

## 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 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870017

研究課題名（和文）細胞骨格主導の核機能の制御機構の解明

研究課題名（英文）Nucleocytoplasmic shuttling of cytoskeletal proteins: molecular mechanism and biological significance

## 研究代表者

条田 昌宏 (KUMETA MASAHIRO)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：00582181

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞核と細胞骨格の物質・機能両面における相互関連を明らかにするべく、そのコミュニケーションの分子メカニズムの解明に取り組んだ。核膜には「疎水的バリア」としてその選択的透過性を担保する核膜孔複合体（NPC）があり、比較的小さな分子（～40kDa）や輸送複合体の通過を許容しているが、如何にしてその厳密な分子選別がなされているかは不明であった。本研究ではまず、レプトマイシン B により核外輸送を阻害すると、通常は明らかに細胞質側にのみ局在するように見えるスペクトリンやアクチニンが、核内に蓄積することから、ある種の細胞骨格タンパク質は核内外を行き来していることを示した。共沈や定量 PCR を用いた解析から、これらの「核内に局在する細胞骨格関連タンパク質」は、転写などの重要な核内機能に関与していることが明らかとなった。更に細胞質を取り払った状態の細胞を用いた輸送実験から、これらのタンパク質は、非常に巨大にも関わらず輸送担体の助けを借りない「自発的核輸送」により核内に移行することを示した。これらのタンパク質分子は両親媒性ヘリックスから成る構造モチーフを持っていたことから、NPC 内部の疎水的環境との関わりを更に詳細に解析した。疎水的蛍光プローブを用いてタンパク質の表面疎水性を定量評価すると、これらのタンパク質の表面疎水性は溶液の疎水的性質の増加に対応して有意に上昇することが明らかとなった。この結果は分子動態シミュレーション解析と一致し、「両親媒性タンパク質は構造変化によってその内部の疎水的領域を表面に露出することで、NPC 内部の疎水的環境に適応して核膜を通過することができる」という「自発的通過」の概念を提唱した。これらのことから、NPC を介した分子通過は、そもそもそんなに厳密に制御されていない、と考えられる。本研究により得られた分子通過のモデルは、多くの核タンパク質の核移行を説明する一般的機構を示唆し、また一見して核には局在しないタンパク質であっても核内に局在し機能している可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：In this study we focused on the communication between cytoskeleton and the nucleus, which is achieved by the dynamic shuttling of cytoskeletal components into the nucleus. Nuclear pore complex (NPC) serves as a hydrophobic selective gate of nucleocytoplasmic molecular transport, enabling small molecules (～40kDa) and nuclear transport receptors (e. g., importins and exportins) to pass through the nuclear membrane. However, the detailed selectivity property of NPC still remained unknown. First, we demonstrated the nucleocytoplasmic shuttling of several cytoskeletal proteins such as spectrin and actinin by immunostaining of cells treated with Leptomycin B, a selective inhibitor for CRM1-dependent nuclear export. Co-precipitation and quantitative PCR assays revealed their role in fundamental nuclear functions such as gene expression. In vitro nuclear transport assay using digitonin-treated cytoplasm-depleted cells clearly showed their interesting property to spontaneously migrate into the nucleus. Because these proteins possess a characteristic amphiphilic motif in their 3D structure, it was speculated that this amphiphilic motif plays an important role in the molecular passage through the hydrophobic barrier of the pore. Surface hydrophobicity measurement by using

a hydrophobic fluorescent probe bis-ANS clearly revealed the significant increase of their surface hydrophobicity in hydrophobic solution. The molecular dynamics simulation also supported the conformational change, especially around the hydrophobic amino acid residues. Based on these findings, we proposed a “spontaneous migration” model of nuclear transport, which is achieved by the spontaneous conformational change of the molecules to adapt to the hydrophobic environment. We suggest that such cytoskeletal proteins may act to functionally link the nucleoplasm and cytoplasm to organize integrated cellular activities that are required for both basal cellular events and for responses to specific environmental changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：細胞・組織、分子細胞生物学、核膜孔複合体、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

