

機関番号：82636

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770224

研究課題名 (和文) 繊毛虫の核分化過程におけるヌクレオポリン Nup98 の役割

研究課題名 (英文) Role of nucleoporin Nup98 in the nuclear differentiation process of ciliated protozoa

研究代表者

岩本 政明 (IWAMOTO MASAOKI)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究センターバイオ ICT グループ・専攻研究員

研究者番号：80450683

研究成果の概要 (和文)：繊毛虫テトラヒメナの大核と小核では、核膜孔成分の Nup98 が異なっている。本研究では、Nup98 の核分化過程における挙動と機能的役割について調べた。受精核由来の 4 つの未分化核のうち、大核に分化する 2 核には、直前の核分裂直後に大核タイプ Nup98 が出現し、そのタイミングは、ゲノム DNA の大核化に必要な核タンパク質が核輸送されるより～30 分も早かった。この結果は、大核特異的なヌクレオポリンあるいはそれを含む核膜孔複合体が、繊毛虫の核分化に重要な役割を果たすこと示している。

研究成果の概要 (英文)：The macronucleus (MAC) and the micronucleus (MIC) of ciliate *Tetrahymena thermophila* can be distinguished by nucleus-specific homologues of nucleoporin Nup98. In this study, we examined the dynamic behavior of the Nup98s during nuclear differentiation. We observed that MAC-type Nup98 started to assemble on the periphery of the future MACs immediately after the end of the last mitotic division of postzygotic nuclei. This timing was about 30 min earlier than the nuclear transport of factors required for MAC nuclear differentiation. These results suggest that placement of the MAC NPC containing MAC-type Nup98 is the first distinct event triggering further MAC differentiation, probably by leading to MAC-selective nuclear transport.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：(1)核膜孔複合体, (2)ヌクレオポリン, (3)核分化, (4)接合, (5)テトラヒメナ

1. 研究開始当初の背景

原生動物の繊毛虫類は、性質の異なる 2 種類の細胞核を持つ。一方はゲノム再編成を経て遺伝子のコピー数を増大させた「大核」で、細胞当たり 1 個存在し、他方は受精核由来の完全なゲノムをもつ「小核」で、

細胞当たり 1 個～数個 (種による) 存在する。両者は転写活性の有無、DNA 複製の時期、核分裂の様式とタイミングなどが異なっている。

代表者らは、2 核性生物が 2 つの細胞核を使い分ける仕組みの解明を目指して、テ

トラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) を研究対象として用い、核膜孔複合体 (NPC) を構成するヌクレオポリンの同定を行ってきた。多くのヌクレオポリンは両核に共通であったが、Nup98 に相当する成分は2核間で異なっていることをこれまでに明らかにしている。大核に局在する2種類の Nup98 (MacNup98A, MacNup98B) と小核に局在する2種類 (MicNup98A, MicNup98B) では、N 末側の FG リピート配列に大きな違いがあった。大核タイプ Nup98 は、他生物の Nup98 に見られる典型的な GLFG (Gly-Leu-Phe-Gly) リピートを有していたが、小核タイプ Nup98 では、新奇の NIFN (Asn-Ile-Phe-Asn) リピートを有していた。リピート配列を含む領域は、輸送因子であるインポーチン β との結合に重要な役割を果たすことが分かっているため、大核と小核では、異なる核輸送因子が働いていると推察される。

大核と小核は、接合、減数分裂、受精といった一連の生命活動の後に、ひとつの受精核から生じた4つの核が、それぞれ2つずつの大小核に分化することで生じる。未分化な核から新たな大核が分化する段階で起こるゲノム再編成に必要な様々なタンパク質因子は、新大核へ輸送され蓄積することが知られているが、これらの因子がなぜ新小核へは入らず新大核にだけ輸送されるのか、そのメカニズムは明らかになっていない。このような新大核への選択的な核輸送が、繊毛虫における核分化の分子基盤になっていると予想される。

2. 研究の目的

本研究は、トラヒメナの大核・小核に特異的に存在するヌクレオポリンが、核分化にどのような役割を果たすかを明らかにするものである。核輸送の構造基盤となる NPC に着目し、それを構成するヌクレオポリンの挙動を指標に、核膜孔の大核化・小核化が、いつ・どこで起こるかを生きた細胞で検討する。特に、大・小核で使い分けられている Nup98 については、その動態を詳細に解析して、核分化との関係を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

大小核に共通のヌクレオポリンや、大小核特異的な局在を示す4種類の Nup98、大核分化の指標となる Twilp に対して、GFP または mCherry を融合した融合タンパク質のそれぞれをトラヒメナで発現させ、核分化過程での局在変化を生きた細胞で time-lapse 観察する。さらに、FRAP 法を用いてそれらの分子動態を解析する。

