

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16084208

研究課題名（和文） 核膜の構造と染色体相互作用のダイナミクス

研究課題名（英文） Dynamics of nuclear envelope structures and interaction between the nuclear envelope and chromosomes

研究代表者

原口 徳子 (HARAGUCHI TOKUKO)

(独) 情報通信研究機構・未来 ICT 研究センター バイオ ICT プロジェクト・主任研究員

研究者番号：20359079

研究成果の概要：

核膜と染色体に注目し、その構造とダイナミクスの解明を行うため、核膜と染色体の双方に結合する生体因子として Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) や lamin A、Sun/Kash 蛋白質などの核膜因子に注目し、ヒト細胞やショウジョウバエ、分裂酵母を用いて、その細胞内動態と機能の解析を行った。独自に開発した live CLEM イメージング法などを用いて解析し、核膜や核膜を構成する分子が、細胞増殖、分化、老化、アポトーシスに重要な働きをすることを分子レベルで明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	19,000,000	0	19,000,000
2005年度	19,000,000	0	19,000,000
2006年度	24,300,000	0	24,300,000
2007年度	24,300,000	0	24,300,000
2008年度	21,200,000	0	21,200,000
総計	107,800,000	0	107,800,000

研究分野：細胞生物学、生化学

科研費の分科・細目：510

キーワード：核膜、クロマチン・染色体、細胞核、細胞増殖、ダイナミクス、生体分子イメージング、細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

核膜タンパク質や核ラミナの変性・欠失が、筋ジストロフィーや心筋症、リポジストロフィー、早老症など、様々な病気を引き起こすことが分かってきていた。このことは、核膜の正常な形成・維持が、細胞周期や細胞増殖の維持といった細胞レベルの機能に必須であるだけでなく、個体の維持にも重要であることを示している。しかし、核膜の機能や構造、そのダイナミクスに関して、分子レベルでの理解はなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題は、細胞分裂周期・増殖・分化・発生・老化・アポトーシスでの核膜の機能と構造変化を明らかにすることを目的とする。具体的には、1) 細胞周期で核膜や染色体構造を形成・維持する仕組み、2) 細胞老化での核膜および染色体構造変化、3) 発生やアポトーシスにおける核膜構造変化を分子レベルで理解し、真核生物の増殖・分化・老化などの生命現象での核膜-染色体の相互作用

用の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

主に分子イメージングの手法を用いて解析を行う。特定の分子を蛍光で標識し、その分子の動態を、生きた細胞（もしくは個体）で観察することによってダイナミクスを明らかにする。また、イメージング法と分子遺伝学的手法を組み合わせ、変異体や分子ノックアウト（もしくはノックダウン）を行うことにより、特定の蛋白質因子の機能を解析する。

4. 研究成果

細胞増殖における核膜と染色体相互作用のダイナミクス

細胞増殖過程における核膜のダイナミクスを理解するため、主に生細胞蛍光イメージング法を用いて、核膜分子が染色体の周りに集合する過程を詳細に調べた。核膜タンパク質を DNA 上に運んでくるタンパク質として、核膜蛋白質であるエメリン(emerin)と、DNA の双方に結合するタンパク barrier-to-autointegration factor (BAF) に注目し解析を進めた。まず、FRAP 法を用いて間期での細胞内分子運動を測定したところ、BAF は 1 秒当たり $1\sim 50 \mu\text{m}^2$ という自由拡散に近い速さで細胞内を動いていること、emerin や MAN1 などの膜タンパク質は核膜内を並進拡散で進むことが分かった。また、2つの蛍光分子間に起こる蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の測定を行い、エメリンと BAF が生きた細胞の核膜上で直接結合することを明らかにした (Shimi et al, J. Struc. Biol. 2004)。哺乳類細胞に存在する BAF は S 期には核内に存在すること、RNAi を用いて BAF をノックダウンすると S 期が遅延することを発見し、核内 BAF は正常な S 期の進行に必要であることを示した (Haraguchi et al, S. Cell Sci., 2007)。分裂期になると、核膜は一旦崩壊し、染色体分離の後に、速やかに染色体上に再形成される。我々は、この過程を解析するために、生細胞蛍光イメージング法を用いて解析を行った (Dechat et al, J. Cell Sci., 2005; Haraguchi et al, J. Cell Sci., 2008)。さ

