

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790090
研究課題名（和文）
核膜の高分子拡散バリア能の再評価
研究課題名（英文）
Permeability change of the nuclear envelope after mitosis.
研究代表者
下 菌 哲 (Shimozono Satoshi)
独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・研究員
研究者番号：40391982

研究成果の概要（和文）：

細胞の核は核膜と呼ばれる膜により細胞質から隔てられている。核膜は細胞分裂時に崩壊し、染色体の分離が終了した後、再び形成される。核膜の高分子透過に対するバリアは細胞分裂直後に形成され、細胞周期を通して不変であるというのが現在のモデルである。今回、細胞分裂直後の核膜の透過性変化を、紫外線照射により蛍光特性を変化させることのできる蛍光タンパク質 KikGR を用いて調べた。その結果、細胞分裂直後は透過性が非常に高いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Permeability of the nuclear envelope (NE) was investigated using a photoconvertible fluorescent protein, KikGR. It is widely believed that the barrier of the NE against the macromolecule diffusion is established at the end of mitosis and it does not change along the cell cycle. But, in this study, it was revealed that the barrier is loose at least during the first 30 minutes after cytokinesis. Furthermore, during the first 10 minutes, molecules with a molecular mass of as large as 210k can pass through the NE.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 ・ 生物系薬学

キーワード：

核膜、蛍光タンパク質、フォトコンバージョン

1. 研究開始当初の背景

核膜は細胞質と核を隔てる膜である。核膜は細胞周期の分裂期に入ると崩壊し、分裂期のテロフェーズと呼ばれる時期において凝縮した染色体を覆うように形成される。細胞質と核の間の物質の輸送は、核膜孔と呼ばれる巨大分子複合体を介して行われる。核膜孔は分子量 60k 以上の高分子は拡散によっては透過できないことが示されている。申請者は、ある実験の過程においてこのモデルとは相容れない現象を発見した。HeLa 細胞に分子量 108k の、紫外光により蛍光の色を緑から赤に変換できる蛍光タンパク質 KikGR を発現させたところ、核にも細胞質にも一様に KikGR は観察された。細胞質のみにおいて KikGR の色を赤色に変換すると、赤色の KikGR は核へは拡散せず、細胞質に留まった。教科書によれば、分子量 60k 以上の分子は細胞分裂直後も核膜を透過することはなく細胞周期を通じて核のなかに存在することはできない。「KikGR はいつ核の中には入ったのだろうか？」というのが研究の出発点である。細胞分裂直後の細胞を観察しても核の中に KikGR は観察されることから、細胞分裂時に入ったことが予想された。これまでも細胞周期と核膜の透過性についての研究はなされてきたが、細胞周期に伴って透過性の変化はないというのが通説になっていた。

2. 研究の目的

核膜の高分子に対するバリア(分子量 60k 以上の高分子は透過させない)は本当に細胞分裂直後に形成され、細胞周期を通じて一定なのか？を新たなツール(紫外線照射により蛍光特性を緑色から赤色に変換できる分子量 108k の蛍光タンパク質 KikGR)を用いて検討する。もしも透過性が高い時期が存在するのであれば、細胞分裂後のどの時期であるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

KikGR を HeLa 細胞に発現させる。また、核をラベルするため、核膜の成分 Lamin B receptor に ECFP を融合したタンパク質も共発現させる。顕微鏡にて 37 度で培養することにより、分裂期にある細胞を形態から同定する(細胞分裂期にある HeLa 細胞は丸い形態をしめす)。細胞質分裂後の様々な時点に

おいて、細胞質に紫外線を照射することにより KikGR の蛍光特性を緑色から赤色に変換し、赤色蛍光が核の中へ拡散しなくなる時期を探し出す(Fig. 1)。本実験において高い時空間分解能によって細胞質に紫外線を照射することが必要であるので、紫外線照射機能をもつ共焦点顕微鏡 FV1000 を用いる。

