) 複製因子の品質管理機構 (水野・柳^{*2}・水野^{*1}・今本)

DNAポリメラーゼ (Pol.)は新生DNA鎖の合成開始を司る唯一のポリメラーゼである。最近、Pol. の変異に伴い、染色体の二重鎖切断、テロメア長の増加、クロマチン構造の変化等、染色体の不安定化が誘発されることが報告されている。さらに、Mcm10、Ctf4などの複製関連因子がPol. の安定性に関与するという報告もあり、染色体の恒常性維持に於けるPol. の役割が再注目されている。私達はマウスPol. 触媒サブユニット (p180) に変異を有する温度感受性変異株tsFT20細胞とEGFPとp180の融合タンパク質の観察により、p180の細胞内局在、タンパク質分解、Pol. サブユニット間の相互作用を解析した。許容温度下では野生型と同様に核に局在したが、非許容温度下では細胞質に蓄積することを見出した。Time-lapse観察、photoactivatable GFPやmRFP-p68を用いた観察、及び様々な阻害剤を用いた実験により、非許容温度下でのp180^{tsFT20}の細胞質への局在は、1) *de novo*に合成されたp180^{tsFT20}が細胞質に留まること、2) 核内のp180^{tsFT20}がプロテアソームにより分解されること、という二種類の過程が組み合せて生じることが示された。さらに、tsFT20細胞中の内在性p180^{tsFT20}も非許容温度下では分解され、細胞質に留まることが判明した。以上の結果から、細胞にはPol. の品質を管理する機構が存在し、異常なPol. を核内で分解すると同時に細胞質に貯留することで結果的に核内から排除し、ゲノムの恒常性を維持している可能性が示唆された。

(3) 複製開始制御機能の解析 (柳^{*2}・水野・今本)

真核生物においては、染色体複製開始に先立ちクロマチン上に複製前複合体形成が必須である。複製前複合体はORC、Cdc6、Cdt1、MCMが段階的にクロマチンへ結合することで形成される。複製前複合体形成メカニズムは出芽酵母におい

て研究が進んでおり、ORCがATP依存的に複製開始配列を認識して結合し、他の因子がロードされる。しかしながら、特定の複製開始配列が不明な哺乳類細胞においては、クロマチン上のどこに、どのようにして複製前複合体が形成されるのか詳細は不明である。我々はこれまでに、マウスCdt1を中心とした解析から、Cdt1とMcm6及びOrc2間の相互作用を見出すとともに、これらの相互作用がgemininによって阻害される事を示してきた。そこで、本研究では哺乳類細胞における複製前複合体形成機構を明らかにするために、マウス複製前複合体の*in vitro*再構成を試みた。まず、大腸菌で発現、精製したマウスOrc1DN / 2DN/3-5複合体を用い、ゲルシフト法によりDNA結合能について解析した。その結果、Orc1DN / 2DN/3-5はATP依存的に二本鎖DNAに結合した。一方、一本鎖DNAにはATP非依存的に結合する事が示された。さらに、複数のDNA基質を用い配列特異性に付いて検討したが、出芽酵母のように顕著な配列特異的DNA結合活性は見出せなかった。次に、DNA上での複合体形成を確認するために、Orc1DN / 2DN/3-5に続き、精製したCdc6、Cdt1を段階的に加えると、より移動度の遅い位置へバンドがシフトした。ORC、Cdc6、Cdt1がDNA上で機能的な複合体を形成している可能性が示唆された。現在、再構成した複製前複合体のツメガエル*in vitro*複製系による活性化を試みているが、効率的な複製反応を開始させるには至っていない。バックグラウンドの抑制や非活性の高いタンパク質を供給する事が必要と考えられる。

(4) 複製前複合体と核膜孔複合体構築との関係の解析 (水野・Vedecnik^{*6}・船越^{*1}・今本)

Gemininで複製前複合体形成を阻害すると、核膜孔複合体構築の遅延が見られることが、アフリカツメカエル卵抽出液を用いた実験で報告されている。そのメカニズムは全く不明である。私たちは、ヒト細胞において、複製前複合体の形成と核膜孔複合体の形成の関係を調べるために、細胞周期同調実験と併せたRNAiによる複製前複合体の形成阻害の実験条件を検討している。研究室で得られつつある、核膜孔複合体形成の細胞周期タイミングと、複製グループで解析している複製前複合体形成機構の知見を併せて、2つの現象がどのように結びつくのかを明らかにしたいと考えている。

^{*1}協力研究員、^{*2}基礎科学特別研究員、^{*3}協力技術員、^{*4}研究補助、^{*5}訪問研究員、^{*6}研究支援、^{*7}研修生

In eukaryotic cells, most of genomic information is stored in the cell nucleus. The main subject of our laboratory is to understand the nucleocytoplasmic transport and organization of cell nucleus 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. Nucleocytoplasmic transport

