大日方 英，和泉 孝志
（群馬大学大学院医学系研究科機能分子生化学）

Progress in proton-sensitive GPCR research

Hideru Obinata and Takashi Izumi（Department of Molecular Biochemistry, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan）

細胞周期における核膜孔のダイナミクス

はじめに

「真核細胞」が「真核細胞」であるゆえん，それは文字通り細胞における「核」の存在である．この細胞核は単に遺伝情報を持つゲノムDNAを細胞質から隔離するだけでなく，秩序立った内部構造を維持し，個々の細胞の機能にあわせてゲノム構造を支えている．このため，真核細胞は原核細胞に比べてより複雑なシステムを持つことが可能になった．その細胞核膜の二重膜上に存在する核膜孔は，核膜上のもっとも顕著な構造体であり，細胞質と核をつなぐ物質輸送・情報伝達の場として機能している[1,2]．たとえば，ヒトの全タンパク質のうち，約3分の1のタンパク質が核内に運ばれ，核内で転写されたほとんどすべてのRNAが核外に運び出される．このことを考えれば，核膜孔の重要性は明らかだろう．実際，活発に増殖する初期胚・がん細胞などでは，核膜孔は核膜上に非常に高密度に存在し，「核膜は核膜孔によってできている」と言っても過言ではない．また近年，この核膜孔が単に核-細胞質間の輸送ばかりではなく，遺伝子発現制御にも積極的に関与することが明らかになりつつある[3]．

1. 核膜孔複合体とは？

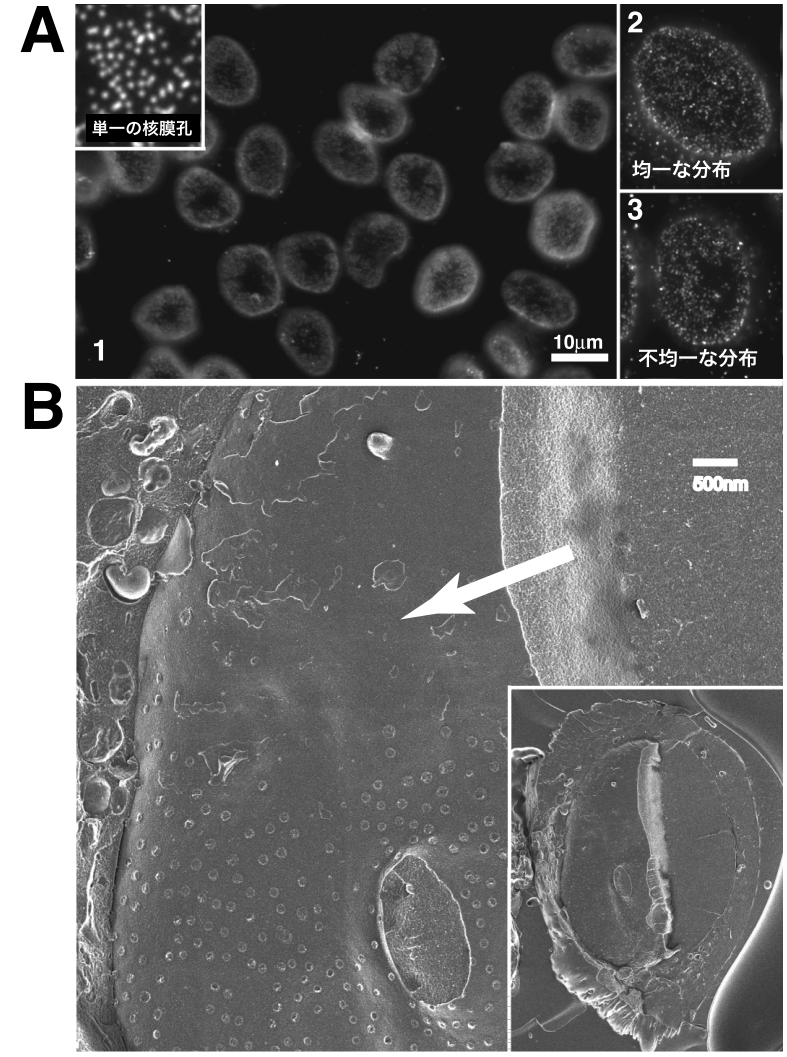
核膜孔複合体（Nuclear Pore Complex, NPC）は，ユニークな八方対称構造をとっており，脊椎動物では直径約120 nm，総分子量100MDa以上にも及ぶ巨大なタンパク質複合体である．八方対称であるため，約30種類の構成因子がそれぞれ8～48コピー（8の倍数個）ずつ存在し，ポリペプチド総数は500から1,000個と推測されている．この核膜孔構成因子は機能によって大きく三つに分類できることが分かってきた．一つ目は，脊椎動物ではNup107-Nup160コンプレックスと呼ばれる複合体構築のスキャホールドとして機能するもの．二つ目はフェニルアラニンとグリシンに富む疎水性の繰り返し配列（FGリピート）を持つ複合体因子群であり，構成因子のおよそ1/3を占める．三つ目は脂質膜の膜貫通領域を持つタンパク質で，脊椎動物ではPom121，gp210，NDC1の三つが知られており，核膜孔複合体の本体を核膜にアンカーしていると考えられている．核膜孔複合体の構造の詳細については概説した総説などを参照されたい[1,2]．

