

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05177

研究課題名(和文)核膜選択的な蛍光ラベル化技術を活用した細胞核の動態解析

研究課題名(英文) Dynamics analysis of the nucleus by using a fluorescent labeling method for the nuclear envelope

研究代表者

末田 慎二 (Sueda, Shinji)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：00325581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核内膜タンパク質を利用しない、核膜に対する新規な蛍光ラベル化技術の開発を行った。ここでは、古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化酵素反応系を利用して蛍光タンパク質を核内膜上に固定化することにより、核膜選択的なラベル化を行った。実際にこの技術を活用してラベル化した哺乳動物細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、細胞分裂過程における核膜の動きを追跡することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核膜の蛍光ラベル化技術としては核内膜上に存在するタンパク質を利用する手法が開発されているが、この場合、核内膜タンパク質がそれぞれ独自の局在性を示すため、核膜の動きを正確に追跡することができない。本研究では、古細菌由来の特殊なビオチン化酵素反応を利用して、核内膜タンパク質を利用しない、新規な蛍光ラベル化技術を開発することに成功した。本ラベル化技術は、核膜に関連した様々な生命現象の解明に活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this work, we have developed a fluorescent labeling method for the nuclear envelope (NE), which does not rely on the inner nuclear membrane proteins. In this method, labeling of the NE is accomplished by fixing a fluorescent protein on the inner nuclear membrane based on a unique biotinylation reaction from the archaeon *Sulfolobus tokodaii*. With this method, we succeeded in the tracing of the NE dynamics during cell division.

研究分野：生物分析化学

キーワード：核膜 核膜ラベル化 蛍光ラベル化 細胞分裂 核内膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核膜は、真核生物において染色体を細胞質成分から隔離し、核という構造体の形成を担う極めて重要な構成要素である。核膜は、様々な機能を担う複雑な構造体であるにもかかわらず、哺乳動物を始めとする後生動物では、細胞分裂の度に崩壊と再構成が繰り返されるという、非常にダイナミックな動きをする。核膜の崩壊と再構成のメカニズムに関してはこれまで様々な論争がなされ、最近になってようやく、統一的な見解が持たれるようになった。核膜は、細胞分裂の開始時において小胞体に吸収されることにより一旦消失し、細胞分裂の最後の段階で小胞体の膜が染色体の周辺に集まり、その膜が拡張することによって、核膜が再形成されると考えられている。しかし、細胞分裂過程において、核膜を構成していた脂質膜が、崩壊の過程でどのように小胞体に吸収され、また、再形成の際にどのように再利用されるか等、詳細なメカニズムはまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

このようなメカニズムを解明するには核膜を選択的に蛍光ラベル化する技術が必要であり、この目的のために核内膜に存在するタンパク質を利用した手法が利用されてきた。ここでは核内膜を貫通している膜タンパク質や、核の裏打ち構造を形成しているタンパク質を、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させ、それらを蛍光観察することによって核膜の動態解析がなされてきた。しかし核内で元々機能しているタンパク質は、染色体などの核内成分と積極的に相互作用するため、核内膜タンパク質を利用する系では、核膜そのもの動きを正確に追跡することができない。またそれらの過剰発現によって細胞の生理機能に影響が与えられる可能性がある。そのため核内膜タンパク質を利用しない、新たなラベル化技術の開発が必要とされている。そこで本研究では、核内タンパク質を利用せずに核膜を選択的に蛍光ラベル化できる技術を開発し、それを利用して細胞分裂過程における核膜の動きを追跡することを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、核膜選択的な蛍光ラベル化技術を、古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化酵素反応系を活用して構築した。この酵素反応系は、酵素であるビオチンリガーゼ (BPL) が、ビオチン化された基質タンパク質 (BCCP) と非常に安定な複合体を形成し、常温付近の反応では実質に解離しないという特殊な性質を有している²⁾。本研究では、この酵素反応系を利用して、核内膜上に蛍光タンパク質 (GFP) を固定化することにより核膜選択的なラベル化系を構築した (図1)³⁾。具体的には、BPL を膜タンパク質との融合体として発現させ、BPL を細胞膜上に提示する。膜タンパク質としては、PDGF レセプターの一回膜貫通ドメイン (TM) を利用した。TM の C 末端に BPL を融合させたタンパク質 (TM-BPL) を発現させると、細胞質側 / 核質側に BPL が提示される。この TM-BPL と共に、GFP の N 末端と C 末端にそれぞれ BCCP と核移行シグナル (NLS) を連結させた融合タンパク質 (BCCP-GFP-NLS) を共発現させる。両融合タンパク質を発現させた細胞中では、核内に移行した BCCP-GFP-NLS が核内膜上で捕捉され、核膜選択的なラベル化が実現できるという戦略である。実際にこのようなラベル化が可能かどうかを検証するために、両融合タンパク質を発現させた細胞を観察した。ここではまず両融合タンパク質の発現プラスミドを作製し、それらを培養細胞 (HeLa 細胞) に導入して一晚培養した後に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。また細胞分裂過程を観察するためにタイムラプスイメージングを実施した。

