

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16084203

研究課題名（和文） 細胞核の高次構造動態：ナノスケールイメージングによる解明

研究課題名（英文） Structural Dynamics of Nucleus: Analysis by Nano-scale Imaging

研究代表者

竹安 邦夫 (TAKEYASU KUNIO)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：40135695

## 研究成果の概要：

(1) 新しいナノスケール解析法の開発として、高速 AFM の応用法の確立をした。また、効率的な「AFM-カンチレバーの修飾法」を確立し、細胞核動態の解析に応用した。

(2) 細胞核マトリックス画分はWD repeats を持つタンパク質と disordered 領域を多く含むタンパク質 (DO タンパク質) を高率で含むことを明らかにし、45 種の新規タンパク質を同定した。また、新しい核マトリックス構造モデルとして "Dynamic scaffold-based model" を提案した。

(3) 各種核膜内膜タンパク質の分裂期におけるリン酸化とクロマチンからの解離の関係を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	29,200,000	0	29,200,000
2005 年度	19,700,000	0	19,700,000
2006 年度	19,700,000	0	19,700,000
2007 年度	19,700,000	0	19,700,000
2008 年度	19,700,000	0	19,700,000
総計	108,000,000	0	108,000,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学 (5805)

キーワード：核内構造タンパク質・核膜孔・核膜再構成・核マトリックス・核小体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞核は 2m におよぶゲノム DNA と多くの構造タンパク質、機能タンパク質を含み、核膜で囲まれている。この動態を最新のイメージング技術とプロテオミクス解析により解明しようという動きが数年前から世界中でみられた。

## 2. 研究の目的

- ナノスケール解析による核内構造タンパク質の動態の解明
- 新規核マトリクスタンパク質の同定
- 細胞周期に依存した核膜とクロマチンの結合調節機構の解明
- 核研究に応用可能な新しいナノスケール解析法の開発

### 3. 研究の方法

- (1) これまでに抗原決定できたモノクローナル抗体のうち、核小体 (ISP36, SP120 など) と核骨格 (サイトケラチン 18、 $\alpha$  アクチニン 4、SP120 など) を認識するものを中心に解析し、核内構造タンパク質の動態および核内構造と核機能の関係を明らかにする。さらに核マトリックスタンパク質画分のプロテオーム解析も進め新規構造タンパク質の検索と、見いだされたタンパク質の動態解析も進める。
- (2) 核膜内膜タンパク質のエメリンや LBR、LAP2 $\alpha$  とクロマチンとの直接結合様式を解析し、その調節機構を明らかにする。
- (3) フィブロネクチン (核内にも存在することが知られている)、Ski8、nodal modulator 等のタンパク質が ISP36 に結合することが明らかになったことから、ISP36 が核構造と mRNA の合成・分解をつなぐキータンパク質であることが考えられる。よってこの機能の解析を進める。
- (4) 液中ナノスケール画像と蛍光顕微鏡像の同時解析技術、高速原子間力顕微鏡の核膜形成の素過程解剖への応用等を確立する。他の計画班との共同研究を積極的に進め、細胞周期依存的な核構造再構成系と最新の可視化技術を組み合わせる、等の研究から、核内構造の形成機構及び動態を明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) **モノクローナル抗体の抗原検索：**動態解明のための道具をそろえるため、細胞核質、核マトリックスおよび分裂期クロマチンに対するモノクローナル抗体ギャラリーを作成し、核内および分裂期染色体上の染色パターンを確定し、その結果をホームページ上にアップした。これらのモノクローナル抗体に対する抗原を検索し、21 種類の抗体に対する抗原を決定した。それらの中には、新規タンパク質である JmjC ドメインタンパク質に対するものを含む核小体特異的抗体 12 種類、他、核内にあるサイトケラチン 18 のみを特異的に染色する抗体、核内にある  $\alpha$  アクチニン 4 のみを特異的に染色する興味ある抗体も含まれていた。
- (2) **核研究に応用可能な新しいナノスケール解析法の開発：**(1) 高速 AFM の応用法の確立を目指し、酵素と DNA との反応機構の解明に、また、GroEL/ES の ATP/ADP 存在下での反応機構の解明に成

