

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25年 4月17日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570181

研究課題名（和文）プロテオームとホスホプロテオーム解析を基盤とした細胞核内構造の解明
 研究課題名（英文）Studies on the inner nuclear structure of the cell based on proteome and phosphoproteome analyses

研究代表者

堀米 恒好（HORIGOME TSUNEYOSHI）

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：60053352

研究成果の概要（和文）：我々は以前に細胞核内構造に関する「動的核骨格モデル」を提唱した。このモデルでは、WDタンパク質等が足場となって動的に形成されるタンパク質複合体がクロマチン間の構造形成の構築モジュールになるとしている。本研究で、14種類の核マトリックスWDタンパク質の局在、動態及び複合体形成・解離について解析することによってこのモデルを検証したところ、ほとんどの結果はこのモデルを支持するものであった。

研究成果の概要（英文）：We previously proposed the dynamic scaffold model for inner nuclear structure formation. In this model, structures in inter-chromatin regions comprise dynamically formed protein complexes, and WD repeat-proteins and others act as scaffolds for these protein complexes. In this study, fourteen WD-repeat proteins found in a nuclear matrix fraction were studied on the localization and dynamics in the living cells and association and dissociation with other proteins to evaluate the model. These results and others supported the dynamic scaffold model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

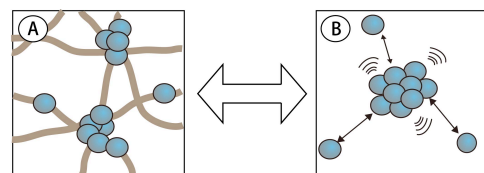
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：プロテオーム、ホスホプロテオーム、細胞核、核小体、WDタンパク質、リボソーム形成

1. 研究開始当初の背景

細胞核高次構造は核機能制御やウイルス感染と深く関わることから、その構築原理の解明は重要である。核内の構造モデルとしては、初期に、主に電子顕微鏡観察の結果から提唱された静的な繊維状の核マトリックスモデル（Pederson, T. 2000、図1A）があるがその分子レベルでの実態は明らかではなかった。ま

た近年、主にタンパク質の動態解析の結果から、近傍のタンパク質のランダムな集合で説



繊維状核マトリックスモデル

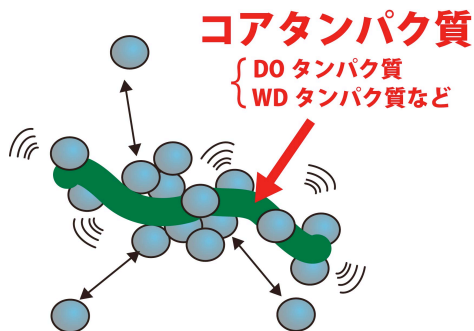
ランダム集合モデル

[図1 対立する核マトリックスモデル]

明できるという対極的なランダム集合モデル (図1B) も提唱された(Misteli, T. 2005) が、特定のタンパク質に限られた議論しかなされていなかった。これら核内構造構築のメカニズムがモデルの域を出なかった理由として、このタンパク質は難溶性である (もしくは生化学的処理で容易に不溶化する) ため、核マトリックス全体を対象とした議論が不可能であった点が挙げられる。そこで本研究では、これらの問題点を乗り越えられる新しい方法“プロテオーム解析法”を用いてこの問題を解明しようとした。

2. 研究の目的

本研究ではまず、我々がプロテオーム解析の結果を基にこれまでに提案した“動的核骨格モデル”の核骨格構築単位である“核内構造構築モジュール”の検証を通して核内高次構造形成機構を明らかにする。このためこの仮説の基となる、核内に特徴的なタンパク質をコアとする超分子複合体モジュール (図2) の存在と実体を検証する。次にホスホプロテ

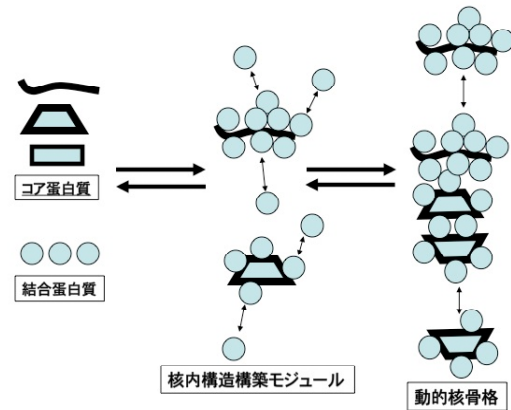


[図2 核内構造構築モジュール作業仮説]

