

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770187

研究課題名(和文) ヴァーチャルな核膜崩壊をもたらす核膜機能調節メカニズムの研究

研究課題名(英文) Mechanism of virtual nuclear envelope breakdown

研究代表者

浅川 東彦 (Asakawa, Haruhiko)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：70399533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母の減数分裂では核膜や核膜孔の構造を維持しながらも核膜透過性が増大し、機能的に核膜崩壊と同じ効果をもたらす現象が起こる(ヴァーチャルな核膜崩壊：V-NEBD)。本研究はV-NEBDに対する核膜孔複合体の役割を明らかにすることを目的として、分裂酵母の核膜孔複合体を構成する約30種類のタンパク質について局在と発現量を網羅的に解析し、分裂酵母の核膜孔複合体が特異な構成をとることを明らかにした。さらに核膜孔複合体の遺伝子破壊実験の結果、V-NEBDのタイミングを調節すると考えられる核膜孔複合体の遺伝子を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：In fission yeast, a phenomenon functionally equivalent of nuclear envelope breakdown (virtual nuclear envelope breakdown: V-NEBD) occurs in meiosis to increase nuclear envelope permeability with maintenance of nuclear envelope and nuclear pore structure. To understand the function of nuclear pore complex on the V-NEBD, about 30 proteins composing nuclear pore complex were characterized by their localizations and expression levels. These analyses suggested the unique composition of nuclear pore complex in fission yeast. In addition, gene disruption analysis of the nuclear pore complex genes revealed a gene that regulates the timing of V-NEBD.

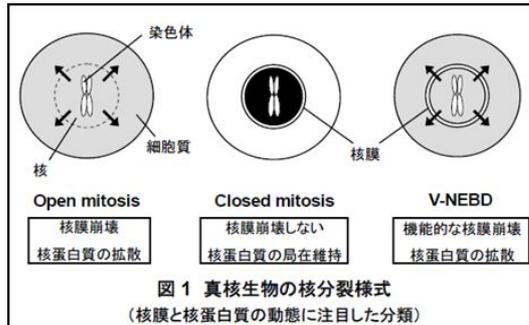
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核構造 核膜孔複合体 核膜 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞核は核膜によって細胞質と隔てられた構造体である。間期では、核-細胞質間の物質輸送は核膜孔複合体と呼ばれる蛋白質複合体を通しておこなわれる。分裂期では高等真核生物では核膜が崩壊して核膜孔複合体も分散するため(open mitosis)、核と細胞質が均一化する。一方、酵母などの下等真核生物では、核分裂過程で核膜は保持され(closed mitosis)、核蛋白質は全生活環を通して核内に保たれると考えられていた(図1)。



分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は分裂期で核膜が崩壊しない生物のひとつである。研究代表者が核移行シグナル配列をもった GFP 蛋白質 (GFP-NLS) を分裂酵母細胞で発現させると、体細胞分裂では GFP 蛋白質が核内に保たれたままで核分裂が進行したが、減数分裂を誘導した細胞では減数第二分裂において GFP-NLS が核内から細胞全体へと拡散する現象が見られた。研究代表者らはこの現象について研究をおこない、内在性の核蛋白質も減数第二分裂で核から細胞質に核酸すること、その際に核膜と核膜孔複合体が構造として維持されていることを確認した。原因となる因子を検索したところ、核-細胞質間の物質輸送に必須で通常は細胞質に局在している RanGTPase 活性化因子 (RanGAP1) が時期特異的に核に流入することがわかり、また人為的に RanGAP1 を核内に局在変化させるだけで核蛋白質が核から細胞全体へ拡散したことから、RanGAP1 がこの現象を促進する因子であることがわかった。さらに、これらの現象は減数分裂に続いて起こる胞子形成と密接に関係することもわかった。この現象を核膜や核膜孔の構造を維持しながらも機能的な核膜崩壊が起る「ヴァーチャルな核膜崩壊 (Virtual Nuclear Envelope Breakdown: V-NEBD)」と名付けた(図1)。その後、研究が進展する一方で、RanGAP1 の局在変化をもたらす分子機構ならびに V-NEBD の生物学的意義については未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、V-NEBD またはその指標となる RanGAP1 の局在変化をもたらす分子機構を解明することである。V-NEBD の際にも核膜構造は維持されるので、生体物質の流入・流出輸送は核膜孔を介することが予想さ

