

「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応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。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、生体分子間に起こる相互作用を生きた細胞で検出する方法として蛍光分光相互相関顕微鏡法 (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, FCCS) を開発した (項目1-1に関連)。この方法の開発により、細胞内を自由拡散と同じくらい高速で動いている生体分子同士の結合を生きた細胞で計測することが可能となった。さらに、生細胞蛍光イメージング法を電子顕微鏡と組み合わせることにより、生きた細胞の動的な画像の解像度を一気に電顕レベルに引き上げることに成功した。このような方法を用いて、染色体の回りに核膜が形成されていく様子を観察し、そこに働く仕組みの解析を行った。項目2「人工細胞核の形成」の研究として、試験管内で人工的な細胞核を再構成させる実験を行うために、アフリカツメガエルの卵抽出液の調整法を検討し、特定のタンパク質でコートしたプラスチックビーズの回りに核膜が形成されることを確認した (項目2-1に関連)。今後は、このような試験管内実験系を用いて、核膜を集合させるのに必要なタンパク質を検索するとともに、生きた細胞内に人工ミニ細胞核を形成させることを試みる予定である。

### 2. 研究実施内容

天然の細胞が持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1: 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2: 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

蛍光顕微鏡を用いた様々な生細胞イメージング法を用いて、染色体の周りに核膜分子が集合する機構について解析を行った。そのためのイメージング法として、従来の方法である生細胞タイムラプス蛍光顕微鏡法 (Haraguchi and Hiraoka, 2004)、FRAP法、FRET法に加えて、平成16年度は、FCS (蛍光相関分光顕微鏡) 法やFCCS (蛍光相互相関分光顕微鏡) 法を併用し、核膜タンパク質の分子動態の解析を行った。FCS法は、FRAPでは測定が困難な、高速で流動している分子のmobilityを計測することができる。FCCS法は、FRETでは検出できない結合でも検出できる可能性を持っている。これらの方法を用いて、分裂期中期から終期にかけて、核膜形成が次第に起こってくる時期の核膜分子の挙動を解析した。その結果、核膜形成に働くDNA結合性のタンパク質であるBAFは、細胞周期の全時期で2量体を形成していること、この2量体は分裂中期では自由拡散に近い速度で動いていること、核膜形成が起こる終期の核膜コア領域では全く動かなくなること、コア領域ではBAFと核膜タンパク質エメリンの結合状態が間期のものとは全く異なること、などが分かった。核膜コア領域での核膜の形成状態を知るために、光学顕微鏡より高い解像度で解析できる電子顕微鏡を用いて解析した。それにより、核膜が形成される直前の染色体表面にはBAFが結合して電子密度の高い構造が形成されていることが分かった。これらの知見は、終期染色体上に核膜形成の種となる特別な構造が存在し、その構造にBAFが関わっていることを示唆している。イメージングの技術としては、生きた細胞でダイナミクスを観察した同じ細胞を、電子顕微鏡で観察する革新的技術を確立した。そのことによって、光学顕微鏡が持つ「特定分子のダイナミクスを生きた細胞で観察できる」という利点と、電子顕微鏡が持つ「高い空間解像度」という利点の両方を兼ね備えた観察システムが作られたことになる。

LAP2alphaは、LEMドメインタンパク質の一つであり、BAFと協調的に働いて核膜形成に関与すると考えられている。LAP2alphaの細胞内の挙動を、タイムラプス法とFRAP法により解析を行った (フォイスナー教授の研究グループとの共同研究)。その結果、LAP2alphaは、細胞分裂期終期の核膜形成期に、核膜形成に先立ち、テロメアの先端に結合してくることが分かった。このあと、核膜コア領域に局在し、immobileな複合体を形成することが示された。生化学的な実験から、分裂期にはLAP2alphaはBAFと結合していることを示し、テロメアへの結合は、BAFと協調的に行っていると結論した (Dechat et al, J. Cell Sci., 2004)。この研究は、今後、核膜形成機構を考えていくのに重要である。

核輸送に関与する一連のタンパク質 (例えばRan, インポートインベータ, インポートインアルファなど) は、試験管内実験により核膜形成に重要と考えられている。今年度は、インポートインベータに関して、細胞内での挙動を生きた細胞でタイムラプス観察、FRAP測定、FCS測定により解析した。その結果、インポートインベータは、単体として存在するもの、核輸送複合体などの複合体として存在するもの、巨大複合体として

存在するもの、があることが分かった。さらに、細胞内のmobilityは、細胞周期を通して、非常に高いことが分かった。驚くべきことに、核膜孔を通過する場合にも、速度の低下が少ないことが分かった。この事実は、核膜孔複合体と結合・解離を高速で繰り返すことができるということを示している。インポーティンベータの持つこの性質が、細胞分裂期終期で核膜が形成されるときにどのように調節されるのかは、今後の問題である。今回の実験は、これらの問題をあぶり出すのに重要な基礎的知見が得られたという点で成果があった。

