

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291007

研究課題名(和文)核機能分化に働くテトラヒメナ核膜孔複合体の分子・構造の解明

研究課題名(英文)Molecular structures of the nuclear pore complex in Tetrahymena

研究代表者

原口 徳子 (Haraguchi, Tokuko)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：20359079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛虫テトラヒメナには、ひとつの細胞内に、大核・小核という構造と機能の異なる2種類の核が存在する。本研究課題は、この生物学上の特徴を利用して、核膜孔複合体が核機能分化に関与する分子基盤および構造基盤を明らかにするものである。まず、大小核の核膜孔複合体を構成する全ヌクレオボリンを同定し、大小核核膜孔の構造的な違いを分子レベルで明らかにした。次に、受精後の核が大小核へ分化する過程を生細胞イメージングで解析し、核膜孔複合体と核機能分化との時空間的な関係を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A ciliated Tetrahymena has two structurally and functionally distinct nuclei, a somatic macronucleus (MAC) and a germline micronucleus (MIC) that develop from the post-zygotic nuclei originated from MIC during the sexual process of conjugation. This study aims to understand molecular and structural difference between MAC and MIC nuclear pore complexes (NPCs), which is believed to be involved in the nuclear differentiation. By combining in silico analysis, mass spectrometry analysis for immuno-isolated proteins, and subcellular localization analysis of GFP fused proteins, we first identified all components of the NPCs in MAC and MIC and indicated structural difference between MAC and MIC NPCs. We next examined dynamic process of the nuclear differentiation using fluorescence live cell imaging and Live CLEM imaging, and found that assembly of the type-specific NPC is one of the most important determinants for the nuclear differentiation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞・組織 生体分子 蛋白質 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

核膜孔複合体は核-細胞質間の輸送を担う構造であり、核の機能は、この孔を介した物質輸送によって制御される。従って、核膜孔複合体を構成するタンパク質(ヌクレオポリン)は、核輸送を介して核機能分化を制御することが可能である。しかし、個別のヌクレオポリンが核機能分化にどのような役割をもっているかについては全く分かっていなかった。我々は、Nup98 がヒストン H1 の核輸送を制御することによって核機能分化に関与しうることを、テトラヒメナを用いて示した(Iwamoto et al, Curr. Biol., 2009)。

繊毛虫のテトラヒメナ(単細胞生物)は、ひとつの細胞内に機能と構造が異なる2種類の核(大核と小核)が存在し、生命現象に応じてこの二核を使い分ける。大核は、転写活性の高い短いDNAが多コピー存在し、増殖に必要な全ての転写をまかなっている。一方、小核は、二倍体のゲノムDNAが存在するが転写不活性で、自身の複製以外には使われない。減数分裂後、受精し、発生に相当する2回の核分裂を経て、大核と小核に分化していく。通常の一核性の真核生物では、細胞自体も分化するため、核構造の違いだけによって核機能分化が起こることを示すのは困難であるが、この生物では、同一細胞質内のごく近傍で大小核の核分化が起こることから、核分化の制御の仕組みを核構造と結びつけて研究することが可能である。

2. 研究の目的

本研究課題は、核機能分化に重要な働きをする核膜孔複合体の構造的基盤を明らかにすることを目的とする。まず、テトラヒメナの大核・小核の核膜孔複合体を構成する全ヌクレオポリンを同定し、大核と小核の核膜孔複合体の構造的な違いを分子レベルで明らかにする。次に、受精後の核が大核・小核へ分化する過程を生細胞イメージングで解析し、核膜孔複合体と核分化との時空間的な関係を明らかにする。これらの解析により、核機能分化に働く核膜孔複合体の分子・構造を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

既知のヌクレオポリンに GFP を融合したタンパク質をテトラヒメナ細胞で発現させ、抗 GFP 抗体により共沈降するタンパク質群を、質量分析法を用いて網羅的に解析した。それらのタンパク質およびゲノムデータベースから発見したタンパク質に対して、*in silico* による構造予測および発現プロファイル解析を行い、分子構造と発現プロファイルの特徴からヌクレオポリンの候補となるタンパク質を抽出した。候補タンパク質に対して、GFP 融合タンパク質を細胞に発現させ、その核膜孔への局在によってヌクレオポリンと判定した。この方法を、新規に発見されたヌクレオポリンに対しても繰り返し行っ

