

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82636

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650073

研究課題名(和文) 究極の細胞核再構成系の構築を目指した生細胞内における人工核創製の試み

研究課題名(英文) Development of the experimental system in which nuclear envelope can be assembled around a biomolecule-coated bead in a living cell

研究代表者

小林 昇平 (Kobayashi, Shouhei)

独立行政法人情報通信研究機構・未来ICT研究所バイオICT研究室・主任研究員

研究者番号：40425765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生きたヒト培養細胞に生体分子結合ビーズを導入し、それを種として細胞内に「人工細胞核(核膜)」を創製することを目的とする。核膜形成への関与が知られている分子を結合させたビーズの周囲で起こる現象について、生細胞蛍光電子相関観察法等によって解析した結果、DNAやBAFなどを結合させたビーズの周囲に、核膜に類似した形態の膜構造が形成されることを見出した。また、DNA結合ビーズの周囲におけるBAF依存的な核膜様構造の形成が、ビーズのオートファジー回避に繋がることを明らかにした。以上の結果から、生細胞内に導入したビーズの周囲に核膜様構造の形成を誘導できる実験系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：This research aims to develop an experimental system in which nuclear envelope (NE) can be artificially assembled around a biomolecule-coated bead in a living cell. Live cell imaging-associated correlative light and electron microscopy of the beads coated with candidate molecules which are known to act as a seed of NE formation in the cell extract-based NE reconstitution experiments revealed that DNA-bound and BAF-bound beads can assemble nuclear envelope-like membranes around the beads in living cells. Further studies about the NE-like membranes formed around the DNA-coated beads revealed that BAF-mediated assembly of the NE-like membranes leads to exogenous DNA avoiding autophagy. Based on these results we conclude that our bead-mediated system can be used to induce and dissect the process of NE assembly in living cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核膜 DNAビーズ BAF autophagy live CLEM

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする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。この核膜再形成過程は、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細かくダイセクトする手法として、従来までカエル卵抽出液を使った *in vitro* 実験系が用いられてきた。しかし、カエルとヒトの核膜構成の違いや、卵細胞と体細胞の違いといった本質的な違いがあるため、ヒト体細胞の核膜形成を構造的に解析できる手法の確立が熱望されていた。

申請者はこれまでに、生細胞内に生体分子結合ビーズを導入し、特定分子の濃度が局所的に高くなった空間を創り出すことで、生命現象を生細胞内で自在に誘導(再構成)して解析できる実験系の開発を進めてきた(Kobayashi, et al., *Autophagy*, 2010)。また、予備実験の結果から、直鎖状二本鎖 DNA を結合させたポリスチレンビーズ(DNA 結合ビーズ)を、トランスフェクション試薬を用いて細胞内に導入すると、エンドソーム崩壊の直後に、DNA 結合タンパク質である barrier-to-autointegration factor (BAF)が DNA 結合ビーズ表面に集積し、ビーズ周囲に小胞体あるいは核膜に由来すると思われる膜構造が形成されることが分かっていた。しかし、この膜構造がどのような性質を持ち、一般的に核膜形成反応が起こる時期、すなわち、細胞分裂期を経た後にどのような膜構造がビーズ周囲に存在するかについてはこれまで分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、生きたヒト培養細胞に生体分子結合ビーズを導入し、それを種として細胞内に人工細胞核(核膜)を創製することを目指すものである。具体的には、これまでにカエル卵抽出液を用いた核膜再構成系において核膜形成の種として働くことが知られている生体分子を対象にして解析を行い、ヒト細胞内に導入したビーズの周囲に人為的に核膜形成を誘導できるのか、で

きるとすればその核膜はどのような性質を持ったものであるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

DNA 結合ビーズをはじめとする生体分子結合ビーズをヒト培養細胞(HeLa)に導入し、導入処理後の様々な時点において、免疫染色法および生細胞蛍光-電子相関顕微鏡法(Live CLEM 法)等を用いて核膜形成の成否を判定した。観察時期としては、主に、ビーズが細胞内に到達した直後の数時間と、そこから時間が経過して細胞が分裂期を経た後に着目して解析を行った。核膜形成の成否については、電子顕微鏡観察による形態観察、および、免疫染色法による核膜孔複合体の構成成分(ヌクレオポリン)の局在の有無によって判定した。これらの観察において陽性と判定されたものについては、さらに、核移行シグナル配列を付与した蛍光タンパク質等を用いて、選択的物質輸送能を有する膜であるかどうかを検証した。