功した。本装置は世界で唯一の「液中での生体試料観察が可能な高速原子間力顕微鏡」である。(2) GSH-ポリエチレングリコールリンカーを用いた「AFM-カンチレバーの修飾法」を確立した。この系を用いて、核膜孔複合体とインポーチンとの間の力学測定に成功した。また、ラミン B 受容体とクロマチンとの結合力も測定した。(3) ラミン B 受容体とクロマチンとの結合の解析において、ピコトレックモードを用いて、AFM 画像とその画像上でのラミン B 受容体の結合部位の情報を同時取得する方法 (Recognition Imaging 法) を確立した。

- (3) **細胞核マトリックス画分のプロテオーム解析を基にした核内構造の解析：**核内構造に寄与するタンパク質が多く含まれている細胞核マトリックス画分の構成タンパク質を 3 回 (ラット肝 1 回と HeLa 細胞 2 回) のプロテオーム解析で網羅的に調べ、1) 28 (このうち新規タンパク質 1)、83 (5) 及び 333 (39) 種のタンパク質を同定し、データベースにして公開した。2) この画分は、ゲノム全体と比べて、しばしば超タンパク質複合体の骨格タンパク質として見出される、WD repeats を持つタンパク質と disordered 領域を多く含むタンパク質 (DO タンパク質) を高率で含むことを明らかにした。また、3) 機能未知タンパク質 BXDC1 と EBNA1BP2 の機能と動態を解析し、これらのタンパク質がリボソーム形成において dynamic scaffold として働いていることを明らかにした。4) これらの結果を基に新しい核マトリックス構造モデルとして "Dynamic scaffold-based model" を提案した。

- (4) **新規核内タンパク質の機能・動態解析：**機能未知核マトリックスタンパク質で DO タンパク質の一種である ISP36 の機能解析のため Yeast two hybrid 法を行った。(1) 12 種類の結合タンパク質を検出したがその多くはシグナリングに関係するタンパク質であった。(2) そのうち調べた 5 種はいずれも一部は ISP36 の核内スペックルと共局在した。(3) FRAP 法により、ISP36 の動きは通常の核内タンパク質よりかなり遅いことが示された。(4) これらの結果より ISP36 は、核内のクロマチン間にあつて情報伝達分子超分子複合体の dynamic scaffold として働いていることが示唆された。さらに、機能未知の核小体タンパク質である BXDC1、EBP2、NO66 は、核小体内において特徴的にモビリティが遅く、難溶性であり、また分裂期にも特徴的な動態

を示すことが明らかになった。

(5) **核膜タンパク質の細胞周期依存的な翻訳後修飾の解析**：アフリカツメガエル卵抽出液の系での解析により、1) 核膜内膜タンパク質のラミンB受容体(LBR)とエメリンの分裂期におけるリン酸化を詳細に調べ、クロマチンからの解離機構を明らかにした。また、2) 核膜再構成時のクロマチン表面への核膜の集積にLBRが寄与し、またタンパク質リン酸化酵素1が重要な働きをしていることを明らかにした。また、エメリンとの機能的相同性が示唆され、かつヒトから線虫まで保存されているMAN1の細胞周期依存的リン酸化状態の解析を行った。MAN1は、N末端領域(MAN1-N、1-471残基)、C末端領域(MAN1-C、651-911残基)の二つの核質領域を持つ。MAN1-Nは合成期、分裂期ともリン酸化され、MAN1-Cは分裂期のみ弱くリン酸化された。In vitroのBAF結合実験から、MAN1-Nの分裂期におけるリン酸化が、MAN1-NとBAFの結合を抑制することが明らかになった。

