

## 哺乳類体細胞分裂期における核膜再構築機構の解析

Analysis of the mechanism of nuclear envelope reassembly at mitosis of mammalian somatic cells

大阪大学医学部解剖学第三講座助手 松岡洋祐

Department of anatomy and cell biology, Osaka university medical school.

Yosuke Matsuoka, Assistant professor.

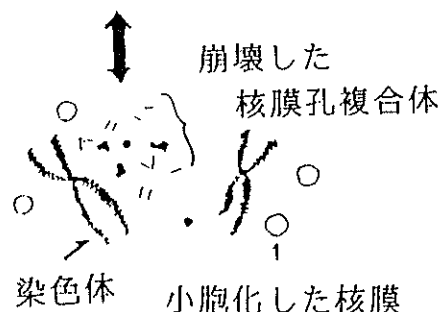
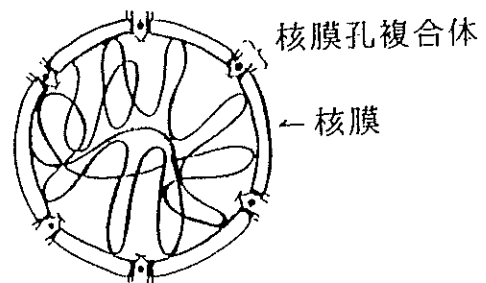
The nuclear pore complex (NPC) has an estimated mass of 125MDa and it is expected to consist of over 100 different polypeptides. During each cell cycle of mammalian somatic cells, the NPC undergoes an assembly and disassembly. I established a hybridoma cell line producing a monoclonal antibody which recognized NPC antigens. Using this antibody, I found that, at mitosis NPC disassembled into at least three subcomplexes, A, B and C (molecular mass; 1MDa<, 670KDa, 440KDa respectively). These subcomplexes were thought to be fundamental units of NPC in the process of nuclear reassembly. Further characterization of the subcomplex C revealed that this subcomplex consisted of Nup98 and a human homologue of yeast RAE1/GLE2 proteins. It was interesting that both proteins were involved in mRNA export from the nucleus. In a pseudo-interphase cell extract, I found that an additional protein bound to subcomplex C and molecular weight of this subcomplex grew up to 2MDa<. I think that the interaction between the additional protein and subcomplex C presents a good model for the study of NPC reassembly.

### 研究目的

細胞核はその中に遺伝子 DNA を保持し、遺伝子の複製、発現をはじめとする細胞にとって必須の機能を果たす場である。真核生物では核膜により細胞質と核内が仕切られているが、核膜は核-細胞質間の単なる仕切りではなく、核-細胞質間の物質輸送の場あるいは核内高次構造の足場として核の機能発現に不可欠な構造体である。核膜は膜構造、核膜孔複合体、ラミナからなる複雑な構造体であるが、高等真核生物では細胞分裂の度ごとに崩壊と再構築を繰り返す。核膜の制御された崩壊、再構築が行われなければ核機能は損なわれ、細胞は生存不可能になると考えられるので、核膜の崩壊、再構築には巧妙な機構が存在することが予想された。本研究では核膜の構成要素のうち特に核膜孔複合体に注目し、哺乳類体細胞分裂期での動態を解析することを出発点として核膜の崩壊、再構築のメカニズ

ムを明らかにすることを目的とした。

### 細胞分裂間期



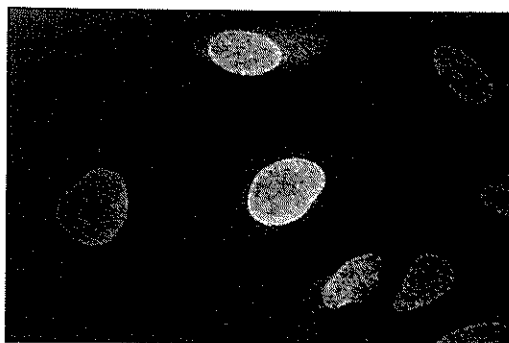
### 細胞分裂期

前ページの図は細胞分裂間期と分裂期各々の核膜のイメージ図である。分裂期に核膜は小胞となり、核膜孔複合体はある程度の大きさのサブコンプレックスとなる（本研究により示された）。

## 研究経過

ヒト子宮頸癌より樹立された Hela 細胞を細胞分裂期に同調し細胞抽出液から不溶性画分を得、これをマウスに免疫し抗核膜モノクローナル抗体 MY95 を調製した。電子顕微鏡での観察によりこの抗体の抗原は核膜孔に局在することが示された。細胞抽出液をこの抗体でイムノブロットすると主要な 3 本のバンドを含む多数の蛋白質バンドが検出された。これらのバンドは NPC の抗原蛋白質であると考えられるので、分裂期にこれらのバンドがどのような挙動をとるかを知らることで NPC の分裂期における動態を知ることができ、これを基盤として NPC の崩壊、再構築のメカニズムに迫れると考えた。そこで分裂期細胞抽出液をゲル濾過カラムにかけ、分子量別に分離し各画分を MY95 でイムノブロットした。その結果、MY95 の抗原は主として 3 種類のサブコンプレックス A、B、C として存在することがわかった。サブコンプレックス A、B、C の分子量は各々 1MDa<, 670KDa, 440KDa であった。MY95 の主要抗原として分子量約 200KDa, 60KDa, 100KDa の蛋白質が存在するが（各々、p200、p60、p100 とする）、p200 はサブコンプレックス A に p60 は B に、p100 は C に含まれていた。この 3 種類の蛋白質の部分アミノ酸配列を決定したところ p200 は CAN、p60 はヌクレオポリン p62、p100 は NUP98 でいずれも NPC の蛋白質として知られているものであった。サブコンプレックス C についてさらに解析を進めたところ、このコンプレックスは NUP98 と 40KDa の蛋白質から成ることが判明した。40KDa の蛋白質は新規のものであったためその全長をコードする遺伝子をクローニン