オーム解析法により、そのモジュールの崩壊機構を明らかにする。これらの結果を統合して、“核内構造構築モジュールの形成・崩壊を基とした動的核骨格”の概念 (図3) を確立する。

より具体的には、核マトリックスのプロテオーム解析で見出された新規 WDタンパク質を中心に、これらのタンパク質をコアとした核内構造構築モジュールの存在と実体を、タンパク質動態解析、インタラクトーム解析で検証する。さらに、種々の状態の細胞のホスホプロテオーム解析を行い相互の比較によりモジュール・核内構造体の崩壊とリン酸化の関係を網羅的に解析する。

(1) 核マトリックス画分に見出された新規WDタンパク質の細胞内での動態を観察し、その動きの遅さから大きな複合体の成分となっていることを明らかにする。



[図3 核内構造構築モジュールの形成・崩壊を基とした動的核骨格のモデル]

(2) これらのタンパク質のインタラクトーム解析を行い、これらのタンパク質をコアとした超分子複合体モジュールの存在を検証する。

(3) 培養細胞の間期と分裂期、及び細胞核機能阻害時等のホスホプロテオーム解析を行い、モジュールタンパク質を含めた核内構造タンパク質のリン酸化と核内構造の関係を明らかにする。これらの結果を統合して、“核内構造構築モジュールの形成・崩壊を基とした動的核骨格”の概念を確立する。

3. 研究の方法

本研究計画では、核マトリックスのプロテオーム解析で見いだした新規 WD タンパク質を中心に、これらのタンパク質をコアとした核内構造構築モジュールの存在と実体を、タンパク質動態解析 (FRAP解析)、in vitroにおける結合解析で検証した。また、タンパク質リン酸化解析により、そのモジュール・核内構造体の崩壊とリン酸化の関係を調べた。そしてこれらの結果を統合して、“核内構造構築モジュールの形成・崩壊を基とした動的核骨格”の概念を検証した。

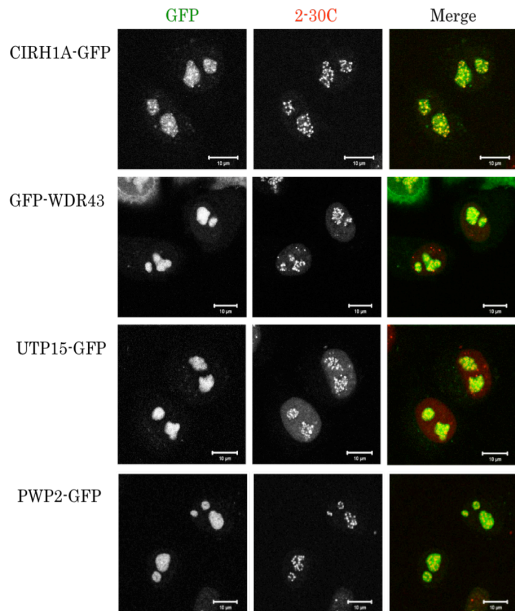
実際に行った具体的な研究項目は、(1) 新規核 WD タンパク質群の細胞内局在解析と動態解析によるコアタンパク質の検証、(2) 新規核 WD タンパク質群の相互作用解析による複合体モジュールの検証、(3) 特定モジュールの細胞周期依存的形成・崩壊とタンパク質リン酸化の解析。

4. 研究成果

(1) 新規核 WD タンパク質群の細胞内局在解析と動態解析によるコアタンパク質の検証
①. 新規核 WD タンパク質群の細胞内局在解析
核マトリックス画分に見いだされたタンパク質で、ヒト細胞における機能が明確でないWDタンパク質を中心に研究を進めることとし、

まずその局在を調べた。

14種のWDタンパク質をGFP融合タンパク質としてHeLa細胞で一過性に発現してその局在を調べた。そのうち10種類は、酵母のオルソログタンパク質の機能解析から、rRMAプロセソームに含まれることが知られていたため、これらについてまず局在を調べた。そのうちのいくつかの例を図4に示す。



