

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570223

研究課題名(和文)核膜形成機構：オルガネラ形成を規定する膜タンパク質動態制御

研究課題名(英文) Mechanism of the nuclear envelope assembly: regulation of the nuclear transmembrane proteins translocation for organelle assembly

研究代表者

船越 智子(石井智子)(Funakoshi, Tomoko)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・特任研究員

研究者番号：90318460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞の核膜は分裂期に崩壊し、染色体分離後に再形成される。崩壊時に小胞体(ER)に吸収された核膜タンパク質や核膜成分は、再形成時にERから選択的に供給されるが、そのメカニズムは不明な点が多い。分裂期のセミインタクト細胞を利用して核膜形成初期の核膜タンパク質のERから染色体への局在化を観察した。本実験系で核輸送活性を持つ核膜を再構築することに成功し、核膜再形成のためには核膜孔の再形成の他に、少なくとも2種類の膜タンパク質LBRとエマリンの染色体への集積が必要であること、その集積のためにはそれぞれ異なる因子とATP、GTPが必要であること、反応中のリン酸化状態が重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：At the one set of cell division of metazoan, the nuclear envelope (NE) breaks down and the nuclear membrane components are absorbed to the ER. After chromosome segregation, NE is reassembled around the daughter chromosomes. Reassembly of the NE is crucial to organize a functional nucleus and to ensure proper progression of cell cycle. I found that NE containing subdomains characterized by LBR and emerin can be reconstituted by supplying mitotic cytosol and CDK inhibitor to semi-intact mitotic cells. The reconstituted NE is competent for active nuclear transport, showing the integrity of NE. To localization LBR and emerin to chromosome from the mitotic ER, at least two factors are needed. The results of inhibitor effects and immunostaining analysis indicated that the accumulation of LBR-membranes is positively regulated by PP1. It is shown that this newly developed system allows us to elucidate mitotic stage specific regulatory factor(s) for NE formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞核 オルガネラ 核膜 膜タンパク質 核膜孔 セミインタクト細胞 再構成

## 1. 研究開始当初の背景

核膜は染色体を細胞質から隔てることで核機能の効率化に寄与する膜構造体である。核膜近傍での転写制御などが示され、核機能そのものにも関わっていることがわかってきた。間期における動物細胞の核膜は、核外膜、核内膜、核膜孔、核膜の裏打ち構造であるラミナから成る。核外膜は小胞体膜と連続しているため、共通の膜タンパク質が存在し得るが、内膜には核に特徴的な膜タンパク質群が局在している。核と小胞体(ER)は連続した膜構造体であるが、各オルガネラの形成、構造維持、機能発現のためには、膜成分と共にそれぞれのオルガネラ特異的なタンパク質が選択的に供給される必要がある。

ER とゴルジ体間のタンパク質の輸送経路については精力的に研究が進められ、膜小胞輸送経路をはじめとして多くの情報が蓄積していたが、ER から核への輸送機構についての知見は少なく、これまで間期核への膜成分、膜タンパク質は、合成の場である ER から核へ拡散によって供給され積極的な輸送機構はないとされていた。その一方で、核膜タンパク質の核内膜への能動的な輸送経路があることがわかってきた。CDK1/2 阻害剤の影響が核膜成分の供給と、核膜孔の供給(形成)に対して異なるといった興味深い報告もあった。これらはいずれも間期の核に関する報告であり、分裂期染色へのタンパク質の輸送に関しては、間期の核-細胞質間輸送を担うインポーチンファミリーによる輸送経路に関する報告があったが、膜タンパク質の輸送に関する情報は限定されていた。

動物細胞の核は分裂期に入ると崩壊し、核膜タンパク質や核膜孔膜タンパク質は ER に吸収され、可溶性の構成因子のほとんどは細胞質中に放出される。分裂期中期では核膜構造は観察されないが、分裂期後期になると染色体の周囲に分裂期 ER を供給源として核膜が再形成される。分裂期の核膜・核膜タンパク質の輸送経路は、細胞核の構築に必要で次の世代の細胞機能にとって必須なものである。間期核への輸送とは違い、分裂期では膜構造の大きな変化が起きるため、また、核膜孔複合体も同時期に再形成されて外膜内膜間に組込まれる必要があるため、脂質膜、核膜タンパク質、核膜孔複合体の形成が同調的に制御されなければならないが、その分子メカニズムはわかっていない状況であった。

