

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440109

研究課題名(和文) Hikeshiによるストレス依存的核輸送の駆動機序とその生理機能解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism and physiological functions of the stress-responsive nucleocytoplasmic transport mediated by Hikeshi

研究代表者

小瀬 真吾 (Kose, Shingo)

国立研究開発法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：90333278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Hikeshiは、熱ストレス時に分子シャペロンHSP70を細胞質から核に輸送する運搬体分子である。本研究では、Hikeshi遺伝子の点変異が重篤な遺伝性疾患を誘引することを明らかにした。Hikeshiが熱ストレス時以外にも重要な機能をもっている可能性が強く示唆された。また、Hikeshiがタンパク質の構造維持機構でも機能していることや、Hikeshi結晶構造を明らかにするなど、Hikeshi輸送の新しい分子メカニズムや機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nuclear import of molecular chaperone HSP70 under heat-stress conditions is mediated by a nucleocytoplasmic transport carrier, Hikeshi. This study revealed that V54L point-mutation in Hikeshi gene is associated with a severe hereditary disease. These results suggest that Hikeshi is likely to have important role(s) not only under heat-stress conditions, but also in various cellular situations. Further, we reported the crystal structure of Hikeshi. These studies provided insights into new mechanism and functions of the Hikeshi-mediated transport.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核-細胞質間輸送 熱ストレス 分子シャペロン Hikeshi

1. 研究開始当初の背景

核-細胞質間の分子輸送は、一般に Importin β ファミリーと称される運搬体分子群によって担われる。しかし、近年、Importin β ファミリーによる輸送活性は一様ではなく、細胞状態や分化・発生の段階で変化することが判ってきた。

本研究者らは、以前、熱ストレス時には、Importin β ファミリーによる輸送活性が低下することを見出した(Furuta, M., et al. 2004, Genes Cells)。熱ストレス時には、代表的なサイトゾル分子シャペロンである HSP70 が細胞質から核に集積することが古くから知られていたが、その輸送分子の実体は不明であった。本研究者らは、熱ストレス時に HSP70 を核に運ぶ運搬体分子の同定に成功し、この分子を“Hikeshi (火消し)”と命名した(Kose, S., et al., 2012, Cell)。Hikeshi が欠損した細胞では、熱ストレス温度から正常温度に戻しても、細胞のストレス状態が持続し、生存率も顕著に低下する。これらの結果は、熱ストレス時において、Hikeshi 輸送活性と HSP70 の核内機能の重要性を示している。

一方、イスラエルの研究者グループが、神経変性疾患に似た症状を示す遺伝性疾患患者の遺伝子解析を行ったところ、Hikeshi 遺伝子に点変異があることが見つかった。その結果、医学的見地からも Hikeshi の機能解析の重要性が高まった。

2. 研究の目的

本研究では、熱ストレス時における Hikeshi 輸送経路の駆動機序と、HSP70 分子シャペロンシステムにおける Hikeshi の機能の発掘と解析を進めることで、ストレス時における「核-細胞質間タンパク質輸送」と「分子シャペロンシステム」の統合的機能理解を目指した。また、ヒト遺伝性疾患の原因となる Hikeshi 点変異体を解析することで、この疾患の発症機序の解明や医学的応用への貢献を目標とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト遺伝性疾患における Hikeshi 点変異体の解析

イスラエルでの遺伝性疾患のエキソーム解析から、Hikeshi 遺伝子のミスセンス点変異 V54L が見つかった。この遺伝子変異をもつ患者は、大脳白質の変性疾患である白質脳症の症状が診られ、幼児期に死亡することが多い。

患者由来の線維芽細胞を入手し、熱ストレス時における Hsp70 の細胞内局在変化と、内在性 Hikeshi 点変異体タンパク量をウエスタンブロッティングで解析した。また、Hikeshi-V54L タンパク質の基本的性質を生化学的解析や *in vitro* 輸送系で解析し、野

生型と比較した。

(2) 分子シャペロン HSP70 システムでの Hikeshi の機能

Hikeshi の新しい細胞内機能発掘を目指し、タンパク質フォールディングにおける機能解析を進めた。変性ルシフェラーゼタンパク質を基質とし、網状赤血球からの細胞抽出液やリコンビナントタンパク質を用いて、タンパク質リフォールディングアッセイを行った。

(3) Hikeshi の結晶構造解析

Lee 研究室(Chungbuk National Univ., 韓国)との共同研究として解析を行った。ヒト Hikeshi 及び Hsc70 リコンビナントタンパク質を大腸菌内で発現誘導し、精製した。Hikeshi の結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行った。

得られた構造を基に Hikeshi 点変異体タンパク質を作成し、Hikeshi の機能ドメイン解析を行った。

(4) Hikeshi 輸送の駆動メカニズムの解析

蛍光相関分光法/蛍光相互相関分光法(FCS/FCCS)を利用し、正常時と熱ストレス時の Hikeshi と HSP70 の分子間相互作用解析を行った。

別種の蛍光タンパク質で標識した TagRFP-Hikeshi と EGFP-Hsc70 を培養細胞内で発現させ、それらの相互作用のダイナミクス変化を解析することを試みた。また、細胞抽出液やリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 系でも同様の解析を行った。