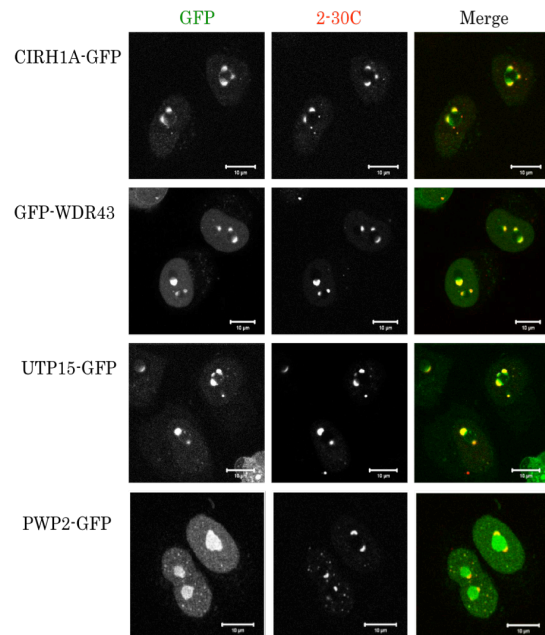
[図4 GFP融合WDタンパク質の局在観察例 HeLa細胞で発現して蛍光顕微鏡で観察した。2-30C:核小体のFC領域に局在するマーカータンパク質の抗体染色。]

また、これらの局在が、rRNAプロセシングの機能に依存しているかを調べるため、アクチノマイシンドで処理してrRNA合成を阻害したときの局在についても調べた(図5)。ここで得られた全10種のタンパク質の局在結果を表1にまとめて示した。

酵母ではリボソームの小亜粒子rRNAプロセシングの初期に働くt-UTPサブコンプレックスのヒトオルソログと推測されるタンパク質は、主に、核小体のFC領域に、t-UTPサブコンプレックスに続いて働くUTP-Bサブコンプレックス成分と推測されるタンパク質はDFCとGC領域に局在し、予想通りの局在であった(表1)。また、CIRH1Aは、内在性のタンパク質がFC/DFC領域に局在するという報告があり、我々のCIRH1A-GFPは内在性のタンパク質とほぼ同じ局在を示した。またGFPより小さなTagであるV5-TagをつけたCIRH1A、WDR43及びWDR75も、今回調べたGFPタグのタンパク質とほぼ同じ局在が報告されていることから、今回のGFP融合タンパク質の多くのものは本来の局在を示しているものと推測された。

また、GFPの蛍光で観察されたタンパク質は、細胞全体や核全体に広がっているのではなく、核小体または核小体のさらに限られた領域

に局在したことから、これらのタンパク質は核内構造構築モジュールに含まれていると考えられた。



[図5 アクチノマイシンド処理で、rRNA合成を阻害したときのGFP融合WDタンパク質の局在観察例 HeLa細胞をアクチノマイシンドで処理後、発現タンパク質を蛍光顕微鏡で観察した。2-30C:核小体のFC領域に局在するマーカータンパク質の抗体染色。]

さらに、アクチノマイシンドで処理した細胞においても、調べたタンパク質の多くは、その主要な部分が核小体の限られた領域に局在していたことから(図5, 表1)、これらのタンパク質が含まれる構造体は、機能に関係なく形成されていることが示唆された。

Protein	Subcomplex	Untreated					40 ng ActD for 2h		
		FC	DFC	GC	NP	cap	body	np	
UTP15	t-UTP	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
CIRH1A	t-UTP	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
WDR43	t-UTP	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
WDR75	t-UTP	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
PWP2	UTP-B	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
UTP18	UTP-B	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
TBL3	UTP-B	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
NCL10	unknown	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
WDR51	unknown	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
WDR66	unknown	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	

[表1 GFP融合WDタンパク質の局在観察。HeLa細胞で発現して蛍光顕微鏡で観察した。濃い緑色は強いGFP蛍光を、薄い緑色は弱いGFP蛍光を示す。FC, DFC, GCは核小体内の領域を、NPは核質を示す。]

これらのタンパク質の他に、リボソーム大亜粒子rRNAのプロセシングに働くことが推定されるBOP1、mRNAのスプライシングに働くことが知られているSMU1とPRPF4、mRNAの核外輸送に働いているSTRAP(いずれも核マトリクス画分に検出されたWDタンパク質)についても、それらのGFP融合タンパク質であるGFP-BOP1、GFP-SMU1、GFP-PRPF4とGFP-STRAPをHeLa細胞で発現して局在を調べた。

