

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06238

研究課題名(和文) 生細胞内導入ビーズを用いた構成的アプローチによる核膜形成機構の解析

研究課題名(英文) Dissection of nuclear envelope assembly by constitutive approach using artificial beads in living cells

研究代表者

小林 昇平 (Kobayashi, Shouhei)

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・研究マネージャー

研究者番号：40425765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト体細胞における核膜形成機構の理解を目指すものである。このため、生細胞内に導入した生体分子結合ビーズを用いて、その周囲に核膜孔複合体(NPC)を有する核膜様構造を形成させる条件の探索を行った。免疫染色法及びLive-CLEM法による解析の結果、importin-beta等を結合させたビーズの周囲にNPCの構成因子を含む膜構造が形成されていることを見出した。一方、BAF結合ビーズの場合には、LEMドメイン核膜タンパクは見られたものの、NPCは見られなかった。以上の結果は、核膜形成において、NPCとLEMドメイン核膜タンパク質が互いに独立した経路で集積することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来までカエル卵抽出液を用いた方法でしか実現困難であった核膜孔を有する核膜構造の人工形成を、生きたままのヒト培養細胞の中で実現した。このことは、より生細胞内環境に近い条件下での核膜形成機構の解析を可能とするため、細胞核研究分野の進展に大きく貢献すると思われる。また、本研究結果は、核膜形成以外の細胞内現象の構成的アプローチでの解析技術としての発展も期待されるため、多くの研究分野に大きなインパクトを与え得るものと考えている。

研究成果の概要(英文)：This research aims to elucidate the mechanism of nuclear envelope formation in human somatic cells. To this end, we developed an experimental system in which nuclear membrane-like structures with nuclear pore complexes (NPC) can be assembled around a biomolecule-coated bead in a living cell. Immunofluorescence staining and live correlative light-electron microscopy (Live-CLEM) revealed that the beads coated with effector molecules, such as importin-beta, efficiently assembled NE-like structures with several components of NPC. In contrast, the beads coated with barrier-to-autointegration factor (BAF), a factor to assemble the LEM domain NE proteins, also efficiently assembled the NE-like structures containing emerin, but not the NPC components. These results suggest that assembly of the NPC is a mutually independent process with that of the LEM domain proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核膜 核膜形成 人工ビーズ 核膜孔複合体 importin-beta BAF Live-CLEM

1. 研究開始当初の背景

高等真核生物の核膜は、細胞分裂期になるといったん消滅し、染色体の分離後、染色体周囲に再形成される。この核膜再形成は、染色体分離の開始から数分以内に、多くの因子が秩序立って染色体周辺に集積することで実現される。このように素早く進行する核膜形成過程を詳細に解析する手法として、これまでカエル卵抽出液を使った *in vitro* 再形成系が用いられてきた。しかし、カエルとヒトでは核膜構成因子の組成が異なり、また、通常/body細胞千個分に相当するとも言われる豊富な栄養素を有する卵細胞から作製した抽出液が、体細胞という資源的・空間的に限定された環境で起こる現象を反映しているとは到底考えられない。そのため、ヒト体細胞の核膜形成を構成的に解析できる手法の確立が熱望されていた。

研究代表者はこれまでの研究で、既知成分から成る人工ビーズを細胞内に導入し、その周囲で進行する現象を直接可視化できる実験系（人工ビーズ実験法）の開発を進めてきた(図参照)。この実験系では、望みの生体分子を結合させたポリスチレンビーズ（直径 $\sim 3 \mu\text{m}$ ）を、トランスフェクション試薬を用いて生細胞に導入し、ビーズ周囲で様々な現象を誘導して、その過程を追跡できる。これにより、細胞が持つ分解機構であるオートファジーを、富栄養条件下で、かつ、ビーズ周囲に限定して誘導できることを明らかにした（Kobayashi, S., et al. (2010) *Autophagy* 6, 36-45.）。また、H25-26年度に科研費（挑戦的萌芽）を受けて実施した研究では、生細胞内という *in vivo* 環境中に、人工細胞核という *in vitro* 反応場を造り出すというチャレンジングな課題に着手した。二本鎖DNAを結合させたビーズ（DNAビーズ）を細胞に導入し、ビーズ周囲で起こる現象を顕微鏡法によって解析したところ、DNAビーズはオートファジーを回避しており、ビーズの周囲には核膜に似た形態の膜構造が形成されていることを見出した（Kobayashi, S., et al. (2015) *PNAS* 112, 7027-7032.）。これらの背景から、生細胞内に導入する人工ビーズの表面に結合させる生体分子を適切に選ぶことで、ビーズをオートファジーから回避させつつ、ビーズ周囲に機能的な核膜構造の形成を誘導できるのではないかと考えた。

