

平成 28 年度 博士学位論文

アフリカツメガエル胞胚の核システム  
を支える分子基盤の研究

小田春佳

名古屋大学大学院

理学研究科 生命理学専攻

## 目次

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 要旨                             | 1  |
| 第1章 序論                         | 4  |
| 第2章 材料と方法                      | 10 |
| 第3章 ツメガエル胞胚の核 F-アクチンの役割        | 20 |
| 3-1. 背景                        |    |
| 3-2. 結果                        |    |
| 3-3. 考察                        |    |
| 第4章 核内膜タンパク質 LBR によるクロマチン-核膜結合 | 46 |
| 4-1. 背景                        |    |
| 4-2. 結果                        |    |
| 4-3. 考察                        |    |
| 第5章 総括                         | 74 |
| 第6章 参考文献                       | 77 |
| 謝辞                             | 94 |

## 要旨

動物の受精後まもない胚の細胞（胞胚細胞）は、機能、構造の両面から分化後の体細胞とは異なる特徴を有する。アフリカツメガエル（以下、ツメガエル）胚では、受精後しばらくの間S期とM期からなる短い細胞分裂（約30分に一回）が繰り返され、活発に細胞分裂（卵割）が行なわれる。胞胚期の間、細胞核は未分化な状態を維持しており、胚の遺伝子の転写は抑制されているが、速い細胞周期に対応してクロマチンの複製活性は非常に高い。原腸胚期に入ると、細胞周期が徐々に長くなり、細胞分裂の同調性は失われ、胚の遺伝子の転写が開始されて細胞分化が進行する。このような機能的特質に加え、胞胚細胞の核は、短い細胞周期にダイナミックな構造的調節を受ける特徴がある。胞胚細胞では核形成とともにDNA複製が開始し、核は速やかに大きく成長して約15分でゲノム複製を完了して核膜が崩壊し、分裂期染色体が形成される。このような調節を受ける胞胚細胞の核は、核の構造的分子基盤が原腸胚以降の細胞と大きくことなると考えられる。近年、ツメガエルの未成熟卵の巨大な核（卵核胞）に蓄積するF-アクチンが核の構造維持に寄与することが示され、核骨格としてのF-アクチンの機能が注目されている。しかしながら、通常の体細胞では核にF-アクチンが蓄積する報告はなく、胚発生における核アクチンについても不明である。そこで本研究では、胞胚細胞の核にF-アクチンが蓄積するのかについて検討した。アクチン結合タンパク質（UtrCHおよびLifeAct）にEGFPを付加したmRNAをツメガエル受精卵に顕微注射し、胞胚および原腸胚まで発生させて核を観察したところ、胞胚期の核内にF-アクチンが蓄積することが明らかとなった。さらに、前期・中期・後期胞胚および原腸胚から核を単離し解析した結果、胞胚期の間は、核にF-アクチンが一定の高い密度で存在していることが示された。また、核F-アクチンは核膜直下に特に高密度で存在した（核ラミナアクチン）。核質のF-アクチンは、核ラミナアクチンより密度が低く、核質内にほぼ均一に分布していた（核質アクチン）。一方、原腸胚期に入ると、核F-アクチンはほぼ消失した。このことから、核に高密度のF-アクチンが蓄積することは、胞胚の特有の核構造の特徴であることが明らかになった。続いて、胞胚の核F-アクチンの役割を解析するため、アクチン重合阻害剤を用いずに卵抽出液の調製法を検討し、核およびF-アクチンの同時解析が可能な卵無細胞系（IFE: inhibitor-free extract）を確立した。IFEで形成された核では、胞胚同様にF-アクチンが蓄積し、核ラミナアクチンと核質アクチンも胞胚と同様の分布を示し、IFEでは胞胚の核がより正確に再現されることが示された（胞胚型核）。IFEでアク

チンを脱重合させるとクロマチンが核膜から乖離し、胞胚から単離した核も IFE で形成された核と同様に両者が乖離した。このことから、胞胚型核ではクロマチン-核膜結合は F-アクチンに依存して行われることが示された。また、卵無細胞系で形成させた核を用いる実験により、核 F-アクチンは核の物理的強度を向上させることが判明した。さらに、卵無細胞系で形成された核を分裂期に移行させる手法により、分裂期紡錘体を形成させたところ、分裂期の細胞質 F-アクチンのみならず、核 F-アクチンもまた、分裂中期における染色体の紡錘体赤道面への整列を促進することが示された。以上により、核 F-アクチンはクロマチン-核膜結合を促進し、核の構造を支え、分裂期の染色体整列の促進に関わるなど、胞胚の核構造と機能に重要な役割を果たすことが明らかになった。

興味深いことに、原腸胚期には核 F-アクチンがほぼ消失することが判明したが、クロマチンは核膜から乖離しない。このことから、原腸胚期以降の核では F-アクチン以外の因子によってクロマチン-核膜結合が維持されると予想された。そこで次に、F-アクチンが消失した核のクロマチン-核膜結合の維持に関わる分子を探索した。ツメガエルの胞胚細胞では、核内膜の主要な構成分子である核内膜タンパク質の組成が、分化後の体細胞と大きく異なり、分化後の体細胞に発現する核内膜タンパク質の発現レベルが低いことがこれまでに明らかとなっている。そこで、各々の核内膜タンパク質を、アクチン重合を阻害した卵抽出液 (ICE: inhibitor-containing extract) に発現させ、クロマチン-核膜結合への影響を検討した。その結果、核内膜タンパク質の一つである LBR (lamin B receptor) が、クロマチン-核膜結合の維持に働くことが明らかとなった。クロマチン-核膜結合には、LBR の核質側内部配列 (N1、N2、N3) のうち N2 と N3 が関与すること、これら配列にヒストンおよび HP1 (heterochromatin protein 1) が結合することを明らかにした。胞胚細胞のクロマチン-核膜結合に LBR が用いられない生理的意味を探るため、LBR の全長 (WT) と、クロマチン核膜結合を維持しない変異体 ( $\Delta$ N2-3) を卵抽出液に発現させ、胞胚型の核膜構造に及ぼす影響を調べた。その結果、胞胚型の核膜上で LBR はクロマチンの近傍に凝集し、初期胚型ラミン L3 で形成される核ラミナ構造に乱れを生じさせることが判明した。このことから、胞胚では F-アクチンによってクロマチンと核膜の結合が維持されることが胞胚の核の機能に重要であることが示唆された。

本研究により、ツメガエル胞胚における核 F-アクチンの存在が初めて明らかにされた。さらに、胞胚では核 F-アクチン依存的にクロマチン-核膜結合が維持されることが

示された。また、原腸胚以降は **LBR** によってクロマチンが核膜に結合すること、胚発生過程でクロマチン-核膜結合の分子機構が転換することが示唆された。遺伝子発現制御などの重要な“場”の構築のために重要な、クロマチン-核膜結合機構が転換することは、胞胚と原腸胚以降で大きく異なる転写状態の制御にも関与する可能性が考えられ、ツメガエルのみならず多くの動物の胚発生で重要な転換点である、転写活性化の分子メカニズム解明の糸口になると期待される。

## 第 1 章 序論

### 1-1. 胚発生における胞胚期の細胞の特質

多くの動物において、受精直後の胚発生の初期は、同調的で比較的短い細胞周期を繰り返して（卵割）、細胞数を増やしていく。培養細胞などとは異なり、卵割期の細胞は分裂後に成長せず、胚の大きさを変えることなく細胞数を増やすことに特化している。この時期の胚を胞胚と呼び、多くの種では胞胚期には胚の遺伝子の転写は抑制されていて、未分化性が高く、細胞の運命決定はまだなされておらず、胞胚期ののちに、細胞の運動によって原腸陥入が起こり、胚は外胚葉・中胚葉・内胚葉の三層構造に分かれ、それぞれの細胞運命に従って、細胞分化が開始する。

ツメガエルの胚は、受精からしばらくの間、約 30 分に一回という素早い速度で、同調した卵割を 12 回繰り返す (Newport and Kirschner, 1982)。この間、細胞周期は S 期 (Synthesis phase) と M 期 (Mitotic phase) から構成されており、Gap 期は存在しない。核内では早い細胞周期に対応して、クロマチンの複製活性が非常に高いが (Mahbubani et al., 1992)、細胞周期チェックポイント機構は働いていない (Newport and Dasso, 1989; Clute and Masui, 1997)。さらに、中期胞胚までの細胞では、分化全能性が維持されており (Gurdon, 1960)、胚の遺伝子の転写が強く抑制されている (Newport and Kirschner, 1982)。初めの 12 回の分裂で細胞数がおおよそ 4,000 に達すると (中期胞胚、stage: st. 8.5; Nieuwkoop and Faber, 1967)、Gap 期の出現によって細胞周期が徐々に長くなり、細胞周期の同調性は失われ、それまで抑制されていた胚の遺伝子の転写が開始する。胚発生における、細胞の性質の大きな転換を中期胞胚遷移 (MBT: Mid-Blastula Transition) と呼ぶ。原腸胚期に進行すると、胚の遺伝子の転写が本格的に活性化され、細胞分化が開始する (Newport and Kirschner, 1982)。以上のように、ツメガエルの初期胚発生過程において、未分化性を維持したまま、速い細胞周期を繰り返す胞胚までの細胞の核（胞胚型核）と、Gap 期が出現し細胞分化が進行する原腸胚以降の細胞の核では、機能的性質が大きく異なるといえる (図 1-1)。

### 1-2. 胞胚型核を試験管内で再構築できるツメガエル卵無細胞系

Lohka と Masui は、賦活したカエルの卵から得られた細胞質画分（卵抽出液）に膜透過処理した精子クロマチンを加えると、DNA 複製が行われるとともに核が形成され、最終的には核膜崩壊と分裂期染色体が形成されることを明らかにした (Lohka and Masui, 1983)。その後、ツメガエルでも同様の卵抽出液を用いて、DNA 複製などの細

胞質イベントが再現されることが報告された (Blow and Laskey, 1986)。これらの卵抽出液では、卵割期の胚の特徴である短い S 期とそれに続く分裂期が繰り返される (Murray and Kirshner, 1989)。さらに、ツメガエルの未受精卵を賦活せず、カルシウムイオンのキレート剤である EGTA の存在下で遠心することで、減数第二分裂中期に停止した卵抽出液; CSF (cytostatic factor) -extract が確立された (Lohka and Maller, 1985; Murray, 1991)。CSF-extract は減数第二分裂中期で停止した状態にあるが、カルシウムイオンを加えることで賦活され、サイクリン B が分解されて細胞周期が間期に移行する (Murray and Kirshner, 1989; Murray et al., 1989; 図 1-2)。また、CSF-extract 中で核を形成させたのち、再び分裂期に移行させると、完全な紡錘体が形成される (Sawin and Mitchison, 1991) これらの卵無細胞系は、胞胚までの核の特徴である高い複製活性を持つ核や、その後に形成される分裂期染色体や紡錘体を、同調的に大量に試験管内で形成できるという利点があり、様々な細胞周期イベントの分子メカニズムの解析に寄与してきた。

### 1-3. 胞胚型核におけるクロマチンと核膜の結合性

卵抽出液中には、核の構成要素が豊富に存在するうえ、細胞膜による空間的制約がないために、細胞周期を間期にとどめて核をインキュベートすると、インキュベート時間に従って核が大きく成長する (図 1-3)。CSF-extract を用いて核を形成させたのち、タンパク質合成阻害剤の添加により、サイクリン B の再合成を阻害して、細胞周期を間期にとどめ、核を十分に大きく成長させると、クロマチンが核膜から乖離しやすいことが経験的に知られていた。卵無細胞系で核を大きく成長させると、クロマチンの大部分が核膜から乖離し、核膜から乖離したクロマチンは、核内で凝集する (図 1-3、図 1-5)。しかしながら、実際の胞胚の核について、DNA を染色して観察しても、クロマチンは核膜から乖離していない (図 1-4)。すなわち、卵抽出液中で形成した核は、胞胚の核に比べてクロマチンが核膜から乖離しやすいといえる。前述のとおり、ツメガエル卵無細胞系で形成した核は、胞胚期の細胞の核と同様の構造および機能を持つとされているにもかかわらず、胞胚の核のクロマチンと核膜の結合状態 (クロマチン-核膜結合状態) を再現していない。この原因として、我々はツメガエル卵抽出液の調製過程に着目した。従来、卵抽出液の調製には、細胞質と脂質、卵黄の分離を良くするため、アクチン重合阻害剤を添加するのが一般的であった (Lohka and Masui, 1983; Ohsumi *et al.* 2006)。これら卵抽出液で見られるクロマチンが核膜から乖離する現象は、アクチンの重合が核

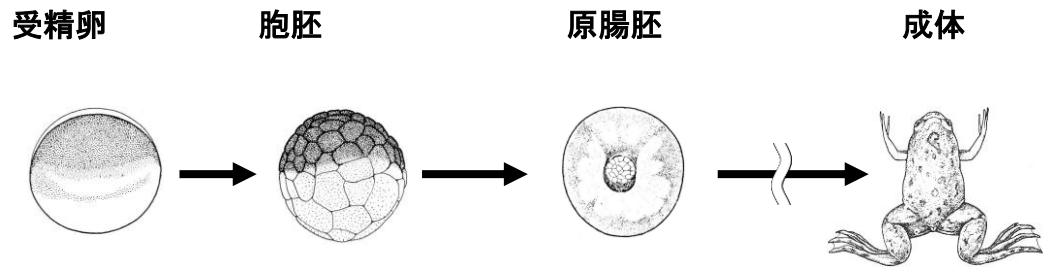
内のクロマチン-核膜結合に関与することを示唆した。しかしながら、核形成と F-アクチンの動態を同時に解析可能な卵無細胞系の調製法はこれまでに報告されておらず、それらの関係については明らかではない。また、胞胚細胞における核内アクチンの構造についても明らかではない。

#### 1-4. クロマチン-核膜結合の重要性

一般的な体細胞や培養細胞では、核膜は必ずクロマチン上に形成され、クロマチンと核膜が乖離する減少は見られない。白血球などの分葉化した核や、細胞が狭い間隙を通過して移動する際に核が大きく変形するときにも、クロマチンが核膜から乖離するという報告はない (Fried et al., 2010)。これらのことから、間期の核においてクロマチンは常に核膜に結合していると考えられる。近年、クロマチンと核膜が接する領域である核内膜層では、ラミンや核内膜タンパク質がクロマチンと相互作用し、転写やクロマチン複製の調節に関わることが明らかにされており (Lee et al., 2001; Kumaran et al., 2002; Spann et al., 2002; Johnson et al., 2004; Shumaker et al., 2008)、クロマチンと核膜が結合することは、真核細胞に共通の重要な核構造の一つであると考えられる。しかしながら、これまでにクロマチンと核膜の結合についての解析はほとんど行われておらず、クロマチンと核膜の結合性を維持する機構については未だ不明な点が多い。



アフリカツメガエル *Xenopus laevis*



|         |     |       |
|---------|-----|-------|
| 未分化性    | +++ | ±     |
| 細胞周期    | 30分 | 約24時間 |
| 転写      | —   | ++    |
| クロマチン複製 | +++ | ++    |

