
Review

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* の核膜孔複合体と核-細胞質間輸送

岩本 政明

独立行政法人情報通信研究機構 未来 ICT 研究所
〒651-2492 兵庫県神戸市西区岩岡町岩岡 588-2

Nuclear pore complex and nuclear transport in the ciliate *Tetrahymena thermophila*

Masaaki IWAMOTO

Advanced ICT Research Institute, National Institute of Information and Communications Technology, Kobe 651-2492, Japan

SUMMARY

Ciliated protozoa have two functionally and structurally distinct nuclei, a somatic macronucleus (MAC) and a germline micronucleus (MIC), in the same cytoplasm. Nuclear dimorphism is one of the most mysterious puzzles in Ciliate Biology: how these two distinct nuclei are formed in a single cell remains to be solved. Toward this end, we have studied structural differences between the MAC and MIC in *Tetrahymena thermophila* and have found that the two nuclei have distinctive nuclear pore complexes. Importantly, this difference affects the nuclear entry of nucleus-specific nuclear proteins. This finding suggests that the nuclear pore complex together with the nuclear transport system may be one of the key factors that generate the nuclear dimorphism in *T. thermophila*. In this review, I will focus on the differences between the MAC and MIC nuclear pore complexes and discuss how these difference can cause nucleus-specific nuclear transport leading to nuclear dimorphism in ciliates.

Key words: Nucleoporin, FG repeat, Importin, Nuclear localization signal, Nucleocytoplasmic transport, Nuclear dimorphism

Tel: +81-78-969-2247/Fax: +81-78-969-2249

E-mail: iwamoto@nict.go.jp

Received: 31 July 2011; Accepted: 29 August 2011.

はじめに

絨毛虫類に属する原生生物は、細胞内に大核 (macronucleus) と小核 (micronucleus) という2種類の細胞核 (以後、核と省略) を持つ (Karrer, 2000; Orias et al., 2011). 大核と小核は、名前が示すように大きさに違いがあるが、それ以外にも、含まれている染色体の構造、クロマチンの凝縮度、転写活性の有無、DNA複製のタイミング、核分裂の様式など、様々な点で異なっている。大核は、すべての生命現象において遺伝子の転写を担っているのに対して、小核は、増殖過程では転写活性がなく、生殖過程においてのみ遺伝情報が使われる。増殖過程と生殖過程で大・小核を使い分ける2核性 (nuclear dimorphism) と呼ばれるこのシステムは、絨毛虫類がもつユニークな生物学的特徴の一つであり、多くの絨毛虫研究者の興味を引きつけている。

ひとつの細胞内で2種類の核が使い分けられるためには、それぞれの核の構造と機能を担うタンパク質成分が、目的の核へ正しく輸送されることが必要である。核の表面には、核膜孔 (nuclear pore) と呼ばれる「あな」が多数存在していて、核と細胞質間の物質輸送は、この核膜孔を通して行われる。我々は、大核タンパク質を大核へ、小核タンパク質を小核へ正しく運び分けるためには、核膜孔に何らかの構造的な違いが必要であろうと考えた。そこで、絨毛虫の1種 *Tetrahymena thermophila* の大核ゲノムデータベース (Eisen et al., 2006) から、アミノ酸配列の相同性をもとに、核膜孔を形づくる核膜孔複合体の構成タンパク質を選定し、それらがどちらの核の核膜孔に局在するかを調べた。その結果、大核と小核の核膜孔構造に決定的な違いを見出し、その違いが実際に核タンパク質の運び分けに深く関与していることを突き止めた。この研究により、絨毛虫が核タンパク質を2核へ運び分ける仕組みの一端がようやく明らかになった。細胞内に2種類の核を持つためには、それらを別々にコントロールする仕組みが必要であり、その分子基盤となっているのは、おそらく核膜孔構造と核内輸送系の差別化にあることは間違いない。我々のおこなった *T. thermophila* の核膜孔複合体に関する研究と、関連する周辺研究を概観し、2核性細胞における核-細胞質間輸送 (nucleocytoplasmic transport) の仕組みについて考察したい。

核膜孔複合体とヌクレオポリン (概説)

核膜孔複合体 (nuclear pore complex; NPC) は、核膜上に存在する巨大なタンパク質構造体である (図 1A)。その分子量は、動物細胞では約 125 MDa

(Reichelt et al., 1990)、酵母では約 66 MDa (Rout and Blobel, 1993) にもおよび、核膜の外膜と内膜を貫通して、細胞質と核内を連絡する通路である核膜孔を形成している。電子顕微鏡で観察される NPC は 8 角の回転対称体で、外径は脊椎動物細胞で約 120 nm、酵母で約 100 nm である (Fahrenkrog et al., 1998)。 *T. thermophila* の NPC の外径は、大・小核ともに ~80 nm (岩本ほか, 未発表) で、両核のそれを形態的に区別することはできない (図 1B)。 *T. thermophila* の核膜における NPC 分布密度は、両核とも約 45 個/ μm^2 と見積もられ (Iwamoto et al., 2009)、哺乳類培養細胞の 3-4 個/ μm^2 (Daigle et al., 2001) や、出芽酵母の 11-15 個/ μm^2 (Winey et al., 1997) よりはるかに多く、 *Xenopus* 卵母細胞の約 50 個/ μm^2 (Maul, 1977) の値に近い。このことから、 *T. thermophila* では、非常に活発な核-細胞質間輸送がおこなわれていると考えられる。

NPC を構成するタンパク質は、これまでに動物細胞や出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) などで約 30 種類が同定されており、ヌクレオポリン (nucleoporin; Nup) と総称される (Cronshaw et al., 2002; Rout et al., 2000)。それらが 8 の倍数個ずつ集合して巨大なタンパク質複合体を形作っている。NPC は構造上、細胞質フィラメント、中心構造体、および核内バスケットに大別される (図 1A)。中心構造体内の膜貫通領域には、3 種類の膜貫通型ヌクレオポリン (Pom121, Ndc1, gp210) が存在し、NPC を核膜にアンカーしている (図 2左)。膜貫通領域を取り囲むようにメインボディである Nup107-Nup160 複合体と Nup93 複合体が位置し、さらにそれら複合体の上に、フェニルアラニン-グリシン (FG) が高頻度で出現する FG リピートをもった FG-ヌクレオポリン (Terry and Went, 2009) が多数集合して中央の孔を形成している (図 2左)。核輸送に重要な働きをするのが、この FG-ヌクレオポリンであり、後で詳述するが、我々が大小核で違いを見いだした Nup98 も FG-ヌクレオポリンのひとつである。

