

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570242

研究課題名(和文) ストレス応答性新規核-細胞質間分子輸送機構とその機能解析

研究課題名(英文) Mechanism and function of a novel stress-induced nuclear import pathway

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：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新規運搬体分子を同定し、その分子をHikeshiと命名した。HSP70のHikeshi依存的核内移行は、HSP70のATPaseサイクルと共役していることが判り、従来のImportinファミリー分子による輸送とは異なる分子メカニズムで駆動している可能性が示唆された。さらに、細胞の熱ストレスダメージからの回復に、Hikeshi輸送経路とHSP70が核内で機能することが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nuclear import of molecular chaperones HSP70 is up-regulated during cellular thermal stresses. However, the mechanism of nuclear transport and physiological significance of HSP70 in the nucleus remains to be unknown. Using our in vitro transport system under heat stress conditions, we identified a novel nuclear import carrier named Hikeshi that mediates heat-stress-induced nuclear import of HSP70. Unlike importin-beta-family-mediated nuclear transport, the Hikeshi-mediated nuclear import of HSP70 is coupled with the ATPase cycle of HSP70. In human living cells, depletion of Hikeshi reduces cell viability during recovery from heat stress conditions, and delays the attenuation and reversion of the heat stress response significantly. Nuclear HSP70 rescues the effect of Hikeshi-depletion partially, suggesting that HSP70 counteracts to the heat stress damages by acting in the nucleus.

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-細胞質間輸送 分子シャペロン 熱ストレス

1. 研究開始当初の背景

機能分子の核-細胞質間の選択的輸送は、Importin ファミリー(ヒトでは 20 種以上)と称される進化的によく保存された運搬体分子群によって担われる。また、その輸送の方向性は、GTP 型 Ran の核-細胞質間の濃度差(勾配)によって制御される。この RanGTPase サイクルと共役した輸送システムは、間期核における輸送のみならず、細胞分裂期の染色体分配や核膜再形成にも機能し、細胞機能発現の様々な局面で重要な制御システムであることが明らかとなっている。しかし、この核-細胞質間分子輸送システムが、様々な環境応答刺激によってどのように反応するのか、さらには高次生命現象にどのような機能をもっているのかを明らかにすることは、本研究分野の重要な課題であった。

本研究者は、代表的な細胞外刺激のひとつとして熱ショックを取り上げ、熱ショック応答時の輸送反応を解析した。その結果、熱ショック応答時には、複数の Importin ファミリー依存的輸送経路が抑制される一方で、分子シャペロン HSP70(Hsc70/Hsp70)の核内輸送効率が劇的に上昇することを明らかにした(Furuta, M., et al., 2004, Genes Cells, 9, 429-441)。過酸化水素処理等での観察と同様に、熱ストレス時においても Ran の細胞内局在変化(細胞質内 Ran の増加)が観察され、様々な細胞ストレス応答時には正常時の Importin ファミリー分子依存的輸送経路が全般的に抑制されることが示唆された。一方、代表的な熱ショックタンパク質である HSP70 は、熱ストレスに応答して発現が亢進し、細胞質から核に局在を変化させることが知られていた(Velazquez, JM. and Lindquist, S., 1984, Cell, 36, 655-662)。しかし、HSP70 の核内移行機構の詳細は長く不明なままであった。

本研究者は、熱処理した培養細胞からの抽出液を用いて、熱ストレス応答時の HSP70 核内移行を解析する *in vitro* 輸送解析系を構築した。リコンビナント GFP-HSP70 タンパク質の核内移行活性を指標に、HSP70 核内輸送因子を生化学的に分離精製することで、ヒト新規タンパク質 C11orf73(後に Hikeshi と命名)を同定し、この分子が熱ストレス時に HSP70 を核に輸送する運搬体として機能することを明らかにした。この分子は、アミノ酸配列上酵母からヒトまで高度に保存されているものの、Importin ファミリーとの相同性はなく、その機能は全く不明であった。

2. 研究の目的

細胞ストレス応答時には、正常時と異なる核-細胞質間分子輸送経路が活性化される。本研究者は、20 年以上不明であったストレス応答時に核内に移行する分子シャペロン HSP70 の運搬体分子(Hikeshi と命名)の同定

