

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 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されず

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

熱ショックストレスは、細胞が受ける環境ストレスの優れたモデルケースである。私たちは、ヒト細胞の熱ショック時に定常時で働く importin β ファミリーで担われる核-細胞質間輸送の効率が低下し、これまで知られていなかった新規運搬体分子で担われる輸送経路が新たに駆動することを、分子シャペロン Hsp70/Hsc70 (Hsp70s) のストレス応答性核内輸送メカニズムを解析して明らかにした。ストレスに応答して駆動する新しい輸送は、細胞をストレスダメージから回復させるのに必要であることから、私たちは見つけた運搬体タンパク質を Hikeshi (火消し) と命名した。Hikeshi は機能未知とデータベースに登録されていた進化的に保存された因子である。平成 24 年度までに、ヒト培養細胞に見られる Hikeshi ノックダウンの細胞レベルの影響、線虫や酵母の Hikeshi ホモログがヒト Hikeshi と生化学的に類似した性質を有することがわかってきた。また、ヒト Hikeshi の結晶構造が得られるなど、構造解析に向けて大きく前進した。これらの結果を踏まえ、平成 25 年度はモデル動物を用いた Hikeshi 機能の解析を明らかにすること、ヒト Hikeshi の原子レベルでの構造を明らかにすることを目標とした。

2. 研究の実施状況

Hikeshi の結晶構造解析: Hikeshi は分子量約2万のタンパク質であり、結晶構造解析から、N 末側領域でホモ2量体を形成し、C 末領域は特徴的な "jelly roll/beta-sandwich fold" と呼べる特徴的な構造をとっている。ゲル濾過の解析で、Hikeshi は溶液中で2量体形成していること、酵母 two hybrid アッセイでも Hikeshi の2量体形成が確認されたことから、Hikeshi は結晶構造で見られた2量体として細胞内で機能すると結論できる。結晶構造解析から、Hikeshi monomer の C 末側構造のそれぞれに、Phe がはまり込む疎水性ポケットのあることがわかり、このポケットに、核膜孔複合体の輸送チャネルを構成する FXFG や GLFG リピート配列がもつ疎水性アミノ酸である Phe が結合すると予想される。結晶構造解析から、Hikeshi のこの C 末領域の疎水性ポケットには、Hikeshi が持つ Flexible なアミノ酸ループ (E-loop と命名) が相互作用し、Hikeshi と核膜孔複合体輸送チャネルの相互作用を制御するといった新しい可能性が浮かび上がった。これらの可能性を提唱するために、Hikeshi (wt) や Hikeshi E-loop の様々な変異体と3種類の異なる FG リピートのペプチドとの結晶構造を作成し、その構造を解析し、可能性について詳細に検討している。Hikeshi が、その輸送基質である Hsp70 と結合することにより、Hikeshi の構造変化が誘引され、それに伴って E-loop を介した核膜孔複合体との相互作用が変化する可能性も考えられ、輸送が駆動する機構とも密接であることが予想される。Hikeshi と核膜孔複合体との相互作用、Hikeshi と Hsp70 の相互作用を結晶解