(5) Hikeshi ノックアウト細胞における遺伝子発現変化の解析

CRISPR-Cas9 により Hikeshi 発現をノックアウトした HeLa 細胞を作成し、新学術領域「ゲノム支援」の援助を受け、RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。野生型 HeLa 細胞と Hikeshi ノックアウト HeLa 細胞で、正常時、熱ストレス時、ストレスからの回復時における遺伝子発現変化のデータを得た。

4. 研究成果

(1) ヒト遺伝性疾患における Hikeshi 点変異体の解析

患者由来の線維芽細胞を熱ストレスに曝すと、正常細胞と異なり、HSP70 の核集積が効率良く観察されなかった。しかし、生化学的解析からは、野生型よりも、Hikeshi-V54L 点変異体の方が HSP70 との結合が強く、*in vitro* 輸送系においても、効率よく HSP70 を核に運ぶ活性を有していた。そこで、患者由来線維芽細胞における内在性 Hikeshi (V54L) タンパク質の量を調べた。すると、患者細胞では、コントロール細胞に比べて、Hikeshi タンパクが顕著に少量しか存在していない

ことが判った。患者細胞において、熱ストレス時に HSP70 が核に集積しなかったのは、内在性 Hikeshi (V54L) が減少していたためと考えられた。

以上の結果から、Hikeshi の遺伝子変異がヒト疾患の原因となることが明らかになり、Hikeshi が生体内で、熱ストレス時以外にも重要な機能をもっている可能性が強く示唆された。

この成果を原著論文として報告した(雑誌論文 2)。

(2) 分子シャペロン HSP70 システムでの Hikeshi の機能

変性ルシフェラーゼタンパク質を基質とするタンパク質リフォールディングアッセイ系に、リコンビナント Hikeshi タンパク質を過剰量加えると、ルシフェラーゼのリフォールディングが抑制されることが判った。HSP70 との結合が弱い Hikeshi 変異体では、この抑制効果も弱くなることから、Hikeshi が HSP70 シャペロンシステムへ直接関与しているものと思われる。

Hikeshi が核-細胞質間タンパク質輸送以外にも機能している可能性が示唆された。

(3) Hikeshi の結晶構造解析

ヒト Hikeshi タンパク質の結晶構造を明らかにした。Hikeshi 結晶構造は、C 末領域とリンカー領域間の作用で、特徴的な非対称性ホモダイマーを形成していた。このダイマー形成は、HSP70 との結合ならびに核への輸送に重要であることを Hikeshi 点変異体等を用いた解析で明らかにした。また、N 末側領域には、FG-Nup 結合部位に似た疎水性ポケットがあり、柔軟性のあるループ構造(E-loop)が、この疎水性ポケットに埋め込まれた形で存在した。この疎水性ポケットと E-loop の相互作用が Hikeshi の核膜孔通過活性を制御する可能性を示し、新しい核膜孔通過制御機構の存在を提唱した。

この成果を原著論文として報告した(雑誌論文 4)。

(4) Hikeshi 輸送の駆動メカニズムの解析

細胞抽出液やリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* での解析から、熱ストレス温度(43 °C)で処理することで、Hikeshi と HSP70 の分子間相互作用が劇的に上昇することが明らかとなった。さらに、この相互作用は ATP 依存的であった。

また、*in vitro* 輸送系での解析から、熱前処理によって、Hikeshi 依存的な HSP70 の核への移行が促進されることを明らかにした。

これらの結果は、熱そのものが HSP70 の核輸送を活性化する重要な一つの要素であることを示すものである。

(5) Hikeshi ノックアウト細胞における遺伝子発現変化の解析

RNA-seq 解析から、Hikeshi ノックアウト細胞では、正常温度においても、Hsp70 などの熱ストレスタンパク質(Hsps)の発現が亢進していることが判った。これらの熱ショックタンパク質関連遺伝子は転写因子 HSF1 によって発現誘導されることが知られている。Hikeshi タンパク質が欠損すると、何らかの機構で細胞にストレスがかかり、HSF1 の活性化を誘導している可能性が考えられる。

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 9 件)