#### 1-2 分裂酵母を用いた核膜構造とそのダイナミクスの解析

分裂酵母の全ゲノムにある遺伝子約4500の約3分の1にあたる1500個に対し、GFP融合した細胞株を作製し、うち約800個の遺伝子に対して特定の細胞内局在をとる細胞株を作製することに成功した（CREST「ゲノムの構造と機能」平岡泰研究代表の成果）。そのうち、核膜に局在するタンパク質として33個を同定した。これらのタンパク質の細胞内動態の解析を行っている。染色体側の因子としてセントロメアタンパク質の動態を解析し、Nuf2タンパク質が細胞分裂周期の特定の時期にセントロメアから消失することを報告した（Asakawa et al, Mol. Bio. Cell, 2005）。

#### 1-3 DT40細胞を用いた核膜構造の機能解析

核膜構造と核膜形成に重要な因子の機能を研究する目的で、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、遺伝子破壊を進めている。今年度は、BAF, Ranについてノックアウト細胞を作製を試みた。BAFは、多数の試行にも関わらず、遺伝子のGC含有量が高いために、必要なノックアウトDNAを作製することがかなり困難であった。Ranに関しても、Ranをコードする領域のゲノム構造が特殊なために、ノックアウト細胞の作製が困難であることが分かった。これに関しては、ノックアウトDNAを様々に工夫することにより、困難を回避する方法を模索している。

### (項目2) 人工細胞核の形成

#### 2-1 人工核膜の試験管内形成

これまでの実験で、アフリカツメガエルの卵抽出液を当施設内で作製することが実験の成功に重要であることが分かったので、今年度は、まずアフリカツメガエル飼育設備を整備し、活性の高いアフリカツメガエル卵抽出液を要時調整することを可能にした。核膜形成実験のためのGST融合Ranタンパク質、およびその変異体の作製を行った。今後、これらを用いてグルタチオンビーズの回りに核膜が形成され、人工的な核・核膜が形成される条件を検討していく予定である。

#### 2-2 細胞内での人工ミニ細胞核の形成

細胞内に直径1-2  $\mu\text{m}$ のビーズを導入した細胞を電子顕微鏡で観察し、ビーズ表面

の状態を解析した。それによると、ビーズ表面には膜状構造が結合しやすいことが分かった。この膜状構造の詳細について、今後、解析していく予定である。

### 2-3 分裂酵母でのヒト核ラミナの形成

分裂酵母を試験管のように見立てて、ヒトの核膜構成タンパク質を発現させ、核膜とラミナ構造の生理的意義を検討するものである。このような実験系の作製のためには、外来の遺伝子を分裂酵母のゲノムに組み込むためのベクターの開発が必要である。今年度は、2種類の異なる遺伝子をゲノムに導入するためのベクターの開発に成功し(Chikashige et al, Genes Cells, 2004)、2種類のタンパク質の相互作用を研究できる実験系の開発に成功した。それを用いて核膜タンパク質と染色体結合タンパク質の相互作用を検討した。核膜タンパク質エメリンは、Emery-Dreifuss筋ジストロフィーの原因遺伝子であり、その核膜局在と病態との関連が示唆されている。エメリンは、ヒト細胞では核膜に局在するが、分裂酵母では核膜に局在することができない。この状態に、エメリンと結合すると考えられている核タンパク質としてラミンA, BAF, またはBtfを同時に発現させ、どの因子がエメリンの核膜局在を起こすことができるか検討した。その結果、その活性は、BAFが最も高く、ラミンAはその半分以下であることが明らかとなった。

## 3. 研究実施体制

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 分裂酵母を用いた核膜構造とそのダイナミクスの解析

1-3 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

○ Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., and Yoneda, Y. (2004) Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin-alpha and cause a conventional nuclear import block. *J. Cell Biol.* 165: 617-623.

- Ogawa, H., Yu, R.T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Nakatani, Y., Morohashi, K. and Umesono, K. (2004) Nuclear structure-associated TIF2 recruits glucocorticoid receptor and its target DNA. *Biochemical Biophysical Research Communications* 320: 218-225.
- Chikashige, Y., Kurokawa, R., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y. (2004) Meiosis induced by inactivation of Pat1 kinase proceeds with aberrant nuclear positioning of centromeres in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes to Cells* 9: 671-684.
- Haraguchi, T. and Hiraoka, Y. (2004) Imaging Hoechst 33342-labeled chromosomes and fluorescent proteins during the cell cycle. *In* "Live cell imaging: A Laboratory Manual" (David Spector, ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 503-511.
- Dechat, T., Gajewski, A., Korbei, B., Gerlich, D., Daigle, N., Haraguchi, T., Furukawa, K., Ellenberg, J. and Foisner, R. (2004) LAP2  $\alpha$  and BAF transiently localize to telomeres and to specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J. Cell Sci.* 17: 6117-6128.
- Ocegüera-Yanez, F., Kimura, K., Yasuda, S., Higashida, C., Kitamura, T., Hiraoka, Y., Haraguchi, T. and Narumiya, S. (2005) Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. *J. Cell Biol.* 168, 221-232.
- Asakawa H, Hayashi A, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2005) Dissociation of the Nuf2-Ndc80 Complex Releases Centromeres from the Spindle-Pole Body during Meiotic Prophase in Fission Yeast. *Mol Biol Cell.* Feb 23

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：3件）