様式19 別紙1

析原子レベルで明らかにすることの重要性を改めて考える。結晶構造解析の研究は、全て韓国の李博士の研究グループとの共同研究である。**線虫を用いた Hikeshi の機能解析**: Hikeshi には4つの splicing variant が存在し、一つのイントロンの挿入により、線虫 Hikeshi が線虫 Hsp70 と結合することが生化学解析で確認できた。線虫 Hikeshi を RNAi feeding 法でノックダウンすると、熱ストレスで線虫個体の寿命 (Life span) が野生株よりも短縮することがわかった。また、RNAi feeding による Hikeshi のノックダウンは、線虫の熱耐性 (thermal resistance) を低下させることがわかり、Hikeshi ホモログは線虫個体内で寿命や熱ストレスに関与すると考えられる。**マウスを用いた Hikeshi の機能解析**: マウスには Hikeshi を code する遺伝子が2つ存在するが、その一つは pseudo gene であると考えられる。Cre-loxp のシステムを用いて、Hikeshi ホモログのコンディショナルノックアウトマウスを作成した。作成したノックアウトマウスを用いて、現在の観察結果を得ている。Hikeshi ノックアウトマウスのホモマウスは誕生しないため、生まれる前に死ぬと考えられる。しかし、12.5 週齢胚が得られるため、Hikeshi ノックアウトで初期の胚発生に影響が出るのではなく、発生後期に Hikeshi ノックアウトの影響がでると考えられる。Hikeshi ノックアウトマウス 12.5 週齢胚からは、mouse embryonic fibroblast (MEF) を得て、その解析を開始した。ヒト細胞で Hikeshi をノックダウンしたときと同様に、Hikeshi を欠損した MEF 細胞では、熱ストレスをかけても Hsp70 の核内集積が見られない。Hikeshi ノックアウトマウス作成は理研 CDB との共同研究である。**分裂酵母を用いた Hikeshi の機能解析**: 分裂酵母の Hikeshi ホモログは Opi10 と命名されているが、これまで機能は解析されていなかった。Opi10 は分裂酵母の SSA2 (Hsp70) と結合し、YFP タグをつけた Opi10 は、分裂酵母内で核膜に局在する。また、分裂酵母の Opi10 は、ヒト Hikeshi と同様にヒトのセミンタクト細胞の核輸送アッセイ系で Hsp70 を核に輸送する。これらのことから、Opi10 と Hikeshi の生化学的性質は極めて類似している。しかし、Opi10 破壊株は分裂酵母や出芽酵母の熱ストレス耐性に影響を与えず、Hsp70 の核局在にも影響を与えない。一方で、マイクロアレイで調べると、Opi10 を破壊株すると“response to stress”と annotate された遺伝子群の発現が低下することから、ストレス応答と関係があると予想される。米国 Corbett 博士の研究グループは、出芽酵母の Opi10/Hikeshi の破壊も酵母の熱耐性に影響を与えないと結論し、我々の分裂酵母の結果と合わせて論文に発表した。イスラエルの研究グループとの共同研究で、ヒト Hikeshi の点変異は遺伝脱随様疾患を誘発すると考えられる。広い生物種間で保存されている Hikeshi の機能を、進化的な考察を加えながら解析していくことが生物学的には重要と考える。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 10 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <p>Kose, S., Imamoto, N. (2014). Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems. BBA-General Subjects May 2. PMID: 24797038</p> <p>Oda, Y., Kimura, M., Kose, S., Fasken, M.B., Corbett, A.H., Imamoto, N. (2014). The Schizosaccharomyces pombe Hikeshi/Opi10 protein has similar biochemical functions to its human homolog but acts in different physiological contexts. FEBS Lett. 588, 1899-1905. PMID: 24768994</p> <p>Kimura, M., Imamoto, N. (2014). Biological significance of the importin-β family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways. Traffic April 25. PMID: 24766099</p> <p>Mäckel, V., Meissl, W., Ikeda, T., Clever, M., Meissl, E., Kobayashi, T., Kojima, T.M., Imamoto, N., Ogiwara, K., Yamazaki, Y. (2014). A novel facility for 3-D micro-irradiation of living cells in a controlled environment by MeV ions. Review of Scientific Instruments 85, 01430. PMID: 24517788</p>
------------------------	---