に成功した。本研究は、この新規核-細胞質間輸送経路の詳細を明らかにするとともに、ストレス応答による核-細胞質間分子輸送システムの変換機構とその機能を解析する。また、その解析を通して、細胞分化、老化等における分子シャペロンの新しい機能理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) 核-細胞質間運搬体分子としての Hikeshi の機能解析と細胞核ストレス応答における役割。

Hikeshi と輸送基質 HSP70 の結合様式をリコンビナントタンパク質で解析した。HSP70 コシャペロンタンパク質である HSP40 や HSP110 を利用し、ATP 型 HSP70 と ADP 型 HSP70 の Hikeshi 結合能を解析した。

さらに、*in vitro* 輸送系で、Hikeshi 依存的 HSP70 の核内移行活性を確認するとともに、Hikeshi 分子の核膜孔通過活性を解析した。

(2) Hikeshi 輸送経路の細胞熱ストレス応答における役割。

siRNA-Hikeshi 処理した HeLa 細胞に熱ストレスを与え、その生存率を解析した。また、熱処理後、細胞を正常温度に戻し、その後の細胞状態をイメージングによって観察した。

熱ストレス時の核内 HSP70 の機能を調べるために、予め核局在化シグナル(NLS)を融合させた Hsc70(ストレス、Hikeshi 両非依存的に核内に定常的に局在する)を発現させた HeLa 細胞を、同様に siRNA-Hikeshi 処理し、熱ストレス後の細胞生存率を解析した。

(3) HSP70 以外の Hikeshi 相互作用分子のスクリーニング。

Hikeshi が輸送する HSP70 以外の基質や制御機能分子の探索を試みた。細胞抽出液からの Hikeshi によるプルダウンや酵母ツーハイブリッド法により、Hikeshi との相互作用分子の同定を行った。

(4) Hikeshi の HSP70 基質認識機構の解析。

Hikeshi の HSP70 認識機構を明らかにするために、Hsc70 deletion mutant を用いて、Hsc70 の Hikeshi 結合部位の同定を試みた。

さらに共同研究として、蛍光相関・蛍光相互相関法(FCS/FCCS)を用いて、GFP-Hsc70 と TagRFP-Hikeshi の分子間相互作用解析と、Hikeshi の結晶構造解析を試みた。

(5) ヒト以外の生物種における Hikeshi の機能解析。

Hikeshi が進化的に保存されているため、モデル生物として線虫や酵母の Hikeshi ホモログの解析を行い、細胞分化や老化等における Hikeshi 輸送経路の機能を解析することを試みた。

線虫 Hikeshi ホモログは機能未知である。

線虫 Hikeshi の遺伝子クローニングを行った。RNAi 法により線虫 Hikeshi のノックダウンを行い、線虫個体における熱耐性を解析した。

Hikeshi 分裂酵母ホモログ(spHikeshi)の遺伝子クローニングを行い、その機能解析を行った。spHikeshi と分裂酵母 HSP70 の結合確認と、HeLa 細胞での in vitro 輸送系において輸送活性を解析した。また、分裂酵母での熱ストレス耐性等を解析した。

4. 研究成果

(1) 新規核-細胞質間運搬体分子 Hikeshi の機能解析。

Hikeshi は、ATP 型 HSP70 と効率よく結合し、ADP 型 HSP70 との結合は弱かった。また、幾つかの核膜孔構成タンパク質 FG-Nup と結合し、核膜孔を通過する活性を持つことを明らかにした。siRNA 処理で Hikeshi タンパク質発現を抑制した培養細胞では、熱ストレス時においても HSP70 の核内移行は促進されなかった。これらの結果、Hikeshi は、熱ショック時に ATP 型 HSP70 を核に運び、新しい運搬体分子であることを明らかにした。これにより、細胞ストレス時には、核-細胞質間輸送システムの大きな変換が起こることが明らかとなった。

