

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19770182

研究課題名（和文）細胞周期における核膜孔形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding of mechanism of nuclear pore formation during cell cycle.

研究代表者

前島一博 (MAESHIMA KAZUHIRO)

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：00392118

研究成果の概要：

核膜孔複合体は、核膜上の巨大な超分子複合体である。この核膜孔複合体が、どのように形成されるのかは未だなぞのままである。このため、代表者らは代表的な蛋白質に蛍光タグを付け、HeLa 細胞の安定発現株を作製した。これらの細胞では核膜孔がラベルされ、そのダイナミクスをライブ観察することが可能となった。さらに、レーザーをもちいて新たに形成された核膜孔を可視化できるようになった。この手法と細胞周期阻害剤を組み合わせ、間期の核膜孔形成が、細胞周期によって厳密にコントロールされていることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,800,000	0	1,800,000
20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物学・細胞生物学

キーワード：細胞核 核膜孔 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

核膜孔の数が細胞周期に従って 2 倍に増加するという事実は今から 30 年以上前から報告されていたが(Maul et al. J. Cell Biol., 1971)、それ以後ほとんど解析されていなかった。代表者らは「核膜孔がいつ、どこで、どのように増えるのか」に注目して解析をおこない、

核膜孔分布の驚くべき不均一性を見出し、新しい核膜ドメインである”Pore-free island”を同定していた。また、その当時、核膜孔形成の解析は、細胞分裂期直後の核膜形成に伴う核膜孔新生を対象とするものが主流であり、本計画の主題である「核膜の二重膜形成後にどのようにして新たな核膜孔が膜に挿

入され、構築されていくか」に注目しているものは他に例が無かった。

2. 研究の目的

細胞核の二重膜上に存在する核膜孔は、核膜上のもっとも顕著な構造体であり、細胞質と核をつなぐ物質輸送・情報伝達の場として機能している。代表者らはこれまで、核膜孔を指標として細胞核の動的な形成過程の解析をおこなってきた。その結果、核膜上の核膜孔の分布には大きな偏りが存在し、核膜孔の数や分布は細胞周期や分化の過程でダイナミックに変化することを明らかにした (Maeshima et al., 2006)。そして、G1 初期の核膜上の核膜孔が存在しない領域を、あたらしい核膜ドメインとして“Pore-free island”と名付けた。本研究では、代表者らがそれまでおこなってきた細胞周期における核膜孔ダイナミクス解析を足がかりとして、光学顕微鏡ライブ観察と、透過・走査電子顕微鏡観察を組み合わせ、単一核膜孔のイメージングをおこなった。そしてこの巨大な複合体が「いつ、どこで、どのように、構築されるのか」という核膜孔形成のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

核膜孔複合体は、数個のサブコンプレックスから形成されることが近年明らかになっている。このため、代表者らは各サブコンプレックスに含まれる代表的な蛋白質に蛍光タグを付け、HeLa 細胞内で発現させて安定発現株を作製することにした。これらの安定発現株では核膜孔がラベルされ、そのダイナミクスをライブ観察することが可能となる。とりわけ、複合体の中で最も安定に存在する Nup133-YFP の発現株では、488nm レーザーをもちいると、核膜表面のある核膜孔領域を安定的に bleach することができるため、予想される bleach 後の輝点は核膜上に新たに形成された核膜孔であると考えられた。この手法と細胞周期阻害剤を組み合わせ、間期核における核膜孔の形成を可視化できる系の構築、およびその系を用いて核膜孔形成がどのように制御されているか解析した。

4. 研究成果

核膜孔複合体の各サブコンプレックスに含まれる代表的な蛋白質に蛍光タグを付け、HeLa 細胞内で発現させて安定発現株を作製した結果、これらの安定発現株では核膜孔がラベルされ、そのダイナミクスをライブ観察することが可能となった。とりわけ、複合体の中で最も安定に存在する Nup133-YFP や Nup107-YFP の発現株では、488nm レーザーをもちいて核膜表面のある核膜孔領域を bleach ことができ、新たに形成された核

膜孔を可視化できるようになった。この手法と細胞周期の阻害剤を組み合わせることによって、間期の核膜孔形成が、細胞周期によって厳密にコントロールされていることが示された (投稿準備中)。さらに、走査電顕観察では、増殖期細胞において、核膜孔の形成過程らしき前駆体構造も得られている。このような前駆体は脳のプリキンエ細胞など、分化細胞では観察されなかった。さらに興味深いことに、細胞周期の阻害剤によって、間期の核膜孔の形成は阻害されたが、細胞核の成長は阻害されなかった。このことは、細胞核の構築と、その核膜上にある核膜孔の構築が異なるメカニズムで制御されていることを意味している (投稿準備中)。

このような間期の核膜孔形成のメカニズムをためには、核膜孔形成を人為的にコントロールするシステムがあれば非常に便利である。この目的のため、代表者らは RanGTPase サイクルを制御する RCC1 の温度感受性変異体である tsBN2 細胞を用いて、温度依存的に核膜孔形成を制御できる哺乳類細胞のシステムをはじめて確立した。今後、このシステムを用いて、間期の核膜孔形成のメカニズムを解析していく予定である。

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 12 件)

Nishino, Y., Takahashi, Y., Imamoto, N., Ishikawa, T., and Maeshima, K.
Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-ray Diffraction. **Physical Review Letters** (2009), 102, 18101 (4 pages)

Eltsov, M., MacLellan, K.M., Maeshima, K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J.