## 2. 研究の目的

核膜は細胞周期を通してダイナミックな膜構造体で、動物細胞では特に分裂期に著しく構造変化する。分裂期に入ると、核膜は崩壊し分裂期 ER と一体化して核膜タンパク質も吸収され、分裂期中期染色体周辺には核膜構造は観察されなくなる。分裂期後期になると核が再形成されるが、その際、核膜タンパク質は再び核へ分配されなければならない。分裂期 ER から核膜タンパク質が選別され、染

色体へ運ばれることが核形成初期に必要である点に着目して、分裂期培養細胞を用いた *in vitro* 核膜再構成系を利用して核膜タンパク質の局在制御機構を明らかにすることを目的とした。これまで、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた核再構成実験や、培養細胞内のタンパク質動態の観察によって、前核膜構造が染色体へ結合することが示されていた。本実験系では染色体と分裂期 ER を細胞内の構造を維持したセミインタクト細胞を材料とするため、染色体と膜構造の空間的位置関係を維持したまま動態を追うことができ、膜成分を分画する際に避けられない構造破壊を回避できると同時に、生化学的アプローチが可能であるといった利点がある。

## 3. 研究の方法

核膜タンパク質であるラミン B レセプター(LBR)とエマリリンにそれぞれ異なる蛍光タンパク質を融合させ、双方を細胞で共発現させた細胞株を用いた。この細胞内では LBR とエマリリンの挙動を同時に観察できる。生細胞内において LBR とエマリリンは分裂期に入ると ER に吸収された後、核膜が再形成される際に染色体周辺に排他的領域に集積する(Clever et al, 2013)。この核膜タンパク質の排他的局在化のメカニズムの詳細はわかっていなかった。上記細胞株をチミジン処理後に洗浄して培養し、大半の細胞が分裂期前期になった時点で、ジギトニンで細胞膜を透過性にしたセミインタクト細胞を調製した。このセミインタクト細胞を洗浄して細胞質成分を除いた後、別途調整した細胞質画分や各種阻害剤、リコンビナントタンパク質、蛍光標識タンパク質などを添加して、LBR とエマリリンの局在変化をタイムラプス観察することで、核膜形成に必要な条件の検討と、核膜形成初期に関わる因子の検索を試みた。細胞質画分として非同調細胞、分裂期前中期に同調した細胞からそれぞれの可溶性画分を調製して用いた。

各条件における反応前後のタンパク質の局在は免疫染色によって確認した。タイムラプス観察した細胞について反応後のタンパク質局在を確認する場合には、タイムラプス観察前後で観察する細胞の位置を特定するためにグリッド付のガラスボトムディッシュを用いた。

## 4. 研究成果

(1)再構成された核膜の核輸送活性: ATP、GTP 存在下で、分裂期細胞質に CDK1 阻害剤もしくは脱リン酸化酵素を添加すると、LBR とエマリリンの両者を染色体周辺へ集積させることができた。分裂期には Cdk1/サイクリン B などリン酸化酵素の活性が高いため、核膜孔複合体構成因子、ラミン、LBR、エマリリンなどのリン酸化によって核膜形成が阻害される状態にあり、リン酸化活性を抑制することで核膜形抑制が解除されると考えられ

る。LBR とエマリンの染色体上への集積領域は、生細胞内で観察される核膜ドメインの排他的な局在パターンと一致していた。その後、染色体分離後の染色体では両膜タンパク質で囲まれた空間が拡大してゆくことが観察された。そこで、核内輸送活性を確認するために BSA に SV40 の核移行シグナルを付加した蛍光プローブを核膜再構成反応に加えた。LBR、エマリンの染色体に局在し、各核膜ドメインに集積した後、蛍光プローブが核内に蓄積するのが観察された。核輸送活性を持つ核膜を、本アッセイ系で再構築できることが確認できた。

しかし、同じ条件下でも染色体分離以前のステージでは LBR、エマリンの集積しても輸送活性が低いかほとんど活性のない核膜しか形成されなかった。再構成された核膜に核膜孔複合体を形成させるためには、染色体分離後に獲得される染色体の状態変化が必要かもしれない。