た。

ヌクレオポリンと同定されたタンパク質については、核分化過程での挙動を、生細胞蛍光イメージング法を用いて解析した。GFP 融合ヌクレオポリンを発現させたテトラヒメナを性別の異なる細胞と混ぜ合わせ、低栄養液に晒すことで生殖を誘導し、核分化過程の細胞を、蛍光顕微鏡を用いて生きたままの状態で経時観察した。核膜および核膜孔複合体の詳細構造については、ライブクレム法(生細胞蛍光イメージングと電子顕微鏡観察を組み合わせた方法)を用いて解析した。ヌクレオポリンの核膜孔内での局在に関しては、免疫電子顕微鏡法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 全ヌクレオポリンの同定

既知のヌクレオポリン Nup93 をベイトとして、結合するタンパク質を質量分析法で解析し、Nup93 complex に含まれる新規ヌクレオポリン Nup308(Nup205 ホモログ)と Nup58 を発見した。Nup308 は、C 末端側に Nup205 ホモログに見られる構造を持つが、それに加えて N 末端側には GLFG リピート領域を持つことが分かった。この領域は、他の生物の Nup205 ホモログには見られないため、テトラヒメナ Nup308 特有の構造である。大小核の核膜孔に存在する量を、GFP 融合タンパク質の蛍光量を指標に調べたところ、大小核に同程度の量比で局在することが分かった。

次に、Y-complex と呼ばれる土台部分の構造を検討した。脊椎動物の Y-complex は、約 10 種類のタンパク質から構成されるが、テトラヒメナではこれまでに 3 種類しか分かっていなかった。そのうちのひとつである Seh1 をベイトとして、その結合タンパク質を質量分析で解析し、新たに Nup85 を発見した。さらに、Nup85 をベイトとして Nup160 と Nup133 を発見した。既知の Nup96 をベイトとして Nup107 を発見した。しかし、これらの解析のいずれでも、Nup43, Nup37, ELYS のホモログを発見することは出来なかった。これらのタンパク質は、出芽酵母には存在しないことが知られているため、テトラヒメナにも存在しないと考えられる。大小核の核膜孔に存在する Y-complex タンパク質の量を GFP 融合タンパク質の蛍光量を指標に調べたところ、すべての Y-complex タンパク質は、大核より小核に多く存在することが分かった。

FG-Nup と総称される FG リピートをもつヌクレオポリンを検討した。これまでに、我々により Nup98 の 4 つのパラログが発見され、2 つずつが大小核にそれぞれ特異的な局在をすることが分かっていた(Iwamoto et al., 2009)。本研究課題では、最新のゲノムデータベースから FG リピート構造などを指標に、新たな FG-Nup として、Nup214 ホモログ 2 種類、Nup153 ホモログ 2 種類、Nup62、上述した Nup58 を同定することに成功した。Nup214 と Nup153 のホモログ 2 種類は、それ

それぞれ大小核に特異的に局在した。

膜タンパク質 Nup を検討し、新たに大核特異的な Pom121 と小核特異的な Pom82 を発見した。免疫電験法により大核 Pom121 は核質側にのみ、小核 Pom82 は細胞質側にのみ存在することが分かった。

その他の Nup として、Nup88, Nup185, Tpr を同定した。

これらの結果を論文にまとめて報告した (Iwamoto et al., J. Cell Sci., 2017)。これにより、テトラヒメナの大小核の核膜孔複合体の構成因子のほぼ全てが明らかとなった(図1)。

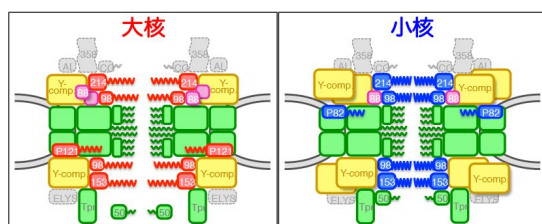


図1 大小核の核膜孔複合体構造

(2) 核分化におけるヌクレオポリンの動態

小核から大核と小核が形成される核分化過程での各ヌクレオポリンの動態を生きた細胞で観察した。大核に特異的な mCherry-MacNup98A, -B の動態を検討した結果、核分化の極めて初期段階に、新大核予定核(大核原基)に出現することが分かった。クロマチンの再編成(すなわち、大核化)に必要な Twi1p-GFP は、それに遅れて同核に核移行することも分かった。小核に特異的なヌクレオポリン mCherry-MicNup98A, -B および大小核共通な成分である GFP-Nup93 を観察したところ、新大核予定核および新小核予定核(小核原基)の核膜上に、これらの蛍光タンパク質融合ヌクレオポリンがクラスターした構造が観察された。その構造をライブクレム法で観察したところ、核膜が二重になった二重核膜(redundant nuclear envelope)構造が形成され、内側の核膜に、小核由来の核膜孔複合体が詰め込まれているのが観察された(図2)。

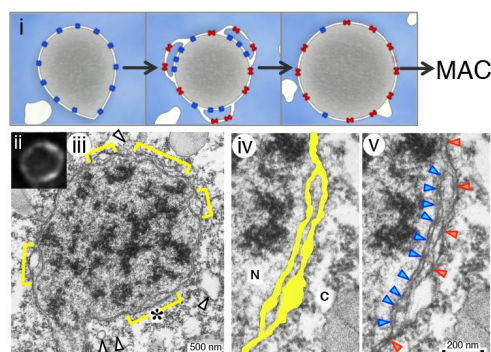


図2 核分化過程で見られる二重核膜構造

このような二重核膜構造は、全生物を通じて、今回初めて発見されたものである。これらの

結果は、核膜孔の大核化が大核分化に重要であること、大核化が進むこの時期には、小核タイプの核膜孔複合体を物理的に閉じ込める必要があることを示唆している (Iwamoto et al, JCS, 2015)。また、他の生物においても、核膜孔複合体のタイプスイッチングが、核分化に重要な働きをする可能性を示唆するものである (Iwamoto et al., Commun, Integr. Biol., 2015; Iwamoto et al., Curr. Opin. Cell Biol., 2016)。

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43件)

Iwamoto M, Osakada H, Mori C, Fukuda Y, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T: Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in ciliate *Tetrahymena*, J. Cell Sci., 査読有, doi: 10.1242/jcs.199398, (2017)

Kaur H, Sparvoli D, Osakada H, Iwamoto M, Haraguchi T, Turkewitz A.P: A late endosomal syntaxin and the AP-3 complex are required for formation and maturation of lysosome-related secretory organelles (mucocysts) in *Tetrahymena thermophile*, Mol. Biol. Cell, 査読有, doi:10.1091/mbc.E17-01-0018, (2017)

Yang H-J, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T: Function of nuclear membrane proteins in shaping the nuclear envelope integrity during closed mitosis. J. Biochem., 査読有, doi: 10.1093/jb/mvx020, (2017)

Kobayashi S, Iwamoto M, Haraguchi T: Live correlative light-electron microscopy to observe molecular dynamics in high resolution. Microscopy (Oxf), 査読有, 65(4), 296-308. doi: 10.1093/jmicro/dfw024, (2016)

Tange Y, Chikashige Y, Takahata S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y: Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. Genes to Cells, 査読有, 21(8), 812-832, doi: 10.1111/gtc.12385, (2016)

Tsuchiya M, Ogawa H, Takako K, Kobayashi S, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T: Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of

gene delivery in mammalian cells. FEBS Lett., 査読有, 590(16), 2671-80, doi: 10.1002/1873-3468, 12262, (2016)

Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T: Uniquely designed nuclear structures of lower eukaryotes. Curr. Opin. Cell Biol., 査読有, 40, 66-73, doi: 10.1016/j.ceb.2016.02.019, (2016)

Asakawa H, Yang H-J, Hiraoka Y, Haraguchi T: Virtual nuclear envelope breakdown and its regulators in fission yeast meiosis. Front. Cell Dev. Biol., 査読有, 4, 5, doi: 10.3389/fcell.2016.00005, (2016)

Yang H-J, Haraguchi T, Hiraoka Y: A nucleoporin that facilitates meiotic kinetochore reorganization. Cell Cycle, 査読有, 15(3), 307-308, doi: 10.1080/15384101.2015.1125237, (2016)

Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y: Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore assembly. J. Cell Biol., 査読有, 211(2), 295-308, doi: 10.1083/jcb.201501035, (2015)

Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T: The nuclear pore complex acts as a master switch for nuclear differentiation. Commun. Integr. Biol., 査読有, 8, 4, e1056950, doi: 10.1080/19420889.2015.1056950, (2015)

