[研究課題名] 細胞核表層から捉えた細胞核のアーキテクチャとダイナミズム
[研究課題名（英文）] Analysis of nuclear pore dynamics and nuclear structure
[研究担当者]前島一博, 矢幡一英、佐々木葉子、船越智子、今本尚子
[研究室] 今本細胞核機能研究室

１．研究目的（500 字程度）

細胞核は、真核生物の巨大なゲノムを安定に保持するとともに、同じゲノム情報から機能の異なる分化細胞をつくりだす仕組みを兼ね備えた動的な細胞内器官である。また、同じ塩基配列を持ったゲノム DNA は、細胞核という「箱」の中に収納されてはじめて、細胞機能に応じた情報を発現するという、個性と機能をもつことができる。このため、細胞機能に応じた適切なゲノム情報を取り出す仕組みを理解するためには、秩序立ったゲノム構造を納める細胞核の枠組み構造を視野に入れた研究が重要である。本研究では、その最初のアプローチの１つとして、核膜の最も顕著な構造体である核膜孔複合体に注目し、細胞周期や細胞分化、細胞老化などの細胞機能に応じて、その分布や数がどのようにダイナミックに変動するかを調べる。核膜孔複合体の動態変化に、細胞核のどの構造体が寄与するかを明らかにしていくことで、細胞核の構築と機能制御における核膜の役割を明らかにすることを目的とする。

２．平成 18 年度の研究計画（500 字程度）

ヒト培養細胞を用いて、細胞核表層の核膜孔複合体を可視化して、その分布を観ると、不均一に分布するものもあれば、均一に分布するものがあることに気付いた。まず、HeLaS3 細胞で、細胞周期マーカーを用いて細胞周期を通した核膜孔の分布の変化を調べると、核膜新生直後の telophase から earlyG1 期の核に、核膜孔が存在しない大きな核膜孔フリー（Pore-free）の領域が見出された。この核膜孔分布の大きな偏りが、細胞周期の進行にしたがって徐々に解消される傾向にあること、また、核膜孔の密度が細胞周期の進行に伴い増加することがわかった。核膜孔フリー領域の核膜構造との関連を調べるため、核膜の種々の裏打ち蛋白質の局在を調べると、LaminB に結合する LAP2βが核膜上にほぼ均一に局在する一方、Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの原因遺伝子産物である Emerin や LaminA/C は核膜孔フリー領域に高度に濃縮されていることがわかった。昨年度報告したこれらの知見に基づき、本年度は核膜孔分布と核内膜タンパク質の関係を明確にした上で、現象の普遍性を確認する。また、核膜孔複合体の構築とダイナミクスを生細胞で調べる。

３．平成 18 年度の研究成果（1000-2000 字程度）

細胞核構築における核膜の重要性を意識し、核膜に存在する核膜孔複合体に着目して細胞周期を通したその挙動の変化を調べた。細胞分裂を終えた核膜新生時に、核膜孔複合体は姉妹染色体上に不均一に分布するように構築され、細胞周期の進行に伴って G1 期から S 期にかけてその不均一分布が解消されることを見いだした。核膜孔複合体は、B-type lamin の分布と一致する一方で、A-type lamin の分布領域から排除されることが明らかになった。B-type lamin と相互作用する LBR は核膜孔複合体の分布と一致し、A-type lamin と相互作用する emerin は核膜孔複合体の分布領域から排除される。A-typelamin を siRNA で knock-down すると、核膜孔複合体の不均一分布が解消される一方で、lamin A を過剰発現すると、核膜孔複合体のない領域が核膜上に誘引される。これらの結果から、核膜孔複合体の核膜上の分布は核内膜タンパク質の分布と密接な繋がりをもち、その構造が細胞周期進行に伴って re-organize されることがはじめて明らかになった。私たちは、核内膜構造の作用で形成される細胞周期依存的な核膜ドメインを、新たに“Pore-free islands”と名づけた（Maeshima et al.2006）。脳研究センター･神経構築グループの中臣らと共同で、Freeze-fracture した HeLaS3 細胞の細胞核表面を走査電子顕微鏡で観察すると、１つ１つの核膜孔を「見る」ことができ、核膜上に広がる”Pore-free island”が確認できた。更に、このような”Pore-free island”は CFP や YFP を用いた生細胞観察でも確認された。

“Pore-free islands”は、HeLa 細胞のような不死化したガン細胞ばかりでなく、ヒト 2 倍体の正常細胞の細胞周期においても観察された。また、2 倍体細胞の quiescence（休止状態）では“Pore-free islands”が維持され、核膜孔の密度も低下した。その一方で、senescence（老化状態）で“Pore-free islands”は消失して核膜孔の密度も増加した。これらの観察は、「増殖停止状態」といった一見似た状態においても、両者の細胞の生理状態が大きく異なっていることを示し、senescence を不死化の前段階として位置づける上で非常に興味深い。このように核膜孔の分布や密度は細胞周期や細胞分化または細胞老化の過程で大きく変化する。これらの観察に基づき、今後核膜孔を指標にして細胞核の構造や動的な構築過程もあわせて追求したいと考えている。