4. 研究成果

長時間の生細胞観察を可能にする実験系の確立

核分化過程における核膜孔あるいはヌクレオポリンの挙動を解析するには、特定の接合細胞を生きたまま数時間に渡って観察することが必要である。トラヒメナは遊泳細胞であるため、そのような time-lapse 観察はこれまで困難であった。我々は、接合過程の進行を阻害しない条件を検討し、低融点アガロースに接合細胞を包埋することで、接合過程を長時間に渡って蛍光観察できるイメージング法を確立した。この方法を用いて、接合過程のほぼ全てのステージを time-lapse 観察することに成功している。

核分化過程における NPC と Nup98 の挙動

NPC の挙動を解析するために確立した time-lapse イメージング法を用い、はじめに、大核と小核に共通するヌクレオポリンとして Nup93 と Seh1 を観察した。これらのヌクレオポリンは、接合の全過程で大核・小核両方の NPC に局在した。受精後1回目の核分裂では、これらのヌクレオポリンは、2つの核に等しく分配されたが、受精後2回目の核分裂の直後あるいは途中で、細胞前側の核の蛍光が、後側の核より強くなることが分かった。この現象は、受精後2回目の分裂で、NPC が娘核に不均等に分配される可能性を示している。

次に、大小核特異的な局在を示す Nup98 の挙動を解析した。はじめに、2種類の小核 Nup98 (MicNup98A, MicNup98B) を観察したところ、これらの小核成分は、接合から減数分裂を経て、受精核に至る全過程で、小核に局在した。受精後2回目の核分裂では、両娘核へ均等に分配された。一方、2種類の大核 Nup98 は、受精後2回目の核分裂まで、小核には局在しないが、2回目の分裂が完了する頃から、前側の娘核に局在し始めた。この核は、この後、大核に分化することを生細胞観察により確認した。これらの結果は、未分化核に局在していた小核 Nup98 を含む既存の NPC は娘核間で均等に分配されるが、2回目の核分裂が完了する頃から前側の娘核に大核 Nup98 を含んだ新たな NPC が形成されることを示唆している。

共通成分が前側の娘核により多く局在する理由を知るために、両核共通の不動成分である Nup93 の FRAP 解析を、受精後2回目分裂後の核に対して行った。大核に分化することが知られている前側の核に対して、核全域の GFP-Nup93 をフォトブリーチすると、核分裂が完了してから約 10 分間では、比較的速やかに蛍光が回復したが、後側の核で同様のフォトブリーチを行っても蛍光

の回復は見られなかった。このことは、2回目の分裂後10分間に新たなNPCが予定大核の核膜には付加されるが、予定小核には付加されないことを示しており、time-lapse観察の結果を支持している。

予定大核における大核 NPC の出現と大核選択的輸送の関係

大核ゲノムの再編成に関与するタンパク質因子 Twi1p は、接合過程の大部分を親大核の内部に留まって過ごすが、未分化核の最終分裂の後、新大核へと移動する。この Twi1p の移動と、大核 Nup98 の出現の時間関係を time-lapse 観察で調べた。その結果、Twi1p-GFP が核間移動するのは、予定大核に大核 Nup98 が出現してから約30分後であることが分かった。したがって、Twi1p の輸送が行われる時には、既に大核 Nup98 を含む大核型 NPC が形成されていることになる。この結果から、大核 NPC の形成により、大核選択的な核輸送が機能した結果、Twi1 の核移行が起こり、大核化が促進したものと考えられた。

核容積の増大、ゲノムの不可逆的再編成、遺伝子コピー数の増加といった劇的な大核分化が起こるより先に、大核選択的輸送の必要条件である核膜孔の大核化が起こっていることが明らかになった。しかしながら今回、大核 Nup98 または大核型 NPC が、Twi1p などの大核選択的輸送に直接関与していることを示す証拠を得るには至らなかった。現在、引き続いて大核 Nup98 の RNAi、および大核 Nup98 特異的抗体のインジェクションによる機能阻害実験等を行っており、大核分化に対する大核選択的輸送系の直接的な関与を示す証拠を得たいと考えている。

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4件)

- ① Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T. and Hara-Nishimura, I. (2010) Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* (査読有), 22, 4084-4097.
- ② Iwamoto, M., Asakawa, H., Hiraoka, Y. and Haraguchi, T. (2010) Nucleoporin Nup98: a gatekeeper in the eukaryotic kingdoms. *Genes to Cells* (査読有), 15, 661-669.
- ③ Iwamoto, M., Mori, C., Kojidani, T., Bunai, F., Hori, T., Fukagawa, T., Hiraoka, Y. and

Haraguchi T. (2009) Two distinct repeat sequences of Nup98 nucleoporins characterize dual nuclei in the binucleated ciliate *Tetrahymena*. *Current Biology* (査読有), 19, 843-847.