(2) Hikeshi 輸送経路と細胞熱ストレス応答における役割。

siRNA-Hikeshi 処理をした細胞では、熱ストレス処理後再び正常温度に戻しても、Hsp70 mRNA 発現上昇、転写因子 HSF1 の核内ストレス顆粒形成や核小体タンパク質の局在変化などのストレス応答状態が長く持続することが観察された。また、細胞生存率も低下したが、核局在化 Hsc70 を発現させておいた細胞では、その生存率が 50%程度上昇した。これらの結果は、熱ストレスからの細胞保護や回復に、Hikeshi 依存的輸送経路と HSP70 の核内での機能が重要であることを示している。

以上(1)(2)の研究成果を学術雑誌に報告した (Kose, S., et al., Cell, 2012)。

(3) Hikeshi 相互作用分子の同定。

酵母ツーハイブリッド法や免疫沈降法などによって Hikeshi 結合分子のスクリーニングを行った。幾つかの候補遺伝子の同定に成功した。今後、相互作用確認とその機能解析を行う予定である。

(4) Hikeshi の HSP70 基質認識機構の解析。

Hsc70 deletion mutant を用いた結合実験からは、Hikeshi が結合する Hsc70 領域を同定することは出来なかった。HSP70 は ATP/ADP 型変換に伴い大きく分子構造が変化することが知られている。Hikeshi は HSP70 の立体構造変化を認識し、ATP 型 HSP70 と結合する可能性が示唆された。

蛍光相関法/蛍光相互相関法(FCS/FCCS)による Hikeshi と HSP70 の分子間相互作用解析を行った。細胞抽出液やりコンビナントタンパク質を用いての in vitro 解析から、Hikeshi と HSP70 の温度依存的な分子間相互作用を示唆する予備的結果が得られた。

(5) ヒト以外の生物種における Hikeshi の機能解析。

Hikeshi 線虫ホモログの遺伝子クローニングを行い、データベースに登録されていないスプライシングバリエーションを得た。この C 末領域はヒト等の Hikeshi 遺伝子との相関性が高く、線虫 hsp-1 やほ乳類 HSP70 との結合が確認出来た。さらに、RNAi により Hikeshi ノックダウンした線虫では、熱耐性が低下することが明らかになった。線虫個体においても、Hikeshi が熱ストレス応答に機能している可能性が示唆された。

分裂酵母 spHikeshi は、Ssa2(分裂酵母 Hsp70)と結合し、HeLa 細胞での in vitro 輸送系において Ssa2 を核内に輸送した。spHikeshi 破壊株を用いた解析から、分裂酵母では spHikeshi の熱ストレス時での要求性は確認出来なかったが、グルコース枯渇時の要求性が確認された。これらの成果を学術雑誌に報告した(Oda, Y., et al., FEBS Lett., 2014)。

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 5 件)

1. 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., pii: S0014-5793(14)00304-4. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.018. 査読有
2. Kimura, M., Okumura, N., Kose, S., Takao, T., and Imamoto, N. (2013) Identification of cargo proteins specific for Importin- with Importin- applying a stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based in vitro transport system. J. Biol. Chem., 288(34):24540-24549. doi: 10.1074/jbc.M113.489286. 査読有
3. Kimura, M., Kose, S., Okumura, N., Imai, K., Furuta, M., Sakiyama, N., Tomii, K., Horton, P., Takao, T., and

