

特集：観て考える，考えて観る—細胞内オルガネラの空間構造変化

小胞体による核膜の再形成

伴 玲 子^{1,2}，浦 野 健¹

核は、生物の遺伝情報が保存され転写される場であり、核の統合性を維持することは細胞にとって非常に重要である。外膜と内膜からなる二重の脂質二重膜構造をとっている核膜は、核の統合性の維持に必須である。核膜は、単に核と細胞質とを隔てているだけでなく、核膜上に存在する無数の核膜孔を通して核-細胞質間の選択輸送を行い、核の統合性を維持している。この核膜は、分裂期では染色体分配のためにいったん崩壊するが、染色体分配が終わると再び染色体の周りに形成され始め、新たな核膜ができあがる。核膜再形成の機構は古くから研究されているが、実際の分裂期細胞内における核膜再形成の全貌は明らかになっていない。本稿では、これまでの核膜再形成研究の流れと、最近新たに報告された小胞体による核膜再形成のモデルを紹介する。

1. はじめに

細胞情報の貯蔵庫である核は、外膜 (ONM: outer nuclear membrane) と内膜 (INM: inner nuclear membrane) からなる二重の核膜 (NE: nuclear envelope) に覆われた形で細胞内に存在している (図 1)。外膜は、核の周辺に存在する小胞体 (ER: endoplasmic reticulum) と連結している。一方、内膜には多数の INM タンパク質が存在しており、これらは ER で合成されたのち、外膜と連結する道をたどって内膜にやってくる¹。多くの INM タンパク質は DNA やクロマチン構成因子と結合することができ、これにより核膜を核につなぎとめている^{2,3}。内膜のさらに裏側にはラミン A, B からなる中間径フィラメントの一種の核ラミナが裏打ち構造を形成し、核膜の強度を保ってい

る^{2,3}。また、核膜には無数の核膜孔 (NP: nuclear pore) が存在し、核-細胞質間の輸送を行っている^{2,3}。

細胞分裂は細胞が 2 個の娘細胞へと分かれる現象であり、その過程において、生物の遺伝情報すべてが記載されている染色体は正確にそれぞれの娘細胞に分配される。染色体分配は、分裂期紡錘体が染色体に結合し、各娘細胞へ引っ張ることにより行われるが、これには核膜で隔離されている染色体が剥き出しになる必要がある。そのため、分裂期において核膜は一度崩壊し、染色体分配が終わったあと再び形成される。核膜の存在が発見されてから 100 年以上経つが、分裂期における核膜の崩壊と再形成の機構はいまだよくわかってはいない。ここでは、特に核膜再形成に焦点をあて、最近報告された新たな知見をもとに核膜の再形成機構のモデルを紹介する。

2. 核膜再形成のこれまでのモデル機構

核膜の崩壊 (NEBD: nuclear envelop break down) は分裂前期から前中期へ移行する時に突然起こる。これまでの研究によると、まず分裂期キナーゼである Cdk1 によってラミンがリン酸化され、核ラミナの裏打ち構造が壊れ核膜の強度が保てなくなる。同じ頃、核膜孔も解体し膜の透過性障壁が失われる。さらに、INM タンパク質も Cdk1 や下流のキナーゼでリン酸化を受け、これにより他のタンパク質や DNA との結合能が弱まる。その結果、核膜をつなぎ

¹ 島根大学医学部病態生化学講座 (〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1)

² 名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞化学 (〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65)

Nuclear envelope assembly by endoplasmic reticulum during cell cycle

Reiko Ban^{1,2} and Takeshi Urano¹ (¹Department of Biochemistry, Shimane University Faculty of Medicine, 89-1 Enyacho, Izumo 693-8501, Japan; ²Department of Biochemistry II, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan)