Kobayashi S, Haraguchi T: A novel pathway to detect and cope with exogenous dsDNA. Commun. Integr. Biol., 査読有, 8(5), e1065361, doi: 10.1080/19420889.2015.1065361, (2015)

Asakawa H, Mori C, Ohtsuki C, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T: Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in fission yeast. FEBS Open Bio, 査読有, 5, 508-514, doi: 10.1016/j.fob.2015.06.004, (2015)

Kobayashi S, Koujin T, Kojidani T, Osakada H, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T: BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 112 (22), 7027-7032, doi: 10.1073/pnas.1501235112, (2015)

Iwamoto M, Koujin T, Osakada H, Mori C, Kojidani T, Matsuda A, Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T: Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in

Tetrahymena. J. Cell Sci., 査読有, 128 1812-1823, doi:10.1242/jcs.167353, (2015)

Haraguchi T, Osakada H, Koujin T: Live CLEM Imaging to Analyze Nuclear Structures at High Resolution. Methods Mol Biol., 査読有, 1262:89-103. doi: 10.1007/978-1-4939-2253-6_6. In Nuclear Bodies and Noncoding RNAs, Methods and Protocols (Humana Press), (2015)

Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T: Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Nucleus, 査読有, 5(2), 149-162, doi:10.4161/nucl.28487, (2014)

Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T: A method of correlative light and electron microscopy for yeast cells. Micron, 査読有, 61, 53-61, doi:10.1016/j.micron.2014.02.007, (2014)

他 25 件

〔学会発表〕(計 107 件)

岩本政明、平岡泰、原口徳子: 織毛虫テトラヒメナの二種類の核を分ける核膜孔複合体の構造と動態. 日本藻類学会 41 回大会、高知大学(高知県高知市曙町)、2017 年 3 月 23 日

原口徳子、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、舩本寛、平岡泰: 癌で見られる微小核の形成と維持に対する核膜の役割. 第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市かずさ鎌足)、2017 年 1 月 12 日

岩本政明、荒神尚子、小坂田裕子、森知栄、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子: 機能の異なる 2 核をもつテトラヒメナの核膜孔複合体構造と核分化での核膜孔・核膜動態. 第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区)、2016 年 12 月 1 日

原口徳子、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、小林昇平、平岡泰: 癌で見られる微小核の形成と維持の仕組み: 核膜の役割. 第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター(宮城県仙台市青葉区青葉山)、2016 年 9 月 25 日

Haraguchi T, Asakawa H, Kojidani T, Hiraoka Y.: Live CLEM imaging to observe

molecular dynamics in high resolution: application to yeast cells . The 14th International Congress on Yeasts . 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市夢舞台) 、2016年9月14日

丸山顕史、岩本政明、平岡泰、原口徳子 : テトラヒメナヒストン H3 における新規の化学修飾 .第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市中央区港島中町) 、2015年12月3日

原口徳子、小林昇平、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、森知栄、平岡泰 : Visualization of the autophagic process using beads incorporated into living cells .第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市中央区港島中町) 、2015年12月1日

Haraguchi T : Asymmetrical structure of the nuclear pore complex in the fission yeast *S. pombe* . Nuclear Transport Meeting, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2015年9月19日

Haraguchi T, Kobayashi S, Koujin T, Osakada H, Kojidani T, Mori C Hiraoka Y: A Role of Chromatin-Nuclear Membrane Protein Interaction on the Nuclear Envelope Assembly . International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市夢舞台) 、2015年8月25日

Haraguchi T, Asakawa , H, Kojidani ,T Osakada ,H, Iwamoto M, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y : Molecular architecture of the nuclear pore complex in the fission yeast *S. pombe* .Pombe2015 8th International Fission Yeast Meeting . 生田神社 (兵庫県神戸市中央区下山手通) 2015年6月24日

Asakawa H, Mori C, Ohtsuki C, Hiraoka Y, Haraguchi T : Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* . Pombe2015 8th International Fission Yeast Meeting, 生田神社 (兵庫県神戸市中央区下山手通) 2015年6月22日

浅川東彦、Yang H-J、大槻千鶴、糀谷知子、森知栄、小坂田裕子、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子 : 分裂酵母の核膜孔複合体蛋白質 Nup131、Nup132 の機能解析 .第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、安芸グランドホテル (広島県廿日市市宮島口西) 、2014年12月16日