(2) 核膜孔複合体形成 : *in vitro* で再構成された核膜が輸送活性を示したという結果は、核膜で閉じられた空間ができ、その核膜平面上に核膜孔が形成されたことを意味している。再構成された核膜のなかでも、分離後の染色体周辺に形成された核膜は高い輸送活性を示し、分裂期中期染色体の場合は、LBR とエマリンの集積していても輸送活性は低かった。中期染色体には核膜タンパク質や膜成分が集積する一方で、核膜孔は構築されないことがわかった。核膜孔複合体形成初期に形成の足場となる染色体の状態の違い、もしくは染色体分離前後の細胞状態が影響していることが予想された。

核膜孔複合体の中でも複合体形成の初期に必要な構成因子として知られる ELYS/Mel28 についてセミインタクト細胞内の局在をみると、中期染色体と後期染色体上での局在が異なることがわかった。中期染色体ではセントロメアに、後期染色体では LBR が局在する核膜ドメインと一致する領域に ELYS が分布する。核膜孔複合体形成の初期に必要な構成因子が染色体上の局在を変えること、もしくは局在を変えるための染色体の状態変化が核膜孔形成に必要なかもしれない。

(3) エマリンの染色体局在化 : エマリンの染色体への局在化の程度は非同調細胞質と、分裂期細胞質とで大きく異なる。非同調細胞質中ではエマリンは染色体に集積しないのに対し、上述した通り、分裂期細胞質を用いれば ATP、GTP 存在下で、CDK1 阻害剤もしくは脱リン酸化酵素を添加すれば染色体上へ集積させることができる。両細胞質画分間の大きな違いはリン酸化状態と核タンパク質の含有量である。エマリンの染色体局在化は DNA 結合タンパク質である BAF を介していることが知られている。BAF は核タンパク

質であるため、非同調細胞質にはエマリンの局在化のために必要な量が含まれていない可能性がある。ATP、GTP 存在下で、分裂期細胞質に CDK1 阻害剤だけでなく脱リン酸化酵素を追加するとエマリンは染色体近傍まで集積するが染色体へ局在しなくなる。分裂期におけるリン酸化 / 脱リン酸化状態のバランスが重要であることを示唆している。

エマリンの染色体への局在化・集積は、異なる分裂期ステージで同じように観察され、染色体分離前後で変わることはない。セミインタクト細胞側の状態 (染色体、膜構造など) ではなく、細胞質による影響を受け易いと見える。

#### (4) LBR の染色体局在化

細胞質依存的な染色体局在化 : エマリンとは異なり、LBR は ATP、GTP 存在下であれば、非同調細胞質中で染色体上に集積する。また、分裂期細胞質中では、エマリンの場合と同じ条件下、つまり ATP、GTP、CDK1 阻害剤もしくは脱リン酸化酵素の添加によって染色体へ集積する。以上から、LBR を集積させるには、細胞質因子が必要であること、分裂期細胞質中ではその活性が抑制されていてリン酸化を抑制すると活性化されることを示している。また、この細胞質因子は、エマリンの染色体局在化に必要な因子とは異なることがわかる。従って、核膜タンパク質群を染色体へ局在化させるためには少なくとも 2 つ以上の因子が必要であることがわかる。

細胞質非依存的な染色体局在化 : 以上の LBR の細胞質依存的な局在化は、染色体分離前の中期染色体を観察して得られた結果で、染色体分離後の娘染色体には細胞質が存在しなくても LBR が集積する。この細胞質非依存的な LBR の染色体局在化は ATP、GTP の加水分解が必要であったため、セミインタクト細胞中に残存している何らかの活性因子の存在が予想された。この活性は、キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンや Aurora B キナーゼ阻害剤の ZM44739 では阻害されず、ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸ホスファターゼ-1 (PP1) 阻害剤である Inhibitor-2 で阻害された。そこで、まず分裂期に活性化されるホスファターゼの 1 つである PP1- $\gamma$  について、セミインタクト細胞内に存在するかどうかについて以下のようにして調べた。

PP1- $\gamma$  の蛍光タンパク質融合体 (PP1- $\gamma$ -FL) を発現させた細胞株からセミインタクト細胞を調製し、染色体上に PP1- $\gamma$ -FL 由来の蛍光が観察されるか調べると、中期染色体、後期染色体双方に PP1- $\gamma$ -FL が存在していることがわかった。次に、同セミインタクト細胞を ATP、GTP のみで反応させると PP1- $\gamma$ -FL は後期染色体にのみ観察され、中期染色体にはみられなかった。さらに、細胞質画分 PP1- $\gamma$  が染色体に局在し得るかについて調べるために、通常の (何も発現させていない) HeLa

