

140. 核の大きさが転写制御に与える影響の解析

原 裕貴

*山口大学 大学院医学系研究科

Key words : 核サイズ, 転写制御, *in vitro* 無細胞再構築系

緒 言

生命の基本単位である（真核）細胞は、遺伝情報である DNA を内包する細胞核（以下、「核」とする）をもつ。核により細胞質から DNA を隔てることで、mRNA の転写や DNA の複製など DNA の機能に適切な場を提供している。興味深いことに、発生・分化の過程において、これら DNA の機能に変化が生じる際、内包する DNA・ゲノムの量が変化しないにも関わらず、核の形態、特にサイズ（大きさ）に変化が生じる。さらに、細胞機能に異常が生じている癌化や老化した細胞では、核のサイズや形態に異常が生じることが知られている。これらのことは、遺伝子発現の変化により核のサイズ・形態が変化する可能性と共に、核のサイズや形態の変化が、内包する DNA が関わる核内機能を制御する機構の存在を示唆している。実際に、核膜の内側に位置し核の構造を支える核ラミナは DNA と結合することにより、核内での DNA 高次構造の形成を促すことが知られ、核の形態の変化をきっかけに DNA 機能を直接的に制御することが考えられる。近年の分子・細胞生物学分野の発展により、核のサイズや形態の制御機構、さらには転写や複製の DNA 機能の制御機構がそれぞれ別々に解析されているが、核のサイズが機能に与える直接的な影響は殆ど理解されていない。そこで本研究において、この核の「サイズ」と転写制御の因果関係を解析するために、核のサイズを発生イベント非依存的に操作することを可能にする改良型の *in vitro* の無細胞再構築系を確立したので報告する。

方 法

核サイズと転写状態の因果関係を解析するために、転写活性をもつ改良型の *in vitro* 無細胞再構築系を確立した（論文未発表）。従来の無細胞再構築系では転写状態が抑制されているアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の未受精卵を材料とし調製した細胞質抽出液中で核を構築させるため、転写解析が困難であった。この転写状態を活性化させるために、転写が活性化している *X. laevis* の特定の細胞より核内容物を単離し、従来の未受精卵から調製した細胞質抽出液に対し添加することにより転写活性を誘導した。実際に、この改良型無細胞再構築系において、従来法と変わらず核の再構築を確認した（図 1）。さらに、予め細胞質抽出液にヌクレオシドアナログである 4-チオウリジンを添加しておくと、改良型無細胞再構築系において核を再構築させたサンプルでは、4-チオウリジンを取り込んだ新規に転写された mRNA を検出した（図 1）。この結果から、転写活性をもつ核の *in vitro* 無細胞再構築が完了したと考えられる。

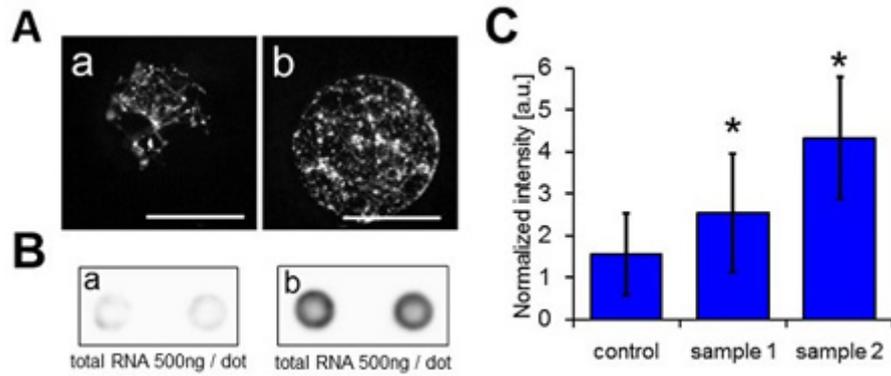


図1. 改良型 *in vitro* 無細胞再構築系

(A) 従来型 (a)、及び改良型の *in vitro* 無細胞実験系で再構築した核 (b)。180 分間培養後の核を固定後、Hoechst33342 で染色した。スケールバー：50 μm 。(B) 再構築核から単離した全 RNA 500 ng を dot blot し、新規転写後に取り込まれた 4-チオウリジンを HRP 結合の特異的抗体により検出した。(C) 検出した dot blot から発光強度を定量し、4-チオウリジンを添加していないサンプルで標準化した従来型 (control) と改良型 (sample 1, 2) の蛍光強度。Asterisk: $P < 0.05$ (スチューデントの t 検定 (両側検定))。

