

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19370091  
 研究課題名（和文）新規核膜蛋白質 Nemp1 による遺伝子発現調節機構と眼発生機構の解析  
 研究課題名（英文）Analysis of gene regulation and eye development by a novel nuclear protein, Nemp1  
 研究代表者  
 平良 眞規（TAIRA, MASANORI）  
 東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
 研究者番号：60150083

## 研究成果の概要（和文）：

*Xenopus* 胚の眼の初期形成における核膜蛋白質 Nemp1 による遺伝子発現調節の分子メカニズムを解析した。Nemp1 は核の内膜に局在し、C 末端の領域 B は核質側に配向した。領域 B には Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) と低分子 G 蛋白質 Ran の GTP 型が結合した。Nemp1 は Otx2 による *rax* エンハンサーの活性化を阻害し、その活性に領域 B が必要であった。したがって、Nemp1 は核内膜において領域 B を介して BAF や Ran と相互作用することで眼特異的遺伝子 *rax* の発現調節に関わることがえられる。

## 研究成果の概要（英文）：

We investigated the molecular mechanism of the role of a nuclear membrane protein, Nemp1, in gene regulation during early *Xenopus* eye development. We found that Nemp1 is localized to the inner nuclear membrane with region B facing the nucleoplasm, and that Nemp1 binds to Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) and the GTP form of the small GTPase Ran. Nemp1 inhibits activation of a *rax* enhancer reporter gene by Otx2 in a region B-dependent manner. These data lead to the possibility that Nemp1 is involved in the expression of the eye-specific gene *rax* by functioning at the inner nuclear membrane through interactions with BAF and Ran.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：初期発生、眼形成、核内膜蛋白質、遺伝子発現調節、otx2、*rax*、BAF、Ran

1. 研究開始当初の背景

核膜 (nuclear envelope) は真核生物を最も特徴付けるものの1つであり、外膜と内膜からなる2重膜と、内膜を裏打ちする核ラミナから成る (図1)。外膜や内膜に埋め込まれている膜蛋白質は、核膜の構築や構造の維持に重要と考えられ、細胞分裂における核膜の消失や再構築という観点で良く研究されて来た。しかし、細胞核は遺伝子発現の調節の場であるにも関わらず、核膜蛋白質、特に核の内膜に存在する核内膜蛋白質 (inner nuclear membrane protein) が果たして遺伝子発現の調節に関わっているか否か、もし関わる場合はどのように関わるかなどに関して十分な解析が行われて来なかった。

そのような状況で2003年に我々が報告したアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の核内膜蛋白質のXMAN1の機能解析から、XMAN1がSmad1に結合してBMPシグナル伝達を負に制御すること (図1)、それによりXMAN1が前方神経板の形成に関わることが示唆された (Osada et al. 2003 Development 130:1783)。この研究成果は、核膜蛋白質の新たな役割を示すものとして注目され (Gruenbaum et al. 2005 Nat Rev Mol Cell Biol 6:21)、さらにこの論文を基に、骨過形成を呈し優性遺伝するヒト遺伝病Osteopoikilosisの原因遺伝子としてヒトのMAN1遺伝子が同定された (Hellems et al. 2004 Nat Genet 36:1213)。その後、他の核内膜蛋白質であるEmerinがβ-cateninと結合することで、Wntシグナル伝達の調節に関わることなどが報告された (図1) (Markiewicz et al. 2006 EMBO J 25:3275)。Smad1とβ-cateninはそれぞれ転写因子と転写補助因子として直接遺伝子発現の制御に関わる蛋白質である。これらの知見は核内膜が遺伝子発現調節における一つの場として重要な役割を担っていることを示唆している。したがって、その可能性をさらに追及するには種々の核内膜蛋白質の機能解析が重要である。