## 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：全て査読あり] (計42件)

1. Kazuya Ishida, Taka-aki Tsunoyama, Suguru Toda, Shinichi Osoda, Tsuneyoshi Horigome, Paul A Fisher, Shin Sugiyama, and Kazuhiro Furukawa (2009) A-type and B-type lamins initiate layer assembly at distinct areas of the nuclear envelope in living cells. *Exp. Cell Res.* (In Press).
2. K. Hizume, T. Nakai, S. Araki, E. Prieto, K. Yoshikawa & K. Takeyasu (2009) Removal of histone tails from nucleosome dissects the physical mechanisms of salt-induced aggregation, linker histone H1-induced compaction and 30-nm fiber formation of the nucleosome array. *Ultramicroscopy*. (In Press).
3. Y. Hirano, Y. Iwase, K. Ishii, M. Kumeta, T. Horigome & K. Takeyasu (2009) Cell Cycle-Dependent Phosphorylation of MAN-1. *Biochemistry*, 48:1636-1643.
4. Y. Hirano, K. Ishii, M. Kumeta, K. Furukawa, K. Takeyasu & T. Horigome. (2008) Proteomic and targeted analytical identification of BXDC1 and EBNA1BP2 as dynamic scaffold proteins in the nucleus. *Genes Cell*, 14: 155-166.
5. K. Ishii, Y. Hirano, N. Araki, T. Oda, M. Kumeta, K. Takeyasu, K. Furukawa & T. Horigome (2008) Nuclear matrix contains novel WD-repeat and disordered-region-rich proteins. *FEBS Lett.*, 582: 3515-3519.
6. S. Otsuka, S. Iwasaka, Y. Yoneda, Takahashi, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura (2008) Individual binding pockets of importin  $\beta$  for FG-nucleoporins have different binding properties and different sensitivities to RanGTP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 16101-16106.
7. M. Yokokawa, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura (2008) Scanning probe microscope revealed mechanical properties of plasma membrane and nuclear envelope in living cells. *J. Microscopy* 232: 82-90.
8. E. Shindo, K. Kubo, R.L. Ohniwa, K. Takeyasu & K. Yoshikawa (2008) *In situ* analysis of the higher-order genome structure in a single *Escherichia coli* cell. *J. Biotechnology*, 133: 172-176.
9. Y. Hirano, H. Takahashi, M. Kumeta, K. Hizume, Y. Hirai, S. Otsuka, S.H. Yoshimura & K. Takeyasu (2008) Nuclear Architectures and Chromatin Dynamics Revealed by Atomic Force Microscopy in Combination with Biochemistry and Cell Biology. *Eur. J. Physiol.*, 456: 139-153.
10. R.L. Ohniwa, K. Morikawa, S.L. Takeshita, J. Kim, T. Ohta, C. Wada & K. Takeyasu (2007) Transcription-coupled uncoupled architecture in bacteria. *Gene to Cells*, 12: 1141-1152.
11. H. Sanchez, P.P. Cardenas, S.H. Yoshimura, K. Takeyasu & J.C. Alonso (2007) Dynamic structures of *Bacillus subtilis* RecN-DNA complex. *Nucleic Acid Res.*, 1-11.
12. D. Liu, L. Ge, F. Wang, H. Takahashi, D. Wang, A. Guo, S.H. Yoshimura, T. Ward, X. Ding, K. Takeyasu & X. Yao (2007) Single-molecule detection of phosphorylation-induced plasticity changes during ezrin activation. *FEBS Lett.*, 581: 3563-3571.
13. Crampton N, Yokokawa M, Dryden DT, Edwardson JM, Rao DN, Takeyasu K, Yoshimura SH, & Henderson RM (2007). Fast-scan atomic force microscopy reveals that the type III restriction enzyme EcoP151 is capable of DNA translocation and looping. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12755-12760.
14. K. Hizume, S. Araki, K. Yoshikawa & K. Takeyasu (2007) Topoisomerase II, a scaffold component, promotes chromatin-compaction in vitro in a linker-histone H1-dependent manner. *Nucleic Acid Res.*, 35: 2787-2799.
15. T. Kobori, S. Iwamoto, K. Takeyasu, & T. Ohtani (2007) Chromatin dynamics of unfolding and refolding controlled by the nucleosome repeat length and the linker and core histones. *Biopolymers*, 85: 295-307.
16. Ito, H., Koyama, Y., Takano, M., Ishii, K., Maeno, M., Furukawa, K. and T. Horigome (2007) Nuclear envelope precursor vesicle targeting to chromatin is stimulated by protein phosphatase 1 in *Xenopus* egg extracts. *Exp. Cell Res.* 313, 1897-1910.
17. Kazuhiro Furukawa, Tomoko Aida, Yuki Nonaka, Shinichi Osoda, Candido Juarez, Tsuneyoshi Horigome, Shin Sugiyama (2007) BAF as a Caspase-Dependent Mediator of Nuclear Apoptosis in *Drosophila*. *J Struct. Biol.* 160, 125-134.
18. K. Miyachi, H. Hosaka, N. Nakamura, H. Miyakawa, T. Mimori, M. Shibata, S. Matsushima, H. Chinoh, T. Horigome, Hankins, W. R., Zhang, M., and Fritzier, J. M. (2006) Anti-p97/VCP antibodies: an autoantibody marker for