- ④ 岩本政明, 原口徳子 (2009) 核膜バリアの意味: その破綻によってみえてきた核膜孔複合体の機能, 実験医学増刊号「細胞核: 遺伝情報制御と疾患」(査読無), 27, 79-86.

[学会発表] (計10件)

- ① 岩本政明, 森知栄, 平岡泰, 原口徳子, Nuclear transport machineries cooperatively working with the nucleus-specific nucleoporins in the bi-nucleated protozoan *Tetrahymena thermophila* –Implication of the nuclear transport system in evolution of eukaryotes–. The 20th CDB Meeting–Molecular Bases for Evolution of Complex Traits, 2011年2月24日, 理化学研究所(神戸市)
- ② 岩本政明, 武内史英, 荒神尚子, 小坂田裕子, 森知栄, 糀谷知子, 平岡泰, 原口徳子, Dynamics of the nuclear pore complexes and the nuclear envelope during nuclear differentiation in *Tetrahymena thermophila*. 遺伝情報場国際シンポジウム, 2011年1月25日, ウェスティン淡路(淡路市)
- ③ 岩本政明, 武内史英, 荒神尚子, 小坂田裕子, 森知栄, 糀谷知子, 平岡泰, 原口徳子, Dynamics of the nuclear pore complexes and the nuclear envelope upon nuclear differentiation in ciliate *Tetrahymena thermophila*. アメリカ細胞生物学会, 2010年12月13日, ペンシルベニアコンベンションセンター (Philadelphia, USA)
- ④ 岩本政明, 森知栄, 梶田浩孝, 小布施力史, 平岡泰, 原口徳子, Identification of micronucleus-specific nuclear localization signals in ciliate *Tetrahymena*. 日本分子生物学会, 2010年12月8日, 神戸国際会議場(神戸市)
- ⑤ 岩本政明, テトラヒメナの大核と小核の核膜孔複合体タンパク質の研究—繊毛虫が2核を使い分ける仕組みの解明に向けて— (招待講演), 日本原生動物学会, 2010年11月6日, 茨城大学(水戸市)
- ⑥ 岩本政明, 武内史英, 森知栄, 小坂田裕

子, 糀谷知子, 荒神尚子, 平岡泰, 原口徳子, Dynamics of nuclear envelope and nuclear pore complexes upon nuclear differentiation in ciliate *Tetrahymena thermophila*. 日本細胞生物学会, 2010年5月21日, 大阪国際会議場 (大阪市)

- ⑦ 岩本政明, 小坂田裕子, 森知栄, 榊田浩孝, 小布施力史, 平岡泰, 原口徳子, テトラヒメナの Nup98 リピート領域に結合する核輸送関連因子の探索. 日本分子生物学会, 2009年12月12日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑧ 岩本政明, 森知栄, 榊田浩孝, 小布施力史, 平岡泰, 原口徳子, テトラヒメナの核選択的ヌクレオポリン Nup98 は核輸送のバリアとして働く. 日本原生動物学会, 2009年11月1日, 石巻専修大学 (石巻市)
- ⑨ 岩本政明, 武内史英, 森知栄, 平岡泰, 原口徳子, Nup98 nucleoporins bearing different types of repeat sequence characterize nucleus-specific nuclear pore complexes in *Tetrahymena thermophila*. FASEB Summer Research Conferences (Ciliate Molecular Biology), 2009年7月24日, Vermont Academy (Vermont, USA)
- ⑩ 岩本政明, 森知栄, 武内史英, 平岡泰, 原口徳子, Nup98 nucleoporins bearing different types of repeat sequence are involved in the nucleus-selective transport in the ciliate *Tetrahymena*. 日本細胞生物学会, 2009年6月3日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計1件)

名称: 顕微鏡観察用サンプル作製方法, 及びそれに用いるキット

発明者: 武内史英, 岩本政明, 原口徳子, 平岡泰

権利者: 独立行政法人情報通信研究機構

種類: 特許

番号: 特開 2009-229339

取得年月日: 2009年10月8日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

報道発表

「テトラヒメナ2種類の核 細胞が判別、原理解明 情通機構 IT技術に応用」日

経産業新聞, 平成21年5月13日掲載

ホームページ等

[http://www-](http://www-karc.nict.go.jp/w131103/CellMagic/index-J.html)

[karc.nict.go.jp/w131103/CellMagic/index-J.html](http://www-karc.nict.go.jp/w131103/CellMagic/index-J.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 政明 (IWAMOTO MASAOKI)

独立行政法人情報通信研究機構・未来ICT研究センターバイオICTグループ・専攻研究員

研究者番号: 80450683

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: