

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570211

研究課題名（和文） 核膜ドメインを基盤とした分裂期細胞における核膜形成制御

研究課題名（英文） Mechanism of postmitotic nuclear membrane assembly by targeting of nuclear membrane proteins to nuclear subdomains

研究代表者

船越 智子（石井智子）(FUNAKOSHI TOMOKO)

独立行政法人理化学研究所・ライプセル分子イメージング研究チーム・基幹研究所研究員

研究者番号：90318460

研究成果の概要（和文）：核膜形成制御機構の解明を目的として、分裂期セミインタクト細胞を用いた *in vitro* 核膜再構成系を樹立した。核膜形成の初期ステップである核膜タンパク質の染色体への局在化には、細胞質画分と ATP/GTP が必要であり、核タンパク質によって必要とする細胞質因子が異なる可能性を示した。その細胞質因子依存性は分裂期のステージによって異なること、細胞質非依存性のステップには脱リン酸化活性が必要であることがわかった。核膜孔形成初期に必要な核膜孔構成因子が、核膜形成にも関与することを示した。

研究成果の概要（英文）： To analyze mechanism of postmitotic NE assembly, we tried to reconstitute and visualize NE subdomain formation in a cell-free system using semi-intact mitotic human cells. Using this assay system, it was shown that INM proteins localized to metaphase chromosomes in a cytosol and ATP/GTP dependent manner and that different cytosol factor would be required for localization of each INM protein to metaphase chromosomes. We further showed that the cytosol dependency is not maintained during mitosis and that dephosphorylation activity is needed for the cytosol-independent step. We reported that a nucleoporin that required for the first step of nuclear pore complex assembly, organizes INM protein accumulation on the chromosome in living cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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、核膜、核膜孔、膜動態、再構成、イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

核膜の裏打タンパク質であるラミンが遺伝子発現制御に関与しており、プロジェリアなどの重篤な病因であること、核膜孔の構成因

子と転写制御因子や複製関連因子との相互作用することなどが示され、核構造と核膜直下での核機能発現制御や核内構造との関連

性を示す報告が蓄積してきた。核機能発現の場の構築といった観点からも核膜の形成は真核生物にとって重要な生命活動の素過程の1つである。核膜形成機構についての解析は、これまで、アフリカツメガエル卵抽出液と精子核などを材料とした生化学的手法や、核膜タンパク質の細胞内局在変化の観察などのイメージングを通して進められてきた。分裂期後の核膜再形成は、クロマチン上への前核膜小胞の結合、核膜前駆小胞同士の融合と核膜孔形成、クロマチンの脱凝縮などを伴う核の成熟化、といった幾つかのステップから成ることが示されてきた。しかし、実験材料である膜成分は分画操作によって、本来の膜構造が失われてしまっていた。生殖系細胞を使用しているため、体細胞との違いがある可能性もあった。

最近では、イメージング技術を駆使し、間期核の核膜形成についての解析も行われるようになってきた。所属研究室では、それに先駆けて間期核の核膜形成機構の解析に着手し、その過程で間期核の核膜上に核膜孔やラミンの分布が異なる2つの核膜ドメインの存在が明らかにされた。G1期には核膜孔の分布に大きな偏りがあり、細胞周期の進行にしたがって徐々に解消される。この細胞周期依存的な核膜孔の分布の大きな偏りは細胞の種類に依らないので、普遍的な現象であると考えられた。核膜孔に富むポア領域と核膜のないポアフリー領域は、それぞれラミンAとエマリン(ラミンA結合膜タンパク質)、ラミンBとLBR(ラミンB結合膜タンパク質)の分布の偏りと一致しており、核膜上には膜タンパク質の分布が異なる2つ領域(核膜サブドメイン)が存在することがわかった。内膜タンパク質であるエマリンとLBRは、核膜が再形成される姉妹染色体上でも分布パターンが異なっているため、核膜が崩壊している分裂期に、異なる膜構造(もしくは膜領域)に分布している可能性があった。生細胞中でのLBR-Venus, SECFP-エマリンの局在を経時的に観察すると、これまでの報告の通り、エマリンとLBRはまず染色体の両端に同じように局在し、その後、エマリンは娘染色体上のコア領域と呼ばれる中央領域へ強く集積し、一方LBRは両端に強く集積した。核膜形成の初期ステップは、核膜の染色体への局在化と集積といった2段階で制御されることが考えられた。