GFP-BOP1は、核小体のGC領域に、GFP-SMU1とGFP-PRPF4は核質にスペckル状に、

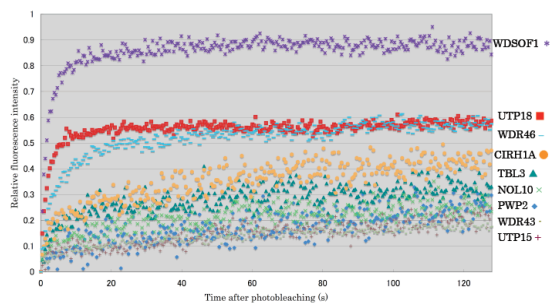
GFP-STRAPは核小体以外の核質が主で一部は細胞質に、それぞれ局在していた（データ省略）。なお、GFP-PRPF4とGFP-STRAPはすでに知られている内在性のタンパク質の抗体染色と同じ局在を示したため、GFPを融合しても正しい局在を示していることが確認された。また、GFP-BOP1とGFP-SMU1は、その機能から推測される局在と一致していた。

調べた14種のWDリピートを含む核マトリックスタンパク質のうち13種は核小体または核スペckルに局在したことから、これらのほとんどのWDタンパク質は、核内構造構築モジュールに含まれることが示唆された。

そこで次にこれらのGFP融合タンパク質を用いて、細胞内でのこれらのタンパク質の動態を調べた。

②. 新規核マトリックスWDタンパク質群の動態解析によるコアタンパク質の検証

酵母においてリボソームの小亜粒子rRNAプロセシングに働くSSUプロセソーム構成タンパク質のヒトオルソログと推測されるタンパク質（表1のタンパク質）のうちの9種について、それらのGFP融合タンパク質を用いたFRAP法で、生細胞中での動態を解析した。その結果を図6に示した。



[図6 WDタンパク質の動態解析。核マトリックスタンパク質中のWDタンパク質をHeLa細胞で一過性にGFP融合タンパク質：UTP15-GFP, CIRH1A-GFP, GFP-WDR43, PWP2-GFP, GFP-UTP18, TBL3-GFP, GFP-NOL10, GFP-WDSOF1, GFP-WDR46として発現し、レーザービームで核小体の一部を消光後、蛍光回復の時間経過を測定した。]

調べた9種のうちGFP-WDSOF1は、速やかに蛍光が回復し、動きが速いことからコアタンパク質ではないと考えられた。

GFP-UTP18とGFP-WDR46は、半分程度は速やかに蛍光が回復したがその後は非常にゆっくりと回復したことから、半分程度は大きな構造体に強く結合している、コアとなっている、ことが推測された。残る6種類のタンパク質は、非常にゆっくりと蛍光が回復したことから、やはり大きな構造体のコアとなっていると考えられた。

これらのタンパク質の他に、リボソーム大亜粒子rRNAのプロセシングに働くことが推定されるGFP-BOP1、mRNAのスプライシングに働く

ことが知られているSMU1とPRPF4、mRNAの核外輸送に働いているSTRAP（いずれも核マトリックス画分に検出されたWDタンパク質）についても、それらのGFP融合タンパク質であるGFP-BOP1、GFP-SMU1、GFP-PRPF4とGFP-STRAPをHeLa細胞で発現して動態を調べた。

GFP-BOP1は動きが遅く、GFP-SMU1は約半分は急速に蛍光が回復したが残りの半分は緩やかに回復した（データ省略）。GFP-PRPF4とGFP-STRAPは比較的速やかに蛍光が回復したことから、動きが速いものと推測された。

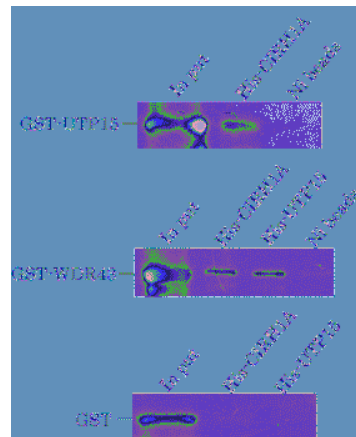
これらの動態の結果を総合すると、13種のWDタンパク質のうち10種は細胞内での動きが遅く、核小体や核スペckルの構築モジュールの一部と推測された。

(2) 新規核WDタンパク質群の相互作用解析による複合体モジュールの検証

これまで調べてきたWDタンパク質からいくつかを取り上げて、実際にどのようなタンパク質と直接結合しているかを、in vitroでの結合実験で調べた。

①. t-UTPサブコンプレックス

酵母ホモログが核小体の中で、SSUプロセソームのt-UTPサブコンプレックスとして複合体を形成していることが知られているUTP15, CIRH1A及びWDR43について、in vitroでの結合実験を行った(図7)。