2. 細胞周期における核膜孔の動態をしらべる

今までの核膜孔の研究は，主に輸送担体を通過させる構造体としての側面から行われてきた．実際，細胞周期（G_1-S-G_2）の進行にともなって核膜上の核膜孔の数が2倍に増加することを，1971年にMaulが報告して以来[4]，核膜孔の動態についてはほとんど解析されていなかった．私たちは「この巨大な複合体がいつ，どこで，どのように，構築されるのか？」という細胞周期における核膜孔のダイナミクスに深い興味を持ち，研究をはじめることにした．

私たちは，まず研究室にあったヒトHeLaS3細胞において，「核膜孔が核膜表面にどのように分布するのか？」を蛍光免疫染色で調べることにした．カバースリップの上に培養したHeLaS3細胞では，カバースリップに面した核の底面はほとんどフラットである．ここで核膜孔構成タンパク質のFGリピートを認識するmAB414抗体を用いると，蛍光顕微鏡で核表面の1個1個の核膜孔を詳細に観察することができる（**図1A-1**左上）．蛍光免疫染色した核表面を観察すると，驚いたことに核膜孔の分布は，個々の細胞によってかなり異なることが分かった（図1A-1）．ある細胞では核膜孔はほぼ均一に分布する一方（図1A-2），他の細胞では，顕著な偏りが存在し，核膜孔が存在しない領域が広がっている（図1A-3）．私たちは，このような細胞による核膜孔分布の違いに大変興味を持ち，核膜上に広がる「核膜孔の存在しない領域」を“pore-free island”と名付け，その構造と動態について詳細に解析することにした[5]．

蛍光免疫染色法は，抗体を用いて核膜孔を間接的に可視化しているため，抗体のaccessibilityの問題もはらんでいる．私たちは，核膜孔を直接「見る」ため，細胞を瞬間凍結してフリーズフラクチャーを作製し，クライオ走査型電子顕微鏡で観察した（図1B）．すると，露わになった核表面には，1個1個の核膜孔に加えて，核膜上に広がるpore-free islandが確かに存在した（図1B）．それでは，蛍



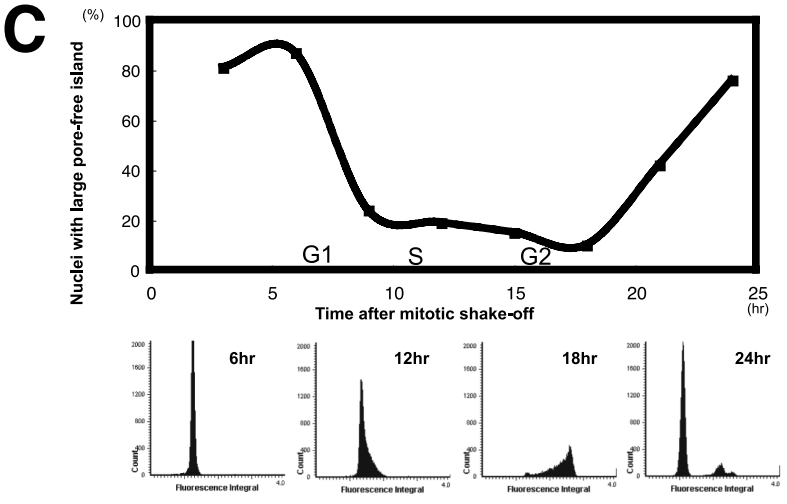


図1　核膜上の核膜孔分布の偏りと pore-free island

A：非同調の HeLaS3 細胞の核表面の核膜孔蛍光免疫染色像．1．低倍率像　2・3．高倍率像　3においては核膜孔の分布の顕著な偏りが観察される（pore-free island）