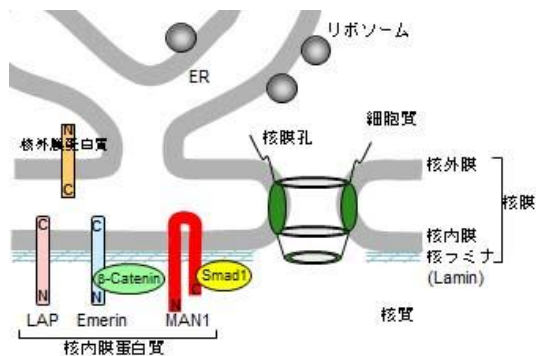


図1. 核内膜蛋白質とシグナル伝達

2. 研究の目的

我々は1999年より神経誘導や頭部形成の分子機構を解明する目的で、*Xenopus* の前方神経外胚葉 (anterior neuroectoderm: ANE) に発現する遺伝子について、発現パターンと神経化活性を指標にして探索を行い、多数の新規遺伝子を同定した (Shinga, et al. 2001 Mech. Dev. 109:225; Takahashi, et al. 2005 Int J Dev Biol 49:939; Osada et al. 2003 Development 130:1783)。核内膜蛋白質XMAN1はその中の1つであったことから、発生や遺伝子発現の制御に関わる新たな核膜蛋白質を探索するため、得られた遺伝子についてタグ付コンストラクトを作成して細胞内局在を検討した。その結果、これまで全く解析されていなかった新規核膜蛋白質を見出し、Nemp1 (Nuclear envelope integral membrane protein 1) と命名した (ヒトゲノムの遺伝子モデルはTMEM194)。

Nemp1はシグナルペプチド様配列と5つの膜貫通領域をもつことが予想され、それら以外には既知のドメインやモチーフは見出されなかったが、EST (Expressed Sequence Tag) 解析により、線虫からヒトまで保存された2つの領域AとBを同定した (図2)。領域Aは膜貫通領域内に、領域Bは膜貫通領域よりC末端側に存在する。*nemp1* の発現は神経胚期で前部神経板に、尾芽胚期で頭部に、特に眼胞に強く認められた。*Xenopus* 胚を用いたmRNAの顕微注入による機能更新実験と、アンチセンスモルフォリノ (*nemp1* MO) の顕微注入による機能低下実験により、Nemp1は眼の形成に関わること、また機能亢進と低下で同じ眼の欠損の表現型が現れることから、Nemp1は複数の因子と複合体を形成して機能することが示唆された。さらに、眼の形成の遺伝子カスケード (*otx2* → *rax* → *pax6*) のモデル (Zuber et al. 2003 Development 130:5155) に基づいて解析した結果、Nemp1の作用点は*otx2*と*rax*の間であることが示唆された。欠失コンストラクトを用いた解析では、Nemp1のシグナルペプチド様配列と膜貫通領域が眼の形成阻害活性と核膜局在に必須なこと、領域AとBは共に眼の形成阻害活性に必要なことが示された (図2)。これらの結果より、『Nemp1は核膜において複合体を形成し、遺伝子発現を制御することで眼の発生に関わる』というモデルが考えられた。

以上の知見を基に本研究では、核内膜蛋白質がどのように遺伝子発現制御に関わり、またそれにより眼の初期発生過程にどのように関与するかを解明することを目的とした。具体的には以下の点を解析した。(i) Nemp1の核膜での局在場所と分子的性状に関する検討、(ii) Nemp1と相互作用する蛋白質の同定、(3) Nemp1の眼胞形成における役割の解

析、である。Nemp1の局在場所と分子的性状に関する検討では、(a) Nemp1が核内膜と核外膜のどちらに存在するか、(b) N末端とC末端が核膜の内腔か核質か細胞質のどちらに配向するか、(c) シグナルペプチド様列と核移行シグナル(NLS)の活性を検討した。Nemp1と相互作用する蛋白質の同定では、候補蛋白質との相互作用、酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングを行った。それにより眼の発生に関わる遺伝子カスケードにおける Nemp1 の役割について検討した。

