

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570227

研究課題名(和文) 2核性単細胞生物テトラヒメナの核分化に働く核膜孔複合体タンパク質の同定

研究課題名(英文) Identification of nuclear pore complex proteins involved in nuclear differentiation of bi-nucleated unicellular organism Tetrahymena

研究代表者

岩本 政明 (IWAMOTO, MASAOKI)

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：80450683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ひとつの細胞に二つの核を持つ単細胞生物テトラヒメナの核膜孔複合体を構成するタンパク質成分を網羅的に同定した。これによって大核と小核の核膜孔複合体の全体構造を比較することができるようになり、両者の構造がどのように異なっているのかを明らかにすることができた。さらに、構造の違いを生み出しているいくつかの成分の分子機能を解析し、大核と小核の分化過程に決定的な役割をもつと考えられる成分の特定に成功した。このことは、核の機能的分化の仕組みを理解するための重要な知見となるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, nuclear pore complex proteins of the binucleated unicellular organism Tetrahymena were comprehensively identified. Hereby, it became clear how some of the nuclear pore complex components were different between macronucleus and micronucleus. I studied the molecular functions of some components involved in generating of the structural difference between them, and successfully found probable components that had a major role in nuclear differentiation. This finding provides a new insight into understanding the mechanism that causes nuclear differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核膜孔複合体 スクレオポリン 2核性 繊毛虫 テトラヒメナ 核分化

1. 研究開始当初の背景

単細胞生物の繊毛虫類は、体細胞核に相当する大核と、生殖核に相当する小核という機能的に異なる2種類の核を持つことから、核の分化と機能制御の研究に適した生物材料となっている。2核の機能と内部構造の違いについては多くの研究が行われているが、1個の受精核から2種類の核がどのように分化していくのか、その仕組みは未だによく分かっていない。申請者らは、繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) では、核膜孔複合体 (nuclear pore complex; NPC) を構成するタンパク質成分 (ヌクレオポリン; Nup) の一種である Nup98 の特徴的なアミノ酸配列が大核と小核では大きく異なっていること、さらにそのことがそれぞれの核に特異的なリンカーヒストンの運び分けに深く関与していることを明らかにした (Iwamoto et al., Curr. Biol. 2009; 19: 843 - 847)。染色体構造と遺伝子発現制御に関与するリンカーヒストンが、核膜孔複合体の部分的な違いに依存して運び分けされている事実は、核膜孔複合体が、核の構造と機能を差別化する重要な要因であることを強く示唆するものである。したがって申請者らは、核膜孔複合体の構造の違いこそが核分化の分子基盤ではないかと考えるに至った。しかしながら、テトラヒメナのヌクレオポリンは未だ一部しか同定されていなかったため、大核と小核の核膜孔複合体全体の構造を比較し、特異的な核タンパク質の運び分けと核分化に決定的に作用する構造上の違いを十分に検討することができない状態であった。

2. 研究の目的

本研究は、繊毛虫の核分化の分子基盤となっている核膜孔複合体の構成成分を見出すことを目的とした。様々なモデル生物を用いた研究から、一般的にヌクレオポリンは30種類存在するとされているが、テトラヒメナでは13種類しか同定されていない。そこで、(1)テトラヒメナにおける未同定のヌクレオポリンの探索を行って、テトラヒメナの核膜孔複合体の構造を網羅すること、(2)大核と小核の核膜孔複合体の全体構造を比較し、機能的な差を生み出すことに関わっている成分の候補を選定、(3)それらを機能解析することによって核分化に決定的な働きを持つヌクレオポリンの分子種を特定することを目指した。

3. 研究の方法

これまでに同定されているヌクレオポリンに緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグを付けたものをテトラヒメナに発現させ、その細胞抽出液から抗 GFP 抗体ビーズによって GFP-ヌクレオポリンを回収し、共沈してきたタンパク質成分をマスペクトロメトリーで解析した。検出されたアミノ酸部分配

列を精査し、ヌクレオポリンと予想されるものについては cDNA をクローニングして、それらの GFP 融合体が核膜孔複合体に局在するヌクレオポリンであることを確認した。このようにして同定した新たなヌクレオポリンをベイトにして共沈実験以降の過程を繰り返し、更なるヌクレオポリンの同定を行った。

新規に同定された成分のうち、大核と小核で異なる局在を示したものについて、分子機能を明らかにするため遺伝子ノックアウト株の作成を行い、表現型の解析を試みた。

4. 研究成果

本研究により、これまでほとんど同定できていなかった Nup107-160 サブコンプレックスの構成要素を含む主要なヌクレオポリンのほぼ全てを同定することができた。これによってテトラヒメナの大核と小核の核膜孔複合体の全体構造が解明され、両者間で異なっている成分、構造部位が明らかになった。核機能の分化に特に重要な働きを持つと思われる複数のヌクレオポリンについて、それらの遺伝子を改変した変異細胞株を作成し、核分化に及ぼす影響を調べたところ、核分化過程に重篤な影響を生じるヌクレオポリンが存在することを突き止めた。現在このヌクレオポリンの詳細な分子機能を明らかにするため、更なる解析を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

岩本政明、荒神尚子、小坂田裕子、森知栄、梶谷知子、松田厚志、浅川東彦、平岡泰、原口徳子、Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in *Tetrahymena*, *Journal of Cell Science*, 査読有、Vol.128、No.9、2015、pp.1812 - 1823、DOI:10.1242/jcs.167353