れることから、核膜孔複合体が果たす役割に注目し V-NEBD における役割を明らかにする。また、V-NEBD の生物学的意義の解明につながる基礎技術として、V-NEBD を経て形成される胞子細胞を単離する技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) 分裂酵母の核膜孔複合体を構成する因子 (ヌクレオポリン) の同定

出芽酵母や動物細胞に比べて、分裂酵母ではヌクレオポリンとして同定されたタンパク質の種類が少ないため、まず分裂酵母のゲノム情報のデータベースから、ヌクレオポリンと相同なタンパク質をコードする遺伝子を検索した。検索で見つかった遺伝子と機能のヌクレオポリンの遺伝子に GFP の遺伝子を融合し、核膜局在を確認できたものを分裂酵母のヌクレオポリンとして同定した。Nup132 の遺伝子を破壊すると NPC が核膜上でクラスターすることが知られているため、特に確認が必要なものについては、Nup132 の遺伝子を破壊した株を用いて、遺伝子産物が NPC と同様にクラスターした局在を示すかどうかを確認した。

(2) 生化学によるヌクレオポリンの発現量解析

GFP 融合ヌクレオポリンを発現する分裂酵母の細胞株から細胞抽出液を調整し、抗 GFP 抗体を用い Western blot 解析をおこなった。Chemiluminescence の蛍光強度をイメージアナライザーで測定することでヌクレオポリンの量を定量した。

(3) DeltaVision による生細胞中のヌクレオポリンの発現量解析

GFP 融合ヌクレオポリンを発現する細胞を生きたまま DeltaVision 蛍光イメージングシステムで観察し、蛍光像を取得した。個々の GFP 融合ヌクレオポリン発現株をすべて同じ条件で画像取得した。画像は z スタックイメージとして取得し、核の赤道面を捉えたイメージから、細胞ごとのヌクレオポリンの蛍光強度を測定した。

(4) 薄層斜光照明法 (HILO microscopy) によるヌクレオポリンの発現量解析

個々の NPC を識別して GFP の蛍光強度を測定するために、薄層斜光照明法 (HILO microscopy) を用いた。この照明法を用いると細胞核表面を含む薄層領域に限定的に励起光を照射することによって核膜上の NPC に含まれる GFP 融合ヌクレオポリンの蛍光を励起することができる。生細胞を試料として得られた画像から、単一のスポットとして蛍光強度を測定できるシグナルをひとつの NPC の蛍光として、蛍光強度を測定した。

(5) ヌクレオポリンの遺伝子破壊株の解析

生育に必須であるかどうか報告されていないヌクレオポリンに関して、遺伝子破壊をおこなった。生育に必須でないヌクレオポリンの遺伝子破壊株を用いて、温度感受性、薬剤感受性、減数分裂の進行を解析した。温度感受性は20度、26度、30度、36度で調べた。薬剤感受性についてはDNA複製に必要なリボヌクレオチドレダクターゼの機能を阻害する薬剤であるヒドロキシウレアと、微小管重合阻害剤であるチアベンダゾールの存在下での増殖能を調べた。減数分裂の進行については、減数分裂の最終産物である胞子の形成率を調べ、さらに生育可能な胞子の割合を調べることで、減数分裂が正常に進行したかの指標とした。また核移行シグナルを付加したGFPタンパク質を細胞内で発現させることによってV-NEBDの様子を観察した。

(6) 胞子細胞の単離

分裂酵母は胞子形成培地で培養することで高頻度に胞子形成を誘導することが出来る。胞子形成培地で培養した細胞を集菌し、 β -グルクロニダーゼで処理することで栄養細胞を選択的に消化した。その後遠心分離によって、消化した栄養細胞の破砕物と胞子細胞を分画した。