グしたところ酵母の遺伝子である RAE1、GLE2 のヒトホモログであることがわかった。BAPTA と呼ばれているカルシウムキレート剤は NPC の再構築を阻害することが知られている。分裂期抽出液を調製する際通常 BAPTA を加えておくが、もしこの薬剤を除いて抽出液を調製すれば部分的に分裂間期型となり NPC の再構築がある程度進んだ抽出液を得ることができると期待される。このような条件下で調製した抽出液をゲル濾過カラムにかけた結果、サブコンプレックス C の構成蛋白質が分子量 2MDa< に現われるとともに、これらと挙動をとる新たな蛋白質バンドが検出された。この蛋白質の部分アミノ酸配列を決定したところ、新規蛋白質であることがわかった。



MY95 による細胞の染色像。核が点状に染まる。個々の点が核膜孔複合体一個に相当する。

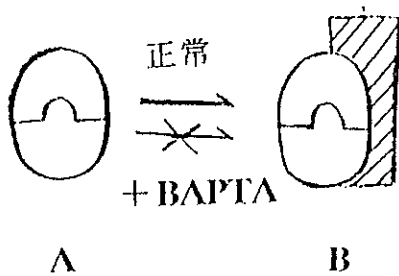
## 研究成果

1. 哺乳類体細胞の分裂期において NPC は個々の構成蛋白質のレベルまで崩壊するのではなくある程度の大きさのサブコンプレックスとして存在していることが明らかとなった。NPC 構成蛋白質と知られる CAN は 1MDa<, p62 は 670KDa, NUP98 は 440KDa のサブコンプレックスの構成要素となっていた。
2. サブコンプレックス C をさらに解析したところ、これが NUP98 と分子量 40KDa

の蛋白質から成ることがわかった。この40KDaの蛋白質は酵母のRAE1、GLE2のヒトホモログであることがわかった。RAE1、GLE2はmRNAの核外への移行に関与しているといわれており、またNUP98もmRNAの核外への移行に関与しているので分裂間期で共同して働いている蛋白質同士が分裂期でも挙動を共にすることで間期の互いの共同作業を保証しているのではないかと考えられる。

3. 部分的に NPC の再構築を起こさせた結果、サブコンプレックス C に新たな蛋白質が結合し、分子量が440KDa から2MDa<に増加することがわかった。この蛋白質は部分アミノ酸配列を決定した結果新規の蛋白質であることがわかった。

崩壊時                      再構築時



A : サブコンプレックス C  
 B { サブコンプレックス C  
       +  
       新規蛋白質

BAPTA を除いた時に見られるサブコンプレックス C の挙動のイメージ図。サブコンプレックス C と新規蛋白質との結合は BAPTA によって阻害されると考えられる。

#### 今後の課題と発展

現在までの研究で NPC の細胞分裂期での存在様式について基本的なことがわかっ

てきたので、今後はいよいよ NPC の再構築のメカニズムを本格的に探ることになる。再構築機構に関しては部分的に NPC の再構築を行なわせたときにサブコンプレックス C に結合してくる新規蛋白質の解析からとりくむ予定である。この蛋白質をコードする遺伝子の全長をまずクローニングし蛋白質の基本的特徴を把握し、次にサブコンプレックス C とどのようにして結合するのか、結合部位や細胞周期による結合様式の変化、結合を促進する蛋白質の有無等を調べる。これにより NPC 再構築機構の基本的メカニズムが明らかになることが期待される。また、この蛋白質もまた mRNA の核外への移行に関与しているのか否か、興味深いところである。

本研究で部分アミノ酸配列を決定した蛋白質のうち、CAN と NUP98 はそれぞれの蛋白質の遺伝子が細胞の中での異常な遺伝子組み換えの結果、途中から別の蛋白質の遺伝子に置き換わっているという例がある種の白血病で見つかっており、これら蛋白質と発癌との関連が注目されている。これらの NPC 蛋白質の異常が果たして癌化と結び付くのかどうか、もし結び付くとすればどのようなメカニズムが働くのかについて解析を進めたい。細胞内で重要な働きをしている蛋白質間の相互作用の異常が癌化につながるということは十分に考えられるので、各々が含まれるサブコンプレックス内での蛋白質間の相互作用に着目して検討を加える予定である。

#### 発表論文

現在投稿準備中。