FG-ヌクレオポリンの FG リピート領域は、立体構造を取らないフレキシブルな物性で、フィラメント様の体裁を示す (図 1A)。そのぐにゃぐにゃとしたフィラメント上には、数多の F 残基が存在しており、それらの F 残基どうしが疎水的に結合することで、孔内部に 3 次元メッシュ構造が形成される。この構造が分子ふるいとして働き、約 60 kDa 以上の高分子物質の自由通過を妨げると考えられている (複数ある核膜孔モデルの最有力のひとつ; Frey and Görlich, 2007)。それではなぜ核輸送の運搬体である importin- β はそれ自身で 100 kDa 以上の大きさにもかかわらず、核膜孔を通過できるのだろうか。Importin- β やそのスーパーファミリー分子は、FG-ヌクレオポリンの F 残基と結合できる疎水性ポケットをもっており、その結合によ

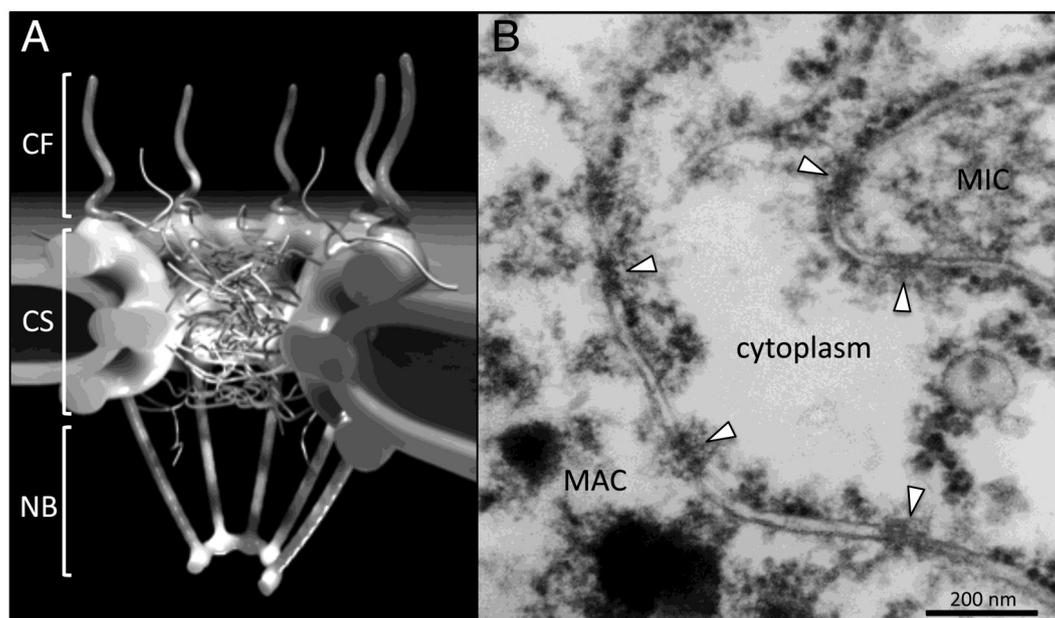


図1 核膜孔複合体 (nuclear pore complex; NPC). A) 一般的な NPC のモデル (高等動物細胞). 上側が細胞質, 下側が核内. CF; 細胞質フィラメント (cytoplasmic filament), CS; 中心構造体 (central NPC structure), NB; 核内バスケット (nuclear basket). 中心構造体が形作る核膜孔内と孔周辺部は, フィラメント様の FG-ヌクレオポリンに満たされている. B) *T. thermophila* の透過型電顕像. 矢じりは NPC の位置を示す.

リヌクレオポリン間の疎水結合を切断し, 分子ふるいを部分的に押し広げながら核膜孔を通過すると考えられている (Frey et al., 2006) .

NPC とヌクレオポリンの研究には, これまで *S. cerevisiae* とヒト培養細胞が多く用いられ, 前者は下等真核生物, 単細胞, ならびに核膜非崩壊型核分裂 (closed mitosis) をおこなう生物のモデル細胞として, 後者は高等真核生物, 多細胞, ならびに核膜崩壊型核分裂 (open mitosis) をおこなう生物のそれとしてそれぞれ扱われてきた. 遺伝学的な材料としての扱いやすさから *S. cerevisiae* における研究がリードし, その後, HeLa 細胞などでの研究が追従してきた感がある. 両者の NPC の構成はよく似ていたため, これまで, 単細胞生物から高等動物まで, 全真核生物の NPC はほぼ同様の構成で成り立っていると考えられてきた. しかしながら, 酵母と多細胞動物は, 進化系統的には同一の分類群であるオピストコンタに属するため, 両者の NPC 構成が似ているのは当然のことといえるだろう. 実際のところ, NPC の各構成成分は, 進化的な系統の違いによってかなり異なっていることが分かってきた (Mans et al., 2004; DeGrasse et al., 2009; Iwamoto et al., 2010) . NPC 構造の違いは, 核機能の違いやその

制御機構の違いに直結する可能性が高いため, より広い範囲の生物について NPC 構造を調べ, それらを比較研究していくことが重要である. このような研究は, 真核生物の起源や進化過程を理解する上で重要であるばかりでなく, 高等生物の核機能の制御機構の理解にも繋がると思われる. 原生物は, その重要な一角を担う生物システムということができる.

