

繊毛虫テトラヒメナの核分化過程における核膜孔複合体のダイナミクス

武内 史英¹, 岩本 政明¹, 平岡 泰^{1,2,3}, 原口 徳子^{1,2,3}

(¹情報通信研・未来 ICT 研セ・バイオ ICT, ²大阪大・院生命機能, ³大阪大・院理)

Dynamics of the nuclear pore complexes during nuclear differentiation in ciliate *Tetrahymena thermophila*

Fumihide Bunai¹, Masaaki Iwamoto¹, Yasushi Hiraoka^{1,2,3} and Tokuko Haraguchi^{1,2,3}

(¹Kobe Adv. ICT Res. Ctr., Natl. Inst. Informat. Commun. Technol., ²Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ³Grad. Sch. Sci., Dept. Biol., Osaka Univ.)

SUMMARY

Ciliated protozoa have two functionally distinct nuclei, macronucleus (Mac) and micronucleus (Mic). These nuclei are differentiated from a zygotic nucleus formed during conjugation. Because the nuclear pore complex (NPC) of Mac and Mic comprise different sets of nucleoporins, nucleoporins of the zygotic nucleus must be differentiated to the Mac-type or Mic-type nucleus during differentiation. To elucidate this process, we conducted live cell imaging associated correlative light electron microscopy (live CLEM): living mating pairs were observed with a fluorescence microscope; at the time when nuclear differentiation was occurring during observation, they were fixed *in situ* for electron microscopy. We found newly assembling nuclear envelope formed redundant nuclear envelope in both newly differentiating Mac and Mic, and the assembling nuclear envelope contained the newly assembled NPCs in the new Mac but not in the Mic. We also performed FRAP analysis to measure the mobility of GFP-nucleoporins on the rim of the differentiating nuclei. Results show that the new Mac, but not the new Mic, was assembling the nucleoporins on the nuclear rim. These results suggest that the dynamic assembly of the nucleoporins might be involved in nuclear differentiation in *Tetrahymena thermophila*.

【目的】 繊毛虫類には、ひとつの細胞内に、機能と構造が異なる 2 種類の細胞核（大核，小核）が存在する。これらの核は、一つの受精核が 2 度の有糸分裂をすることによって生じた 4 つの核が、それぞれ 2 つずつ、大核と小核に分化することによって作られることが知られている。大核分化には Twi1 や Pdd などの蛋白質が核内に輸送されることが必要であることから¹⁾、核選択的な核輸送が、大核への核分化に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、これまで核分化に関与する核輸送の仕組みについての研究はなく、核膜孔複合体の役割についても全く理解されていなかった。本研究は、核輸送に重要な働きをする細胞構造として核膜孔複合体に注目し、live CLEM 法や FRAP 法などの蛍光イメージング法を用いて、核膜孔複合体の挙動を明らかにすることにより、核膜孔複合体が核分化に果たす役割を明らかにするものである。

【方法】 繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* の細胞から、核膜孔複合体蛋白質のひとつである Seh1 および Nup93 の cDNA を RT-PCR 法で増幅・分取し、カドミウムで発現誘導可能な GFP 融合発現ベクター pIGF-1 ヘクローニングした。これを接合細胞 (CU427 × CU428) ヘレクトロポレーションで導

入し、パロモマイシンにより選別した後、蛍光顕微鏡観察で、GFP 融合蛋白質を発現している細胞株を選別した。この GFP-Seh1 発現株および GFP-Nup93 発現株を、それぞれ CU428 株と掛け合わせて接合を誘導し、生きた状態のまま、蛍光顕微鏡 (DeltaVision 蛍光顕微鏡システム) を用いて time-lapse 観察 (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たものをを用いた。Live CLEM 法は、上述したように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) 置換を行って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、得られた蛍光顕微鏡画像と電子顕微鏡画像の相関を解析することによって行った。FRAP は、LSM 510 META を用いて行った。GFP-Nup93 発現株と CU428 を掛け合わせた接合細胞をカバーガラス (24 × 60 mm) 上に包埋した試料を用いた。受精後の第二有糸分裂終了後に形成される新大核、新小核を 488 nm の波長のレーザーで GFP の蛍光を退色させ、3 次元の画像を 3 分間隔で 12 分間を取得した。取得した画像は Image J で解析した。

【結果】 ライブセルイメージングの結果、GFP-Seh1

は、受精後の第二有糸分裂途中から核分化時期では、新大核になる核の核膜に比較的多くユニフォームに局在すること、新小核になる核の核膜ではやや少なくパッチ状に局在することが分かった、GFP-Nup93 の観察でも、同様の結果が得られた。従って、この挙動は、核膜孔複合体の挙動を反映しているものと考えられる。核分化時期の核を live CLEM 法で解析したところ、新大核に分化中の核では、GFP-Nup93 の蛍光量が多い場所には、それに比例して核膜孔複合体が多く存在することが分かった。また、GFP-Nup93 の蛍光強度が特に高い場所では、核膜が 2 重になっており、外側と内側の核膜の両者に核膜孔複合体が存在することが分かった。新小核に分化中の核でも、同様の 2 重の核膜構造が見られた。しかし、新小核では、内側の核膜には多数の核膜孔複合体が密に存在し、外側の核膜には核膜孔複合体はほとんど存在しない点で、新大核とは異なっていた。この時期の大小核に局在する GFP-Nup93 の分子動態を FRAP 法により解析したところ、蛍光退色後 9 分以内では新大核での GFP-Nup93 の蛍光が回復すること、しかし新小核ではほとんど回復しないことが分かった。

【考察】 核分化では、新大核でゲノム 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

り、この時期に新大核特異的に局在する Twil や Pdd などの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、厳密に新大核へ核輸送される必要がある。一方、核膜孔複合体は、大核と小核で一部のヌクレオポリンが異なっており、大核タイプのもので小核タイプのもので存在することが知られている²⁾。今回の Live CLEM 法と FRAP 解析の結果は、有糸第 2 分裂が終了した直後に、核膜と核膜孔複合体が、新大核側で形成されることを示している。しかも、新大核の核膜上に形成される核膜孔複合体は大核タイプであると考えられる。一方、新小核側では、小核タイプの核膜孔複合体は、2 重の核膜の内側に閉じ込められるように存在することから、核輸送がおこらないように抑制されているように見える。これらの結果は、大核タイプの核膜孔の形成が Twil や Pdd の核選択的な核輸送に関与し、ひいては大核への核分化を決定付けるということを強く示唆するものである。

【謝辞】 電子顕微鏡像の撮影に対して、情報通信研究機構 バイオ ICT グループ 技術員の小坂田裕子、糀谷知子に感謝する。

【文献】

- 1) Chalker (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1783, 2130-2136.
- 2) Iwamoto et al. (2009) *Curr. Biol.*, 19, 843-847.