

受精後第二有糸分裂時の核膜孔複合体偏在が繊毛虫テトラヒメナの  
核分化を決定する

武内 史英<sup>1</sup>, 岩本 政明<sup>1</sup>, 平岡 泰<sup>1,2</sup>, 原口 徳子<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>情報通信研究機構神戸研究所未来ICT研究センターバイオICTグループ, <sup>2</sup>大阪大学大学院  
生命機能研究科, <sup>3</sup>大阪大学大学院 理学研究科)

Biased distribution of the nuclear pore complex after second postzygotic nuclear  
division determine nuclear differentiation in *Tetrahymena thermophila*

Fumihide BUNAI<sup>1</sup>, Masaaki IWAMOTO<sup>1</sup>, Yasushi HIRAOKA<sup>1,2</sup> and Tokuko HARAGUCHI<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Kobe Advanced ICT Research Center, National Institute of Information and Communications Tech-  
nology, <sup>2</sup>Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, <sup>3</sup>Graduate School of Science,  
Osaka University)

SUMMARY

The ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*, has two functionally and structurally distinct nuclei in a single cell. Although understanding such “nuclear dimorphism” is a central issue, unique to ciliate biology, the molecular bases of nuclear differentiation have remained largely unknown, because of the technical difficulties of monitoring a temporal sequence of highly-dynamic, complex nuclear events in a rapidly moving organism. Here we report a method of live-cell fluorescence imaging to monitor dynamic behavior of specific molecules in living *Tetrahymena* cells undergoing nuclear differentiation. We have also developed a technique of correlative light and electron microscopy by which molecule-specific fluorescence images can be correlated with ultrastructural electron microscopy images. Using these imaging technologies, we examined dynamic behavior of the nuclear pore complex (NPC) and nuclear membranes during sexual reproduction, including nuclear differentiation. We found that the NPCs moved toward the anterior side of the nuclear envelope during the second postzygotic mitosis, generating distinguishable nuclei; one is NPC-rich, and the other is NPC-poor. Live-cell imaging further showed that the

NPC-rich and NPC-poor nuclei were destined to become the new macronucleus and micronucleus, respectively. These results suggest that the NPCs, or components of the NPC, may contribute to nuclear differentiation through regulation of selective nuclear transport.

**[目的]** 繊毛虫テトラヒメナは大核と小核という機能と構造の異なる2種類の核をもつ。これらの核は接合で形成される一つの受精核より分化する。受精核は2回の有糸分裂を経て4つの核に分裂し、細胞前端に位置した2核は大核に、後端に位置した2核は小核に分化する。この核分化は同一の細胞質中で行われるにも関わらず、*TWI1*蛋白質や*PDD*蛋白質などが大核になる予定の核（大核原基）へ選択的に輸送されることによって大核分化を象徴するDNA再編成がおこなわれる（1）。このことから核分化では核内輸送機構が重要な働きがあると考えられるが、大核分化を決定づける分子やそのメカニズムは分かっていない。そこでまず我々はテトラヒメナの核分化を決定する分子とそのメカニズムを研究するために接合・核分化過程での細胞核の挙動を生きた細胞で追跡できる蛍光ライブセルイメージング技術を開発した。この方法を用いることにより核分裂および核分化過程での核構造の変化を、GFP融合蛋白質や蛍光染色したDNAの局在を指標にして調べることができる。さらにこの分子特異的イメージングに加えてlive CLEM法を開発した。この方法は、上述した蛍光ライブセルイメージング法を用いて観察した同一細胞を電子顕微鏡で観察するものであり、これによって分子特異的な局在とその経時変化に加え、核膜などの膜構造、核膜孔複合体、微小管などの細胞超微細構造を観察することができる。本研究は、これらの解析方法を用いてテトラヒメナの核分化過程で起こる細胞（核）構造の変化を解析し、核分化に関与する分子・構造・仕組みを解明することを目的とするものである。

**[材料と方法]** 繊毛虫*Tetrahymena thermophila*細胞から、核膜孔複合体蛋白質の一つである*seh1*のcDNAをRT-PCR法で増幅・分取し、カドミウムでGFPの発現を誘導できるベクターpIGF-1へクローニングした。これを接合細胞（CU427×CU428）へエレクトロポレーションで導入し、GFP-*Seh1*発現株をパロモマイシンと蛍光顕微鏡観察により選別した。このGFP-*seh1*発現株と野生型CU428株を掛け合わせて接合を誘導しライブセルイメージングを行った：細胞はガラスボトムディッシュにアガロースで包埋し蛍光顕微鏡で観察した。Live CLEM法を行う場合は、ライブセルイメージングした後4%グルタルアルデヒドで固定、エタノールによる脱水、樹脂（Epon812）置換により電子顕微鏡用試料を作製し、超薄切片を電子顕微鏡で観察した。得られた蛍光顕微鏡画像と電子顕微鏡画像の相関を検討した。

**[結果]** 蛍光顕微鏡観察の結果、栄養増殖過程では、GFP-*seh1*は大核と小核の核膜に局在することがわかった。接合過程では、GFP-*seh1*は、減数分裂前期（三日月期）から減数分裂期に存在する4つの小核全ての核膜に局在するが、核交換期になると、4つの小核のうち選択された1つがさらに分裂してできた2つの核（移動核と静止核）にのみ局在し、選択されず退化する運命の小核ではその蛍光が消失していくことがわかった。核交換後の受精によってできた受精核では、受精後の第一有糸分裂までは、2つの細胞核に均等にGFP-*seh1*が分配された。また減数分裂中や受精後の有糸分裂中では、GFP-*seh1*は伸長する小核の両端に強く局在した。しかし、受精後の第二有糸分裂途中からGFP-*seh1*は新大核側で強く、新小核側で弱い局在を示した。これらの核の核膜を電子顕微鏡で観察し、新大核と新小核に局在する核膜孔複合体の数を定量した結果、新大核側に80%以上が偏在することが分かった。

**[考察]** 蛍光と電子顕微鏡観察から、受精後の第二分裂は、2つの核に核膜孔複合体が不均等に分配されることが明らかとなった。この第二分裂直後に起こる核分化では、新大核になる核では、ゲノムDNAの再編成（DNA elimination）が起こることが知られている（1）。このゲノムDNA再編成は、厳密に新大核でのみ起こり、この時期に新大核特異的に局在する*TWI1*蛋白質や*PDD*蛋白質が関与することが知られている（1）。従って、これらの蛋白質は、厳密に新大核にのみ核移行されるものと予想される。今回、我々が発見した第二分裂での核膜孔複合体の極端な不均等分裂は、直後に起こる核分化に必要な蛋白質などの分子を選択的に新大核に輸送するための構造基盤であると思われる。面白いことに、別の繊毛虫であるゾウリムシでは受精後の第三分裂直後に、核分化が起こることが示されている（2, 3）。この違いは、核膜孔複合体の不等分配の起こる時期が、この2つの生物で異なっていることを示しているかもしれない。もしそうならば、核膜孔複合体は、繊毛虫の核分化に決定的な役割を果たすことを示唆するものである。

#### [文献]

- 1) Chalker D.L. (2008) *Biochim Biophys Acta*. PMID: 18706458.
- 2) Mikami, K. (1980) *Develop. Boil.* 80, 46-55.
- 3) Grandchamp, S., Beisson, J. (1981) *Develop. Boil.* 81, 336-341.