細胞からセミインタクト細胞を作成し、別途 PP1- $\gamma$ -FL 発現株から調整した細胞質画分と反応させた。その結果、細胞質画分の PP1- $\gamma$ -FL は中期染色体、後期染色体の双方に局在することを確認した。以上の結果は、PP1- $\gamma$  と LBR の染色体局在化条件が一致していることを示しており、セミインタクト細胞内に残存するホスファターゼ活性、細胞質画分の局在化因子が PP1- $\gamma$  である可能性を示している。しかし、PP1- $\gamma$  の染色体上での局在領域には偏りがなく、LBR の核膜ドメインのパターン形成には別の因子が関与することが予想される。

LBR が集積する染色体領域は核膜孔複合体構成因子群が核膜形成初期に集積する領域と一致する。そこで、LBR と ELYS/Mel28 のセミインタクト細胞内での局在が一致するか調べた。(2) に記したように、ELYS は中期染色体ではセントロメアに、後期染色体上では LBR が局在する核膜ドメインと一致する領域に分布する。ATP、GTP 存在下で細胞質画分を加えないで反応させると後期染色体には LBR と同様に染色体に局在したまま残っているが、中期染色体セントロメアの ELYS は検出されなくなり、LBR が染色体へ運ばれることはない。細胞質非依存的な LBR の染色体局在化の条件や集積領域は ELYS/Mel28 と一致することがわかった。今後、PP1- $\gamma$  の染色体局在や活性と ELYS や LBR の染色体集積の関係、ATP、GTP を必要とする反応について検討する必要がある。

複雑な核膜形成機序について分裂期の異なるステージで必要な制御因子群の同定のためには、今後より詳細な解析が必要である。本再構成系がその一助となることを期待する。

## 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3件)

1. Clever M, Mimura Y, Funakoshi T, and Imamoto N. "Regulation and coordination of nuclear envelope and nuclear pore complex assembly" *Nucleus*. 2013;4(2):105-114. doi: 10.4161/nucl.23796. 査読有り
2. Imamoto N, Funakoshi T. "Nuclear pore dynamics during the cell cycle" *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(4):453-459. doi: 10.1016/j.ceb.2012.06.004. 査読有り
3. Clever M, Funakoshi T, Mimura Y, Takagi M, and Imamoto N. "The nucleoporin ELYS/Mel28 regulates nuclear envelope subdomain formation in HeLa cells" *Nucleus*. 2012; 3 (2):187-199. doi:

10.4161/nucl.19595. 査読有り

[学会発表](計5件)

1. 船越 智子、今本 尚子「分裂期セミインタクト細胞を用いた核膜形成機構の解析」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)
2. 船越 智子、今本 尚子 "Reconstitution of nuclear envelope subdomain formation in mitotic semi-intact human cells" 第30回染色体ワークショップ・第11回核ダイナミクス研究会、2012年12月20日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)
3. 船越 智子、今本 尚子「分裂期セミインタクト細胞を用いた核膜形成機構の解析」第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
4. 船越 智子、今本 尚子 "Novel approach to study human nuclear envelope assembly: combination of live imaging and in vitro reconstitution system" 理研シンポジウム「先端光科学研究会」2012年12月4日、理化学研究所(埼玉県和光市)
5. Funakoshi T, and Imamoto N. "Post-mitotic nuclear envelope assembly examined in the in vitro reconstitution system" Cols Spring Harbor Meeting on Dynamics Organization of Nuclear Function. 2012.9.29. New York (USA)

[図書](計2件)

1. Kose S, Funakoshi T, and Imamoto N. Springer New York, *Methods Mol Biol*. Nuclear Bodies and Noncoding RNAs, "Reconstitution of Nucleocytoplasmic Transport Using Digitonin-permeabilized Cells" (2015) 1262: 351(291-303). doi: 10.1007/978-1-4939-2253-6\_18.
2. Maeshima K, Funakoshi T, and Imamoto N. Elsevier Inc. *Methods Cell Biol*. Nuclear Pore Complexes and Nucleocytoplasmic Transport-Methods. "Cell-Fusion Method to Visualize Interphase Nuclear Pore Formation" (2014) 122: 508(239-254). doi: 10.1016/B978-0-12-417160-2.00011-4.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

船越 智子 (Funakoshi, Tomoko)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・特任研究員

研究者番号：90318460