

素活性は上昇したが、一方で LPCAT 活性は変化しなかった (図 2)。つまり、急性の炎症時には PAF を生合成する活性のみが上昇していたのである。すなわちこの酵素は定常時には膜を作る役割や PAF をはじめとする生理活性脂質の材料を貯蔵する役割を果たしていると考えられる。今後はそれぞれの活性に対する特異的な阻害剤の開発と、2 種類の酵素の活性制御メカニズムを解明しなければならない。

## 5. おわりに

LPCAT1 と LysoPAFAT/LPCAT2 の基質認識部位、活性制御、発現調節や生体内での役割などには、まだまだ解明すべき点が多く残っている。さらに、これら二つの酵素の他にも、生体膜を生合成するリゾリン脂質アシル転移酵素は数多く存在するはずである。それら未同定の酵素があと何種類あるのか予測もできない。今後、より多くの酵素が同定されれば、リン脂質の多様性や非対称性、細胞によって異なる形態および特徴、さらに生理活性脂質の貯蔵メカニズムなどが明らかになるだろう。

本研究に御協力いただいた、岩手医科大学の諏訪部章教授、小笠原恵助教、東京大学メタボローム講座の田口良教授、中西広樹研究員に感謝致します。この研究は東京大学大学院医学系研究科細胞情報学教室で行われ、本教室の清水孝雄教授に深謝致します。また、共に解析を行った同研究室大学院生の菱川大介君、原山武士君に感謝致します。

- 1) Kennedy, E.P. & Weiss, S.B. (1956) *J. Biol. Chem.*, **222**, 193–214.
- 2) Lands, W.E. (1958) *J. Biol. Chem.*, **231**, 883–888.
- 3) Kume, K. & Shimizu, T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 663–666.
- 4) Nakanishi, H., Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Ogasawara, R., Suwabe, A., Taguchi, R., & Shimizu, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20140–20147.
- 5) Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., & Shimizu, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 6532–6539.
- 6) Benveniste, J., Henson, P.M., & Cochrane, C.G. (1972) *J. Exp. Med.*, **136**, 1356–1377.
- 7) Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., & Shimizu, T. (1991) *Nature*, **349**, 342–346.
- 8) Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., & Inoue, K. (1994) *Nature*, **370**, 216–218.
- 9) Tjoelker, L.W., Wilder, C., Eberhardt, C., Stafforini, D.M., Dietsch, G., Schimpf, B., Hooper, S., Le Trong, H., Cousins, L.S., Zimmerman, G.A., Yamadat, Y., McIntyre, T.M.,

- Prescott, S.M., & Gray, P.W. (1995) *Nature*, **374**, 549–553.  
 10) Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., & Shimizu, T. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 1177–1183.

進藤 英雄

(東京大学大学院医学系研究科細胞情報)

Lysophospholipid acyltransferase and platelet-activating factor (PAF) biosynthetic enzyme

Hideo Shindou (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

## プロトン感知性 GPCR 研究の展開

### 1. はじめに

G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) は、受容体の中で最大のファミリーを形成している。受容体にリガンドが結合すると共役する三量体型 G タンパク質が活性化され、細胞内にシグナルを伝達する。リガンドの種類は非常に多岐にわたっているが、近年、細胞外環境の酸性化、すなわちプロトン濃度の上昇を感知して細胞内にシグナルを伝達する GPCR サブファミリーが同定された。本稿では、プロトン感知性 GPCR ファミリーに属するメンバーについて、細胞内シグナル伝達経路、プロトン感知の分子メカニズム、想定される生理機能などをまとめた。また、筆者らは、このファミリーの一員である G2A が、酸化脂質の受容体として機能することを同定したので、G2A に関する筆者らの最近の研究成果についても紹介する。

### 2. プロトン感知性 GPCR ファミリー

現在、プロトン感知性 GPCR ファミリーに属していると考えられているのは、OGR1 (ovarian cancer G protein-coupled receptor 1, GPR68), GPR4, TDAG8 (T cell death-associated gene 8, GPR65), G2A (GPR132) の四つの受容体である (図 1A)。これらの受容体はいずれもオーファン GPCR として報告されていたが、OGR1 がスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) の受容体であるとする 2000 年の報告を皮切りに、GPR4 と G2A が SPC とリゾホスファチジルコリン (LPC) の、TDAG8 がガラクトシルホスホ

