

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440098

研究課題名(和文)核膜孔複合体タンパク質による核構造構築の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of nuclear structures regulated by nuclear pore complex proteins

研究代表者

浅川 東彦 (ASAKAWA, Haruhiko)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：70399533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生育に非必須の核膜孔複合体タンパク質Nup132が減数第一分裂に必要な動原体構造の構築および動原体と微小管の接着に必須であることを明らかにし、核膜孔複合体が減数分裂期の染色体分配に関与することを初めて示した。Nup98、Nup96の発現調節機構を明らかにし、これらの機構は分裂酵母の通常の培養条件下では重要ではないことを発見した。核膜タンパク質Lem2がセントロメアヘテロクロマチンの調節に必要であることがわかった。ヒストン修飾に対する新規蛍光プローブを開発し生細胞でイメージングすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We found that a non-essential nuclear pore complex protein Nup132 is essential for establishment of kinetochore structure and for attachment of kinetochore and microtubule in the meiotic first division, firstly indicating that the nuclear pore complex participates in the meiotic chromosome segregation. Next, we revealed a specific but dispensable regulation for expressions of nuclear pore complex proteins Nup98 and Nup96. We also found that an inner nuclear membrane protein Lem2 is essential for centromere-specific heterochromatin formation. In addition, we developed a novel fluorescent probe to visualize histone modification.

研究分野：分子遺伝学 細胞生物学

キーワード：核膜孔複合体 核構造 分裂酵母 核膜

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の染色体は核膜に包まれている。核膜は染色体を細胞質から隔離する構造であるだけでなく、染色体の機能を調節するために足場となる構造でもある。ほ乳類では核膜内膜に数百種類の核膜タンパク質が存在することが明らかになっており (Korfali et al, Nucleus, 2012)。それらの核膜タンパク質と染色体との相互作用が足場構造の実体であると考えられている (図1)。しかし、どの核膜タンパク質がどのように染色体と

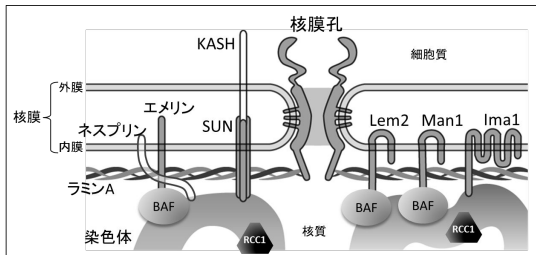


図1 ヒトの核膜構造と主な核膜タンパク質

相互作用し、染色体機能の調節に関与するのははまだ全く理解されていない。核膜は真核生物の最大の特徴とも言える構造体であり核膜の機能は真核生物に共通である可能性が高いことから、核膜と染色体の相互作用の実態を分子レベルで解明することは、真核生物の細胞核における染色体の機能を理解するために重要である。またヒトでは核膜タンパク質の異常が様々な病気の原因となることが知られている (Dauer and Wormon, 2009, Dev Cell; Schreiber, 2012, Cell)。このことは核膜タンパク質が発生・分化・老化における染色体機能に影響を与えることを示唆している。そのため、医学的な見地からも、研究開始当初から、そして今もなお、核膜と染色体の相互作用の解明が期待されている。

### 2. 研究の目的

核膜タンパク質と染色体タンパク質の相互作用は染色体が核膜を足場として機能するために重要と考えられるがその実体は明らかではない。本研究は核膜タンパク質のうち核膜孔複合体タンパク質による染色体機能の調節機構の解明を目的とする。分裂酵母を用いた予備実験から、核膜孔複合体タンパク質のうち生育に必須でない因子は、核-細胞質間輸送には必須ではないと考えられるが、それらの欠失変異体は減数分裂や染色体機能を阻害した条件下では生存に必須であることから、染色体の機能への関与が示唆された。そこで本研究によって、核膜孔複合体タンパク質の染色体機能調節への役割を解明し、核膜と染色体の相互作用の実体を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、生育に非必須な核膜孔複合体タンパク質が染色体の機能調節に直接関わることを明らかにし、相互作用する染色体因

子を同定する。核膜孔複合体タンパク質の機能については、遺伝子破壊株の中で減数分裂に異常を示すものを選び、具体的にどのような染色体の機能に関係するのかを詳細に解析する。また、染色体の機能構造の異常や染色体保持能力の異常についても検討し解析をおこなう。染色体の機能調節に強く関与すると思われる因子と相互作用する染色体タンパク質を網羅的に検索し、機能解析をおこなう。

### 4. 研究成果

#### (1) 減数分裂期における Nup132 の機能

これまでの研究から、分裂酵母では、減数分裂前期に動原体 (キネトコア) の外層構造を構築する KMN 複合体 (図2) がセントロメアからいったん離れ、その後、第一分裂直前にセントロメアに再集合することがわかっている。KMN 複合体は、KNL1/Spc7 が Mis12 複合体および Ndc80 複合体と相互作用することによって形成される、非常に大きなタンパク質複合体である (図2)。Nup132 を欠失した細胞では、KMN 複合体の再集合に異常があ

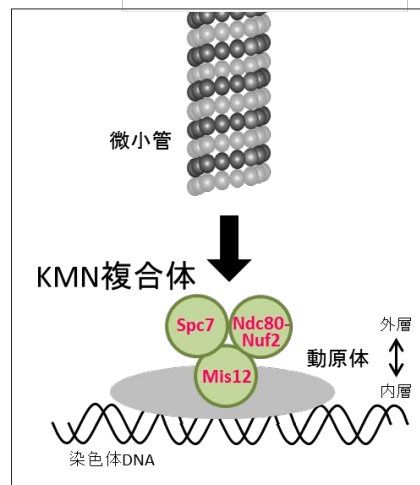


図2 動原体の構造

ることがわかった。Nup132 欠失株では、Mis12 および Spc7 が通常よりも早い時期にセントロメアに集合した (図3)。さらに Nup132 欠失細胞では、減数第一分裂において、紡錘体形成チェックポイント機構が活性化されていることがわかった。これらのことから、

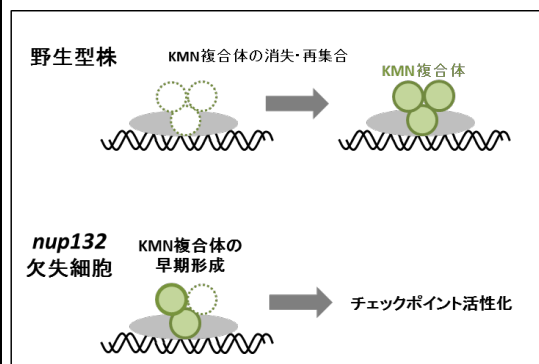


図3 分裂酵母で見られる減数分裂期の動原体構築

Nup132 が、減数第一分裂に必要な特殊なセントロメア構造の構築、および、スピンドルとキネトコアの正常な接着に重要な機能を果たすことが明らかになった。この発見は、減数分裂期の染色体分配に核膜孔複合体が関与することを初めて示したものであり、正常な生殖細胞（卵子や精子など）が形成される仕組みの一端を明らかにした。これにより、核膜がクロマチンの保持のために果たす役割の一端が明らかとなっただけでなく、有性生殖の仕組みの理解にもつながった (Yang et al, J Cell Biol, 2015; Asakawa et al, Front Cell Dev Biol, 2016)。

### (2) Nup98, Nup96 の発現機構とその意義

多くの真核生物において、核膜孔複合体タンパク質 Nup98 と Nup96 は、1つの ORF にコードされており、Nup98 の autopeptidase 活性によって翻訳後に自己切断されて2つの核膜孔複合体タンパク質として産生される。また Nup98-Nup96 の切断に使われるアミノ酸配列は進化的に保存されている。Nup98 と Nup96 がこのような特殊な発現様式をとる理由を明らかにすることを目的に、分裂酵母の Nup98 と Nup96 をコードする *nup189* 遺伝子をモデルとして自己切断の重要性を調べた。

まず野生型細胞から mRNA を抽出して cDNA をクローニングしたところ、選択的スプライシング産物に由来する2種類の cDNA が単離された。塩基配列を解析した結果、Nup98 と Nup96 は分裂酵母の生育に必須のタンパク質であるが、これらはスプライシングを受けない mRNA から発現することが予想された。一方、スプライシングを受けた mRNA からは Nup96 をコードする部分にフレームシフトが起こるため、野生型の Nup98 の配列のあと、切断部位の配列に続いて、短いペプチド (Tail) が産生されることが予想された (図4)。

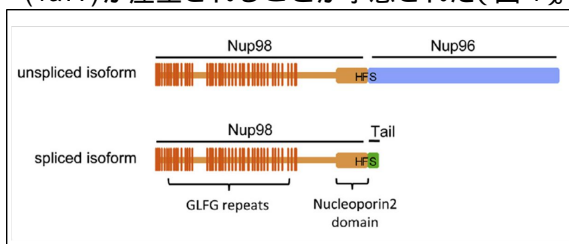


図4 分裂酵母 *nup189* 遺伝子にコードされるペプチド

GLFG repeatsは天然変性領域。Nucleoporin2ドメインは切断活性を有するドメイン。

タンパク質の発現を調べたところ、野生型細胞では、*nup189* の ORF 全長に由来する大きさのペプチドはほとんど検出されず、切断部位で分離したサイズに相当するペプチドが検出された。切断部位に変異を入れると全長に相当するサイズのペプチドが検出されたことから、分裂酵母の Nup98, Nup96 は他の真核生物と同様の自己切断機構を経て発現することがわかった。

スプライシングと自己切断による発現調節の意義を明らかにするために、スプライス

部位に変異を導入してスプライシング不能にした変異体と、自己切断部位に変異を導入して自己切断不能にした変異体を作製した。さらにスプライス部位と切断部位の両方に変異を導入した二重変異体も作製した。これらの変異遺伝子を染色体上に付加的に導入して発現させた上で、内在性の *nup189* 遺伝子を破壊した。その結果、どの変異体も生育することができた。スプライシングや自己切断による Nup98, Nup96 発現調節は、分裂酵母の通常の培養状況の下では細胞成長のために重要でないことを示すことができた (Asakawa et al, FEBS Open Bio, 2015)。

### (3) 核膜内膜タンパク質 Lem2 の機能

核膜構造と核内の構造や機能の関係を知るために、核膜孔複合体以外の核膜タンパク質についても解析をおこなった。分裂酵母の LEM ドメインタンパク質 Lem2 は、2箇所の膜貫通ドメインを持ち、N 末端と C 末端が共に核質内に突出する形で核内膜に局在化する。Lem2 を欠失させると、分裂酵母細胞は、ミニ染色体の高頻度脱落と増殖の低下を起こした。その理由を、クロマチン免疫沈降法によって調べたところ、セントロメアヘテロクロマチンの形成不全を起こしていることが分かった。興味深いことに、これらの表現型は、富栄養の完全培地でのみ見られ、貧栄養の合成最小培地では見られなかった。

栄養に依存する表現型を理解するために、セントロメアヘテロクロマチン状態への栄養の影響を調べたところ、富栄養状態では、ヒストン H3K9 ジメチルの蓄積が起こるのに対して、Lem2 欠損株では起こらない事が分かった (図5)。栄養状態の変化に対応してヘテ

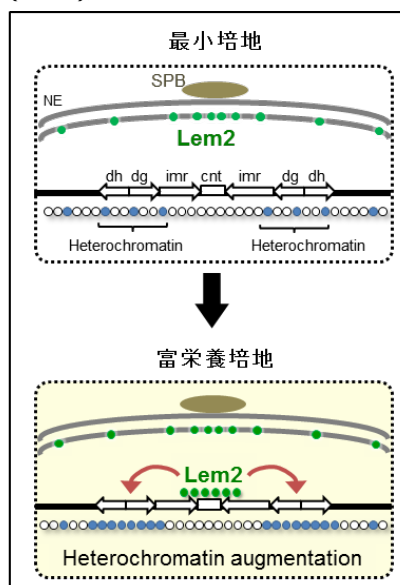


図5 核内膜タンパク質 Lem2 によるセントロメア領域のヘテロクロマチン化

ロクロマチンが強化されるという知見はこれまでにない新しい発見である。今後は、細胞が栄養を感知してクロマチン構造を動的に変化させクロマチン機能を維持していく

分子メカニズムの解明が課題である (Tange et al, Genes Cells, 2016)。

#### (4) 細胞核構造のライブイメージング

細胞核の構造と核膜孔複合体の相互作用を解析するために、様々な核内構造を可視化し構造や動態を解析した。まず、分裂酵母の減数分裂前期では核が細長く伸びた形態をとり、細胞内を往復運動する。このような核構造が減数分裂期の DNA 合成期に特に顕著になり、それがヒストン H4 のアセチル化修飾によること、また往復運動が転写因子の制御下にあることを発見した (Ruan et al, Genes Cells, 2015; Ruan et al, Sci Rep, 2015)。また超分解能蛍光顕微鏡を用いた観察によって分裂酵母の間期細胞核のクロマチンの凝縮の度合いを調べ、転写活性の低いテロメア近傍領域においてクロマチンの凝縮の度合いが低いことを見いだした (Matsuda et al, Nat Commun, 2015)。残念ながら、これらの核内構造と核膜との相関については現時点では不明である。

さらに、1つの細胞内に大核と小核の2種類の核を持つ二核性の繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* の核膜孔複合体タンパク質の FRAP 解析をおこなった。細胞核の分化過程において、分裂した小核が大核と小核に分化していくが、分化の非常に初期の段階において、大核になる核ではレーザーによって核膜孔複合体タンパク質の蛍光を褪色させても時間が経つと蛍光強度が回復するのに対し、小核になる核では褪色後の蛍光強度の回復が見られなかった。電子顕微鏡による解析の結果、このとき大核になる核では、核膜孔複合体を含む膜構造が集積していたが、小核になる核では核膜孔複合体を含まない膜構造が集積していた。この結果は細胞核の分化過程と核膜孔複合体の量的変化の相関を初めて示唆したものであり、核膜孔複合体と細胞核の機能を結びつける新たな例として意義のある知見である (Iwamoto et al, J Cell Sci, 2015)。

#### (5) 核内構造を認識する新規蛍光プローブの開発

核膜孔複合体と相互作用する核構造を可視化する試みの一つとして、クロマチン構造に密接に関わるヒストン修飾を特異的に認識する新規蛍光プローブの開発をおこなった。従来、ヒストン修飾の検出法として、細胞を固定した後に修飾特異的抗体を反応させる方法が用いられている。しかしこの方法では、一個の細胞の中で修飾が変化していく過程を追うことは出来ない。そこで、抗体の可変領域を single-chain variable fragment (scFv) として蛍光タンパク質を融合した融合遺伝子を細胞内で発現させるプローブ modification-specific intracellular antibody (mintbody) を作製した。

ヒストン H4 リシン 20 モノメチル化修飾

(H4K20me1) は、DNA 損傷修復や遺伝子発現制御、また X 染色体の不活性化などに関与することが報告されている。H4K20me1 特異的抗体から mintbody の作製に成功した。細胞内での標的特異性を調べるために、分裂酵母のメチル化酵素変異体やメチル化残基を改変したヒストン変異体を用いた解析をおこない H4K20 メチル化特異的であることを明らかにした (図 6)。また、培養細胞に SUV420H1 を発現させて H4K20me1 レベルを低下させた

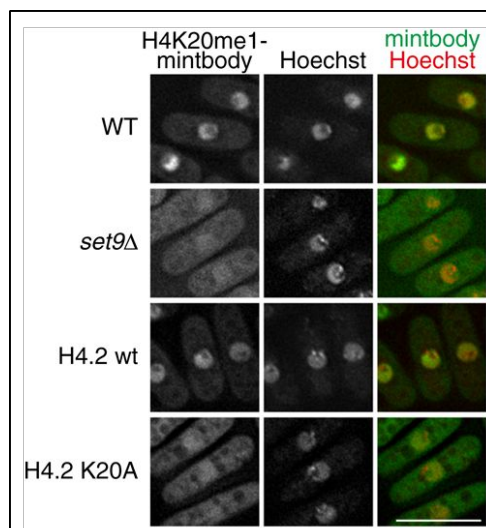


図6 新規蛍光プローブの開発

際に、H4K20me1-mintbody の核への集積が減少したことから、H4K20 メチル化の中でも H4K20me2 や H4K20me3 ではなく H4K20me1 に特異的であることが証明できた。この蛍光プローブの開発により、その他の核内構造に対する scFv を利用したプローブ作製の方法や利用について多くの知見を得ることができ、核構造の研究に利用できる新しい技術として確立することに成功した (Sato et al, J Mol Biol, 2016)。

以上の成果の中から特に核膜と細胞核構造に関する知見について、総説を執筆した (Matsuda et al, Yeast, 2017)。

#### 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10件)

Matsuda A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2017) Spatial organization of the Schizosaccharomyces pombe genome within the nucleus. Yeast. 査読有, 34:55-66. doi:10.1002/yea.3217.

Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. (2016) A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20

monomethylation. *J. Mol. Biol.* 査読有, 428:3885-3902.

doi:10.1016/j.jmb.2016.08.010.

Tange Y, Chikashige Y, Takahata S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2016) Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. *Genes Cells.* 査読有, 21:812-832. doi: 10.1111/gtc.12385

Asakawa H, Yang H, Hiraoka Y and Haraguchi T (2016). Virtual nuclear envelope breakdown and its regulators in fission yeast meiosis. *Front. Cell Dev. Biol.* 査読有, 4:5. doi: 10.3389/fcell.2016.00005

Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2015) Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore assembly. *J Cell Biol.* 査読有, 211:295-308. doi:10.1083/jcb.201501035.

Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Kimura H, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2015) Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci Rep.* 査読有, 5, article:12720, pp.1-10. doi:10.1038/srep12720.

Matsuda A, Chikashige Y, Ding DQ, Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2015) Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nat Commun.* 査読有, 6, article:7753, pp.1-12. doi:10.1038/ncomms8753.

Asakawa H, Mori C, Ohtsuki C, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2015) Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Open Bio.* 査読有, 5: 508-514. doi:10.1016/j.fob.2015.06.004

Iwamoto M, Koujin T, Osakada H, Mori C, Kojidani T, Matsuda A, Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2015) Biased assembly of the nuclear pore complex is required for somatic and germline nuclear differentiation in *Tetrahymena*. *J Cell Sci.* 査読有, 128(9):1812-23.

doi:10.1242/jcs.167353

Ruan K, Yamamoto TG, Asakawa H, Chikashige Y, Masukata H, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2015) Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells.* 査読有, 20:160-172. doi:10.1111/gtc.12207

[学会発表](計14件)

淺川東彦, 糀谷知子, 小坂田裕子, 大槻千鶴, 長尾恒治, 小布施力史, 岩本政明, 平岡 泰, 原口徳子「分裂酵母に特異的な核膜孔複合体の構造」第34回染色体ワークショップ第15回核ダイナミクス研究会(2017年1月12日)かずさアカデミアホール、千葉県・木更津市

衣笠泰葉, 平野泰弘, 淺川東彦, 近重裕次, 原口徳子, 平岡 泰「分裂酵母核膜内膜タンパク質 Bqt4 は Lem2 と相互作用し、細胞内局在を調整する」第34回染色体ワークショップ第15回核ダイナミクス研究会(2017年1月11日)かずさアカデミアホール、千葉県・木更津市

佐藤優子, 淺川東彦, 大槻千鶴, 原口徳子, 平岡 泰, 木村 宏「生細胞プローブ H4K20me1-mintbody の細胞内標的特異性の検討」第39回日本分子生物学会年会(2016年11月30日)パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市

衣笠泰葉, 平野泰弘, 淺川東彦, 近重裕次, 原口徳子, 平岡 泰「分裂酵母核膜内膜タンパク質 Bqt4 は Lem2 と相互作用し、細胞内局在を調整する」第39回日本分子生物学会年会(2016年11月30日)パシフィコ横浜、横浜市

Kinugasa Y, Hirano Y, Asakawa H, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Localization of inner nuclear membrane protein Lem2 is regulated by a telomere-anchoring protein Bqt4 in fission yeast. 14<sup>th</sup> International Congress on Yeasts. (2016年9月11-15日)、淡路夢舞台国際会議場、兵庫県・淡路市

淺川東彦, 糀谷知子, 小坂田裕子, 大槻千鶴, 長尾恒治, 小布施力史, 岩本政明, 平岡 泰, 原口徳子「分裂酵母に特異的な核膜孔複合体の構造」第49回酵母遺伝学フォーラム研究報告会(2016年9月9日)

シーサイドホテル舞子ビラ、兵庫県・神戸市

浅川東彦、梶谷知子、小坂田裕子、大槻千鶴、長尾恒治、小布施力史、岩本政明、平岡 泰、原口徳子「分裂酵母の核膜孔複合体蛋白質のプロテオミクス解析と免疫電子顕微鏡解析」第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会（共同開催）（2016 年 1 月 13 日）松島一の坊、宮城県・宮城郡松島町

原口徳子、浅川東彦「免疫電顕法による分裂酵母核膜孔複合体構造の解析」第 7 回光塾（2015 年 9 月 5-6 日）広島大学東広島キャンパス、広島県・東広島市

阮琨、山本孝治、浅川東彦、原口徳子、平岡 泰「Histone H4 acetylation required for chromatin loosening during DNA replication」第 48 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会（2015 年 9 月 1 日）広島大学東広島キャンパス、広島県・東広島市

Asakawa H, Kojidani T, Osakada H, Iwamoto M, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Two Nup133-homologs separately function at the cytoplasmic or nuclear side in nuclear pore complex in *Schizosaccharomyces pombe*. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function. (2015 年 8 月 23-26 日) 淡路夢舞台国際会議場、兵庫県・淡路市

Asakawa H, Mori C, Ohtsuki C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Uncleavable Nup98-Nup96 is functional in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The eighth International Fission Yeast Meeting (Pombe2015) (2015 年 6 月 21-26 日)、生田神社会館、兵庫県・神戸市

Haraguchi T, Asakawa H, Kojidani T, Osakada H, Iwamoto M, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y. Molecular architecture of the nuclear pore complex in the fission yeast *S. pombe*. The eighth International Fission Yeast Meeting (Pombe2015) (2015 年 6 月 21-26 日)、生田神社会館、兵庫県・神戸市

Yang H-J, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Nup132 modulates meiotic spindle attachment in fission yeast by regulating kinetochore reassembly. The eighth International Fission Yeast Meeting (Pombe2015) (2015 年 6 月 21-26

日)、生田神社会館、兵庫県・神戸市

Kinugasa Y, Asakawa H, Ohtsuki C, Kuroki A, Hiraoka Y. Codon usage bias affects the mRNA amounts in *S. pombe*. The eighth International Fission Yeast Meeting (Pombe2015) (2015 年 6 月 21-26 日)、生田神社会館、兵庫県・神戸市

〔図書〕(計 1 件)

Asakawa H, Ding D-Q, Haraguchi T, Hiraoka Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 10: Microscopic Observation of Living Cells Stained with Fluorescent Probes, protocol 1, in: *Fission yeast: a laboratory manual*. (Hagan I, Carr AM, Gallert A, Nurse P., ed.), 2016, 230-235 (共著)。

〔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/general/lab/07/>

Hiraoka Laboratory:

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅川 東彦 (ASAKAWA, Haruhiko)  
大阪大学・生命機能研究科・准教授  
研究者番号：70399533

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

平岡 泰 (HIRAOKA, Yasushi)  
Zhang Xu (ZHANG, Xu)