とめておくことができなくなり、最終的に核膜は崩壊に至ると考えられている^{2,3)}。

染色体が分配され脱凝縮し始める頃になると、染色体の周りに核膜が再び形成され始め、細胞質分裂期には核膜で覆われた核へと戻る。核膜の再形成は、上述した NEBD の機構の逆の流れ — つまり、INM タンパク質やラミンの脱リン酸化が起こり、それらはフラグメント化した核膜とともに染色体周囲に集合し、もとの核膜に戻るとまず想像される。実際にそれを再現する手段があればより詳しい解析を行うことができる。そこで、アフリカツメガエルの卵抽出液を用い *in vitro* で核膜を再形成する実験系が開発された³⁻⁵⁾。卵抽出液を細胞質画分と膜画分に分け、膜画分をさらに分画し、そのうちの light membrane fraction を細胞質画分および精子クロマチンと反応させると、最終的に1枚の膜で覆われた核ができあがる。この light membrane fraction に核膜前駆小胞が存在すると考えられる。この実験系によると、核膜再形成はいくつかのステップに分けることができる(図2)。まず、1) 核膜前駆小胞がクロマチン表面に集合し、2) これら小胞同士が融合し、クロマチン表面にチューブル状ネットワークを形成する。続いて、3) このネットワークがさらに融合していき、最終的に1枚の膜となる。その後、4) ラミンなどの核の構成因子が核内に輸送され核が成長するのにもなって、核膜も膨張していく。核膜孔の形成は、ステップ3前後で起こるとされている。

この実験系を用いたこれまでの研究から、核-細胞質間輸送の制御で知られている Ran GTPase の活性が、核膜の形成および核膜孔の形成に必須であると言われている。GTP 結合型の活性化 Ran の非存在下では、膜の融合ができないため1枚の核膜が形成されず、また核膜孔構成因子(NPC: nuclear pore complexes) の集合も見られない^{3,6)}。これはおそらく、分裂前中期における Ran による紡錘体形成⁷⁾と同じように、染色体周辺において Ran の活性勾配を作り出し、これが核膜再形成の合図になっているのではないかと考えられている^{3,6)}。1枚の核膜を作り出すための膜の融合(ステップ2から3)には、小胞融合を制御する AAA ファミリー ATPase^{*脚注} の一つ p97 と、そのアダプタータンパク質である Ufd1/Npl4 からなる複合体が関与していることが示唆されている^{2,3,8,9)}。これらの機能を障害

すると、初期段階での核膜の融合が起こらない。また、核膜形成後の核の成長(ステップ4)にも Ran が制御する核内輸送が必須で、この系を介して核内にラミンなど核構成因子を取り込んでいく¹⁰⁾。この時、成長する核のサイズに合わせて核膜の膨張が起きるが、これは核膜前駆小胞を核膜に融合させることで膨張していくと考えられている^{2,3,8,9)}。前述した p97 と別のアダプタータンパク質の p47 からなる複合体がこれを制御しているようである。

以上をふまえると、核膜の形成/膨張には GTP や ATP を使った膜の融合が必須であり、実際、GTPγS や ATPγS 存在下では *in vitro* での核膜再形成は起こらない^{6,11,12)}。ただし、*in vitro* で見られるこの一連の流れが、分裂期における核膜再形成時に同じように細胞内でも起こっているのかは疑問が残る。本当に細胞内に核膜前駆小胞なるものが存在するのか、存在するのであればその小胞はどこから湧き出てきたものなのか。それを知るためには、核膜崩壊後に核膜構成因子がどのようなになるのかという点が問題となってくる。

3. 核膜と ER ネットワーク

生細胞のイメージング観察から、INM タンパク質のように膜に存在していた核膜構成因子は、核膜崩壊後から再形成されるまでの間、ER 内に局在することが明らかになった¹³⁾。ER は、粗面小胞体(RER: rough/ribosome ER) のような1枚の膜で包まれた袋状の形態以外に、細いチューブル状の膜が三叉につながり合った網状のネットワークを細胞内に張り巡らせている^{1,14,15)}。このチューブルネットワークは形態的に流動性が高いらしく、膜で包まれた他の小器官が分裂期では断片化するかたわら、無傷な ER ネットワークとして存在し続ける^{2,3,13)}(図3)。もともと核膜の外膜は ER に連結しているので、内膜に存在する INM タンパク質などはここをつたって ER ネットワーク内に避難しているようである。INM タンパク質は DNA やクロマチン構成因子と結合できるので、核膜再形成時にはこれらが ER ネットワークを染色体周辺にターゲティングし、核膜の形成を始めると思われる。これらをふまえると、分裂期細胞内において、どうも ER ネットワークが核膜の前駆膜なのではないかという気がしてくる。