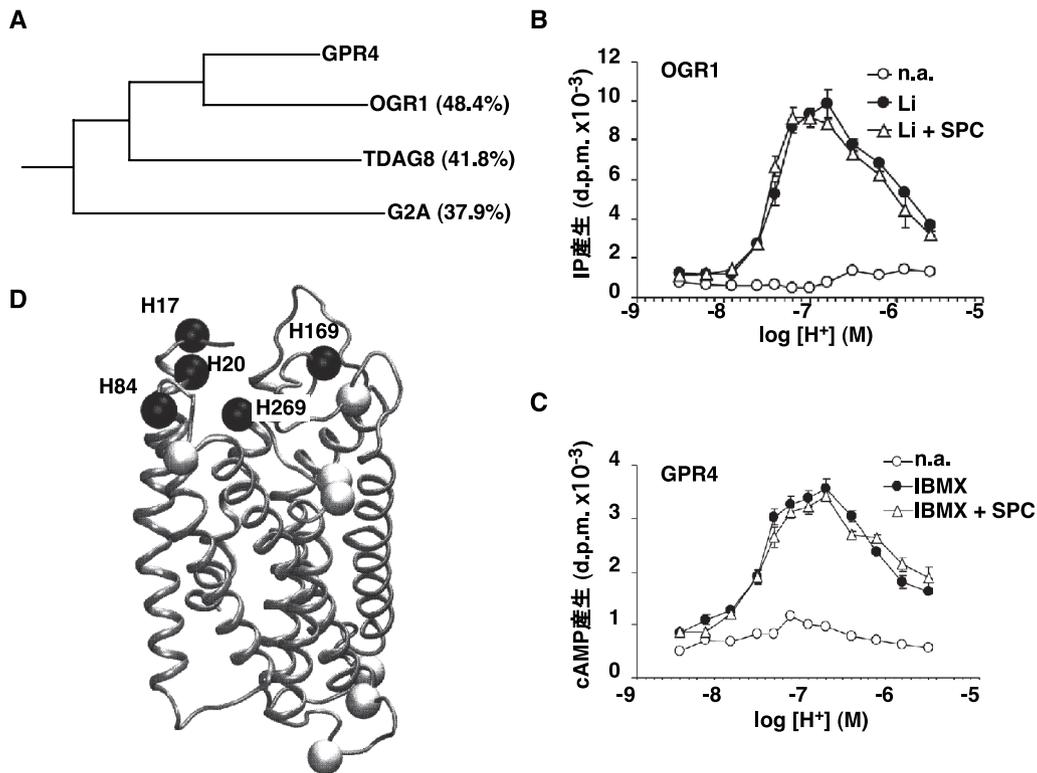


図1 プロトン感知性 GPCR ファミリー

A. ClustalW による系統樹解析の結果。括弧内に GPR4 との amino 酸配列の相同性を示した。B, C. 細胞外 pH の低下に伴う OGR1 を介した細胞内イノシトールリン脂質代謝の亢進(B)と, GPR4 を介した細胞内 cAMP 産生の上昇(C)。リチウムはイノシトール 1 リン酸ホスファターゼ阻害剤, IBMX はホスホジエステラーゼ阻害剤。IP; イノシトールリン酸。n.a.; no addition. (文献1より引用・改変) D. OGR1 の立体構造モデル。プロトン感知に重要とされるヒスチジンが黒丸で示されている。(文献6より引用・改変)

リルコリン (サイコシン) の受容体であることが相次いで報告され, リゾホスファチジン酸受容体等とともに, リゾリン脂質受容体ファミリーを形成すると考えられるようになった。ところが, リガンド同定に関するこれらの論文は, 結合実験等の再現性に乏しく, TDAG8 をのぞき, 2005 年になっていずれも取り下げられている。その後, これらの受容体のリガンドがリゾリン脂質であることを直接的に示した報告はなされていない。

2003 年に Ludwig らは, OGR1 と GPR4 がプロトン感知性の GPCR であることを報告した<sup>1)</sup>。OGR1 と GPR4 は細胞外 pH が 7.8 程度だと不活性化状態にあるが, それよりも低下すると急速に活性化され, OGR1 はイノシトールリン脂質代謝の亢進を, GPR4 は cAMP の産生をそれぞれ引き起こす (図 1B, C)。どちらの受容体でも活性のピークは pH6.8 程度であり, pH7.8-6.8 という生理的条件下で起こり得る pH の変化に鋭敏に反応できると考えられる。