4. 研究成果

(1) ヌクレオポリンタンパク質の網羅的同定

分裂酵母のヌクレオポリンタンパク質について種類や構成が不明であったため、ゲノムデータベースから他の真核生物のヌクレオポリンと相同なタンパク質を検索した。機知のヌクレオポリンを含め31種類のタンパク質(Cut11, Nup85, Nup107, Nup120, Nup131, Nup132, Nup189c, Seh1, Nup97(Mug87), Npp106, Nup186, Nup40, Nsp1, Nup44, Nup45, Nup146, Nup61, Nup124, Nup211, Nup189n, Rae1, Ely5, Nup37, Pom34(Mug31), Pom152, Nup184, Nup155, Nup82, Nup60, Amo1, Tts1)についてGFP融合タンパク質を分裂酵母細胞内で発現させたところ、核膜に局在することが確認できたため、ヌクレオポリンとして以降の解析に用いた。他の真核生物でヌクレオポリンであるとされているSec13は、分裂酵母では核膜局在は見られなかった。

(2) ヌクレオポリンの発現量の測定

(1)で作製したGFP融合ヌクレオポリンについてヌクレオポリンの種類によって蛍光強度に違いがあったため、ヌクレオポリンの発現量を調べた。GFP融合ヌクレオポリンを発現する各細胞株を使って生きたまま蛍光顕微鏡で観察し、核膜に局在するGFPの蛍光シグナルの強度を個々の細胞ごとに計測したところ、ヌクレオポリンの種類によって蛍光強度に差があることがわかった(図2)。中でも、Nup107-Nup160サブ複合体を構成する因子と考えられるNup131, Nup107, Seh1,

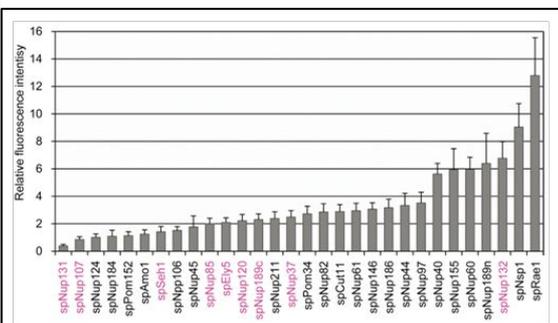


図2 GFP融合ヌクレオポリンの核あたりの蛍光強度 (Nup107-Nup160サブ複合体の因子をマゼンタで示している。)

Nup85, Ely5, Nup120, Nup37, Nup132は、他の真核生物では1分子ずつが相互作用してひとつのユニットを形成していると考えられているのに対して、Nup131, Nup107が少なく、Nup132が多いという結果が得られた。このことは蛍光顕微鏡での計測だけではなく生化学解析からも裏付けられた(図3)。さらに薄層斜光照明法(HILO microscopy)を用いて核膜表面のNPCの画像を取得し、NPCあたりのヌクレオポリンの量を調べたところ、同様にNup131, Nup107が少なく、Nup132が多いという結果が得られた。このことは分裂酵母のNPCの構成が他に類を見ないものであることを示唆している。

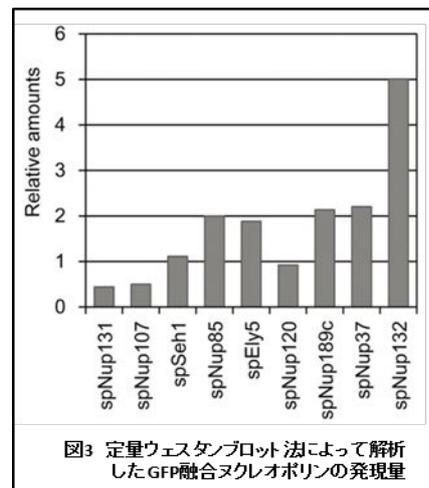


図3 定量ウェスタンブロット法によって解析したGFP融合ヌクレオポリンの発現量

(3) 分裂酵母の栄養増殖に対するヌクレオポリンの必要性

ヌクレオポリンとして同定したタンパク質のうち、Nup120, Nup131, Nup132, Seh1, Npp106, Nup184, Nup40, Nup61, Nup124, Amo1が栄養増殖に必須ではないヌクレオポリンとしてすでに知られている。栄養増殖に対しての必要性が明らかでないものを対象に遺伝子破壊実験をおこなった。その結果、Nup189c, Nup155, Nup82, Nup189nは生育に必須で、Pom34(Mug31), Pom152, Ely5, Nup37, Nup60は栄養増殖に必須ではないことがわかった。