細胞核内に局在する細胞骨格タンパク質については、核内アクチンやβカテニンを中心に、近年徐々に報告が出るようになっていた。しかしそれらの知見は断片的であり、①どのような細胞骨格タンパク質が核内に局在するか、②どのようにして核内に到達するか、③核内で何をしているか、といった基本的な疑問が整理されておらず、この現象を体系的に捉える視点に欠けていた。

また、核-細胞質間の物質輸送を制御する核膜孔複合体 (NPC) は、その選択的透過性により、核膜を通過する分子を選別している。NPC 内部は疎水的サブユニットに満たされており、このため内孔は疎水的バリアとして機能することが提案されている。これまでに、小さい分子 (~40kDa) は自由に通過できること (受動拡散)、大きいタンパク質はインポーチン等の輸送担体への結合によって通過を仲介されること (能動輸送)、等が明らかになってきたが、しかしこれらの既知のシステムのみでは全ての核タンパク質の核輸送を説明できず、核輸送の制御には不明な点も多かった。

2. 研究の目的

(1) どのような細胞骨格タンパク質が核内に局在するかを明らかにし、その核内での機能に迫る。

(2) 核局在性の細胞骨格タンパク質が、どのように NPC のバリアを通過して核内に到達しうるかを明らかにする。

(3) 上記 (1) (2) から得られた知見を元に、細胞骨格主導の核機能の制御の分子機

構と生物学的意義を考察する。

3. 研究の方法

(1) 核内局在を実証するため、核外輸送阻害剤レプトマイシン B を用いて細胞骨格タンパク質の核内への蓄積を検証する。また、共沈や定量 PCR により、これらのタンパク質の核内での機能とその分子基盤を明らかにする。

(2) 上記 (1) で明らかにした核局在性の細胞骨格タンパク質をクローニングし、蛍光タグ融合タンパク質として発現・精製する。これを用いて、in vitro の核輸送アッセイを行い、NPC 通過能を定量評価する。また、タンパク質の構造と疎水的領域に着目し、分子構造解析や in silico の分子シミュレーションにより、NPC 通過に関わる分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) レプトマイシン B 処理した細胞の免疫染色により、スペクトリン α 1・β 1、α アクチニン 1・4 などの細胞骨格タンパク質が核内に局在することを明らかにした。これらのタンパク質は、NPC のサイズ制限 (~40kDa) よりはるかに大きく (全て 100kDa 以上)、また核内輸送シグナル (NLS) は有していない。また、全てが核外輸送シグナル (NES) を持っており、核外輸送タンパク質 CRM1 依存的に核外へと輸送されることが考えられる。

共沈や定量 PCR を用いた解析から、α アクチニン 4 は Ino80 クロマチンリモデリング複合体と結合し、細胞周期依存的な遺伝子発現制御に関与していることが分かった。スペク

トリンに関してはDNA修復などに関与することがすでに知られていることから、このような細胞骨格タンパク質のダイナミックな核内移行は、細胞核の機能制御にとって重要な意味を持つと言える。

(2) 上記(1)で明らかにした細胞骨格タンパク質がどのようにNPCを通過するかを明らかにするため、半透過化した細胞を用いた核輸送アッセイを行った。対象タンパク質はGFP融合体として、昆虫細胞を用いた発現系を用いて精製した。これらのNPC移行能を経時定量的に解析したところ、インポーチンなどの輸送タンパク質よりは遅いものの、70kDaの親水分子デキストランと比較して明らかに有意に核内へ移行している様子が観察された。このことから、これらの巨大タンパク質は輸送担体の助けなしに自発的にNPCを通過しうることが明らかとなった。

これらのタンパク質の持つ特徴的な両親媒性構造に着目し、その特質を解析した。NPC内部は疎水的環境になっていることから、この両親媒性構造が疎水的環境に対応して構造を変化させるという予測のもと、疎水性蛍光プローブbis-ANSを用いて分子表面疎水性を測定した。その結果、溶媒の疎水性が増加するに従い、これらの分子表面の疎水性が増加することが示された。分子ダイナミクス解析による構造シミュレーションにおいても、疎水的環境において両親媒性ヘリックスが角度を変化させ、内部にあった疎水的アミノ酸残基を分子表面に露出するように構造変化を起こす結果が得られた。このことは、構造変化によって疎水的環境に対応しうる分子であれば自発的にNPCを通過できることを示唆している。この考え方はインポーチンなど輸送担体自体のNPC通過にも適用でき、NPCを介した物質輸送の本質を示すものと考えている。