その後, Wang ら<sup>2)</sup>と Ishii ら<sup>3)</sup>がそれぞれ独立に TDAG8 の, Murakami ら<sup>4)</sup>が G2A のプロトン感知性を報告している。TDAG8 は pH の低下に伴い cAMP 産生を, G2A はイノシトールリン脂質代謝の亢進を引き起こす。また, TDAG8 と G2A はそれぞれ pH 低下に伴い, RhoA の活性化を介してストレスファイバーの形成を促進することが観察されている<sup>3,4)</sup>。

### 3. プロトン感知の分子メカニズム

Ludwig らは三次元モデル解析の結果をもとに, OGR1 の細胞外ドメインでクラスターを形成するヒスチジン残基が, プロトン感知に重要ではないかと予想し, 遺伝子変異導入実験を行った (図 1D)。その結果, H17, H20 (N 末端), H84 (第一細胞外ループ), H169 (第二細胞外ループ), H269 (ヘリックス 7 の細胞外領域付近) の五つのヒスチジン残基がプロトン感知に重要であり, どれか一つをフェ

ニルアラニンに置換すると、プロトン感知性が著しく低下すること、五つすべてをフェニルアラニンに置換した場合には、プロトン感知性が完全に失われることを示した<sup>1)</sup>。H17とH84、H20とH269の側鎖がそれぞれ水素結合を形成して受容体の立体構造を安定化しており、プロトン濃度の上昇によりこれらの水素結合が切れることで受容体のコンフォメーション変化が引き起こされると考えられる。OGR1のプロトン感知性は、 $\mu\text{M}$  オーダーの  $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  により阻害を受けるが、これは水素結合を形成するヒスチジン側鎖が、二価イオンに配位して安定構造をとり、プロトン感知能を失うためであると考えられる。

OGR1のプロトン感知性に関与すると考えられる五つのヒスチジン残基は、GPR4ではすべて保存されており、TDAG8ではN末端の二つが保存されているが、G2Aでは一つしか保存されていない。WangらはTDAG8のプロトン感知性が  $\text{Cu}^{2+}$  で阻害されること、H10FとH14Fの変異導入がプロトン感知性を低下させることを報告している<sup>2)</sup>。また、MurakamiらはG2Aのプロトン感知性がH174Fの変異導入により低下することを報告している<sup>4)</sup>。TDAG8とG2Aでは、ヒスチジンの代わりにアルギニンやリジンなどの塩基性側鎖がプロトン感知の役割を担う可能性が指摘されているが<sup>5)</sup>、変異導入実験に関する報告はなされていない。

#### 4. プロトン感知性に対するリゾリン脂質の影響

プロトン感知性受容体ファミリーが、当初リゾリン脂質の受容体として報告されていたこともあり、プロトン感知性に対するリゾリン脂質の影響が検討されている。OGR1とGPR4のプロトン感知性に対するSPCの影響は観察されていない(図1B, C)<sup>1)</sup>。TDAG8のプロトン感知性は、Wangらによればサイコシンにより低下するが<sup>2)</sup>、Ishiiらの報告ではサイコシンの影響は観察されていない<sup>3)</sup>。また、G2Aのプロトン感知性はLPCによる低下が観察されている<sup>4)</sup>。これらの報告は、リゾリン脂質が当初報告されていたようなリガンドとしてではなく、むしろプロトン感知性に対して拮抗的に働くことを示している。しかしながら、SPC、LPC、サイコシンによるプロトン感知阻害は、受容体の選択性が低いこと、 $10\mu\text{M}$ 以上という比較的高濃度が必要なことなどから<sup>2,6)</sup>、細胞膜に対する非特異的な作用ではないかとも考えられ、さらなる検討が必要である。

#### 5. プロトン感知性 GPCR の生理機能

生体内では、pHの恒常性は狭い範囲で厳密に制御され

ており、生理学的な検討は多数なされているものの、その分子メカニズムは必ずしも明らかにはなっていない。プロトン感知性 GPCR が生体の pH 恒常性において、どのような役割を担うかは興味深い課題となっている。

OGR1は肺、腎臓、骨などに高発現しているが、特に骨における機能が注目されている。骨はカルシウム濃度の維持だけでなく、重炭酸やアルカリの吸収・排出を介して pH 恒常性の維持に関与していることが知られている。また、細胞外 pH の低下は、直接的に、あるいは骨芽細胞からのサイトカイン産生を介して間接的に、破骨細胞を活性化し、骨吸収を促進することが知られている。OGR1は骨芽細胞・破骨細胞で発現しており<sup>1,7)</sup>、破骨細胞の分化とともに大きく発現が上昇すること<sup>7)</sup>、酸性化に伴う破骨細胞の細胞内カルシウム濃度上昇に関与すること<sup>8)</sup>などが報告されている。また、血漿の酸性化により血管は弛緩するが、血管平滑筋細胞において OGR1 は、酸性化によるプロスタサイクリン(血管弛緩のメディエーター)産生に関与するという報告がなされている<sup>9)</sup>。