岩本政明、荒神尚子、小坂田裕子、森知栄、平岡泰、原口徳子 : 織毛虫の大核と小核を分ける核膜孔複合体の構造と機能 .第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市西区) 、2014年11月25日

原口徳子、小林昇平、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、森知栄、平岡泰 : 細胞内導入人工ビーズで明らかになったクロマチン-核膜タンパク質相互作用の役割 .第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都府京都市左京区) 、2014年10月18日

原口徳子、小林昇平、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、森知栄、平岡泰 : 核膜形成における核膜タンパク質とクロマチンの動的相互作用の役割 .第 52 回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市白石区) 2014年9月26日

原口徳子 : 細胞の“ありのまま”を見るために-核膜研究-第 6 回光塾、NICT 神戸 (兵庫県神戸市西区岩岡町) 2014年9月7日

丸山顕史、岩本政明、平岡泰、原口徳子 : テトラヒメナのヒストン修飾の観察 .第 6 回光塾、NICT 神戸 (兵庫県神戸市西区岩岡町) 2014年9月6日

岩本政明、小坂田裕子、森知栄、福田康弘、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子 : 織毛虫テトラヒメナの核膜孔複合体:その構造の進化的な共通性と特殊性 .第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂東大寺総合文化センター (奈良県奈良市水門町) 、2014年6月12日

原口徳子、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、小林昇平、舛本寛、平岡泰 : 微小核の形成・維持の仕組みの解析から明らかになった核膜の役割 .第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂東大寺総合文化センター (奈良県奈良市水門町) 2014年6月11日

浅川東彦、Yang H-J、山本孝治、大槻千鶴、近重裕次、十川久美子、徳永万喜洋、岩本政明、平岡泰、原口徳子 : 分裂酵母における核膜孔複合体の構成と機能 .第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂東大寺総合文化センター (奈良県奈良市水門町) 2014年6月11日

他 87 件

〔図書〕（計 8 件）

原口徳子・木村宏・平岡泰（編著）、新・生細胞蛍光イメージング、共立出版、全 352 ページ(2015)

原口徳子、平岡泰（分担執筆）、マルチカラータイムラプス蛍光顕微鏡「新・生細胞蛍光イメージング」、原口徳子他編集、共立出版、34-42（2015）

原口徳子、平岡泰（分担執筆）、スペクトルイメージング「新・生細胞蛍光イメージング」、原口徳子他編集、共立出版、43-48（2015）

原口徳子、生細胞試料の準備「新・生細胞蛍光イメージング」、原口徳子他編集、共立出版、96-100（2015）

木村宏、金城政孝、原口徳子、平岡泰（分担執筆）、蛍光色素・蛍光タンパク質「新・生細胞蛍光イメージング」、原口徳子他編集、共立出版、101-113（2015）

原口徳子（分担執筆）、生細胞タイムラプス「新・生細胞蛍光イメージング」、原口徳子他編集、共立出版、277-285（2015）

原口徳子、永井健治、松田知己（分担執筆）、FRET「新・生細胞蛍光イメージング」、原口徳子他編集、共立出版、299-302（2015）

原口徳子（分担執筆）、観察法、蛍光イメージング「発光の事典」、木下修一他編集、朝倉書店、588-594（2015）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：核酸導入促進剤
発明者：小川英知、原口徳子（NICT）
土屋恵、平岡泰（大阪大学）
権利者：国立研究開発法人情報通信研究機構・国立大学法人大阪大学
種類：特許権
番号：特願 2016-006937
出願年月日：平成 28 年 1 月 18 日
国内外の別：国内

名称：色収差補正方法
発明者：松田厚志、原口徳子
権利者：国立研究開発法人情報通信研究機構
種類：特許権
番号：特願 2014-097942
出願年月日：平成 26 年 5 月 9 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www2.nict.go.jp/frontier/seibutsu/CellMag ic/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原口 徳子 (HARAGUCHI TOKUKO)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・フロンティア創造総合研究室・主任研究員
研究者番号：20359079

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

小布施 力史 (OBUSE CHIKASHI)
北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・教授
研究者番号：00273855

岩本 政明 (IWAMOTO MASA AKI)
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・フロンティア創造総合研究室・主任研究員
研究者番号：80450683