らに、独自に開発した新規イメージング法として live CLEM 法を用いて解析を行った (図 1)。この方法は、生きた細胞で目的分子のダイナミクスを解析した後、同じ細胞を、電子顕微鏡で膜構造や微細構造を観察するものである。この方法によって、BAF は、核膜再形成に先だって、コア領域と呼ばれる染色体領域に結合し、immobile なポリマー構造を作ること、また、RNAi により BAF をノックダウンすると核膜形成が遅れることから、BAF は、コア領域での核膜形成に重要な働きをすることを報告した (Haraguchi et al, J. Cell Sci., 2008)。

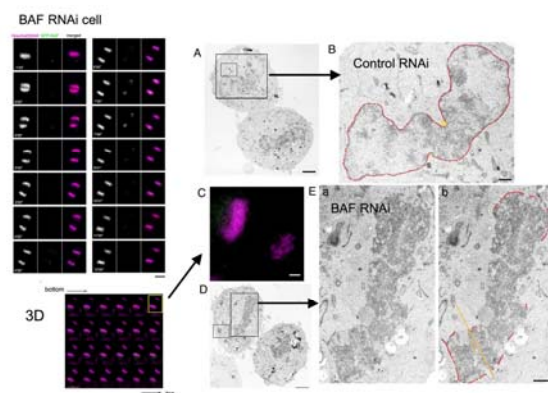


図 1 BAFノックダウン細胞のLive CLEM解析

細胞分化における核膜と染色体相互作用のダイナミクス

我々の解析により、核膜は、細胞分化に伴って、その構造を変化させることが分かってきた。哺乳類細胞では、細胞老化の過程で、核構造の変化に先立って BAF が核膜から脱落し、細胞質に局在を変えることを発見した (Haraguchi et al, J. Cell Sci., 2007)。減数分裂という分化過程での核膜機能については、分裂酵母を用いて解析した。分裂酵母の全ゲノムにある遺伝子約 4500 の約 3分の1にあたる 1500 個に対し、ゲノム上の各遺伝子に直接 GFP 遺伝子を融合した細胞株を作製し、うち約 800 個の遺伝子に対して GFP 遺伝子が融合した細胞株を作製した (Hayashi et al, Genes Cells, 2009)。この細胞株では、遺伝子発現は、本来のプロモータによって制御されるために、GFP 融合遺伝子の過剰発現がなく、細胞内局在は現実を反映している可

能性が高い。核膜に局在するタンパク質や、セントロメアやテロメアなど、染色体の特殊領域に局在するものに関して、その分子動態と機能の一端を明らかにした(Chikashige et al, Genes Cells, 2004; Ding et al, J. Cell Biol. 2006; Hayashi et al, Mol. Biol. Cell, 2006; Asakawa et al, Cell Div., 2007)。減数分裂期に発現量が増加するタンパク質を DNA マイクロアレーの結果に基づいて検索し、核膜とテロメアに結合するタンパク質として bqt1 と bqt2 と名付けた新規タンパク質を同定した。遺伝学的方法とイメージングの手法を用いて、これらのタンパク質は、減数分裂期のテロメアの移動、相同染色体組み換え、胞子形成（高等動物では精子や卵子形成に相当）に直接間接的に必須であることを証明した(Chikashige et al, Cell, 2006)。Bqt1 と bqt2 が揃うと、核膜タンパク質 Sad1 と染色体末端テロメアの両方が Bqt1/bqt2 を介してつながるようになる。それによって、核膜を介して、細胞質に存在する微小管上の動きがテロメアに伝わり、細胞質から核内の染色体テロメアを機械的に動かすことができることを証明した(図2)。我々の発見を契機として、出芽酵母やマウス、線虫でも類似研究が行われ、これらの真核生物でも同様の仕組みがあり、核膜タンパク質が減数分裂の初期反応に重要であることが次々と発見された(Chikashige et al, Chromosoma,