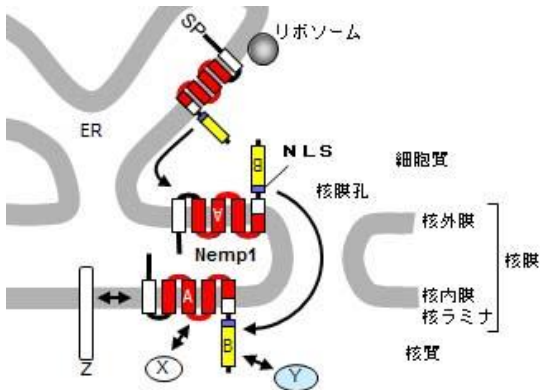


図 2. Nemp1 の構造と核膜への局在

### 3. 研究の方法

#### (1) *Xenopus* 胚と顕微注入実験

*Xenopus* 胚は定法に従い得た。顕微注入はガラス針を Narishige 顕微注入装置 IM300 を用い 5 nl を各割球に注入した。

#### (2) 培養細胞と DNA トランスフェクション

培養細胞株 COS7 は 10% 牛血清を含む DMEM 培地で 37 度にて培養した。DNA トランスフェクションは FuGENE (Roche 社) を用いた。

#### (3) プラスミドと mRNA 合成と MO

発現ベクター pCS2+, pCS2+MT, pCS2+4HA, pCSf107mT に、目的の cDNA 領域を PCR で増幅後、定法に従いコンストラクトを作成した。mRNA 合成は mMESSAGE mMACHINER SP6 キット (ABI 社) を用いた。nemp1 MO は Gene Tool 社に合成を依頼した。

#### (4) 共免疫沈降法

複数の遺伝子にそれぞれ異なるタグを付加した mRNA を *Xenopus* 胚に顕微注入して蛋白質を合成させ、一方の抗体で沈降させたものを、他方の抗体でウェスタン・ブロットを行った。検出は蛍光抗体と蛍光検出装置 Odyssey (LI-COR) を用いた。

#### (5) GST プルダウン法

pGEX6p ベクターを用いて GST 融合蛋白質を大腸菌で合成し、glutathione beads で精製した。GST 融合蛋白質を結合させた beads と、胚に発現させた蛋白質、あるいは TNT in vitro 転写翻訳カップリング・キット

(Promega 社) で合成した蛋白質をインキュベートしたのち沈降させ、ウェスタン・ブロットで解析した。

#### (6) 免疫染色

胚あるいは培養細胞を MEMFA 固定液で固定し、Triton X-100 あるいは digitonin で透過処理したのち、抗体で 4 度一晩インキュベートし、洗浄後二次蛍光抗体と室温 1 時間インキュベートした。観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM Pascal (Zeiss 社) を用いて行った。

#### (7) マウス *Nemp1* のクローニング

*Xenopus* Nemp1 のアミノ酸配列を query としてマウス EST データベースを TBLASTN 検索した。マウス *Nemp1* の EST contig の配列を基にプライマーを合成し、マウス胚 cDNA プールを鋳型として PCR クローニングを行った。塩基配列の決定は、シーケンサー ABI 3100 を用いた。

#### (8) 酵母 two hybrid 法

スクリーニングの bait として、マウス Nemp1 の領域 B からの C 末端までを含む領域 (Bt と命名) を pGBKT7 ベクターに組み込み、マウス胚 E11.5 の cDNA ライブラリー

(Stratagene 社) をスクリーニングした。

#### (9) ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイ

Otx2 に応答する *rax* の制御領域をルシフェラーゼ遺伝子に繋いだレポーターコンストラクト (50 pg/胚) を mRNA と共に 2 細胞期の動物極側に共注入し、原腸胚期で回収してルシフェラーゼ活性を測定した。3 つの胚を 1 つのグループとして、5 グループについて測定し、平均と標準偏差を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) Nemp1 の局在場所と分子的性状

##### ① 核膜における局在と配向性の検討

核の膜蛋白質が内膜と外膜のどちらに局在するか、および膜蛋白質の N 末端と C 末端が膜のどちら側に配向するかを決定するには、一般に免疫電顕が使われる。しかし技術的に熟練を要することや条件検討に時間がかかることなどから、より簡便な方法を見出すため、digitonin 処理に注目した。digitonin は細胞膜の透過性を上げるが核膜の透過性は上げないことが知られている。しかし核膜の外膜と内膜の透過性に違いがあるかは不明であった。そこで、外膜と内膜の間の内腔側に配向させたタグ付き蛋白質 (Emerin-HAc, MAN1-HAi) と、核質側に配向させたタグ付き蛋白質 (HAn-Emerin) を作成し、digitonin 処理を用いた免疫染色により検討した。その結果、適度の digitonin 処理により外膜の透過性を上げるが内膜の透過性を上げない条件を見出した。