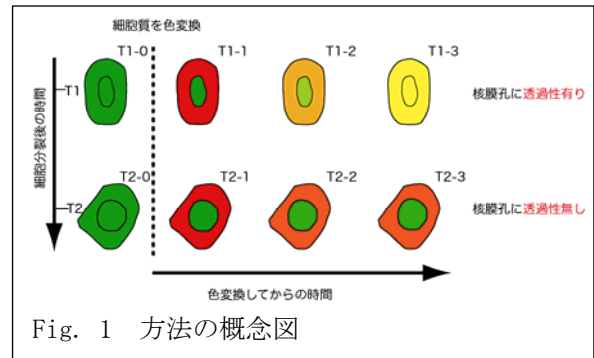


Fig. 1 方法の概念図

4. 研究成果

(1) 核膜の透過性は細胞質分裂後高い。

研究の方法の通り細胞質分裂後様々な時期に細胞質に紫外線を照射し、核への赤色蛍光の拡散を定量した。間期においてはこれまでのモデル通り細胞質から核への赤色蛍光の拡散は観察されなかった。また、細胞質分裂後 1 時間、30 分においては細胞質の赤色蛍光は核の中へほぼ拡散しなかった。しかしながら、紫外線照射時期を細胞質分裂後 20 分、15 分、10 分とより細胞質分裂直後に近づけていくと、細胞質の赤色蛍光の核の中への拡散が観察された。また、拡散の程度は細胞分裂直後ほど高かった。このことからこれまでの定説とはことなり、少なくとも細胞質分裂後約 30 分は核膜の透過性は高いことを明らかにした(Fig.

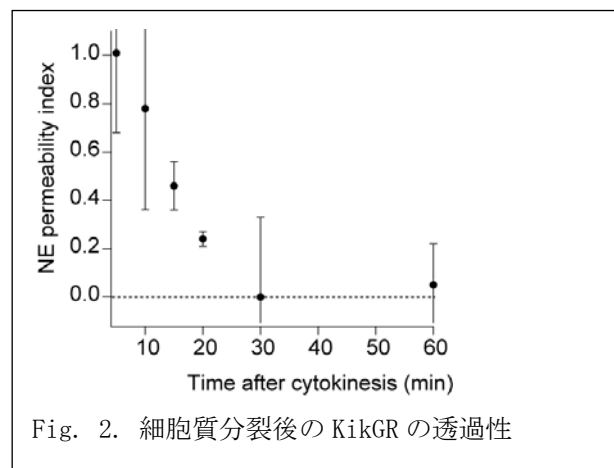


Fig. 2. 細胞質分裂後の KikGR の透過性

2)。KikGR は4量体を形成しているが、その単量体変異体 mKikGR (分子量 27k) を用いて同様の実験を行った。するとこれまでの定説通り間期においても細胞質から核への拡散が観察された。細胞質分裂後様々な時点において細胞質から核への拡散を観察すると、細胞質分裂後1時間の拡散は、間期の拡散よりも高い傾向が観察された。つまり細胞質分裂後長時間にわたり核膜の透過性は高いことが示された。

(2) 細胞質分裂後約10分間においては分子量約210kの巨大分子も核膜を拡散により透過できる。

次により大きなタンパク質の拡散を調べるため、KikGRにECFPを融合したタンパク質を作製した。この融合蛍光タンパク質は、分子量約210kである。この融合タンパク質を同様に発現させ、分布を観察した。すると間期において、細胞質よりは少ないながら核にも蛍光が観察された。この融合タンパク質の細胞質直後の核への拡散を調べるため、4次元イメージングにより核の中の蛍光の総量の変化を計測した。すると細胞質分裂後およそ10分まで核の中の蛍光量は増大することがわかった (Fig. 3)。この結果よりこれまでいわれている核膜のバリア能(分子量60k)の三倍以上の高分子が核膜を透過できることを明らかにした。

