

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790103

研究課題名(和文)核膜透過性の生物学的意義の検討

研究課題名(英文)Possible functions of the permeability barrier of the nuclear envelope.

研究代表者

下 菌 哲 (SHIMOZONO, Satoshi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40391982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：マウス線維芽細胞Swiss3T3において細胞周期の間期において核膜の透過性が上昇している現象の解明を試みた。蛍光タンパク質を用いたライブイメージング技術を用いて、高い核膜透過性は持続的なものではなく一過性であること、核膜透過性の制御に関わる可能性が指摘されていた細胞内カルシウムイオン濃度には依存しないこと、この現象は他のマウス線維芽細胞NIH3T3においても観察されSwiss3T3の特殊性質ではなく一般的な生命現象である可能性が大きいことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I studied the phenomenon of the high nuclear envelope (NE) permeability observed in the mouse fibroblast, Swiss 3T3 cell line. In this research, I obtained the following results by live cell imaging techniques using fluorescent proteins as probes for the permeability. First, the high NE permeability was not persistent but transient. Second, the calcium ion concentration in the cytoplasm, which is reported to affect the NE permeability, was not the cause of the high NE observed in Swiss3T3 cells. Third, this phenomenon was not specific only to the Swiss3T3 cell line but could be general because the high NE permeability was also observed in the NIH3T3 cell line and the HT1080 cell line.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：核膜 蛍光タンパク質 拡散

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞質と核は核膜によって隔られている。核と細胞質間の水溶性の物質のやりとりは核膜上に存在する核膜孔と呼ばれるチャンネルを介して行われる。核膜孔を介した核細胞質間のタンパク質など高分子の輸送は、シグナル(核移行シグナル、核排出シグナル)を介した能動輸送と、イオンなど分子量 60k 以下の小分子の受動拡散による二つの輸送からなる。現在、生物学的意義は主に能動輸送が担っており、受動拡散は能動輸送に対する補助的な役割果たすと考えられている。

私は HeLa 細胞において、それまで細胞周期を通じて一定であると思われていた核膜の受動拡散の透過性(以下、核膜の透過性と記述)が細胞分裂直後には高いことを明らかにした。驚くべきことに細胞質分裂後 10 分間は分子量 210k の高分子も拡散させた(Shimozono et al. Biophys. J. 2009)。つまり核膜の透過性はそれまで仮定されていたように常に静的な構造物ではないことを示した。

私はその後の実験の過程においてマウス線維芽細胞 Swiss3T3 細胞においては細胞分裂直後ではない細胞周期の間期に核膜の透過性が非常に高くなる現象を観察した。具体的には分子量 210k の mEGFP-AmCyan が核内に細胞質と同程度に観察される細胞群が存在するというものである。核膜の透過性の限界は分子量 60k 以上の分子は拡散させない、というものである。この現象は HeLa 細胞においては観察されなかったものである。この核膜の透過性が細胞周期の間期においても高くなることを手がかりに、核膜を介した受動拡散がこれまで考えられてきたような補助的な役割ではなく、核膜の透過性を制御することにより積極的な生物学的役割を果たしている可能性を検討することにした。

2. 研究の目的

核膜は分子量 60k 以上の高分子は単純拡散によっては透過させないと一般的に考えられてきた。核膜の高分子フィルタ機能がこれまで考えられてきた受動的機能以上のより積極的な生物学的機能を有することを想定し、細胞周期間期における核膜透過性の上昇を特徴づけることを目的とした。

3. 研究の方法

蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングにより細胞質と核の局在を経時的に観察することで核膜の透過性を検討した。具体的な手順は以下のように行った。

[融合遺伝子のコンストラクション]

細胞分裂直後にも殆ど形成されつつある核への拡散の見られない蛍光タンパク質 mVenus-KikG (蛍光タンパク質 Venus と KikG の融合タンパク質)を用いて核膜の透過性を評価することとした。この融合蛍光タンパク質は KikG が 4 量体を形成するため、全体としては蛍光タンパク質 8 個分の大きさ(分子量約 210k)を持つ。本研究以前は、mEGFP-AmCyan (AmCyan は 4 量体の蛍光タンパク質)を用いていたが、明るさの観点から mVenus-KikG を用いることとした。mVenus 及び KikG の cDNA を PCR により増幅することにより制限酵素サイトを付加し、pcDNA3 にクローニングし融合タンパク質を作製した。更に 8 量体蛍光タンパク質の細胞質から核への拡散を観察するために、mVenus と、紫外線照射により蛍光のスペクトルを緑から赤に変換できる KikGR の融合タンパク質も同様に作製した。

[イメージング]

ガラスボトムディッシュに細胞をまき、プラスミドを Lipofectamine を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 2 日目に、フェノールレッドを含まない DMEM/F12 培地中でイメージングを行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 もしくは共焦点レーザー顕微鏡 FV10i (共にオリンパス社製)を用いた。KikGR の赤色化は FV1000 を用い、セカンドスキャナーを用いて細胞質に 405 nm のレーザーを照射することにより行った。

細胞内カルシウムイオン濃度上昇には終濃度が 1 μ M になるよう ionomycin を投与することにより行った。

4. 研究成果

[核膜透過性と細胞周期等との関連]

Swiss3T3細胞の核膜透過性上昇が細胞周期のどの時期に生じるのか検討するために、FV10i を用いて mVenus-KikG の局在を長時間にわたり、多点タイムラプスイメージングを行った。ある細胞は細胞分裂直後(G1期と推察される)に細胞質から核への mVenus-KikG 蛍光の拡散が観察され、ある細胞は細胞分裂数時間前(G2期)に核への拡散が観察された。つまり細胞周期の様々な時期に核膜透過性の上昇が生じている。このことから核膜透過性の上昇は細胞周期と関連した現象ではないと結論づけた。また、Histone2Bに mRFP を融合したタンパク質もしくは低分子化合物 Hoechst33342 を用いて核をラベルし、核の形状を経時的に観察しても、核の形状はほぼ一定であり、核膜の透過性との関連は認められなかった。

[細胞周期間期の核膜透過性の上昇は Swiss3T3細胞にのみ観察される特殊な現象か？]

細胞周期間期における核膜透過性の上昇が Swiss3T3 細胞特有の現象であるのか否かを検討するために近縁のマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて mVenus-KikG の分布を検討した。HeLa 細胞では間期における核膜透過性の上昇の兆候は観察されていない。NIH3T3 細胞に mVenus-KikG をトランスフェクションして観察すると Swiss3T3 細胞と同様に核と細胞質に同程度に蛍光が観察される細胞群がトランスフェクションされた細胞の 20~30%程度に観察された(図 1)。更にヒト由来の線維芽細胞様の細胞腫 HT1080 を用いて同様の実験を行った。HT1080 においても約 10%の細胞群において、核内に細胞と同程度の mVenus-KikG 蛍光が観察された。このことから間期における核膜透過性の上昇は Swiss3T3 細胞に特殊な現象ではなく、ある一般的生物学的意義を持つ現象であることを支持する。更に様々な細胞腫を用いて検討する必要があるが、線維芽細胞の機能に関連する可能性を示唆する。

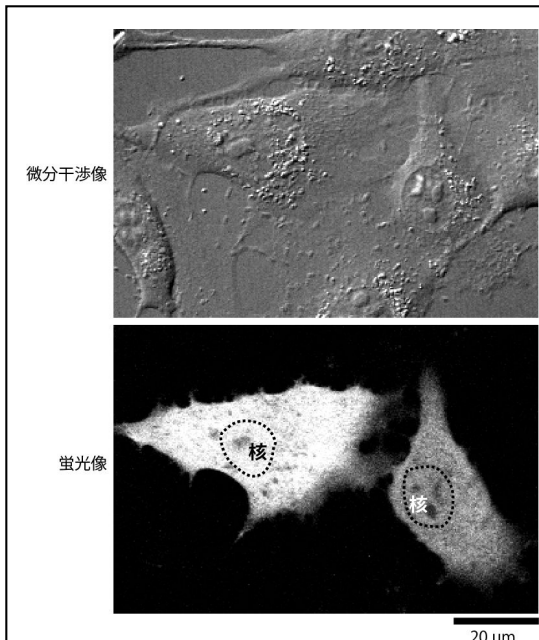


図 1. NIH3T3 細胞における mVenus-KikG の発現パターン。微分干渉像(上)と蛍光像(下)。核内に細胞質と同程度の蛍光が観察される。

[細胞内カルシウムイオン濃度に依存するか？]

細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は核膜の透過性を上昇させるとの報告がある。mVenus-KikG を発現する Swiss3T3 の細胞内カルシウムイオン濃度をイオノフォア ionomycin を用いて上昇させ、その前後で

mVenus-KikG の細胞質-核の局在を観察した(この実験には核に殆ど蛍光が観察されず、細胞質に強い蛍光を呈する細胞を選別)。細胞質の蛍光の核への核酸は観察されず、イオノフォアの投与による顕著な局在の変化は観察されなかった(図 2)。この結果は細胞内カルシウムイオン濃度は高い核膜透過性の原因では無いことを示している。

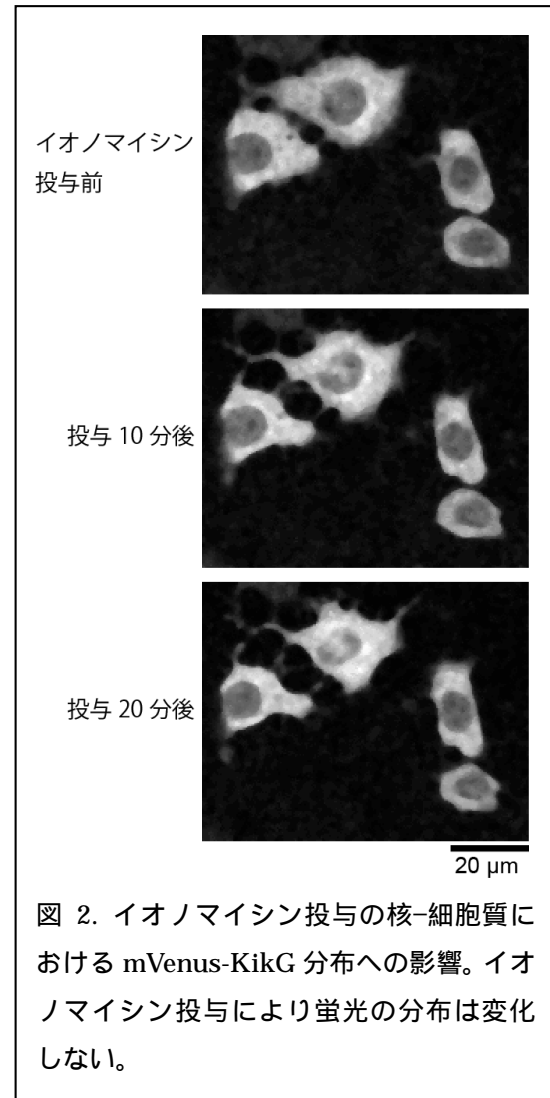
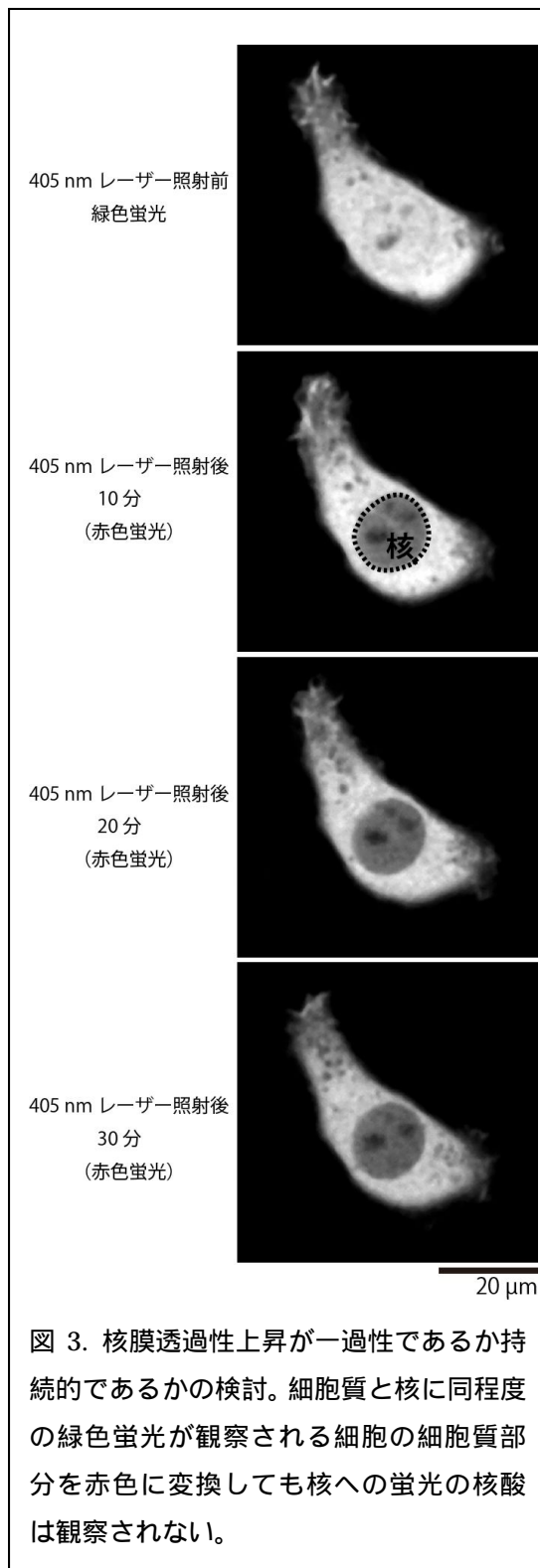


図 2. イオノマイシン投与の核-細胞質における mVenus-KikG 分布への影響。イオノマイシン投与により蛍光の分布は変化しない。

[細胞外基質の影響]

ガラスボトムに塗布した細胞外基質が細胞に機械的ストレスを与え、核膜透過性にも影響を及ぼす可能性が指摘されている。その結果として DNA のトランスフェクションの効率にも影響を与えることが示されている。また、細胞外基質でコートしたディッシュ上の細胞は自発的にカルシウムイオン濃度変化を呈することが示されている。つまり細胞外基質は細胞の状態を変化させうる。今回の実験においてはコラーゲンコートしたガラスボトムディッシュとコートしないディッシュで mVenus-KikG の局在を検討した。しかしながらコラーゲンコートの有無で mVenus-KikG が核にも観察される細胞の割合は変化はなかった。つまり核膜の透過性には影響を及ぼさないことを示している。



[一過性であるか持続的であるか]

細胞周期間に観察される核膜の透過性増大が一過性であるのか、持続性であるのかを検討するために、細胞質と核に mVenus-KikGR が同程度に分布する細胞 (核膜の透過性が高いことを示唆する) について、細胞質に 405 nm のレーザーを照射することにより mVenus-KikGR の KikGR 部分を赤色化し、赤色

蛍光の核への移行を追跡した。赤色蛍光を経時的に観察すると、赤色蛍光は核へ移行せず細胞質にとどまった。この結果より核膜の透過性上昇は持続的なものではなく細胞周期間に一過性に生じる現象であることを明らかにした(図 3)。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下園 哲 (SHIMOZONO, Satoshi)

独立行政法人 理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員

研究者番号: 40391982