

植物核膜の構造ならびに有糸分裂にともなう ダイナミクスに関する研究

学位論文内容の要旨

細胞核は動植物細胞に共通する細胞小器官であり、細胞質と核質は核膜 (nuclear envelope, 以下 NE とする) によって隔てられる。NE は、核外膜と核内膜からなる二重膜 (nuclear membrane, 以下 NM とする)、核膜孔複合体および NM 支持構造で構成される。NE の基本的な役割は転写と翻訳の独立した場をつくることにある。NM はそのためのバリアーとして機能し、NM を貫通する核膜孔複合体が核-細胞質間の選択的輸送を担う。体制の発達した動植物細胞の NE は、有糸分裂の過程で崩壊し、娘核の形成とともに再形成される。その意義は不明であるが、植物では、NE の崩壊が前期前微小管束の近くから始まることから、細胞板形成位置との関連が示唆されている。NE の崩壊と再構成は NM 内在タンパク質、NM 支持構造を構成するタンパク質および細胞骨格の相互作用によると考えられているが、植物の NE 関連タンパク質の研究は緒についたばかりである。そこで本研究では、植物の NM 支持構造に関連すると推定されるタンパク質をアミノ酸配列上の特徴によって分類し、それぞれの群のタンパク質について、有糸分裂にともなうダイナミクスを調べるとともに、染色体および NM との相互作用の可能性を検討した。論文の内容は以下に要約される。

1 NMCP 遺伝子の検索と推定されるアミノ酸配列の解析

動物の NM 支持構造 (核ラミナ) はラミンタンパク質からなる編目状の繊維構造であるが、植物にラミン遺伝子はない。一方植物では、有糸分裂間期細胞の核表層に局在するタンパク質としてニンジン NMCP1 (DcNMCP1) が見つかっている。データベースに含まれる DcNMCP1 ホモログを検索したところ、シロイヌナズナ、イネ、ブドウ、ポプラなどで相同遺伝子の存在が確認された。DcNMCP1 は、そのアミノ酸配列から、coiled-coil からなる中央の Rod 領域を Head と Rod 領域が挟む構造をとっていると推定されている。そこで、検索されたホモログ (以下 NMCP と称する) の構造をアミノ酸配列から推定したところ、いずれも、ほぼ同じ長さの Rod 領域をもつタンパク質であることが明らかとなった。Rod 領域以外のアミノ酸配列に著しい変異が見られたので、CLUSTAL W による系統解析を行った。その結果、NMCP は、長さの比較的斉一な Tail 領域と、高度に保存された配列をカルボキシ末端にもつ群と、アミノ酸配列の類似した Head 領域と総じて短く、多様な長さの Tail 領域をもつ群に分類された。前者を NMCP1、後者を NMCP2 とした。

2 NMCP の細胞内局在に機能するタンパク質領域の特定

モノクローナル抗体を使った先行研究によって、ニンジンの NMCP (DcNMCP1 および DcNMCP2) が、ニンジン懸濁培養細胞の核表層に局在することが明らかにされている。そこで、NMCP1/NMCP2 の核および核表層への局在に関与するポリペプチド領域を特定した。この目的のために、DcNMCP1/DcNMCP2 の全長および部分配列と EGFP との融合タンパク質をコードする DNA 断片を CaMW35S プロモーターの下流に挿入したプラスミドを作成し、パーディクルデリバリー法を用いてセロリ葉柄およびタマネギ鱗茎表皮細胞に導入した。発現したタンパク質の細胞内移行性を顕微鏡下で検討したところ、DcNMCP1 の Tail 領域の一部に核移行に必要な機能のあることがわかった。この部位には PSORT によって検索される核移行シグナル (NLS) が含まれていた。さらに、核表層への移行には Head 領域、Rod 領域の一部および Tail 領域の NLS 周辺の配列が必要であることが明らかとなった。次いで、DcNMCP2 の局在性について調べた。DcNMCP2-EGFP 融合タンパク質は核に移行したものの、核表層には局在しなかった。Head 領域を除去した DcNMCP2 は核内で大型の顆粒を形成したことから、この領域に核内の何らかの構造と結合する働きがあると推定された。セロリおよびタマネギ細胞は同じ移行性を示したが、長いポリペプチドを発現させた場合にセロリ細胞でより強い蛍光強度が得られた。

3 有糸分裂にともなう NMCP1 および NMCP2 のダイナミクス

NE タンパク質に関するこれまでの研究には、歴史的な背景からニンジンが多く利用されてきた。しかし、NE タンパク質の局在性や有糸分裂時の挙動を調べる上で、ゲノムサイズが小さいニンジンは不利である。そこで本研究では、より大きな核を持ち、細胞培養系が確立しているセロリ細胞の利用を試みた。新たに同定したセロリの NMCP1 (AgNMCP1) と NMCP2 (AgNMCP2) はニンジンの NMCP1 と NMCP2 とそれぞれ 83% および 77% の相同性を示した。ニンジンタンパク質を抗原とする単クローン抗体 CML-01 および CML-10 はそれぞれ AgNMCP1 および AgNMCP2 と反応した。両者の交叉反応は無視できる程度であった。そこで、セロリ培養細胞を用い、蛍光抗体法により、有糸分裂にともなう AgNMCP1 と AgNMCP2 の局在性変化を調べた。その結果、いずれのタンパク質も、有糸分裂間期では核の表層に局在していたが、分裂前期から中期にかけての NM の崩壊とともに急速に分散した。それ以降の挙動は両者で大きく異なった。分散した AgNMCP1 の大部分は紡錘体付近に分布し、両極に移動している染色体の表面に集積しはじめ、終期細胞では娘核の表面に局在した。一方、AgNMCP2 は液胞を除く分裂期細胞質全域に広く分散し、分裂終期になってから、再形成されつつある核の表面に集積しはじめた。共焦点および電子顕微鏡によって得た画像の解析から、分裂期細胞質中に分散した AgNMCP2 は小胞状の構造に分布していること、NM は小胞の融合によって再生されること、NM は AgNMCP2 が核表層に集積するのとはほぼ同じ時期に再生されることが明らかとなった。