この方法を用いて Nemp1 の C 末端にタグを付加したコンストラクト (Nemp1-HAc) で検討した結果、C 末端が核質側に配向している

ことが示された。この結果は、Nemp1 が内膜蛋白質であること、および領域 B が核質側で機能していることを示唆している。

#### ② シグナルペプチド様配列の検討

Nemp1 のシグナルペプチド様配列が実際に機能するかをウェスタン・ブロットにより検討した。シグナルペプチドの切断を電気泳動の移動度で検出し易くするため、シグナルペプチド様配列を C 末端側領域 (Bt) に繋いだコンストラクトを作成し、アフリカツメガエル胚に発現させたものと *in vitro* 翻訳系で合成したものとを比較した。その結果、胚に発現させた方が、分子量が小さくなったことから、シグナルペプチドとして切断されたと考えられる。このことは Nemp1 の N 末端が核膜の内腔側に配向していることを示唆しており、さらに C 末端が核質側に配向する結果と合わせると、膜貫通ドメインが 5 個あるとの予測とも合致する。

#### ③ 核膜孔との位置関係についての検討

核膜孔と Nemp1 の位置関係を調べるため、核膜孔の蛋白質 Nup153 に対する抗体を用いて、Nemp1-HAc との 2 重免疫染色を行った。その結果、両者のシグナルは一部を除いて共局在しなかったことより、Nemp1 は主として核膜孔以外の領域に存在すると考えられる。ただし Nemp1 の強いシグナルの一部は Nup153 と共局在していたことから、核膜孔周辺にも局在すると考えられる。

#### ④ 核局在シグナルの検討

膜貫通ドメインより C 末端側の領域 (aa 318-434; Ct と表記) は核に局在するが、Bt (aa 326-434) は細胞質と核の全体に分布する。そこで核局在シグナル (nuclear localization signal; NLS) のコンセンサス配列 (K-K/R-X-K/R) を調べた結果、合致する配列 RKIKRKRK (aa 317-325; KR 配列と表記) を見出した。一般に核膜孔は 50 kDa 以上のものは通過させないが、NLS があると通過する。そこで、glutathione S-transferase (GST) と monomeric red fluorescent protein (mRFP) を融合させたコンストラクト (GST-mRFP-HA, 61.1 kDa) を作成した。GST は 2 量体を形成することから GST-mRFP-HA は細胞内では 122.2 kDa の複合体として存在すると予想される。期待通り GST-mRFP-HA は細胞質に留まり、一方、KR 配列を含む配列 (aa 315-327) を付加した GST-mRFP-KR-HA は核に局在した。さらに、Nemp1 から KR 配列を欠失したコンストラクト ΔKR は、野生型に比べて眼形成の阻害活性は大きく減少した。以上より、KR 配列は NLS として機能すること、およびその配列が Nemp1 の活性に必要であることが示唆された。

#### (2) Nemp1 に結合する蛋白質の同定と解析

胚発生において Nemp1 は眼胞形成に関わることが示唆されたので、その分子機構を探る

ため、相互作用する蛋白質の探索を行った。特に Nemp1 の活性には領域 B が必要であることより、この領域に注目して検討した。

#### ① Barrier to Barrier-to-autointegration factor (BAF)

MAN1 や Emerin などの核内膜蛋白質や Otx2 などの転写因子はクロマチン蛋白質 BAF と結合することが報告されている。そこで BAF の結合部位 (BAF binding site: BBS と表記) のコンセンサス配列 S-R/K-V-X-X-X-R/K を Nemp1 で検索し、領域 B に類似配列 SRIQSPKR (aa 368-375) を見出した。そこで BBS の欠失コンストラクト ΔBBS を作成して *Xenopus* 胚に過剰発現させたところ、野生型 Nemp1 の活性に比べてその活性は大きく減少した。さらに *nemp1* MO による眼の形成阻害は *nemp1* mRNA の共注入では回復するが、ΔBBS mRNA では回復しなかった。

