

平成30年6月25日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07066

研究課題名(和文) 繊毛虫テトラヒメナで見つかった脊椎動物特異的な膜貫通型ヌクレオポリンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of transmembrane nucleoporins in ciliate *Tetrahymena thermophila*

研究代表者

岩本 政明 (IWAMOTO, Masaaki)

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・主任研究員

研究者番号：80450683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛虫テトラヒメナには、1つの細胞中に大核(栄養核)と小核(生殖核)という機能と構造の異なる2つの核が存在する。我々は、大小核の核膜孔複合体の構造を研究し、膜貫通型の核膜孔タンパク質として、大核特異的なPom121と小核特異的なPom82が存在することを発見した。これらの核特異的な膜貫通型核膜孔タンパク質の分子機能を検討した。Pom121については大核分化過程での明確な役割を見出せなかった。一方、Pom82については栄養増殖細胞中での小核の位置決めに必須であることが分かった。この発見は、核の位置決めに核膜孔タンパク質が関与することを初めて明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)：Ciliates contain two structurally and functionally distinct nuclei: a somatic macronucleus (MAC) and a germline micronucleus (MIC). We have discovered that the MAC and the MIC have compositionally different nuclear pore complexes. We also discovered that transmembrane nucleoporins, Pom121 and Pom82, were differentiated between the MAC and MIC: Pom121 was specifically localized in the MAC, and Pom82 specifically in the MIC. We examined molecular functions of these nucleus-specific transmembrane nucleoporins. It was found that Pom121 had no significant roles in the cells undergoing macronuclear differentiation, suggesting that Pom121 is not required for macronuclear differentiation. On the other hand, loss of Pom82 exhibited a defect in micronuclear positioning during vegetative growth. This is the first evidence in eukaryotes that nucleoporins are involved in the nuclear positioning within a cell.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：核膜孔複合体 ヌクレオポリン 遺伝子破壊 免疫電子顕微鏡法 2核性 繊毛虫 テトラヒメナ

1. 研究開始当初の背景

核膜孔複合体は、真核生物の進化過程において構造的によく保存されたタンパク質複合体で、約 30 種類のヌクレオポリンと総称される核膜孔タンパク質で構成されている。ヌクレオポリンには膜貫通ヘリックスを持つものが 3 種類含まれ、核膜孔複合体を核膜へアンカーする役割を担う。脊椎動物細胞に見られる膜貫通型ヌクレオポリン 3 種類 (Ndc1, gp210, Pom121)のうち、Ndc1 は多くの真核生物に保存されており、gp210 も酵母以外に幅広く見出される。ところが、Pom121 は、ヒト、マウス、ツメガエルに存在するが、ショウジョウバエ、線虫、酵母には存在しないことから、脊椎動物細胞に特異的なヌクレオポリンと考えられてきた。Pom121 は、核膜孔複合体が分裂間期の核膜に新規に形成される際と、有糸分裂後に核膜とともに再構築される際、双方の初期段階に重要な働きを持つことが示されている (Funakoshi et al., 2011, *Molecular Biology of the Cell* 22:1058-1069; Rasala et al., 2008, *Molecular Biology of the Cell* 19:3982-3996)。申請者は、H24~H26 の科研費研究(基盤 C)のなかで繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) の核膜孔複合体の構成成分を網羅的に同定し、その中に Pom121 様のタンパク質を発見した。Pom121 の構造的な特徴は、120 kDa 程度の分子サイズ、N 末端付近に存在する 1 箇所の膜貫通ヘリックス、ならびに C 末領域に見られるフェニルアラニン-グリシン反復配列 (FG リピート)であるが、テトラヒメナの Pom121 様タンパク質はこれら全ての特徴を備えていた。テトラヒメナは、栄養核の大核と、生殖核の小核という 2 種類の核をもつ二核性細胞であるが、Pom121 は、大核の核膜孔複合体に特異的に局在し、小核には局在しなかった。脊椎動物細胞で核膜孔複合体形成の初期段階に働く Pom121 がテトラヒメナの大核の核膜孔複合体に特異的に局在することは、Pom121 が大核型の核膜孔複合体の形成に必須な働きを持ち、繊毛虫が同一の細胞質内に 2 種類の核膜孔複合体を構築できる仕組みの鍵因子として機能している可能性を示唆するものと考えられた。