OGR1以外の三つの受容体の生理機能は、未だによく分かっていない。GPR4欠損マウスでは、血管新生の異常により胎生致死の割合が野生型より上昇するが、プロトン感知性との関係は明らかではない<sup>10)</sup>。TDAG8は、Tリンパ球のアポトーシスに伴って発現上昇する遺伝子として同定されたが、欠損マウスでは免疫系の機能をはじめ明らかな異常は観察されていない<sup>11)</sup>。また、G2A欠損マウスは、遅発性の自己免疫疾患を発症すること<sup>12)</sup>、動脈硬化病巣の進展が抑制されること<sup>13)</sup>などが報告されているが、プロトン感知性との関係は不明である。

#### 6. 錯綜する G2A のリガンド同定

プロトン感知性 GPCR ファミリーのうち、G2Aのリガンドに関しては様々な報告があり、未だにコンセンサスが得られているとは言い難い状況である。

G2AのリガンドがLPCとSPCであるとした最初の報告は、結合実験の再現性が得られないことから取り下げられた。しかし、Tリンパ球・マクロファージのLPCへの遊走や<sup>14,15)</sup>、LPCによる神経突起伸展反応にG2Aが関与している<sup>16)</sup>など、G2AとLPCの関連を指摘する様々な報告がなされている。G2Aの局在が、リゾリン脂質刺激により細胞内顆粒から細胞表面へ変化するという報告もなされており<sup>17,18)</sup>、G2AはLPCの受容体ではないものの、何らかのモジュレーターとして働いているのかもしれない。

Murakamiらによって報告されたG2Aのプロトン感知性

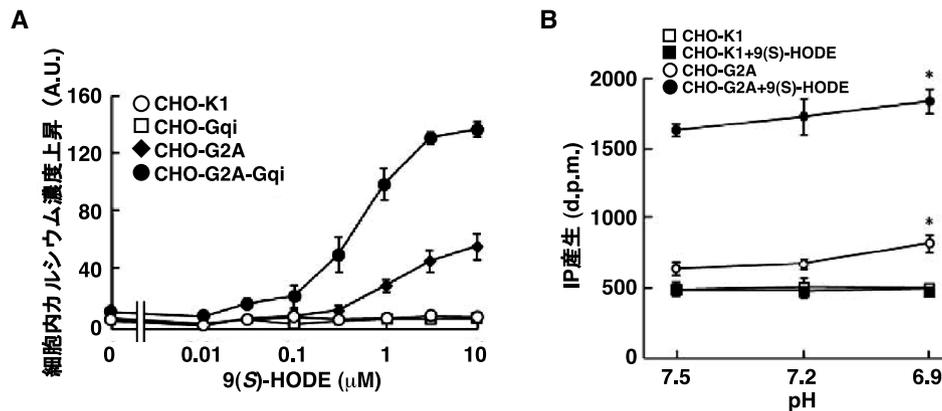


図2 G2Aの9(S)-HODEに対する細胞応答

G2Aを安定的に過剰発現させたCHO細胞において9(S)-HODE刺激により観察される細胞応答。A. 細胞内カルシウム濃度上昇反応。GqiはGαqタンパク質のC末9残基をGαiタンパク質のもので置き換えたキメラタンパク質。B. 細胞内イノシトールリン脂質代謝に対するpHの影響。IP; イノシトールリン酸。(文献19より引用・改変)

は、筆者らを含め複数の研究グループによって確認されているが、酸性条件下でのG2Aを介したイノシトールリン脂質代謝の亢進は、OGR1に比べて非常に小さい<sup>5)</sup>。Seuwenらは2006年の総説の中で、G2Aのプロトン感知性が彼らの実験では得られなかったこと、他の三つの受容体では保存されているプロトン感知に重要なヒスチジン残基が、G2Aでは保存されていないことなどを理由に、G2Aをプロトン感知性受容体と考えることに否定的な見解を示している<sup>6)</sup>。