次に Bt と BAF との結合を検討した。大腸菌で合成・精製した GST-Bt 融合蛋白質と、*Xenopus* 胚に発現させた FLAG-BAF との結合を GST プルダウン法で検討した結果、両者の結合が検出された。さらに、FLAG-BAF は核内に一様に分布したが、Nemp1 と共発現により核膜近傍に共局在することが示された。これらの結果は、Nemp1 と BAF が核内で結合し得ること、Nemp1 の機能の一部は BAF との結合を介することを示唆している。

#### ② 酵母 two hybrid 法を用いた探索

マウス胚の酵母 two hybrid cDNA ライブラリーを用いるため、また核内膜における Nemp1 の機能をマウス培養細胞でも解析可能するため、マウス *Nemp1* cDNA をクローニングした。*Xenopus* Nemp1 とは全アミノ酸配列で 58%、領域 A で 67.0%、領域 B で 80.0% の一致率であった。マウス Nemp1 の領域 Bt を bait として酵母 two hybrid 法により探索した結果、低分子量 G 蛋白質の Ran と SUMO E2 酵素の Ubc9 などを同定した。そこで GST-Bt を用いたプルダウン・アッセイを行った結果、Bt と Ran は結合したが Ubc9 とは結合しなかった。また COS7 培養細胞とタグ付き蛋白質を用いて Nemp1 との共局在を検討した結果、Ran とのみ共局在を示した。そこで以下の実験は Ran に注目して解析した。

#### ③ Nemp1 と Ran との相互作用の解析

Ran は Importin β と共に核輸送を制御する重要な低分子量 G 蛋白質であり、GTP 結合型は核に、GDP 結合型は細胞質に局在する。この分布は核に局在する RanGEF の RCC1 と細胞質に局在する RanGAP1 とその共役因子 RanBP1 と RanBP2 によって維持される。Importin β は「積荷」蛋白質と結合して、それを核内に輸送する担体であり、核内に入ると RanGTP と結合することで、「積荷」は Importin β から解離する (図 3)。そこで Bt が GTP 型と GDP 型のどちらの Ran と結合するかを、Ran の変



異体を用いた共免疫沈降法により検討した。その結果、Bt は GDP 型 Ran (T24N) ではなく GTP 型 Ran (Q69L) と強く結合することが示された。一方、Ran の効果ドメインの変異体 (T42A) は Importin  $\beta$  や RanBP1、RanBP2 と結合しないが、Bt とともに結合しなかった。C 末端領域の欠失体 ( $\Delta$ C) では RanBP1、RanBP2 と結合しないが、Bt は Importin  $\beta$  と同様に結合した。さらに、GST-GTP 型 Ran (Q69L) と Importin  $\beta$  との結合を Bt は阻害した。これらの結果は、Nemp1 は核内膜上で、GTP 型 Ran と効果ドメインを介して結合することを示唆しており、それにより Importin  $\beta$  と Ran との相互作用を制御している可能性が考えられる。

### (3) *rax* エンハンサー・レポーター遺伝子を用いた解析

*Xenopus* 胚での Nemp1 の過剰発現により、*otx2* の発現は阻害されないが、*rax* の発現が阻害される。そこで *Otx2* で活性化される *rax* エンハンサーを繋いだルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いて、Nemp1 の作用を検討した。その結果、*Otx2* によるレポーター遺伝子の活性化が Nemp1 により阻害されることが示された。この阻害作用は、領域 B を欠いた Nemp1 や別の核内膜蛋白質の MAN1 では見られなかった。一方、BMP シグナルで活性化される *vent2* エンハンサー・レポーター遺伝子に対しては、Nemp1 は阻害作用を示さなかった。したがって、Nemp1 は領域 B を介した作用により、*Otx2* による *rax* の転写活性化を特異的に阻害したと考えられる。