- Imamoto, N. (2013) Identification of cargo proteins specific for the nucleocytoplasmic transport carrier transportin by combination of an in vitro transport system and SILAC-based quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 12, 145-157. doi: 10.1074/mcp.M112.019414. 査読有
4. Imamoto, N., and Kose, S. (2012) Heat-shock stress activates a novel nuclear import pathway mediated by Hikeshi. *Nucleus* 3, 422-428. (*Extra view*) doi: 10.4161/nucl.21713 査読有
5. Kose, S., Furuta, M., and Imamoto, N. (2012) Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat-shock induced nuclear damage. *Cell*, 27, 149, 578-589. *corresponding authors (*Faculty of 1000 selected paper*) doi: 10.1016/j.cell.2012.02.058. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 第 36 回日本分子生物学会年会
The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
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
小瀬真吾、亀高愛、本橋詳子、渡邊愛、今本尚子
(理研・今本細胞核機能研究室)
Thermal stress-induced nuclear import of Hsp70 mediated by Hikeshi
Shingo Kose, Ai Kametaka, Shoko Motohashi, Ai Watanabe, Shoko Motohashi, Naoko Imamoto
(Cellular Dynamics Laboratory, RIKEN)
2013 年 12 月 3-6 日(5 日 WS オーガナイザー、口頭)、神戸市(神戸ポートアイランド)
2. 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
ストレス応答時の核-細胞質間タンパク質輸送: 運搬体分子 Hikeshi と分子シャペロン Hsp70 の分子間相互作用解析
小瀬真吾 1、亀高愛 1、白燦基 2、佐甲靖志 2、今本尚子 1
(理化学研究所: 1 今本細胞核機能研究室、2 佐甲細胞情報研究室)
2013 年 11 月 25-27 日(26 日ポスター)、神奈川県足柄下郡(ホテルおかだ)
3. 第 86 回日本生化学会大会
核-細胞質間運搬体分子 Hikeshi と分子
- シャペロン Hsp70 の相互作用とその機能解析
小瀬真吾、渡邊愛、亀高愛、本橋詳子、今本尚子
(理研・今本細胞核機能研究室)
Analysis of the interaction between nuclear import carrier, Hikeshi, and molecular chaperone Hsp70 and its cellular function
Shingo Kose, Ai Watanabe, Ai Kametaka, Shoko Motohashi, Naoko Imamoto
(Cellular Dynamics Lab., RIKEN)
2013 年 9 月 11-13 日(13 日ポスター)、横浜市(パシフィコ横浜)
4. 第 85 回日本生化学会大会
熱ストレス時に機能する核-細胞質間運搬体分子 Hikeshi と分子シャペロン Hsp70 の機能
小瀬真吾、亀高愛、渡邊愛、本橋詳子、今本尚子
(理研・基幹研・今本細胞核機能研究室)
2012 年 12 月 16 日(ポスター&口頭)、福岡市
5. Kose, S., Kametaka, A., Watanabe, A., and Imamoto, N. "Nuclear import receptor, Hikeshi, for Hsp70s is required for attenuation of heat-shock response and protecting cell damages from stress" Dynamic Organization of Nuclear Function Meeting, Cold Spring Harbor, New York, USA, Sept 27-Oct 1 (2012)
6. 第 45 回日本発生生物学会/第 64 回日本細胞生物学会合同大会
Hikeshi, a novel nuclear import carrier for Hsc70/Hsp70, protects cells from heat-shock induced nuclear damage
Shingo Kose, Maiko Furuta, Ai Watanabe, Ai Kametaka, Naoko Imamoto
2012 年 5 月 31 日(ポスター)、神戸市
7. 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 IV」
熱ショック応答と核-細胞質間蛋白質輸送: 新規運搬体分子 "Hikeshi" の機能解析
小瀬真吾、亀高愛、白燦基、佐甲靖志、今本尚子
2012 年 4 月 12-13 日(ポスター)、和光市(理研)
8. 第 10 回核ダイナミクス研究会
熱ショック時における分子シャペロン Hsp70s の核内輸送経路とその機能
小瀬真吾、今本尚子
2011 年 10 月 26 日~28 日(26 日口頭)、

北海道北広島市(札幌北広島クラッセホテル)

9. 第84回日本生化学会大会
細胞ストレスと核-細胞質間分子輸送制御：Hsp70の新規核内輸送経路とその機能
小瀬真吾、渡邊愛、今本尚子
2011年9月21日～24日(23日口頭)、
京都市(国立京都国際会館)
10. 平成23年度日本生化学会関東支部例会
細胞ストレスと核-細胞質間分子輸送制御：新規運搬体分子の生化学的同定
小瀬真吾、今本尚子
2011年6月25日(口頭)、新宿区(東京理科大)
11. 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 III」
熱ショック応答時の核-細胞質間分子輸送：新規輸送経路同定とその機能解析に向けて
小瀬 真吾
2011年5月25日(口頭)、和光市(理研)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riken.jp/celldynamics/index.html>

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：90333278