T. thermophila のヌクレオポリン

我々は, *T. thermophila* の大核ゲノムのデータベース (Eisen et al., 2006) から, 様々な生物種の既知のヌクレオポリンと配列相同性をもった遺伝子を可能な限り拾い出した. *T. thermophila* のヌクレオポリンは, 相対的に配列保存性が低いにもかかわらず, アミノ酸配列をもとにした検索では, 約 30 種類あるといわれているヌクレオポリンのうち, 13 個の遺伝子を見つけ出すことができた (Iwamoto et al., 2009) (図2右). そのうちの 4 個は Nup98 の相同遺伝子 (パラログ) であり, 残りの 9 種類は重複のない独立の遺伝子であった. これらの遺伝子産物を GFP 融合体として発現させ, 細胞内局在を調べたところ,

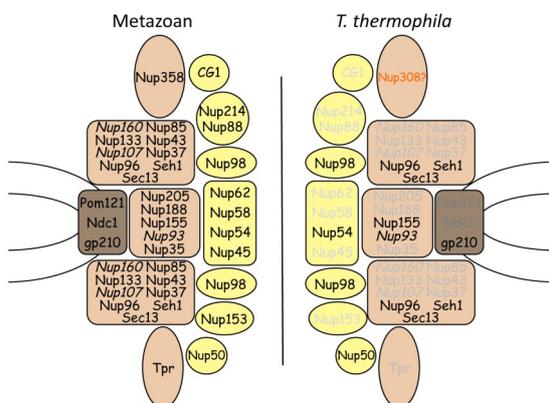


図2 NPC内でのヌクレオポリンの配置図。左は高等動物細胞のNPC、右は *T. thermophila* のNPCを示す。茶色のボックスは、膜貫通型ヌクレオポリンの複合体。黄色は、FG-ヌクレオポリンを表す。ただし、Nup214と複合体を形成するNup88はFGリピートを持たない。*T. thermophila* におけるグレー文字表記のヌクレオポリンは、未同定の分子種を表す。また、*T. thermophila* のNup308は、Nup358に相当する成分の可能性もあるが、現在のところ、そのポジションは不明である。

重複遺伝子が見つからない9種類は、大核と小核両方の核膜孔または核質に局在した(図3)。これに対して面白いことに、4種類のNup98パラログは、2種類が大核に、他の2種類が小核に特異的に局在することが分かった(図3)。この結果は、繊毛虫の大核・小核のNPCは、骨格構造は共有するものの、それらの構成成分には明らかな違いがあることを明確に示すものである。

両核に局在するヌクレオポリン

両核に局在するヌクレオポリンのうち、Nup155, gp210, Nup96, Nup93, Seh1, Sec13, Nup54, およびNup50は真核生物に広く保存されたヌクレオポリンであり、高等動物細胞のオルソログに付けられたタンパク質名をそのまま使用した。Seh1とSec13以外のタンパク質名に付けられた数字は、ヒトオルソログの分子量(kDa)を表しているため、これらは *T. thermophila* のヌクレオポリンの実際の分子量を表してはいない(例えば *T. thermophila* のNup155は235 kDa, Nup54は37 kDa)。

これに対し、Nup308(308 kDa)には相当する既存のヌクレオポリンが見当たらないため、*T. thermophila* の分子量を付けた。このヌクレオポリンは、300 kDaを超える大きさで、FGリピートを持つという特徴は、動物細胞の細胞質フィラメントを構成す

るNup358(RanBP2)(図1,2参照)と共通するものであるが、Nup358が持つRan-binding domain, Zn-finger domainなどの機能性領域(Wu et al., 1995)はNup308には見られず、またFGリピート領域の位置がNup358ではC末側であるのに対して、Nup308ではN末側に存在するなど、構造上、大きな違いが見られた。これらの違いから、Nup308はNup358の機能的カウンターパートではなく、*T. thermophila* に特異的なヌクレオポリンと考えられる。Nup308は、繊毛虫特有の核機能に関与している可能性がある。

膜貫通型ヌクレオポリンのgp210は動物細胞に存在し、酵母には見られないことから、多細胞動物に特有の成分と考えられてきた。核膜孔におけるgp210の分子機能はよく分かっていないが、高等動物では、いくつかの細胞種の増殖に対しては非必須であることや(Eriksson et al., 2004; Olsson et al., 2004)、組織によって発現に大きな差が見られることから(Olsson et al., 1999)、組織特異的な働きをもつものであって、細胞レベルではさほど重要ではないとも考えられている。しかしながら、in silicoの研究は、gp210が酵母を除くほとんどの真核生物(多くの単細胞生物の系統を含む)に高度に保存された成分であることを示唆しており(Mans et al., 2004)、細胞レベルで重要な働きをしていないとは考えにくい。現在のところ、*T. thermophila* はgp210の存在が実験的に証明された唯一の単細胞モデルであり、細胞レベルでのgp210の機能を探るための最適な実験系であるといえる。

両核に局在するヌクレオポリンの中には、大核と小核で核膜面積あたりの局在量が異なるものが存在する。核膜上のGFPの蛍光量を比較した場合、Nup155とSeh1は小核の方が明らかに強い(図3)。またNup50の場合は、量だけでなく局在も異なっている。小核では核膜局在が見られるが、大核では核質に局在し、核膜上には顕著な局在は見られない(図3)。したがって、共通成分といえども、NPC構成の量比は大核と小核で異なっている可能性がある。今のところ、この量比の違いがNPCの機能にどういう意味を持つのかは分かっていないが、同一の生物内でNPC構成成分の量比を変えることができることを示唆するこの結果は、高等生物のNPCの構造と機能を考える上でも面白い問題を提起している。

核選択的なヌクレオポリンNup98

Nup98の遺伝子構造は一風変わっている。多くの生物で、Nup98遺伝子はNup96遺伝子と融合しており、ひとつの遺伝子産物として読み出される。そして翻訳後に、自己切断活性(autopeptidase activity)により切断されて、ひとつがNup98に、もうひとつ