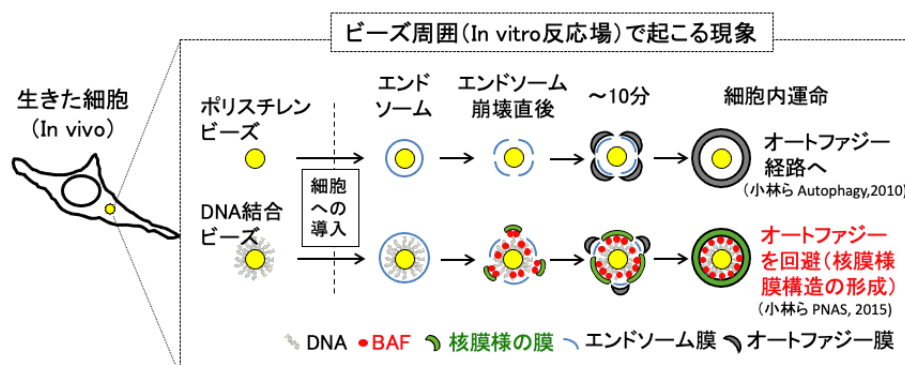


図. 生細胞内導入ビーズを用いた実験系及びこれまでの主な成果

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者がこれまでに開発してきた人工ビーズ実験法を利用した構成的アプローチによって、ビーズ周囲に核膜孔複合体を有する機能的な核膜を形成させる条件を探索し、核膜形成機構の一旦を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の申請に先立って行った予備実験の結果から、HeLa 細胞に導入した DNA ビーズの周囲

に形成される核膜様の膜構造には、核膜孔複合体 (NPC) が見られないことが分かった。そこで本研究では、まず、ビーズ周囲に NPC を含む核膜様構造の形成を誘導できる生体分子を探索した。候補因子として、カエル卵抽出液を用いた実験系で核膜形成へ関与することが知られていた RanGTPase 及びその機能変異体や importin-beta のほか、近年、様々な研究から NPC アセンブリの初期過程に関わると予想されていたヌクレオポリン等を選んで研究を進めた。具体的には、まず、候補因子と GFP との融合タンパク質を安定発現する HeLa 細胞株を作製し、そこに抗 GFP 抗体結合ビーズを導入することで、目的の生体分子結合ビーズを細胞質内で作製した。次に、導入処理後の各時間帯において、ビーズ周囲での核膜形成の成否を生細胞蛍光-電子相関顕微鏡法 (Live CLEM 法) による形態観察及び免疫染色法による NPC の構成成分 (ヌクレオポリン) の局在の有無によって判定した。さらに、NPC 陽性の膜構造が観察されたものについては、核移行シグナル配列を付与した蛍光タンパク質を利用した選択的物質輸送能の検証等の方法によって、主核の核膜と同等の機能を有するかどうかを調べた。