B：細胞瞬間凍結後のフリーズフラクチャーサンプルのクライオ走査型電子顕微鏡像．一つ一つの核膜孔が見え，核膜上に pore-free island が広がっているのが分かる（矢印）．

C：細胞周期進行にともなう pore-free island の解消．分裂期同調した HeLaS3 細胞をリリース後，経時的に pore-free island を持つ細胞の割合をプロットした（上パネル）．リリース後の細胞周期進行をオリンパス LSC2 でモニターした（下パネル）．5時間後，80–90%の細胞に pore-free island が観察されたが，細胞周期進行に伴い（7–8時間後），顕著に減少した．分裂期再突入後，また増加が観察された（18時間後）．

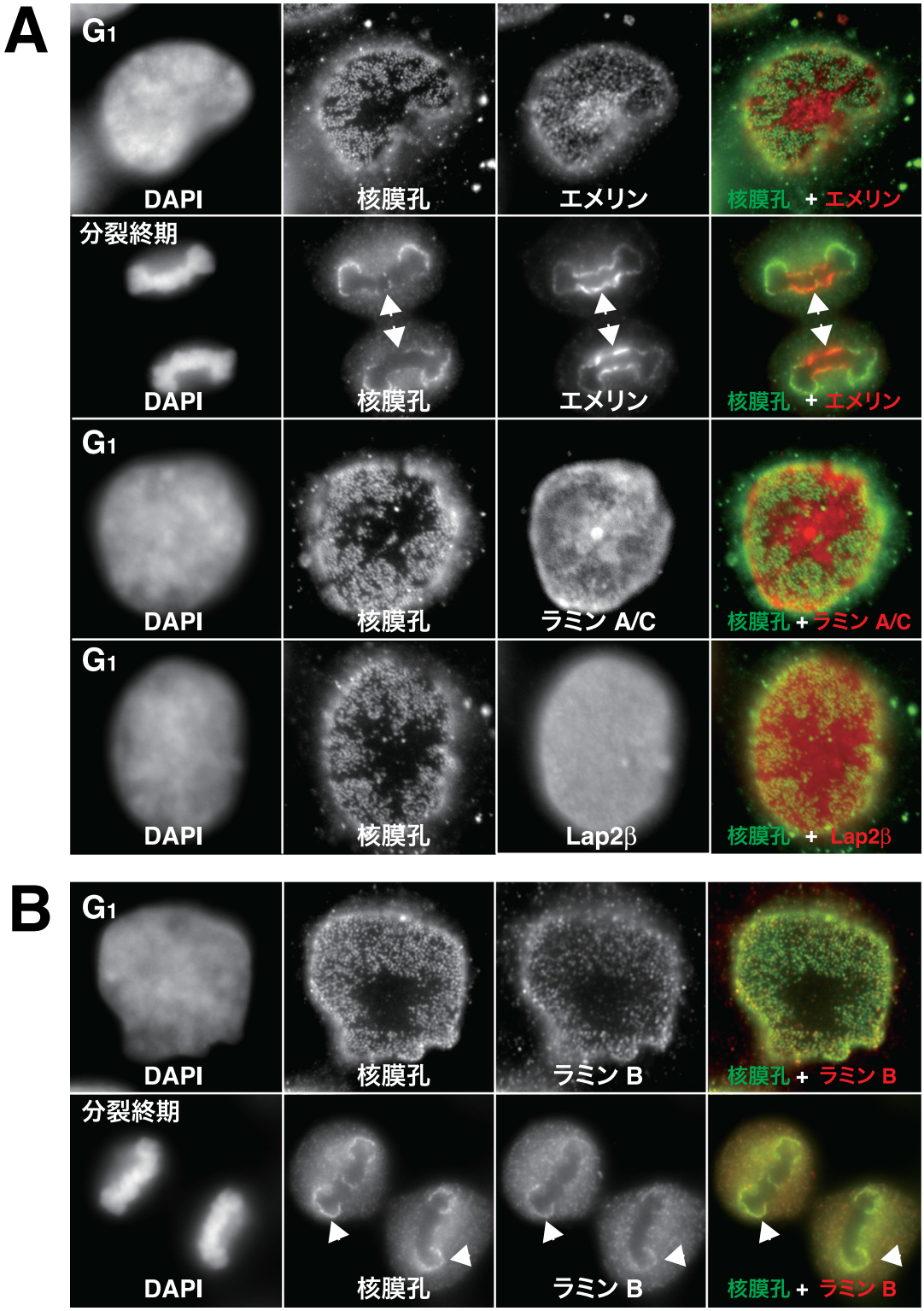

A
G1
DAPI
核膜孔
エメリン
核膜孔 + エメリン
分裂終期
DAPI
核膜孔
エメリン
核膜孔 + エメリン
G1
DAPI
核膜孔
ラミン A/C
核膜孔 + ラミン A/C
G1
DAPI
核膜孔
Lap2β
核膜孔 + Lap2β
B
G1
DAPI
核膜孔
ラミン B
核膜孔 + ラミン B
分裂終期
DAPI
核膜孔
ラミン B
核膜孔 + ラミン B