図 1-1 胚発生の進行に伴う核の機能的特質の変化

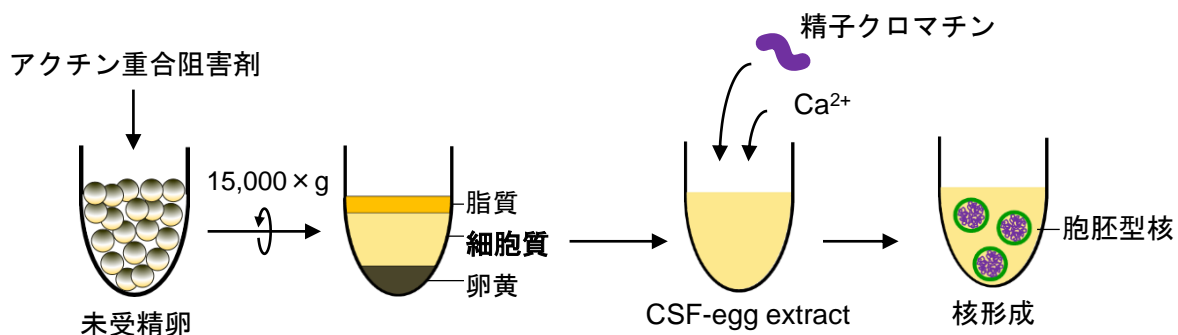


図 1-2 ツメガエル卵無細胞系

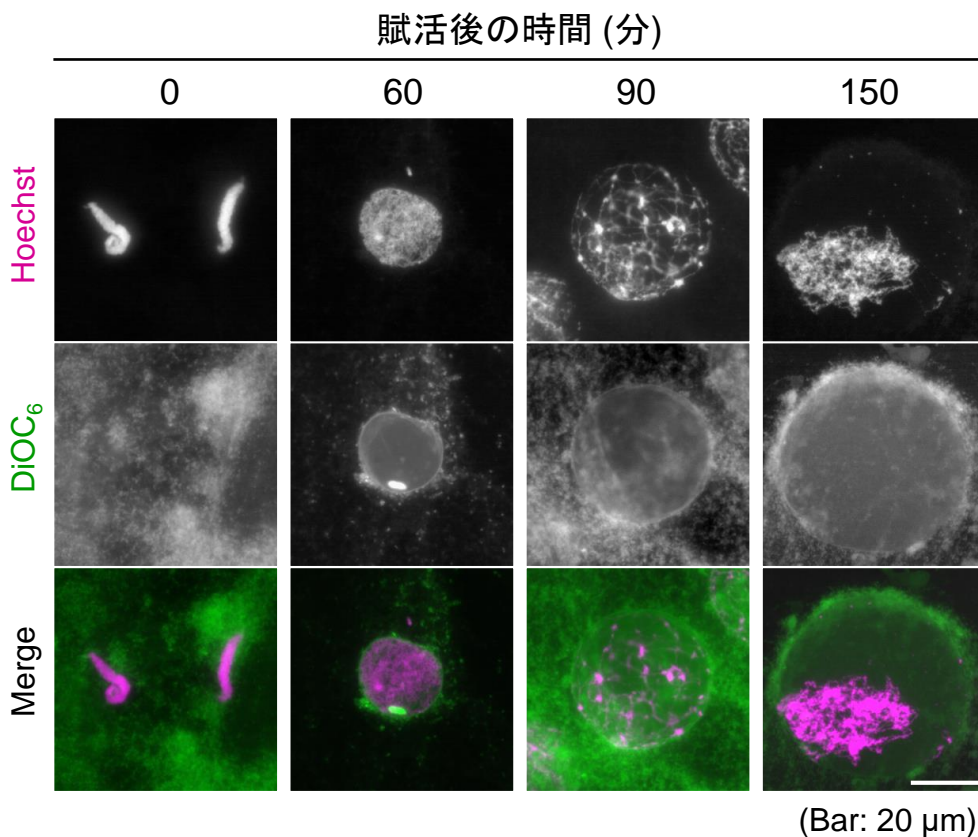
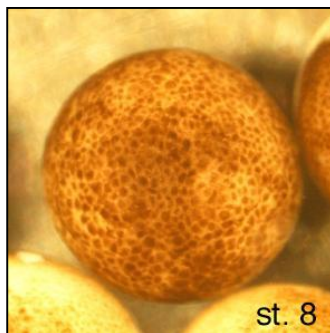


図 1-3 卵無細胞系で形成された核

分裂期の卵抽出液に精子クロマチンを加えたのちCaCl<sub>2</sub>によって賦活して細胞周期を間期に移行させ、核を形成させた。賦活後、0、60、90、150分で卵抽出液を採取し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で染色した。Scale bar: 20 μm

中期胞胚



Hoechst

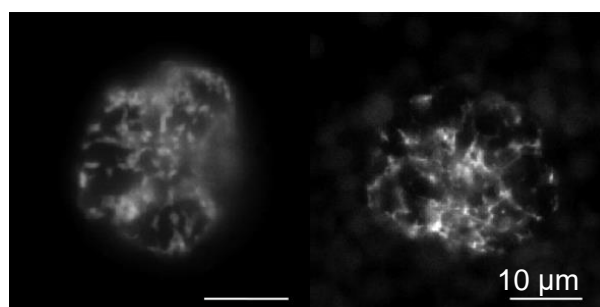


図 1-4 ツメガエル胞胚 (上)から単離した核のDNA染色 (下)

Hoechst / DiOC<sub>6</sub>

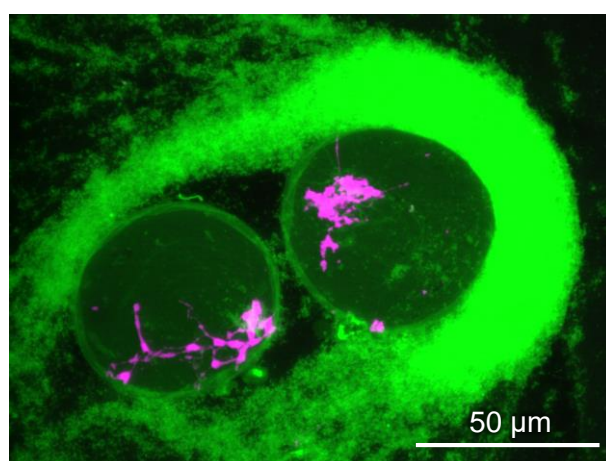


図 1-5 卵無細胞系で形成された核のDNA染色 (マゼンタ)

## 第2章 材料と方法

### 2-1. カエルの飼育・産卵

購入したアフリカツメガエル（城北教材）は、週2回の給餌を行い、22°Cで飼育した。産卵誘起の3~7日前に、50 IUの血清性性腺刺激ホルモン（セロトロピン、あすかアニマルヘルス）を、産卵前日に500 IUのヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（ゴナトロピン、富士製薬）をメスのアフリカツメガエルに投与し、16~22°Cの0.6%食塩水中で産卵させた。ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン投与後約15時間で、未受精卵を回収した。

### 2-2. 人工媒精と胚への顕微注射

ツメガエル未受精卵を22°Cの10%MMR（100 mM NaCl<sub>2</sub>、2 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA、5 mM HEPES-NaOH、pH 7.5）中で人工媒精した。媒精後45~50分で、胚を1.25%チオグリコール酸ナトリウム（pH 8.3）で4分30秒処理し（22°C）、ゼリー層を除去したのち、10%MMRで胚を洗浄した。mRNAの顕微注射は、1細胞期の際に、3%Ficol（SIGMA）を含む10%MMR中で行った。顕微注射後の胚は、3%Ficol/10%MMR中で目的のステージまで16~20°Cで発生させた。ツメガエルの胚発生ステージはNieuwkoopとFaber（1967）に基づいて判断した。

### 2-3. mRNA

アクチンレポーターとして、ヒトUtrophinのcalponin homology domain 261アミノ酸（UtrCH、Burkel et al., 2007）、および酵母Abp140由来17アミノ酸配列LifeAct（LA、Riedl et al., 2008）をEGFPと各々融合させた（EGFP-UtrCH、LA-2EGFP）。クロマチンのレポーターとしてツメガエルヒストンH2BをmTagBFPと融合させた（H2B-mTagBFP）。これらのmRNAをmMESSAGE mMACHINE T3 kit®（Ambion）を用いて、*in vitro*で合成した。合成したmRNAはNuclease-free water（Ambion）に溶解し、ツメガエル胚への顕微注射に用いた。

卵抽出液で外来性核内膜タンパク質を発現させる際は、卵抽出液での翻訳産物量が各々同等となるよう、それぞれのmRNAの終濃度をLBR WT-Flag（9 ng/μl）、Flag-nurim（15 ng/μl）、Flag-MAN1（9 ng/μl）、LAP2β-Flag（11.3 ng/μl）、Flag-emerin（4.5 ng/μl）、LBRΔN1-Flag（7.2 ng/μl）、LBRΔN2-Flag（7.2 ng/μl）、LBRΔN3-Flag（7.5 ng/μl）、LBRΔN2-3-Flag（6 ng/μl）、LBRΔC-Flag（1.3 ng/μl）、LBRΔ2-36-Flag（5.7 ng/μl）、LBR W20A-Flag（11.3 ng/μl）、LBRΔ37-64-Flag（5.63 ng/μl）とし、卵抽

出液の 5%体積を添加した。

#### 2-4. 胚からの核の単離

ツメガエル胚を目的の発生ステージまで発生させ[前期胞胚 (st. 7)、中期胞胚 (st 8)、後期胞胚 (st. 9)、前期原腸胚 (st. 10)、中期原腸胚 (st. 11)], それらより核を単離した。目的のステージに達する約30分前に、胚をシクロヘキシミド (50 µg/ml)を含む10% MMRに移し、22°Cで30分間インキュベートして細胞周期を間期に停止させた。その後、4°Cに冷却した250 mM スクロースを含むEB (100 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM HEPES-KOH、pH 7.5; Ohsumi et al., 2006) で胚を洗浄してから、胚15個と250 mM スクロース/EBを合計体積が60 µlになるように1.5 mlチューブに移した。氷上で、広径チップ (QSP、118-N-Q) をチューブの底に押し付けて軽く胚を破碎した後、さらにピペティングを行って胚細胞を破碎した。胚細胞を十分に破碎し、かつ核を壊さないよう、胚発生ステージ毎にピペティング回数を以下のように調節した。前期胞胚は1-3回、中期胞胚は5-10回、後期胞胚は15回、前期原腸胚と中期原腸胚は20回のピペティングを行って胚を破碎し、これらを胚破碎液とした。

#### 2-5. 胚から単離した核の蛍光染色

上記の胚破碎液を、直ちに4% パラホルムアルデヒドを含むPBS (136.9 mM NaCl、2.7 mM KCl、10.14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4) で2倍希釈し、22°Cで5分以上静置して固定した。これを等体積の核 F-アクチン蛍光染色液 [5 µg/ml Hoechst 33342、20 µg/ml 3,3-dihexylocarbocyanin iodide (DiOC<sub>6</sub>、Kodak)、50 units/ml DY-590-Phalloidin (Dyomics)、30% glycerol、10% ホルマリン/EB] と混合し、全視野蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i、Nikon) で観察し、CCD カメラ (Nikon DS-2MBWc) を用いて撮影した。F-アクチンの定量の際は、各発生ステージで20個ずつ核の写真を撮影し、得られた画像より核内のDY-590-Phalloidinの蛍光強度と核の面積をNIS-Elements BR 4.13.01 (Nikon) ソフトウェアを用いて測定し、それらの値を元に核のF-アクチン密度を算出した。

#### 2-6. 胚から単離した核の共焦点顕微鏡観察

各々のステージの胚破碎液を、直ちに4% パラホルムアルデヒド/PBS で2倍希釈した。前期胞胚 (st. 7) の胚破碎液は室温で12時間以上静置して、卵黄層、核と細胞質

を含む層、脂質層に分離させ、核と細胞質を含む画分を回収した。中期胞胚以降の胚破砕液は、固定液で希釈して室温で5分静置したのち、1.5 ml チューブ中で1.3 M スクロース/EB (100  $\mu$ l)の上に重層して遠心 (2,000 $\times$ g、3分、4 $^{\circ}$ C) し、卵黄と脂質以外の中間層を全て回収した。

このようにして得た核と細胞質を含む画分に対し、330  $\mu$ l の4% パラホルムアルデヒド/PBS を加え、12時間以上静置し固定した。そこに Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/ml)、DY-590-Phalloidin ( $4.0 \times 10^{-4}$  units/ $\mu$ l)、DiOC<sub>6</sub> (10  $\mu$ g/ml) を加え、室温で10分静置し、核を染色した。1.5 ml チューブを用いて2 M スクロース/EB (50  $\mu$ l) と30% スクロース/EB (250  $\mu$ l) によるスクロース不連続密度勾配を作製し、その上に染色したサンプルを重層した後、遠心 (500 $\times$ g、10分、22 $^{\circ}$ C) した。その後、2 M スクロース/EB 直上の20  $\mu$ l を、シングルウェルガラスベースディッシュ (IWAKI, 3971-101) に満たしたミネラルオイル中に移し、共焦点蛍光顕微鏡 (FV10i、OLYMPUS) で観察した。

## 2-7. 精子クロマチンの調製

精子クロマチンは Ohsumi et al. (2006)の方法に従って調製した。雄のツメガエルから摘出した精巣を MMR (100 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM KCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA、5 mM HEPES-NaOH、pH 7.5) 中でホモゲナイズし、精子粗懸濁液を得た。遠心 (1,500 $\times$ g、5分、4 $^{\circ}$ C) によって組織片や血球細胞を沈殿させ、上清を回収した。さらに、遠心 (1,500 $\times$ g、5分、4 $^{\circ}$ C) によって精子を沈殿させて、SMH (250 mM スクロース、5 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM HEPES-KOH、pH 7.5) に懸濁した。得られた精子核を0.05% lysolecithin を含む SMH 中でインキュベートし、原形質膜および核膜を透過性にした。3% BSA/SMH を添加して反応を停止させ、0.4% BSA/SMH で3回洗浄した後、 $1.0 \times 10^8$  個/ml の濃度になるように SMH に懸濁し、分注して液体窒素で凍らせた後-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

## 2-8. 卵抽出液の調製

### (1) IFE : Inhibitor-Free Extract の調製

ツメガエル未受精卵を2.5% thioglycolic acid-NaOH (pH8.2) 処理してゼリー層を除去した。その後 M-EB (100 mM KCl、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM EGTA、20 mM HEPES-KOH、pH 7.5; Yamamoto et al., 2005) で十分に洗浄し、M-EB を満たした遠心チューブに移した (ここまで22 $^{\circ}$ C)。軽い遠心 (3,000 $\times$ g、5秒、4 $^{\circ}$ C) によ

って卵をパックし、余分な M-EB を除去した後、遠心 (15,000×g、10 分、4°C) により卵を破碎し、卵黄を含む沈殿と上部の脂質層の間の細胞質画分を回収した。細胞質画分に 1/50 体積の energy mix (500 mM creatine phosphate、50 mM ATP、50 mM MgCl<sub>2</sub>) を加え、再び遠心 (15,000×g、10 分、4°C) した後に、分離した脂質と卵黄以外の、細胞質画分と色素顆粒層を回収し、ピペッティングにより均一になるまで攪拌したものを、分裂期卵抽出液 (IFE) として用いた。また、IFE にアクチン重合を阻害剤、cytochalasin B (0.1、0.7、1、10、50 µg/ml) または Latrunculin A (0.1、0.3、0.5、1、10 µM) を添加する実験においては、コントロールとしてアクチン重合阻害剤の溶媒 (DMSO) を用いた。

## (2) ICE: Inhibitor-Containing Extract の調製

ICE の調製には、Yamamoto et al., (2005) の方法を用いた。2.5% thioglycolic acid-NaOH (pH8.2) 処理によってゼリー層を除去した未受精卵を M-EB で十分に洗浄した後、cytochalasin B (50 µg/ml) を含む M-EB を満たした遠心チューブに移した。軽い遠心 (3,000×g、5 秒、4°C) によって卵をパックし、余分な M-EB を除去した後、遠心 (15,000×g、10 分、4°C) により卵を破碎し、卵黄を含む沈殿と上部の脂質層の間の細胞質画分を回収した。細胞質画分に 1/50 体積の energy mix を加え、再び遠心 (15,000×g、10 分、4°C) し、得られた細胞質画分を分裂期 ICE とした。

## 2-9. 卵抽出液を用いた核形成

2-8 で調製した分裂期の卵抽出液に精子クロマチン (750 個/µl) を加えたのち、終濃度 0.6 mM の CaCl<sub>2</sub> を加えて賦活し間期に移行させ、核を形成させた。核を成長させて観察する場合は、賦活後 60 分の卵抽出液にタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (100 µg/ml) を加え細胞周期を間期に停止させ、さらに 22°C でインキュベートした。卵抽出液を一部採取し、等体積の蛍光染色 [ 5 µg/ml Hoechst 33342、20 µg/ml DiOC<sub>6</sub>、30% glycerol、10% ホルマリン、EB ] と混合して蛍光顕微鏡で観察し、クロマチンおよび核膜の形態から卵抽出液の細胞周期を判断した。

核アクチンを観察する際には、卵抽出液に EGFP-UtrCH タンパク質 (50 µg/ml) を添加し、卵抽出液を一部採取して EGFP-UtrCH の核への蓄積を蛍光顕微鏡で観察した。または、以下に述べる手法で、固定した核を蛍光標識 Phalloidin で染色して核 F-アクチンを検出した。

## 2-10. 核の免疫蛍光染色

胚の核の免疫蛍光染色は次に述べる方法で行った。2-4 で得た胚破碎液に、直ちに 4% パラホルムアルデヒド/PBS を加え、22°C で 5 分静置したサンプルを、1.5 ml チューブ中で 1.3 M スクロース/EB (100  $\mu$ l) の上に重層し、遠心 (2,000 $\times$ g、3 分、4°C) した。卵黄と脂質以外の中間層を全て回収し、1 ml の 4 % パラホルムアルデヒド/PBS を加え、5 分室温で静置した。これを 1 ml の 30 % スクロース/EB の上に重層し、遠心 (1,000  $\times$ g、5 分、22°C) して、poly-L-Lysine 処理したカバーガラス上に核を回収した。回収後、カバーガラスを 4 % パラホルムアルデヒド/PBS に浸け、22°C で 26~29 時間静置し固定した後、PBS で洗浄した。