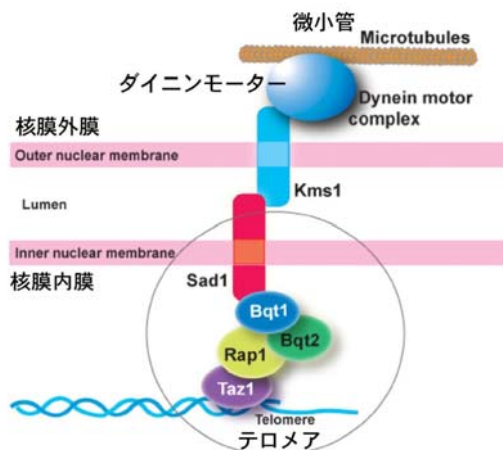


図2 テロメアとダイニンモーターとの核膜を介した相互作用

2007)。この研究は、ヒトでも、核膜機能が卵子や精子のような生殖細胞を作り出す過程に重要な役割を果たす可能性を示唆するものである。

核膜内の核ラミナまたは核脂質膜の構造を形成しているタンパク質に着目して、核膜が真核細胞の細胞レベルから組織レベルまでの核機能をどのように制御しているかを明らかにするため細胞生物学および分子遺伝学的手法を用い研究を進めた。

2本鎖DNA結合タンパク質でありLEMドメインと相互作用するBAFについて、ショウジョウバエのノックアウト動物の成虫原基組織の発生過程を詳細に解析し、高頻度にアポトーシスが誘導されていることを見いだした。またBAFがDNAやラミンの分解前のアポトーシスのかなり初期にDNA結合能を失うことも明らかにし(図3)、BAFがアポトーシスの制御にも関与していることを示唆した。

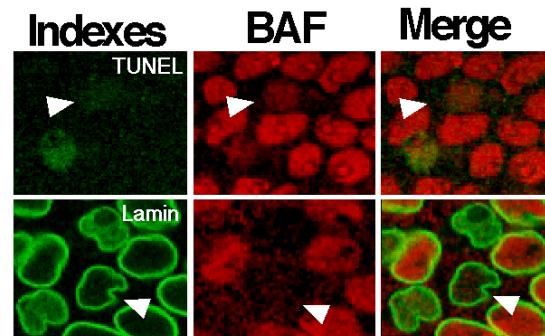


図3 IndexesはアポトーシスでみられるDNAの分解(TUNEL)とラミンの分解(Lamin)をモニターしている。BAFの検出は2本鎖DNA結合型を認識する抗体を用いている。矢頭印はIndexesで分解が見られないがBAFが検出できないものを示す。

核骨格としてDNA複製や遺伝子発現の制御に重要であり、さらにヒト遺伝病の原因遺伝子であるA-およびB-タイプラミンの機能を明らかにするため、ショウジョウバエを用いてノックアウト動物を作製し機能解析も進めた。Bタイプラミン null 個体を用いた解析では、サナギ胚発生期の種々の成体組織の形成に大きな障害があり、特に中枢神経・卵巣では組織形成が未成熟で停止しているが消化器系では過形成(肥大)を生じ、同一個体内で組織により相反する形態異常がおこっていることを見いだした。変異体ではホルモンレセプターや老化マーカーなど各種遺伝

子の発現に異常が起こっていたことからBタイプラミンは、転写には必須ではないが、転写を正確に行うための制御に関わっていると推測している。さらにこの変異体を用い内在性ラミンがない状態でラミンタンパク質による核ラミナ形成の機構の解析も進めた。これまでの *in vitro* の結果と異なり、AタイプとBタイプのラミンは、核ラミナ形成の動態が異なっており、*in vivo* で発現させたラミンはお互いに相互作用することなくそれぞれが独立して核脂質内膜下に重合し核ラミナを形成することを示した(図4)。このことから核膜は均一ではなく、それぞれのラミンにより特徴的な核膜ドメインが形成され核機能が制御されていることを推測している。