エマリンはBAFや、DNA結合活性が知られて、コア領域への集積には紡錘体の安定化が必要であることが示されている。しかし、一度染色体へ結合したエマリンが紡錘体(チ

ューブリン)依存的にスライドするのか、コア領域へのターゲットに紡錘体が必要なのかは不明である。

LBRは、エマリンとは異なった染色体局在・集積様式が予想された。LBRはDNAと結合能を有し、間期における細胞質-核間の物質輸送を担うImportin $\beta$ との結合活性が知られている。Importin輸送システムは、分裂期細胞内においてもタンパク質の局在化に寄与することが知られているが、核膜形成における詳細な役割については不明な点がある。

核膜孔は核膜と同様に、分裂期前期から終期にかけて崩壊し再形成される。核膜と核膜孔は同時期に平行して形成されるための制御が予想された。核膜孔膜タンパク質は、核膜孔の形成や核膜上での安定化に寄与すると考えられていた。その1つであるPom121は、生細胞中でLBRと同様、姉妹染色体が分離した直後に染色体両端に局在する。LBRとPom121の染色体への局在化機構は不明であるが、LBRと同様、Pom121にも核局在化シグナルを見出しており、Importin依存的な制御が1つの可能性として考えられた。

## 2. 研究の目的

核膜形成についての生化学的な解析はアフリカツメガエル卵抽出液と精子核などを用いた核再構成系が精力的に進められてきたが、上述した分裂期染色体表層の核膜ドメイン構築の分子基盤を明らかにするためには分裂期細胞の染色体を観察対象とした解析手法が必要であった。細胞膜を透過膜にした分裂期同調したセミインタクト細胞を利用して、核膜タンパク質の動態を指標とした、新たな実験系の樹立を目指す。核膜サブドメインに局在する核膜タンパク質のセミインタクト細胞内での動態を指標にして、核膜形成を可視化する。これまでの検討の過程で得られた結果を基に解析を進め、核膜形成初期のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 核膜再構成系: まず、核膜タンパク質を蛍光タンパク質との融合体として発現する安定発現株を単離した。具体的には核膜孔膜タンパク質であるPom121をYFP標識したPom121-Venus発現株と、核内膜タンパク質LBRとエマリンを蛍光タンパク質標識したLBR-Venus, SECFP-Emerinの共安定発現株をHeLa細胞より樹立した。これらの株を分裂期に同調した後、ジギトニン処理でセミイン

タクト細胞を調製する。セミインタクト細胞内の細胞質成分を洗い流した後、ATP再生系や細胞質画分、さらに阻害剤や、ペプチドの過剰添加による阻害効果などを、Pom121-Venus、LBR-Venus/SECFP-Emerinを指標として核膜動態観察を行った。その他のタンパク質局在については、反応前後のセミインタクト細胞を免疫染色で確認した。

(2) 核膜孔形成抑制による核膜形成への影響：核膜孔形成に必須と考えられている核膜孔構成因子、ELYSの減少による核膜形成への影響をLBR-Venus/SECFP-Emerinの分裂期染色体への局在を指標に観察した。特に局在に変化が観察されたLBRについては相互作用を免疫沈降で確認した。