卵抽出液で形成した核の免疫蛍光染色は、Iwabuchi et al. (2002) の方法を改変して行った。卵抽出液 20  $\mu$ l を採取し、500  $\mu$ l の 250 mM スクロース/EB を加え、1~2 回ピペティングして混合した。その後、直ちに等体積の 10% ホルマリン/EB を加えて素早く転倒混和し、22°C で 5 分間インキュベートして固定した。これを 1 ml の 30% スクロース/EB の上に重層し、遠心 (22°C、10 分) して poly-L-Lysine 処理したカバーガラス上に回収した。遠心条件は、賦活後の時間によって異なり、核形成開始から賦活後 30 分では 1,500 $\times$ g、45 分では 1,200 $\times$ g、60 分では 700 $\times$ g、90 分では 1,200 $\times$ g、120 分では 2,000 $\times$ g とした。カバーガラス上に回収した核を、0.1% Triton X-100/PBS 中で膜透過処理 (22°C、1 分) した後、PBS で 3 回洗浄し、2% BSA/PBS でブロッキングした (37°C、30 分)。その後、一次抗体 [抗アクチン抗体 (SIGMA、A2103): 1/400 希釈; 抗ラミン L3 抗体 (Hasebe et al., 2011): 1/2,000 希釈; 抗 Flag 抗体 (SIGMA、M2): 1/500 希釈; 抗 LAP2 の抗体 (当研究室): 1/2,000 希釈] と反応させ (37°C、1 時間)、PBS で 3 回洗浄した。続いて二次抗体 [anti-rabbit IgG -Alexa488 (Invitrogen): 1/1,000 希釈; anti-mouse IgG -Alexa488 (Invitrogen): 1/1,000 希釈; anti-rabbit IgG -Alexa568 (Invitrogen): 1/1,000 希釈] と反応させた (37°C、1 時間)。反応後のカバーガラスを PBS で 1 回洗浄した後に、Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/ml) を含む PBS で染色 (22°C、10 分、遮光) し、再度 PBS で洗浄した。最後にカバーガラスを H<sub>2</sub>O で洗浄した後、SlowFade® Gold (Thermo Fisher Scientific) を用いてスライドガラス上にマウントし、蛍光顕微鏡を用いて観察した。抗体の希釈には、Can Get Signal® (TOYOBO) を用いた。



## 2-11. DNA複製

分裂期のIFEにDMSOまたは50 µg/ml cytochalasin Bを添加し、DY-590-dUTP (2.5 µM、Dyomics) と精子クロマチン (750 個/µl) を加えたのち、終濃度 0.6 mM の CaCl<sub>2</sub> を加えて賦活して核を形成させた。これらを賦活後 120 分までインキュベートしたのち、各々に 1/2 体積の分裂期のIFE (DMSO または 10 µM Latrunculin A を添加) を加え、22°Cでインキュベートし、分裂期染色体を形成させた。各々の卵抽出液を等量のDNA染色液 (10%ホルマリン、5 µg/ml Hoechst 33342、EB) と混合し、全視野蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i、Nikon) で観察し、CCDカメラ (Nikon DS-2MBWc) を用いて撮影した。

## 2-12. 紡錘体形成

分裂期のIFEにDMSO または 10 µM Latrunculin A を添加したのち、2-9と同様にして核を形成させた。シクロヘキシミド (100 µg/ml) 存在下で120分間インキュベートし、核を大きく成長させたのち、卵抽出液を250 mM スクロース/EBで40倍に希釈した。これを400 µlの30% スクロース/EBに重層して遠心 (4°C、2,000×g、3分) し、核を1.5 ml チューブの底に回収した。上清を除去したのち、核を4°Cの250 mM スクロース/EBで2回洗浄した。この核に、蛍光チューブリン (HiLyte Fluor™ 488-Tubulin、Cytoskeleton、0.08 µg/µl) を含む22°Cの分裂期IFE (DMSO または 10 µM Latrunculin A を添加) を加えて核をよく懸濁し、分裂期紡錘体を形成させた (22°C、90分)。この卵抽出液を一部採取し、当体積の固定染色液 (10%ホルマリン、5 µg/ml Hoechst 33342、200 unites/µl DY-590-Phalloidin、50% SlowFade® Gold、EB) と混合して全視野蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i、Nikon) で観察し、CCDカメラ (Nikon DS-2MBWc) を用いて撮影した。

## 2-13. 胚から単離した核の卵抽出液でのインキュベート

ツメガエル卵を人工媒精し、胚を前期胞胚 (st. 7) または中期原腸胚 (st. 11) まで発生させた。各々の発生ステージに達する45分前に、胚を50 µg/ml シクロヘキシミドを含む10% MMR 中に移し、22°Cで45分間インキュベートして、細胞周期を間期に停止させた。胚を氷冷した250 mM スクロース/EBで洗浄したのち、前期胞胚30個を120 µlの250 mM スクロース/EB中に、中期原腸胚25個を100 µlの250 mM スクロース/EB中にそれぞれ移した (4°C)。前期胞胚は、広径チップを用いて胚を破碎した

のちさらに2回ピペッティングを行い、胚破碎液を調製した。中期原腸胚は、P200チップを用いて35回ピペッティングして胚破碎液を調製した(4°C)。前期胞胚および中期原腸胚から得た胚破碎液を、4°Cの1.3M スクロース/EB 100 µl に重層したのち、遠心(4°C、2,000×g、3分、スウィングローター使用)した。スクロース層上に回収された核画分(10 µl)を採取し、22°Cの間期IFE中に添加して、120分間インキュベートした。これらの核について、2-10の方法で免疫染色を行った。また、クロマチン-核膜結合の解析には2-15と同様の方法を用いた。

#### 2-14. ツメガエル胚からのウェスタンサンプルの調製

2-4で得た胚破碎液を、1.5 ml チューブ中で1.3 M スクロース/EB (50 µl) の上に重層し、遠心(2,000×g、3分、4°C)した。1.3 M スクロース/EB 層直上の、核と細胞質を含む画分85 µlを回収し、均一になるようピペッティングした。これに等量のSDS サンプルバッファー(終濃度: 10% glycerol、2% SDS、5% 2-mercaptoethanol、0.01% bromophenol blue、62.5 mM Tris-HCl、pH 8.0)を加え、熱処理(95°C、5分)し、ウェスタンブロッティングに用いた。

#### 2-15. クロマチン-核膜結合の解析

分裂期ICEに外来性核内膜タンパク質のmRNAを添加して翻訳させたのち、精子クロマチンを加え、CaCl<sub>2</sub> (0.6 mM)を加えて賦活し、核を形成させた(22°C)。賦活後60分でシンクロヘキシミド(100 µg/ml)を加え細胞周期を間期に停止させた。賦活後180分までインキュベートし核が十分に成長したところで、卵抽出液1 µlを、等量の蛍光染色液と混合した後にカバーガラスを被せ、全視野蛍光顕微鏡(ECLIPSE 80i, Nikon)で観察し、CCDカメラ(Nikon DS-2MBWc)を用いて撮影した。クロマチン-核膜結合状態は、目視により、whole-attachment(クロマチンが核膜全体に結合している)、partial-attachment(クロマチンは核膜の一部にのみ結合している)、dissociation(クロマチンは完全に核膜から乖離し、核内で凝集している)の3種類に分類した。

#### 2-16. リコンビナントタンパク質の調製

LBRのN1-3(1-218 aa)のC末端側にGSTを付加したcDNA配列をプラスミドベクターpET30b(Novagen)に導入した(pET30b/LBR N1-3-GST)。pET30b/LBR N1-3-GSTを基に、下記のプライマーセットを用いて、LBRのN1、N2、N3ドメイン

の C 末端側に GST を付加した配列を持つプラスミドベクターを、PfuUltra II Fusion Hs DNA polymerase を用いた PCR によって増幅した。得られた配列をライゲーションし、pET30b / LBR N1-GST、pET30b / LBR N2-GST、pET30b / LBR N3-GST を得た。pET30b / LBR N1-3-GST、pET30b / LBR N1-GST、pET30b / LBR N2-GST、pET30b / LBR N3-GST をそれぞれ大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、カナマイシン 50 µg/ml を含む 2×YTG 培地 (1% Yeast Extract、1.6% Bacto Trypton、0.5% NaCl、20 mM グルコース) で振盪培養した (180 rpm、37°C、4 時間)。培養液を一部取り、2×YT 培地 (1% Yeast Extract、1.6% Bacto Trypton、0.5% NaCl) で振盪培養 (180 rpm、18°C、4 時間) したのち、IPTG (1 mM) を添加してさらに培養し (180 rpm、18°C、16 時間)、リコンビナントタンパク質を発現させた。大腸菌を回収したのち、プロテアーゼインヒビター (ナカライテスク) を含む PBS 中で超音波破碎をおこない、得られた可溶性画分を、各リコンビナントタンパク質を含むライセートとした。ライセートを、グルタチオンセファロース 4B ビーズ (GE Healthcare) と反応させ、それぞれのリコンビナントタンパク質が同程度ずつ結合したことを確認し、GST プルダウン実験に用いた。N2-GST ライセートのヌクレアーゼ処理の際は、2-15 で得られた、N2-GST のライセートに対し、TURBO Nuclease (Accelagen) を 10 units/µl となるよう混和し、室温で 30 分間インキュベートしたものを、ビーズと反応させた。

#### プライマーセット

##### pET30b / LBR N1-GST

5' プライマー (5'-CTGGCATTGGAGCAATCGGTTGC-3')

3' プライマー (5'-AGGTCGTCCTGGAGAAGCTTGACGC-3')

##### pET30b / LBR N2-GST (2 回の PCR を行った)

1 回目

5' プライマー (5'-CTGGCATTGGAGCAATCGGTTGC-3')

3' プライマー (5'-AGGTCGTCCTGGAGAAGCTTGACGC-3')

2 回目

5' プライマー (5'-AACCGGAAAAGATCCTCCTCTCCCT-3')

3' プライマー (5'-CATAGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC-3')

##### pET30b / LBR N3-GST

5' プライマー (5'-GCAAAGAATGGACATCAGTCATCTC-3')

3' プライマー (5'-CATAGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC-3')

## 2-17. GST プルダウン実験

2-15 で調製したリコンビナントタンパク質結合ビーズに対し、間期 ICE を 1:2 の体積比となるように加え、氷上で 1 時間反応させた。反応中は 10 分ごとにタッピングを行い、ビーズと卵抽出液を混和した。反応後のビーズを、10 倍体積の 0.5% Triton X-100 / EB (4°C) で 5 回洗浄したのち、ビーズと等体積の SDS サンプルバッファーに混和し、熱処理 (95°C、5 分) して、ウエスタンブロットィングに用いた。

## 2-18. 核膜単離

分裂期 ICE に LBR-Flag およびその変異体の mRNA を 5% 体積添加して翻訳させた。それらに精子クロマチン (750 個/ $\mu$ l) を加え、終濃度 0.6 mM の  $\text{CaCl}_2$  を加えて賦活して核を形成させた (22°C)。賦活後 60 分でシクロヘキシミド (100  $\mu$ g/ml) 加え細胞周期を間期に停止させ、さらに 22°C でインキュベートした。賦活後 180 分で、50 倍体積の 4% パラホルムアルデヒド / PBS に卵抽出液を懸濁し、室温で 5 分静置して固定した。これを 1 ml の 30% スクロース / EB の上に重層し、遠心 (22°C、2430 $\times$ g、10 分) して poly-L-Lysine 処理したカバーガラス上に回収し、2-10 の方法で免疫染色を行った。

## 2-19. ウエスタン解析

卵抽出液をウエスタン解析に用いる際は、SDS サンプルバッファーで 10 倍希釈したものを熱処理 (95°C、5 分) して用いた。SDS-PAGE サンプルを 10%~15% の分離ゲル、4.5% の濃縮ゲル、泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS) を用いて分離した。電気泳動後のアクリルアミドゲルを blotting buffer (100 mM Tris、192 mM glycine、0.05% SDS、20% methanol) で平衡化したのち、タンパク質を PVDF メンブレン (MILLIPORE) に 1.5 mA/cm<sup>2</sup> の定電流で 90 分間転写した。メンブレンを TBST (0.1% Tween20、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl) で洗った後、10% skim milk を含む TBST 中で、30 分間室温でブロッキングしたのち、一次抗体と反応させた (4°C、16 時間)。メンブレンを TBST で 3 回洗ったのち、二次抗体と反応させ (4°C、16 時間)、TBST で 3 回洗った後、BCIP/NBT phosphatase substrate system (KPL) または EzWestLumi puls (ATTO) を用いてバンドを検出した。

### 一次抗体

抗 Flag 抗体 (SIGMA、M2、1/500 希釈)、抗 LBR 抗体 (当研究室、1/300 希釈)、

抗 MAN1 抗体 (当研究室、1/1,000) 、抗 LAP2 $\omega$  抗体 (当研究室、1/2,000 希釈) 、  
抗チューブリン抗体 (BioLegend、1/500 希釈) 、抗ラミン L3 抗体 (Hasebe et al.,  
2011、1/1,000 希釈) 、抗ラミン B1 抗体 (当研究室、1/1,000 希釈) 、抗 HP1 $\gamma$  抗  
体(当研究室、1/500 希釈)、抗ヒストン H3 抗体 (Abcam、1791、1/10,000 希釈) 、  
抗ヒストン H4 抗体 (Active Motif、1/2,000 希釈)、抗ヒストン H2AX-F 抗体 (当研  
究室、1/1,000 希釈)。

#### 二次抗体

抗 mouse IgG/AP (Dako、1/500) 、抗 rabbit IgG/AP (Dako、1/1,000) 、抗 mouse  
IgG/HRP (Dako、1/1,000) 、抗 rabbit IgG/HRP (SIGMA、1/1,000)

## 第3章 ツメガエル胞胚の核 F-アクチンの役割

### 3-1. 背景

#### 3-1-1. 細胞骨格としてのアクチン

アクチンは、すべての真核細胞で高度に保存された、細胞骨格を構成する基本的な因子の一つである。球状の立体構造をとり、速やかに重合と脱重合を行うことができる。重合したアクチン (F-アクチン) は繊維構造や網目構造など様々な形態をとることができるうえ、重合と脱重合によってフィラメントの伸長・短縮・トレッドミル、メッシュワーク形成や収縮などのダイナミックな構造変化が可能である。このような性質により、F-アクチンは真核細胞において細胞質分裂や細胞の仮足形成、ミオシンによる細胞内での物質輸送などに不可欠である (Blanchoin et al., 2014)。

#### 3-1-2. ツメガエル卵母細胞における核アクチン

アクチンは細胞質中に非常に多量に存在するが、核内にも存在することが知られている。核アクチンについては、ツメガエルの卵母細胞の巨大な核 (GV: germinal vesicle) 内に高密度のアクチン (100  $\mu$ M 以上) が存在するという報告が最も古い (Clark and Marriam, 1977; Clark and Rosenbaum, 1979)。この核アクチンは GV の巨大な核構造を支え (Kiseleva et al., 2004; Bohnsack et al., 2006)、核小体やクロマチンが、大きな核構造の中で重力によって沈むのを防いでいる (Feric and Brangwynne, 2013)。ツメガエル同様に GV の大きなヒトデの卵母細胞では、減数第一分裂の核膜崩壊の直前に核内で F-アクチンが発達し、核膜崩壊の促進に寄与する (Mori et al., 2014)。さらに、この F-アクチンの網目構造が収縮することで、巨大な GV 内で形成された染色体を散在させず、細胞膜直下に形成される紡錘体の赤道面に集合させることができる (Lénárt et al., 2005)。このような細胞骨格と同様の機能に加え、核内のアクチンは転写との関連する可能性がある。ツメガエルやサンショウウオでは、未成熟卵母細胞の核内において、F-アクチンがランプブラシ染色体と相互作用し染色体の凝縮に関与することや (Karsenti et al., 1978)、ランプブラシ染色体での転写に関与することが示唆されている (Rungger et al., 1979; Scheer et al., 1984) さらに近年、ツメガエルの卵母細胞の GV に体細胞核を移植すると、移植核内に F-アクチンが発達し、アクチンの重合に依存して Oct4 の転写活性化が起こり、核のリプログラミングが進行すると報告されている (Miyamoto et al., 2011)。このように、卵母細胞の GV 内ではアクチン、特に F-アクチ

ンが重要な役割を担っていると考えられる。

### 3-1-3. 体細胞における核アクチンの役割

近年の研究により、培養細胞や体細胞の核内でも、アクチンが転写活性化、mRNAの核外輸送、クロマチンリモデリングなどに関与することが明らかになってきた。例えば、HeLa細胞の核内に抗アクチン抗体を導入すると、RNA polymerase I と II が阻害されるうえ、核輸送を阻害して核アクチン量を減少させると、転写量が減少することから、アクチンは転写開始複合体の形成に必要であるとともに RNA polymerase II を介した転写に必要であることが報告されている (Hofmann et al., 2004; Philimonenko et al., 2004; Dopie et al., 2012)。また、G-アクチンが特定の転写関連因子と相互作用することで転写に関与するという報告がある (Vartiainen et al., 2007; Mouilleron et al., 2011)。G-アクチンはクロマチン再構成複合体の構成要素としても働くことが示されている。クロマチン再構成複合体である、SWI/SNF、SWR1、INO80などは、共通するアクチン結合領域を持ち、結合した G-アクチンを介して ARPs (Actin Related Proteins) と相互作用する (Szerlong et al., 2008)。また、INO80 はアクチンを介してクロマチンに結合する可能性が示唆されている (Kapoor et al., 2013; Tosi et al., 2013)。

### 3-1-4. 核 F-アクチンの役割

体細胞や培養細胞の核では、卵母細胞の核 (GV) のような高密度のアクチンが検出された報告はこれまでになく、F-アクチンが形成されるのは非常に限られた条件であることが知られている。これまでに培養細胞の核内に、非常に短い F-アクチンが集積する領域が存在するという報告がある (Belin et al., 2013) ほか、血清刺激や DNA 損傷時に、Phalloidin で染色が可能な F-アクチン形成が認められている (Baarlink et al., 2013; Belin et al., 2015)。DNA の二本鎖切断を誘起すると、核内の Formin-2 および Spire1/2 によって、核内に F-アクチンが形成されることに加え、核 F-アクチン形成を阻害すると DNA の二本鎖切断の頻度が増加することから、核 F-アクチンは DNA 損傷応答に関与することが示唆されている (Belin et al., 2015)。一方、アクチンをフィラメント化できるタンパク質を発現させ、培養細胞の核内で安定的なアクチンの繊維構造を形成させると、転写が抑制されることが明らかになっている (Serebryanny et al., 2016)。このことは、G-アクチンが RNA polymerase II と相互作用することとも一致し、体細胞の核内ではアクチンの重合と脱重合が厳密に制御される必要があることを強く示唆

する。しかしながら、一般的な細胞では、核で F-アクチンが発達する条件が非常に限られているうえ、細胞質中のアクチン量の方が、核アクチン量をはるかに上回るため、核 F-アクチンの可視化や、核アクチンの重合と脱重合の制御機構の解析は困難である。

### 3-1-5. アクチンの核輸送

アクチンは核移行シグナル (NLS: nuclear localization signal) を持たないが、コフィリンと結合することで、importin 9 によって核内に輸送される (Dopie et al., 2012)。また、アクチンはプロフィリンと結合して、exportin 6 によって核外に輸送される (Stuven et al., 2003)。ツメガエルの卵母細胞の GV では、アクチンを核外に輸送する exportin 6 が発現していないために核内にアクチンが蓄積する (Bohnsack et al., 2006)。一方で、ツメガエルでは、受精後 exportin 6 の発現量が上昇するため、受精後の細胞の核にはアクチンは蓄積しないと予想されていたが (Bohnsack et al., 2006)、胚の核にアクチンが蓄積するののかについては明らかにされていない。

### 3-1-6. 本研究の目的

ツメガエルの胞胚期の細胞核は、GV ほど大きくはないが、原腸胚期以降の細胞や通常の培養細胞の核と比べると非常に大きい (Jevtić and Levy, 2015) ため、この核構造の維持に核 F-アクチンが寄与する可能性が十分に考えられる。また、ヒトの卵母細胞では、減数第一分裂において、染色体を効率よく赤道面に整列させるために、F-アクチンの網目構造が収縮するメカニズムが存在する。胞胚の核でも、非常に短い細胞周期の間に、核膜崩壊や色体の正確な分配を完了させなければならないことから (Newport and Kirschner, 1982)、卵母細胞の GV 同様に核にアクチンが存在し、重要な機能を担っている可能性が考えられる。さらに、実際の胞胚の核ではクロマチンが核膜から乖離しないにもかかわらず、アクチン重合阻害剤を加えて調製した卵抽出液中で形成した核では、核の成長によってクロマチンが核膜から乖離することから、胞胚においてはクロマチンと核膜の結合に F-アクチンが関与する可能性が示唆される。

そこで、本研究では、これまでの研究で十分な検討がなされてこなかった、ツメガエル初期胚発生期の細胞核におけるアクチンの蓄積と形態を明らかにすることとした。また、F-アクチンの解析を可能とする新規卵抽出液の調製法を確立し、卵無細胞系で形成される核と胞胚細胞核のアクチンの蓄積と形態について比較検討した。さらに新規卵抽出液を用いて核アクチンの役割を明らかにすることを目指した。



## 3-2. 結果

第3章の実験は、小田春佳、白井菜月、浦菜緒子が分担して行い、小田が投稿論文にまとめ、発表した。それぞれの分担を、各節の末尾に示す。

### 3-2-1. アフリカツメガエル胞胚の核には F-アクチンが蓄積する

ツメガエル胞胚細胞の核内に F-アクチンが存在するかを明らかにするため、F-アクチン結合タンパク質である Utrophin のアクチン結合ドメイン (CH: calponin homology domain, Burkel et al., 2007) に EGFP を付加した EGFP-UtrCH の mRNA をツメガエル受精卵に顕微注射したのち、胚発生を進行させた。後期胞胚 (st. 9) および中期原腸胚 (st. 11) を、Hoechst 33342 で染色し、カバーガラスで軽く押しつぶして、全視野蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、胞胚の間期の細胞では、細胞膜直下と核内において EGFP-UtrCH の集積が確認された (図 3-2-1 A、矢頭)。分裂期の細胞では (図 3-2-1 A、矢印)、細胞膜直下のみ EGFP-UtrCH のシグナルが観察された。一方、原腸胚の細胞では、EGFP-UtrCH のシグナルは細胞膜直下のみ確認され、核内には観察されなかった。同様に、F-アクチンと G-アクチンの両方に結合するアクチンプローブとして用いられる Lifeact (LA, Riedl et al., 2008) に EGFP を付加した LA-2EGFP と、ヒストン H2B に BFP を付加した H2B-mTagBFP の mRNA をツメガエル受精卵に顕微注射したのち胚発生を進行させ、後期胞胚 (st. 9) および原腸胚 (st. 10) の細胞を観察したところ、後期胞胚の核内には LA-2EGFP のシグナルが観察されたが、原腸胚の核内には LA-2EGFP のシグナルは観察されなかった (図 3-2-1 B)。さらに、中期胞胚 (st. 8)、前期原腸胚 (st. 10.5) および中期原腸胚 (st. 12) の核を単離し、抗アクチン抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、中期胞胚の核内にアクチンのシグナルが検出された (図 3-2-1 C)。原腸胚の核ではアクチンのシグナルはわずかであった。これらのことから、ツメガエル胞胚の核内には F-アクチンが蓄積することが示された (核 F-アクチン)。 (小田、白井)

### 3-2-2. 胞胚期でのみ F-アクチンが核に蓄積する

胞胚で観察される核内の EGFP-UtrCH および LA-2EGFP のシグナルが原腸胚では観察されないこと (図 3-2-1 A, B)、抗アクチン抗体を用いた免疫染色でも原腸胚核内のアクチンシグナルが胞胚に比べ非常に弱かったことから (図 3-2-1 C)、ツメガエル胞胚の核 F-アクチン量は胚発生の進行とともに減少することが考えられた。そこで、前期 (st. 7)・中期 (st. 8)・後期 (st. 9) 胞胚および前期原腸胚 (st. 10.5) から核を単離後、固定

し、DNA を Hoechst 33342 で、脂質膜を DiOC<sub>6</sub> で、F-アクチンを蛍光標識 Phalloidin で染色して、共焦点蛍光顕微鏡および全視野蛍光顕微鏡で観察した (図 3-2-2 A, B)。その結果、胞胚期では、前期から後期までの間、核内に F-アクチンが観察された。共焦点蛍光顕微鏡での観察により、胞胚期の核 F-アクチンは、核膜直下に高密度で存在し、核質内にはそれより密度が低いながらも一定に分布していた (図 3-2-2 A, 胞胚)。我々は、核膜直下の高密度に分布する F-アクチンを核ラミナアクチン、核質に分布する F-アクチンを核質アクチンと命名した。一方、原腸胚期になると F-アクチンはほとんど検出されなかった (図 3-2-2 A, B, 原腸胚)。胞胚期および原腸胚期の核について、全視野蛍光顕微鏡を用いて観察し、撮影した画像を基に核サイズ、および Phalloidin の蛍光強度を計測した。これらを基に核の単位面積当たりの F-アクチン量 (核 F-アクチン密度) を求めた結果、胚発生の進行とともに核の大きさは減少していくが、胞胚期の間は核内 F-アクチン密度は一定に保たれていた (図 3-2-2 C)。一方、原腸胚期に進行すると核 F-アクチン密度は急激に低下した (図 3-2-2 C)。以上のことから、胞胚期までの細胞の核内では、F-アクチンが高密度に存在していること、原腸胚期に入ると核 F-アクチンが消失することが判明した。(白井)

### 3-2-3. F-アクチン動態を解析可能なツメガエル卵抽出液: IFE

これまでに、胞胚型の核の構造や機能研究には、ツメガエル卵の抽出液が用いられ、胞胚細胞の核に蓄積する核 F-アクチンの役割の解明にも卵無細胞系は有用なツールとなると考えられた。しかしながら、従来用いられてきたツメガエル卵抽出液 (Murray, 1991; Ohsumi et al., 2006) は、細胞質の分離を良くするためにアクチン重合阻害剤 (CB: cytochalasin B) を添加して調製されるため、F-アクチンの解析に用いることができない。アクチン重合阻害剤を加えないで調製される卵抽出液はこれまでも報告されていたが (Theriot et al., 1994; Ma et al., 1998; Sider et al., 1999; Valentine et al., 2005; Field et al., 2014; Abu Shah et al., 2015)、それらを用いて核形成が行われたという報告はない。そこで、CB を添加せずに、従来と同様に核形成が誘起される卵抽出液の調製法を検討した。ツメガエル未受精卵を遠心すると、脂質層、細胞質層、卵黄層 (沈殿) に分離する。遠心の際に、CB を加えると、卵抽出液は、脂質・卵黄層と明確に分離し (図 3-2-3 A, +CB)、分離した透明な細胞質層を採取して卵無細胞系として実験に用いる。他方、CB を加えずに遠心すると、色素顆粒を含む黒い層が、CB+ の調製時とは異なり、沈殿せずに脂質層と細胞質層の間に現れる。この色素顆粒層と、細胞質層

および脂質層の境界は不明瞭である (図 3-2-3 A、-CB)。この色素顆粒を含む層と細胞質画層を採取し、懸濁して IFE (Inhibitor-Free Extract) とした。また、以降の実験で、アクチン重合阻害剤を含む卵抽出液を ICE とした (ICE: Inhibitor-Containing Extract)。ICE と IFE に精子クロマチンを添加し、卵抽出液を  $\text{CaCl}_2$  で賦活して間期に移行させ、核を形成させた。賦活後 180 分で、DNA を Hoechst 33342 で、脂質膜を DiOC<sub>6</sub> で染色し、全視野蛍光顕微鏡で観察した。その結果、IFE、ICE のいずれにおいても十分に成長した核が観察され (図 3-2-3 B、DMSO、CB)、IFE を用いて従来の卵抽出液と同様に核形成が誘起されることが示された。

従来用いられてきた ICE では精子クロマチンを基質に DNA 複製が進行する (Lohka and Masui, 1983)。そこで、IFE においても DNA 複製が行われるか検討した。蛍光標識したヌクレオチド (DY-590-dUTP) を添加した IFE に DMSO、CB または DNA 複製阻害剤アフィディコリン (Aph) を加えて核を形成させ、通常 ICE で DNA 複製が完了する賦活後 120 分までインキュベートした。DY-590-dUTP の染色体への取り込みを観察しやすいよう、卵抽出液を分裂期に移行させ、染色体を凝縮させて観察した (図 3-2-3、D)。その結果、IFE (DMSO) または ICE (CB) において、染色体に取り込まれた DY-590-dUTP の蛍光強度に大きな差は見られなかった。DNA 複製を阻害した IFE (Aph) では DY-590-dUTP の蛍光は観察されなかった。このことから、IFE で形成した核でも、従来の卵抽出液で形成した核と同様に、DNA 複製が行われることが示された。(浦、白井)

#### 3-2-4. IFE を用いることで核 F-アクチン豊富な胞胚型核を再構築できる

IFE で形成された核に、F-アクチンが存在するか検証するため、IFE に EGFP-UtrCH タンパク質とツメガエル精子クロマチンを添加し、 $\text{CaCl}_2$  によって賦活して細胞周期を間期に移行させ、核形成を誘起した。賦活後 45 分または 150 分で、DNA を Hoechst 33342 で染色して全視野蛍光顕微鏡で観察したところ、形成された核内に EGFP-UtrCH の集積が観察された (図 3-2-4 A、DMSO)。一方、IFE に CB を添加して形成された核には EGFP-UtrCH の蛍光は観察されなかった (図 3-2-4 A、CB)。核内の EGFP-UtrCH を観察するため、EGFP-UtrCH が集積した賦活後 120 分の卵抽出液をショ糖不連続密度勾配に重層、遠心して回収した。回収した核の DNA を Hoechst 33342 で染色し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、核内に EGFP-UtrCH の蛍光が確認された。核内の EGFP-UtrCH の蛍光は、特に核膜直下で強く、核質では部

分的に束化していた (図 3-2-4 B)。以上のことから、IFE で形成された核内に F-アクチンが蓄積することが示された。(浦)

次に、核を固定したのち蛍光標識 Phalloidin で染色して核 F-アクチンの観察を行った。IFE に精子クロマチンを添加して核を形成させ、賦活後 90 分に卵抽出液を固定し、核をカバーガラス上に回収した。核膜をツメガエルラミン L3 (Benavente et al., 1985) に対する特異抗体を用いて免疫染色を行い、DNA を Hoechst 33342 で、F-アクチンを蛍光標識 Phalloidin で染色した。この核を蛍光顕微鏡で観察したところ、核内に Phalloidin の蛍光が確認された。アクチン重合阻害剤の Latrunculin A (Lat. A) や CB を添加した IFE で形成された核では、Phalloidin の蛍光は観察されなかった (図 3-2-5 A, B)。IFE で形成された核を固定し、抗ラミン L3 抗体を用いて免疫染色を行い、DNA を Hoechst 33342 で、F-アクチンを蛍光標識 Phalloidin で染色して共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その結果、IFE (DMSO) で形成された核では、核ラミナアクチンはラミン L3 と共局在し、クロマチンが核周縁部でラミナに結合して存在する様子が観察された (図 3-2-5 B)。続いて、核形成の過程で核 F-アクチンがどのように核に蓄積するのか観察した。IFE で形成した核を、賦活後 20 分、45 分、90 分でそれぞれ固定し、DNA を Hoechst 33342 で、脂質膜を DiOC<sub>6</sub> で、F-アクチンを蛍光標識した Phalloidin で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その結果、賦活後 20 分の、核膜の形成が明瞭に認められない時点のクロマチンには、F-アクチンの集積は観察されなかった (図 3-2-5 C)。賦活後 45 分では、核が成長しており、核内に明瞭な核ラミナアクチンと微弱な核質アクチンの形成が確認された。賦活後 90 分になると、核はさらに大きく成長し、核ラミナアクチンがさらに増大し、核質アクチンは核質内に高密度で均一な分布を示した (図 3-2-5 C)。このことから、IFE は F-アクチンの豊富な胞胚の核と同様の核を試験管内で再構築できることが示された。(白井、小田)

### 3-2-5. 核 F-アクチンは核内で一定の密度になるまで積極的に取り込まれる

F-アクチンの核内への蓄積を定量的に解析するため、賦活後 30 分、45 分、60 分、90 分、120 分の核を固定し、遠心によってカバーガラス上に回収した。これらの核について、核膜マーカーとして抗ラミン L3 抗体を用いて免疫染色を行い、DNA を Hoechst 33342 で、F-アクチンを蛍光標識 Phalloidin で染色し、全視野蛍光顕微鏡を用いて観察した (図 3-2-6 A)。ラミン L3 で検出されたエリアを核サイズとして計測し (図 3-2-6 B)、Phalloidin の蛍光強度をもとに単位面積当たりの核 F-アクチン量 (核 F-

アクチン密度)を定量した(図 3-2-6 C)。その結果、賦活後 30 分の、核形成初期の核内にわずかに核 F-アクチンが観察されはじめ(図 3-2-6 B、-Lat. A)、その後、60 分までは核の成長とともに核 F-アクチン密度が増加した(図 3-2-6 B, C、-Lat. A)。しかし、60 分以降は、核が成長を続けても、核内の F-アクチン密度はほぼ一定であった(図 3-2-6 B, C、-Lat. A)。ICE (Lat. A) においても、賦活後 30 分で核膜が形成され、核の成長速度も IFE と大きな差がなかった(図 3-2-6 B)。核ラミナを構成するラミン L3 についても、Lat. A 添加の有無によらず、核局在量やその分布に違いは見られなかった(図 3-2-6 A)。これらのことから、IFE において、核 F-アクチンは核形成とともに核に蓄積し、核 F-アクチン密度は核の成長に伴い上昇するが、ある密度に達すると、核が成長しても密度は変わらないことが示唆された。さらに、核 F-アクチンの有無は、核形成や核の成長速度、核ラミナを構成するラミンタンパク質の量や局在に影響を与えないことが明らかになった。(小田)

### 3-2-6. 核 F-アクチン依存的なクロマチン - 核膜結合

上記の実験において、ICE で形成された核を長時間インキュベートした際に、クロマチンが核膜から乖離し、核内で凝集している様子が観察された(図 3-2-3 B, CB; 図 3-2-4 A, CB; 図 3-2-5 B, CB)。このことは、IFE で形成される核では、クロマチンと核膜の結合が(クロマチン - 核膜結合)核 F-アクチンに依存してもたらされることを示唆した。そこで、IFE に各濃度(0.1、1.0、10  $\mu\text{g/ml}$ )の CB、または各濃度(0.1、0.3、1.0  $\mu\text{M}$ )の Lat. A を加えて核を形成させ、120 分間インキュベートして大きく成長させた。固定した核の DNA を Hoechst 33342 で、脂質膜を DiOC<sub>6</sub> で、F-アクチンを蛍光標識 Phalloidin で染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した(図 3-2-7)。その結果、CB(図 3-2-7 A) および Lat. A(図 3-2-7 B) の濃度依存的に核 F-アクチンが消失した。CB および Lat. A とともに、最も低い濃度(CB: 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 、Lat. A: 0.1  $\mu\text{M}$ )では、明瞭な核ラミナアクチンと均一な核質アクチンが観察された。CB および Lat. A とともに中間の濃度(CB: 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 、Lat. A: 0.3  $\mu\text{M}$ )では、核ラミナアクチンの密度はやや減少するかほとんど減少せず、一方、核質アクチンは密度が大きく減少するとともに、核質内に強く束化したアクチンの構造が観察された。このとき、クロマチンは部分的に核膜から乖離した。0.3  $\mu\text{M}$  の Lat. A 存在下で形成した核のクロマチンは強く凝集し、核膜付近に局在した。CB および Lat. A とともに、最も高い濃度(CB: 10  $\mu\text{g/ml}$ 、Lat. A: 1.0  $\mu\text{M}$ )では、核質アクチンはほぼ消失し、核ラミナアクチンがわずかに観察された。また、ク

ロマチンは完全に核膜から乖離し、凝集した。以上のことから、IFE で形成された核では、F-アクチン依存的にクロマチンと核膜の結合が維持されることが示された。また、クロマチン - 核膜結合が維持されることは、クロマチンの核内での凝集を抑制することが示唆された。(白井、小田)

### 3-2-7. 核 F-アクチンは核の物理的強度を向上させる

ツメガエルの卵母細胞では巨大な核である卵核胞(Germinal Vesicle)の構造の維持に核内 F-アクチンが必要であることが示されている (Bohnsack et al., 2006)。胞胚細胞の核も原腸胚の細胞の核に比べ大きいことから (図 3-2-2; Jevtić and Levy, 2015)、核内 F-アクチンが大きな胞胚型核の構造維持に関与する可能性が考えられた。これを検証するため、IFE (DMSO)と ICE (Lat. A)で形成された核を大きく成長させ、未固定の核を遠心 (2,430 ×g)してカバーガラス上に回収した。次にこれら核を固定し、抗ラミン L3 抗体を用いて免疫染色し核ラミナを観察した。その結果、IFE で形成された核はほとんど壊れていなかったが (図 3-2-8 A, B, DMSO)、ICE で形成された核では、50%以上の核の核ラミナに穴が開いているものが観察された (図 3-2-8 A, B, C: Lat. A)。このことから、胞胚型核内の F-アクチンは核の物理的強度を高めることが示された。(白井)

### 3-2-8. 核 F-アクチンおよび分裂期の F アクチンは分裂中期における染色体の整列を促進する

核 F-アクチンの役割の一つである、クロマチンと核膜の結合が、分裂期の染色体構築や紡錘体形成にも関与するかを明らかにするため、以下の手法で紡錘体形成実験を行った (図 3-2-9 A、材料と方法)。間期の卵抽出液 (1<sup>st</sup> extract) で核を形成させ充分成長させたのち、遠心によって核を回収した。回収した核を、蛍光標識した tubulin を添加した分裂期の卵抽出液 (2<sup>nd</sup> extract) 中でインキュベートし、紡錘体を形成させた。この実験では、1<sup>st</sup> および 2<sup>nd</sup> extract に、それぞれ DMSO または Lat. A を添加することで、前者と後者に F-アクチンが存在する(F) またはしない (-) 4つの条件にした (図 3-2-9 B: F/F, -/F, F/-, -/-)。F/F または-/F で形成された紡錘体を、それぞれ F/F spindle、-/F spindle とした。F/F spindle と-/F spindle の周囲には紡錘体を取り囲むように発達した F-アクチンが観察された (図 3-2-9 B)。また、F/-と-/-で形成された紡錘体を、それぞれ F/- spindle、-/- spindle とした(図 3-2-9 B)。これら 4 種類の紡錘体は、いずれ

も形状に差がなく、紡錘体の長さや幅を計測した結果、紡錘体の大きさにも差がないことが示された (図 3-2-9 C)。しかしながら、F/F spindle 以外の 3 種の紡錘体では、紡錘体赤道面へ整列しない染色体が多く観察された (図 3-2-9 C、矢頭)。このような染色体の整列不全を定量化するために、赤道面から最も離れた染色体どうしの距離  $X$  (図 3-2-9 D、模式図、 $X = a + b$ ) と、赤道面方向の染色体分布の幅  $Y$  (図 3-2-9 D、模式図) を計測し、 $X/Y$  を求めた (図 3-2-9 D、グラフ)。その結果、間期または分裂期のいずれか、または両方に Lat. A を加えた場合 (-/F spindle、F/- spindle、-/ spindle) では、いずれも  $X/Y$  値が F/F spindle より有意に大きくなった。分裂期に F-アクチンが存在しない場合 (F/- spindle と -/ spindle) は、存在する場合 (F/F spindle と -/F spindle) に比べ  $X/Y$  値が大きくなった。このことから、分裂期の F-アクチンは染色体の整列を促進することが示された。また、F/F spindle と -/F spindle を比較した場合には、-/F spindle の方が有意に  $X/Y$  値が大きくなった。同様に、F/- spindle と -/ spindle では、-/ spindle の方が有意に大きい  $X/Y$  値を示した。すなわち、間期の核 F-アクチンもまた分裂期染色体の整列の促進に寄与することが示唆された。以上のことから、紡錘体赤道面への染色体の正常な整列には、間期の核 F-アクチンと分裂期における細胞質 F-アクチンの両方が関与する可能性が示唆された。(小田)

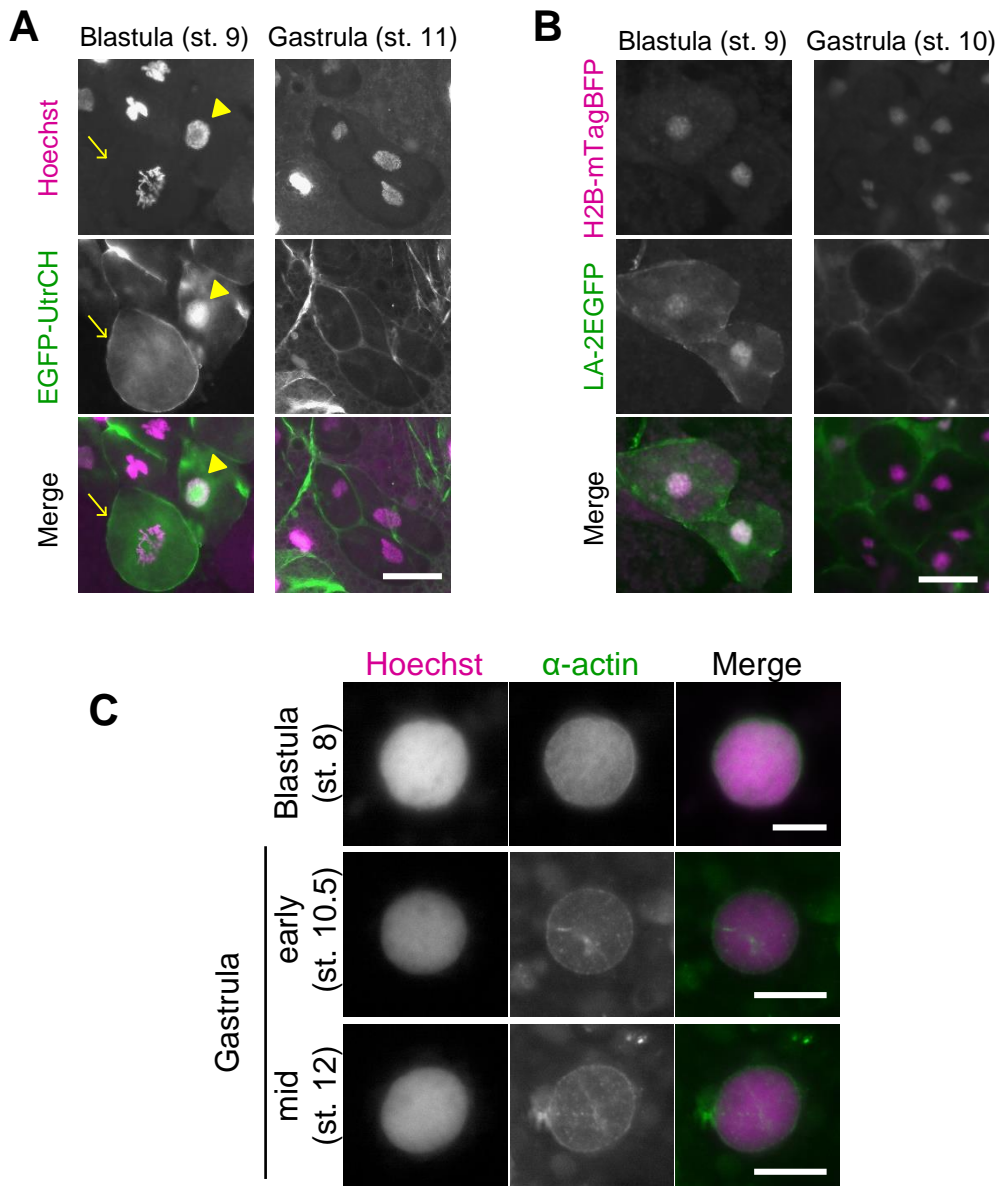
### 3-2-9. 原腸胚期核のクロマチン - 核膜結合と核 F-アクチンの蓄積

上記のように、IFE で形成された核に F-アクチンが蓄積すること、また核 F-アクチンがクロマチン - 核膜結合に役割を果たすことが示された。しかし、胞胚期の核において、核 F-アクチンがクロマチン - 核膜結合の維持に寄与しているのかについては明らかではない。そこで、胞胚 (st. 7) および原腸胚 (st. 11) から核を単離し、IFE (DMSO) または ICE (Lat. A) 中で 120 分間インキュベートして成長させ、核内のクロマチン - 核膜結合の様子を観察した。その結果、胞胚の核は IFE、ICE にかかわらずと大きく成長し (図 3-2-10 A, B、直径 50  $\mu\text{m}$  以上)、IFE ではクロマチンが核膜から乖離することはなかったが (図 3-2-10 A、胞胚、-Lat. A)、ICE ではクロマチンが核膜から乖離して核内で凝縮した (図 3-2-10 A、胞胚、+Lat. A)。一方、原腸胚の核は、インキュベートすることでやや成長したが (図 3-2-10、直径約 20-30  $\mu\text{m}$ )、胞胚の核ほどは成長しなかった (図 3-2-10 A、原腸胚)。興味深いことに、原腸胚の核は IFE、ICE のいずれにおいてもクロマチンが核膜から乖離することはなかった (図 3-2-10 A、原腸胚)。このことから、胞胚の核とは異なり、原腸胚の核では、核 F-アクチン以外の因子によっ

てクロマチン - 核膜結合が維持されることが示唆された。

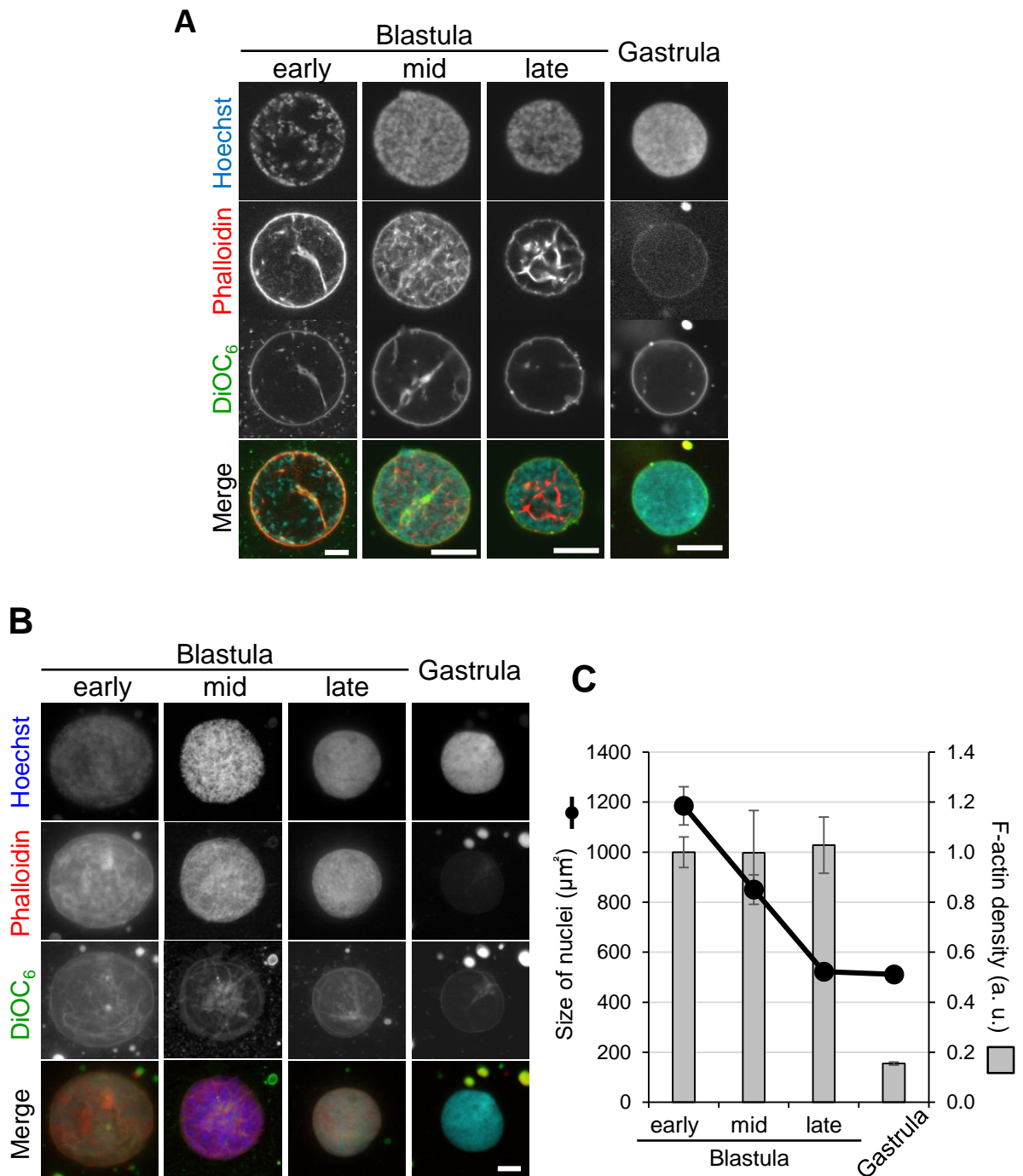
胞胚期の核には F-アクチンが蓄積するが、原腸胚の核では核 F-アクチンが消失する (図 3-2-1 A, B)。これに関しても、胞胚と原腸胚の核構造の違いが関与する可能性が考えられた。そこで、胞胚 (st. 7) と原腸胚 (st. 11) から単離した核を上記と同様に IFE と ICE でインキュベーションしたのち回収し、それらの核の F-アクチンを検出した。その結果、IFE 中で大きく成長した胞胚の核には、高密度の核 F-アクチンが観察された (図 3-2-10 B、胞胚、DMSO)。一方、原腸胚の核は、IFE 中で長時間インキュベートしたにもかかわらず、核 F-アクチンは全く検出されないかわずかしか検出されなかった (図 3-2-10 B、原腸胚、DMSO)。原腸胚の核中、核 F-アクチンがわずかに検出された核は、核 F-アクチンが全く検出されない核に比べ、サイズが大きかった。以上のことから、胞胚由来の核は F-アクチンの有無によらず、卵抽出液に置かれると大きく成長する特性を持ち、一方、原腸胚由来の核は IFE に置かれても、大きく成長することはなく、核 F-アクチンが蓄積しづらい特性をもつことが明らかになった。(小田)





### 図 3-2-1 アフリカツメガエル胞胚の核にはF-アクチンが蓄積する

- (A) ツメガエル受精卵にF-アクチン結合タンパク質EGFP-UtrCH mRNAを顕微注射し、胚を発生させた。胞胚 (st. 9) および原腸胚 (st. 11) について、DNAをHoechst 33342で染色し、胚をカバーガラスで軽く押しつぶして、全視野蛍光顕微鏡で観察した。胞胚細胞では核内にEGFP-UtrCHの蓄積が観察されたが(矢頭)、原腸胚の核にはEGFP-UtrCHのシグナルは観察されなかった。分裂期の胞胚細胞では、細胞全体と細胞膜直下にEGFP-UtrCHのシグナルが観察された(矢印)。Scale bar: 50  $\mu$ m
- (B) (A) 同様にツメガエル受精卵にLA-2EGFPとH2B-mTagBFPのmRNAを顕微注射し、胞胚 (st. 9) および原腸胚 (st. 10) まで発生させたのち、カバーガラスで軽く押しつぶして、全視野蛍光顕微鏡で観察した。胞胚の核にはLA-2EGFPのシグナルが確認されたが、原腸胚の核にはLA-2EGFPのシグナルは観察されなかった。Scale bar: 50  $\mu$ m
- (C) 中期胞胚 (st. 8)、前期および中期原腸胚 (st. 10.5、12) から単離した核を固定し、DNAをHoechs 33342で、アクチンを抗アクチン抗体で免疫蛍光染色し、全視野蛍光顕微鏡で観察した。中期胞胚では核内に明瞭なアクチンのシグナルが観察され、原腸胚では弱いアクチンシグナルが観察された。Scale bar: 10  $\mu$ m

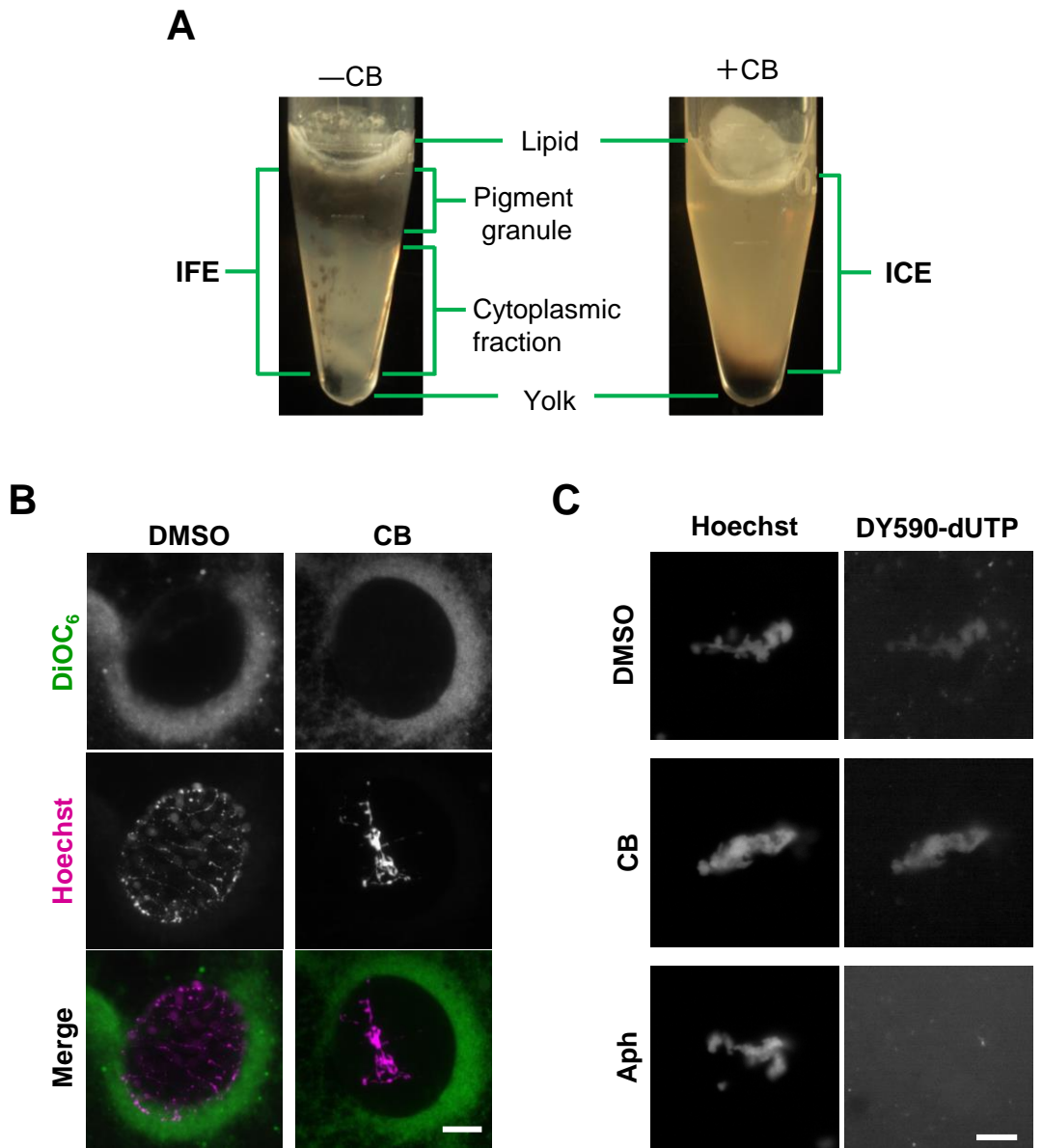


**図 3-2-2 胞胚期でのみF-アクチンが核に蓄積する**

(A) 胞胚 (前期: st. 7、中期: st. 7.5、後期: 8.5-9) および前期原腸胚 (st. 10) から単離した核を固定し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で、F-アクチンをDY-590 Phalloidinで蛍光染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 10 µm

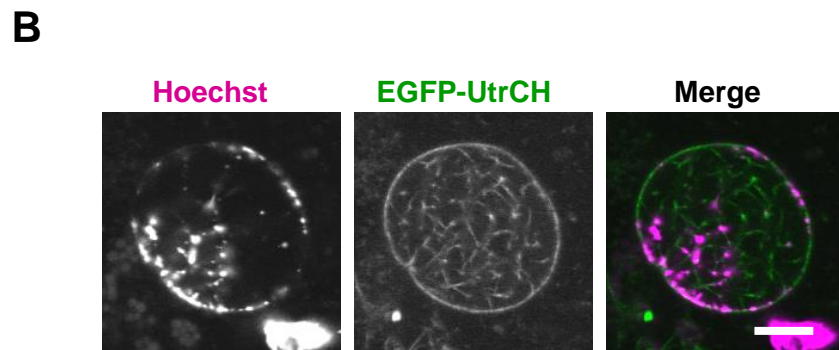
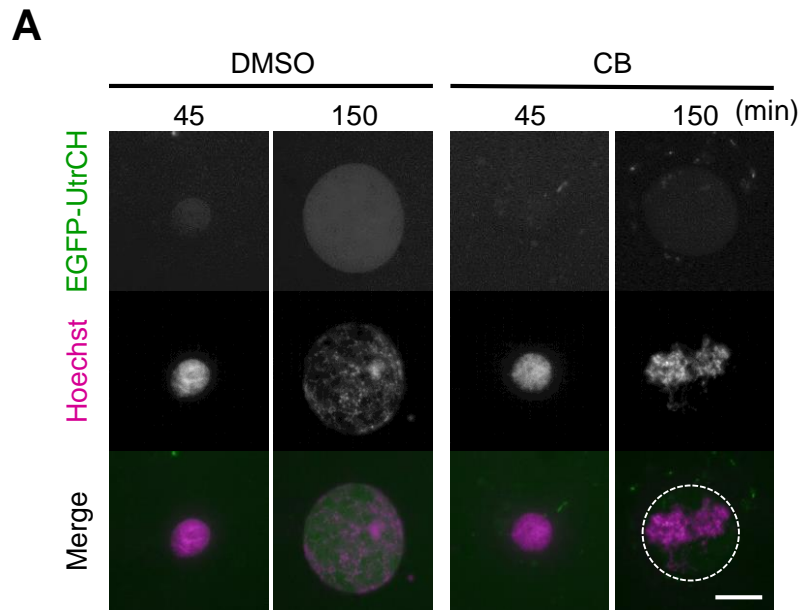
(B) (A)同様の核を全視野蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 10 µm

(C) (B)の核について、核の大きさと単位面積当たりの核F-アクチン密度を、ソフトウェアNIS-elements BR (Nikon) を用いて計測した。胞胚期の間は、核内F-アクチン密度は一定であるが、前期原腸胚では急激に減少する。Average ±SEM, N = 20

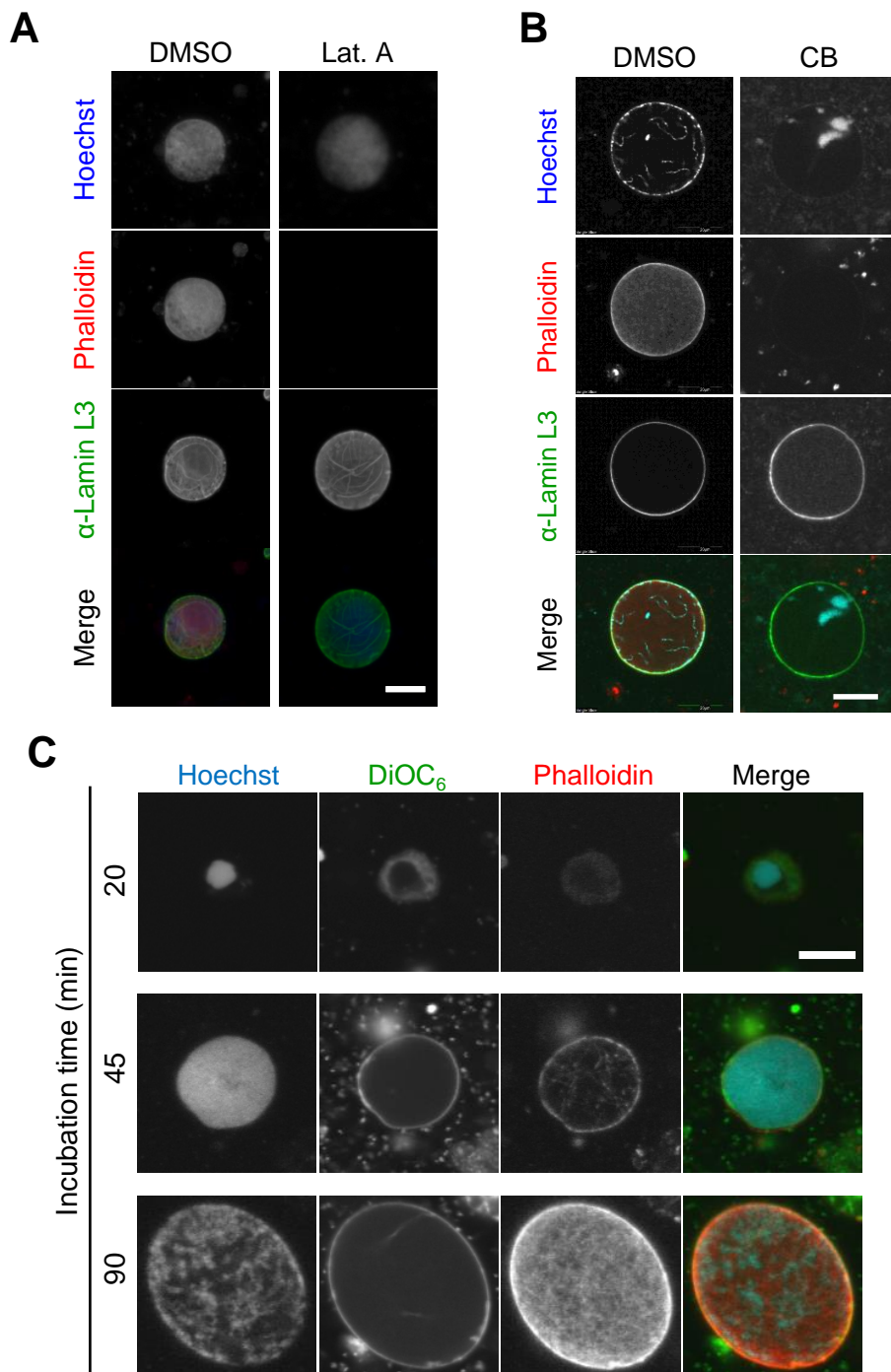


**図 3-2-3 アクチン重合阻害剤を用いずに調製した卵抽出液を用いた核形成**

- (A) アクチン重合阻害剤を加えずに調製する卵抽出液 (IFE: Inhibitor-Free Extract)。ツメガエル未受精卵をアクチン重合阻害剤CB非添加または添加 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 条件で遠心し、得られた細胞質画分を再度遠心した。その結果、最上層に脂質が、最下層に卵黄が沈殿した。—CBでは、脂質の直下に色素顆粒を含む層ができ、この色素顆粒層と細胞質層を回収し、よく懸濁してIFEとして用いた。
- (B) IFEに精子クロマチンを添加したのち $\text{CaCl}_2$ によって賦活し、核を形成させた。賦活後180分の核を固定し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜を $\text{DiOC}_6$ で染色し、全視野蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$
- (C) IFEにDMSO、CB (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )またはDNA複製阻害剤アフィディコリン (Aph: 50  $\mu\text{M}$ ) を添加した。それぞれのIFEにDY-590 dUTP (2.5  $\mu\text{M}$ ) を添加したのち、精子クロマチンを加えて賦活し、120分間インキュベートし、核を形成させた。その後、DMSO、CB (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはAph (50  $\mu\text{M}$ ) を添加した分裂期IFEを加えてインキュベートすることにより、分裂期染色体を形成させた。DNAをHoechst 33342で蛍光染色し、取り込まれたDY-590 dUTPを、全視野蛍光顕微鏡を用いて観察した。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$

