

「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)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散的に形成され、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 「核膜形成機構の解析」では、特定の核膜蛋白質の量を減少させることによって、核膜形成にどのような異常が起こるか、本研究課題で独自に開発した live CLEM 法、FRET 法、FRAP 法、FCS 法、FCCS 法などのイメージング法を用いて解析した。live CLEM 法は、生きた細胞で目的分子のダイナミックな挙動を、電子顕微鏡レベルの高分解能で解析することができる画期的な方法である。この解析により、ある核膜蛋白質の減少によって、終期の核膜再形成に異常が出るようになった。さらに、このような分裂期終期で起こる異常が、間期 S 期の遅延という異常に繋がることも分かった。項目 2 「人工細胞核の形成」の研究として、項目 1 の知見に基づいて、特殊なコーティングを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実験を行った。本年度は、細胞内への導入したビーズが、細胞内でどのような扱いを受けるかについて集中的に解析を行った。その結果、細胞内に導入したビーズの大半が、細胞内で分解系に取り込まれていくことが明らかとなった。今後は、この分解系の実体と分解系に入る仕組みを明らかにすることによって、それを回避する方法を開発する予定である。それによって、生きた細胞内に入れたビーズの周りに効率よく核膜が形成され、人工ミニ細胞核が形成させる条件を検討する予定である。

## 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、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、FCS（蛍光相関分光顕微鏡）法、FCCS（蛍光相互相関分光顕微鏡）法に加えて、live CLEM 法（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方法）を用いて、核膜が次第に形成される時期の核膜分子の挙動を解析した。これまでに、核膜形成に働く DNA 結合性のタンパク質である BAF が、核ラミナ形成の構造的な足場として働くことを示した。本年度は、特に RNAi を用いて特定の因子の量を減らした条件で、同様の解析を行い、核膜タンパク質が核膜形成に果たす役割について、細胞内微細構造を解析した。その結果、BAF が減少した細胞では、終期で起こる核膜再形成が遅れること、微小管や細胞質の膜に異常が出ることが分かった（論文投稿中）。BAF の減少によって終期で起こる核膜再形成の異常は、間期の DNA 合成期（S 期）の進行を遅らすことも分かった(Haraguchi et al, J. Cell Sci. in press)。

#### 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、ゲノム上の各遺伝子に直接 GFP 遺伝子を融合した細胞株を作製し、うち約 800 個の遺伝子に対して GFP 遺伝子が融合した細胞株を作製することに成功している。この細胞株では、遺伝子発現は、本来のプロモータによって制御されるために、GFP 融合遺伝子の過剰発現がなく、細胞内局在は現実を反映している可能性が高い。これらの細胞株に対して、各遺伝子産物（タンパク質）の細胞内局在を詳細に検討した。そのうち、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、その分子動態や機能を検討した。核膜に局在するタンパク質（33 個）について、細胞分裂周期（mitosis）と減数分裂期（meiosis）での核膜タンパク質の動的な挙動を解析した(Asakawa et al, 投稿準備中)。セントロメアやテロメアなど、染色体の特殊領域に局在するものに関しては、その分子動態と機能の一端を明らかにした(Ding et al, J. Cell Biol. 2006; Hayashi et al, Mol. Biol. Cell, 2006)。減数分裂期に発現量が増加するタンパク質として、核膜とテロメアに結合性の bqt1 と bqt2 と名付けた新規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, 2006)。

#### 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きた。核膜孔タンパク質である Nup153 については、3 つの遺伝子のうち 2 つの遺伝子破壊に成功した。この遺伝子は必須遺伝子であるために、3 つめの遺伝子に関して、特定の条件でだけノックアウトができる conditional knockout 細胞を作製していたが、実験に使用できるキレのよい conditional knockout 株を作製することが出来なかった。上手く行っている研究項目に人力を集中するために、この項目は中止した。

### (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に存在する BAF に反応する抗体を作製し、その抗体を用いて卵抽出

液から BAF を取り除くのに成功した。BAF の非存在下での核膜の形成を検討している。

## 2-2 細胞内での人工ミニ細胞核の形成

細胞内に微小なビーズ（直径  $1\mu\text{m}$ ）を導入して、その周囲に人工ミニ細胞核を形成させる条件の検討を行った。そのために、DNA を表面にコートした直径  $1\sim 2\mu\text{m}$  のビーズを細胞内に導入し、核膜形成の条件を、蛍光生細胞イメージング法と電子顕微鏡法により検討した。導入したビーズのうち、一部は、核膜形成に重要な働きをする BAF タンパク質がビーズを取り巻くように存在し、ラミン A やエメリンなどの核膜タンパク質が集合してくることが分かった。しかし、一方、ビーズのほとんどが分解系の膜に覆われることが分かった。これらの膜が何で、どのような仕組みでビーズを覆うのかを時間を追って解析した。その結果、分解系のうちでも、特殊な仕組みが関与することが分かった (Kobayashi et al, 投稿準備中)。

