

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20770166
研究課題名（和文）新規解析系を用いた核-細胞質間タンパク質輸送経路同定と制御機構解析
研究課題名（英文）Identification and analysis of nucleocytoplasmic transport pathway using our novel assay system

研究代表者

小瀬 真吾 (Kose Shingo)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：90333278

研究成果の概要（和文）：

熱ショック応答時には、Importin β ファミリー分子依存的な核-細胞質間の分子輸送経路が強く抑制される。しかし一方で、分子シャペロン Hsc70/Hsp70 は細胞質から核に速やかに移行する。この Hsc70/Hsp70 の熱ショック応答性核内移行の分子機構は不明であった。本研究において、Hsc70/Hsp70 の核内輸送に必須な新規機能分子の同定に成功した。さらに、この分子が全く新規な運搬体分子であることを強く示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

Previous studies suggest that the conventional nucleocytoplasmic transport, which is mediated by members of Importin β family, is down-regulated under cellular stress conditions, whereas molecular chaperones Hsc70/Hsp70 is well known to accumulate rapidly into the nucleus in response to heat shock. However, this mechanisms translocating into the nucleus remain elusive. In this study, we purified biochemically a cytosolic protein that is essential for nuclear import of Hsc70/Hsp70. Our data suggest that this molecule is a novel nuclear import receptor for Hsc70/Hsp70.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核-細胞質間分子輸送, 熱ショック応答, Importin

1. 研究開始当初の背景

核-細胞質間の選択的分子流通は、一般に運搬体として機能する Importin β ファミリー分子によって行われる。Importin β ファミリー分子は、核膜孔複合体構成タンパク質 Nucleoporins との直接的な相互作用により、核膜孔を両方向性に通過する活性をもつ。また、GTP 型 Ran が Importin β ファミリー分子に結合することで、Importin β ファミリー分子と輸送基質の結合と解離が制御される。このような Ran システムとカップルした Importin β ファミリー分子による核-細胞質間分子流通の基本メカニズムが近年明らかになった。一方で、人では 20 種近く存在する Importin β ファミリー分子によって、どのような基質が輸送されるのか、また、細胞外刺激や環境変化にตอบสนองして、多様な輸送システムがどのように変化し、細胞機能発現にどのように機能しているかといった問題は不明な点が多い。

我々は以前、熱ショック時の細胞では、正常時と異なり、塩基性アミノ酸に富む核局在化シグナル(NLS) 依存的核内輸送反応が強く抑制されることを見いだした(Furuta, M., et al., 2004, Genes Cells, 9, 429-441)。この核内輸送阻害の原因として、熱ショック時には、NLS 受容体である Importin α が核に集積し、核から細胞質へのリサイクリングが強く阻害されていることを明らかにしている。また、その後の解析から、ストレス応答時には、細胞内の Ran サイクルに異常が生じ、Importin β ファミリー分子の輸送経路全般が一時的に抑制される可能性が示唆された。しかし、そのような条件下においても、分子シャペロン Hsc70/Hsp70 などは、ストレスにตอบสนองし、速やかに細胞質から核に移行することが古くから知られている。熱ショックなどのストレス応答時に、細胞内の輸送システムがどのように変化し、Hsc70/Hsp70 がどのような分子メカニズムで核内に移行するのか、それらの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

代表的な分子シャペロンのひとつである Hsc70/Hsp70 は、熱ショックなどの細胞ストレスにตอบสนองし、細胞質から核および核小体に一過的に速やかに集積する。この現象は 20 年以上前から明らかであったが、その分子メカニズムは不明であった。そこで、本研究では、Hsc70/Hsp70 核内移行を解析するための in vitro 輸送系を構築し、熱ショック応答に