図 2

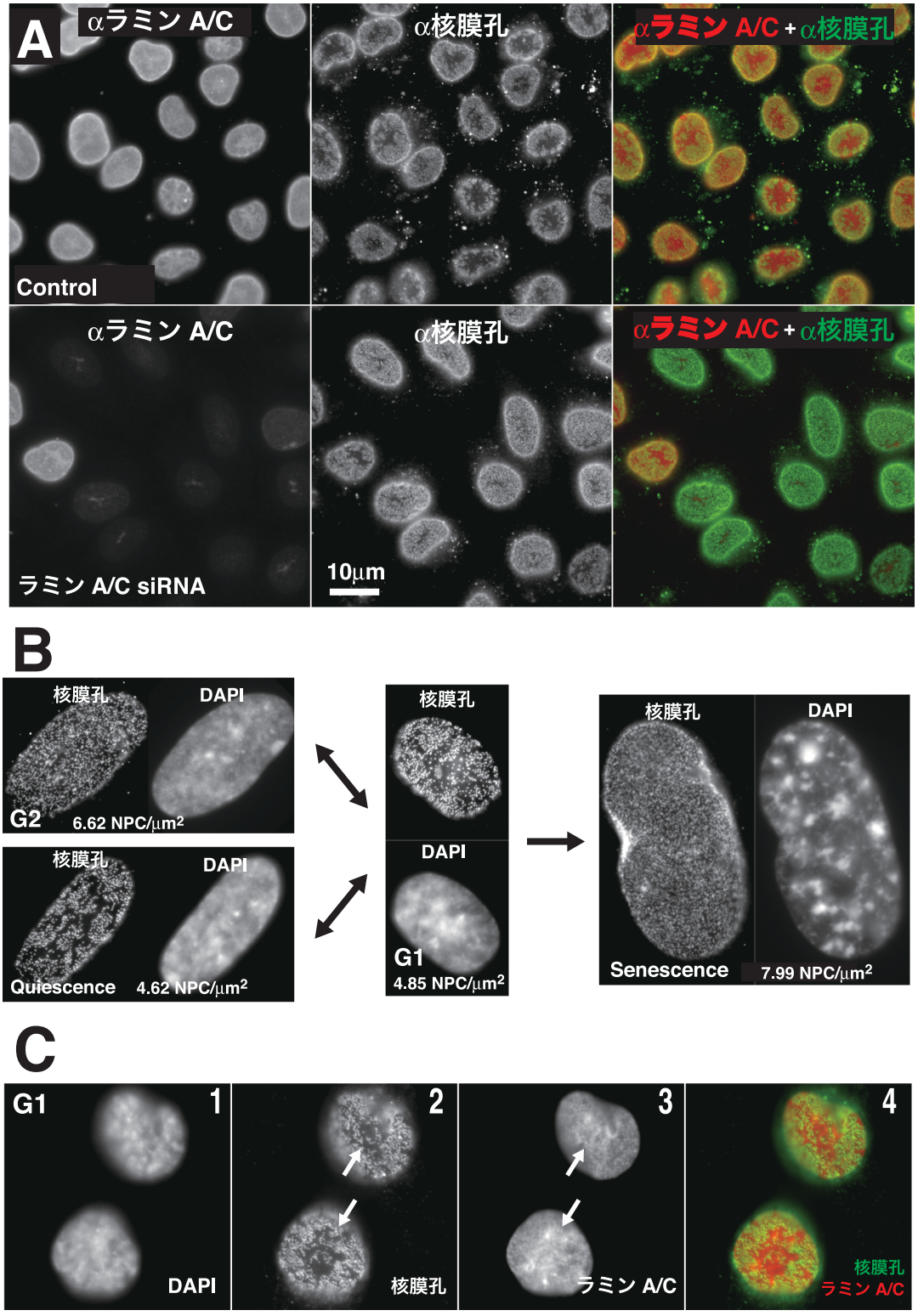

A
αラミン A/C
αラミン A/C + α核膜孔
Control
ラミン A/C siRNA
10μm
B
核膜孔
DAPI
G2
6.62 NPC/μm2
Quiescence
4.62 NPC/μm2
G1
4.85 NPC/μm2
Senescence
7.99 NPC/μm2
C
G1
1
2
3
4
DAPI
核膜孔
ラミン A/C

図 3

図2 pore-free islandにおける核内膜タンパク質の特異的な濃縮
A：G_1期の細胞核（1，3，4段目）と分裂終期（2段目）の核膜孔（左から2列目）と，さまざまな核内膜タンパク質（3列目）の蛍光免疫染色．pore-free islandにEmery-Dreifuss型筋ジストロフィーの原因遺伝子産物として知られるエメリンとラミンA/Cの濃縮が観察される．一方，lap2bは核膜上にほぼ均一に分布している（4段目）．分裂終期では両側面にpore-free islandが観察され（矢印），エメリンの局在が見られる（2段目）．G_1期のイメージはすべて核の底面（下面）のものである．核の上面にも多くの場合，同様のpore-free islandが観察される．
B：G_1期の細胞核（1段目）と分裂終期（2段目）の核膜孔（左から2列目）とラミンB（3列目）の蛍光免疫染色．エメリンとラミンA/Cとは異なり，核膜孔領域に局在が見られる．

図3
A：pore-free island形成におけるラミンA/Cの関与．ラミンA/CをsiRNAでノックダウンすると（下段），pore-free islandの形成が抑えられた．