(4) 栄養増殖に非必須のヌクレオポリンの機能

栄養増殖に必須ではないヌクレオポリン

の役割を調べるために、ヌクレオポリン遺伝子破壊株を様々な環境下で培養し、異常がないかを調べた。生育温度の影響を調べたところ、nup120 遺伝子破壊株は高温感受性を示し、通常の温度や低温でも生育の遅延が観察された。npp106 遺伝子破壊株や amo1 遺伝子破壊株も、程度は弱いものの、高温感受性を示した。また DNA 合成阻害剤や微小管重合阻害剤の存在下での増殖を調べたところ、ely5, nup132, nup60, nup124, nup120 のそれぞれの遺伝子破壊株が DNA 合成阻害剤に感受性を、pom152, nup120, ely5, nu132, npp106, nup124 のそれぞれの遺伝子破壊株が微小管重合阻害剤に感受性を示した。これらの結果は栄養増殖に必須ではないヌクレオポリンが、異常な環境下でのゲノムの安定性に関与している可能性を示している。

(5) 減数分裂におけるヌクレオポリンの機能

栄養増殖に必須ではないヌクレオポリンが減数分裂に何らかの機能をもつかどうかを調べるために、ヌクレオポリン遺伝子破壊株に減数分裂を誘導し、胞子を形成させた。その結果、nup132, nup37, ely5, nup120, pom152, npp106, nup124, nup61 の遺伝子破壊株では、正常に 4 個の胞子を形成した細胞以外に、胞子を 3 個以下しか形成しない細胞が 30-40% 程度観察された。またそれぞれの遺伝子破壊株が形成した胞子の生存率を調べたところ、nup131, nup37, seh1, ely5, pom152, pom34, nup184, npp106, nup124, nup60, nup61 の遺伝子破壊株は野生型に比べ 4-7 割程度の胞子しか生存できないことがわかった。この結果はヌクレオポリンが栄養増殖以外に減数分裂に特異的な機能を持っていることを示している。

(6) ヌクレオポリンの V-NEBD における機能

栄養増殖に必須ではないヌクレオポリンについて遺伝子破壊株の減数分裂過程を生細胞観察した。核蛋白質のマーカーとして、核移行シグナルを付加した GFP (GFP-NLS) の挙動を観察した結果、nup132 遺伝子を欠損した細胞では V-NEBD が通常とは異なり減数第一分裂で起こることがわかった。

(7) Nup132 の機能解析

Nup132 の機能を解明するために nup132 遺伝子破壊株における細胞核構造について解析を進めた。その結果、野生型では核膜上に均一に分布する NPC が、Nup132 欠損細胞では栄養源の枯渇とともに偏った分布を示すことがわかった。これらの結果は Nup132 が核-細胞質間輸送に関する機能だけでなく、核の構造を維持する何らかの機能をもち、その調節が V-NEBD や胞子形成にも重要な役割を果たす可能性を示唆している。

(8) Nup131 の機能解析

分裂酵母には Nup131 という Nup132 パラログが存在するが、nup131 遺伝子を欠損した細胞では V-NEBD の異常は見られなかった。また、Nup132 遺伝子破壊株の核構造異常の表現型は、Nup131 の発現では相補されなかった。nup131 遺伝子を破壊しても細胞は TBZ や HU の存在下でも野生型株と同様に増殖できたことから、Nup132 と Nup131 には機能に違いがあることが示唆された。

(9) V-NEBD の生物学的意義の解明のための胞子細胞単離

V-NEBD は胞子形成と相関関係があるため、胞子細胞を解析することは V-NEBD の意義を見いだすために重要である。栄養細胞の細胞壁を消化処理する α -グルクロニダーゼを用いることにより、胞子形成を誘導した細胞群から胞子細胞を選択的に分離することに成功した。予定していた細胞核単離には至らなかった。分離した胞子細胞は今後の V-NEBD の研究のためにも重要な試料となる。