(3) Pom121分子内の細胞内局在化領域の探索：Pom121については領域欠失変異体シリーズを作成し、Venus融合体として細胞に発現させ、細胞内局在観察などによって、核膜局在、核膜孔局在に必要な分子内領域を決定した。タンパク質相互作用については免疫沈降、GST-プルダウンなどで確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 核膜再構成系の樹立：本来、生細胞内では分裂期中期に染色体への核膜タンパク質はリクルートされない。そのため、中期染色体に核膜タンパク質群の局在できる条件を検討した。その過程で、エマリン、LBR、Pom121の膜タンパク質が分裂期中期染色体上へ局在させることに成功した。これら3種の膜タンパク質の染色体上の集積領域は生細胞での現象を反映して、エマリンは染色体中央、LBRとPom121は染色体端領域に集積した。これら核膜タンパク質の中期染色体への局在・集積には、細胞質画分、ATP/GTPが必要で、核膜タンパク質によって局在するまでの時間や、必要とする細胞因子が異なることを明らかにしてきた。

① Importinシステムによる制御：LBRやPom121のmetaphase染色体周辺領域への局在は過剰量のImportin $\beta$ で阻害された。これはPom121同様、LBRもImportinシステムの制御下にあることを示している。しかし、LBRとPom121の染色体への局在化のタイミングが異なっているため、Importinシステムとは異なる制御系の存在が考えられる。後述するように、ELYSはLBRの局在や核膜孔形成に必須であり、Importinとの相互作用も知られている。LBR、Pom121へのImportinの阻害効果が直接のものか、ELYSの局在を阻害したための間接的なものか確認する必要がある。

② anaphase染色体上における核膜集積機構：セミインタクト細胞内のLBRの染色体への

集積には、metaphase染色体への細胞質依存性の過程と、anaphase染色体への細胞質非依存性の過程があることがわかった。Importin $\beta$ の過剰添加によってELYS局在に影響せず、anaphase染色体へのLBRの集積が阻害された。阻害剤実験から、LBRの細胞質非依存的な集積には、セミインタクト細胞内に残存するホスファターゼ活性が必要であることを明らかにした。

(2) 核膜孔形成と核膜形成の関連性：核膜孔形成初期に必須とされているNupの1つ、ELYSは本アッセイにおいて、細胞質依存性、染色体上のリクルート領域、阻害剤効果など、LBRと同様の反応性、局在変化が観察された。生細胞でELYSをロックダウンすると、LBRやエマリンの分裂期染色体への集積が抑制され、LBRについては間期での核膜局在も抑制されることがわかった。ELYSとLBRの相互作用はリン酸化状態に依存することがわかった。ELYSが核膜と核膜孔の同調形成制御に関わることを示唆する解析結果を誌上発表した。

(3) Pom121分子内の細胞内局在化領域の探索：Pom121は分裂期染色体周辺に集積する膜タンパク質で核膜孔複合体構成因子の1つである。Pom121細胞内の複数の核移行シグナル(NLS)を同定し、このNLSとImportin $\alpha$ の結合を介してImportin $\beta$ と相互作用することを明らかにした。Pom121のNLS変異体の生細胞内局在解析により、Pom121のNLSの機能としては分裂期染色体へターゲットよりむしろ、間期の核膜孔形成時に必要であることを示した。Pom121の核膜への局在化はRan、Importinの制御下にある可能性をRCC1温度変異株であるtsBN2を用いて示した。これらの結果をまとめ誌上発表した。

#### 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〕(計3件)

① Clever M, Funakoshi T, Mimura Y, Takagi M, Imamoto N. The nucleoporin ELYS/Mel28 regulates nuclear envelope subdomain formation in HeLa cells. *Nucleus*, **3**, 1-13, 2012. 査読有

② Funakoshi T, Michaela C, Watanabe A, Imamoto N. Localization of Pom121 to the inner nuclear membrane is required for an early step of interphase NPC assembly. *Mol Biol Cell*, **22**, 1058-1069, 2011. 査読有

③ Maeshima K, Iino H, Hihara S, Funakoshi T,

Watanabe A, Nishimura M, Nakatomi R, Yahata K, Imamoto F, Hashikawa T, Yokota H, Imamoto N. Nuclear pore formation but not nuclear growth is governed by cyclin-dependent kinases (Cdks) during interphase. *Nature Mol Struct Biol*, **17**, 1065-1071, 2010. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

① 船越智子、今本尚子. 分裂期セミインタクト細胞を用いた核膜形成制御の解析. 第 29 回染色体ワークショップ, 2012.1.26, ホテルニュー水戸屋 (仙台).