B：ヒト正常2倍体細胞（IMR90）の細胞周期における核膜孔分布の変化．G_1期（中央）からG_2期（左上）に進行するにつれて，パッチ状に広がった核膜孔の分布の偏り（運河のようなpore-free island）は解消され，密度も増加した．血清を除去したquiescence期（G_0；休止状態，左下）では分布の偏りを示し，核膜孔密度は低下した．しかしながら，分裂を繰り返したreplicative senescence期（老化状態，右下）の細胞では分布は均一となり，密度は増加した．つまり，核膜孔の偏りは，HeLa細胞のようながん細胞だけでなく，正常細胞でも存在し，pore-free islandにはラミンA/Cの濃縮がみられた（C）．

光免疫染色のイメージの中に，どうしてpore-free islandが存在する細胞と存在しない細胞があるのだろうか？　先の観察では非同調の細胞を用いたため，分裂期同調した細胞をリリースし，pore-free islandを持つ細胞の割合を経時的に計測した（図1C）．この結果，分裂終期からG_1初期の約80%の細胞にpore-free islandが存在していたが，S期，G_2期と細胞周期の進行にしたがって，pore-free islandは徐々に解消されることが分かった．さらに，核膜孔の密度は細胞周期の進行に伴い増加した．つまり，核膜上の核膜孔の分布や密度は細胞周期においてダイナミックに変化することが明らかになった．

3. pore-free islandの形成[5]