結果および考察

まずは核サイズの増加速度を制御する機構を理解するために、従来型の *X. laevis* 未受精卵の細胞質抽出液を用いた核の *in vitro* 無細胞再構築系と異分野のマイクロ流体力学の技術を組み合わせ、核周囲の局所的な細胞質空間サイズを人為的に操作する実験系を確立した。この独自の実験系を用い解析を行った結果、核周囲に構築される微小管構造により核膜材料の供給速度を調節する新規の制御機構を解明した (図2) [1-3](#))。この機構に摂動を与えるために、微小管の重合阻害、ダイニンの活性阻害を行うと、既存の無細胞再構築系において核の成長速度を低下させる、つまりは一定時間培養後の核のサイズを小さくさせることが可能となった (図2)。

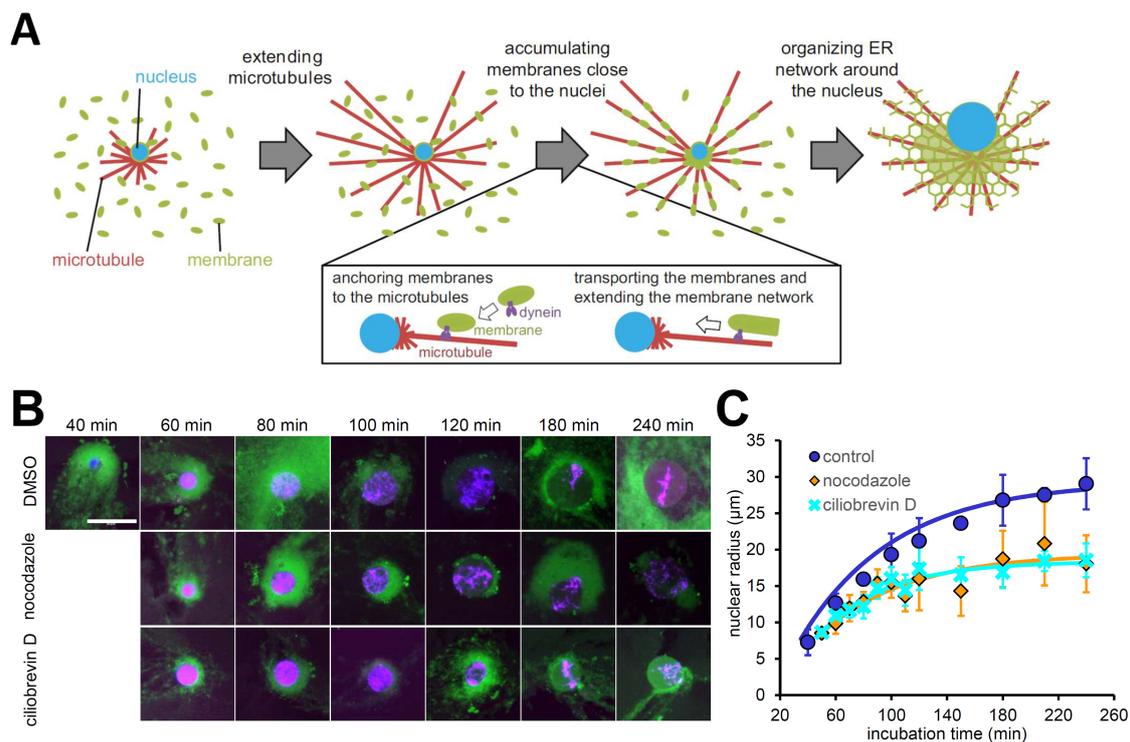


図 2. *X. laevis* 無細胞再構築系における核のサイズ制御機構

(A) 微小管上のダイニンによる核膜成分の集積による核サイズの増大機構の模式図。微小管上のダイニンにより細胞質中の膜成分をリクルートし、核膜へ供給することで核サイズを増加させる。(B) *X. laevis* 未受精卵の細胞質抽出液に精子クロマチンを加え培養開始 40 分後、nocodazole (微小管阻害剤)、ciliobrevin D (ダイニン活性阻害剤)、および DMSO (control) を添加した際の再構築した核の様子。記載された培養時間で核を固定し染色した。青：Hoechst33342 で染色した DNA；緑：DiOC6(3) で染色した膜成分；マゼンタ：複製した DNA に取り込まれた Rhodamine-dUTP。スケールバー：50 μm 。(C) DMSO (control、青)、nocodazole (オレンジ)、ciliobrevin D (水色) 存在下での核の増大の様子。各培養時間での核の半径の平均値 (\pm 標準偏差) を示し、近似曲線を算出した。