(1) A novel mitotic role of importin β and small GTPase Ran

Nucleocytoplasmic transport factors mediate various cellular processes, including nuclear transport, spindle assembly, and nuclear envelope/pore formation. In this study, we identified human chromokinesin Kid (hKid) as an import cargo of the importin- α/β transport pathway and determined its nuclear localization signals (NLSs). Upon the loss of its functional NLSs, hKid exhibited reduced interactions with the mitotic chromosomes of living cells. In digitonin-permeabilized mitotic cells, hKid was bound only to the spindle and not to the chromosomes themselves. Surprisingly, hKid bound to importin-a/b, was efficiently targeted to mitotic chromosomes. The addition of Ran-GDP and an energy source, which generates Ran-GTP locally at mitotic chromosomes, enhanced the importin-b-mediated chromosome loading of hKid. Our results indicate that the association of importins- β and - α with hKid triggers the initial targeting of hKid to mitotic chromosomes and that local Ran-GTP-mediated "cargo-release" promotes the accumulation of hKid on chromosomes. Thus, this study demonstrates a novel nucleocytoplasmic transport factor-mediated mechanism for targeting proteins to mitotic chromosomes.

(2) Analysis of the mechanism of nuclear import of 70kDa heat shock cognate protein (hsc70)

Hsc70 accumulates into the nucleus from the cytoplasm during heat shock stimuli. We have reconstituted the heat shock-mediated nuclear import of hsc70 in an *in vitro* transport assay, and revealed that nuclear import of hsc70 is cytosolic factor(s)- and Ran-dependent, suggesting strongly that hsc70 is transported by the Importin b family molecule. We developed the system for identification of nuclear transport pathway, using Importins-depleted cytosol and recombinant protein of importins in an *in vitro* transport assay, and examined nuclear import carrier(s) of hsc70. However, any importin was not able to mediate effectively nuclear import of hsc70. We are proceeding to the biochemical purification of new carrier protein.

(3) Interaction of nucleocytoplasmic transport receptor and nuclear pore complexes examined using highly inclined and thin beam illumination

We developed a simple illumination method of fluorescence microscopy for molecular imaging. Illumination by a highly inclined and thin beam increases image intensity and decreases background intensity, yielding a signal/background ratio about eightfold greater than that of epi-illumination. A high ratio yielded clear single-molecule images and three-dimensional images using cultured mammalian cells, enabling one to visualize and quantify molecular dynamics, interactions and kinetics in cells. Using this method, we found that 100-200 molecules of importin b is capable to bind a single assembled nuclear pore complex with dissociation constant ranging from 0.3 +0.2/-0.1nM to 70 +50/-30 nM. A mechanism concerning how importin b can rapidly transit through NPCs, which provide such high affinity binding sites for this molecule, remains to be elucidated.

2. Nuclear envelope and chromatin structure

(1) Analysis of nuclear pore dynamics and formation during cell cycle

Nuclear pores, sophisticated gateways between cytoplasm and nucleoplasm, are the most notable structures on the nuclear membrane. Through investigation of the dynamic behavior of nuclear pores, we found a novel nuclear subdomain, a "pore-free island". This pore-free island changes significantly during the cell cycle and cell differentiation, suggesting that the nuclear structures are dynamically regulated reflecting the physiological state of the cells. Currently, we are examining how the nuclei and nuclear pores are assembled and regulated during cell proliferation and differentiation.

(2) Analysis of human POM121

Pom121 is one of the integral membrane components of the nuclear pore complex (NPC) in vertebrate cells. Unlike rodent cells carrying a single POM121 gene, human cells possess multiple POM121 gene loci on chromosome 7q11.23, as a consequence of complex segmental-duplications in this region during human evolution. In HeLa cells, two "full-length" Pom121 are transcribed and translated by two distinct genetic loci. RNAi experiments showed that efficient depletion of both Pom121 proteins significantly reduces assembled NPCs on nuclear envelope. Pom121-depletion also induced clustering of NPCs, indicating its role on maintenance of NPC structure/organization.

(3) Analysis of nuclear envelope components required for cell proliferation.

We examined components of nuclear envelope in clinical colorectal cancer tissues. Interestingly, LAP2a was found to be strongly overexpressed among the proteins examined in all cases. Member of LAP2 (lamina-associated polypeptide 2) family are candidate proteins involved chromatin organization through attaching nuclear membranes to the underlying lamina and chromatin. In human cells, three different forms of LAP2 mRNA, LAP2a (75kDa), LAP2b (51kDa) and LAP2g (39kDa), are generated by alternative splicing from a single gene. LAP2a is structurally and functionally different. It shares only the N-terminal 187 amino acid region with the other isoforms and localized throughout the nucleus. In order to examine a role of LAP2a in cell proliferation at cellular level, knockdown experiments of Lap2a were carried out. LAP2a-knockdown significantly reduced the growth rates of several cancer cell lines. The effect showed good correlation with knockdown levels of LAP2a. LAP2a-depleted cells showed abnormal nuclear shape and increased number of multinucleated cells. Since LAP2a interacts with lamin A/C, RB and BAF, their collaboration in the cell proliferation is now under examination in our lab.