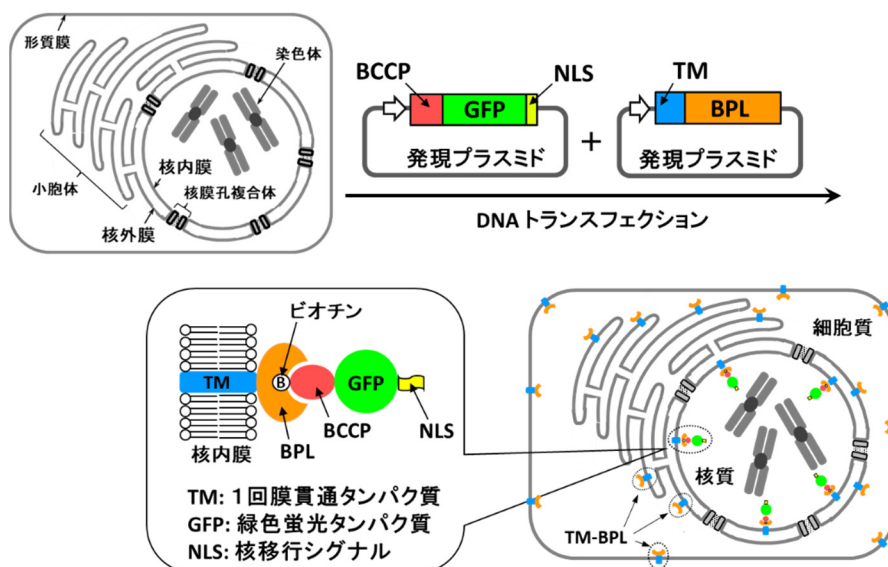


図1 *S. tokodaii* ビオチン化酵素反応を利用した核膜の蛍光ラベル化

4. 研究成果

(1) 核膜選択的な蛍光ラベル化

TM-BPL と BCCP-GFP-NLS を共発現させた細胞を蛍光観察したところ、核の輪郭から選択的に GFP に由来する蛍光が観察された (図 2)。同様の実験を BCCP-GFP-NLS の代わりに NLS を連結していない BCCP-GFP を用いて行った場合や、TM に直接 GFP を融合させたタンパク質 (TM-GFP) を単独で発現させた場合には、GFP に由来する蛍光は、細胞内の膜ネットワーク全体から観察された。そのため、期待通り核内に移行した BCCP-GFP-NLS を核内膜上でビオチン化酵素反応を介して核内膜上で捕捉することにより、核膜選択的なラベル化が実現できていることが確認できた。またラベル化した細胞において正常に核膜が形成されていることを確認するために、核ラミナとの同時観察を行った。ここでは核ラミナを構成するタンパク質である Lamin A と赤色タンパク質の融合タンパク質を共発現させ観察を行った。その結果、核ラミナの構造に特に異常はなく、核膜が性状に形成されていることが裏付けられた。