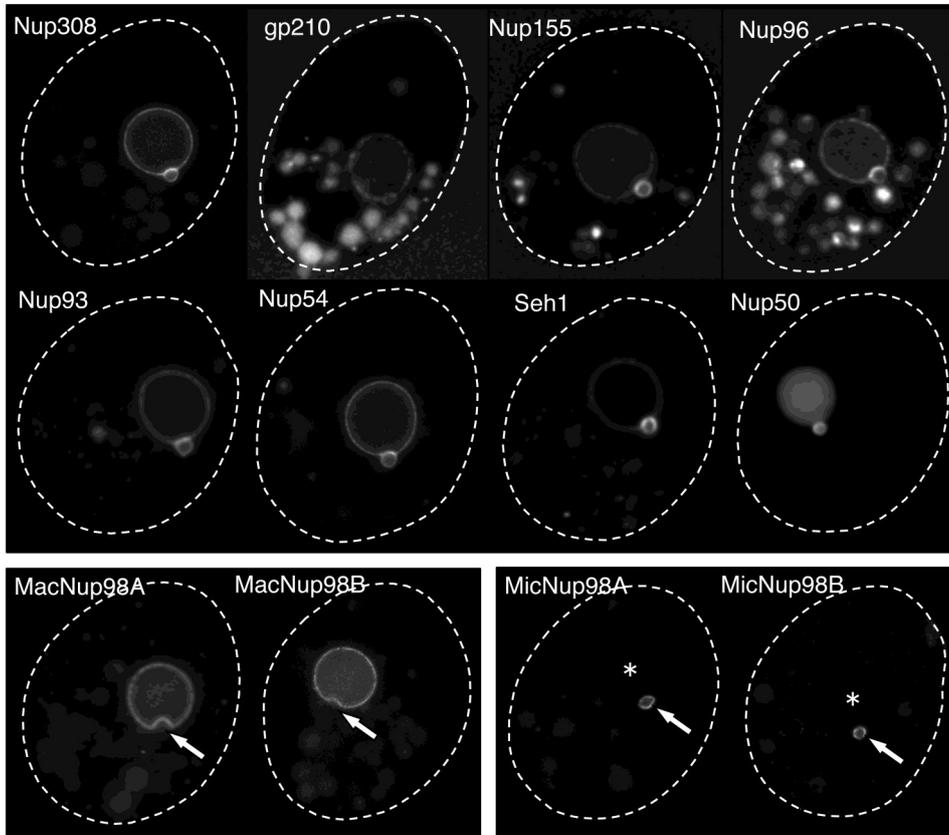


図3 *T. thermophila* ナクレオポリンの細胞内局在. いずれもN末側にGFPを融合したものを発現させた. 矢印は小核の位置を, アスタリスクは, 大核の位置をそれぞれ示す. 細胞の状態によって, digestive vacuole 内部に蛍光が観察される. Iwamoto et al. (2009) の Figure 1 を改変.

が Nup96 になるのである. Nup98 は, N 末側に FG リピート領域を, C 末端に保存性の高い Nucleoporin2 ドメインを持つことによって定義される (図4). Nucleoporin2 は自己切断活性を持つドメインであり, ドメイン内後端に存在する保存配列ヒスチジン-フェニルアラニン-セリン (HFS) の F-S 間を切断して, 2 本のポリペプチド鎖を生じさせる (Fontoura et al., 1999; Rosenblum and Blobel, 1999; Iwamoto et al., 2010). 前半部のポリペプチドが Nup98, 後半部が Nup96 という機能的に異なったヌクレオポリンとなる. Nucleoporin2 は, 自らのドメイン後端部を切断するため, 切断後は Nup98 の C 末端に位置することになる. 一方, 植物細胞では Nup98 と Nup96 は別々の遺伝子座に独立した遺伝子としてそれぞれコードされている. テトラヒメナの Nup98 パラログ 4 種類のうち, 大核型 2 種類 (NUP2, NUP3) と小核型 1

種類 (NUP4) は Nucleoporin2 ドメインの直後に停止コドンが存在し, 後ろの Nup96 を欠いた植物タイプのものであったが, 小核型の 1 種類 (NUP5) は, 切断部位の HFS 配列を持ち, 後半の Nup96 につながった動物タイプのものであった (図4). ちなみに, NUP5 の後半部のみを発現させた Nup96 (Nup5p_C) は両核に局在した (図3).

大核と小核を分ける Nup98 のリピート配列

大核に局在する Nup98 と小核に局在するものの決定的な違いは, N 末側に存在するリピート配列にある (図4). 動物細胞や酵母などの既知の Nup98 では, FG リピートの変種であるグリシン-ロイシン-フェニルアラニン-グリシン (GLFG) リピートが特徴的であり (Wente et al., 1992; Powers et al., 1997), この部分で importin- β (核内輸送の運搬体) や ex-

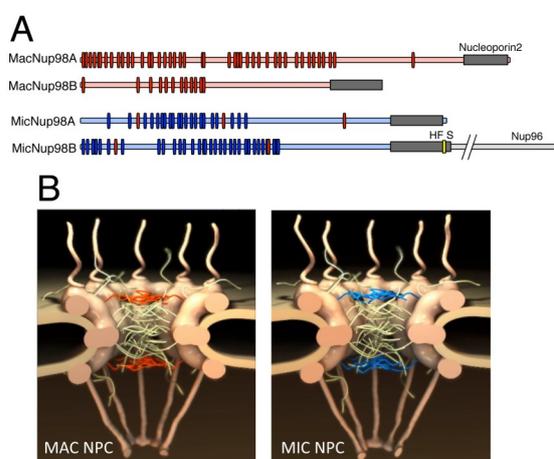


図4 *T. thermophila* の Nup98. A) 4 種類の Nup98 パラログ. 大核に局在するのは MacNup98A (Nup2p) と MacNup98B (Nup3p) で, 小核に局在するのは MicNup98A (Nup4p) と MicNup98B (Nup5p_N) である. 赤の縦線は, GLFG または xxFG (x は不特定のアミノ酸を表す) モチーフ, 青の縦線は NIFN または類似の xxFx モチーフの位置を示す. グレーのボックスは, Nucleoporin2 ドメインを表し, MicNup98B のドメイン内には自己切断サイトである HFS 配列の位置を黄色の縦線で示す. MicNup98B の切断位置より後側には Nup96 の配列が続く. B) NPC 内での Nup98 の配置. MacNup98A, B をオレンジ, MicNup98A, B を青色で表している.