(3) 能動輸送は核膜の高分子バリア能よりも先に機能する。

背景においても記述したように細胞質と核の間の物質の輸送は能動輸送と受動拡散による。この細胞質分裂直後の核膜の透過性の高い時期に能動輸送はどのような状態にあ

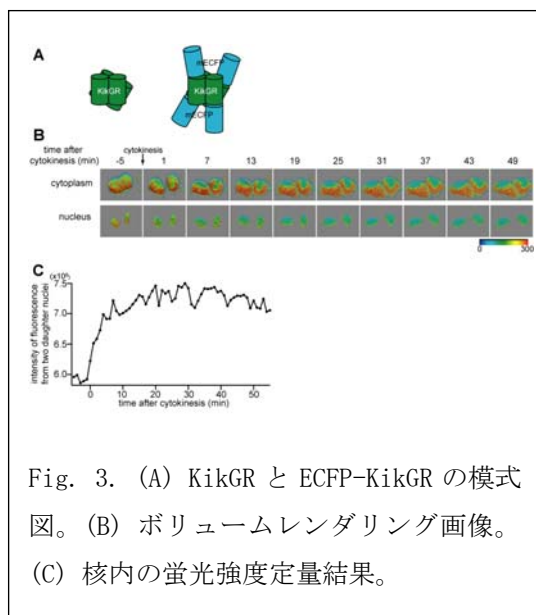


Fig. 3. (A) KikGR と ECFP-KikGR の模式図。(B) ボリュームレンダリング画像。(C) 核内の蛍光強度定量結果。

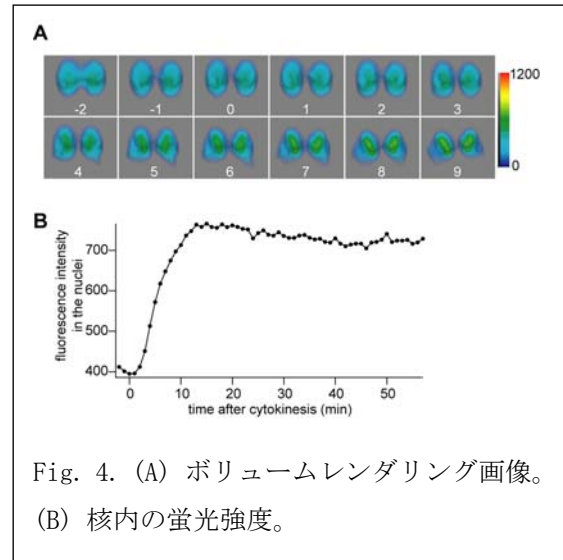


Fig. 4. (A) ボリュームレンダリング画像。(B) 核内の蛍光強度。

るのかを次に検討した。この目的の為、glutathione-S-transferase (GST) と Venus (蛍光タンパク質 YFP の変異体) の融合タンパク質に SV40 large T 抗原由来の核移行シグナルを付加したコンストラクトを作製した。このタンパク質を発現させ、細胞質分裂後の局在を観察すると、細胞質分裂直後から核への濃縮が観察された (Fig. 4)。このことから、核膜の高分子に対するバリア能はまだ完成されていないにも関わらず、能動輸送はすでに始まっていることを明らかにした。つまりバリア能と能動輸送機能を比べると、能動輸送機能が先に完成することを示している。これまで様々な研究結果がこれまでの核膜の高分子バリア能モデルをもとに解釈されてきた。今回の結果は、細胞質分裂後は、核膜の透過性は非常に高く、分子量210kもの高分子を透過させることがわかった。様々な生命現象を解釈するうえで非常に重要な知見を得たと考える。

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1件)

著者名

Shimozono S., Tsutsui H. and Miyawaki A.

論文標題

Diffusion of large molecules into assembling nuclei revealed using an optical highlighting technique.

雑誌名 *Biophysical Journal*

巻97 ページ1288-1294

発行年2009年

査読有り

〔学会発表〕（計 1 件）

発表者名
下 蘭 哲

発表標題
Diffusion of large molecules into
assembling nuclei revealed using an
optical highlighting technique.

学会等名
9th NIBB-EMBL Symposium

発表年月日
平成 2 1 年 4 月 2 2 日

発表場所
愛知県岡崎市

6. 研究組織
(1) 研究代表者
下 蘭 哲 (Shimozono Satoshi)
独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技
術開発チーム・研究員
研究者番号：40391982