それでは，どのようにしてpore-free islandが作られるのであろうか？　この問いに答える前に，少し数学的な考察を行っておきたい．G_1期では，pore-free island以外の核膜孔の密度は約7個/μm^2である．そして，平均的なpore-free islandの面積は30μm^2ほどである．もし，核膜孔がランダムに作られ，その分布がポアソン分布に従うと仮定すると，「30μm^2の領域で核膜孔が作られない確率」が計算できる．そのような計算結果は約1×10^{-79}と出た．つまり，偶然では起こりえない！ということであり，核膜上のある領域をpore-free islandにする何かが存在するということを意味する．pore-free islandの基盤構造を詳しく調べるため，核膜の内膜タンパク質群（inner nuclear membrane proteins）を調べることにした．ラミナなどの核膜の内膜構造は，核膜の「裏打ち」として，核膜を物理的に支えていると考えられている[1]．エメリン，ラミンA/C，lap2b，ラミンB，ラミンBレセプター（LBR）など様々な核内膜タンパク質群の蛍光免疫染色を行った結果，驚いたことにpore-free islandにはEmery-Dreifuss型筋ジストロフィーの原因遺伝子産物として知られるエメリンやラミンA/Cが高度に濃縮されていることが分かった（**図2A**）．一方，ラミンBやLBRは，核膜孔と同様の分布を示した（図2B）．lap2bは核膜上にほぼ一様に分布する（図2A）．また，エメリンのYFP融合タンパク質の細胞内発現でも，同様の局在が得られている．これらの結果から，核内膜タンパク質は，従来考えられていたように核膜上に一様に分布するものではなく，ラミンBやLBRは核膜孔領域，エメリンやラミンA/Cはpore-free islandのように，選択性や「棲み分け」が存在することが分かった．この知見は，今後，核膜構造を考える上で非常に興味深い．以上の解析は，G_1期の核で行ったが，細胞周期を分裂終期までさかのぼっても，やはり新生核の両側面にpore-free islandが存在し，エメリンの濃縮が確かに観察された（図2A　2段目）．この分裂終期におけるエメリンの濃縮は，もともと原口らによって見出された「コア領域」と呼ばれるものである[6]．このようにpore-free islandは新生核が形成される分裂終期から存在することが分かった．ここで付け加えたいのは分裂終期とG_1期におけるpore-free islandの位置関係である．図2のG_1期のイメージはすべて核の底面（下面）を示している．多くの場合，核の上面にも同様のpore-free islandが観察される．つまり分裂終期では，pore-free islandが核の両側面にあるが，G_1期の核では上面と下面（底面）に存在する．このことは，分裂終期からG_1期にかけて，核が90度回転することを意味している．

4. 核膜孔の分布に対する核内膜タンパク質の関与[5]

先ほどpore-free islandにはエメリンやラミンA/Cが高度に濃縮されていると述べた．それでは実際，核内膜タンパク質は核膜孔の分布にどのような影響を与えているのだろうか？　この問いに答える最初の手がかりが意外なところから得られた．研究室内のいくつかのHeLa細胞株を調

べたところ，どの株でも分裂終期にはpore-free islandが存在するが，細胞周期におけるpore-free islandの解消時期はまちまちであった．このことはそれぞれの株で「何か」が変化して，pore-free islandの安定化に寄与していることを意味する．私たちは，さまざま核内膜タンパク質を調べた結果，細胞株間でラミンA/Cの発現量に大きな違いがあることを見出した．つまり，顕著なpore-free islandを持つものは，ラミンA/Cの発現量が増加していたのである．それではラミンA/Cの量を減らせばどうなるだろうか？このため，先のHeLaS3のラミンA/CをsiRNAでノックダウンし，発現量を減らしてみた（**図3A**）．すると，pore-free islandは解消していた（図3A）．一方，エメリンのノックダウンはpore-free islandに変化をもたらさなかった．これはエメリンの核内膜への局在はラミンA/Cに依存するという知見を考えれば納得する．つまりエメリンはラミンA/Cの「乗り物」にすぎない．また，細胞にラミンA/Cを過剰発現させると，やはりpore-free islandが形成されることが分かった．つまり，ラミンA/Cのような「核内膜の裏打ちタンパク質」がpore-free islandの形成を含む，核膜孔分布の制御に重要な役割を果たすことが明らかになったわけである．また，私たちのグループの船越らの解析では，膜貫通領域を持つPom121をノックダウンすると，ラミンA/Cの核膜上での凝集が観察された[7]．この知見も核膜孔と核内膜タンパク質の結びつきを示しているのかもしれない．