2. 研究の目的

脊椎動物以外の生物で唯一、繊毛虫が Pom121 を持つ意味を明らかにすることを目的とした。Pom121 の分子機能を解析することによって、テトラヒメナの大小核間における核膜孔構造の違いと核機能の分化に、Pom121 がどう関わっているのかを明らかにすることを目指した。また、当初の計画にはなかった、小核核膜孔複合体に特異的な Pom121 の機能性ホモログを見出すことを試みた。

3. 研究の方法

小核に特異的な Pom121 の機能性ホモログ

の探索は、タンパク質相同性検索プログラム Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) で既知の FG スクレオポリンの FG リピート配列をクエリーに *T. thermophila* のタンパク質データベースを検索し、ヒットした未知のタンパク質について膜貫通領域予想ソフト TMHMM Server v. 2.0 を用いて膜貫通領域の有無を調べた。候補となる遺伝子の cDNA をクローニングし、緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識してタンパク質の小核核膜孔複合体への局在を蛍光顕微鏡で確認した。

免疫電子顕微鏡観察は、GFP 標識した Pom121 タンパク質を発現するテトラヒメナを抗 GFP 一次抗体、金粒子標識二次抗体で免疫染色後、金粒子を銀増感処理し、超薄切片における金粒子を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

小核特異的 Pom121 タンパク質の遺伝子破壊株の作成は、小核ゲノム上の当該遺伝子をピュロマイシン耐性遺伝子発現カセット (pur4) で置換した小核遺伝子破壊株を作成し、その後、それらを掛け合わせることで大核と小核の遺伝子コピーの全てが pur4 に置換された完全破壊株を得た。

4. 研究成果

(1) テトラヒメナの Pom121 が大核特異性を発揮する仕組みについて調べた。脊椎動物細胞における Pom121 の核局在性は、N 末側領域に存在する核局在化シグナル (NLS) に依ることがわかっている (Yavuz et al., 2010, *FEBS letters* 584:3292-3298)。もし、テトラヒメナの Pom121 にも同様の仕組みが備わっているならば、分子内に、大核に特異的に輸送される NLS 活性が見出されるはずである。N 末端に存在する膜貫通領域の機能を阻害するように GFP を N 末端に接続した GFP-Pom121 は、核膜孔への局在は見られず、大核核内に NLS 活性を持つ可溶性タンパク質のような局在を示した。そこで、Pom121 を様々な領域に断片化したものを GFP で標識し、その大核局在性の有無を確認することで、NLS 活性をもった分子内領域の絞り込みを行ったところ、分子中央付近に活性配列が存在することがわかった。したがって、テトラヒメナ Pom121 の大核局在性は、脊椎動物細胞の Pom121 と類似した NLS に依存した機構によるものと考えられた。

(2) Pom121 の核膜孔複体内での配置を免疫電子顕微鏡法で調べた。大核の核膜孔に局在する Pom121-GFP を発現するテトラヒメナを抗 GFP 抗体および金粒子標識二次抗体で免疫染色して電顕観察したところ、金粒子は大核核膜孔複体の核内側だけに見られたことから、Pom121 は大核核膜孔複体の核内側に偏って局在することが分かった (図 1)。

(3) 大核の分化過程における Pom121 出現のタイミングを調べた。受精核由来の小核から

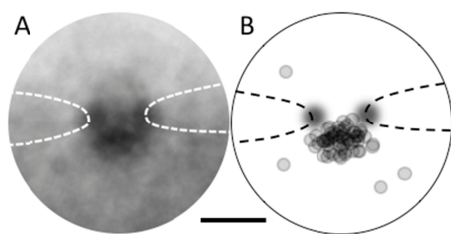


図1 . Pom121-GFP の免疫電子顕微鏡像。
(A) 20 枚の大核核膜孔複合体の重ね合わせ画像と、(B) 同一画像内に検出された金コロイドの位置を丸印で示したもの。破線は核膜を示す。スケールバーは 100 nm。

新大核が分化する後期接合過程にある接合細胞を観察した。Pom121-GFP を発現する細胞、または内在の Pom121 を特異的抗体で免疫染色して観察したいずれの場合においても、他の大核核膜孔特異的ヌクレオポリン (MacNup98A) が新大核の核膜上に出現したのに遅れて Pom121 が出現することが分かった。したがって、Pom121 が最も早く新大核の核膜上に出現し、その他の大核核膜孔複合体の構成成分をリクルートする役割を担って