以上の結果から、NMCP1 および NMCP2 は NM あるいは染色体と相互作用する構造タンパク質であることが示唆された。これらのタンパク質は、形態形成、環境応答やプログラム細胞死との関連など核膜の多様な機能を明らかにする貴重なツールとして利用できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 増 田 清
副 査 教 授 幸 田 泰 則
副 査 准教授 山 岸 真 澄

学 位 論 文 題 名

植物核膜の構造ならびに有糸分裂にともなう ダイナミクスに関する研究

細胞質と核質を仕切る核膜は、外膜と内膜からなるリン脂質の二重膜、核膜孔複合体および核膜支持構造で構成される。核膜と核膜孔複合体は、転写と翻訳の場を隔離するとともに、核と細胞質との間の選択的な物質輸送に働く。一方、核膜支持構造はリン脂質の二重膜を保持し、核膜孔複合体を繫留する。加えて、核膜支持構造は核内膜と染色体との相互作用に関わっていると考えられている。体制の発達した動物や植物の核膜は有糸分裂の過程で崩壊し、娘核の形成にともなって再構成される。近年、動物では、核膜構成要素のそれぞれが核膜の崩壊と再形成とどのように関わっているのかが明らかにされつつある。しかし、植物の核膜については、その崩壊と再構成の仕組みを含めて多くが未解決のもんだいとして残されている。核膜ダイナミクスの研究は、核膜支持構造タンパク質の役割の解明するための1つのアプローチである。

提出された論文は、このような研究の背景をふまえ、植物固有の核膜タンパク質 NMCP、核膜（リン脂質膜部分）、および染色体のダイナミクスを調べることにより、有糸分裂における植物核膜の崩壊・再構成の仕組みを推定したものである。論文は図 44、表 13 を含む総ページ数 125 の和文論文であり、別に参考論文 1 編が添付されている。論文審査の内容を以下に要約する。

1 NMCP 遺伝子の検索と推定されるアミノ酸配列の解析

有糸分裂間期細胞の核表層に局在するタンパク質としてニンジン NMCP1 (DcNMCP1) およびそのホモログがシロイヌナズナとイネで報告されている。DcNMCP1 は、主に coiled-coil からなる中央の Rod 領域を介して Head と Rod 領域が挟む構造をとる。そのことから、植物における核膜支持構造の骨格タンパク質であると推定されている。そこで、Rod 領域のアミノ酸配列を手がかりに、データベースを検索した。その結果、ブドウ、ポプラなど 8 種の植物で合計 18 の相同の遺伝子を同

定した。NMCP1 ホモログ（以下 NMCP とする）の共通する性質を調べるため、それらのホモログについてコンピュータプログラムによるアミノ酸配列の解析を行い、いずれもほぼ同じ長さの coiled-coil 領域を形成するタンパク質であることを明らかにした。さらに、同定された NMCP について、アミノ酸配列に基づいた系統解析を行い、NMCP は NMCP1 と NMCP2 の 2 つの群に分けるのが適当であるとした。

2 細胞内局在に機能するタンパク質領域の特定

NMCP1 は分裂間期細胞核の表層に局在することが免疫染色法によって明らかになっている。そこで、NMCP1 の核および核表層への局在に関与するポリペプチド領域を特定した。そのことを検討するため、DcNMCP1 の全長および部分配列を EGFP との融合タンパク質として発現するベクターを作成し、一過性発現により生じた NMCP1 の細胞内移行性を蛍光顕微鏡で観察した。材料としてセロリ葉柄およびタマネギ鱗茎表皮組織を用い、パーティクルデリバリー法を用いてベクターを導入した。それにより、DcNMCP1 には核に移行する機能があること、核の表層への移行には、Head、Rod の一部および Tail の一部を含む領域が必須であることを明らかにした。DcNMCP2 についても核に移行することを確認している。

3 有糸分裂にともなう NMCP1 および NMCP2 のダイナミクス

セロリ液体培養細胞を利用し、有糸分裂にともなう NMCP1 および NMCP2 の局在性変化を調べることにより、核膜（リン脂質膜）および染色体との相互作用を検討した。間期核では核の表層に局在していた NMCP1 と NMCP2 は、分裂前期から中期にかけて、核膜の崩壊とともに、細胞質に分散した。分散した NMCP1 は紡錘体付近に分布し、その後、両極に移動している染色体の表面に集積した。一方、NMCP2 は、小胞状の構造となって分裂期細胞質の全域に分散し、分裂終期になって、再形成されつつある核の表面を覆った。以上の結果から、NMCP1 および NMCP2 は、核膜支持構造タンパク質として、それぞれ染色体および核内膜と相互作用することによって核膜のダイナミクスに関わっていると結論した。

核膜支持構造のタンパク質組成に動植物で基本的な違いがあることがゲノム科学の成果により明らかにされている。核は謎に包まれた細胞小器官であり、細胞の機能に直接関係する構造として、その研究の重要性が指摘され始めている。提出された論文は、植物における核膜の構造とそれを支えるタンパク質に関する研究分野において、具体的な目標を提示したという点で高く評価される。よって審査員一同は、木村 祐太が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。