おける Hsc70/Hsp70 の核内移行機構を分子レベルで明らかにすることが本研究目的である。

3. 研究の方法

本研究分野では、ジギトニン処理によって作成したセミインタクト細胞を利用して in vitro での輸送解析を行うことが一般的である。我々の以前の解析から、in vitro 輸送系において、GFP 融合 Hsc70 リコンビナントタンパク質は、熱ショック処理をした細胞からの抽出液(熱ショックサイトゾル)と ATP に依存して、セミインタクト細胞の核に効率よく集積することが明らかとなっている。そこで、Hsc70 の核内移行が、Importin (核内運搬体分子) 依存的かどうか、さらにどの Importin に依存的かどうかを、熱ショックサイトゾルと全 Importin リコンビナントタンパク質を使用して、in vitro 輸送系で解析する。また、Hsc70 の核内移行が Importin 非依存的であった場合は、熱ショックサイトゾルを分離分画し、運搬体分子の精製を目指す。

4. 研究成果

(1) 熱ショック時における核内移行解析系の構築
分子シャペロン Hsc70 は正常時には細胞質に局在するが、熱ショックにตอบสนองして、速やかに核内に集積する。通常の HeLa 細胞抽出液を使用して、セミインタクト細胞での in vitro 輸送アッセイを行っても、Hsc70 の効率のよい核内集積は観られない。しかし、HeLa 細胞を熱ショック処理した後に細胞抽出液を調整し、この細胞抽出液(熱ショックサイトゾル)を用いて in vitro アッセイを行うと、Hsc70 の核内移行が効率よく再現できた。

また、塩基性 NLS (Importin α/β 依存的輸送経路) や M9 シグナル (Transportin 依存的輸送経路) をもつ輸送基質を熱ショック処理をした細胞にマイクロインジェクションし、その核内移行を観察すると、正常時の細胞よりも核内移行効率が低下する。そこで、熱ショックサイトゾルを使用して、正常時における Importin β ファミリー分子依存的輸送反応を解析した。その結果、熱ショックサイトゾルを使用した場合は、in vivo での結果と同様に、塩基性 NLS や M9 シグナル依存的核内輸送効率が低下することが判った。

以上の結果から、セミインタクト細胞での in vitro 輸送系において、熱ショックサイトゾルを使用すると、熱ショック時における核内輸送反応 (Hsc70 の核内移行活性化や Importin β ファミリー依存的輸送経路の効率低下) を再現することが可能であることが判った。

(2) Hsc70/Hsp70 核内運搬体分子の新規同定

Hsc70/Hsp70 の核内移行が Importin β ファミリー分子に依存的かどうかを解析するため、細胞抽出液から Importin β ファミリー分子の吸収を試みた。Importin β ファミリー分子は、核膜孔複合体構成タンパク質 Nucleoporins と疎水的相互作用によって核膜孔を通過すると考えられている。そのため、細胞抽出液を低塩濃度下で疎水性カラムに通すと、Importin β ファミリー分子を効率よく吸収することができた(吸収サイトゾル)。

この Importin β ファミリー分子群が欠損した吸収サイトゾルに、各 Importin β ファミリー分子のリコンビナントタンパク質を再添加することで、それぞれの運搬体分子が担う輸送経路を再構築できることを明らかにした。しかし、Hsc70 の核内移行は、どの Importin(核内輸送担体分子)でも促進されなかった。

そこで、熱ショック処理後の細胞抽出液を生化学的に分画することで、Hsc70/Hsp70 の核内移行に必須であるタンパク質の同定を試みた。その結果、Hsc70 の核内移行活性と高い相関を示すひとつのタンパク質を発見した。質量分析によりこの分子のアミノ酸配列を決定すると、この分子はデータベース上において C11orf73 と登録されており、そのアミノ酸配列は酵母から人まで進化的に非常に保存されていることが判った。しかし、報告されているどの生物種においても、その分子機能は全く不明であった。

この分子の機能を、生細胞で明らかにするため、siRNA 処理を行った。その結果、この分子のタンパク質発現量を低下させても、通常の細胞増殖には顕著な影響は見られなかった。しかし、熱ショック処理後の生存率は、正常細胞に比べて、50%程度に低下した。また、siRNA 処理をした細胞では、熱ショック時においても Hsc70/Hsp70 の細胞内局在は細胞質のままであり、核への局在変化を示さなかった。

