

課題番号	LS126
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ストレス応答時に機能する新規核-細胞質間輸送経路の解明によるシャペロン機能の発掘
研究機関・部局・職名	独立行政法人理化学研究所・基幹研究所・今本細胞核機能研究室・主任研究員
氏名	今本 尚子

1. 当該年度の研究目的

ストレス応答時には定常時で働く importin  $\beta$  ファミリーで担われる核-細胞質間輸送経路が遮断され、これまで知られていなかった新規運搬体分子(Hikeshi と命名)で担われる核-細胞質間輸送が出現する。Hikeshi は熱ストレス時に分子シャペロン Hsp70s を核に輸送する。平成 23 年度までに、Hikeshi が担う Hsp70 の輸送にはコシャペロンによる Hsp70 の ATP/ADP 変換が必要なこと(Hikeshi が ATP 型に変換された Hsp70s に結合する一方で、ADP 型に変換された Hsp70s から解離する)を再構成輸送と生化学的手法で証明した。しかしながら、Hikeshi と Hsp70 の認識機構は十分に理解できていないため、H24 年度は Hikeshi が Hsp70s を認識する構造基盤と仕組みを理解することに力点を置いて解析する。その1つのアプローチとして、Hikeshi/Hsp70 結晶構造解析に取り組む。2つめのアプローチとして、Hikeshi が Hsp70 を認識する生理的条件を調べるため、前年度までにセットアップしてきた Hikeshi と Hsp70 の複合体形成を蛍光イメージングで解析できる実験に着手する。また、これまでに Hikeshi 輸送経路を遮断するとストレス応答後に細胞がストレスから回復せずに死滅することを明らかにしていた。Hikeshi 輸送の生理的重要性を個体レベルで明らかにするため、線虫やマウスといったモデル生物を使って研究を進める体制を構築する。

2. 研究の実施状況

**Hikeshi の結晶解析:** Hikeshi は核膜孔複合体構成因子がもつ FG リピートと結合するとともに、ATP 型の Hsp70 と結合する。大腸菌で Hikeshi を精製し、FG リピートと、ATP 型 Hsp70 との共結晶を得る様々な条件に取り組んだ。その結果、Hikeshi/FG リピートの共結晶を得ることに成功した。Hikeshi は N 末側の領域で特徴的なホモ2量体となり、C 末側の“jelly role/beta-sandwich fold”で形成される疎水ポケットで FG リピートと結合することがわかった。得られた結晶構造に基づいて2量体形成を阻害する点変異を加えていくと、Hikeshi は Hsp70 と結合できず、Hsp70 の輸送活性も低下することがわかった。そのため、Hikeshi はダイマーを形成してはじめて Hsp70 と結合すると考えられる。現在、生化学的手法で Hikeshi と Hsp70 の結合ストイキオメリーを確認しようとしている。また、Hsp70 の ATP 型を安定させ、Hikeshi との共結晶を得る努力を引き続きおこなっている。**蛍光イメージング:** TagRFP を結合した Hikeshi と GFP を結合した Hsp70 を細胞内で発現させ、蛍光相関法(FCS)と蛍光相互相関法(FCCS)を利用して、熱ストレスをかけたときに「いつ」「どこで」Hikeshi と Hsp70 が結合するのかを細胞内で調べようとした。細胞内で結合が見えないため、輸送再構成で輸送が起こる条件下で in vitro で同様の蛍光イメージングを試みた。