4. 研究成果

生細胞導入ビーズの周囲における核膜孔複合体を有する核膜様構造の形成誘導

ビーズ周囲での核膜形成に必要な因子の探索として、まず、ヌクレオポリン等の核膜孔関連因子について、GFP との融合タンパク質をコードする DNA コンストラクトを設計・作製し、それを HeLa 細胞に導入して安定発現株の作製を行った。具体的には、GFP-Nup133 及び GFP-Nup153 等を安定発現する HeLa 細胞を作製し、当該タンパク質の全長が発現していることを、それぞれのタンパク質に対する特異的抗体を利用したウェスタンブロッティングによって確認した。得られた細胞株、及び、予備実験で取得していた GFP-BAF 発現株 (BAF : barrier-to-autointegration factor)、GFP-importin-beta 発現株等に対して、抗 GFP 抗体結合ビーズを導入して細胞内で目的タンパク質結合ビーズを構築し、細胞分裂期を経たビーズの周囲に形成される膜構造について、核膜関連因子に対する抗体 (mAb414) を用いた免疫染色、及び、生細胞蛍光-電子相関顕微鏡法 (Live CLEM 法) を用いた膜構造の観察 (膜長の計測等) を行なった。その結果、BAF 結合ビーズの周囲には、NPC を持たないものの emerin などの核膜タンパクを有する核膜様構造が形成されるのに対し、importin-beta や Ran 変異体 (Q69L) を結合させたビーズの周囲には、NPC を含む連続した膜構造が形成されることが分かった。また、NPC の構成因子そのもの (Nup153、Nup133) を結合させたビーズの場合にも、集積する因子の種類や膜の連続性等に差はあるものの、ビーズ周囲に NPC を持つ核膜様構造が形成されることを見出した (Bilir, S., et al. (2019) *Genes Cells* 24, 338-353.)。以上の結果から、ヒト体細胞に導入した人工ビーズの周囲における核膜様構造の形成には、NPC を伴う膜構造形成と、NPC を伴わない膜構造形成の、少なくとも二種類の膜形成過程が存在しており、人工ビーズ実験法を用いた実験手法を用いることで、特定の膜形成反応のみを誘導して、その過程を詳細に解析できることが分かった。

形成された核膜様構造の機能評価

上述の実験で、ビーズ周囲に NPC を含む核膜様構造の形成が見られたサンプルのうち、ビーズ周囲全体を覆うように膜構造が観察された GFP-importin-beta 結合ビーズについて、核膜様構造の機能評価を行った。具体的には、GFP-importin-beta 結合ビーズを保持する細胞に対して、ビーズ導入処理から 24 h の時点で、SV40 large T 抗原型の核移行シグナル配列を付与した赤色蛍光標識タンパク質 (NLS タンパク) をマイクロインジェクションし、ビーズ表面に蛍光シグナルが集積するかどうかを調べた。その結果、GFP-importin-beta 結合ビーズでは高頻度でビーズ

表面へのシグナルの集積が見られたのに対し、Ran 変異体を結合させたビーズでは、NLS タンパクの集積は見られなかった。一方、SV40 型 NLS タンパクとは異なる核移行シグナル配列 (M9 配列) を持つタンパク質は、GFP-importin-beta ビーズ周囲に集積しなかった。これらのことから、GFP-importin-beta 結合ビーズの周囲に形成された核膜様構造は、形態的特徴や一部の NLS タンパクの集積などの面で主核の核膜に類似した部分はあるものの、機能的には同一ではないことが明らかとなった。