[図7 WDタンパク質のin vitro結合実験。核マトリックス中に検出されたWDタンパク質：UTP15とCIRH1AのHis-tagタンパク質をNi-ビーズに固定化し、可溶性のGST-UTP15,

GST-WDR43及びGSTと混合後ビーズに結合してきたタンパク質をSDS-PAGEで分離し、抗GST抗体で検出した。]

これらの結果によって、UTP15とCIRH1Aが直接結合すること、WDR43とCIRH1A及びUTP15が直接結合することが示された。

②. その他の複合体

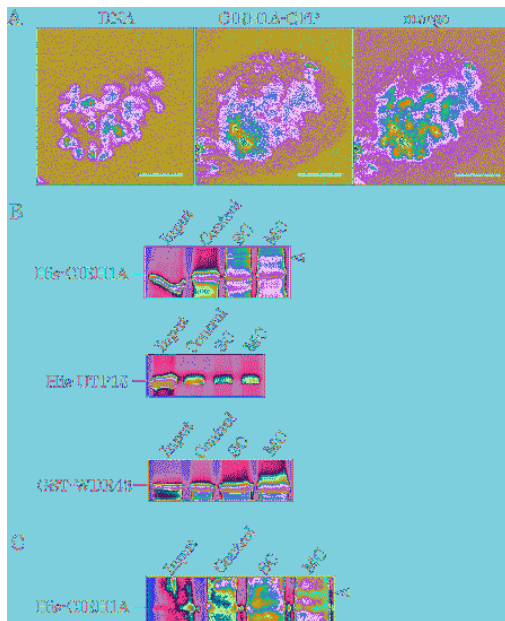
酵母UTP-Bサブコンプレックスタンパク質のオルソログであるヒトUTP18とPWP2もin vitro結合実験で、結合が確認された。また、スプライソソームの成分であるPRPF4についてもin vitro結合実験でPRPF3と結合するこ

とが示された（データ省略）。
 これら結果から、核マトリックス画分の新規WDタンパク質群が、核内、核小体内において、核内部構造形成の複合体モジュールの成分、または足場になっていることが実際に示された。

(3) 特定モジュールの細胞周期依存的形成・崩壊とタンパク質リン酸化の解析。

核内構造形成に働いていることが推測された核内タンパク質モジュールのSSUプロセソムのt-UTPサブコンプレックスを例として、細胞周期依存的な複合体の崩壊機構について解析した。

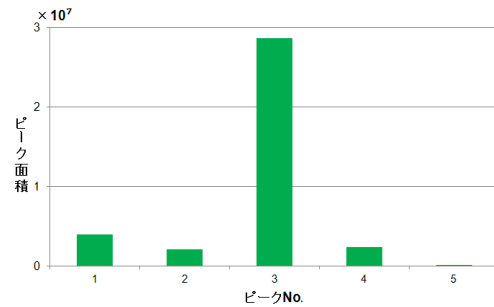
t-UTPサブコンプレックスの成分でありHeLa細胞核マトリックス画分に見いだされたWDタンパク質であるCIRH1A, UTP15およびWDR43の細胞周期依存的な解離会合を調べた。合成期及び分裂期のカエル卵抽出液を用いたin vitroの系でCIRH1A, UTP15およびWDR43のタンパク質を処理したところこれらのタンパク質のうちCIRH1Aのみが細胞分裂期特異的にリン酸化されることが示された(図8 B, C)。また、分裂期には、CIRH1A-GFPは細胞内で、クロマチン周囲とクロマチン間に広く広がっていることが示された(図8 A)。



[図8 t-UTP複合体中のWDタンパク質の細胞周期依存的な局在変化とリン酸化。(A) HeLa細胞でCIRH1A-GFPを発現させてノコダゾール処理で細胞周期を分裂期に同調させ、分裂期の細胞について蛍光顕微鏡で観察した。(B)と(C) 核マトリックス中に検出されたWDタンパク質: CIRH1A, UTP15及びWDR43をHis-またはGST-tagタンパク質としてbeadsに固定化し、緩衝液(Control), 合成期卵サイトソル(SC)または分裂期サイトソル(MC)で処理した後、Phos-tag-アクリルアミド入りの