様式19 別紙1

その結果、温度依存的かつ細胞抽出液又は精製 Hsp110 に ATP を加えたときにのみ両者の結合が FCCS で認められた。この結合が細胞内で起こる結合を反映しているかも含めて現在検討中である。**モデル生物**:線虫の cDNA ライブラリーには複数の Hikeshi ホモログ(スプライシングバリエーション)が存在する。その中の一つに他の遺伝子には無いイントロンをもつものがある。このイントロンが挿入されることで C 末端がヒト Hikeshi とのホモロジーが飛躍的に高まり、線虫 Hsp70 とも結合するようになる。イントロンが挿入されたこの遺伝子がヒト Hikeshi ホモログであると考えられるが、そのことを線虫内で発現するタンパク質の性質と合わせて現在確認中である。また、線虫の培養系を研究室でセットアップし、life span アッセイを開始している。マウスゲノムには2つの Hikeshi ホモログ遺伝子が存在するが、タンパク質は片方の遺伝子からのみ発現していることが確認された。マウス Hikeshi のノックアウトマウスは致死との報告があるので、コンディショナルノックアウトマウスを現在作製中である。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 9 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 8 件</p> <p>Imamoto, N. (2013). Cargo recognition explains nuclear transport regulation induced by nuclear pore complex reorganization. <i>J. Mol. Biol.</i> 425, 1849-2851</p> <p>Chinen, T., Kazami, S., Nagumo, Y., Hayakawa, I., Ikedo, A., Takagi, M., Yokosuka, A., Imamoto, N., Mimaki, Y., Kigoshi, H., Osada, H., Usui, T. (2013). Glaziovianin A prevents endosome maturation via inhibiting microtubule dynamics. <i>ACS Chem. Biol.</i> 8, 884-889.</p> <p>Clever, M., Mimura, Y., Funakoshi, T., Imamoto, N. (2013). Regulation and coordination of nuclear envelope and nuclear pore complex assembly. <i>Nucleus</i> 4 105 - 114</p> <p>Kimura, M., Kose, S., Okumura, N., Imai, K., Furuta, M., Sakiyama, N., Tomii, K., Horton, P., Takao, T., Imamoto, N. (2013). Identification of cargo proteins specific for the nucleocytoplasmic transport carrier transportin by combination of an in vitro transport system and stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based quantitative proteomics. <i>Mol. Cell. Proteomics</i> 12, 145-157.</p> <p>Hihara, S., Pack, C.G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozak, i T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., Sako, Y., Kinjo, M., Takahashi, K., Nagai, T., Maeshima, K. (2012). Local nucleosome dynamics facilitate chromatin accessibility in living Mammalian cells. <i>Cell Rep.</i> 2, 1645-1656.</p> <p>Imamoto, N., Kose, S. (2012). Heat-shock stress activates a novel nuclear import pathway mediated by Hikeshi. <i>Nucleus</i> 3, 422-428.</p> <p>Imamoto, N., Funakoshi, T. (2012). Nuclear pore dynamics during the cell cycle. <i>Curr. Opin. Cell Biol.</i>, 24, 453-459.</p> <p>Kose, S., Furuta, M., Imamoto, N. (2012). Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat-shock induced nuclear damage. <i>Cell</i> 149, 578-589. Selected as Faculty of 1000</p>
-----------------------	---

様式19 別紙1

	<p>(掲載済みー査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件</p> <p>Takagi, M., Imamoto, N. Control of Nuclear Size by NPC proteins. <i>Invited review</i> in <i>Cancer biology and Nuclear Envelope</i>.</p>
<p>会議発表 計 13 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件 今本尚子「ストレス時に働く核一細胞質間運搬体分子Hikeshi (火消し)」奈良先端大学セミナー 2012年 9月14日 (招待講演)</p> <p>Imamoto N. "Thermal stress-induced nuclear import mediated by Hikeshi: its mechanism and cellular roles" National Institute of Genetics, The 160th Biological Symposium 2012年 10月31日 (招待講演)</p> <p>今本尚子「核一細胞質間輸送運搬体分子 Hikeshi (火消し) : その輸送メカニズムと細胞機能」新潟大学公開セミナー 2012年 9月 18日 (招待講演)</p> <p>Kose, S., A. Kametaka, A. Watanabe, and Imamoto, N. "Nuclear import receptor, Hikeshi, for Hsp70s is required for attenuation of heat-shock response and protecting cell damages from stress" Cold Spring Harbor Meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function, Cold Spring Harbor, New York, USA Sept 27-Oct 1, 2012. <i>Selected talk</i></p> <p>Imamoto, N. "How do cells recover from environmental stress damage? – new aspects from nuclear transport system" 2<sup>nd</sup> RIKEN-KFU Workshop, Physics, Chemistry and Biology of Complex Systems – On the way to trans disciplinary research. Kazan Federal University, Kazan, Russia Nov 19 – Nov 22, 2012. (招待講演)</p> <p>Imamoto, N. "Nuclear transport essential for cell recovery from stress damages" Post Genomic Workshop, Kazan Federal University, Kazan, Russia Nov 19 – Nov 22, 2012. (招待講演)</p> <p>Imamoto, N. "Thermal stress-induced nuclear import: new aspects on function of molecular chaperones during a cellular stress" ASCB Special Interest Group on Beyond Border Control: Nuclear Pores, the Nuclear Envelope and the rest of the Cell, San Francisco, USA, Dec15, 2012. (招待講演)</p> <p>Funakoshi, T. and Imamoto, N. "Reconstitution of human nuclear envelope subdomain formation in vitro". Organized session for Dr. Iain Mattaj 第30回染色体ワークショップ, 淡路, 2012年 12月 19-21日 (招待講演)</p> <p>高木昌俊、田口温子、今本尚子「Ki67 抗原により染色体表層領域へリクルートされる PP1γ の役割 第30回染色体ワークショップ, 淡路, 2012年 12月 19-21日 <i>Selected talk</i></p> <p>Kose S., Kametaka A., Watanabe A., Motohashi S., and Imamoto N., "Thermal stress induced nuclear import mediated by Hikeshi" 第30回染色体ワークショップ, 淡路, 2012年 12月 19-21日 <i>Selected talk</i></p> <p>一般向け 計 3 件 今本尚子「細胞の生きる仕組み」鳥栖高校・鳥栖中学校講演会、佐賀県 2012年11月 12日 今本尚子「細胞の生きる仕組み」香楠中学校講演会、佐賀県 2012年11月 12日 今本尚子「細胞核が細胞の生命活動を司令する仕組み」佐保会大阪支部理科研修会講演会、大阪府 2013年1月19日</p>

様式19 別紙1

<p>図書 計 2 件</p>	<p>小瀬真吾、今本尚子 (2012) “Hikeshi” は分子シャペロン Hsp70 を核に輸送し熱ストレスによる核の損傷から細胞を守る」ライフサイエンス 新着論文レビュー 6月12日. 小瀬真吾、今本尚子(2012)「新しい核-細胞質間輸送運搬体分子”Hikeshi”の同定」実験医学 30:2621-2624.</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.riken.go.jp/research/labs/chief/cell_dyn/">http://www.riken.go.jp/research/labs/chief/cell_dyn/</a> <a href="http://www.riken.jp/celldynamics/index.html">http://www.riken.jp/celldynamics/index.html</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>ホームページを充実させて国民に研究内容を説明していくとともに、平成 24 年度も一般に向けた以下の講演を行った。 今本尚子「細胞の生きる仕組み」鳥栖高校・鳥栖中学校講演会、佐賀県 2012年11月 12日 今本尚子「細胞の生きる仕組み」香楠中学校講演会、佐賀県 2012年11月 12日 今本尚子「細胞核が細胞の生命活動を司令する仕組み」佐保会大阪支部理科研修会講演会、大阪府 2013年 1月 19日</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計 1 件</p>	<p>プレス発表 2012年 4月 27日 「核と細胞質の間を輸送する新しい運搬体分子”Hikeshi (火消し)”を発見」 ー核-細胞質間輸送と分子シャペロンのシステムが初めて結びつくー</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

平成 24 年度 重要業績表彰受賞 理化学研究所

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	109,000,000	48,650,000	31,350,000	29,000,000	0
間接経費	32,700,000	14,595,000	9,405,000	8,700,000	0
合計	141,700,000	63,245,000	40,755,000	37,700,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	6,392,167	31,350,000	0	37,742,167	33,218,253	4,523,914	0
間接経費	0	9,405,000	0	9,405,000	9,405,000	0	0
合計	6,392,167	40,755,000	0	47,147,167	42,623,253	4,523,914	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	11,728,462	実体蛍光顕微鏡、消耗品費等
旅費	1,853,429	海外渡航費等
謝金・人件費等	17,365,687	研究者月例給与等
その他	2,270,675	雑誌投稿費、機器修理費、解析費等
直接経費計	33,218,253	
間接経費計	9,405,000	
合計	42,623,253	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
蛍光実体顕微鏡	オリンパス SZX16	1	2,563,575	2,563,575	2013/1/23	独立行政法人理 化学研究所
				0		
				0		