

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670087

研究課題名(和文) 蛍光偏光観測による核ラミナのフィラメント構造と重合機構の解析

研究課題名(英文) Polarized fluorescence microscopy analysis of nuclear lamina

研究代表者

佐藤 啓介 (Sato, Keisuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60644044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の核膜を裏打ちする核ラミナの主要構成成分であるラミンフィラメントを蛍光偏光顕微鏡で解析できるようにするため、ヒトLamin AおよびLamin B1とEGFPを立体的位置関係を固定した形で繋ぐことを試み、これに成功した。そのようにして作製したLaminB1-EGFPを、CRISPR/Cas9法によりHEK293細胞ゲノムの内在性遺伝子座に組み込んだが、測定系との相性が悪く、成果を得るに至らなかった。そこで親株をHeLa細胞に代えてゲノムへの組み込みを行い、LaminA-EGFPについては導入に成功した。LaminB1-EGFPについても同様にHeLa細胞ゲノムへ組み込みを行っている。

研究成果の概要(英文)：To analyze the structure of Lamin filaments, which is the main constituent of nuclear lamina of eukaryotic cells, human Lamin A and Lamin B1 proteins were constrainedly tagged with EGFP. We tried to replace endogenous Lamin genes of HeLa cells with cDNA of these proteins, and partially succeeded.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ラミン 蛍光偏光

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類を含む多くの真核生物では、核膜は核ラミナと呼ばれる構造で裏打ちされている。核ラミナは主にラミンフィラメントにより構成されているが、その構造についての知見は極めて少ない。一般的に受け入れられている核ラミナの構造モデルは、1986年にアフリカツメガエル卵の核膜成分を界面活性剤により抽出し、電子顕微鏡観察したものであり、本来の構造を正しく反映しているか不明である。また、生殖細胞は体細胞とは核内のクロマチンの分布が異なり、クロマチンに相互作用する核ラミナの構造にも違いがある可能性がある。以上のような問題点がありながら、従来の核ラミナ構造モデルは、約30年にわたり検証されてこなかった。

(2) 哺乳類細胞は分裂の際、核膜崩壊をおこし、それと共にラミンフィラメントも脱重合する。脱重合したラミンタンパク質は、分裂が進行すると、核膜の再形成と共に再重合し、核膜直下にラミンフィラメントのネットワークを伸長し、核ラミナを形成する。この際のラミンフィラメントの重合様式・伸長メカニズムも不明なままである。その大きな理由は、精製ラミンタンパク質を用いた生化学的実験では、細胞内での重合・伸長を再現することができないことである。生細胞の観察でも、ラミンフィラメントが重合・伸長する様子が観察されてこなかった。このような状況を打開する手段として、より高い空間分解能を持つ顕微鏡を用いることが考えられる。しかし、近年開発された超解像顕微鏡は撮像に時間がかかり、生細胞での観察に不向きである。このような状況から、ラミンフィラメントの重合・伸長の現場をリアルタイム観察することは既存の顕微鏡法では技術的に困難であった。

(3) 以上のような問題を解決する手段として、蛍光偏光顕微鏡の利用が考えられた。緑色蛍光タンパク質 GFP のような蛍光タンパク質を観察対象とするタンパク質に立体的位置関係が固定された状態で結合することにより、そのタンパク質の向きに応じて蛍光偏光の傾き(蛍光異方性)が変化する。すなわち、蛍光異方性を調べることで、タンパク質の向きを知ることができる。これをラミンのようなフィラメントを形成するタンパク質に適用すれば、フィラメントはその全長にわたって蛍光偏光を持ち、蛍光偏光顕微鏡観察によりその異方性を調べることでフィラメントの配向を決定することができる。

(4) ラミン遺伝子の変異は、ラミノパシーと総称される数多くの先天性疾患の原因となることが知られている。その種類は、早老症、筋ジストロフィー、拡張型心筋症など、多岐に渡る。これらの発症メカニズム、ひいては治療戦略を考える上でも、核ラミナおよびラ

ミンについての基礎的な理解が重要と考えられる。本研究の進展により、核ラミナの構造や、ラミンの重合についての理解が深まり、ラミノパシーの発症機序の解明および将来的な治療法確立に貢献する可能性が期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 上記のような背景から、本研究では、より一般的な細胞で、本来の核ラミナ構造を明らかにするため、新しい顕微鏡法である蛍光偏光顕微鏡により、生きたままの細胞でのラミンフィラメント構造の観察を目指した。その成果をもとに、従来の核ラミナ構造モデルが正しいか検証し、必要があれば新たなモデルを構築することを目指した。

(2) 培養細胞の分裂期で起こるラミンフィラメントの重合・伸長を、蛍光偏光顕微鏡観察し、いまだ明らかになっていない、ラミンフィラメントの重合様式・伸長メカニズムについて、分子レベルでの理解を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 蛍光偏光顕微鏡システムは、申請者の所属する研究室内で2軸の直交する蛍光偏光分岐光学系を組み立て、既存の顕微鏡に取り付けることで実現した。さらに一分子レベルの蛍光偏光顕微鏡観察は、研究協力者の谷研究員が所有する、4軸の蛍光偏光顕微鏡を使用し、共同研究として実施した。

(2) 蛍光偏光顕微鏡観察を行うためには、観察対象を蛍光分子と立体的位置関係が固定された状態で標識(constrained tagging)する必要がある。本研究ではこのために、緑色蛍光タンパク質 EGFP のアミノ末端 ヘリックスをラミン内に存在する ヘリックスと連続させる形で、EGFP をラミンに挿入することを試みた。