(4) Analysis of chromosome structures

Mitotic chromosomes are essential structures for the faithful transmission of the genetic information at each cell division. However, how the two meters of DNA that is present in each human cell is packaged into compact mitotic chromosomes (a 10,000-fold shortening) remains largely unknown. To address this question, at RIKEN SPring-8 we are investigating chromosome structure using small angle X-ray scattering analysis (SAXS), which makes it possible for us to detect internal regular structures in non-crystal materials in solution.

3. Chromosome segregation and replication

(1) Novel mechanisms involved in proper behavior of mitotic chromosomes.

In our previous studies, we showed that Ki67 antigen, a perichromosomal protein, had a role in proper behavior of mitotic chromosomes. We went on to purify the protein complex containing chmadrin (*Xenopus* homolog of Ki67) from *Xenopus* egg extract and revealed that the complex contained various enzymes whose involvement in mitosis has not been described. We then focused on analyzing the significance of these enzymes during mitosis and tried to understand the molecular bases on which these enzymes functioned cooperatively with Ki67 antigen. Based on the assumption that these enzymes modulate certain functions of known mitotic regulators, search for substrates of these enzymes has been on the way.

(2) Sequestration of aberrant DNA polymerase alpha in the cytoplasm suggests a quality control mechanism

DNA polymerase alpha is essential for the onset of eukaryotic DNA replication. Due to a single point mutation in the DNA polymerase alpha p180 subunit, the temperature-sensitive mouse cell line tsFT20 exhibits heat-labile DNA polymerase alpha activity and S phase arrest at restrictive temperature. We show that p180^{tsFT20} localizes in the cytoplasm at restrictive temperature while its wild-type counterpart enters the nucleus. Time-lapse fluorescence microscopy with EGFP-tagged or photoactivatable GFP-tagged p180^{tsFT20} variants and inhibitor analysis revealed that the changes in protein localization after temperature up-shift are due to the inability of newly synthesized p180^{tsFT20} to enter the nucleus and to the proteasome-dependent degradation of nuclear-localized protein. Moreover, p180^{tsFT20} synthesized de novo at restrictive temperature does not associate with the second subunit of DNA polymerase alpha, p68. Finally, we show that RNA interference of p68 results in a decrease of the overall p180 protein level and in a specific increase of cytoplasmic localized p180. Taken together, our data suggest the presence of a quality control mechanism that prevents the nuclear expression of aberrant DNA polymerase alpha.

(3) Analysis of pre-RC formation.

The assembly of pre-replicative complexes (pre-RCs) at origins of DNA replication is highly regulated and conserved in eukaryotic cells. From yeast to human, pre-RC assembles in a stepwise manner. At first, the origin recognition complex (ORC) is loaded on the origin, then Cdc6 and Cdt1, and finally Mcm2-7 associate sequentially. Pre-RC assembly is inhibited by geminin, which is a negative regulator of DNA replication in metazoan cells. To understand how the pre-RC formation is regulated, we tried to develop the *in vitro* system for pre-RC assembly. First, using gel mobility shift assay, we analyzed the DNA binding activity of mouse Orc1DN/2DN/3-5. Mouse Orc1DN/2DN/3-5 bound dsDNA in an ATP-dependent manner. In addition, the sequential assembly of Orc1-5, Cdc6 and Cdt1 onto DNA was reconstituted. Now, we are trying to reconstitute of pre-RC on *Xenopus* nuclei using purified recombinant proteins.

Staff

Head

Dr. Naoko IMAMOTO

Members

Dr. Kose SHINGO

Dr. Masatoshi TAKAGI

Dr. Kazuhiro MESHIMA

Dr. Takeshi MIZUNO

Dr. Makoto KIMURA

Dr. Keiko MIZUNO^{*1}

Dr. Tomoko FUNAKOSHI^{*1}

Dr. Kei OHKIMOTO^{*2}

Dr. Kenichiro YANAGI^{*2}

Dr. Kiyoshi TAHARA^{*4}

Ms Ai WATANABE^{*3}

Ms Vedecnik MICHAELA^{*4}

Ms Akiko FUKASE^{*4}

Ms Saera HIHARA^{*4}

Ms Keiko YOSHIKAWA^{*4}

^{*1}Contract researcher, ^{*2}Special Postdoctoral Researcher, ^{*3} Contract Technical Scientist, ^{*4} Technical Assistant

Visiting Members

Dr. Kazuhide YAHATA (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

Dr. Takefumi SONE (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

Dr. Fumiko NISHIUMI (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

Dr. Fumio IMAMOTO (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

Dr. Miho OSUGI (Institute of Medical Science, University of Tokyo)

Dr. Notiko TOKAI-NISHIZUMI (Institute of Medical Science, University of Tokyo)

Dr. Tasuoki HORIUCHI (Institute of Medical Science, University of Tokyo)

Dr. Tadashi YAMAMOTO (Institute of Medical Science, University of Tokyo)

Dr. Sumio SUGANO (Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

Trainees

Mr. Haruki IINO (Fac. Science, Saitama Univ.)

Ms. Tomomi YOKOYAMA (Fac. Science, Saitama Univ.)