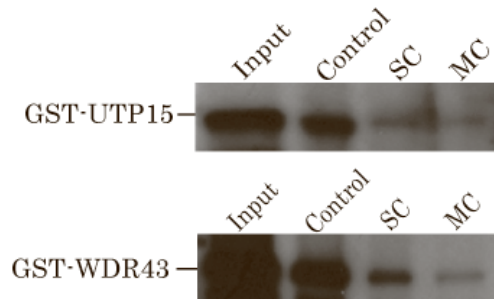
SDS-PAGEで分離し、コマジブルーでタンパク質染色したもの(B)と抗His抗体でHis-CIRH1Aを検出したもの(C)。このゲルの泳動では、リン酸化されたタンパク質は遅れて泳動される。矢じりは、リン酸化His-CIRH1Aのバンドを示す。]

次に、分裂期サイトソル処理でCIRH1Aのどこがリン酸化されているか調べた。(図9)。



[図9 分裂期サイトソルでリン酸化したHis-CIRH1Aのリン酸化部位の分析。分裂期サイトソルで処理したHis-CIRH1Aをトリプシン分解し、我々が開発した全自動リン酸化ペプチド精製装置でリン酸化ペプチドを精製し、nanoLC MS/MSでリン酸化ペプチドを分析した。その結果、5種類のリン酸化ペプチドのピークが観察され、合計13カ所のリン酸化部位が推測された。そのうち最も高いピークであるピーク3は、131番目のトレオニンがリン酸化されていた。]

その結果、WDリピート領域内にある131番目のトレオニンが他と比べて圧倒的に強くリン酸化されていることが示された(図9)。このようにリン酸化されるMC処理が、CIRH1AとUTP15およびWDR43との結合に影響を与えるかどうかを調べるため、in vitroでの結合実験を行った。ビーズに結合したHis-CIRH1Aを合成期または分裂期カエル卵サイトソルで処理した後GST-UTP15およびGST-WDR43との結合を調べたところ、いずれのタンパク質との結合もMC処理の方が強く抑制されていた(図10)。

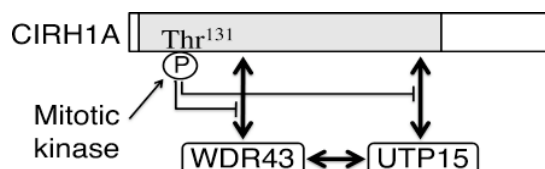


[図10 CIRH1Aの分裂期卵サイトソル前処理によるUTP15およびWDR43との結合の抑制。His-CIRH1Aを結合したビーズを緩衝液(Control), 合成期卵サイトソル(SC)または分裂期卵サイトソル

(MC)で処理した後緩衝液で洗浄した。このビーズを、GST-UTP15またはGST-WDR43を含む溶液と振とう後、ビーズに結合してきたタンパク質を抗GST抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。]

これらの結果は、分裂期特異的なリン酸化が、この複合体モジュールの細胞周期依存的な崩壊・形成に影響を与えていることを示唆している。

これらの結果を図11に模式的に示した。



[図11 t-UTP複合体の細胞周期依存的な解離会合機構のモデル。]

これらの結果は、多くの核内構造モジュールの細胞周期依存的形成・崩壊が、リン酸化によって制御されていることを示唆している。

まとめ

本研究の実験結果は全体的に、「細胞の核内構造が、WDタンパク質その他のタンパク質をコアとして動的に形成される構築モジュールの形成・崩壊によって形成される」とする我々のモデルを支持するものであった。

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)

[学会発表] (計5件)

- ① 田中要、核マトリックスタンパク質 PRPF4、SMU1 の細胞核内局在と細胞周期依存的な複合体形成 日本生化学会大会、(2012. 12. 14-16)福岡
- ② 和田好子、WD 蛋白質 PWP2 の解析に基づく核内構造の Dynamic Scaffold Model に関する研究 日本生化学会大会、(2011. 9. 21-24) 京都
- ③ 佐藤愛恵、リボソーム小サブユニット (SSU) プロセソーム t-UTP サブコンプレックスの構造形成機構の解析 日本生化学会大会、(2011. 9. 21-24) 京都
- ④ 佐藤徳仁、クロマチン間領域局在タンパク質 ISP36/UIF の細胞周期依存的リン酸化解析 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、(2010. 12. 7-10) 神戸
- ⑤ 和田好子、核内構造の Dynamic Scaffold Model に関する研究-WD 蛋白質の局在と動態の解析- 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、(2010. 12. 7-10) 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀米 恒好 (HORIGOME TSUNEYOSHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：60053352

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

古川 和広 (FURUKAWA KAZUHIRO)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：40229109