portin (核外輸送の運搬体) と結合する (Radu et al., 1995; Yaseen and Blobel, 1997; Fontoura et al., 2000; Oka et al., 2010). 2 種類の大核タイプの Nup98 には, 典型的な GLFG リピードが存在したが, 2 種類の小核タイプの Nup98 には GLFG リピードどころか, FG モチーフですらほとんど存在しなかった. しかしながら, 運搬体との結合に必須の F 残基は, 小核タイプの Nup98 にも GLFG リピードとほぼ同じピッチで存在しているので, F 残基を中心にしてアライメントしてみると, アスパラギン-イソロイシン-フェニルアラニン-アスパラギン (NIFN) または, セリン-イソロイシン-フェニルアラニン-アスパラギン (SIFN) という一風変わったモチーフのリピード (NIFN リピードと定義) が存在することが分かった (Iwamoto et al., 2009). それぞれのリピード領域を構成するアミノ酸の組成は, 柔軟で立体構造を取らない G リッチ (大核) または N リッチ (小核) なスペーサー配列の中に, 疎水性の LF (大核) または IF (小核) が一定間隔で存在するという非常に似通ったものであった. 両モチーフに共通する F 残基が運

搬体との結合に用いられると考えられるため, いずれのリピード領域も運搬体と結合できると予想されるが, それぞれのモチーフに特異的に結合する運搬体が存在するのか, F 残基周囲のアミノ酸組成が運搬体との結合にどう影響するのかなど不明な点が多く, これらは今後解決されるべき問題である.

配列の異なるリピード領域にはどのような生物学的な意義があるのだろうか. 大核 Nup98 に見られる GLFG リピードは, 動物細胞や酵母などオピストコンタ生物の Nup98 ホモログに共通して存在する. ところが, *Arabidopsis* を始めとする植物の Nup98 のリピードは GLFG ではなく, プロリン-アラニン-フェニルアラニン-グリシン (PAFG) モチーフが顕著である (Iwamoto et al., 2010). したがって, GLFG は全真核生物の Nup98 に共通のリピードモチーフではない. また, ゲノム解読されている原生生物の Nup98 を見渡してみると, 原生生物に共通したものは見られず, さまざまなリピードモチーフが存在する. GLFG は, 繊毛虫と同じくアルベオラータに分類される *Theileria*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* などのアピコンプレクサ原虫に見られる. *T. thermophila* 以外は病原性の原生生物であるが, 自由生活性の種のゲノム解析が進んでいないこともあり, GLFG モチーフと病原性に関連があるのかどうかは今のところ分からない. 一方, 自由生活性の繊毛虫である *Paramecium tetraurelia* のデータベースに見つかる 7 種類の Nup98 様遺伝子には, GLFG モチーフは全く見られず, NIFN リピードを持つものが 5 種類, FG リピードを持つものが 1 種類と, 明瞭なリピードを持たないものが 1 種類存在する (Iwamoto et al., 2010). これらが小核と大核のどちらに局在するかは調べられていないが, 繊毛虫に共通するモチーフは, 典型的な GLFG ではなく, NIFN のようである. しかしながら, 繊毛虫における Nup98 のオリジナルなリピードモチーフは NIFN なのか, それとも *Paramecium* 属が GLFG リピードを失ったのかを結論するには, 他の繊毛虫, さらにはアルベオラータ生物のゲノム解読を待ち, それらと比較解析を行う必要がある.

Nup98 の核選択性を決めている要因

T. thermophila の Nup98 の核選択性の問題は, 2 核性生物の成り立ちを考える上で, より直接的で重要な問題である. 他生物の Nup98 は, Nucleoporin2 ドメインを含む C 末側の globular な領域で NPC と相互作用することが分かっている (Hodel et al., 2002). テトラヒメナの Nup98 も同様に C 末側で NPC に結合していると考えられるが, 核選択性も C 末側で決まるのか, それとも核選択的なリピード領域のある

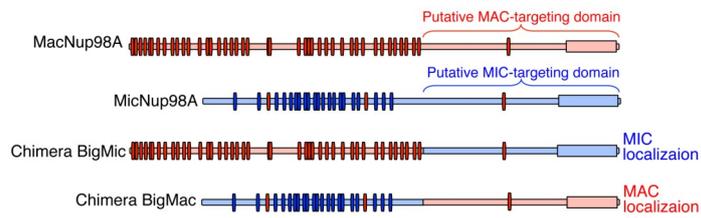


図5 MacNup98A と MicNup98A のキメラ分子. BigMic キメラは MacNup98A の N 末側 GLFG リピードと MicNup98A の C 末側配列をもち、小核 NPC に局在する. BigMic キメラは MicNup98A の N 末側 NIFN リピードと MacNup98A の C 末側配列をもち、大核 NPC に局在する.

N 末側で決まるのだろうか. この問題を解くために, MacNup98A と MicNup98A の N 末側リピード領域と C 末側領域を分子間で置き替えた Nup98 のキメラ分子を作成し, それらの核膜孔局在における核選択性を調べた. ひとつは, 大核型 MacNup98A の N 末側 GLFG リピード領域と小核型 MicNup98A の C 末側領域を持つもので, 他方は, 小核型 MicNup98A の N 末側 NIFN リピード領域と大核型 MacNup98A の C 末側領域を持つものである (図5). これらを細胞内で発現させたところ, いずれも C 末側配列に用いたパラログの核選択性に従った局在を示した. したがって, テトラヒメナの Nup98 は, 核局在に必要な C 末側配列が, 同時に核選択性をも決定していることが分かった. しかしながら, C 末領域のアミノ酸配列は 4 種類のパラログ間でそれぞれ適度に異なっており, 大核局在または小核局在を規定するような共通の配列あるいは法則性をそこに見出すことはできなかった.

Nup98 の核選択性が, Nup98 側の構造だけで決まるとは考え難く, NPC 側に存在する Nup98 の結合パートナーも大核と小核で違っている必要がある. 他生物では, Nup96, Nup88, Tpr, Pom121 などが Nup98 の結合パートナーとして報告されている (Griffis et al., 2003; Fontoura et al., 2001; Mitchell et al., 2010). テトラヒメナでは, Nup96 は両核に存在しているため, 結合パートナーであっても核選択性の決定因子ではない. これに対して, Nup88, Tpr, および Pom121 はテトラヒメナでは未同定であり, これらが小核と大核で異なっていて, そのことが Nup98 の核選択性を決定しているのかもしれない. もしくは, 両核に共通するヌクレオポリンの量比が異なっていることが, Nup98 の核選択性に何らかの影響を与えている可能性もある.

