

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 6 月 11 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770205

研究課題名（和文）

生細胞導入 DNA ビーズを使った小胞体・核膜様の膜のアセンブリー機構の解明

研究課題名（英文）

A study of molecular mechanisms of assembly of the nuclear envelope-like membrane using DNA-beads incorporated into living cells

研究代表者

小林 昇平（KOBAYASHI SHOUHEI）

（独）情報通信研究機構 未来 ICT 研究所 バイオ ICT 研究室・主任研究員

研究者番号：40425765

研究成果の概要（和文）：

本研究は、生細胞内に導入した DNA ビーズの周囲に小胞体・核膜様の膜構造がアセンブリーする現象を利用して、核膜形成の分子機構を明らかにすることを目的とする。細胞内に導入した DNA ビーズ周辺で起こる現象を蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて解析し、barrier-to-autointegration factor (BAF)が早い段階でDNAビーズに集積することを発見した。RNAiにより細胞内のBAFの量を減らすと、ビーズへの核膜タンパク質の集合が減弱した。これらの結果から、BAF が核膜形成に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This research aims to investigate molecular mechanisms of assembly of the nuclear envelope (NE)-like membrane by utilizing DNA-beads incorporated into a living cell. We analyzed the timing of assembly of various cellular components on the DNA-beads using fluorescence microscopy and electron microscopy, and found that barrier-to-autointegration factor (BAF) appeared on the beads at very early timing after endosomal breakage. Removal of BAF with RNAi significantly reduced assembly of a nuclear envelope protein on the beads. Based on these results, we conclude that BAF is a critical factor for DNA-beads dependent NE assembly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：DNA ビーズ、膜アセンブリー、Live CLEM、異物認識

1. 研究開始当初の背景

生きた細胞の中で望みの生命現象を人為的に誘導し、その過程を解析することができるようになれば、基礎生物学だけでなく、

様々な分野の進展に繋がる。申請者らはこれまでの研究で、生体分子を結合させたプラスチックビーズ（直径～3 μm）をヒト培養細胞

(HeLa) に導入することにより、細胞内分解系の一つであるオートファジーを時空間的に制御して誘導できることを明らかにしてきた (Kobayashi et al. (2010) *Autophagy* 6, 36-45.)。さらに、本研究の申請時点において、DNA 結合ビーズ (DNA ビーズ) を細胞内に導入することにより、形態学的にオートファジーとは異なる、小胞体・核膜様の膜構造がビーズ周囲に形成されることを見出していた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト培養細胞に導入した DNA ビーズの周囲に形成される特殊な膜構造について、膜のアセンブリー過程を顕微鏡イメージングによって明らかにし、DNA ビーズの初期認識に関わる因子を同定することによって、DNA ビーズ周囲で起こる核膜様の膜構造のアセンブリー機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

主に顕微鏡イメージング法を使用して、膜構造のアセンブリー機構について、時空間的情報および形態学的情報の取得を行った。具体的には、種々のオルガネラマーカータンパク質に対する免疫染色や、live CLEM 法 (生細胞蛍光観察したのと同じ場所を、電子顕微鏡で観察する方法) を使用し、時間経過と共に進行する膜アセンブリーの様子について調べた。

4. 研究成果

(1) DNA ビーズ周囲への BAF の集積

まず、細胞内に導入した DNA ビーズの周囲にどのような分子が集積しているかについて調べた。エンドサイトーシスによって DNA ビーズを HeLa 細胞内に取り込ませた後、各種オルガネラマーカータンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、ビーズ周囲に、核膜内膜タンパク質である emerin をはじめとする LEM ドメインタンパク質、および、LEM ドメインタンパク質への結合能を有する barrier-to-autointegration factor (BAF) が局在していることが分かった。BAF は、in vitro の実験系で DNA 配列非依存的に DNA と結合する分子であることから、上記の結果は、細胞内に導入した DNA ビーズの認識に BAF が関わっていることを示唆している。

(2) DNA ビーズのエンドソーム脱出と BAF によるビーズ認識との時間的關係

次に、DNA ビーズ周囲への BAF の集積が、いつ、何をきっかけにして始まるのかを調べた。EGFP-BAF を安定発現する HeLa 細胞に、pH 感受性色素である pHrodo を表面にまぶした DNA ビーズを導入して、エンドソーム崩壊と BAF 集積の時間的關係を調べたところ、BAF はエンドソーム崩壊 (ビーズのエンドソーム脱出) から遅くとも 30 秒の時点で、DNA ビーズ周囲に集積し始めることが分かった。一方、live CLEM 法による解析から、エンドソーム崩壊から 3 分以内の時間帯に固定したサンプルでは、オートファジーに典型的な膜構造 (隔離膜) はビーズ周囲に見られなかった。これらの結果は、BAF による DNA ビーズの認識は、オートファジーによる DNA ビーズの隔離に先立って起こることを示している。

(3) DNA ビーズ周囲における膜構造形成のタイムコース

次に、ビーズ周囲における膜構造の形成をより詳しく調べるために、live CLEM 法による解析を行った。EGFP-BAF を安定発現する細胞に DNA ビーズを導入し、ビーズ周囲に BAF の局在が認められてからの経過時間毎にサンプルを化学固定して、同ビーズの周囲に存在する膜構造を電子顕微鏡で観察した。その結果、BAF 陽性となってから約 10 分が経過した時点で、すでに DNA ビーズ周囲全体を取り囲むような連続した膜構造が形成されていることが分かった。一方、オートファジーに典型的な膜構造は、これらの膜構造とは独立した状態で、ビーズとは反対側に散見された。また、BAF 陽性となってからの経過時間が長いサンプルについても、同様に、オートファジーとは異なる連続した膜構造がビーズ周囲に見られた。これらの結果は、DNA ビーズ周囲における膜構造の形成は、オートファジー関連の膜による隔離とは異なる過程であることを示している。

(4) RNAi 法による BAF の機能解析

次に、RNAi 法による BAF の機能解析を行った。BAF 特異的な配列を有する siRNA を用いて、HeLa 細胞における内在性 BAF の発現を抑制したところ、DNA ビーズ周囲への emerin の局在化が顕著に阻害されることが分かった。一方、ビーズ周囲へのオートファジーのマー

カータンパク質の局在は亢進していた。これらの結果は、細胞内に導入された DNA ビーズは、BAF 依存的なメカニズムによってオートファジーから逃れていることを示唆している。

(5) まとめ

本研究によって、BAF による DNA ビーズの認識が、DNA ビーズ周囲における核膜様の膜構造のアセンブリーにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究で得た知見は、効率良い遺伝子デリバリー法の開発等に直結するため非常に意義深いといえる。

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 5 件)

1. Kobayashi S, Hattori Y, Osakada H, Toma K, Maitani Y, Hiraoka Y, Haraguchi T. Early entry and deformation of macropinosomes correlates with high efficiency of decaarginine-PEG-lipid-mediated gene delivery, *The journal of Gene Medicine*, 査読有、14 巻、2012、262-271、DOI: 10.1002/jgm.2615.
2. Hirose H, Takeuchi T, Osakada H, Pujals S, Katayama S, Nakase I, Kobayashi S, Haraguchi T, Futaki S. Transient Focal Membrane Deformation Induced by Arginine-rich Peptides Leads to Their Direct Penetration into Cells, *Molecular Therapy*, 査読有、20 巻、2012、984-993、DOI: 10.1038/mt.2011.313.
3. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 森知栄, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, 人工ビーズを用いた細胞の外来異物認識機構の解析, *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌*, 査読無、26 巻、2012、21-22.
4. 原口徳子, 小林昇平, 核膜タンパク質、生体の科学, 査読無、62巻、2011、366-369.
5. 小林昇平, 原口徳子, 人工ビーズを用いてオートファジーを視る, *顕微鏡*, 査読無、45巻、2010、78-82.

[学会発表] (計 21 件)

1. 原口徳子, 荒神尚子, 小坂田裕子, 糀谷知子, 小林昇平, 木村宏, 中野めぐみ, 舩本寛, Larionov V, Earnshaw WC, 平岡泰, 人工染色体の分配異常により形成される微小核の細胞内動態と核膜形成, 第29回

染色体ワークショップ、2012年1月25日、仙台秋保温泉、宮城県

2. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 森知栄, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, DNA 結合ポリスチレンビーズの細胞核内への送達, 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜、神奈川県
3. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 森知栄, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, 人工ビーズを用いた細胞の外来異物認識機構の解析, 医学生物学電子顕微鏡技術学会第12回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム、2011年11月26日、浜松市駅ビル MayOne, 静岡県
4. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 森知栄, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, LiveCLEM法を用いたDNAビーズの細胞内運命の解析, 第3回「光塾」、2011年10月22日、東京大学大学院・薬学系研究科、東京都
5. 小林昇平, 人工ビーズを用いた細胞内アセンブリーの誘導・解析法, 近畿電顕技術情報交換会第31回談話会、2011年9月17日、情報通信研究機構未来ICT研究所、兵庫県
6. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 森知栄, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, 生細胞導入ビーズを用いた外来DNA認識機構の解析, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2011, 2011年9月2日、大阪大学コンベンションセンター、大阪府 (奨励賞受賞)
7. Haraguchi, T., Koujin, T., Osakada, H., Kojidani, T., Kobayashi, S., Nakano, M., Masumoto, H., Larionov, V.L., Earnshaw, W.C., Hiraoka, Y., The Nuclear Envelope Structures are Required for Maintenance of the Micronucleus Formed by Loss of Centromere Functions of a Human Artificial Chromosome, *Nuclear envelope disease and chromatin organization*, July 14, 2011, Robinson College, Cambridge, UK
8. 原口徳子, 糀谷知子, 浅川東彦, 森知栄, 小坂田裕子, 小林昇平, 平岡泰, 蛍光・電子顕微鏡両用プローブを用いた分子特異的ナノイメージング法の開発, 医学生物学電子顕微鏡技術学会第27回学術講演会、2011年5月14日、四国大学交流プラザ、徳島県
9. Kobayashi, S., Kojidani, T., Osakada, H., Mori, C., Koujin, T., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., Assembly of intracellular membrane around DNA-coated polystyrene beads in living HeLa cells, *International Symposium on the*