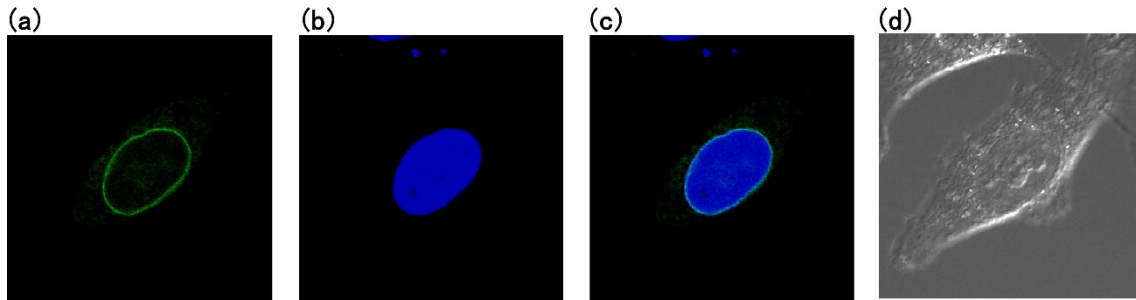


図 2 TM-BPL と BCCP-GFP-NLS を共発現させた HeLa 細胞
(a) GFP に由来する蛍光画像、(b) Hoechst による核染色画像、
(c) (a)と(b)の重ね合わせ画像、(d)微分干渉像

(2) タイムラプスイメージングによる核膜の動態観察

次に TM-BPL と BCCP-GFP-NLS を共発現させた細胞についてタイムラプスイメージングを行い、細胞分裂過程における核膜の動態観察を試みた。その結果、細胞分裂の進行に伴い核膜が崩壊し、その後、分裂後の細胞で新たに核膜が形成される様子を明瞭に可視化することに成功した (図 3)。また核膜と核ラミナを同時にラベル化した細胞についてタイムラプスイメージングを行った結果、核膜の前駆体が形成された後に、核ラミナが形成される様子を明瞭に観察することに成功した。また細胞分裂過程において、小胞体の膜ネットワークから新たな核膜が形成されることを確認するために、小胞体のマーカータンパク質である Sec61 β と蛍光タンパク質の融合体を共発現させ観察を行った。その結果、細胞分裂が始まり核膜が崩壊すると、核膜が細胞内の膜ネットワーク全体に吸収され、その後、細胞分裂の終盤に膜ネットワークから染色体周辺に新たな核膜が形成される様子を可視化することに成功した。また、核膜の形成のタイミングをより詳細に追跡するために、ヒストンと蛍光タンパク質の融合体を共発現させることにより、染色体との同時蛍光観察を行った。その結果、細胞分裂過程の後期の終盤から染色体周辺に核膜が形成される様子を観察することに成功した。

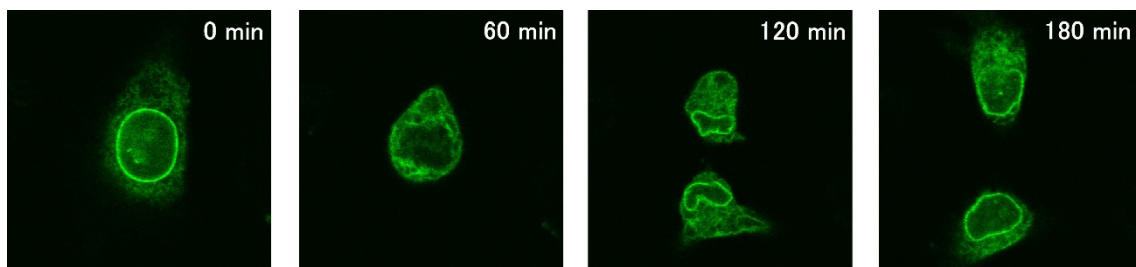


図 3 核膜を蛍光ラベル化した細胞についての細胞分裂過程の観察

(3) 核移行シグナルの機能の検証

本ラベル化系では NLS を 3 つタンデムに連結させた GFP 融合タンパク質を利用して核膜のラベル化を実現してきたが、NLS を 1 つあるいは 2 つ連結させた GFP 融合タンパク質を発現させて、同様にラベル化が可能であるかどうかについて検証を行った。実際に、各 BCCP-GFP-NLS と TM-BPL を共発現させた細胞について観察を行ったところ、NLS の連結数が 1 つあるいは 2 つの系