② 船越智子、今本尚子. Mechanism of post-mitotic nuclear envelope assembly examined in a new in vitro reconstitution system. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.15, パシフィコ横浜 (横浜).

③ Clever M, Funakoshi T, Imamoto N. The nucleoporin ELYS/Mel28 governs formation of nuclear envelope (NE) subdomains in post-mitosis. 第 12 回エクストリームフォトニクスシンポジウム, 2011.6.30, 独立行政法人理化学研究所梅太郎ホール (埼玉).

④ 船越智子、今本尚子. Mechanism of post-mitotic nuclear envelope assembly examined in an in vitro reconstitution system. 第 12 回エクストリームフォトニクスシンポジウム, 2011.6.30, 独立行政法人理化学研究所梅太郎ホール (埼玉).

⑤ 船越智子、今本尚子. 分裂期セミインタクト細胞を用いた核膜形成機構の樹立と利用. 平成 23 年度日本生化学会関東支部例会, 2011.6.25, 東京理科大森戸記念館 (東京).

⑥ Clever M, Funakoshi T, Imamoto N. The nucleoporin ELYS/Mel28 governs formation of nuclear envelope subdomains by recruiting the lamin B receptor (LBR) to mitotic chromosome. 平成 23 年度日本生化学会関東支部例会, 2011.6.25, 東京理科大森戸記念館 (東京).

⑦ Funakoshi T, Clever M, Watanabe A, Imamoto N. Localization of Pom121 to the inner nuclear membrane is required for an early step of interphase NPC assembly. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 2011.1.25, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫).

⑧ 船越智子、Clever M、渡邊愛、今本尚子. 核膜孔膜タンパク質 Pom121 と核内膜の相互作用が間期核膜孔複合体形成に果たす役割の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83

回日本生化学会大会 合同大会, 2010.12.8, 神戸ポートアイランド (神戸).

⑨ Clever M, Funakoshi T, Imamoto N. Functional interaction between the nucleoporin ELYS/Mel28 and inner nuclear membrane (INM) proteins during post-mitotic reassembly of the nuclear envelope. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010.12.8, 神戸ポートアイランド (神戸).

⑩ 船越智子、渡邊愛、今本尚子. Analysis of early-step of interphase nuclear pore complex formation: a role of Pom121. 第 11 回エクストリームフォトニクス研究シンポジウム, 2010.10.12, 独立行政法人理化学研究所梅太郎ホール (埼玉).

⑪ 船越智子、Clever M、渡邊愛、今本尚子. Functional domains of Pom121 required for interphase NPC-assembly. 第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010.5.19, 21, 大阪国際会議場 (大阪).

⑫ Clever M, Funakoshi T, Imamoto N. ELYS tightly connects post-mitotic assembly of the nuclear pore complex (NPC) and nuclear envelope formation in human cells. 第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010.5.19, 大阪国際会議場 (大阪).

⑬ 船越智子、渡邊愛、今本尚子. 核膜孔複合体膜タンパク質 Pom121 の核膜孔局在化に必要な分子内領域の解析. 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.23, 神戸ポートアイランド (神戸).

⑭ 船越智子、今本尚子. In vitro 核膜再構成系の樹立. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009.6.2, 名古屋国際会議場, (名古屋).

[図書] (計 2 件)

① 今本尚子、三村恭弘、船越智子. 核膜孔複合体の形成機構. 生体の科学, **62**, 2011年, 378-379.

② 船越智子、今本尚子. Pom121の構造と核膜孔形成における役割. 生体の科学, **62**, 2011年, 388-389.

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船越 智子 (石井智子) (FUNAKOSHI TOMOKO)  
独立行政法人理化学研究所・ライブセル分子  
イメージング研究チーム・基幹研究所研究員  
研究者番号：90318460

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし