

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」
平成14年度採択研究代表者

原口 徳子

(独立行政法人 情報通信研究機構 主任研究員)

「遺伝子デリバリーシステムとしての人工細胞核の創製」

1. 研究実施の概要

本研究は、細胞の中で、染色体の周りに核膜が自己集合的に形成され、正しく機能する細胞核が連鎖反動的に形成される機構を解明し、それを操作することにより特殊機能をもった人工的細胞核を細胞内に造ることを目的としている。本年度は、項目1「生細胞蛍光イメージングによる核膜形成機構の解析」のための技術開発として、蛍光スペクトル測定法で蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を測定する方法を開発し、生きた細胞で核膜タンパク質エメリンとDNA結合タンパク質BAFが結合することを証明した(項目1-1に関連)。この方法の開発により、今後DNAの回りに核膜が形成される時期の、エメリンとBAFの結合状態の変化を生きた細胞で調べることが可能となった。項目2「人工細胞核の形成」の研究として、試験管に見立てた分裂酵母に、ヒトの核膜タンパク質とBAFを同時に発現させることによって、これまで明らかでなかったBAFの機能を明らかにすることに成功した(項目2-3に関連)。

2. 研究実施内容

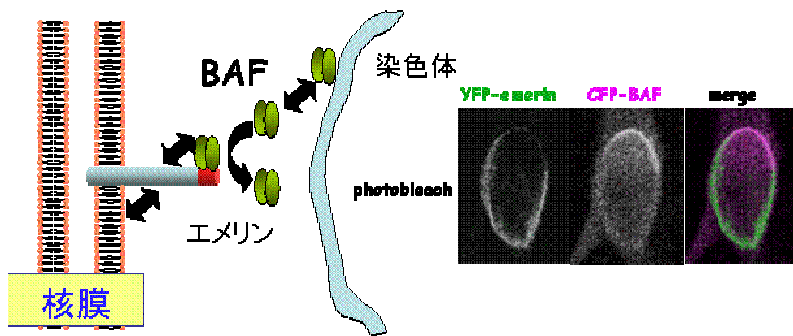
当研究課題は、天然の細胞がもつ核膜形成機構を利用・操作することにより、特殊な機能をもつ人工細胞核を細胞内に造ることを研究目的としている。そのために、1)天然の細胞核の核膜形成メカニズムの解析(項目名:生細胞蛍光イメージングによる核膜形成機構の解析)、2)試験管内または細胞内での人工細胞核の形成(項目名:人工細胞核の形成)、を目標として研究を行った。

(項目1) 生細胞蛍光イメージングによる核膜形成機構の解析

1-1 ヒト細胞における細胞核構造のダイナミクス解析

生きた細胞のなかで起こる核膜形成の分子機構を理解するためには、核膜タンパク質がDNAの回りに集合する過程を生きた細胞で詳細に調べる必要がある。そのために、核膜タンパク質をDNA上に運んでくるタンパク質として、エメリンとDNAの双方に結合するタンパク質BAFに注目し解析を進めた。Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)法を用いて細胞内の分子運動を測定したところ、BAFは1秒当たり1-50 μm^2 の速さで細胞

内を動いている分子であることが分かった。さらに、2つの蛍光分子間に起こる蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を蛍光スペクトル顕微鏡で測定し、エメリンとBAFが核膜上で直接結合することを



明らかにした (図1)。YFP-emerin(緑色)を消光した場所のCFP-BAF(紫色)が明るくなっているのが、FRETを示している。

これらの結果から、BAFがエメリンを核膜に集合させる機構として、“tough-and-go” modelを提唱した (Shimi et al, J. Struc. Biol. 2004)。

核膜形成機構には、核タンパク質の核輸送に関わるRan, インポートインアルファ、インポートインベータも直接または間接的に関わっていると考えられている。そこで、生きた細胞でのこれらの因子の挙動を、蛍光イメージング法により検討した。インポートインアルファは、通常、細胞内のすべての場所に存在し、核タンパク質が核に移行する時に、それに連れて核内に移行するのが見られた。しかし、面白いことには、細胞に様々なストレス (UV, 熱、薬剤、酸化) がかけると、インポートインアルファは核内に蓄積してしまい、そのために通常の核輸送が起これなくなるということが分かった (Furuta et al, Genes Cells, 2004; Miyamoto et al, J. Cell Biol., 2004)。しかし、このようなストレス環境下でも、heat-shock proteinの核輸送には変化がないことから、ストレス環境化では生物は特別の輸送システムを働かせていることが分かった。核膜の核タンパク質輸送能を調節する上で重要な知見が得られたといえる。この知見は、人工細胞核を作る際に参考となるものである。

核膜タンパク質であるエメリンが核膜に集合する機構を解析する一環として、エメリンに結合するタンパク質を、酵母2ハイブリッドアッセイ法を用いて網羅的に解析した。HeLa細胞から調製された遺伝子ライブラリーを用いて解析したところ、新規のエメリン結合タンパク質としてBtf, splicing factor, cytochrome c oxidase subunit 3を同定した。Btfは、death-promoting transcription repressorとして報告のある核タンパク質であり、細胞死と転写調節に関わると考えられている。エメリンとBtfは、通常の細胞では、それぞれ核膜上と核内部と離れた場所に局在するが、アポトーシス初期には核膜付近で近接することを示した (Haraguchi et al, Eur. J. Biochem., 2004)。アポトーシスを起こした核膜の構造と機能の変化に関して重要な知見が得られたものである。

1-2 DT40細胞を用いた核膜構造の機能解析

高等動物細胞として唯一遺伝子破壊が可能なDT40細胞を用いて、核膜形成因子の遺伝子破壊を進めている。最近では、分裂期にセントロメアタンパク質と核膜孔複合体のタンパク質が、分裂期のセントロメア上で結合することが知られており、セントロメアタンパク質の核膜形成への関与も考えられる。そこで、DT40細胞で、セントロメアタンパク質であるNuf2やHec1を破壊した株を作製し、その挙動と機能を解析した。その結果、Nuf2やHec1を欠失した細胞では、分裂期の遅延と細胞死が起こることが分かった(Hori et al, J. Cell Sci., 2003)。これらの欠失では、一度も核膜が形成することなしに細胞死を迎える点で、CENP-IやCENP-Hの欠失とは異なっていることが分かった。

(項目2) 人工細胞核の形成

2-1 人工核膜の試験管内形成

アフリカツメガエル卵抽出液での核膜形成実験のためのGST融合BAFタンパク質、およびその変異体の作製を行った。GST-BAFは、細胞毒性が非常に高いためか、融合遺伝子プラスミドさえも取ることができないためにGST以外の標識を検討している。

2-2 細胞内での人工ミニ細胞核の形成

特になし。

2-3 分裂酵母でのヒト核ラミナの形成

ヒト細胞の2種類のタンパク質を調節的に発現させ、その分子動態を生きた細胞で解析できる分裂酵母実験系を作製することに成功した(Ding et al, Dev. Cell, 2004; Chikashige et al, Genes Cells, 2004)。それを用いて核膜タンパク質エメリンとBAFを同時に発現する細胞株を作製し、BAFのエメリンに対する機能を検討した。その結果、BAFはエメリンを核膜に局在させる機能を持つことが分かった。BAFもエメリンも、ヒト細胞では、それぞれ多くの結合因子があるために、2者の結合の意義は必ずしもはっきりしないが、新たに開発したこの実験系では、2者以外に結合タンパク質がないために、その生物学的意義を明らかにすることができる。

3. 研究実施体制

原口グループ

① 研究分担グループ長：原口 徳子（独立行政法人 情報通信研究機構、主任研究員）

② 研究項目

(項目1) 生細胞蛍光イメージングによる核膜形成機構の解析

1-1 ヒト細胞における細胞核構造のダイナミクスの解析

1-2 DT40細胞を用いた核膜構造の機能解析

(項目 2) 人工細胞核の形成

- 2-1 人工核膜の試験管内形成
- 2-2 細胞内での人工ミニ細胞核の形成
- 2-3 分裂酵母でのヒト核ラミナの形成

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- T. Hayakawa, T. Haraguchi, H. Masumoto and Y. Hiraoka (2003) Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J. Cell Sci.* 116: 3327-3338
- T. Hori, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, H. Kimura and T. Fukagawa (2003) Dynamic behavior of Nuf2-Hecl complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells. *J. Cell Sci.* 116(16): 3347-3362
- E. Funakoshi, T. Hori, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, J. Kudoh, N. Shimizu, F. Ito (2003) Overexpression of the human MNB/DYRL1A gene induces formation of multinucleate cells through overduplication of the centrosome. *BMC Cell Biology* 4: 12
- T. Shimi, T. Koujin, M. Segura-Totten, K. L. Wilson, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka (2004) Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct. Biol.* 147: 31-41
- T. Haraguchi, J. M. Holaska, M. Yamane, T. Koujin, N. Hashiguchi, C. Mori, K. L. Wilson, and Y. Hiraoka (2004) Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem.* 271(5): 1035-1045
- D.-Q. Ding, A. Yamamoto, T. Haraguchi and Y. Hiraoka (2004) Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast. *Dev Cell* 6: 329-341
- M. Furuta, S. Kose, M. Koike, T. Shimi, Y. Hiraoka, Y. Yoneda, T. Haraguchi, N. Imamoto (2004) Heat-shock induced nuclear retention and recycling inhibition of importin α . *Genes to cells* 9: 429-441

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）