

「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 関西先端研究センター 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、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」では、核膜や核膜形成に働くと考えられている蛋白質に対して、これまでに開発した FRET 法と FCCS 法を用いて生体分子間結合を、FRAP 法と FCS 法を用いて分子の動きやすさの解析を行った。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方法確立し、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、項目 1 で理解されてきた知見に基づいて、特定のタンパク質でコートしたプラスチックビーズを生きた細胞内に入れ、その周りに核膜を作らせるための実験を行った。その結果、細胞内への導入の仕方、ビーズの性質、コートするタンパク質の種類や方法によって、結果が大きく変化することが分かってきた。今後は、生きた細胞内に入れたビーズの周りに核膜が形成される条件を検討し、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。核膜や核を構成するものは、高度に不溶性のタンパク質と脂肪膜であり、生化学的な解析や再構成が困難である。そのために、これまで様々な実験系により、核膜の再形成の条件を探ってきた。今後は、特に注目すべき実験系に絞って解析を進めていく予定である。

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、独自に開発した生細胞タイムラプス蛍光顕微鏡法、FRAP 法、FRET 法に加えて、平成 16 年度に開発した 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。さらに、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。これらの方法を用いて、細胞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。RNAi を用いて、特定の因子の量を減らした条件でも同様の解析を行った。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、核膜形成の初期に染色体のコア領域に結合し、さらに lamin A とも結合し immobile な複合体を形成させることによって、エメリンを核膜に局在させるための足場を提供することが分かった。この機構は、エメリンだけでなく、LAPbeta などの LEM domain タンパク質すべてに当てはまると考えられる (論文準備中)。

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。そのうち、核膜に局在するタンパク質 (33 個)、染色体の特定領域に局在するタンパク質としてセントロメアとテロメアに局在するものなど、正常な細胞核形成に必要と考えられるタンパク質を選択した。現在、その動態を解析している (Asakawa et al, Mol. Biol. Cell, 2005; 他、論文準備中)。核膜とテロメアに結合するタンパク質として bqt1 と bqt2 というタンパク質を発見し、減数分裂の進行に必須であることを報告した (Chikashige et al, Cell, in press)。

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。BAF, Ran についてノックアウト細胞作製を試み、それぞれ異なる理由でたいへん困難であったので中止したが、核膜孔タンパク質である Nup153 については上手く行く可能性がでてきたので進めることとした。この遺伝子は 3 本ある染色体上にあるために、3 回の遺伝子破壊が必要である。必須遺伝子である公算が高いために、現在、特定の条件でだけノックアウトができる conditional knockout 細胞を作製している。染色体側のタンパク質が核膜形成に関与する可能性があるために、染色体タンパク質についても knockout 細胞を作製し解析している、そのうち、セントロメアタンパク質である CENP-50 の knockout 細胞を作製し解析した。その結果、このタンパク質は核膜形成には関与しないが、セントロメアに存在

する CENP-H と CENP-I を結合し、スピンドルチェックポイント活性が上がっている細胞では、染色体の異常がでることが分かった。これは、このタンパク質が癌の発生と関与している可能性を示している (Minoshima et al, 2005)。

(項目 2) 人工細胞核の形成

2-1 人工核膜の試験管内形成

平成 16 年度にアフリカツメガエル飼育設備を整備したので、核膜形成実験のための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が可能となった。しかし、この実験系を用いた解析の進展が遅く、今後、適切な担当者を配備することが困難なので、この系は限定的に用いるだけとする。

2-2 細胞内での人工ミニ細胞核の形成

細胞内に plasmid DNA を lipofection 法により導入した時の DNA の挙動を解析した。この方法では、細胞質に入った DNA は脂質と複合体を形成した状態で存在しており、細胞質に長く止まることが分かった。この複合体は、細胞分裂期では染色体の近傍に存在するものの、分裂期終期でも細胞核に入ることはなく、細胞質に止まった。このことから、細胞内に入った DNA を効率良く機能的な状態にするためには、この脂質複合体を細胞内で脱集合させることが必要であることが分かった。外来の DNA の周りに核膜を形成させる方法論の開発のために、特定のタンパク質を表面にコートした直径 1〜2 μm のビーズを導入し、核膜形成の条件を電子顕微鏡観察により検討した。現在までに、あるタンパク質をコートしたものでは、ビーズ表面に小胞体様のオルガネラが融合してくるのが観察された。今後、使用するビーズ、導入方法、表面にコートするタンパク質の種類を変えて検討し、生きた細胞内で人為的な核膜形成が起こすことが可能な条件を検討する。

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) 情報通信研究機構関西先端研究センター、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

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- 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* 16 (5): 2325-2338.
- Y. Minoshima, T. Hori, M. Okada, H. Kimura, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, Y.-C. Bao, T. Kawashima, T. Kitamura, and T. Fukagawa (2005). The constitutive centromere component CENP-50 is required for recovery from spindle damage. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10315-10328.
- Doll, E., Molnar, M., Hiraoka, Y., and Kohli, J. (2005). Characterization of rec15, an early meiotic recombination gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 48, 323-333.
- Nakashima, H., Nakano, M., Ohnishi, R., Hiraoka, Y., Kaneda, Y., Sugino, A. and Masumoto, H. (2005).
Assembly of additional heterochromatin distinct from centromere-kinetochore chromatin is required for de novo formation of human artificial chromosome. *J. Cell Sci.* 118, 5885-5898.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）