全て査読有り。

1. Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 importin pathways. Kimura, M., Morinaka, Y., Imai, K., Kose, S., Horton, P., Imamoto, N. *Elife* (2017) Jan 24;6. pii: e21184. doi: 10.7554/eLife.21184.
2. Leukoencephalopathy and early death associated with an Ashkenazi-Jewish founder mutation in the Hikeshi gene. Edvardson, S.[#], Kose, S.[#], Jalas, C.[#], Fattal-Valevski, A., Watanabe, A., Ogawa, Y., Mamada, H., Fedick, A.M., Ben-Shachar, S., Treff, N.R., Shaag, A., Bale, S., Gärtner, J., Imamoto, N., Elpeleg, O. *J. Med. Genet.* (2016) 53, 132-137. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103232. ([#]equally contributed authors)
3. Molecular mechanism by which acyclic retinoid induces nuclear localization of transglutaminase 2 in human hepatocellular carcinoma cells. Shrestha, R., Tatsukawa, H., Shrestha, R., Ishibashi, N., Matsuura, T., Kagechika, H., Kose, S., Hitomi, K., Imamoto, N., Kojima, S. *Cell Death Dis.* (2015) Dec 3;6:e2002. doi: 10.1038/cddis.2015.339.
4. Structural and functional analysis of Hikeshi, a new nuclear transport receptor of Hsp70s. Song, J., Kose, S.^{*}, Watanabe, A., Son, S.Y., Choi, S., Hong, H., Yamashita, E., Park, I.Y., Imamoto, N.^{*}, Lee, S.J.^{*} *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* (2015) 71, 473-483. doi: 10.1107/S1399004714026881. (^{*}corresponding authors)
5. Reconstitution of nucleocytoplasmic transport using digitonin-permeabilized cells. Kose, S., Funakoshi, T., Imamoto, N.

- Methods Mol. Biol. (2015) 1262, 291-303.
doi: 10.1007/978-1-4939-2253-6_18.
6. 「Hikeshi: 熱ストレス時の核-細胞質間タンパク質輸送」
小瀬 真吾
生化学 (2015) 87, 27-33.
(小瀬真吾、「特集: 核-細胞質間分子輸送システム: 基本分子メカニズムの理解とその応用」同号企画)
7. Analysis of nucleocytoplasmic transport in digitonin-permeabilized cells under different cellular conditions.
Furuta, M., Kose, S., Kehlenbach, R.H., Imamoto, N.
Methods Cell Biol. (2014) 122, 331-352.
doi:10.1016/B978-0-12-417160-2.00015-1.
8. Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems. (Review.)
Kose, S., Imamoto, N.*
Biochim. Biophys. Acta. (2014) 1840, 2953-2960.
(*corresponding authors)
doi:10.1016/j.bbagen.2014.04.022.
9. The Schizosaccharomyces pombe Hikeshi/Opi10 protein has similar biochemical functions to its human homolog but acts in different physiological contexts.
Oda, Y., Kimura, M., Kose, S., Fasken, M.B., Corbett, A.H., Imamoto, N.
FEBS Lett. (2014) 588, 1899-1905.
doi:10.1016/j.febslet.2014.04.018.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会合同開催
Hikeshi ノックアウト細胞における遺伝子発現変化とストレス応答の解析
小瀬真吾、渡邊愛、高木昌俊、儘田博志、今本尚子
2017 年 1 月 11-13 日(ポスター)、千葉県木更津市(かずさアカデミアホール)
2. 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム「温度生物学の新展開」
核-細胞質間タンパク質運搬体分子 Hikeshi: 熱ストレス時に活性化する分子シャペロン HSP70 輸送機構とその生理機能
小瀬真吾、今本尚子
2016 年 9 月 25 日(口頭、招待)、宮城県仙台市(東北大学川内キャンパス)
3. 第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会合同開催
「核-細胞質間輸送運搬体 Hikeshi の機

- 能: 熱ストレス応答時における遺伝子発現変化の網羅的解析」
小瀬真吾、高木昌俊、儘田博志、今本尚子
2016 年 1 月 12-14 日(ポスター)、宮城県宮城郡(松島一の坊)
4. 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会合同大会
「熱ストレス依存的 HSP70 運搬体分子 Hikeshi: その機能と遺伝性疾患」
小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2015 年 12 月 1-4 日(ポスター)、神戸市(神戸ポートアイランド)
5. 第 67 回日本細胞生物学会大会
「HSP70 輸送分子 Hikeshi: その構造と機能」
小瀬真吾、Jinsue Song、渡邊愛、Soo Jae Lee、今本尚子
2015 年 6 月 30-7 月 2 日(ポスター&ポスタートーク)、東京都江戸川区(タワーホール船堀)
6. 第 87 回日本生化学会大会
「HSP70 分子シャペロンシステムにおける核-細胞質間運搬体分子 Hikeshi の機能解析 (Functional analysis of a nuclear import carrier Hikeshi on the molecular chaperone system of HSP70)」
小瀬真吾、渡邊愛、儘田博志、高木昌俊、今本尚子
2014 年 10 月 15-18 日(18 日ポスター)、京都市(国立京都国際会館)
7. 第 66 回日本細胞生物学会大会
「分子シャペロン HSP70 運搬体分子 Hikeshi の輸送機構とその機能解析 (Molecular mechanism and function of the Hikeshi-mediated nuclear import of HSP70)」
小瀬真吾、亀高愛、渡邊愛、本橋詳子、今本尚子
2014 年 6 月 11-13 日(11 日口頭)、奈良市(奈良県新公会堂)
8. 理研シンポジウム 細胞システムの動態と論理 VI
「Hikeshi による熱ストレス依存的 HSP70 核内移行」
小瀬真吾
2014 年 4 月 3-4 日(ポスター)、埼玉県和光市(理研)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_dyn/

6．研究組織

(1)研究代表者

小瀬 真吾 (KOSE, Shingo)

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：9 0 3 3 3 2 7 8