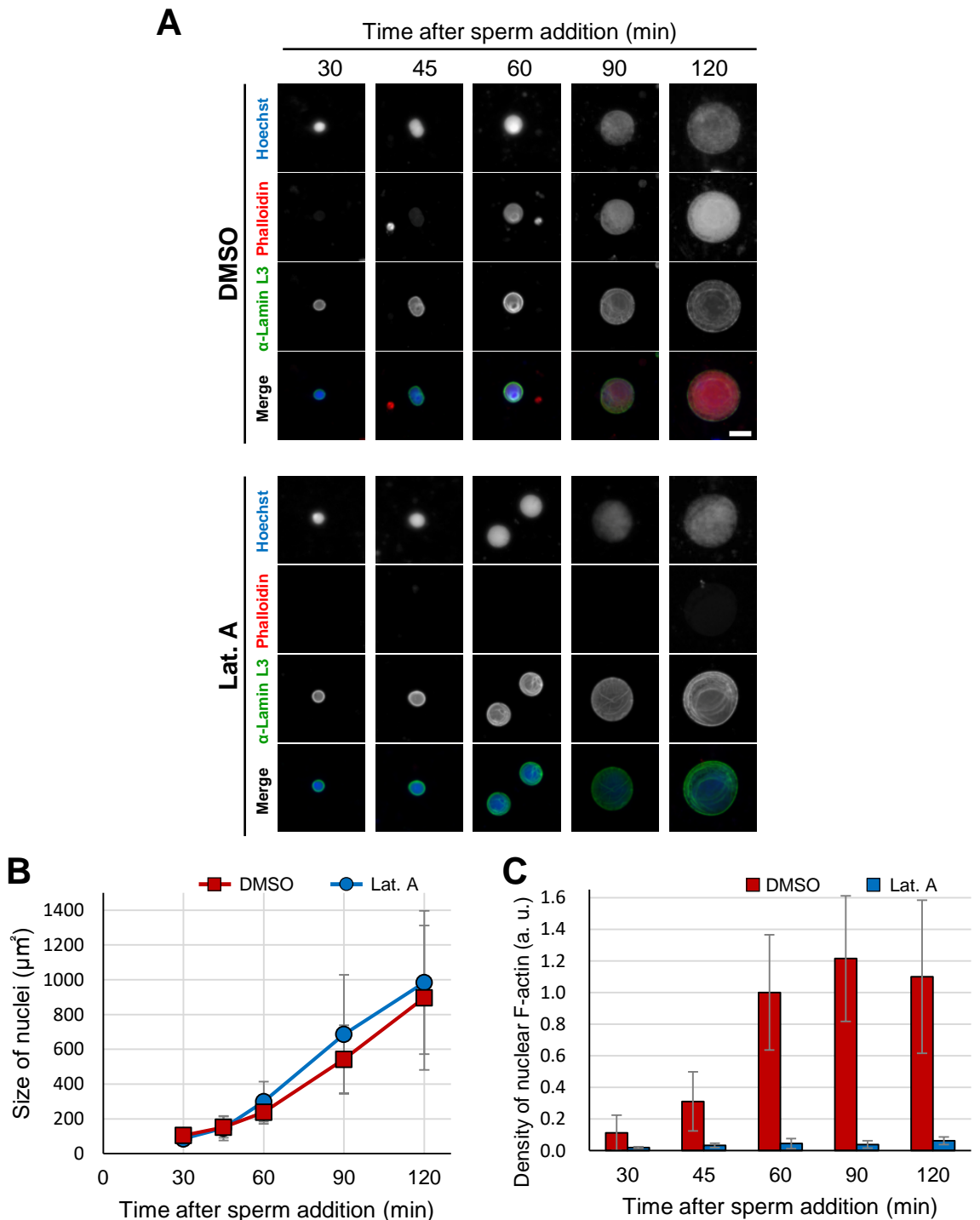


**図 3-2-4 IFEを用いることで核F-アクチン豊富な胞胚型核を再構築できる**  
 (A) EGFP-UtrCHタンパク質を加えたIFEにDMSOまたはCB (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加した。その後、精子クロマチンを加え、 $\text{CaCl}_2$ で賦活して核を形成させた。賦活後45分および150分でDNAをHoechst 33342で染色して全視野蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ 、破線: 核膜  
 (B) EGFP-UtrCHタンパク質を加えたIFEに、精子クロマチンを加え、 $\text{CaCl}_2$ で賦活して核を形成させた。賦活後120分でDNAをHoechst 33342で染色して共焦点顕微鏡で観察した結果、核内にF-アクチンが蓄積することが確認された。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$



**図 3-2-5 IFEで形成した核を固定しても核F-アクチンを観察できる**

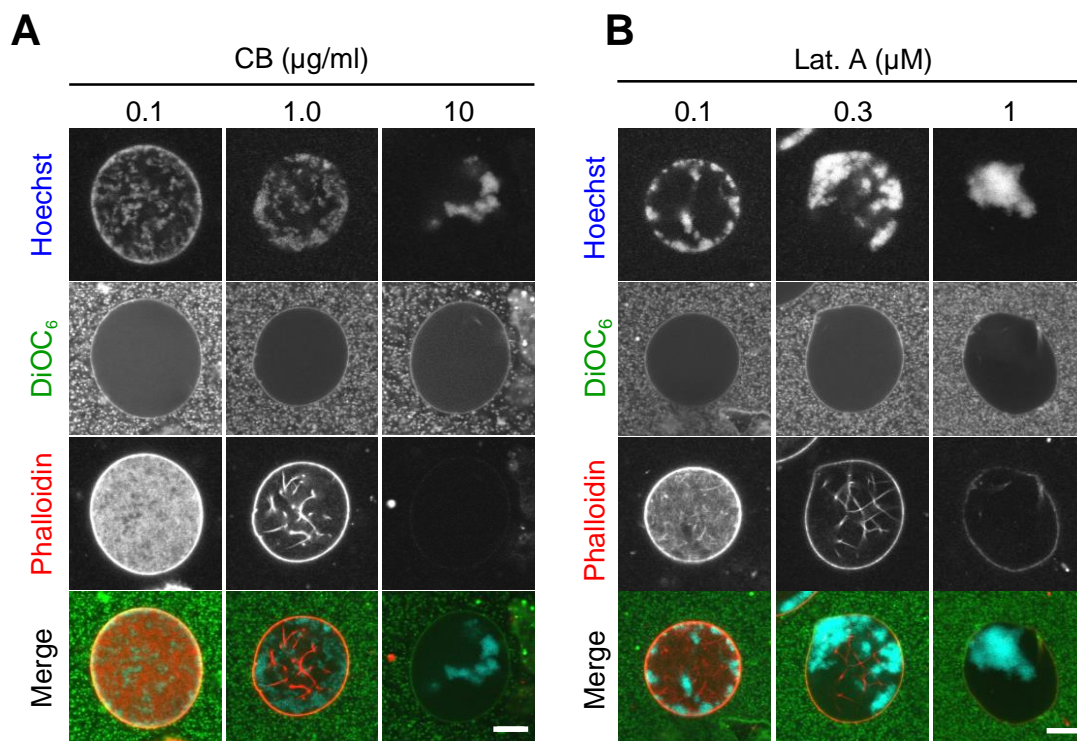
- (A) IFE中にDMSOまたはLat. A (1.0  $\mu\text{M}$ ) を添加したのち、精子クロマチンを加え、 $\text{CaCl}_2$ によって賦活し、核形成を誘起した。賦活後90分で核を固定し、カバーガラス上に回収して、抗ラミン L3抗体を用いて免疫染色を行った。DNAをHoechst 33342で、F-アクチンをDY-590 Phalloidin蛍光染色したのち全視野蛍光顕微鏡を用いて観察した。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$
- (B) (A)同様にしてIFEで核を形成させ、賦活後140分の核を固定し、抗ラミン L3抗体を用いて免疫染色を行ったのち、DNAをHoechst 33342で、F-アクチンをDY-590 Phalloidinで蛍光色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 20  $\mu\text{m}$
- (C) IFEに精子クロマチンを添加し、 $\text{CaCl}_2$ によって賦活して核を形成させた。賦活後、20分、45分、90分の各時間で、核を固定し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で、F-アクチンをDY-590 Phalloidinで染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 10  $\mu\text{m}$



**図 3-2-6 核F-アクチンは核内で一定の密度になるまで積極的に取り込まれる**

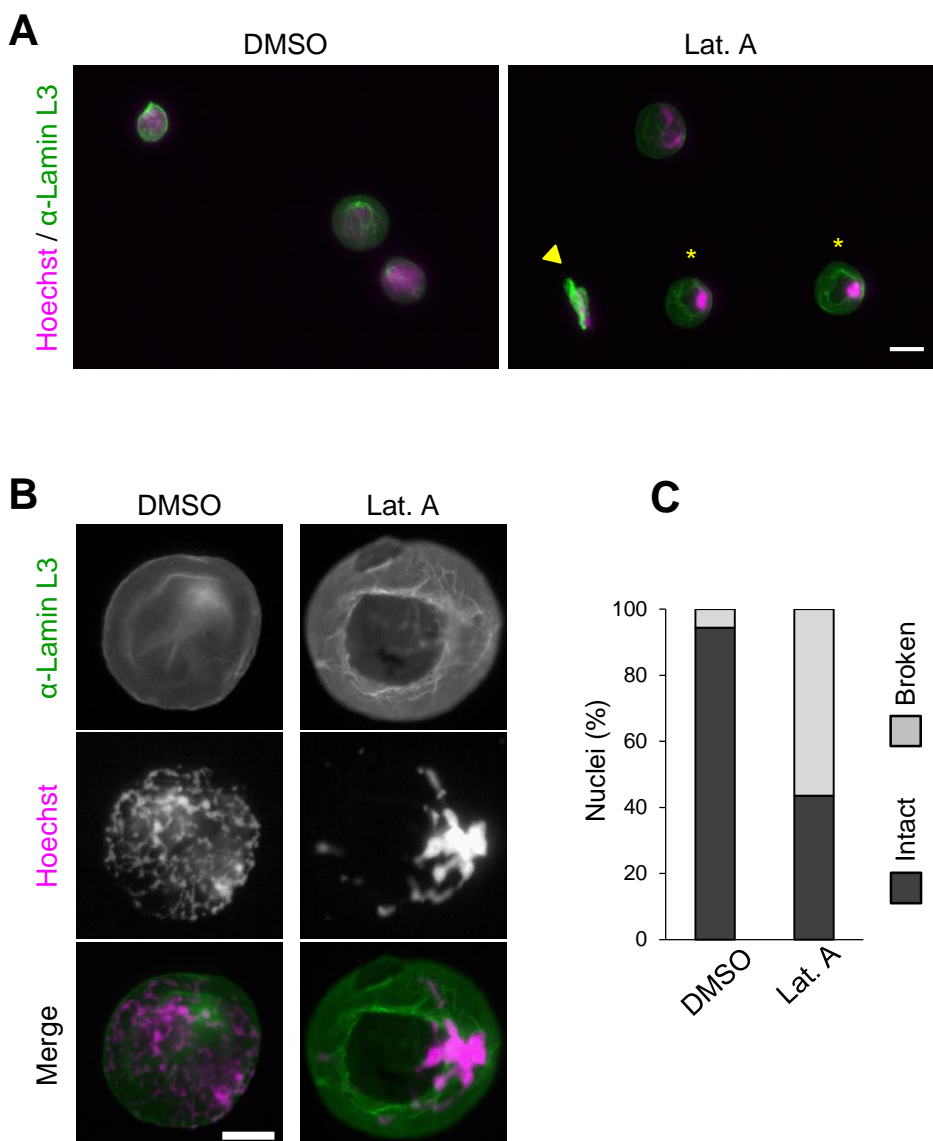
(A) IFE中にDMSO (−Lat. A) またはLat. A(1.0 µM)を添加したのち、精子クロマチンを加え、CaCl<sub>2</sub>によって賦活し、核形成を誘起した。賦活後、30, 45, 60, 90, 120分の各時間で、核を固定し、カバーガラス上に回収して、抗ラミン L3抗体を用いて免疫染色を行った。DNAをHoechst33342で、F-アクチンをDY-590 Phalloidin蛍光染色したのち全視野蛍光顕微鏡を用いて観察した。Scale bar: 20 µm

(B-C) (A) の核について、核の大きさ (B)とDY-590 Phalloidinの蛍光量を基に核F-アクチン密度(C)を計測した。核F-アクチン密度は−Lat. A条件の60分における値を1として相対値であらわした。IFEで形成した核は時間とともに成長し、60分までは核内F-アクチン密度も時間依存的に増加するが、60分以降は核内F-アクチンがほぼ一定となる。Average ±SD, N = 60



**図 3-2-7 胞胚型核では核F-アクチン依存的にクロマチン - 核膜結合が維持される**

IFEに各濃度 (0.1, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$ )のCB (A) または各濃度 (0.1, 0.3, 1.0  $\mu\text{M}$ ) の Lat. A (B) を添加し、核を形成させ120分間インキュベートした。これらの核を固定し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で、F-アクチンをDY-590 Phalloidinで蛍光染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。CBおよびLat. Aの濃度が高いほど、核内のF-アクチンは減少し、CBが10  $\mu\text{g/ml}$ およびLat. Aが1.0 $\mu\text{M}$ ではF-アクチンがほとんど消失した。さらに、F-アクチンの消失した核 (CB: 10  $\mu\text{g/ml}$ ) ではクロマチンは核膜から乖離し、核内で凝集した。 Scale bar: 10 $\mu\text{m}$

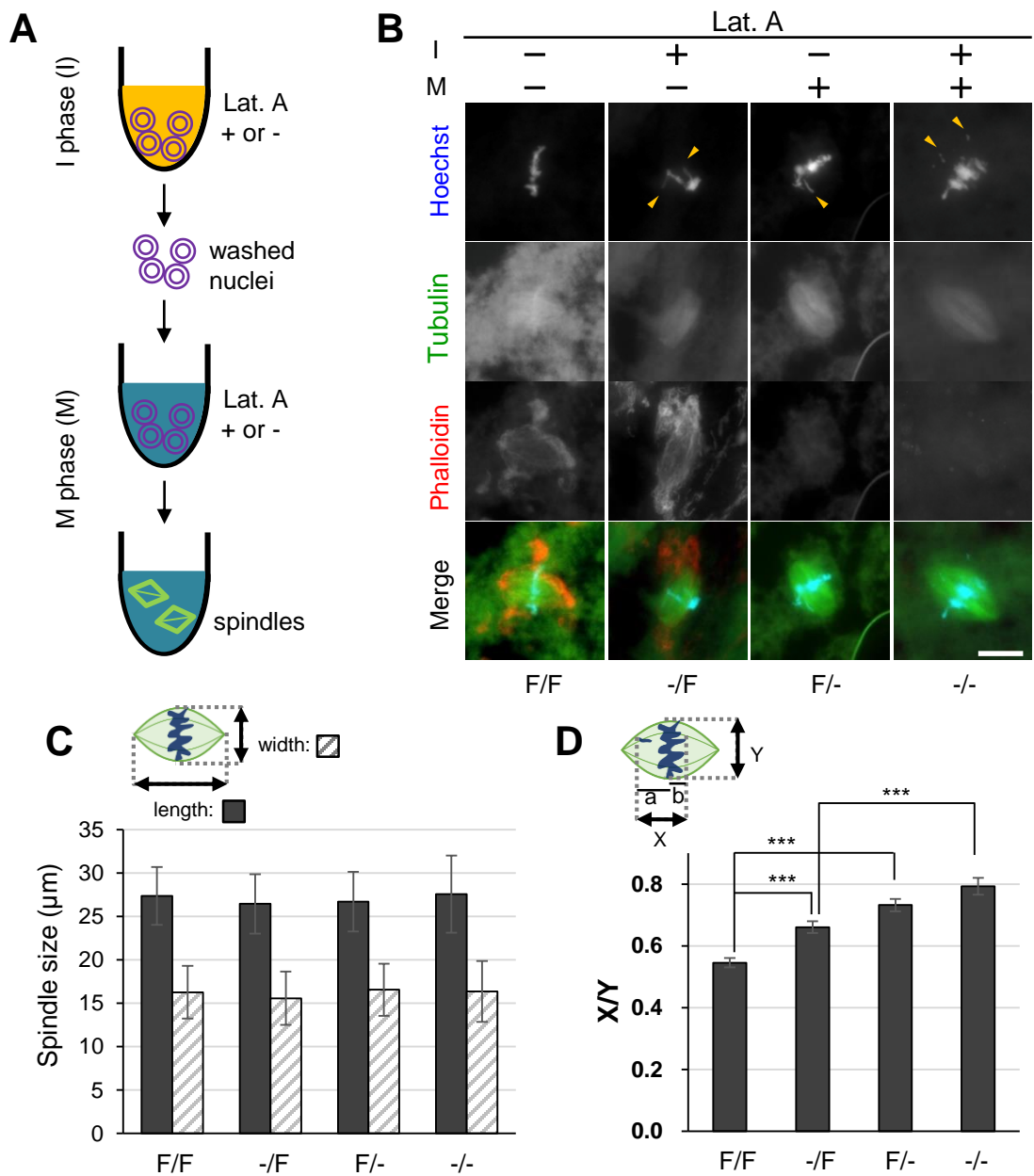


**図 3-2-8 胞胚型核における核内F-アクチンは核の物理的強度を向上させる**

(A) IFEにDMSOまたはLat. A (1.0  $\mu$ M) を添加したのち、精子クロマチンを加え、 $\text{CaCl}_2$ によって賦活し、核を形成させた。賦活後120分の核を、強い遠心力 (2430  $\times$ g) でカバーガラス上に回収したのち固定し、DNAをHoechst 33342で、ラミンを抗ラミン L3抗体を用いて染色した。\*: 核膜が破れた核、矢頭: 破れて単離された核膜、scale bar: 10  $\mu$ m