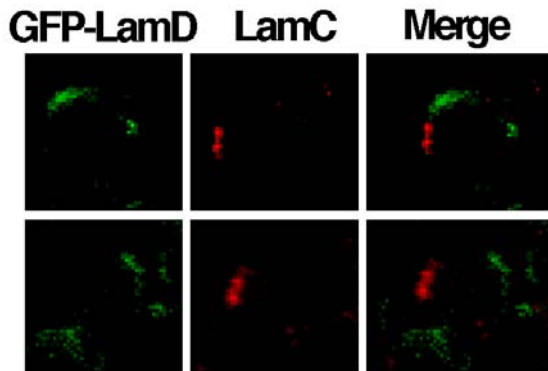


図4 Bタイプラミンnull変異体の菌細胞にGFPでタグしたラミンDm0(GFP-LamD; Bタイプ)とラミンC(LamC; Aタイプ、抗体で検出)を発現させ、初期を観察した。各タイプのラミンは異なる核膜領域から重合を開始している。

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 49 件)

- ①Iwamoto M, Mori C, Kojidani T, Bunai F, Hori T, Fukagawa T, Hiraoka Y, and Haraguchi T. Nup98 nucleoporins bearing different types of repeat sequence characterize nucleus-specific nuclear pore complexes in the ciliate Tetrahymena. *Current Biology* (in press, 2009) 査読有
- ②Furukawa K, Ishida K, Tunoyama TK, Toda S, Osouda S, Horigome T, Sugiyama S, Fisher PA. A-type and B-type lamins initiate layer assembly at distinct areas of the nuclear envelope in living cells. *Exp. Cell Res.* (in press, 2009) 査読有
- ③Hiraoka Y, Kawamata K, Haraguchi T, and

Chikashige Y. Codon usage bias is correlated with gene expression levels in the fission yeast

Schizosaccharomyces pombe. *Genes to Cells* 14, 499-509. (2009) 査読有

- ④Hayashi A, Ding DQ, Tsutsumi C, Chikashige Y, Masuda H, Haraguchi T, and Hiraoka Y. Localization of gene products using a chromosomally tagged GFP-fusion library in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *Genes Cells*. 14, 217-225. (2009) 査読有

- ⑤Hirano Y, Ishii K, Kumeta M, Furukawa K, Takeyasu K, and Horigome T. Proteomic and targeted analytical identification of BXDC1 and EBNA1BP2 as dynamic scaffold proteins in the nucleolus. *Gene to Cell*, 14, 155-166. (2009) 査読有

- ⑥Ishii K, Ogiyama Y, Chikashige Y, Soejima S, Masuda F, Kakuma T, Hiraoka Y, and Takahashi K. Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction. *Science*. 321, 1088-91. (2008) 査読有

- ⑦Haraguchi T, Kojidani T, Koujin T, Shimi T, Osakada H, Mori C, Yamamoto A, and Hiraoka Y. Live cell imaging and electron microscopy revealed dynamic processes of BAF-directing nuclear envelope assembly. *J. Cell Sci.* 121, 2540-2554. (2008) 査読有

- ⑧Chikashige Y, Haraguchi T, and Hiraoka Y. Another way to move chromosomes. *Chromosoma* 116, 497-505. (2007) 査読有

- ⑨Furukawa K, Aida T, Nonaka Y, Osouda S, Juarez C, Horigome T, Sugiyama S. BAF as a Caspase-Dependent Mediator of Nuclear Apoptosis in *Drosophila*. *J. Struct. Biol.* 160, 125-134. (2007) 査読有

- ⑩ Haraguchi T, Koujin T, Osakada H, Kojidani T, Mori C, Masuda H, and Hiraoka Y. Nuclear localization of barrier-to-autointegration factor is correlated with progression of S-phase in human cells. *J. Cell Sci.*, 120, 1967-1977. (2007) 査読有