選択的核輸送に関与する Nup98

N 末側と C 末側を繋ぎ変えたキメラ Nup98 分子は, 核選択的な局在化の問題を明らかにするだけでなく, Nup98 の核-細胞質間輸送における機能を解析する機会を提供する. 既述の通り, Nup98 は N 末側

のリピード領域を介して核輸送の運搬体である importin- β と相互作用する. キメラ分子では, 大核タイプの GLFG リピードが小核 NPC に異所局在し, 小核タイプの NIFN リピードが大核 NPC に異所局在する. このような状況で選択的な核内輸送はどのような影響を受けるのだろうか. Nup98 のリピード領域の違いだけで核選択的な核内輸送が成立するとしたら, キメラ分子を発現する細胞では, 大核物質は小核にも輸送され, 小核物質は大核にも輸送されるはずである. しかしながら実際には, 核選択的な核タンパク質が, 他方の核へ間違っ て輸送されるようなことは起こらなかった (Iwamoto et al., 2009). この結果は, Nup98 だけでは核選択的な核内輸送を成立させることはできず, 輸送物質を核内へ引き込むには, 核膜孔または核内に他の核選択的な要素が必要であることを示唆するものである.

ところが, キメラ発現細胞では, 核選択的な核内輸送に予想外の影響が出た. 核選択的な核内タンパク質の輸送がキメラ分子の発現によって著しく抑制されたのである. すなわち, 大核特異的なリンカーヒストン H1 やヒストン H2A.Z, 大核へ選択的に輸送される核局在化シグナル (後に詳述) などは, 大核 NPC に異所局在する小核 NIFN リピードによって大核への輸送を阻まれ, 同様に, 小核特異的なリンカーヒストン MLH は, 小核 NPC に異所局在する大核 GLFG リピードによって小核への輸送を阻まれた (Iwamoto et al., 2009). この結果は, Nup98 の核選択的なリピード領域が, 他方の核への輸送物質の核膜孔通過に対して阻害的に作用する障壁効果を持つことを示唆している. Nup98 は, NPC の出入り口付近に位置するヌクレオポリンであるため (図2, 4 参照), 輸送運搬体が核膜孔を通過する直前の足場になっていると考えられる. おそらく, 大核運搬体は小核 NIFN リピードに対してまったく親和性が無く, 同様に, 小核運搬体は大核 GLFG リピードに対してまったく親和性が無いため, キメラ分子の局在によって核膜孔の出入り口付近で弾かれてしまうのかもしれない. このことを確かめるために, GLFG および NIFN リピードと核輸送運搬体との結合親和

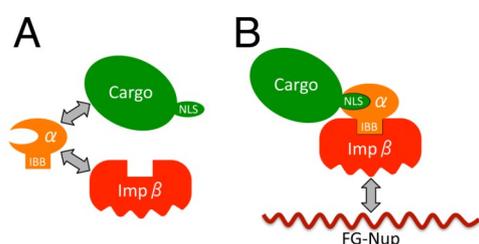


図6 輸送基質，輸送運搬体，およびFG-ヌクレオポリンの関係。A) 輸送基質 (cargo) がもつ核局在化シグナル (NLS) は importin- α によって認識され，さらに importin- α がもつ IBB (importin- β -binding) 配列が importin- β に認識されることで，三者複合体を形成する。B) Importin- β が FG-ヌクレオポリンとのアフィニティーをもつことで三者複合体は核膜孔を通過できる。

性を生化学的に調べる必要がある。

このようなリピート配列による障壁効果は，2核性の繊毛虫を材料にしたからこそ見出すことができたのであって，1核の細胞では必要無いか，仮に効果が存在したとしても，それを実験的に見出すことは困難であったと考えられる。構造と機能の異なる2つの核が同一細胞内に存在する繊毛虫は，核の構造と機能との関連を調べるための様々な *in vivo* 実験が可能で優れた系であるといえる。

核選択的な核内輸送に必要なその他の要素：運搬体と核局在化シグナル

Nup98 のリピート領域のアミノ酸組成の違いは，核輸送の運搬体である importin- β との親和性に影響を及ぼすと考えられるため，importin- β の核局在性は2核間で違いが見られるはずである。Chalkaerらは，importin- α および - β ファミリーと予想されるタンパク質の細胞内局在を報告している (Malone et al., 2008)。彼らが見出した13種類の importin- α には，大核特異的に局在するものが2種類，小核特異的に局在するものが9種類，核局在を示さないものが2種類存在した。Importin- α は，輸送されるタンパク質 (輸送基質) と importin- β を繋ぐアダプター因子であり，FG-ヌクレオポリンとは直接相互作用しない (図6) ため，これらを運搬する importin- β ファミリーが必要である。Chalkaerらは，importin- β ファミリーとして11種類 (2種類の exportin を含む) の細胞内の局在を調べ，それらの中に大核特異的なものは存在するが，小核特異的なものは存在しなかったと報告している。小核特異的な importin- α を運搬す

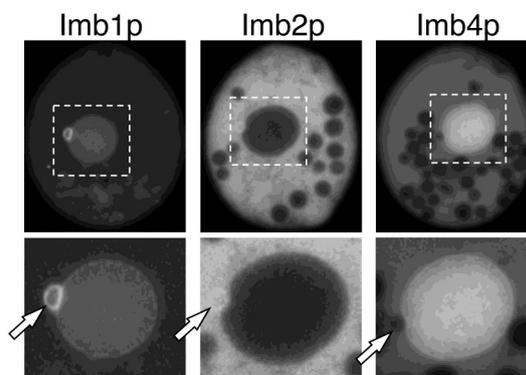


図7 *T. thermophila* の importin- β ファミリータンパク質。大核と小核の両方に局在するもの (Imp1p)，小核にだけ局在するように見えるもの (Imp2p)，および大核だけ局在するように見えるもの (Imp4p) が存在する。ただし，Malone et al. (2008) の報告では，Imp2p の小核局在性については述べられていない。いずれも N 末側に GFP を融合したものを発現させた。矢印は小核の位置を示す。

る importin- β は小核特異的な局在を示すはずである。この考えに基づいて，我々は Malone et al. (2008) が同定した11種類の importin- β タンパク質の再検討と，それ以外の新たな importin- β タンパク質の探索を行い，小核選択的な運搬体の同定を進めているところである (図7参照)。

Importin- β が核内へ輸送する輸送基質には，核局在化シグナル (nuclear localization signal; NLS) と呼ばれる塩基性アミノ酸に富んだ特殊な配列が存在している (Yoneda, 1997; Lange et al., 2007)。いわば，核内行きを記した荷札のようなものである。典型的な NLS はまずアダプターの importin- α によって認識され，次いで importin- β が，輸送基質と importin- α の複合体を認識して結合することで，三者複合体が形成される (Rexach and Blobel, 1995) (図6)。また NLS の中には，importin- α を介さず，直接 importin- β ファミリータンパク質に認識されるものも数多く知られている。繊毛虫細胞の NLS には，大核行きを記したものと小核行きを記したものが存在するのだろうか。現在，テトラヒメナの細胞内で NLS として機能することが知られている唯一の配列は，シミアンウイルス SV40 のラージ T 抗原に由来する classic NLS (PKKKRKV) である (Kalderon et al., 1984)。この配列は，様々な生物種で核局在化シグナルとして働くことが知られており，テトラヒメナでは，この配列を付加したタンパク質は大核へだけ輸送され，小核へは輸送されない (White et al., 1989; Raha-

man et al., 2008; Iwamoto et al., 2009) . したがって大核行きを規定する NLS と、それを輸送する大核選択的輸送系は存在するようである. しかしながら、小核 NLS を含め、テトラヒメナのタンパク質に由来する NLS 配列は全く知られていないため、大核 NLS と小核 NLS の配列にどのような違いがあって行き先が分かれるのかは不明である. これらが同定されれば、核内タンパク質の局在を自由にコントロールすることが可能となり、核内タンパク質の機能解析に役立つだけでなく、大核と小核の核機能を人為的に制御することができるようになるかもしれない.

繊毛虫における核膜孔複合体研究のこれから

繊毛虫生物学の最も重要な問いのひとつは、2 核性がどのような仕組みで形成・維持されるかということである. 大核と小核は、接合過程で形成される 1 つの受精核から分化して生じる. 受精時は 1 つだった核が、(*T. thermophila* の場合) 2 回分裂して 4 つになり、その 2 つが大核に、残りの 2 つが小核に分化する. この核分化過程で生じる大小核間の構造的な差異が、その後の核機能の違いを引き起こすに違いないが、分化の初期段階に起こる核構造の変化に NPC と核内輸送系の差別化 (大・小核化) がどのように寄与するかを明らかにすることが、今後の最重要課題である.

今のところ我々が同定できたヌクレオポリンは 13 種類であり、大小核間で違いが見出されたのは Nup98 のパラログだけである. NPC を構成するヌクレオポリンは、生物種によらず約 30 種類は存在すると考えられていることから、おおよそ 20 種類が未同定であるということになる. 核分化の問題を考える上でも、NPC の構成要素を網羅することが重要である. これまで得られている相同性検索によって見出すことができたヌクレオポリンは、保存性の比較的高いものであり、NPC の構造と機能の普遍的な部分を担うものと考えられる. 一方、繊毛虫核の特殊性に係わるものは、保存性が低く簡単に見つからない未同定の 20 種類に含まれる可能性が高い. その中には Nup98 の局在選択性の分子基盤となっている NPC 骨格側の結合パートナーも含まれる可能性がある. 現在、NPC コンポーネントを生化学的手法で回収し、画分に含まれる成分を網羅的に同定する作業を進めている. 大核と小核の NPC 構造を完全解明し、各コンポーネントの機能解析を行っていく予定である. 繊毛虫の 2 核性の形成と機能制御の仕組みを解き明かす鍵は、NPC 構造の中に隠されていると筆者は考えて疑わない.

謝辞

テトラヒメナの核膜孔複合体と核輸送の研究を行うにあたり、多大なご理解とご助力をいただいている原口徳子博士 (情報通信研究機構) と平岡泰博士 (大阪大学) に感謝いたします. また、原口博士には本総説の執筆にあたってご助言いただきましたことを合わせて感謝申し上げます. さらに、私の研究遂行に日頃ご協力くださっている情報通信研究機構 バイオ ICT 研究室 生物情報グループのメンバーに感謝いたします. なお、本総説で取り上げた著者の研究は、科研費・若手研究 (B) (#21770224) および新学術領域研究 (#23128514) による助成を受けて行われたものであることを書き添えます.

引用文献

- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. and Matunis, M. J. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.*, 158, 915–927.
- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Ellenberg, J. (2001) Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 154, 71–84.
- DeGrasse, J. A., DuBois, K. N., Devos, D., Siegel, T. N., Sali, A., Field, M. C., Rout, M. P. and Chait, B. T. (2009) Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *Mol. Cell. Proteomics*, 8, 2119–2130.
- Eisen, J. A., Coyne, R. S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J. R., Badger, J. H., Ren, Q., Amedeo, P., Jones, K. M., Tallon, L. J., Delcher, A. L., Salzberg, S. L., Silva, J. C., Haas, B. J., Majoros, W. H., Farzad, M., Carlton, J. M., Smith, R. K. Jr., Garg, J., Pearlman, R. E., Karrer, K. M., Sun, L., Manning, G., Elde, N. C., Turkewitz, A. P., Asai, D. J., Wilkes, D. E., Wang, Y., Cai, H., Collins, K., Stewart, B. A., Lee, S. R., Wilamowska, K., Weinberg, Z., Ruzzo, W. L., Wloga, D., Gaertig, J., Frankel, J., Tsao, C. C., Gorovsky, M. A., Keeling, P. J., Waller, R. F., Patron, N. J., Cherry, J. M., Stover, N. A., Krieger, C. J., del Toro, C., Ryder, H. F., Williamson, S. C., Barbeau, R. A., Hamilton, E. P. and Orias, E. (2006) Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol.*, 4, e286.