(Three authors have equal contribution)

Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (2008) 105, 19732-7.

Iwai, Y., Ikeda, T., Kojima, T.-M., Yamazaki, Y., Maeshima, K., Imamoto, N., Kobayashi, T., Nebiki, T., Narusawa, T., Pokhil, G.-P.

Ion irradiation in liquid of μ m3 region for cell surgery. **Applied Physics Letters** (2008), 92, 23509 (3 pages).

Maeshima, K., and Eltsov, M.

Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. **Journal of Biochemistry** (2008)

143, 145-153.

Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, Ko., Mishiro, T., Yahata, K., Imamoto, F., Aburatani, H., Nakao, M., Imamoto, N., Maeshima, K., Shirahige, K., and Peters, J.-M.

Cohesin is required for the transcriptional insulator function of CTCF binding sites. **Nature (Article)** (2008), 451, 796-801.

Tahara, K., Takagi, M., Ohsugi, M., Sone, T., Nishiumi, F., Maeshima, K., Horiuchi, Y., Tokai-Nishizumi, N., Imamoto, F., Yamamoto, T., Kose, S., and Imamoto, N.

Importin-beta and small GTPase Ran mediate chromosome loading of human chromokinesin Kid. **Journal of Cell Biology** (2008), 180, 493-596.

Yahata, K., Maeshima, K., Sone, T., Ando, T., Okabe, M., Imamoto, N., and Imamoto, F. cHS4 insulator-mediated alleviation of promoter interference during cell based expression of tandemly associated transgenes. **Journal of Molecular Biology** (2007), 374, 580-90.

Funakoshi, T., Maeshima, K., Yahata, K., Sugano, S., Imamoto, F., and Imamoto, N. TWO DISTINCT HUMAN POM121 GENES: Requirement for the Formation of Nuclear Pore Complexes. **FEBS Letters** (2007), 581, 4910-6.

前島一博 「染色体の内部構造を見る」細胞工学別冊「電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ (ナノワールドに迫るパワフル技術入門) (2008) 121-129

前島一博、吉田圭介、白髭克彦「姉妹染色体間の接着因子、コヒーシンの新たな機能」蛋白質核酸酵素 (2008), 53, 1337-1344

前島一博、今本尚子「細胞周期における核膜孔のダイナミクス」**生化学** (2008) 2月号, 118-124

前島一博、矢幡一英、今本文男、今本尚子「インスレーター/バウンダリー配列を用いた複数の導入遺伝子を安定的に発現させるシステム」**羊土社バイオテクノロジージャーナル** (2007) 9-10月号, 557-563

[学会発表] (計 14 件)

Maeshima, K. How is genome DNA compacted into a mitotic chromosome? The 1275th Biological Symposium, National Institute of

Genetics (Idenken), Dec 24, 2008, Mishima

Maeshima, K. Global structure of chromatin: irregular folding of nucleosome fibers.

日本分子生物学会・生化学会合同年会 (BMB2008) シンポジウム 転写シグナリングと複合体ダイナミクスの新展開、2008年12月11日、神戸

Maeshima, K. mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers.

Symposium, "molecular regulation of Chromosome assembly and Segregation", The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Dec 1-4, 2008, Osaka

前島一博、「分裂期染色体の構造」大阪大学・蛋白質研究所セミナー「クロマチン構造とダイナミクス」、2008年10月30-31日、大阪

前島一博、「分裂期染色体内のヒトゲノムDNAの高次構造」九州工業大学情報工学部生命情報工学科講演会、2008年8月5日、福岡県飯塚

前島一博、伊藤和輝、渡辺愛、日原さえら、Mikhail Eltsov、今本尚子、「分裂期染色体の構造」日本細胞生物学会年会ミニシンポジウム「細胞機能の3次元ナノイメージング」、2008年6月29日、横浜

Maeshima, K., Ito, K., Eltsov, M., Watanabe, A., Hihara, S., Dubochet, J., and Imamoto, N., Mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fiber.

International Symposium on Chromosome Dynamics (2008), Ise, May 28-30

前島一博、「高輝度放射光をもちいたヒト染色体の構造解析」ERLサイエンス研究会 2008年3月、筑波

前島一博、伊藤和輝、Jacques Dubochet、渡辺愛、今本尚子、Mikhail Eltsov 「分裂期染色体内のヒトゲノムDNAの高次構造」第25回染色体ワークショップ 2008年1月、湯河原

前島一博、今本尚子「クロマチン工学への展望」日本分子生物学会・生化学会合同年会ワークショップ「クロマチン工学の開拓」2007年12月、横浜

前島一博、「細胞核のダイナミクス-ライブセルモデリングの視点から」理研シンポジウム

VCADシステム研究2007 2007年10月、和光

前島一博、「コヒーレント照明による細胞内小器官のイメージング」第4回日本放射光学会若手ワークショップ-次世代放射光源を用いた生命科学未踏領域への挑戦-
2007年8月、播磨

前島一博、「染色体の高次構造」生理学研究
所研究会「位相差断層電子顕微鏡
染色体構造とダイナミクス」2007年7月、岡
崎

Maeshima, K. Mitotic chromosome structure:
regular or random? **International Symposium
Functional Organization of the Nucleus** (2007),
Awaji-shima, Jan. 9-12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前島 一博 (MAESHIMA KAZUHIRO)

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：00392118