## 2-3 分裂酵母での核ラミナの形成

分裂酵母を用いてヒトの核膜タンパク質の核膜アセンブリーを検討するスクリーニング系は、我々が独自に開発した方法論である。この実験系を用いて、核膜に存在する lamin A や BAF の分子動態を解析してきた。これらの因子を発現させることによって、細胞の増殖速度が大きく変化するために、発現量の調節が実験結果に大きな影響を与える。これまで、これらの核膜タンパク質は、プレート上で培養した細胞でしか検討することができない点が問題であったが、増殖速度を抑えることにより、液体培養した細胞でも実験が可能となった。今後、分裂酵母を用いて、ラミン存在下での遺伝子発現の制御を検討することが可能となる。

## 2-4 テトラヒメナを用いた細胞核

繊毛虫は単細胞であるが、機能と構造の異なる 2 つの細胞核が存在している。小核はゲノム DNA を内包しており転写活性が低い、大核は増幅された遺伝子が存在し転写活性が高い。全く異なる機能を持つ細胞核が、ひとつの細胞質の中になぜ存在できるのかは大きな謎であり、この分子機構を知り利用することにより、効率の良い（転写活性の高い）人工細胞核が可能になると考えられる。そのために、本年度から新たにテトラヒメナでの細胞核・核膜形成の条件を検討してきた。本年度は、繊毛虫の細胞核を形成している因子をゲノム情報から検索し、核膜形成や核形成に関連が高い分子の遺伝子を選定し、その遺伝子産物に対する特異的な抗体、タンパク質、cDNA の作製を試みた。Ran や RCC1 など核膜形成に関与する可能性の高い因子や、核膜孔複合体を形成すると考えられる因子について、その遺伝子約 20 個を選別し、そのうち 7 個に対する cDNA をクローニングすることに成功した。この生物では、一般的に GFP 融合遺伝子を発現させることが困難であるが、5 個の遺伝子に関しては、GFP 融合タンパク質を発現させることに成功した。2 個の核膜形成関連タンパク質に関して、特異的抗体を作製するのに成功した。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「ダイナミクス解析による核膜形成機構解析と人工細胞核形成」グループ

##### ①研究者名

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

- ・ヒト細胞における細胞核構造のダイナミクスの解析
- ・分裂酵母を用いた核膜構造とそのダイナミクスの解析

（項目2）人工細胞核の形成

- ・人工核膜の試験管内形成
- ・細胞内での人工ミニ細胞核の形成
- ・絨毛虫テトラヒメナ細胞での細胞核形成

#### (2)「微細構造イメージングによる核膜形成機構解析」グループ

##### ①研究者名

松影 昭夫（日本女子大学理学部 教授）

##### 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

- ・ヒト細胞における細胞核構造のダイナミクスの解析
- ・分裂酵母を用いた核膜構造とそのダイナミクスの解析

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

- Yuji Chikashige, Chihiro Tsutsumi, Miho Yamane, Kasumi Okamasa, Tokuko Haraguchi, and Yasushi Hiraoka (2006) Meiotic proteins Bqt1 and Bqt2 tether telomeres to promote the bouquet arrangement of chromosomes in fission yeast. *Cell* 125(1), 59-69.
- Masuda, H., Toda, T., Miyamoto, R., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Modulation of Alp4 function in *Schizosaccharomyces pombe* induces novel phenotypes that imply distinct functions for the nuclear and cytoplasmic  $\gamma$ -tubulin complexes. *Genes Cells* 11(4), 319-336.
- Masuda, H., Miyamoto, R., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). The carboxy-terminus of Alp4 alters microtubule dynamics to induce oscillatory nuclear movement led by the spindle pole body in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 11(4), 337-352.
- Osumi M., Konomi M., Sugawara T., Takagi T., Baba M. (2006) High-pressure freezing is a powerful tool for visualization of *Schizosaccharomyces pombe* cells: ultra-low temperature and low voltage scanning electron microscopy and immunoelectron microscopy. *J. Electron Microsc.*, 55, 75-88
- Fangwei Wang, Naoki Koyama, Hiroko Nishida, Tokuko Haraguchi, Walter Reith, Toshiro Tsukamoto (2006) The Assembly and Maintenance of Heterochromatin Initiated by Transgene Repeats are Independent of the RNA Interference Pathway in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* 26: 4028-4040.
- Ding, D.-Q., Sakurai, N., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. (2006) Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol.* Aug

14;174(4):499-508.

- Hayashi A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2006) Reconstruction of the kinetochore during meiosis in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*. Dec;17(12):5173-84.
- Ishida, M., Miyamoto, M., Naitoh, S., Tatsuda, D., Hasegawa, T., Nemoto, T., Yokozeki, H., Nishioka, K., Matsukage, A., Tanaka, S., Ohki, M., and Ohta, T. (2007) The SYT-SSX fusion protein down-regulates the cell proliferation regulator COM1 in t(x;18) synovial sarcoma. *Molecular and Cellular Biology*. 27 (4):1348-1355
- Kohda TA, Tanaka K, Konomi M, Sato M, Osumi M, Yamamoto M. (2007) Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes Cells*. 12, 155-170

## (2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:2 件)