様式19 別紙1

	<p>Kimura, M., Okumura, N., Kose, S., Takao, T., Imamoto, N. (2013). Identification of cargo proteins specific for importin-β with importin-α applying a stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based in vitro transport system. J24549. PMID: 23846540</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件 Takagi, M., Imamoto, N. (2014) Control of nuclear size by NPC proteins. Cancer biology and nuclear envelope. Adv. Exp. Med. Biol. 773, 571-591. PMID: 24563366 (invited review)</p> <p>(未掲載) 計 4 件 Booth, D., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C.P., Tollervey, D., Earnshaw, W., Vagnarelli, P. (2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. eLife in press.</p> <p>Kimura, M., Thakar, K., Karaca, S., Imamoto, N., Kehlenbach, R. H. (2014). Novel approaches for the identification of nuclear transport receptor substrates. Methods Cell Biol. in press.</p> <p>Furuta, M., Kose, S., Kehlenbach, R. H., Imamoto, N. (2014). Analysis of nucleocytoplasmic transport in digitonin-permeabilized cells under different cellular conditions. Methods Cell Biol. in press.</p> <p>Maeshima, K., Funakoshi, T., Imamoto, N. (2014). Cell-fusion method to visualize interphase nuclear pore (NPC) formation. Methods Cell Biol. in press.</p>
<p>会議発表 計 5 件</p>	<p>専門家向け 計 4 件</p> <p>今本尚子 「核-細胞質間輸送:Importin and Hikeshi」疾患プロテオゲノム 特別講演会 徳島大学 2013 年 5 月 17 日 招待講演</p> <p>Naoko Imamoto “Reconstitution of Nuclear Envelope Subdomain Formation in Human Permeabilized Cells” International Meeting on Mechanism of Nuclear Transport, Marine Biology Laboratory, Woods Hole, MA, USA October 18-23, 2013, Invited talk</p> <p>今本尚子「ストレス時に働く核-細胞質間輸送運搬体分子 Hikeshi (火消し)」名古屋大学理学部セミナー 2013 年 11 月 22 日 招待講演</p> <p>小瀬真吾、亀高愛、本橋詳子、渡邊愛、今本尚子 「熱ストレス時に誘導される分子シャペロン Hsp70 の Hikeshi 依存的核内移行」第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ(主催者 小瀬、吉村) 2013 年 12 月 5 日 神戸</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>今本尚子 「ここまで解明された細胞のなぞ」練馬区光が丘図書館 視聴覚室 2013 年 11 月 16 日</p>
<p>図書 計 0 件</p>	

様式19 別紙1

<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>理化学研究所ホームページ 研究紹介 http://www.riken.go.jp/research/labs/chief/cell_dyn/ 研究室ホームページ http://www.riken.jp/celldynamics/index.html</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、一般市民に向けた以下の講演を行った。 「ここまで解明された細胞のなぞ」練馬区光が丘図書館 視聴覚室 2013年11月16日 (参加人数 およそ50人)</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	<p>第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会合同開催を京大の吉村成弘博士とともに世話人代表として主催した。</p>

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	80,000,000	29,000,000	0	0
間接経費	32,700,000	24,000,000	8,700,000	0	0
合計	141,700,000	104,000,000	37,700,000	0	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	4,523,914	29,000,000	0	33,523,914	33,514,161	9,753	0
間接経費	0	8,700,000	0	8,700,000	8,700,000	0	0
合計	4,523,914	37,700,000	0	42,223,914	42,214,161	9,753	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	11,295,654	Delta Vision用解析用ワークステーション、微量冷却遠心機、消耗品費等
旅費	738,330	海外渡航費、学会等
謝金・人件費等	19,335,142	研究者月例給与等
その他	2,145,035	雑誌投稿費、機器修理費、解析費等
直接経費計	33,514,161	
間接経費計	8,700,000	
合計	42,214,161	

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
Delta Vision用解 析用ワークステ	Applied Precision 製	1	3,231,900	3,231,900	2013/5/15	独立行政法人理 化学研究所
微量冷却遠心機	SS-1500X	1	787,500	787,500	2013/4/23	独立行政法人理 化学研究所
オートクレーブ	トミー精工LSX- 500	1	580,125	580,125	2014/1/17	独立行政法人理 化学研究所