- Eriksson, C., Rustum, C. and Hallberg, E. (2004) Dynamic properties of nuclear pore complex proteins in gp210 deficient cells. *FEBS Lett.*, 572, 261–265.
- Fahrenkrog, B., Hurt, E. C., Aebi, U. and Panté, N. (1998) Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes. *J. Cell Biol.*, 143, 577–588.
- Fontoura, B. M., Blobel, G. and Matunis, M. J. (1999) A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J. Cell Biol.*, 144, 1097–1112.
- Fontoura, B. M., Blobel, G. and Yaseen, N. R. (2000) The nucleoporin Nup98 is a site for GDP/GTP exchange on ran and termination of karyopherin β 2-mediated nuclear import. *J. Biol. Chem.*, 275, 31289–31296.
- Fontoura, B. M., Dales, S., Blobel, G. and Zhong, H. (2001) The nucleoporin Nup98 associates with the intranuclear filamentous protein network of TPR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 3208–3213.
- Frey, S. and Görlich, D. (2007) A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell*, 130, 512–523.
- Frey, S., Richter, R. P. and Görlich, D. (2006) FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science*, 314, 815–817.
- Griffis, E. R., Xu, S. and Powers, M. A. (2003) Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. *Mol. Biol. Cell*, 14, 600–610.
- Hodel, A. E., Hodel, M. R., Griffis, E. R., Hennig, K. A., Ratner, G. A., Xu, S. and Powers, M. A. (2002) The three-dimensional structure of the autoproteolytic, nuclear pore-targeting domain of the human nucleoporin Nup98. *Mol. Cell*, 10, 347–358.
- Iwamoto, M., Asakawa, H., Hiraoka, Y. and Haraguchi, T. (2010) Nucleoporin Nup98: a gatekeeper in the eukaryotic kingdoms. *Genes Cells*, 15, 661–669.
- Iwamoto, M., Mori, C., Kojidani, T., Bunai, F., Hori, T., Fukagawa, T., Hiraoka, Y. and Haraguchi, T. (2009) Two distinct repeat sequences of Nup98 nucleoporins characterize dual nuclei in the binucleated ciliate *Tetrahymena*. *Curr. Biol.*, 19, 843–847.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39, 499–509.
- Karrer, K. M. (2000) *Tetrahymena* genetics: two nuclei are better than one. *Methods Cell Biol.*, 62, 127–186.
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E. and Corbett, A. H. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α . *J. Biol. Chem.*, 282, 5101–5105.
- Malone, C. D., Falkowska, K. A., Li, A. Y., Galanti, S. E., Kanuru, R. C., LaMont, E. G., Mazzarella, K. C., Micev, A. J., Osman, M. M., Piotrowski, N. K., Suszko, J. W., Timm, A. C., Xu, M. M., Liu, L. and Chalker, D. L. (2008) Nucleus-specific importin alpha proteins and nucleoporins regulate protein import and nuclear division in the binucleate *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot. Cell*, 7, 1487–1499.
- Mans, B. J., Anantharaman, V., Aravind, L. and Koonin, E. V. (2004) Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle*, 3, 1612–1637.
- Maul, G. G. (1977) The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 6, 75–186.
- Mitchell, J. M., Mansfeld, J., Capitanio, J., Kutay, U. and Wozniak, R. W. (2010) Pom121 links two essential subcomplexes of the nuclear pore complex core to the membrane. *J. Cell Biol.*, 191, 505–521.
- Oka, M., Asally, M., Yasuda, Y., Ogawa, Y., Tachibana, T. and Yoneda, Y. (2010) The mobile FG nucleoporin Nup98 is a cofactor for Crm1-dependent protein export. *Mol. Biol. Cell*, 21, 1885–1896.
- Olsson, M., Ekblom, M., Fecker, L., Kurkinen, M. and Ekblom, P. (1999) cDNA cloning and embryonic expression of mouse nuclear pore membrane glycoprotein 210 mRNA. *Kidney Int.*, 56, 827–838.
- Olsson, M., Schéele, S. and Ekblom, P. (2004) Limited expression of nuclear pore membrane glycoprotein 210 in cell lines and tissues suggests cell-type specific nuclear pores in metazoans. *Exp. Cell Res.*, 292, 359–370.
- Orias, E., Cervantes, M. D. and Hamilton, E. P. (2011) *Tetrahymena thermophila*, a unicellular eukaryote with separate germline and somatic genomes. *Res. Microbiol.*, 162, 578–586.
- Powers, M. A., Forbes, D. J., Dahlberg, J. E. and Lund, E. (1997) The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J. Cell Biol.*, 136, 241–250.
- Rahaman, A., Elde, N. C. and Turkewitz, A. P. (2008) A dynamin-related proteins required for nuclear remodeling in *Tetrahymena*. *Curr. Biol.*, 18, 1227–1233.

- Radu, A., Moore, M. S. and Blobel, G. (1995) The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell*, 81, 215–222.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L. Jr., Jarnik, M., Engel, A. and Aebi, U. (1990) Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell Biol.*, 110, 883–894.
- Rexach, M. and Blobel, G. (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, 83, 683–692.
- Rosenblum, J. S. and Blobel, G. (1999) Autoproteolysis in nucleoporin biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11370–11375.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B. T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.*, 148, 635–651.
- Rout, M. P. and Blobel, G. (1993) Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.*, 123, 771–783.
- Terry, L. J. and Wenthe, S. R. (2009) Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryot. Cell*, 8, 1814–1827.
- Wenthe, S. R., Rout, M. P. and Blobel, G. (1992) A new family of yeast nuclear pore complex proteins. *J. Cell Biol.*, 119, 705–723.
- White, E. M., Allis, C. D., Goldfarb, D. S., Srivastva, A., Weir, J. W. and Gorovsky, M. A. (1989) Nucleus-specific and temporally restricted localization of proteins in *Tetrahymena* macronuclei and micronuclei. *J. Cell Biol.*, 109, 1983–1992.
- Winey, M., Yasar, D., Giddings, T. H. Jr. and Mastroianni, D. N. (1997) Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol. Biol. Cell*, 8, 2119–2132.
- Wu, J., Matunis, M. J., Kraemer, D., Blobel, G. and Coutavas, E. (1995) Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J. Biol. Chem.*, 270, 14209–14213.
- Yaseen, N. R. and Blobel, G. (1997) Cloning and characterization of human karyopherin $\beta 3$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4451–4456.
- Yoneda, Y. (1997) How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J. Biochem.*, 121, 811–817.