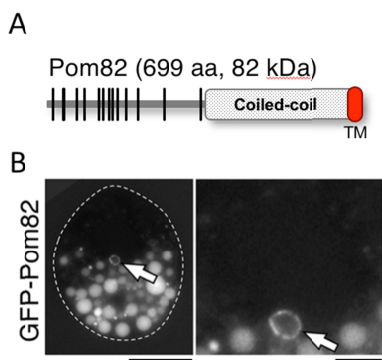


図2 . テトラヒメナの Pom82。(A) Pom82 の分子構造の模式図。縦線は FG リピート、赤の楕円は膜貫通領域 (TM) を表す。(B) GFP-Pom82 の蛍光顕微鏡像。左は細胞全体の像、右は大小核の拡大像。矢印は小核を指す。大核の核膜には蛍光が局在しない。スケールバーは 20 μm (左) と 5 μm (右)。

いる可能性は低いと考えられた。Pom121 は NLS に依存して大核内へ移行すると考えられるため、大核輸送系が確立した後に大核核膜孔へ局在できるようになるのかもしれない。

(4) 小核の核膜孔複合体に特異的に局在する Pom121 様タンパク質を探索し、Pom82 を発見した。膜貫通ヘリックスと FG リピートを指標にテトラヒメナのタンパク質データベースを検索し、候補となる大きさ約 82 kDa の TTHERM_00375160 を見出した。このタンパク質は Pom121 とは異なり、N 末側に FG リピ

ート、C 末端付近に膜貫通ヘリックスを持つ (図 2A)。TTHERM_00375160 を GFP で標識して細胞内局在を確認したところ、小核の核膜孔複合体に特異的に局在したことから (図 2B)、このタンパク質を Pom82 と命名した。

(5) Pom82 の小核核膜孔複合体内部での配置を免疫電子顕微鏡法で調べた。GFP-Pom82 を発現するテトラヒメナを抗 GFP 抗体および金粒子標識二次抗体で免疫染色して電顕観察したところ、金粒子は小核核膜孔複合体の細胞質側だけに観察されたことから、Pom82 は小核核膜孔複合体の細胞質側に偏って局在することが分かった (図 3)。

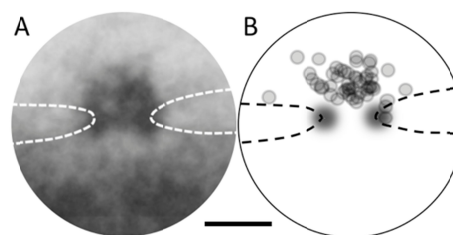


図3 . GFP-Pom82 の免疫電子顕微鏡像。
(A) 20 枚の小核核膜孔複合体の重ね合わせ画像と、(B) 同一画像内に検出された金コロイドの位置を丸印で示したもの。破線は核膜を示す。スケールバーは 100 nm。

(6) Pom82 の遺伝子破壊株を作成し、Pom82 の分子機能の解析を行った。遺伝子破壊株では活発な増殖が見られたが、本来 1 細胞あたり 1 個である小核の個数に異常をきたし、0 から十数個まで様々な個数の小核を持つ細胞が観察された。遺伝子破壊株では小核の有糸分裂が細胞の長軸方向に沿って起こらず、そのため分離した二つの小核が細胞質分裂後の娘細胞のそれぞれに正しく分配されない個体が多く見られ、このことが小核数の異常を引き起こす原因と考えられた。また、野生型では分裂間期の小核は大核に寄り添って存在するが、遺伝子破壊株では大核から離れている小核が多く見られた。これらの観察結果は、Pom82 が細胞周期を通して小核の位置決め機能していることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

岩本政明、森知栄、小坂田裕子、荒神尚子、平岡泰、原口徳子、Nuclear localization signal targeting to macronucleus and micronucleus in binucleated ciliate *Tetrahymena thermophila*, Genes to Cells, 査読有、Vol.23、No.7、2018、ページ数未定、DOI:10.1111/gtc.12602
Sparvoli D、Richardson E、小坂田裕子、