- Physicochemical Field for Genetic Activities, January 24, 2011, The Westin Awaji Island, Japan
10. Koujin, T., Osakada, H., Kojidani, T., Kobayashi, S., Nakano, M., Masumoto, H., Larionov, V. L., Earnshaw, W. C., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., The Nuclear Envelope Structures are Required for Maintenance of the Micronucleus Formed by Loss of Centromere Functions of a Human Artificial Chromosome, International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, January 24, 2011, The Westin Awaji Island, Japan
 11. Haraguchi, T., Koujin, T., Osakada, H., Kojidani, T., Kobayashi, S., Nakano, M., Masumoto, H., Larionov, V., Earnshaw, W. C., Hiraoka, Y., The nuclear envelope structures are required for maintenance of the micronucleus formed by loss of centromere functions of a human artificial chromosome, The American Society for Cell Biology Annual Meeting, December 13, 2010, Philadelphia Pennsylvania Convention Center U.S.A
 12. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 森知栄, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, 生細胞導入ビーズを用いた細胞内膜アセンブリの可視化, 第二回「光塾」, 2010年12月11日, 大阪大学, 大阪府
 13. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 森知栄, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, 生細胞導入DNA結合ビーズによる細胞内膜系のアセンブリ, BMB2010(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年12月9日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県
 14. 原口徳子, 小林昇平, 小坂田裕子, 糀谷知子, 荒神尚子, 平岡泰, 人工ビーズの細胞内導入によって明らかになった遺伝子デリバリーのセルバリア, BMB2010(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年12月9日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県
 15. 荒神尚子, 小坂田裕子, 糀谷知子, 小林昇平, 木村宏, 中野めぐみ, 舛本寛, Larionov V, Earnshaw WC, 平岡泰, 原口徳子, 人工染色体の分配異常により形成される微小核の細胞内動態と核構造, BMB2010(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年12月7日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県
 16. Nakano, T., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Interfacing Living Cells via Molecular Communication, 5th International ICST Conference on Bio-Inspired Models of Network, Information, and Computing Systems (BIONETICS 2010), December 1, 2010, Le Meridien Cambridge Hotel, Boston, USA
 17. 原口徳子, 荒神尚子, 小坂田裕子, 糀谷知子, 小林昇平, 中野めぐみ, 舛本寛, Larionov, V., Earnshaw, W.C., 平岡 泰, 人工染色体のセントロメア機能低下に伴って形成される微小核の細胞内動態と核膜構造, 第9回核ダイナミクス研究会, ラフォーレ修善寺, 2010年5月29日, 静岡県
 18. 原口徳子, 荒神尚子, 糀谷知子, 小坂田裕子, 小林昇平, 岩本政明, 武内史英, 浅川東彦, 平岡 泰, Live CLEM: An approach for observing molecular dynamics in high resolution, 日本顕微鏡学会第66回学術講演会, 名古屋国際会議場, 2010年5月26日, 愛知県
 19. 原口徳子, 荒神尚子, 小坂田裕子, 糀谷知子, 小林昇平, 中野めぐみ, 舛本寛, Larionov, V., Earnshaw, W.C., 平岡 泰, Live CLEM 法によって追跡した微小核の成り行き, 第62回日本細胞生物学会大会, 大阪国際会議場, 2010年5月21日, 大阪府
 20. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, 細胞内での人工オルガネラの構築, 第62回日本細胞生物学会大会, 大阪国際会議場, 2010年5月21日, 大阪府
 21. 小林昇平, 糀谷知子, 小坂田裕子, 山本章嗣, 吉森保, 平岡泰, 原口徳子, Visualization of endosomal escape of pH sensor-conjugated polystyrene beads by live CLEM (Live CLEM 法による pH センサー結合ビーズのエンドソーム脱出過程の可視化), 第62回日本細胞生物学会大会, 大阪国際会議場, 2010年5月19日, 大阪府
- [その他]
ホームページ等
http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/index.html
6. 研究組織
(1) 研究代表者
小林 昇平 (KOBAYASHI SHOUHEI)
(独) 情報通信研究機構 未来 ICT 研究所
バイオ ICT 研究室・主任研究員
研究者番号: 40425765
- (2) 研究分担者 ()
- 研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