### (4) 考察

本研究において、以下の成果を得た。(i) 核膜の外膜を選択的に透過性にする digitonin 法を開発した；(ii) Nemp1 は核の内膜に局在し、C 末端領域が核質側に配向する；(iii) Nemp1 はシグナルペプチドと NLS をもつ；(iv) 進化的に保存された領域 B に BAF と GTP 型 Ran が結合する；(v) Nemp1 は Importin  $\beta$  と Ran の結合に競合する；(vi) *Otx2* による *rax* 遺伝子のエンハンサーの活性化を Nemp1 が特異的に阻害する。

これらの結果を基に、図 3 に示すように、Nemp1 の作用機構のモデルを立てた。核内膜蛋白質の Nemp1 は核質側の領域 B が GTP 型 Ran と結合することで、内膜周辺の GTP 型 Ran の濃度を増大させる。核膜孔からは Importin  $\beta$  ファミリーの蛋白質が積荷である転写因子と結合して核内に移動する。*Otx2* は Importin  $\beta$  ファミリーの Importin 13 と結合することが予想されている。*Otx2* は Importin 13 と共に核内に入り、核内膜周辺の GTP 型 Ran により Importin 13 から解離する。Nemp1 はまた C 末端領域の NLS を介して Importin  $\beta$  と相互作用することで *Otx2* の Importin 13 からの解離を促進する可能性がある。一方、核内には多量に存在する BAF は *Otx2* に結合して転

写活性を抑制するという報告がある。Nemp1 は BAF とともに結合することで *Otx2* を BAF から解離させる役割も考えられる。遊離した *Otx2* は *rax* エンハンサーに結合して、予定眼胞での *rax* の発現を引き起こすと考えられる。このように、Nemp1 は BAF、GTP 型 Ran、Importin  $\beta$  ファミリーメンバーと相互作用することで、間接的に転写調節を行うと予想される。

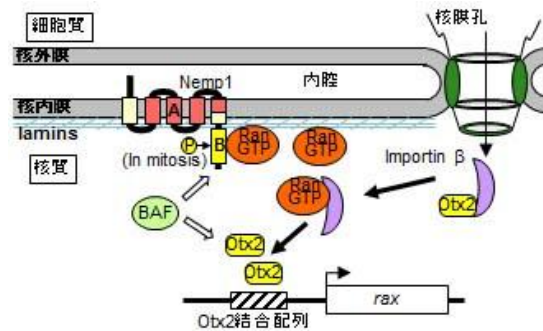


図 3. Nemp1 の作用機構のモデル。

Nemp1 の作用機構モデル (図 3) をより確かなものにするには、さらに実験的支持が必要であるが、Nemp1 が GTP 型 Ran と結合するというこれまでにない核内膜蛋白質である点は、本研究で初めて得られた重要な知見である。一方、Ran はハウスキープング蛋白質として、蛋白質の核輸送の全般に関わるものであるのに対し、Nemp1 の初期発生における役割は眼の初期形成に限定的である。その理由としては、Importin  $\beta$  ファミリーには 11 のメンバーがあり、それぞれ特異的な積荷蛋白質を輸送すること、およびそれらと Ran との親和性に差異があることが報告されている。したがって、仮に Nemp1 が Importin  $\beta$  メンバーのいずれかに特異性をもつと仮定すると、Ran に比べてより限定的な作用をもつことが理解される。さらに Nemp1 は *Otx2* の活性に影響を与えることから *Otx2* の輸送担体として予想される Importin 13 と相互作用することが想定される。この点も図 3 のモデルに入れたが、今後の検討課題である。

本研究は、『核膜蛋白質の遺伝子発現制御における機能と発生における役割』という、その重要性が近年認識されつつある課題に挑み、大変興味深い結果を得た。我々は先に発生における核膜蛋白質の重要性を XMAN1 で初めて明らかにし、またその結果を基に Nemp1 の解析を早期に着手したことで、本研究は非常に独創的な研究となった。さらに、眼の発生は良く研究されている分野であるが、初期の眼胞形成の機構に関しての研究は少なく、アフリカツメガエル胚を用いた過剰発現実験系で *otx2* → *rax* → *pax6* → *six3* という遺伝子カスケードが提唱されているのみであった (Zuber et al. 2003

Development 130:5155)。したがって Nemp1 を解析することは、眼の初期発生に関わる眼胞特異的遺伝子の発現制御機構の解明にも繋がるものである。