Lan X, 岩本政明、他 8 名、Remodeling the specificity of an endosomal CORVET tether underlies formation of regulated secretory vesicles in the ciliate *Tetrahymena thermophila*, *Current Biology*, 査読有、Vol.28, No.5, 2018, pp.697-710, DOI:10.1016/j.cub.2018.01.047
岩本政明、平岡泰、原口徳子、Newly found *Tetrahymena* nucleoporins, Nup214, Nup153 and Pom121/Pom82, differentiate nuclear pore complexes of functionally distinct nuclei, *Communicative & Integrative Biology*, 査読有、Vol.11, No.1, 2018, e1384890, DOI:10.1080/19420889.2017.1384890
楊恵如、岩本政明、平岡泰、原口徳子、Function of nuclear membrane proteins in shaping the nuclear envelope integrity during closed mitosis, *Journal of Biochemistry*, 査読有、Vol.161, No.6, 2017, pp.471-477, DOI:10.1093/jb/mvx020
岩本政明、小坂田裕子、森知栄、福田康弘、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in ciliate *Tetrahymena*, *Journal of Cell Science*, 査読有、Vol.130, No.10, 2017, pp.1822-1834, DOI:10.1242/jcs.199398
Kaur H, Sparvoli D, 小坂田裕子、岩本政明、原口徳子、Turkewitz AP, An endosomal syntaxin and the AP-3 complex are required for formation and maturation of candidate lysosome-related secretory organelles (mucocysts) in *Tetrahymena thermophila*, *Molecular Biology of the Cell*, 査読有、Vol.28, No.11, 2017, pp.1551-1564, DOI:10.1091/mbc.E17-01-0018
小林昇平、岩本政明、原口徳子、Live correlative light-electron microscopy to observe molecular dynamics in high resolution, *Microscopy*, 査読有、Vol.65, No.4, 2016, pp.296-308, DOI:10.1093/jmicro/dfw024
岩本政明、平岡泰、原口徳子、Uniquely designed nuclear structures of lower eukaryotes, *Current Opinion in Cell Biology*, 査読有、Vol.40, 2016, pp.66-73, DOI:10.1016/j.ceb.2016.02.019
岩本政明、平岡泰、原口徳子、The nuclear pore complex acts as a master switch for nuclear and cell differentiation, *Communicative & Integrative Biology*, 査読有、Vol.8, No.4, 2015, e1056950, DOI:10.1080/19420889.2015.1056950
浅川東彦、森知栄、大槻千鶴、岩本政明、

平岡泰、原口徳子、Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *FEBS Open Bio*, 査読有、Vol.5, 2015, pp.508-514, DOI:10.1016/j.fob.2015.06.004

[学会発表](計 8 件)

岩本政明、小坂田裕子、森知栄、平岡泰、原口徳子、テトラヒメナの核に特異的な膜貫通型ヌクレオポリン Pom82 の機能解析、第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会、2017 年 12 月 21 日、グリーンホテル三ヶ根(愛知県西尾市)
岩本政明、小坂田裕子、森知栄、福田康弘、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、二核性生物テトラヒメナの大小核核膜孔複合体の違い、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 8-9 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
岩本政明、小坂田裕子、森知栄、平岡泰、原口徳子、テトラヒメナの核膜孔複合体を分ける膜貫通型ヌクレオポリン Pom121/Pom82、第 50 回日本原生生物学会大会・第 1 回日本共生生物学会、2017 年 11 月 18 日、筑波大学(茨城県つくば市)
岩本政明、平岡泰、原口徳子、繊毛虫テトラヒメナの二種類の核を分ける核膜孔複合体の構造と動態、日本藻類学会第 41 回大会ワークショップ、2017 年 3 月 23 日、高知大学(高知県高知市)
岩本政明、荒神尚子、小坂田裕子、森知栄、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、機能の異なる 2 核をもつテトラヒメナの核膜孔複合体構造と核分化での核膜孔・核膜動態、第 39 回日本分子生物学会年、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
丸山顕史、岩本政明、平岡泰、原口徳子、テトラヒメナヒストン H3 における新規の化学修飾、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
岩本政明、The nuclear pore complex acts as a master switch for nuclear differentiation of ciliate *Tetrahymena*, 日本原生生物学会日韓合同シンポジウム、2015 年 11 月 6 日、国立感染症研究所(東京都新宿区)
原口徳子、浅川東彦、梶谷知子、小坂田裕子、岩本政明、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、Molecular architecture of the nuclear pore complex in the fission yeast *S. pombe*, *Pombe 2015 8th International Fission Yeast Meeting*, 2015 年 6 月 24 日、生田神社(兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.nict.go.jp/frontier/seibutsu/CellMagic/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 政明 (IWAMOTO, Masaaki)

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・

主任研究員

研究者番号：80450683