では、核膜だけでなく細胞質の膜成分からも強い蛍光が観察された。これより核膜に対する選択的なラベル化を実現するには NLS を 3 つ連結する必要があることがわかった。

ここで NLS については、主にプラスの電荷を持った塩基性アミノ酸残基から構成されており、それを 3 つ連結させた場合、核内において染色成分と相互作用する可能性が示唆された。そこで、核内膜上で捕捉された BCCP-GFP-NLS の移動度を FRAP アッセイを行うことにより検証した。FRAP アッセイは、蛍光成分が存在する微小領域にレーザー光を照射し、光退色させた後、その領域における蛍光回復をモニターすることによって目的成分の動態解析を行う手法である。実際に NLS の連結数の異なる一連の BCCP-GFP-NLS について解析を行うと、NLS の連結数が多くなるほど、核膜上での移動度が減少することがわかった。これより NLS 部位が核内成分と相互作用しているものと判断ができた。

この結果を受けて、NLS 部位を膜タンパク質に直接に連結させるだけでも、それを核内で濃縮できる可能性が考えられたため、TM に対して直接に GFP と NLS を連結させた融合タンパク質 (TM-GFP-NLS) についてもその細胞内での挙動を解析した。実際に、TM-GFP-NLS を発現させた細胞について観察を行ったところ、その核膜への局在はほとんど観察されなかった。これより、NLS 部位と核内成分との相互作用は、核内に膜タンパク質を積極的に止めるほどのものではないことがわかった。したがって、NLS を直接に膜タンパク質へ連結させただけでは、膜タンパク質を核内へ局在化させることができないことが明らかとなった。これらの結果から、本ラベル化系においては、可溶性タンパク質として核内に移行した GFP 融合タンパク質を核内膜上で捕捉して始めて核膜に対する選択的なラベル化が実現できていることが確認できた。

本ラベル化系については今後、既存のラベル化技術との詳細な特性の比較が必要ではあるが、原理的には核内成分との相互作用は、既存のラベル化技術よりも限定的であると考えられるため、本技術は今後、核膜に関連した様々な生命現象の解明に活用されることが期待される。

<引用文献>

- 1) J. Ellenberg *et al.*, *J. Cell Biol.*, **138**, 1193-1206 (1997)
- 2) S. Sueda *et al.*, *Anal. Biochem.*, **393**, 189-195 (2009)
- 3) T. Taniyama *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1463-1469 (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taniyama Toshiyuki, Sueda Shinji	4. 巻 2274
2. 論文標題 Fluorescent Labeling of the Nuclear Envelope Without Relying on Inner Nuclear Membrane Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1258-3_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sueda Shinji	4. 巻 69
2. 論文標題 Enzyme-based protein-tagging systems for site-specific labeling of proteins in living cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 156~166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfaa011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taniyama Toshiyuki, Tsuda Natsumi, Sueda Shinji	4. 巻 13
2. 論文標題 Fluorescent Labeling of the Nuclear Envelope by Localizing Green Fluorescent Protein on the Inner Nuclear Membrane	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1463~1469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.8b00219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 荒木優花、深川凌平、都田菜摘、末田慎二
2. 発表標題 核膜選択的な蛍光ラベル化技術における核移行シグナルの機能に関する検証
3. 学会等名 第81回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都田菜摘、谷山俊之、末田慎二
2. 発表標題 蛍光タンパク質の細胞内局在制御技術を活用した核膜の動態解析
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 都田菜摘、谷山俊之、末田慎二
2. 発表標題 蛍光タンパク質の細胞内局在制御に基づいた核膜選択的な蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第61回日本顕微鏡学会九州支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷山俊之、都田菜摘、末田慎二
2. 発表標題 蛍光タンパク質の局在制御に基づいた核膜に対する選択的なラベル化技術の開発
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末田慎二
2. 発表標題 古細菌由来のユニークな酵素反応系を利用した蛍光タンパク質によるラベル化技術の機能拡張
3. 学会等名 第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------