4. 研究成果

DNA 結合ビーズ周囲における核膜様構造のアセンブリー

本研究では、GFP と BAF との融合タンパク質(GFP-BAF)を安定発現する HeLa 細胞(HeLa/GFP-BAF)を用いることで、GFP-BAF を、ビーズが細胞質内に到達したことを示す指標とした。DNA 結合ビーズを HeLa/GFP-BAF 細胞へ導入し、GFP-BAF 陽性となったビーズに対して、分裂期を通した蛍光タイムラプス観察を行ったところ、ビーズ周囲の GFP-BAF のシグナルは細胞が分裂期に入ると顕著に減少し、その後、細胞が核膜再構成を行う時期、すなわち分裂期終期になると再びビーズ周囲にシグナルが検出された。そこで次に、分裂期を経たビーズの周囲の様子を Live CLEM 法により観察したところ、ビーズ周囲に連続した二重膜構造の形成が見られた。この二重膜構造は、通常の核膜と似た膜間距離を有しており、また、細胞質に面した側の膜にのみリボソームと思われる電子密度の物

質が存在する、通常の核膜に似た膜構造であった。一方で、核膜孔複合体と思われる構造体は電子顕微鏡像中にほとんど観察されなかった。ビーズを細胞に導入してから 24 時間が経過した時点で、核膜孔複合体の構成成分を抗ヌクレオポリン抗体 (mAb414) で染色したところ、BAF 陽性ビーズのうちほとんどのものはヌクレオポリン陰性であった。以上の結果は、今回調べた実験条件下においては、DNA 結合ビーズは、核膜に似た形態の膜構造を形成させる能力があるものの、完全な機能を持つ核膜を形成するのに不十分であることが分かった。また、DNA 以外の生体分子についても解析を行ったが、核膜様の膜構造の形成は見られたものの、いずれの膜構造も核移行シグナルを付与した蛍光タンパク質の選択的蓄積などの機能は有していなかった。

外来 DNA のオートファジー回避における BAF 依存的な核膜様構造形成の意義

上記と並行して、DNA 結合ビーズ周囲における核膜様構造形成の意義を調べた。バクテリア等の外来物質が細胞内へ侵入した際に起こる細胞応答の一つとして、細胞が持つ分解機構の一つであるオートファジーによる異物の排除(分解)が知られている。これまでの研究から、BAF をノックダウンした細胞に DNA 結合ビーズを導入すると、DNA 結合ビーズがオートファジー経路へ取り込まれる頻度が上がることから、BAF が DNA 結合ビーズのオートファジー回避に重要な役割を持つことが示唆されていた。そこで、DNA 結合ビーズ、および、BAF のみを結合させたビーズについて、細胞への導入直後にビーズ周囲で起こる現象を生細胞蛍光-電子相関顕微鏡法により解析したところ、BAF 陽性ビーズの周囲に、DNA 結合ビーズの場合に見られたのと同様の核膜様構造が観察された。また、オートファジーのマーカーである LC3 に対する免疫染色を行ったところ、GFP のみを結合させた対照実験に比べ、GFP-BAF を結合させたビーズの場合には、多くのビーズが LC3 陰性になった。これら

のことから、BAF 依存的な核膜様構造の形成がオートファジー回避に重要な役割を持つことが分かった。さらに、DNA のみを HeLa/GFP-BAF 細胞内にマイクロインジェクションした場合にも、インジェクション直後に DNA 上への BAF の集積が見られ、約 10 分が経過した時点で、DNA の周囲に核膜様の膜構造が観察された。一方、このときオートファジーに典型的な膜構造はインジェクションした DNA の周囲に見られなかった。このことから、今回見られた BAF 依存的な核膜様構造の形成はビーズを用いたことによるアーティファクトではなく、外来 DNA に対して起こる現象を反映していると考えられる。以上の結果から、BAF には、外来 DNA の細胞質への侵入を検出し、その周囲に核膜様構造を形成することにより、外来 DNA をオートファジーから回避させる役割があると結論した (Kobayashi, et al., PNAS, 2015)。

以上の結果から、ヒト培養細胞に導入した生体分子結合ビーズを用いて、様々な性状の核膜様構造を人為的に形成させ、その形成過程を詳細に解析できる実験系の構築に成功したと結論した。

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 5 件)
1. Kobayashi, S., Koujin, T., Kojidani, T., Osakada, H., Mori, C., Hiraoka, Y., Haraguchi, T. (2015) BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 2;112(22):7027-32. doi: 10.1073/pnas.1501235112. (査読有り)
 2. Nakano, T., Kobayashi, S., Suda, T., Okaie, Y., Hiraoka, Y., Haraguchi, T. (2014) Externally Controllable Molecular Communication Systems. IEEE Journal of Selected Areas in Communications 32, 2417-2431. (査読有り)
<http://dx.doi.org/10.1145/2619955.2619971>
 3. Kobayashi, S. (2013) Artificial

- induction of organelle formation in a living cell. Journal of the National Institute of Information and Communications Technology 60, 41-44. (査読有り)
4. 小林昇平. 細胞内小器官の改変、人工小器官の作製技術.(2013) NICT 季報. vol.59, 37-40. (査読有り)
 5. Fujita, N., Morita, E., Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Guan, J.L., Saito, K., Ishibashi, K., Akira, S., Fukuda, M., Noda, T., Yoshimori, T. Recruitment of the autophagic machinery upstream of LC3 is mediated by ubiquitin on host endosomal membranes during infection-induced autophagy. (2013) J. Cell Biol. 203, 115-128. (査読有り)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 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. BAFによる外来DNAのオートファジー回避. 第32回染色体ワークショップ. 安芸グランドホテル. 広島県. 2014.12.15-17. ポスター発表
2. 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. 2014.10.18.一般口頭発表. 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都
3. 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. 口頭発表 (2014.9.26).
4. 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. BAFによる外来物質のオートファジー回避. 第六回光イメージング若手の会(光塾). (独)情報通信研究機構未来ICT研究所. 兵庫県. ポスター発表. (2014.9.6-9.7).
5. 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. BAF依存的な膜集合による外来DNAのオートファジー回避. 第66回細胞生物学会年会. 奈良県新公会堂. 奈良県. ポスター発表. (2014.6.11).
6. 原口徳子、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、小林昇平、舩本寛、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回細

胞生物学会年会. 奈良県新公会堂. 奈良県. シンポジウム、口頭発表. (2014.6.11).

7. 小林昇平、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、荒神尚子、平岡泰、原口徳子. BAF依存的な核膜集合は外来DNAへのオートファジー集合を回避する. 第36回分子生物学会年会 (2013.12.3-12.6). 神戸国際会議場. 兵庫県. ポスター発表.
8. 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. 核膜形成に対するクロマチン-核膜タンパク質相互作用の役割. 第36回分子生物学会年会(2013.12.3-12.6). 神戸国際会議場. 兵庫県. 口頭発表(招待講演).
9. 小林昇平、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、荒神尚子、平岡泰、原口徳子. BAF依存的なDNAビーズのオートファジー回避. 若手イメージング研究会 (2013.9.7-9.8). 東京理科大学. 千葉県. ポスター発表.

〔図書〕(計 1 件)

1. 小林昇平. 生細胞が行う分子通信のメカニズムとその産業応用への期待. 生体模倣技術と新材料・新製品開発への応用 (2014.7.31 発刊). 分担執筆. 第三章第一節 p,217-224.

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/index.html

6. 研究組織
(1)研究代表者

小林 昇平 (KOBAYASHI SHOUHEI)
独立行政法人 情報通信研究機構 未来 ICT
研究所 バイオ ICT 研究室・主任研究員
研究者番号： 40425765

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：