筆者らは、オーファンGPCRのリガンドスクリーニングを行う過程で、G2Aがいくつかの酸化脂肪酸により活性化されることを見出した<sup>19)</sup>。リノール酸・アラキドン酸由来の種々の酸化脂肪酸を用いてリガンド特異性を細胞内カルシウム濃度上昇反応により検討したところ、リノール酸の酸化代謝物である9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE)の活性が最も強く、EC<sub>50</sub>は500nM程度であった(図2A)。また、光学異性体の関係にある9(S)-HODEと9(R)-HODEでは、9(S)-HODEの方がやや強いものの、ほぼ同程度の活性を示した。リノール酸を基質として9-HODEに変換するリポキシゲナーゼは、マウスでは8-リポキシゲナーゼが報告されているものの、ヒトでは報告されておらず、G2Aは非特異的な酸化反応により産生されるラセミ体の9-HODEもリガンドとすることが推測される。

G2Aのプロトン感知性に関して筆者らも検討を行ったところ、pH低下に伴うイノシトールリン脂質代謝の亢進が観察されたが、9-HODE刺激時に比べると非常に小さな

ものであった(図2B)<sup>19)</sup>。9-HODEとプロトンは相加的にイノシトールリン酸の産生を増加させるものの、相乗的あるいは相反的な効果は観察されず、それぞれ異なった分子メカニズムでG2Aを活性化しているものと考えられた。

## 7. 酸化脂質受容体G2Aの生体内における役割

筆者らは、表皮に着目してG2Aの機能の検討を行った。表皮は絶えず紫外線照射や細菌感染などの酸化ストレスに曝されている。また、表皮最外層の角層には、リノール酸が角層細胞間脂質として多量に含有されている。これらのことから、酸化ストレスによりリノール酸から変換された9-HODEの受容体としてG2Aが機能すると予想されたからである。

ヒト正常表皮組織および初代培養の表皮角化細胞を用いた免疫学的な検討により、G2Aの表皮における発現が確認された<sup>20)</sup>。表皮角化細胞に9-HODE刺激を加えると、濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇、細胞増殖の抑制、インターロイキン6, 8などのサイトカイン類の産生上昇が観察された。G2A過剰発現やG2Aに対するsiRNAを用いた検討により、これらの反応がG2Aを介したものである可能性が高いと考えられた<sup>20)</sup>。また、紫外線照射によるリノール酸の9-HODEへの変換を検討したところ、我々が日常的に曝されている程度の紫外線量で、9-HODEが産生されることが観察された<sup>20)</sup>。これらのことから、表皮においてG2Aは、紫外線照射などの酸化ストレスにより産生される9-HODEに反応して、細胞増殖の抑制を引き起こすと同時に、炎症性サイトカインの産生を介して炎

症を惹起する役割を担うと考えられる。

G2Aは酸化脂質の受容体として、表皮以外でも機能している可能性が考えられる。G2Aの発現は白血球系の細胞で高く、特に粥腫動脈硬化病巣に堆積したマクロファージに高発現していることが報告されている<sup>21)</sup>。動脈硬化病巣の初期形成は、酸化LDLのマクロファージによる貪食が引き金となっていると考えられているが、リノール酸はLDLの主要な構成成分の一つであり、酸化のターゲットともなっている。G2A欠損マウスでは、動脈硬化病変の進展が顕著に抑制されるという報告がなされており<sup>13)</sup>、今後G2Aが酸化脂質の受容体として動脈硬化病変の発症・進展にどう関わっているか、興味深い課題である。

## 8. おわりに

オーファンGPCRのリガンドが同定されたとき、それが生体内で機能し得る真のリガンドであるかどうかの判断が難しいことがある。オーファンGPCRのリガンドスクリーニングは多くの場合、極めて人為的・限定的な実験条件下で行われるからである。報告されたりガンドが真のリガンドであるかどうかは、複数の研究者による追試、同定されたりガンドの産生機構や生理的濃度、生理機能や疾患との関わりなどが明らかになった後、総合的に判断されるべきであろう。

そういう観点で考えたときに、生理活性を有するプロトン感知性GPCRとしてコンセンサスを得られつつあるのは、まだOGR1だけであるように思う。GPR4とTDAG8については、プロトン感知性の再現性は複数の研究グループで得られているものの、どのような生理機能を担っているのか不明な点が多い。今後、受容体欠損マウスの詳細な解析等を通して、徐々に明らかにされていくことが期待される。