実はすでに、2000年に Dreier と Rapoport が発表した論文が、暗にこれを証明していた。彼らは、*in vitro* の核膜再形成系にクロマチンを加えずに反応を行うと、ER ネットワークが形成されることを報告していた¹²⁾。light membrane fraction 内の小胞同士が融合し、チューブル状の膜となり、これらがつながり合ってネットワークができあがり、この過程には GTP や ATP が必要であった。またこれは、*in vitro* での核膜形成時に見られるクロマチン表面に集まってきた小胞から形成されるチューブル状ネットワー

*AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリー ATPase: ATPase の構造的特徴から分類される ATPase ファミリーの一群である。この一群は、Walker 型 ATPase であると同時に ATPase ドメイン(AAA モジュール)内に、他の ATPase には存在しない SRH (second region of homology) 配列を持つ。AAA という名称の通り、機能の多様性に富んでおり、タンパク質分解や膜融合、オルガネラ形成などに関わる。

クに酷似していた。つまり、*in vitro*における核膜再形成は、まず light membrane fraction から ER ネットワークが形成され、このネットワークから核膜が形成されるという可能性が考えられる。

4. ER チューブルネットワークによる核膜再形成

この可能性は、2007年に Anderson と Hetzer によって証明された¹⁶⁾。彼らは、*in vitro*で先に ER ネットワークを形成させてからそこにクロマチンを加え核膜が形成されるかどうかを検討した結果、これまでの実験系と同様に核膜が形成された。ただしこの核膜再形成系では、これまでの報告と異なり、GTPやATPを必要としなかった。このような酵素反応を介した膜融合はERネットワーク形成のために必要であり、一度ネットワークが形成されれば、膜の融合という事象なしに核膜は形成される。つまり、このERネットワークという形態そのものが核膜の形成に必要なのである。さらに *in vitro*におけるERネットワークによる核膜形成の様子をタイムラプス観察した結果、最初にネットワークのチューブルの先端がクロマチン表面に付着することが明らかになった^{16,17)}。実はこのような現象は、実際に分裂期細胞内でも観察される¹⁶⁾。続いて、最初にクロマチン表面に付着したチューブルを軸として、他のチューブルが滑り落ちるように集合してきて、チューブルの側面でべたべたクロマチン上に貼り付いていく様子が観察され、

また、最初に先端が付着したチューブルも、そのうち倒れ込むように側面でクロマチンに付着する。このようにして、ERネットワークがそっくりそのままクロマチン表面に移行されていくと、これら1本1本のチューブルがシート状の膜に形態を変えどんどん面積を広げていき、あっと

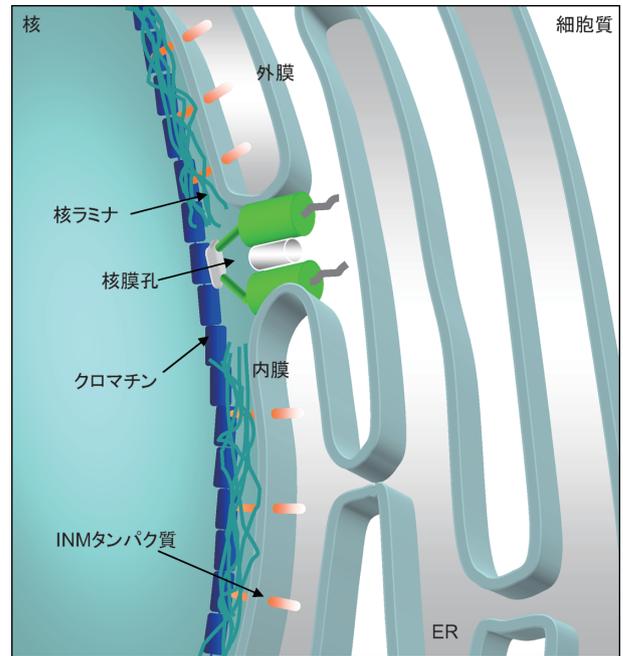


図1 核膜の構造

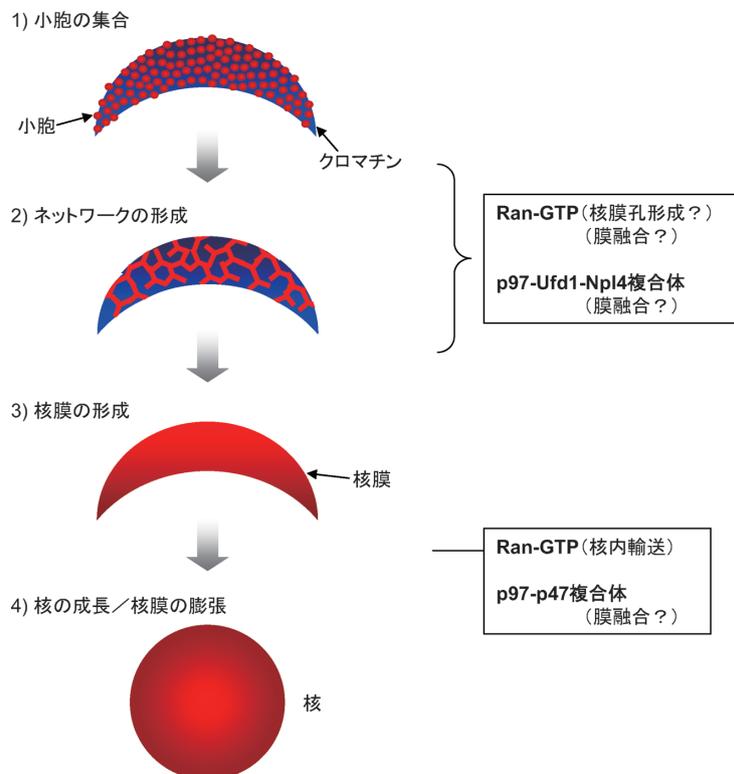


図2 *in vitro*における核膜形成過程

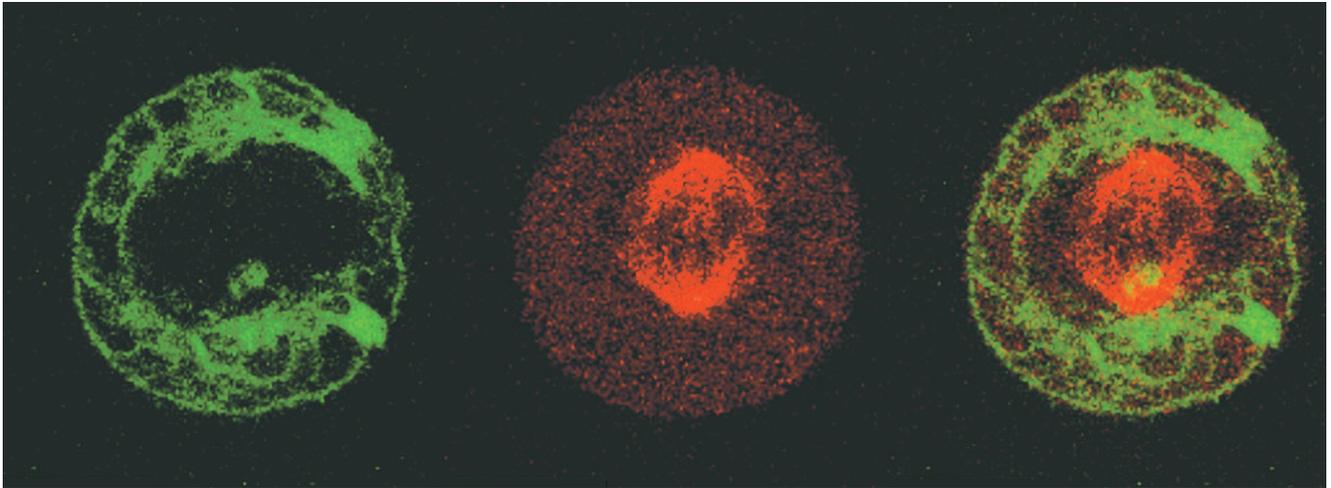


図3 小胞体の分裂期局在
緑：小胞体, 赤：チューブリン

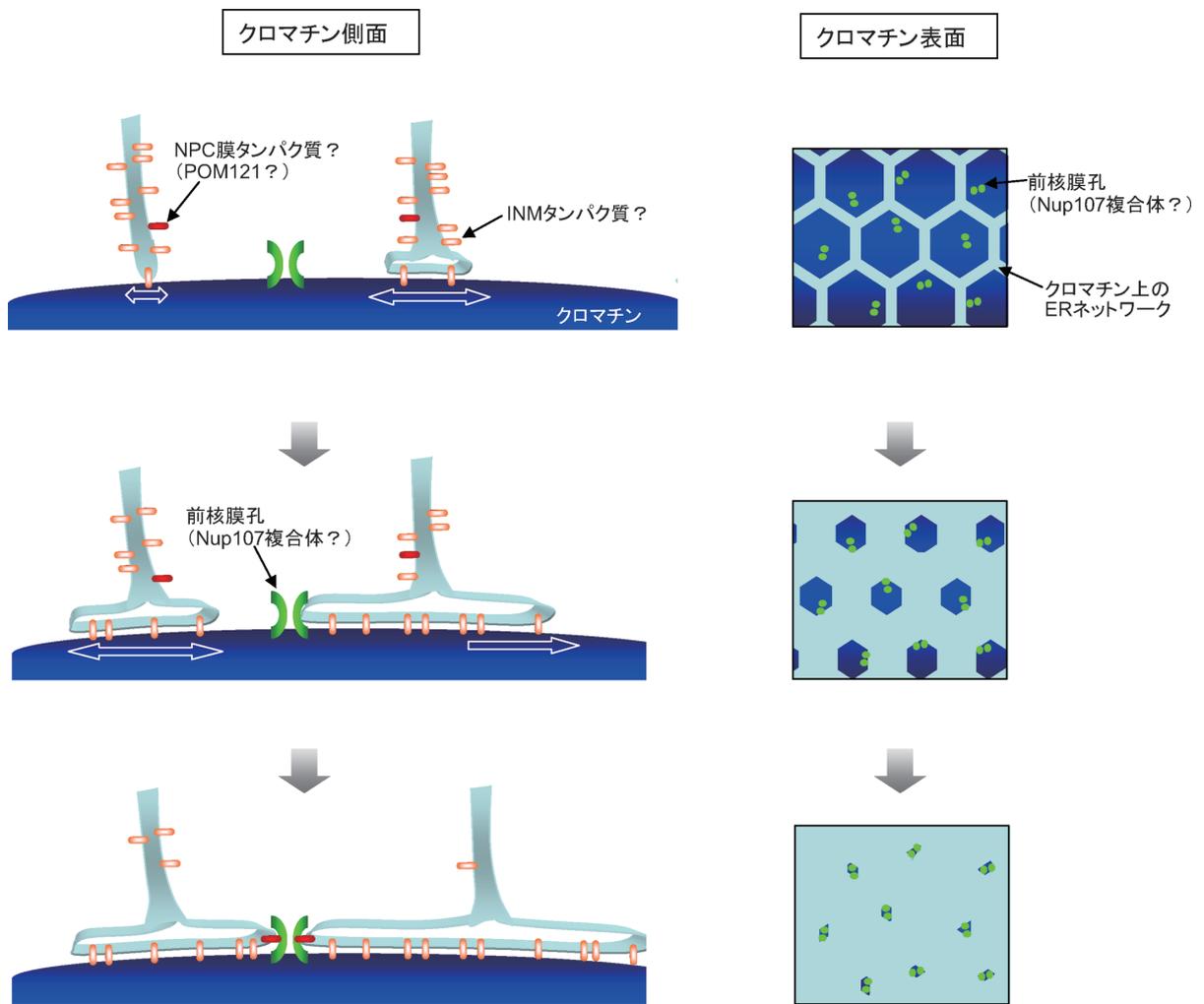


図4 ER ネットワークによる核膜形成のモデル

いう間にクロマチン表面を覆いつくすのである¹⁶⁾。一連の流れを図4にまとめてみた。ERネットワークのチューブル状の膜という形はRtn4という内在性膜タンパク質によって保たれている^{14,15,18)}ので、おそらくチューブルがクロマチンに付着したのち、何らかの原因でRtn4が阻害されることで、チューブルからシート状の膜に変化するのではないかと考えられる。

しかし、チューブルの先端や側面がクロマチンに付着し、それがシート状になったあともクロマチン上で広がっていくという現象は、膜そのものがクロマチン構成因子やDNAに付着しているというよりは、その間になんらかの分子が介在しているように思われる。彼らはこの分子が、核膜構成因子でありDNAやクロマチン構成因子との結合能力を持っているINMタンパク質ではないかと考え、あらかじめ熱で不活性化させた細胞質画分中でERネットワークとDNAを反応させた。つまり、ERネットワーク内に存在するタンパク質のみの状態で、剥き出しのDNAに核膜は問題なく形成され、しかもそれはクロマチンを用いた核膜形成よりも効率よく行われた¹⁶⁾。このことから、分裂期の核膜崩壊後のERと同じように、*in vitro*においてもERネットワーク内にすでにDNAに結合できる分子が存在しており、これらがチューブルの先端をDNAにターゲティングさせ、DNAとチューブルおよびシート状の膜を連結し、その面積を広げさせていっていると考えられる(図4)。この分子の同定までには至っていないが、核膜崩壊時にERネットワーク内に分散するINMタンパク質である可能性は非常に高い。また、剥き出しのDNAの方が効率よく核膜を形成できるという点から、やはり分裂期細胞内では染色体の脱凝縮そのものが核膜形成開始のタイミングを制御していると考えられる。ここにおそらく、前述したRanが絡んでくるのであろう。

5. 核膜孔によるシーリング

クロマチン上に張り巡らされたERネットワークのチューブル1本1本が広がっていくため、効率よくクロマチン表面を膜で覆っていくことができるが、この原理では最終的に必ず小さな隙間が残ってしまう(図4)。これまでは、この隙間はp97-Ufd1/Npl4複合体による環状融合(annular fusion)という形式の膜融合で閉じられ、最終的に1枚の核膜ができあがると考えられていた^{2,3,8,9)}。しかし、AndersonとHetzerのERネットワークを用いた核膜再形成系では、GTPやATPを用いるような膜融合反応は起こらないので、どのようにして隙間が埋まるのか疑問が生じる。そこで彼らが立てた仮説は、その隙間に核膜孔が形成されるのではないかと考えた。確かに、細胞質画分非存在下でERネットワークから核膜形成を行うと膜はできあがるが、ある程度の大きさの分子なら簡単に

素通りできる穴だらけの核膜となっていた¹⁶⁾。これは隙間に機能的な核膜孔が形成されることで初めて完全な核膜ができあがるということを示唆している。

この仮説を裏付けるものとして、核膜形成時にクロマチン上に“前核膜孔(pre-pore)”が存在し、これが核膜および核膜孔の形成に必要であるという報告が2005年にMattajらのグループからされている¹⁹⁾。この前核膜孔はおそらく、NPCの一つであるNup107複合体(核膜崩壊後、染色体のキネトコアに移行する³⁾)を含むものからなっており、核膜形成初期の段階でクロマチン上にすでに存在している^{3,20,21)}。そしてこの前核膜孔に、NPC膜貫通型タンパク質であるPOM121(核膜崩壊後、ERネットワーク内に移行する^{2,16)})が集まってくることで完全な核膜の形成および核膜孔の形成に必要とされている¹⁹⁾。この報告と今回のAndersonとHetzerの結果を合わせると、ERチューブルがシート状に広がっていくクロマチン上にNup107複合体からなる前核膜孔がすでに“場所取り”をしており、この前核膜孔に膜のシートがぶつかると、膜上に存在しているPOM121が前核膜孔と相互作用し、膜と前核膜孔がつなぎ止められるというモデルが考えられる^{16,17)}(図4)。その後、この前核膜孔に他のNPCが集まり、機能的な核膜孔が形成されると思われる。結果として、やはり膜の間の隙間は核膜孔によって埋められた(つなぎ止められた)形となる。

6. おわりに

核膜構成因子やNPC膜タンパク質を含んでいるERネットワークによる核膜の再形成が実際に分裂期細胞内で行われている可能性は非常に高く、AndersonとHetzerが提唱したモデルも真実に近いものと思われる。彼らはさらに、核の成長にともなう核膜の膨張にも無傷なERネットワークの存在が重要であることも示しており¹⁶⁾、ERネットワークが分裂期でも無傷な状態で存在する意味がここから伺える。ただし、今回紹介したモデルはまだ*in vitro*の実験系から予測された段階のものであり、また本当にERネットワークのチューブルから広がった膜をクロマチンや核膜孔とつなぎ止める役割を行っているのがINMタンパク質や核膜孔の膜タンパク質であるという証拠までは得られていない。さらに、DNA合成期に新たな核膜孔が形成される^{3,10)}が、核膜孔による核膜のシーリングモデルを考えると、*de novo*のNPCがどのようにして核膜に挿入されるのか疑問が生じる。今回のモデルが細胞内でも起こるといふ確証が得られるまでにはまだ時間がかかりそうではあるが、いずれにせよ、核膜再形成の研究に大きなヒントは得られたと言えるであろう。

文 献

- 1) Voeltz, G.K., Rolls, M.M., & Rapoport, T.A. (2002) *EMBO Rep.*, **3**, 944–950.
 - 2) Burke, B. & Ellenberg, J. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 487–497.
 - 3) Hetzer, M., Walther, T.C., & Mattaj, I.W. (2005) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 347–380.
 - 4) Lohka, M.J. & Masui, Y. (1983) *Science*, **220**, 719–721.
 - 5) Vigers, G.P. & Lohka, M.J. (1991) *J. Cell Biol.*, **112**, 545–556.
 - 6) Hetzer, M., Bilbao-Cortés, D., Walther, T.C., Gruss, O.J., & Mattaj, I.W. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 1013–1024.
 - 7) Quimby, B.B. & Dasso, M. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 338–344.
 - 8) Hetzer, M., Meyer, H.H., Walther, T.C., Bilbao-Cortés, D., Warren, G., & Mattaj, I.W. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 1086–1091.
 - 9) Burke, B. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, E273–274.
 - 10) ND'Angelo, M.A., Anderson, D.J., Richard, E., & Hetzer, M. W. (2006) *Science*, **312**, 440–443.
 - 11) Boman, A.L., Delannoy, M.R., & Wilson, K.L. (1992) *J. Cell Biol.*, **116**, 281–294.
 - 12) Dreier, L. & Rapoport, T.A. (2000) *J. Cell Biol.*, **148**, 883–898.
 - 13) Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J., & Lippincott-Schwartz, J. (1997) *J. Cell Biol.*, **138**, 1193–1206.
 - 14) Borgese, N., Francolini, M., & Snapp, E. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 358–364.
 - 15) Shibata, Y., Voeltz, G.K., & Rapoport, T.A. (2006) *Cell*, **126**, 435–439.
 - 16) Anderson, D.J. & Hetzer, M.W. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1160–1166.
 - 17) Burke, B. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1123–1124.
 - 18) Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., & Rapoport, T.A. (2006) *Cell*, **124**, 573–586.
 - 19) Antonin, W., Franz, C., Haselmann, U., Antony, C., & Mattaj, I.W. (2005) *Mol. Cell*, **17**, 83–92.
 - 20) Harel, A., Orjalo, A.V., Vincent, T., Lachish-Zalait, A., Vasu, S., Shah, S., Zimmerman, E., Elbaum, M., & Forbes, D.J. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 853–864.
 - 21) Walther, T.C., Alves, A., Pickersgill, H., Loiodice, I., Hetzer, M., Galy, V., Hülsmann, B.B., Köcher, T., Wilm, M., Allen, T., Mattaj, I.W., & Doye, V. (2003) *Cell*, **113**, 195–206.
-