- ⑪Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 24, 841-847. (2006) 査読有

- ⑫Harigaya Y, Tanaka H, Yamanaka S, Tanaka K, Watanabe Y, Tsutsumi C, Chikashige Y,

- Hiraoka Y, Yamashita A, Yamamoto M. Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature*, 442, 45-50. (2006) 査読有
- ⑬ Chikashige Y, Tsutsumi C, Yamane M, Okamasa K, Haraguchi T, and Hiraoka Y. Meiotic proteins Bqt1 and Bqt2 tether telomeres to promote the bouquet arrangement of chromosomes in fission yeast. *Cell*, 125, 59-69. (2006) 査読有
- ⑭ Minoshima Y, Hori T, Okada M, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y, Bao Y-C, Kawashima T, Kitamura T, and Fukagawa T. The constitutive centromere component CENP-50 is required for recovery from spindle damage. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 10315-10328. (2005) 査読有
- ⑮ Asakawa H, Hayashi A, Haraguchi T, Hiraoka Y. Dissociation of the Nuf2-Ndc80 complex releases centromeres from the spindle-pole body during meiotic prophase in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, 16, 2325-2338. (2005) 査読有
- ⑯ Osouda S, Nakamura Y, de Saint Phalle B, McConnell B, Horigome T, Sugiyama S, Fisher PA, and Furukawa K. Null mutants of *Drosophila* B-type lamin Dm0 show aberrant tissue differentiation rather than obvious nuclear shape distortion or specific defects during cell proliferation. *Dev. Biol.*, 284, 219-232 (2005) 査読有
- ⑰ Hirano Y, Segawa M, Honma S, Ouchi FS, Yamakawa Y, Takeyasu K, Furukawa K, and Horigome T. Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated by mitotic phosphorylation of emerin in *Xenopus* egg cell-free system. *J. Biol. Chem.*, 280, 39925-33 (2005) 査読有
- ⑱ Dechat T, Gajewski A, Korbei B, Gerlich D, Daigle N, Haraguchi T, Furukawa K, Ellenberg J, and Foissner R. LAP2 α and BAF transiently localize to telomeres and to specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J. Cell Sci.*, 17, 6117-6128. (2004) 査読有
- ⑲ Miyamoto Y, Saiwaki T, Yamashita J, Yasuda Y, Kotera I, Shibata S, Shigeta M, Hiraoka Y, Haraguchi T, and Yoneda Y. Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin- α and cause a conventional nuclear import block. *J. Cell Biol.*, 165, 617-623 (2004) 査読有
- ⑳ Furuta M, Kose S, Koike M, Shimi T, Hiraoka Y, Yoneda Y, Haraguchi T, and Imamoto N. Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin α . *Genes Cells*, 9, 429-441. (2004) 査読有
- ㉑ Shimi T, Koujin T, Segura-Totten M, Wilson KL, Haraguchi T, and Hiraoka Y. Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP and FRET analyses in living HeLa cells. *J. Struct. Biol.*, 147, 31-41. (2004) 査読有
- [学会発表] (計 250 件)
(国際)
1. Hiraoka Y 他 9 名 Correlative light and electron microscopy for observing molecular dynamics in living cells. 39th NIPS International Symposium & 7th OIB Symposium (Nov. 10. 2008) Okazaki Conference Center, Japan.
 2. 平岡泰 分子細胞生物学之細胞蛍光画像技術 台日農業生物技術應用研討會 (2007 年 7 月 13 日) 中華經濟研究院 蔣碩傑國際會議厅、台北市、台湾
 3. Haraguchi T 他 5 名 Live-cell and ultrastructural analyse of barrier- to-autointegration factor-dependent nuclear envelope assembly in human cells. International Symposium On Functional Organization Of The Nucleus (Jan. 9. 2007) Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan
 4. Haraguchi T 他 4 名 Live-cell and ultrastructural analyse of barrier- to-autointegration factor-dependent nuclear envelope assembly in human cells. Cold Spring Harbor Meeting: Dynamic Organization of Nuclear Function (Sep. 30. 2006) Cold Spring Harbor, USA
 5. Haraguchi T. Dynamics and Assembly of the Nuclear Envelope in Living Hela Cells. International Symposium on Ran and Cell Cycle (Oct. 3. 2005) Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan
 6. Haraguchi T 他 4 名 Direct visualization of molecular interaction between the nuclear envelope proteins and BAF, a DNA binding protein, in living cells. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science (Apr. 17, 2004) PACIFICO Yokohama, Japan
 7. Haraguchi T 他 4 名 Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Reveals Importance of the Nuclear Envelope as a Cellular Infrastructure. 繊維学会主催、みらいせんい展イベントシンポジウム (2004 年 7 月 14 日)、日本未来科学館、東京都