(3) 実際の蛍光偏光顕微鏡観察では、発現量が低レベルにコントロールされること、および、全ての細胞が融合タンパク質を発現していることが重要となる。この条件を満たすため、融合タンパク質を内在性ラミンのプロモーターから発現する安定発現株を、ゲノム編集技術「CRISPR/Cas9法」により、ヒト由来培養細胞ゲノムに組み込むことにより作製した。このようにして作製した EGFP 融合ラミン発現細胞株を、蛍光偏光顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

(1) まず、蛍光偏光観察を行うため、蛍光を偏光ビームスプリッターで2つの偏光成分に分岐させた後に、角度可変ミラーともう一つの偏光ビームスプリッターを組み合わせることで、僅かに位置をずらして合流させ、CCDカメラのセンサー内に同時に結像するよう

に光学系を組んだ。この結果、一画面で直交する2方向の蛍光偏光成分を同時にリアルタイム観察可能な光学系を構築することができた。

(2) ヒト Lamin A と EGFP、およびヒト Lamin B1 と EGFP の constrained tagging について、様々な長さのヘリックスをリンカーとして試し、蛍光偏光顕微鏡観察を行った。蛍光異方性の強さを検討した結果、Lamin A は5つ、Lamin B1 は2つの成功例を得ることができた。

(3) Constrained tagging により作製した Lamin A-EGFP と Lamin B1-EGFP を、トランスフェクションにより培養細胞に導入して観察したが、発現量が高くなりすぎ、EGFP 一分子観察を行うことが出来なかった。そのため、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法により、ヒト培養細胞の内在性ラミン遺伝子のプロモーターから発現させることを試みた。Lamin A-EGFP もしくは Lamin B1-EGFP の cDNA の下流に薬剤耐性遺伝子発現カセットを IRES で繋いで配置し、それらを Lamin A もしくは Lamin B1 のゲノム上の相同領域で挟み、homologous recombination 用の構築を作製した。この構築を、Cas9 と gRNA を発現するベクターと共に細胞に導入し、ゲノム上の Lamin A 遺伝子もしくは Lamin B1 遺伝子と置き換えることに成功した。ゲノム切断は特異性を上げるため、double nickase 法を用いた。

(4) HEK293 細胞を親株として作製した安定発現株は、観察系との相性が悪く、満足するデータを得るに至らなかった。そのため、HeLa 細胞を親株として、改めて安定発現株を作製した。Lamin A-EGFP については、多くの安定発現株を得ることができ、現在解析に適した株を選択しているところである。Lamin B1-EGFP は、CRISPR/Cas9 法の切断ターゲット配列を変更したため、現在そのためのコンストラクトを作製しているところである。解析な株が揃い次第、蛍光偏光顕微鏡観察を行う予定である。

(5) ラミンの重合機構解析のためには、細胞分裂時に核膜が再形成する際のラミンを一分子レベルで観察する必要がある。我々の一分子蛍光観察は、全反射照明蛍光 (TIRF) 顕微鏡によるが、TIRF は、カバーガラス面から百ナノメートル程度の非常に狭い領域を照明することで高感度・低バックグラウンド観察を可能にする技術である。しかし、HeLa 細胞は、有糸分裂に入ると丸くなり、核膜再形成が起こる場所がカバーガラス面から遠ざかってしまうため、TIRF 顕微鏡で観察できないことが判明した。この問題を解決するため、空間的制約を加えて HeLa 細胞を分裂させることを試みた。その結果、適切な厚さ・硬さのアガロースゲルに乗せた状態で分裂させ

ることで、核膜再形成の起こる場所がカバーガラスに近づき、TIRF で照明できるようになった。今後、この方法を用いて、生細胞でラミンが重合する過程を一分子蛍光偏光観察していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(1) Peristera Roboti\*, Keisuke Sato\*, Martin Lowe (\*equally contributed) **The golgin GMAP-210 is required for efficient membrane trafficking in the early secretory pathway** *Journal of Cell Science*, 128, 2015, 1595-1606 査読有り

doi: 10.1242/jcs.166710

(2) Keisuke Sato, Peristera Roboti, Alexander A. Mironov, and Martin Lowe **Coupling of vesicle tethering and Rab binding is required for in vivo functionality of the golgin GMAP-210** *Molecular Biology of the Cell*, 26, 2015, 537-553 doi: 10.1091/mbc.E14-10-1450 査読有り

(3) Keisuke Sato, Martin Lowe **Golgi Apparatus** *Molecular Life Sciences* 2014 doi: 10.1007/978-1-4614-6436-5\_189-2 査読有り

(4) 佐藤 啓介, 寺田 純雄 **微小管**, *脳科学辞典* 2014 doi: 10.14931/bsd.4389 査読有り

(5) 佐藤 啓介, 寺田 純雄 **MAP2**, *脳科学辞典* 2014 doi: 10.14931/bsd.4347 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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://www.tmd.ac.jp/cgi-bin/nana/index.cgi/>

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 啓介 (SATO, Keisuke)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：60644044

(2)研究分担者

寺田 純雄 (TERADA, Sumio)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：00262022

川岸 将彦 (KAWAGISHI, Masahiko)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：60323606

齋藤 健太 (SAITO, Kenta)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：60374659

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

谷 知己 (TANI, Tomomi)  
米国ウッズホール海洋学研究所・研究員