5.　正常細胞でのpore-free island[5]

このようなpore-free islandは，HeLa細胞のような不死化したがん細胞ばかりでなく，ヒト2倍体正常細胞の細胞周期においても観察される（図3B）．G_1期では，核膜孔はパッチ状に分布し，運河のようなpore-free islandが広がっている（中央）．G_2期に進行するにつれて，パッチ状の核膜孔の分布の偏りは解消され，密度も増加した（左上）．血清を除去したquiescence期（G_0：休止状態）では分布の偏りを示し，核膜孔密度は低下した（左下）．しかしながら，分裂を繰り返したreplicative senescence期（老化状態）の細胞では分布は均一となり，密度は増加した（右）．つまり，核膜孔の挙動は細胞周期だけでなく，細胞の生理状態によっても大きく変化することが分かった．確かにpore-free islandにはラミンA/Cの濃縮が見られた（図3C）．

終　わ　り　に

以上のように，私たちはこれまで，核膜孔を指標として細胞核の動的な形成過程の解析を行ってきた．その結果，核膜上の核膜孔の分布には大きな偏りが存在し，核膜孔の数や分布は細胞周期や分化の過程でダイナミックに変化することを明らかにした[5]．現在，核膜孔形成の解析は，細胞分裂期直後の核膜新生に伴う核膜孔形成を対象とするものが主流である．核の二重膜形成後，どのようにして新たな核膜孔が膜に挿入され，構築されていくか？　そのメカニズムは，分裂直後の核膜孔形成とは全く異なる可能性があり，極めて興味深いものである．また，核膜孔の構築はどのように制御されているのであろうか？　最近のEllenbergらの解析では，核膜孔複合体内における各構成タンパク質の安定性は，数秒から数十時間と大きな隔たりがあることが分かっている[8]．このような核膜孔内の滞在時間と構築過程には相関があるのかもしれない．

今後，本稿で紹介した知見を足がかりとして，透過・走査電子顕微鏡観察，光学顕微鏡ライブ観察を組み合わせて，核膜孔形成のメカニズムを総合的に解明したいと考えている．

本稿に述べた研究は，理研の今本細胞核機能研究室の佐々木さん，渡辺さん，飯野さん，船越博士，理研脳センターの中臣さん，端川博士，阪大微研の矢幡博士，今本教授，大阪市大の立花博士との共同研究として遂行されました．ここに深く感謝致します．

1）Hetzer, M.W., Walther, T.C., & Mattaj, I.W.（2005）*Annu. Rev. Cell Dev. Biol*., **21**, 347–380.
2）Suntharalingam, M., & Wente, S.R.（2003）*Dev. Cell*, 4, 775–789.
3）Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G., & Laemmli, U.K.（2002）*Cell*, **109**, 551–562.
4）Maul, G.G., Price, J.W., & Lieberman, M.W.（1971）*J. Cell Biol*., **51**, 405–418.
5）Maeshima, K., Yahata, K., Sasaki, Y., Nakatomi, R., Tachibana, T., Hashikawa, T., Imamoto, F., & Imamoto, N.（2006）*J. Cell Sci*., **119**, 4442–4451.
6）Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y., & Hiraoka, Y.（2000）*J. Cell Sci*., **113**, 779–794.
7）Funakoshi, T., Maeshima, K., Yahata, K., Sugano, S., Imamoto, F., & Imamoto, N.（2007）*FEBS Lett*., **581**, 4910–4916
8）Rabut, G., Doye, V., & Ellenberg, J.（2004）*Nat. Cell Biol*., **6**, 1114–1121.