(国内)

1. 原口徳子 Live CLEM: 見えないものを視る挑戦 視る生物学3 —イメージングの挑戦— (2008年11月20日) 奈良先端科学技術大学院大学、奈良県
2. 原口 徳子 細胞分裂における細胞核と核膜のダイナミクス 京都大学ウイルス研究所学術講演会 (2008年6月24日) 京大会館、京都府
3. 原口徳子他5名 単一細胞での「ライブ+超構造」イメージング 日本化学会第87回春期年会 (2007年3月28日) 関西大学千里山キャンパス、大阪府
4. 原口徳子 生きた細胞で生体分子間相互作用を見るための顕微鏡法 バイオ・高分子研究会 (2005年9月23日) 一の坊、宮城県
5. 原口徳子他4名 スペクトル共焦点顕微鏡を用いたライブセルイメージング 日本顕微鏡学会第61回学術講演会 (2005年6月3日) つくば国際会議場、茨城県

[図書] (計32件)

- ① Haraguchi T and Hiraoka Y Breakdown and reformation of the nuclear envelope in human cells. In Nuclear Dynamics: Molecular Biology and Visualization of Nucleus. (K. Nagata, K. Takeyasu, ed.) Springer Verlag, pp. 89-106. (2007)
- ② Haraguchi T and Hiraoka Y Imaging Hoechst 33342-labeled chromosomes and fluorescent proteins during the cell cycle. In "Live cell imaging: A Laboratory Manual" (David Spector, ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 503-511. (2004)

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

- ① 名称: Nuf2 蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法
発明者: 原口徳子、荒神尚子、平岡泰
権利者: (独)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2008-133885
出願年月日: 2008年5月22日
国内外の別: 国内
- ② 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)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2008-77060
出願年月日: 2008年3月25日
国内外の別: 国内

- ③ 名称: オートファジーの誘導方法、及び培養細胞への外来粒子導入方法
発明者: 小林昇平、原口徳子
権利者: (独)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2007-303366
出願年月日: 2007年11月22日
国内外の別: 国内
- ④ 名称: 改良型 HA タグ及び改良型 HA タグを用いたスクリーニング方法
発明者: 原口徳子、平岡泰
権利者: (独)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2005-96907
出願年月日: 2005年3月30日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計2件)

- ① 名称: Method of Measuring Biological Sample with high Accuracy
発明者: Takeshi Shimi, Tokuko Haraguchi
権利者: (独)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: US 7, 336, 417 B2
取得年月日: 2008年2月26日
国内外の別: 国外 (米国)
- ② 名称: 生物試料を高精度に測定する方法
発明者: 志見剛、原口徳子
権利者: (独)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: 3879001
取得年月日: 2006年11月17日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 徳子 (HARAGUCHI TOKUKO)
(独)情報通信研究機構・未来 ICT 研究センターバイオ ICT プロジェクト・主任研究員
研究者番号: 20359079

(2) 研究分担者

古川 和広 (FURUKAWA KAZUHIRO)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 40229109

(3) 連携研究者

平岡 泰 (HIRAOKA YASUSHI)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号: 10359078