熱ショック時には、転写因子 HSF1 の活性化によって、Hsp70 などの発現量が亢進する。しかしまた、Hsp70 は核内で HSF1 に結合することで、その転写活性を負に制御することが知られている(負のフィードバック制御)。通常は、熱ショック処理によって亢進した Hsp70 mRNA 発現量は、正常温度に戻すことで、その発現量は再び抑制される。そこで、新規同定分子を siRNA 処理した細胞における Hsp70 mRNA の発現量変化を解析した。すると、siRNA 処理をした細胞では、コントロール細胞よりも Hsp70 mRNA の発現亢進がより長時間維持されることが判った。

これらの結果は、C11orf73 依存的な Hsc70/Hsp70 輸送経路が、熱ショック時における細胞防御に重要な働きを持ち、HSF1 依存的な熱ショック応答反応に寄与しているこ

とを示している。

この分子はアミノ酸配列上、運搬体 Importin β ファミリーとの相同性は認められなかった。しかし、この分子が運搬体分子として機能するかどうかを解析したところ、この分子は、核-細胞質間運搬体分子として機能するための主要な二つの性質、1) 基質認識: Hsc70/Hsp70 と特異的に結合する、2) 核膜孔通過能: 核膜孔構成因子との直接的相互作用によって、核膜孔を通過する、をもつことが明らかになった。これらの結果は、この新規同定分子が、運搬体分子として機能することを強く示唆している。

本研究における以上の結果から、熱ショック時には、正常時の Importin β ファミリー依存的輸送経路が一時的に抑制され、分子シャペロン Hsc70/Hsp70 など特定の輸送経路が活性化されることが明らかとなった。また、熱ショック時に機能する新規運搬体分子の同定に成功し、この分子は分子シャペロン Hsc70/Hsp70 を核内へ輸送することを明らかにした。また、これらの結果は、輸送システムは常に一定ではなく、それぞれの状況において、細胞機能を効率よく発現させるために輸送経路網が最適化されるという可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Iino, H., Maeshima, K., Nakatomi, R., Kose, S., Hashikawa, T., Tachibana, T., Imamoto, N. (2010) A live imaging system for visualizing nuclear pore complex (NPC) formation during interphase in mammalian cells. *Genes Cells* (in press) 査読有

2. Kosako, H., Yamaguchi, N., Aranami, C., Ushiyama, M., Kose, S., Imamoto, N., Taniguchi, H., Nishida, E., and Hattori, S. (2009) Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1026-1035. 査読有

3. Hatayama, M., Tomizawa, T., Sakai-Kato, K., Bouvagnet, P., Kose, S., Imamoto, N., Yokoyama, S., Utsunomiya-Tate, N., Mikoshiba, K., Kigawa, T., and Aruga J. (2008) Functional and structural basis of the nuclear localization signal in the ZIC3 zinc finger domain. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3459-3473. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 小瀬 真吾、今本 尚子
熱ショック時における分子シャペロン Hsc70 の核

内移行を促進するタンパク質の同定

Identification of a protein facilitating nuclear import of molecular chaperone Hsc70 under heat shock

第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸市

2. Shingo Kose, Naoko Imamoto

Analysis of nuclear import of molecular chaperone 70kDa heat shock cognate protein (Hsc70)

第 61 回日本細胞生物学会大会、2009 年 6 月 2 日、名古屋市

[図書] (計 2 件)

1. 小瀬真吾

“化合物で乗り物タンパク質を発見” 入門ケミカルバイオロジー編集委員会編「入門ケミカルバイオロジー」(株オーム社, 2008 年, 189 ページ(134-135))

2. 小瀬真吾、今本尚子

“細胞質から核へのタンパク質輸送” 岡田弘晃監修「機能性 DDS キャリアの製剤設計」(株シーエムシー出版, 2008 年, 321 ページ(169-176))

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/wako/cell-dyna/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小瀬 真吾 (Kose Shingo)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：90333278