また、G2Aに関しては、欠損マウスで遅発性の自己免疫疾患や<sup>12)</sup>、動脈硬化病巣の進展抑制が観察されるなど<sup>13)</sup>、興味深い表現型が観察されるだけに、その分子メカニズムの解明が待たれるところである。筆者らは、酸化脂質受容体としてのG2Aという側面から、この問題に取り組んでいきたい。

- 1) Ludwig, M.G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J.A., Jones, C. E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R.M., & Seuwen, K. (2003) *Nature*, 425, 93-98.
- 2) Wang, J.Q., Kon, J., Mogi, C., Tobo, M., Damirin, A., Sato, K., Komachi, M., Malchinkhuu, E., Murata, N., Kimura, T., Kuwabara, A., Wakamatsu, K., Koizumi, H., Uede, T., Tsuji-

- moto, G., Kurose, H., Sato, T., Harada, A., Misawa, N., Tomura, H., & Okajima, F. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 45626-45633.
- 3) Ishii, S., Kihara, Y., & Shimizu, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 9083-9087.
- 4) Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T., & Shimizu, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 42484-42491.
- 5) Radu, C.G., Nijagal, A., McLaughlin, J., Wang, L., & Witte, O. N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 1632-1637.
- 6) Seuwen, K., Ludwig, M.G., & Wolf, R.M. (2006) *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 26, 599-610.
- 7) Yang, M., Mailhot, G., Birnbaum, M.J., MacKay, C.A., Mason-Savas, A., & Odgren, P.R. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 23598-23605.
- 8) Komarova, S.V., Pereverzev, A., Shum, J.W., Sims, S.M., & Dixon, S.J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 2643-2648.
- 9) Tomura, H., Wang, J.Q., Komachi, M., Damirin, A., Mogi, C., Tobo, M., Kon, J., Misawa, N., Sato, K., & Okajima, F. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 34458-34464.
- 10) Yang, L.V., Radu, C.G., Roy, M., Lee, S., McLaughlin, J., Teitell, M.A., Iruela-Arispe, M.L., & Witte, O.N. (2007) *Mol. Cell Biol.*, 27, 1334-1347.
- 11) Radu, C.G., Cheng, D., Nijagal, A., Riedinger, M., McLaughlin, J., Yang, L.V., Johnson, J., & Witte, O.N. (2006) *Mol. Cell Biol.*, 26, 668-677.
- 12) Le, L.Q., Kabarowski, J.H., Weng, Z., Satterthwaite, A.B., Harvill, E.T., Jensen, E.R., Miller, J.F., & Witte, O.N. (2001) *Immunity*, 14, 561-571.
- 13) Parks, B.W., Lulis, A.J., & Kabarowski, J.H. (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 2703-2709.
- 14) Radu, C.G., Yang, L.V., Riedinger, M., Au, M., & Witte, O.N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 245-250.
- 15) Yang, L.V., Radu, C.G., Wang, L., Riedinger, M., & Witte, O. N. (2005) *Blood*, 105, 1127-1134.
- 16) Ikeno, Y., Konno, N., Cheon, S.H., Bolchi, A., Ottonello, S., Kitamoto, K., & Arioka, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 28044-28052.
- 17) Wang, L., Radu, C.G., Yang, L.V., Bentolila, L.A., Riedinger, M., & Witte, O.N. (2005) *Mol. Biol. Cell*, 16, 2234-2247.
- 18) Frasc, S.C., Zemski-Berry, K., Murphy, R.C., Borregaard, N., Henson, P.M., & Bratton, D.L. (2007) *J. Immunol.*, 178, 6540-6548.
- 19) Obinata, H., Hattori, T., Nakane, S., Tatei, K., & Izumi, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 40676-40683.
- 20) Hattori, T., Obinata, H., Ogawa, A., Kishi, M., Tatei, K., Ishikawa, O., & Izumi, T. (2007) *J. Invest. Dermatol.*, in press.
- 21) Rikitake, Y., Hirata, K., Yamashita, T., Iwai, K., Kobayashi, S., Itoh, H., Ozaki, M., Ejiri, J., Shiomi, M., Inoue, N., Kawashima, S., & Yokoyama, M. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 2049-2053.

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・情報伝達の間として機能している<sup>1,2)</sup>。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<sup>3)</sup>。

#### 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 複合体と呼ばれる複合体構築のスキヤ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<sup>1,2)</sup>。

#### 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、主に輸送担体を通わ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<sup>4)</sup>、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で培養した 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<sup>5)</sup>。

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