以上、本研究は核膜蛋白質 Nemp1 の核内膜上での働きを解析したものであり、領域 B を介して BAF や GTP 型 Ran と結合し、特定の転写因子 (Otx2 等) の核輸送を制御している可能性を示唆している。核内膜蛋白質により転写因子の核輸送を制御している報告はこれまでに無く、本研究は発生過程および遺伝子制御における核内膜蛋白質の新たな役割を示唆するものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

### 〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Mii, Y. and Taira, M. (2009). Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* 136, 4083-4088.
2. Takada, H., Kawana, T., Ito, Y., Kikuno, R. F., Mamada, H., Araki, T., Koga, H., Asashima, M. and Taira, M. (2009). The RNA binding protein Mex3b has a fine-tuning system for mRNA regulation in early *Xenopus* development. *Development* 136, 2413-2422.
3. Yasuoka, Y., Kobayashi, M., Kurokawa, D., Akasaka, K., Saiga, H., and Taira, M. (2009). Evolutionary origins of blastoporal expression and organizer activity of the vertebrate gastrula organizer gene *lhxl* and its ancient metazoan paralog *lhx3*. *Development* 136, 2005-2014.
4. Mamada, H., Takahashi, N. and Taira, M. (2009). Involvement of an inner nuclear membrane protein, Nemp1, in *Xenopus* neural development through an interaction with the chromatin protein BAF. *Dev. Biol.* 327, 497-507.
5. del Pino, E. M., Venegas-Ferrin, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Saenz-Ponce, N., Moya, I. M., Alarcon, I., Sudou, N., Yamamoto, S., and Taira, M. (2007). Inaugural Article: A comparative analysis of frog early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 11882-11888.
6. Shibano, T., Takeda, M., Suetake, I., Kawakami, K., Asashima, M., Tajima, S., and Taira, M. (2007). Recombinant Tol2 transposase with activity in *Xenopus* embryos. *FEBS Lett.* 581, 4333-4336.

### 〔学会発表〕 (計 6 件)

1. T. Shibano, H. Mamada, N. Sudou, F. Hakuno, S.-I. Takahashi, and M. Taira "Molecular mechanisms of the regulation of *rax* expression by the inner nuclear membrane protein Nemp1 in vertebrate eye development" The 2010 CSHL Symposium on Nuclear Organization & Function (2010年6月2日~7日)
2. T. Shibano, H. Mamada, F. Hakuno, S.-I. Takahashi, H. Koga and M. Taira "Molecular mechanisms of the regulation of *rax* expression by the inner nuclear membrane protein Nemp1 in vertebrate eye development" (柴野、ワークショップ口頭発表とポスター発表) 第32回分子生物学会年会、横浜 (2009年12月9日~12日)
3. T. Shibano, H. Mamada, F. Hakuno, S.-I. Takahashi, H. Koga and M. Taira "Interaction of the inner nuclear membrane protein Nemp1 with the chromatin protein BAF and the small GTPase Ran in *Xenopus* embryos" (柴野、口頭発表) 日本発生生物学会第42回大会、新潟 (2009年5月28日~31日)
4. 柴野卓志、儘田博志、伯野史彦、高橋伸一郎、古閑比佐志、平良眞規 "眼の発生に関わる核内膜蛋白質 Nemp1 と相互作用する因子の同定" 第31回分子生物学会年会、神戸 (2008年12月9日-12日)
5. 儘田博志、柴野卓志、伯野史彦、高橋伸一郎、古閑比佐志、平良眞規 "アフリカツメガエル初期眼発生における新規核膜タンパク質 Nemp1 の解析" 第30回分子生物学会年会、横浜 (2007年12月11日-15日)
6. H. Mamada, T. Shibano, F. Hakuno, S.-I. Takahashi, H. Koga, M. Taira "Analysis of a novel nuclear envelope protein, Nemp1, in early *Xenopus* eye development" International Symposium on Advanced Functional Genomics, Kazusa (2007年11-12, Oct.)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/lmb/index.php>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平良眞規 (MASANORI TAIRA)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：60150083