前島 一博，今本 尚子
（独立行政法人理化学研究所 中央研究所
今本細胞核機能研究室）

Cell cycle dependent dynamics of nuclear pores
Kazuhiro Maeshima and Naoko Imamoto（Cellular Dynamics Laboratory, RIKEN Institute, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-0198 Japan）

DNA損傷トレランスの分子機構とその役割

はじめに

遺伝情報の中枢であるゲノムを構成する核酸は，非常に反応性に富んだ化学的性質を備えている．このような化学的性質は，DNA複製や転写などの様々な生命機能に貢献している一方で，放射線や化学物質などの外的要因や，細胞内代謝の過程で生じる活性酸素及び細胞内pHの変化などの内的要因による膨大な数のDNA損傷を引き起こす原因ともなっている．これらのDNA損傷が修復される前にDNA複製フォークがその損傷箇所に到達すると，塩基の誤対合や複製フォークの進行阻害が起こる．これらのDNA複製異常は，突然変異等のゲノム不安定性や細胞死を引き起こすことから，ヒトにおいては発がんや老化促進の原因となっている．DNA損傷に起因するDNA複製フォークの進行阻害が起こった場合，複製の再開にDNA損傷の修復を待っていては，DNA複製完了にかかる時間は様々なDNA損傷の修復効率に依存し，さらにDNA修復機構自体が細胞増殖に必須の機能となってしまう．そのような事態を回避するために，損傷部位を修復することなく，“バイパス”する機能によりDNA複製フォークの進行を保証する*RAD 6* DNA損傷トレランス機構が存在する．本稿では，DNA損傷によるDNA複製の進行阻害の回避に働くDNA損傷トレランスに関して，出芽酵母の研究から明らかになってきた分子メカニズムについて解説する．

1. 出芽酵母におけるDNA損傷トレランス経路に関わる因子

紫外線等によって生じるDNA複製阻害の回避には，*RAD 6* 経路に属するRad6-Rad18複合体が中心的な役割を果たしている．Rad6及びRad18は，それぞれ標的タンパク質のリジン残基へユビキチン（Ub）を結合する反応に関与するUb結合（E2）及びUbリガーゼ（E3）活性を有するタンパク質であり，さらに，Rad18は，DNA結合活性を持ち，増殖核抗原（PCNA）と物理的に相互作用する（**図1**）．PCNAは，DNAポリメラーゼの伸長反応の促進因子（DNAクランプ）であることから，Rad18は，E3酵素としての機能以外に，Rad6-Rad18複合体を停止したDNA複製装置上にリクルートする役割を持つと考えられる．

RAD 6 経路の下流には，大きく分けて二つの経路が存在する．一つは，損傷部位を乗り越えてDNA合成を行うことが出来るDNAポリメラーゼが関与する経路で，一般に，損傷乗り越え型DNA合成（translesion DNA synthesis, TLS）経路と呼ばれている（図1）．このようなDNAポリメラーゼとして，DNAポリメラーゼζ及びDNAポリメラーゼηが存在する．DNAポリメラーゼηは，少なくとも紫外線によって生じるシクロブタン型ピリミジンダイマーのような損傷塩基に対しては，正しい塩基を対合させることが出来るため，TLSの中でもエラーフリーの働きを持っている[1,2]．DNAポリメラーゼζは，*REV3* 遺伝子によってコードされており，Rev7サブユニットと複合体として機能する．出芽酵母では，紫外線などのDNA損傷によって突然変異が誘発されることが知られているが，これらの大部分は，DNAポリメラーゼζに依存している[3]．

そして，もう一つの*RAD6* 経路として機能するのが，Ubc13-Mms2複合体及びRad5からなる複製後修復経路（post replication repair, PRR）であり，DNA複製フォークが損傷塩基部位を誤りなく乗り越える働きにおいて主要な役割を果たしている（図1）．Ubc13及びMms2は，Ub結合酵素（E2）に類似した構造を持つが，実際にはUbc13のみがその機能を有する．Rad5は，Swi-Snf2型ATPaseドメインを持つUbリガーゼ（E3）であり，Rad18及びUbc13と相互作用することから，Rad6-Rad18-PRRのユビキチン化修飾酵素からなる高次複合体形成に重要な役割を果たしている（図1）[4]．PRR経路の詳細は未だ不明な点が多いが，DNA複製のリーディング鎖合成が停止した場合，新生ラギング鎖の相同鎖領域を鋳型として部分的にDNA合成が行われた後，この分岐点が複製の進行方向に移動することで損傷塩基箇所を乗り越える反応を行っていると考えられている（図1）．このような反応は，一時的にDNA合成の鋳型鎖を交換することからテンプレートスイッチ反応