核膜孔複合体の構築とダイナミクスを生細胞で調べるため、蛍光蛋白質でラベルされた様々な核膜孔構成因子を安定に発現する細胞株を複数樹立した。現在、この安定発現株を用いて核膜孔構築のメカニズムの解析を開始している（阪大微研、今本文男グループとの共同研究）。

４．目的と成果の要約（100-200 字程度．年報原稿用）

細胞核構築における核膜の重要性を意識し、核膜に存在する核膜孔複合体に着目して細胞周期を通したその挙動の変化を調べた。その結果、細胞周期依存的に規則的に変化する新たな核膜サブドメイン”Pore-free islands”を見つけた。”Pore-free island”は核内膜タンパク質ラミンと密接に関連をもち、細胞周期、細胞分化、細胞老化などの細胞機能に応じて変化する。

５．研究成果の概要（英文）

By visualizing the nuclear pore complex, we found a novel nuclear envelope subdomain, devoid of nuclear pores. The size of this “pore-free islands” drastically changes upon cell cycle progression with common periodic dynamics in all human cell line examined. Formation of islands is regulated by inner nuclear envelope protein, A-type lamin, providing strong evidences that nuclear pore dynamics are regulated by the reorganization of inner nuclear structure. These are the initial phenomena expecting underlying mechanisms that would bring about our understanding of nuclear organization and function from new aspects.

６．平成 18 年度誌上発表（英文のみ）

原著論文

Tanaka, K., Ogawa, K., Takagi, M., Imamoto, N., Matsumoto, K. & Tsujimoto, M. Rap55, a cytoplasmic mRNP component, represses translation in Xenopus Oocytes. (2007) ***J. Biol. Chem***. 281, 40096-40106

Maeshima, K., Yahata, K., Sasaki, Y., Nakatomi, R., Tachibana, T., Hashikawa, T., Imamoto,' F., and Imamoto, N. (2006) Cell cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. ***J. Cell Sci***., 119, 4442-4451.

Handa, N., Kukimoto-Niino, M., Akasaka, R., Kishishita, S., Murayama, K., Terada, T., Inoue, M,. Kigawa, T., Kose, S., Imamoto, N., Tanaka, A., Hayashizaki, Y., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2006) The crystal structure of mouse Nup35 reveals atypical RNP motifs and novel homodimerization of the RRM domain. ***J. Mol Biol***. 363, 114-24.

Aratani, S., Oishi, T., Fujita, H., Nikazawa, M., Fujii, R., Imamoto, N., Yoneda, Y., Fukamizu, A., & Nakajima, T. The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin-α3. ***Biochem Biophys Res Commun***, 340, 125-133 (2006).

７．メンバー（日本語および英語で）（理研以外の方は所属機関の正式呼称を日本語と英語で書いてください）

（例）

今本尚子　Naoko IMAMOTO

前島一博　Kazuhiro MAESHIMA

矢幡一英　Kazuhide YAHATA

佐々木葉子 Yoko SASAKI

船越智子　Tomoko FUNAKOSHI

佐々木葉子　YOKO Sasaki

８．共同研究者（同上）（理研のデータベース登録に必要なので，誌上発表のみならず，口頭発表でも名前を連ねている人をリストしてください）

小瀬真吾　Shingo KOSE

高木昌俊　Masatoshi TAKAGI

水野武　　Takeshi MIZUNO

大木本圭　Kei OHKIMOTO

柳　憲一郎　Kenichiro YANAGI

古田満衣子 Maiko FURUTA

今本文男　Fumio IMAMOTO（阪大、微研　Osaka University）

曽根岳史　Sone TAKEFUMI（阪大、微研　Osaka University）

西海史子　Fumiko NISHIUMI　（阪大、微研　Osaka University）

大杉美穂 Miho OHSUGI (東京大、医科研 University of Tokyo)

西住（渡海）紀子：Noriko Tokai-Nishizumi (東京大、医科研 University of Tokyo)

堀内　保臣：Yasutomi Horiuchi (東京大、医科研 University of Tokyo)

山本雅　Tadashi YAMOTO (東京大、医科研 University of Tokyo)

立花太郎 Taro TACHIBANA(大阪市立大学　Osaka City University)

中臣礼子　Reiko NAKATOMI (理研 BSI 神経構築技術開発グループ)

端川勉　Tsutomu HASHIKAWA (理研 BSI 神経構築技術開発グループ)