以上のように、本研究によって、ヒト培養細胞に導入した生体分子結合ビーズの周囲に核膜孔複合体を有する核膜様構造を形成させる条件を見出し、それを利用して、核膜形成反応の一部をダイセクトすることができた。今後、ビーズに結合させる分子の種類や量などを制御する技術を高度化していくことで、より機能的な核膜の人為形成技術を開発し、核膜形成機構の解明に貢献していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuka Suzuki, Sukriye Bilir, Yu Hatano, Tatsuhito Fukuda, Daisuke Mashiko, Shouhei Kobayashi, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi, Kazuo Yamagata	4. 巻 9
2. 論文標題 Nuclear formation induced by DNA-conjugated beads in living fertilised mouse egg.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44941-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 小林 昇平	4. 巻 65
2. 論文標題 生細胞内環境における特定分子の機能解析を実現する人工ビーズ実験法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 32-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sukriye Bilir, Tomoko Kojidani, Chie Mori, Hiroko Osakada, Shouhei Kobayashi, Takako Koujin, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi	4. 巻 24
2. 論文標題 Roles of Nup133, Nup153, and membrane fenestrations in assembly of the nuclear pore complex at the end of mitosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 338-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原口 徳子、小林 昇平、ピリル スクリエ、荒神 尚子、小坂田 裕子、森 知栄、平岡 泰
2. 発表標題 生きた細胞内で人工ビーズ依存的に構築される核膜構造
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 昇平、荒神 尚子、糀谷 知子、小坂田 裕子、森 知栄、氏家 加洋子、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 外来DNAビーズ周辺における核膜様構造体形成の意義
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 龍人、鈴木 由華、Bilir Sukriye、波多野 裕、増子 大輔、小林 昇平、平岡 泰、原口 徳子、山縣 一夫
2. 発表標題 転写能を持つ人工細胞核の作製
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tokuko Haraguchi, Shouhei Kobayashi, Sukriye Bilir, Takako Koujin, Hiroko Osakada, Chie Mori, Yasushi Hiraoka
2. 発表標題 Artificial nuclei induced by beads introduced into human cells
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 英知、土屋 恵、渡邊 賢人、荒神 尚子、小林 昇平、森 知栄、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 選択的オートファジー機構を介した細胞自己防衛機構の解明
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 昇平、荒神 尚子、糀谷 知子、小坂田 裕子、森 知栄、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 生細胞内導入ビーズを用いた生体膜構造の形成制御
3. 学会等名 第11回光塾
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 昇平、荒神 尚子、糀谷 知子、小坂田 裕子、森 知栄、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 生細胞内導入ビーズを使って望みの生体膜構造を創る
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 昇平
2. 発表標題 生体-非生体ハイブリッド素子を用いた細胞活動の理解と人為制御
3. 学会等名 未来ICTシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 昇平
2. 発表標題 医薬品開発等に役立つ特定分子の生細胞内での機能解析法
3. 学会等名 JST新技術説明会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 昇平、荒神 尚子、糀谷 知子、小坂田 裕子、森 知栄、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 生細胞導入DNA ピーズの周囲に形成される核膜様構造体の分裂期における挙動
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sukriye Bilir, Hiroko Osakada, Chie Mori, Shouhei Kobayashi, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi
2. 発表標題 Roles of Nup133, Nup153, and membrane fenestrations in assembly of the nuclear pore complex at the end of mitosis.
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口 徳子、荒神 尚子、小坂田 裕子、森 知栄、小林 昇平、有吉 哲郎、岡田 康志、平岡 泰
2. 発表標題 トランスフェクションで導入された外来DNA の細胞内動態
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口徳子、荒神尚子、小坂田裕子、森知栄、小林昇平、有吉哲郎、岡田泰志、平岡泰.
2. 発表標題 トランスフェクションで導入された外来DNAの細胞内動態
3. 学会等名 第 36 回 染色体ワークショップ、第 17 回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 菜穂子、福田 龍人、小林 昇平、細井 美彦、原口 徳子、山縣 一夫
2. 発表標題 DNAビーズを用いた未受精卵内でのキネトコアの再構成
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 由華、Sukriye Bilir、小坂田 裕子、小林 昇平、平岡 泰、原口 徳子、山縣 一夫
2. 発表標題 DNAビーズを用いたマウス受精卵での核構築
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 昇平、荒神 尚子、糺谷 知子、小坂田 裕子、森 知栄、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 生細胞内導入ビーズを用いた構成的アプローチによる核膜形成機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土屋 恵、小川 英知、渡邊 賢人、荒神 尚子、小林 昇平、森 知栄、小坂田 裕子、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 オートファジーレセプターp62/SQSTM1 を標的とした効果的な遺伝子導入法の確立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小栗 未生奈、半田 哲也、鈴木 由華、波多野 裕、野老 美紀子、八尾 竜馬、小林 昇平、細井 美彦、野崎 直仁、原口 徳子、木村 宏、山縣 一夫
2. 発表標題 ライブセルイメージングを用いたマウス受精卵におけるDNA損傷の可視化及び定量化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sukriye Bilir、小林 昇平、荒神 尚子、森 知栄、小坂田 裕子、Tomoko Kojidani、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 A role of Nup133 and Nup153 on the post-mitotic nuclear pore complex formation.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 昇平、荒神 尚子、糀谷 知子、小坂田 裕子、森 知栄、平岡 泰、原口 徳子
2. 発表標題 生細胞内導入ビーズを足場とする核膜再構成系の構築
3. 学会等名 細胞を創る研究会11.0
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林昇平、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、森 知栄、平岡 泰、原口徳子
2. 発表標題 Bead-induced nuclear envelope assembly in the living cell.
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposia 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林昇平、荒神尚子、梶谷知子、小坂田裕子、森 知栄、平岡 泰、原口徳子
2. 発表標題 Assembly of nuclear envelope-like structures around artificial beads in living cells
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------