浅川東彦、楊恵如、山本孝治、大槻千鶴、近重裕次、十川久美子、徳永万喜洋、岩本政明、平岡泰、原口徳子、Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleus*, 査読有、Vol.5、No.2、2014、pp.149 - 162、DOI:10.4161/nucl.28487

岩本政明、森知栄、平岡泰、原口徳子、Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate *Tetrahymena*, *Gene*, 査読有、Vol.534、No.2、2014、pp.249 - 255、DOI:10.1016/j.gene.2013.10.049

岩本政明、浅川東彦、大槻千鶴、小坂田裕子、荒神尚子、平岡泰、原口徳子、Monoclonal antibodies recognize Gly-Leu-Phe-Gly repeat of nucleoporin Nup98 of *Tetrahymena*, yeasts, and humans, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 査読有、Vol.32、No.2、2013、pp.81 - 90、DOI:10.1089/mab.2012.0118

[学会発表](計14件)

岩本政明、二核性繊毛虫テトラヒメナの核膜孔複合体と核-細胞質間輸送、第84回日本寄生虫学会大会、2015年3月21日、杏林大学三鷹キャンパス(東京都三鷹市)

岩本政明、荒神尚子、小坂田裕子、森知栄、平岡泰、原口徳子、繊毛虫の大核と小核を分ける核膜孔複合体の構造と機能、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25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、テトラヒメナのヒストン修飾の観察、第47回日本原生生物学会大会、2014年11月2日、宮城教育大学(宮城県仙台市)

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、繊毛虫テトラヒメナの核膜孔複合体:その構造の進化的な共通性と特殊性、第66回日本細胞生物学会大会、2014年6月12日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

浅川東彦、楊恵如、山本孝治、大槻千鶴、近重裕次、十川久美子、徳永万喜洋、岩本政明、平岡泰、原口徳子、分裂酵母における核膜孔複合体の構成と機能、第66回日本細胞生物学会大会、2014年6月11日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

岩本政明、小坂田裕子、森知栄、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、大小核をもつテトラヒメナの核膜孔複合体構成因子の網羅的解析、第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会、2013年11月26日、ホテルおかだ(神奈川県足柄下郡箱根町)

岩本政明、小坂田裕子、森知栄、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、Comprehensive characterization of nucleoporins reveals structural difference between MAC and MIC nuclear pore complexes of *Tetrahymena thermophila*, *FASEB Science Research Conferences, Ciliate Molecular Biology*,

2013年7月11日、コロラド州スチームボートスプリングス(米国)

岩本政明、小坂田裕子、森知栄、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、テトラヒメナの大小核の核膜孔複合体を構成するヌクレオポリンタンパク質の網羅的探索、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21日、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

岩本政明、荒神尚子、武内史英、小坂田裕子、森知栄、糀谷知子、平岡泰、原口徳子、核膜孔複合体が二核性生物テトラヒメナの核分化を決定する、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

岩本政明、小坂田裕子、森知栄、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子、テトラヒメナにおける核膜孔複合体タンパク質の網羅的探索、第45回日本原生動物学会、2012年11月25日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス(兵庫県姫路市)

原口徳子、岩本政明、武内史英、荒神尚子、小坂田裕子、森知栄、糀谷知子、平岡泰、The nuclear pore complex determines nuclear differentiation in ciliate *Tetrahymena thermophila*, *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Dynamic Organization of Functional Nucleus*, 2012年9月29日、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(米国)

岩本政明、荒神尚子、武内史英、小坂田裕子、森知栄、浅川東彦、平岡泰、原口徳子、Biased assembly of the nuclear pore complex determines nuclear differentiation in the ciliate *Tetrahymena thermophila*, 第45回発生生物学会・第64回細胞生物学会合同大会、2012年5月29日、神戸国際会議場・神戸商工会議所(兵庫県神戸市)

原口徳子、岩本政明、小坂田裕子、森知栄、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、Identification of nuclear localization signals to distinguish macronucleus and micronucleus in binucleated *Tetrahymena thermophila*, 第45回発生生物学会・第64回細胞生物学会合同大会、2012年5月29日、神戸国際会議場・神戸商工会議所(兵庫県神戸市)

原口徳子、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、岩本政明、小林昇平、浅川東彦、平岡泰、ライブクレム法:分子ダイナミ

クスを高分解能で観察する方法、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会、2012 年 5 月 15 日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

〔図書〕(計 2 件)

原口徳子、岩本政明、(株)化学同人、染色体と細胞核のダイナミクス、第 9 章 核膜の機能・構造・ダイナミクス、2013、総ページ数 224 (pp.129 - 145)

岩本政明、(独)情報通信研究機構、情報通信の未来をつくる研究者たち、2 種類の遺伝情報を使い分けて生きるテトラヒメナ 単細胞生物の高度な生存戦略、2012、総ページ数 250 (pp.192 - 195)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：核膜孔タンパク質 Nup98 を特異的に認識するモノクローナル抗体
発明者：原口徳子、岩本政明
権利者：独立行政法人情報通信研究機構
種類：特許
番号：特願 2013-061612
出願年月日：2013 年 3 月 25 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 政明 (IWAMOTO MASA AKI)

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：8 0 4 5 0 6 8 3