これまで蓄積した核サイズの操作の知見を、上記の改良型 *in vitro* 無細胞再構築系に応用した (論文未発表)。改良型 *in vitro* 無細胞再構築系において核を再構築させる際に、微小管の重合阻害剤である nocodazole、もしくはダイニンの活性阻害剤である ciliobrevin D を加えると、核サイズの増大速度が低下することが明らかとなった (図 3)。この結果は、従来の無細胞再構築系と同様に、今回確立した改良型でも、核周囲に構築される微小管構造により核膜材料の供給速度を調節する核サイズの制御機構が作用することを示唆している。

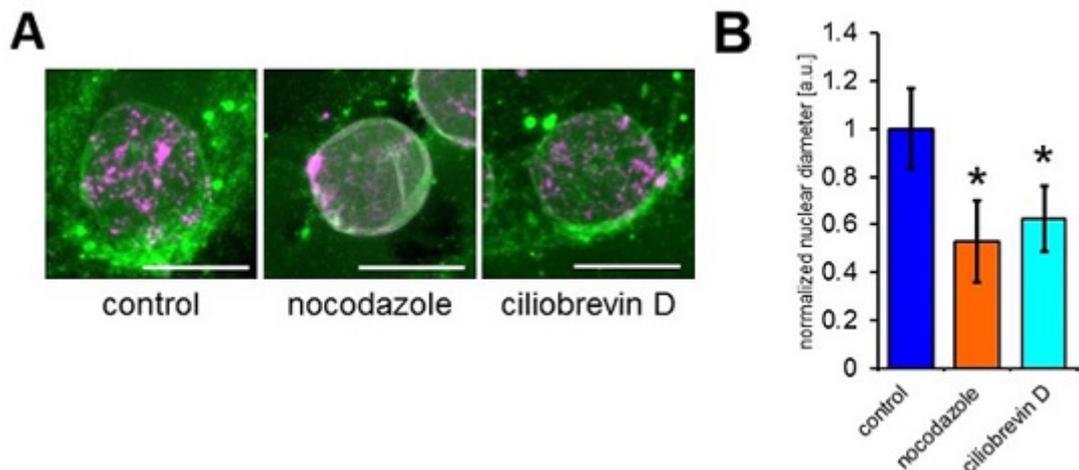


図 3. 改良型 *in vitro* 無細胞再構築系における核サイズの操作

(A) 改良型 *in vitro* 無細胞再構築系において、nocodazole (微小管阻害剤)、ciliobrevin D (ダイニン活性阻害剤)、および DMSO (control) を添加した際の再構築した核の様子。180 分間培養後、核を固定し染色した。マゼンタ：Hoechst33342 で染色した DNA；緑：DiOC6(3)で染色した膜成分。スケールバー：50 μm 。(B) DMSO (control)、nocodazole、ciliobrevin D 存在下で、180 分間培養後に測定した核の直径の平均 (\pm 標準偏差)。control の平均値を 1 として、標準化した値を示した。Asterisk: $P < 0.05$ (スチューデントの t 検定 (両側検定))。

本研究で確立した転写活性を有する異なるサイズの核を調製可能な手法は、核サイズと核内機能である転写制御との因果関係を解析する強力な研究ツールとなりうる。また、核サイズ依存的な転写制御機構の解明に留まらず、*in vitro* 実験系として大量にサンプルを調製可能な実験系であり、一般的な転写制御機構の解析法としての応用されることが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院理学研究科の大隅圭太ならびに岩淵万里である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hara Y, Merten CA. Dynein-based accumulation of membranes regulates nuclear expansion in *Xenopus laevis* egg extracts. *Dev. Cell* 2015;33:562–575. doi: 10.1016/j.devcel.2015.04.016.
- 2) 原 裕貴. ダイニンに依存した核膜成分の集積による細胞核の大きさ制御. *生物物理*. 2016;56(5):275-277. doi: 10.2142/biophys.56.275
- 3) 原 裕貴. ダイニンによる膜の成分の供給が核の大きさの成長する速度を制御する. *ライフサイエンス新着論文レビュー* 2015 doi: 10.7875/first.author.2015.073