(3) これまでに知られている23種の核局在性細胞骨格タンパク質について、その核内での機能と核移行メカニズムを考察した。これらのタンパク質は、転写・DNA修復・ヒストン修飾・染色体分裂など、核内で多様な機能を果たしており、核内への移行は生物にとって重要な現象であると考えられる。NPC通過の方法としては、これまでに知られていた受動拡散と能動輸送に加え、数多くのタンパク質が両親媒性構造による自発的輸送を行っていることが示唆された。このことは、本研究によって得られた「細胞骨格主導の核機能の制御」の意義を示すものであると考えている。今後この考えを更に拡張することで、NPCを介した分子通過の一般的原理や、未知の核局在タンパク質の発見、ひいては核機能と細胞骨格の一体となった細胞制御機構の理解などに繋がると期待している。

## 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2件)

- ① Masahiro Kumeta, Shige H. Yoshimura, James Hejna, Kunio Takeyasu. Nucleocytoplasmic shuttling of cytoskeletal proteins: molecular mechanism and biological significance. *International Journal of Cell Biology*, 査読有, 2012, 2012 巻, DOI: 10.1155/2012/494902
- ② Toshiyuki Oda, Ryosuke Ohniwa, Yuki Suzuki, Masatsugu Denawa, Masahiro Kumeta, Hiroyuki Okamura, Kunio Takeyasu. Evolutionary dynamics of spliceosomal intron revealed by in silico analyses of the P-Type ATPase superfamily genes. *Molecular Biology Reports*, 査読有, 2011, 38 巻 2285-2293, DOI: 10.1007/s11033-010-0360-3

[学会発表] (計7件)

- ① Masahiro Kumeta. Beyond the size barrier of the nuclear pore: molecular mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of amphiphilic proteins. The 10th NTU-Japan International mini-Symposium on Molecular and Cell Biology (招待講演), 2012年1月8日, Taiwan, Taipei
- ② Masahiro Kumeta, Shige H. Yoshimura and Kunio Takeyasu. Karyopherin-independent nuclear transport of large cytoskeletal proteins. The American Society for Cell Biology - 51st annual meeting, 2011年12月5日, US, Denver
- ③ 糸田昌宏, 山口秀輝, 吉村成弘, 竹安邦夫. 核膜孔のサイズバリアを越えて-巨大タンパク質の核内移行メカニズム. 第10回細胞核ダイナミクス研究会 (口頭発表), 2011年10月26日, 北海道
- ④ Emilie Louvet, Yaron Silberberg, Yuki Suzuki, Hirohide Takahashi, Masahiro Kumeta, Kunio Takeyasu. Structural study of the nucleolus by Atomic Force Microscopy. The 22th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus, 2011年8月28日, Latvia. Riga
- ⑤ Masahiro Kumeta, Shotaro Otsuka, Shige H. Yoshimura and Kunio Takeyasu. Karyopherin-independent nuclear transport of spectrin superfamily proteins. The American Society for

Cell Biology - 50th annual meeting,  
2010年12月14日, US, Philadelphia

- ⑥ Masahiro Kumeta. Dynamic regulation of nuclear functions by subcellular scaffolding proteins. Translational Science - Animal Biotechnology Symposium (招待講演), 2010年6月19日, Taiwan, Taipei
- ⑦ Masahiro Kumeta, Shige H. Yoshimura and Kunio Takeyasu. Spectrin-repeat proteins in the nucleus: molecular mechanism and biological significance of the nuclear localization. Cold Spring Harbor 75th Symposium: Nuclear organization & Function, 2010年6月4日, US, New York

[図書] (計3件)

- ① 桑田昌宏、竹安邦夫. 医学書院、生体の科学—「核内における細胞骨格関連タンパク質」、2011、408-409
- ② Emilie Louvet、桑田昌宏、竹安邦夫. 医学書院、生体の科学—「核小体の単離・精製とその構造」、2011、424-425
- ③ 堀米恒好、古川和広、桑田昌宏、平井悠哉、竹安邦夫. 医学書院、生体の科学—「核マトリックスタンパク質」、2011、402-403

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑田 昌宏 (KUMETA MASAHIRO)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：00582181