

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06632

研究課題名(和文)二核性生物テトラヒメナにおける核膜孔構造の多様性

研究課題名(英文) Diversity of nuclear pore structure in the binucleate ciliate Tetrahymena

研究代表者

岩本 政明 (IWAMOTO, Masaaki)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：80450683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：テトラヒメナは、同じ細胞内に大核と小核という2種類の機能の異なる核をもつ二核性生物である。これまでに、大核と小核の核膜孔複合体を構成する核膜孔タンパク質は一部が異なっているが、大部分は両核に共通する成分であることが知られていた。しかしながら、それらの共通成分が構築する核膜孔複合体の構造領域は大核と小核で同じ形状なのか、あるいは異なっているのかは不明であった。本研究では、両核共通の核膜孔タンパク質の核膜孔複合体内における配置を免疫電子顕微鏡法によって調べた。その結果、大核と小核の核膜孔複合体では、同じ組み合わせの核膜孔タンパク質によって大きく異なる形状の構造領域が形づくられていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核膜孔複合体に関するこれまでの研究の多くは、オピストコンタに属する出芽酵母や哺乳類細胞を用いて行われてきたことから、核膜孔複合体の構造と機能は単細胞生物から高等動物まで広く保存されたものと認識されている。しかしながら、アルベオラータに属するテトラヒメナの大核の核膜孔複合体は、まったく新奇の構造を呈するものだった。この知見は、核膜孔複合体は考えられていた以上にバリエーションに富んだ構造体であることを示唆しており、テトラヒメナの核膜孔複合体の多様な構造と、大核および小核に特有の核機能との関連性を調べることによって、今後、核膜孔複合体の未知の機能が明らかになっていくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The ciliate Tetrahymena is a binucleate organism that has two types of nuclei with different functions, the macronucleus (MAC) and the micronucleus (MIC), within the same cell. It was known that the nuclear pore complexes (NPCs) of the MAC and MIC are composed of partly different but mostly common nuclear pore proteins. However, it was unclear whether the core scaffolds of the NPCs formed by these common components were the same shape or different between MAC and MIC. In this study, the arrangement of the common nuclear pore proteins within the NPC was examined by immunoelectron microscopy. It was found that the same set of nuclear pore proteins form core scaffolds with largely different shapes in the NPCs of MAC and MIC.

研究分野：細胞生物学、分子生物学、原生生物学

キーワード：核膜孔複合体 ヌクレオポリン 免疫電子顕微鏡法 核分化 テトラヒメナ 繊毛虫

## 1. 研究開始当初の背景

核膜孔複合体 (Nuclear Pore Complex; NPC) は、すべての真核生物の核膜に存在し、核と細胞質間における物質輸送の通路である核膜孔を形成する巨大なタンパク質構造物である。NPC は、30 種類程度の核膜孔タンパク質 (ヌクレオポリン) によって構築されており、構造的にいくつかの領域に区分することができる (図 1)。NPC のメインボディは、inner ring 構造と、それを挟むように存在する二つの outer ring 構造から形成され、細胞質側と核内側で上下対称の構造となっている。細胞質側の outer ring には細胞質線維が、核内側の outer ring には核内バスケットがそれぞれ付属しており、それらが NPC の核内外における構造的な非対称性を作り出している。また、核膜孔を通過する輸送物質との相互作用に必要なフェニルアラニン (F)-グリシン (G) の繰り返し配列から成る非構造領域を持った FG ヌクレオポリンがメインボディ内側に配列し、それらの非構造領域が孔内を満たしている。このような NPC の基本構造は進化的に広く保存されたものであると考えられている。