以上の成果のうち、分裂酵母のヌクレオポリンの発現量および機能について解析した成果を *Nucleus* 誌に投稿し、掲載された。また、ヌクレオポリンのうち Nup98 に関する成果を *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 誌に投稿し、掲載された。V-NEBD の際の核膜構造の解析に使用したライブ CLEM イメージング法についての論文を *Micron* 誌に投稿し、掲載された。

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)

Asakawa H, Yang H-J, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2014) Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleus* 5(2): 印刷中. DOI:10.4161/nucl.28487、査読有

Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2014) A method of correlative light and electron microscopy for yeast cells. *Micron* 61: 53-61. DOI:10.1016/j.micron.2014.02.007、査読有

Iwamoto M, Asakawa H, Ohtsuki C, Osakada H, Koujin T, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2013) Monoclonal antibodies raised against GLFG repeat of Nucleoporin Nup98 from Tetrahymena, yeast to human. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 32(2): 81-90. DOI:10.1089/mab.2012.0118、査読有

〔学会発表〕(計9件)

丹下喜恵, 浅川東彦, 原口徳子, 平岡 泰.
染色体安定性に関わる分裂酵母核膜タン
パク質. 第36回日本分子生物学会年会.
2013年12月5日. 神戸ポートアイランド,
神戸市

Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T,
Hiraoka Y. Nup132, a NPC scaffolding
protein, mediates meiotic progression
in the fission yeast
Schizosaccharomyces pombe. EMBO
Conference on Meiosis. 2013年9月17
日. Hotel Radisson Blu,
Radebeul-Dresden, Germany

Tange Y, Asakawa H, Yang H-J, Chikashige
Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Fission yeast
nuclear membrane proteins that affect
chromosome movements. The seventh
international fission yeast meeting,
EMBO Conference on Fission Yeast:
pombe2013. 2013年6月29日, Senate
House, London, UK

Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H,
Chikashige Y, Haraguchi T, Masukata H,
Hiraoka Y. Meiotic nuclear movement in
fission yeast is prolonged by stalled
DNA replication through a
Cds1-dependent checkpoint pathway. The
seventh international fission yeast
meeting, EMBO Conference on Fission
Yeast: pombe2013. 2013年6月24-29日,
Senate House, London, UK

浅川東彦, 大槻千鶴, 十川久美子, 徳永
万喜洋, 平岡 泰, 原口徳子. GFP融合ヌ
クレオポリンを用いた分裂酵母核膜孔複
合体の構成の解析. 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
(共同開催). 2012年12月20日. 淡路
夢舞台国際会議場, 兵庫県淡路市

Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Hiraoka
Y. The replication stress causes
prolonged nuclear movement and
chromosome decompaction in fission
yeast. 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(共同開催).
2012年12月20日. 淡路夢舞台国際会議
場, 兵庫県淡路市

Ruan K, 山本孝治, 浅川東彦, 平岡 泰.
減数分裂期のDNA複製の欠損は分裂酵母
のhorsetail核運動時間の伸長とクロマ
チン構造異常をもたらす. 第35回日本分
子生物学会年会. 2012年12月13日. 福
岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡市
Asakawa H, Chikashige Y, Ohtsuki C,
Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T.
Organization of the nuclear pore
complex in fission yeast
Schizosaccharomyces pombe. 第45回日
本発生生物学会・第64回日本細胞生物学

会合同大会. 2012年5月31日. 神戸国際
会議場, 神戸市

Iwamoto M, Koujin T, Bunai F, Osakada H,
Mori C, Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi
T. Biased assembly of the nuclear pore
complex determines nuclear
differentiation in the ciliate
Tetrahymena thermophila. 第45回日本
発生生物学会・第64回日本細胞生物学会
合同大会. 2012年5月29日. 神戸国際会
議場, 神戸市

〔図書〕(計1件)

Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T.
Formatex Research Center (Badajoz,
Spain). "Live CLEM imaging: an
application for yeast cells". in:
*Current microscopy contributions to
advances in science and technology, vol.
1*, 2012, pp.478-485

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院生命機能研究科 細胞核
ダイナミクス研究室:
[http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/gene
ral/lab/07/](http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/07/)

Hiraoka Laboratory:

[http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hir
aoka/index.html](http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hir
aoka/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 東彦 (ASAKAWA, Haruhiko)
大阪大学大学院生命機能研究科・助教
研究者番号: 70399533