a subset of primary biliary cirrhosis patients with milder disease? *Scand. J. Immun.* 63, 376-382.

19. R.L. Ohniwa, K. Morikawa, J. Kim, T. Kobori, K. Hizume, R. Matsumi, H. Atomi, T. Imanaka, T. Ohta, S.H. Yoshimura & K. Takeyasu (2006) Atomic force microscopy dissects the hierarchy of genome architectures in eukaryote, prokaryote and chloroplast. *Microscopy and Microanalysis*, 13: 3-12.
20. C. Das, K. Hizume, K. Batta, B.R.P. Kumar, S.S.Gadad, S. Ganguly, S. Lorain, A. Verreault, P.P. Sadhale, K. Takeyasu & T.K. Kundu (2006) Transcriptional co-activator PC4, a chromatin-associated protein, induces chromatin condensation. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 8303-8315.
21. K. Morikawa, R.L. Ohniwa, J. Kim, S.L. Takeshita, A. Maruyama, Y. Inose, K. Takeyasu & T. Ohta (2006) Biochemical, molecular genetic and structural analyses of the Staphylococcal nucleoid. *Microscopy and Microanalysis*, 13: 30-35.
22. S.H. Yoshimura, H. Takahashi, S. Ohtsuka & K. Takeyasu (2006) Development of glutathione-coupled cantilever for the single-molecule force measurement by scanning force microscopy. *FEBS Lett.*, 580: 3961-3965.
23. R.L. Ohniwa, K. Morikawa, J. Kim, T. Ohta, A. Ishihama, C. Wada & K. Takeyasu (2006) Dynamic state of DNA topology is essential for genome condensation in bacteria. *EMBO J.*, 25: 5591-5602.
24. Y. Hirano, R.L. Ohniwa, C. Wada, S.H. Yoshimura & K. Takeyasu (2006) Human small G proteins, ObgH1 and ObgH2, participate in the maintenance of mitochondria and nucleolar architectures. *Genes Cells*, 11: 1295-1304.
25. M. Yokokawa, C. Wada, T. Ando, N. Sakai, A. Yagi & K. Takeyasu (2006) Single-molecule reaction analysis reveals the ATP-ADP-dependent conformational changes of chaperonin GroEL. *EMBO J.*, 25: 4567-4576.
26. M. Yokokawa, S.H. Yoshimura, Y. Naito, T. Ando, A. Yagi, N. Sakai & K. Takeyasu (2006) Fast-scanning atomic force microscopy revealed the molecular mechanism of DNA cleavage by ApaI endonuclease. *IEE Proc. Nanobiotechnology*, 153: 60-66.
27. D. Liu, N. Zhang, J. Du, X. Cai, M. Zhu, C. Jin, Z. Dou, C. Feng, Y. Yang, L. Liu, K. Takeyasu, W. Xie & X. Yao (2006) Interaction of Skp1 with CENP-E at the midbody is essential for cytokinesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345: 394-402.
28. S. Araki, T. Nakai, K. Hizume, K. Takeyasu & K. Yoshikawa (2006) Hydrodynamic radius of circular DNA is larger than that of linear DNA. *Chem. Physics Lett.*, 418: 255-259.
29. Y. Yoshikawa, K. Hizume, Y. Oda, K. Takeyasu, S. Araki & K. Yoshikawa (2006) Protective effect of vitamin C against double-strand breaks in reconstituted chromatin visualized by single-molecule observation. *Biophys. J.*, 90: 993-999.
30. T. Kobori, M. Kodama, K. Hizume, S.H. Yoshimura, T. Ohtani & K. Takeyasu (2006) Comparative structural biology of the genome: Nano-scale imaging of single

nucleus from different kingdoms reveals the chromatin built up on a 40 nm structural unit. *J. Electron Microscopy*, 55: 31-40.

31. Morikawa, J. Kim, R.L. Ohniwa, A. Maruyama, T. Ohta & K. Takeyasu (2006) Bacterial nucleoid dynamics: Oxidative stress response in *Staphylococcus aureus* *Genes Cells*, 11: 409-423.
32. Y. Hirano, M. Segawa, F.S. Ouchi, Y. Yamakawa, K. Furukawa, K. Takeyasu & T. Horigome (2005) Dissection of Emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of Emerin in a *Xenopus* egg cell-free system. *J. Biol. Chem.*, 280: 39925-39933.
33. K. Hizume, S.H. Yoshimura & K. Takeyasu (2005) Linker histone H1 *per se* can induce three-dimensional folding of chromatin fiber. *Biochemistry*, 44: 12978-12989.
34. T. Uemura, M.H. Sato & K. Takeyasu (2005) The longin domain regulates the vacuolar targeting in *Arabidopsis* VAMP7 proteins. *FEBS Lett.*, 579: 2842-2846.
35. R. L. Ohniwa, M. Denawa, M. Kudo, K. Nakamura and K. Takeyasu (2005) Perspective factor: a novel indicator for the assessment of journal quality. *Research Evaluation*, 13: 175-180.
36. T. Nakai, K. Hizume, S.H. Yoshimura, K. Takeyasu & K. Yoshikawa (2005) Phase transition in reconstituted chromatin. *Europhysics Letters* . 69(6): 1024-1030.
37. Y. Kuzuhara, T. Yonekawa, M. Iwasaki, T. Kadota, H. Kanda, T. Horigome and T. Notomi (2005) Homogeneous assays for single-nucleotide polymorphism genotyping: Exo-proofreading assay based on loop-mediated isothermal amplification. *Yokohama Med. J.* 56, 9-16.
38. M. Segawa, K. Niino, R. Mineki, N. Kaga, K. Murayama, K. Sugimoto, Y. Watanabe, K. Furukawa, and T. Horigome (2005) Proteome analysis of rat liver Hirano, Y., Segawa, M., Ouchi, F. S., Yamakawa, Y., Furukawa, K., Takeyasu, K. and Horigome, T. (2005) nuclear insoluble protein fraction and localization of a novel protein, ISP36, to compartments in the interchromatin space. *FEBS J.* 272, 4327-4338.
39. S. Osouda, Y. Nakamura, de Saint Phalle, B. McConnell, B., T. Horigome, S. Sugiyama, Fisher, P.A. and K. Furukawa (2005) Null mutants of *Drosophila* B-type lamin *Dm0* show aberrant tissue differentiation rather than obvious nuclear shape distortion or specific defects during cell proliferation. *Dev. Biol.* 284, 219-232.
40. K. Takeyasu, J. Kim, R.L. Ohniwa, Y. Inose, K. Morikawa, T. Ohta, A. Ishihama & S.H. Yoshimura (2004) Genome architecture studied by nano-scale imaging: Analyses among bacterial phyla and their implication to the eukaryotic genome folding. *Cytogenet Genomes Res* 107: 38-48.
41. S.H. Yoshimura, H. Maruyama, F. Ishikawa, R. Ohki & K. Takeyasu (2004) Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. *Genes to Cells.*, 9: 205-218.
42. J. Kim, S.H. Yoshimura, K. Hizume, A. Ishihama & K. Takeyasu (2004) A fundamental structural unit of the

*Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy. *Nucleic Acid Res.*, 32: 1982-1992.

[学会発表：全て大学による招待講演]  
(計10件)

1. Department of Physics, Arizona State University at Tempe, USA, December 2, 2004.
2. TATA Institute of Biological Sciences, Bangalore, India, January 21, 2005.
3. Life Science Institute, National Taiwan University, Taipei, March 11, 2005.
4. National Center for Biotechnology, Free University of Madrid, March 15, 2005.
5. Department of Zoology, Potsdam University, Germany, July 8, 2005.
6. The Hong Kong University of Science and Technology, November 14, 2005.
7. Okayama University Medical School, February 17, 2006.
8. University of Dundee, College of Life Sciences, March 26, 2007.
9. Northwestern University Department of Cell Biology and Anatomy, November 29, 2007.
10. Chonnam National University Medical College, Microbiology, Kwang-Ju, South Korea, March 14, 2008.

[図書] (計10件)

#### 単行本

1. 「細胞核のダイナミズム」(2004) 竹安邦夫・米田悦啓 (共編著) シュプリンガー  
「ナノバイオロジー」(2004) 竹安邦夫 編著 共立出版

#### 単行本の章・総説

1. 吉村成弘, 竹安邦夫 (2007) 細胞核のナノバイオロジー。 *ケミカルエンジニアリング* 52(7): 511-520.
2. S. Otsuka, Y. Hirano, H. Takahashi, M. Kumeta, K. Takeyasu and S. H. Yoshimura (2007) Single-Molecule Imaging, Force Measurement and Fluorescence Observation Reveal Protein and Chromosome Dynamics around the Nuclear Envelope. in *IEEE Proceedings of the 2007 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*. (electric publication)
3. S. Otsuka, H. Takahashi, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura (2006) Molecular Mechanism of protein transport across nuclear membrane. *Recent Res. Devel. Biophys.* 5, ptII: 245-256.
4. K. Takeyasu, K. Hizume, T. Kobori, M. Kodama, R.L. Ohniwa & S.H. Yoshimura (2006) AFM elucidates genome architectures where reconstitution of chromatin fibers and dissection of nuclear chromatin meet. *Proceedings of the VII. Linz Winter Workshop*, 111-116.
5. S. Otsuka, H. Takahashi, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura (2006) Single-molecule structural and functional analyses of nuclear pore complex. *IEEE*

*Proceedings of the 2006 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*.

6. K. Takeyasu & K. Nagata (Eds) (2006) Nuclear Dynamics: Approaches from Biochemistry, Molecular Biology and Visual Biology” Springer Verlag
7. Fast-scanning AFM is now applicable to the analyses of single-molecule reactions in nano-biophysics. *IEEE Proceedings of the 2005 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*. 05TH8845, 121-126.
8. 小堀俊郎、横川雅俊、竹安邦夫 (2004) 原子間力顕微鏡—ナノバイオロジーへの架け橋—. *生物物理* 44: 255-259.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹安 邦夫(TAKEYASU KUNIO)  
京都大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号：40135695

### (2) 研究分担者

吉村 成弘(YOSHIMURA SHIGEHIRO)  
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：90346106  
日詰 光治(HIZUME KOHJI)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：10378846  
堀込 恒好(HORIGOME TSUNEYOSHI)  
新潟大学・理学部・教授  
研究者番号：60053352

### (3) 連携研究者

なし