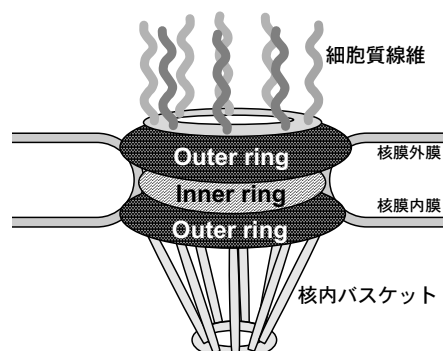


図 1. 核膜孔複合体の模式図

単細胞性の真核生物である繊毛虫類は、一つの細胞内に形態と機能の異なる大核と小核という 2 種類の核をもつ二核性生物である (図 2)。大小核の NPC の構造を理解することを目指して、繊毛虫の一種であるテトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) においてヌクレオポリンの網羅的な探索が行われた (Iwamoto et al., 2009; 2017)。見出された 28 種類のヌクレオポリンのうち、Nup98, Nup214, Nup153 といった主要な FG ヌクレオポリンには、大核と小核のそれぞれに特異的に局在する機能的パラログが存在した。しかしながら、その他の FG ヌクレオポリンと全ての構造的ヌクレオポリンにはパラログは存在せず、大核と小核のどちらの NPC にも局在する両核共通成分であった。これらの両核共通のヌクレオポリンを緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) で標識して細胞内に発現させると、inner ring の構成成分では大核核膜と小核核膜の GFP の蛍光強度に有意差はなかったが、outer ring の構成成分では小核核膜の蛍光強度が大核核膜より 3-4 倍も大きかった (Iwamoto et al., 2017)。核膜単位面積当たりの NPC の個数は大小核ではほぼ同程度であるため (Iwamoto et al., 2015)、大小核間に見られる outer ring 構成成分の蛍光強度の違いは、1 個の NPC に含まれる outer ring の数が異なっていることによるものと考えられる。1 個の NPC に含まれる outer ring の数は生物種によって異なることが知られており、出芽酵母では細胞質側と核内側にそれぞれ 1 リングずつであるのに対し、ヒトではそれぞれ 2 リングずつ存在する (Holzer and Antonin, 2019)。テトラヒメナでは、同じセットのヌクレオポリンを使って、同一生物種、同一細胞内に outer ring の数が異なる 2 種類の NPC を構築している可能性がある。

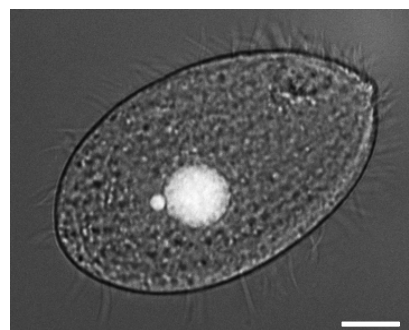


図 2. DNA を蛍光染色したテトラヒメナ大核と、その左側に寄り添う小核が見られる。バーは 10  $\mu\text{m}$ 。

## 2. 研究の目的

テトラヒメナの大核と小核の NPC は、同じセットの構造的ヌクレオポリンによってメインボディが構築されているが、両者は構造的に異なっていることを示唆する結果がこれまでの研究で得られている。そこで本研究では、2 種類の NPC の構築様式を解析することで、両者の違いおよび、それらと他生物の既知の NPC との違いを明らかにする。得られる研究結果から、真核生物の進化の中で NPC が取り得る構造的バリエーションと、それらの機能的な意味について理解することを目指す。

繊毛虫は、アルベオラータと呼ばれる分類群に属しており、これまでに NPC に関する多くの研究が行われてきた出芽酵母やヒトが属する分類群のオピストコンタとは進化的に大きく離れた生物である。したがって、テトラヒメナの NPC に関する知見は、より広い真核生物における NPC の構造的な共通性と多様性を理解することに役立つと考えられる。オピストコンタとの比較によって顕在化される、構造的に変えることができない真の共通領域は NPC の普遍的な機能に関与し、変えることができる多様化した領域は分類系統あるいは生物種ごとに特殊化した機能に関与する可能性が高い。このように NPC 構造の共通性と多様性の両方を検討できるのは、メジャ

一なモデル生物と進化的に隔たりのある生物を用いる研究の大きな利点といえる。また、テトラヒメナなどの繊毛虫類は、機能の異なる二種類の核を持っているため、これらの核を比較することで核の機能と NPC の構造との関係を同一生物種内、同一細胞内において直接比較して調べることができる、核と NPC の研究における優れたモデル生物である。このように、NPC の研究に二核性細胞であるテトラヒメナを用いること、さらには、これまでのモデル生物との共通性を追求することを主たる目的とはせず、共通性からの逸脱と進化的なバリエーションの理解を目指すことが、これまでの研究とは一線を画す本研究の特色である。

### 3. 研究の方法

テトラヒメナの NPC の inner ring および outer ring がどのようなヌクレオポリンで構築されており、それらが大小核間で、あるいは他種の NPC との間でどのように異なっているのかを明らかにするため、各種ヌクレオポリンの NPC 内部における配置を免疫電子顕微鏡法 (immunoelectron microscopy; iEM) によって調べた。

他の生物における先行研究から inner ring と outer ring の構築に関わると予想されるテトラヒメナのヌクレオポリン Nup308、Nup155、Nup93 (以上 inner ring の構成成分)、Nup160、Nup133、Nup107、Nup96、Nup85、Seh1、Sec13 (以上 outer ring の構成成分) について、GFP 標識したそれぞれのヌクレオポリンを発現する細胞株を作製した。これらの細胞に対し、抗 GFP ウサギポリクローナル抗体を一次抗体、金コロイドならびに Alexa594 結合抗ウサギ IgG ヤギ抗体を二次抗体とする免疫染色を行い、Alexa594 を指標とする蛍光観察で免疫染色の成否を判別した。次に、サンプルを樹脂包埋して薄切し、金コロイドを銀増感した後、電子顕微鏡観察を行った。しかしながら、ヌクレオポリンの種類によって免疫染色の効率が大きく異なり、ある種のヌクレオポリンでは通常の工程の免疫染色では Alexa594 の蛍光を全く検出できなかったため、これらについては、細胞をホルムアルデヒドで化学固定した後、抗体処理を行う前に、トリプシンを用いた抗原賦活化処理を行った。

### 4. 研究成果

(1) GFP 融合したテトラヒメナのヌクレオポリンに対する iEM 用の免疫染色の実施条件について検討を行った。ホルムアルデヒド固定し、TritonX-100 で抽出するという一般的な工程で免疫染色を行った場合、ヌクレオポリンの種類によって染色効率が大きく異なった。特に、outer ring の構成成分である Nup107 と Nup85 については GFP の蛍光が存在する部分に Alexa594 の蛍光を全く検出できなかった。このように染色できない、あるいは染色度合いが不十分だったものについては、固定と抽出を行った後、一次抗体処理を行う前にトリプシンによる抗原賦活化の工程を追加した。その結果、劇的な染色効率の改善が見られ、Nup107 については、賦活化せずに十分な染色結果が得られた他のヌクレオポリンと同程度の蛍光強度の染色像を得ることができた。Nup85 については賦活化によって染色されるようにはなかったが、他のヌクレオポリンと比較して十分な蛍光強度の染色像を得るまでには至らなかった。しかしながら、Nup85 を含むすべてのヌクレオポリンで、GFP の蛍光分布と一致する Alexa594 の蛍光像を得ることができたため、今回ターゲットとする全てのヌクレオポリンに対して免疫染色の実施条件が定まったと判断することができた。

(2) Inner ring を構成する Nup155 と Nup93、outer ring を構成する Nup160、Nup133、Nup107、Nup96、Nup85、Seh1 について電子顕微鏡観察を行った。Nup155 と Nup93 はともに、金コロイドのシグナルが両核の NPC において細胞質側 (上側) と核内側 (下側) に同程度検出された。シグナル出現のピークは NPC 中央からやや上側と下側に離れて二つ見られたことから、inner ring は両核の NPC においておそらく 2 リングが上下に対称的に配置していると考えられた。ところが、outer ring の構成成分である Nup160、Nup133、Nup107、Nup96、Nup85、Seh1 はいずれも、小核の NPC では細胞質側と核内側の両側にシグナルが検出されたが、大核の NPC では核内側にしか検出されなかった (図 3)。したがって、小核の NPC は outer ring が上下に対称的に配置する典型的な構造である一方、大核の NPC は細胞質側に outer ring を欠くという非常に特殊な構造を呈していると考えられた。当初の研究実施計画では、NPC のメインボディを構築する 10 種類のヌクレオポリンについて免疫電子顕微鏡観察を行うとしていた。そのうちの 8 種類については、今回データを得ることができたが、残りの 2 種類 (Nup308、Sec13) については電子顕微鏡観察を実施したものの、NPC 上に十分な金コロイドのシグナルを検出することができなかった。しかしながら、観察に成功した 8 種類のヌクレオポリンのデータは、大核と小核の NPC のメインボディ構造に明確な違いが存在することを示すには十分なものであった。

(3) テトラヒメナがもつ構造的なヌクレオポリンのうち、Nup185 については他の生物に相同な成分が見出せないため、テトラヒメナに特異的なヌクレオポリンであると考えられる。GFP 標識した

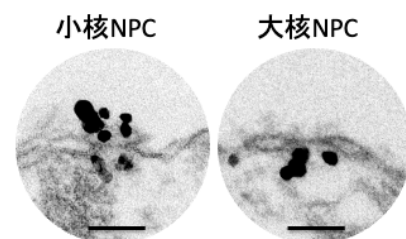


図 3. GFP-Nup160 の iEM 像  
両パネルとも中央に NPC を捉えており、上側が細胞質、下側が核内。バーは 100 nm。

Nup185 は大核と小核の両方に局在するが、GFP の蛍光量は圧倒的に大核の方が多いため、大核の NPC により多く分布していると考えられる。しかしながら Nup185 はテトラヒメナ特異的であるため、NPC 内のどの領域に配置しているのか他の生物の知見から予想することができなかった。そこで、GFP-Nup185 の細胞内局在を免疫電子顕微鏡法で調べたところ、大核の NPC では、Nup185 は outer ring の構成成分が存在しない細胞質側領域に配置しており、核内側には全く分布していなかった。Nup185 が小核に比して大核に大量に、しかも大核 NPC の細胞質側だけに分布していることは、Nup185 が一般的な outer ring の構成成分に替わって、大核 NPC の細胞質側領域の構造を形づくる主要成分であることを示唆している。本研究から、大核と小核の NPC は細胞質側の構造が決定的に異なっていること、また、両者の構造を他のモデル生物の NPC と比較した場合、より普遍的であるのは小核 NPC であり、大核 NPC は細胞質側の outer ring を欠くというこれまで知られていないユニークな構造のメインボディをもつ特殊な形状の NPC であることが明らかになった。テトラヒメナの大核 NPC のような構造をもつ NPC はこれまでまったく報告例がなく、テトラヒメナは NPC の構造的多様性を理解するための絶好の研究機会を提供してくれる生物であるといえる。テトラヒメナが属するアルベオラータ生物群、さらにその上界の SAR 生物群においても、これまで NPC の構造に関する研究は行われていないため、これらの生物群における NPC 構造の知見は皆無に等しかった。したがって、本研究の成果は、全真核生物における NPC 構造の真の共通性ならびに多様性の理解に大きく貢献するものである。

#### <引用文献>

- Guillaume Holzer, Wolfram Antonin, Breaking the Y, PLOS Genetics, Vol.15, 2019, e1008109.
- Masaaki Iwamoto, Takako Koujin, Hiroko Osakada, Chie Mori, Tomoko Kojidani, Atsushi Matsuda, Haruhiko Asakawa, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi, Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in *Tetrahymena*, Journal of Cell Science, Vol.128, 2015, 1812-1823.
- Masaaki Iwamoto, Chie Mori, Tomoko Kojidani, Fumihide Bunai, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi, Two distinct repeat sequences of Nup98 nucleoporins characterize dual nuclei in the binucleated ciliate *Tetrahymena*, Current Biology, Vol.19, 2009, 843-847.
- Masaaki Iwamoto, Hiroko Osakada, Chie Mori, Yasuhiro Fukuda, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi, Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in the ciliate *Tetrahymena*, Journal of Cell Science, Vol.130, 2017, 1822-1834.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tokuko Haraguchi, Hiroko Osakada, Masaaki Iwamoto	4. 巻 2502
2. 論文標題 Live CLEM imaging of Tetrahymena to analyze the dynamic behavior of the nuclear pore complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 473-492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2337-4_30	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6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takaharu Yamamoto, Noriko Fukuta, Masaaki Iwamoto, Atsushi Matsuda
2. 発表標題 Basal bodies in the anterior region of the Tetrahymena cell are binding sites for nucleoporin MicNup98A
3. 学会等名 2021 Ciliate Molecular Biology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本孝治, 福田紀子, 近重裕次, 岩本政明, 松田厚志
2. 発表標題 細胞の前端部に局在する繊毛虫テトラヒメナのヌクレオポリンMicNup98A
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本孝治, 福田紀子, 岩本政明, 松田厚志
2. 発表標題 細胞の前端部に局在する繊毛虫テトラヒメナのタンパク質
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本政明, 小坂田裕子, 平岡泰, 原口徳子
2. 発表標題 The nuclear pore complexes of ciliates' dimorphic nuclei: different structures composed of the same components
3. 学会等名 日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 明松隆彦, 福田康弘, 岩本政明
2. 発表標題 繊毛虫テトラヒメナの配偶核形成におけるSemi1とSemi2タンパク質の協調作用
3. 学会等名 日本原生生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaaki Iwamoto
2. 発表標題 Nuclear pore complexes of dimorphic nuclei: Their distinct structures related to nuclear differentiation
3. 学会等名 2023 Ciliate Molecular Biology Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学文理学部生命科学科原生生物学研究室  
<https://dept.chs.nihon-u.ac.jp/biosciences/staff/iwamoto/>

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
研究協力者	松田 厚志  (MATSUDA Atsushi)		
研究協力者	福田 紀子  (FUKUTA Noriko)		

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