(B-C) (A) の核の核ラミナの状態を観察し(B)、核ラミナが完全なもの(intact)と核ラミナに穴が開いているもの(broken)を分類し、それぞれの割合を示した(C)。DMSOを添加したIFEで形成された核は90%以上がintactであったが、Lat. Aを添加したIFEで形成した核は、50%以上の核で核ラミナの損壊が確認された。





**図 3-2-9 F-アクチンは胞胚期において分裂中期の染色体の整列を促進する**

(A) 紡錘体形成実験の模式図。IFEにDMSOまたはLat. A (10  $\mu$ M) を添加し、核形成を誘起し、これを1<sup>st</sup> extractとした。賦活後120分までインキュベートし、核を十分に成長させたのち、遠心によって核のみを単離し、1<sup>st</sup> extractを除いた。単離した核をDMSOまたはLat. A (10  $\mu$ M) を添加した分裂期IFE (2<sup>nd</sup> extract) 中でインキュベートして紡錘体を形成した。紡錘体の可視化には、2<sup>nd</sup> extractに蛍光標識したチューブリン (HiLyte Fluor™ 488-tubulin、0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l) を添加した。

(B) (A)で示した方法を用いて形成した紡錘体を、1<sup>st</sup> extract (I) および2<sup>nd</sup> extract (M) にDMSOまたはLat. Aを添加した4条件に分類して示した。DMSOまたはLat. Aを添加した1<sup>st</sup> extractで形成した核を、DMSOを添加した2<sup>nd</sup> extractでインキュベートし形成した紡錘体を、それぞれF/F spindle、-/F spindleとした。2<sup>nd</sup> extractにLat. Aを添加したIFEを用いて形成させた紡錘体を、それぞれF/- spindle、-/- spindleとした。F/F spindleおよび-/F spindleでは紡錘体周囲に発達したF-アクチンが観察された。また、-/F spindle、F/- spindle、-/- spindleでは赤道面に整列できていない染色体が観察された(矢頭)。Scale bar: 20  $\mu$ m

(C) 形成された紡錘体について、図の通り長さと同幅を計測した。Average  $\pm$  SD, N = 150 - 152

(D) (B)の矢頭で示した通り、-/F spindle、F/- spindle、-/- spindleでは赤道面に整列できていない染色体が観察された。染色体整列不全を定量するため、図に示したとおり染色体の赤道面への集合についてX/Yを計測し、グラフにあらわした。Xは赤道面から紡錘体局方向に最も離れた染色体同士の距離(a + b)で、Yは赤道面方向の染色体の広がりである。Average  $\pm$  SEM., N = 150 - 152, \*\*\*: p<0.001

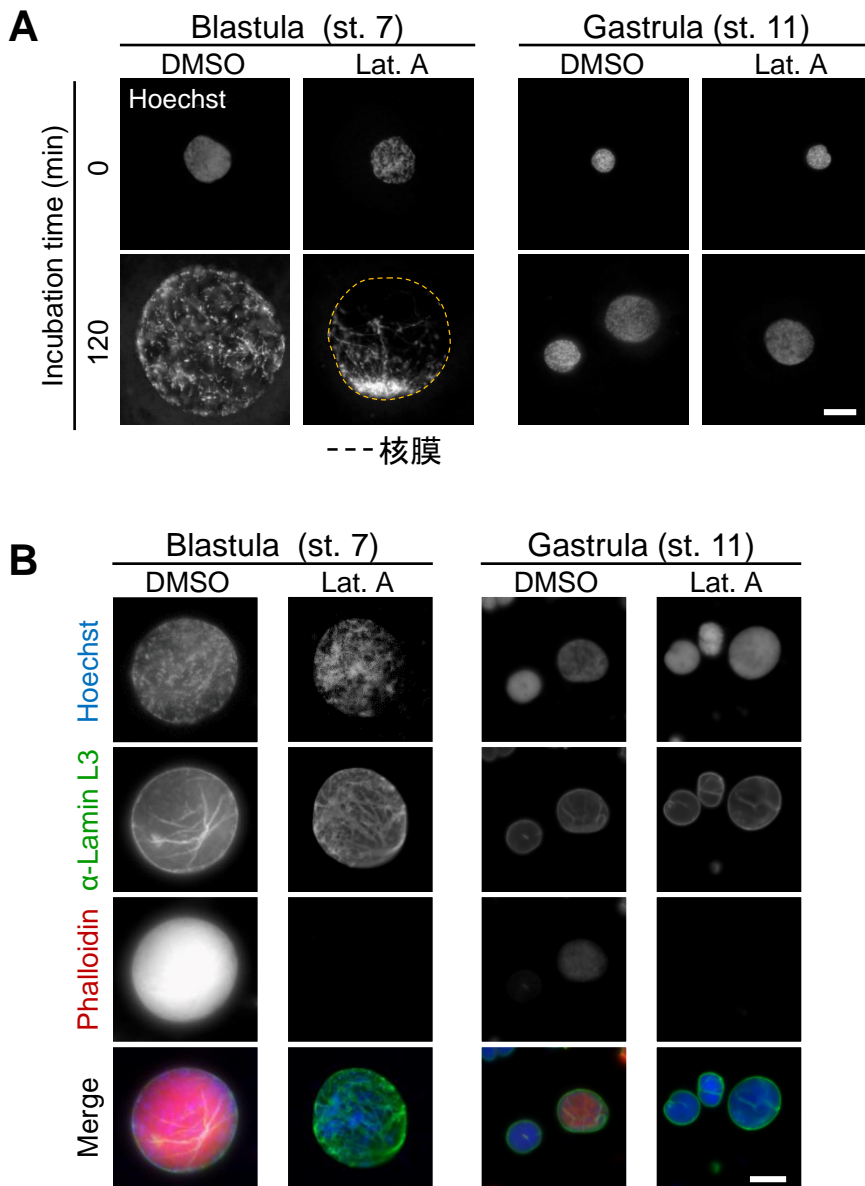


図 3-2-10 胞胚の核と原腸胚の核は構造的性質が大きく異なる

- (A) 胞胚 (st. 7) および 原腸胚 (st. 11) をシクロヘキシミド (50  $\mu\text{g/ml}$ ) で処理して細胞周期を間期にとどめたのち、核を単離し、DMSOまたはLat. A (1.0 $\mu\text{M}$ ) を添加した間期IFE中で120分間インキュベートした。この核を賦活後0分または120分で固定し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で、F-アクチンをDY-590 Phalloidinで蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察した。胞胚由来の核はLat. A添加の有無に関わらず、賦活後120分で大きく成長した。Lat. A添加条件でインキュベートした胞胚由来の核では、クロマチンが核膜から乖離し凝集した (胞胚、Lat. A+, 120分、破線: 核膜の境界)。原腸胚由来の核は、IFE中で120分間インキュベートすると、やや成長したが、胞胚の核ほど大きく成長せず、Lat. A存在下でもクロマチンは核膜から乖離しなかった (原腸胚、Lat. A+, 120分)。破線: 核膜
- (B) (A)同様の核をカバーガラス上に回収して、核ラミナを抗ラミン L3抗体で免疫染色するとともに、DNAをHoechst 33342で、F-アクチンをDY-590 Phalloidinで染色し、全視野蛍光顕微鏡で観察した。DMSOを添加したIFEでインキュベートした胞胚由来の核は、核にF-アクチンが蓄積したが、原腸胚由来の核にはF-アクチンがほとんど蓄積しないか、蓄積してもわずかであった (胞胚、-Lat. A; 原腸胚、-Lat. A)。Scale bar: 20  $\mu\text{m}$

### 3-3. 考察

#### 3-3-1. ツメガエル胞胚の核内 F-アクチンと胚細胞の未分化性の関連

本研究において、EGFP-UtrCH、LA-2EGFP、抗アクチン抗体、蛍光標識した Phalloidin のいずれを用いた場合も、核内に明瞭なアクチンの集積が確認された (図 3-2-1、図 3-2-3)。すなわち、ツメガエルの胞胚細胞の核内には豊富な F-アクチンが存在することが示された。ツメガエルの胚発生においては、胞胚期までの細胞は高い未分化性を維持し (Gurdon, 1960)、胚の遺伝子の転写が強く抑制されているのに対し、DNA 複製活性が非常に高く、極端に短い細胞周期で細胞分裂を繰り返す (Newport and Kirschner, 1982)。MBT を境に胚の遺伝子の転写が開始し、原腸胚から本格的な転写が行われ、細胞分化が開始する。このような胚発生の各段階におけるイベントと対応するように、核 F-アクチン密度は、胞胚期では前期から後期を通じて一定の高い値を示すのに対し、原腸胚期では胞胚期の約 15%程度にまで減少した (図 3-2-2)。これまでに、ツメガエル卵母細胞への体細胞核移植実験により、体細胞核のリプログラミングの際に核内 F-アクチンが形成されること、さらに核内 F-アクチンの形成に応じて *Oct4* の転写活性化が起こることが示されている (Miyamoto et al., 2011)。以上のことから、本研究で示された胞胚細胞の核内に蓄積する F-アクチンは、胚の未分化性の維持に関連する可能性が強く示唆される。

#### 3-3-2. 核内 F-アクチンの動態を解析可能な胞胚型核再構築系の確立

我々は、従来用いられてきたツメガエル卵抽出液の無細胞系を応用し、アクチン重合阻害剤を使用せず、F-アクチン動態の解析および胞胚型核の再構築が可能な IFE を確立した (図 3-2-3、図 3-2-4、図 3-2-5、図 3-2-6)。IFE で胞胚型核を形成させると、賦活後 60 分までは、核内 F-アクチン密度が上昇するが、60 分以降は一定の値を示す (図 3-2-6)。このことから、胞胚型核は核内 F-アクチン密度が一定になるまで、積極的にアクチンを取り込み、閾値に達した後は、核の大きさによらず核 F-アクチン密度を一定に保つ機構を有していると考えられる。また、胞胚から単離された核および IFE で形成した胞胚型核では、核膜直下に高密度に発達した核ラミナアクチンが存在し、核質領域には均一に核質アクチンが分布していた (図 3-2-2、図 3-2-4、図 3-2-5)。核膜直下に核ラミナアクチンが発達するメカニズムは未だ不明であるが、ラミンとアクチンの相互作用が報告されていることから (Simon et al., 2010)、核ラミナ構造が核膜直下の高密度な F-アクチン形成に関与する可能性がある。また、人工的に作成した脂質膜内にアク

チンを一定濃度以上蓄積させると、自律的に F-アクチンが形成され、特に脂質膜直下で高密度に分布することから (Hase and Yoshikawa, 2006)、本研究で用いた胞胚型核の核膜直下でも同様のメカニズムで高密度な F-アクチンが分布している可能性もある。

### 3-3-3. 核 F-アクチンはクロマチン - 核膜結合の維持に関わる

アクチン重合阻害剤を添加した卵抽出液 (ICE) を用いて形成した核では、アクチン重合阻害剤濃度依存的に核 F-アクチンが減少し (図 3-2-7)、大きく成長した核ではクロマチンが核膜から乖離した (図 3-2-3 B、図 3-2-4 A、図 3-2-5 B、図 3-2-7)。このことは、核内 F-アクチンが胞胚型核でのクロマチン - 核膜結合の維持に関与することを示すものである。IFE で再構築した胞胚型核だけでなく、胞胚から単離した核を ICE 中でインキュベートしても、クロマチンが核膜から乖離した (図 3-2-10 A)。このことは、ツメガエル胞胚期の細胞の核では F-アクチン依存的にクロマチンが核膜に結合していることを示すものである。また、核膜から乖離したクロマチンは凝集することから (図 3-2-3 B、図 3-2-4 A、図 3-2-5 B、図 3-2-7、図 3-2-10 A)、F-アクチンによるクロマチン - 核膜結合は、胞胚の核内において、クロマチンの凝集を抑制していると考えられる。

### 3-3-4. 核 F-アクチンは核の物理的強度を向上させる

IFE を用いて形成させた核を、強い遠心力を用いてカバーガラス上に回収し、核ラミナの損壊について調べたところ、F-アクチンが存在する条件では 90%以上の核が壊れなかったのに対し、F-アクチンが存在しない条件では 50%以上の核で核ラミナが壊れていた (図 3-2-8)。このことから、細胞骨格として働く F-アクチンは核内でも核の物理的な構造の維持に関与することが示された。胞胚細胞の核は、原腸胚以降の細胞に比べて大きく、かつダイナミックに分裂を繰り返すことから (Newport and Kirschner, 1982; Jevtić and Levy, 2015)、核ラミナに加えて核 F-アクチンによって大きな核構造が維持されることが考えられる。

### 3-3-5. 胞胚細胞の核内 F-アクチンは分裂中期の染色体の整列を促進する

胞胚型核における核 F-アクチンが分裂期のイベントにも関与するかを明らかにするため、紡錘体形成実験を行った (図 3-2-9)。間期及びその後の分裂期で、F-アクチンが存在する・しないの 4 条件で紡錘体を形成した結果、いずれの条件でも紡錘体の形状や大きさには差がなかった (図 3-2-9 C)。分裂期に F-アクチンが存在する条件で紡錘体

を形成すると、紡錘体周囲に発達した F-アクチンが観察された。この F-アクチンは特に紡錘体極付近で発達していた (図 3-2-9 B、F/F spindle と -/F spindle)。ツメガエル後期胞胚および原腸胚の細胞を用いた研究により、紡錘体周囲に形成される F-アクチンは紡錘体の位置決定や回転に関与することが示されている (Woolner et al., 2008) ことから、卵抽出液で形成した紡錘体周囲にも F-アクチンが発達したと考えられる。

一方、紡錘体が正常に形成されるにもかかわらず、間期または分裂期で F-アクチンが存在しないと、分裂中期における染色体の整列が阻害されることが示された (図 3-2-9 B 矢頭、D、F/F spindle と F/- spindle vs F/- spindle と -/F spindle)。特に、分裂期に F-アクチンが存在しないと、分裂期に F-アクチンが存在する条件に比べ、染色体の整列不全を示す X/Y 値が有意に大きくなった (図 3-2-9 B 矢頭、D)。ヒトデの卵母細胞を用いた研究では、卵母細胞の巨大な核である GV において、分裂期に核内に F-アクチンのメッシュワークが形成され、このメッシュワークが収縮することで巨大な GV 内に散在する染色体を一か所に集合させる機能を持つことが報告されている (Lénárt et al., 2005; Mori et al., 2011)。本研究で用いたツメガエル胞胚の核や、卵抽出液中で形成した核も、一般的な細胞の核に比べ、非常にサイズが大きいことから、分裂期における染色体の赤道面への整列に、F-アクチンで形成されたメッシュワークが寄与すると考えられる。

さらに、分裂期に F-アクチンが存在する条件でも、その前の間期に F-アクチンが存在しない条件では、染色体の整列不全が観察された (図 3-2-9 B 矢頭、D、F/F spindle vs F/- spindle)。すなわち、分裂期にのみ F-アクチンが存在しても、染色体の赤道面への正確な整列には不十分であり、間期の核 F-アクチンが存在することが、分裂中期における染色体の正常な整列に重要であることが明らかになった。この理由として、間期において核 F-アクチンが形成されないと、クロマチンが核膜から乖離して凝集するために (図 3-2-3 B、図 3-2-4 A、図 3-2-5 B-C、図 3-2-7)、その後の染色体形成の際に、染色体の高次構造構築が阻害されている可能性が考えられる。したがって、胞胚の核では間期核内の F-アクチンおよび分裂期の F-アクチンの両方が染色体の赤道面の整列に関与すると考えられる。胞胚期には、染色体の構築、赤道面への整列、娘細胞への分配という分裂期の複雑なイベントを非常に短い時間 (約 15 分) で完了させる必要があり、これを正確に行うために、染色体の整列を F-アクチン促進している可能性が考えられる。

### 3-3-6. 胞胚と原腸胚では核の構造的性質が大きく異なる

胞胚の核では、豊富に存在した核 F-アクチンは、原腸胚期になるとほぼ消失する（図 3-2-1、図 3-2-2）。この理由として、2つの可能性が考えられた。1つは、原腸胚の核は胞胚の核とは異なり、核 F-アクチンを蓄積する機能がない可能性である。2つ目の可能性は、核と細胞質の比が異なるために、原腸胚では核 F-アクチンが蓄積できない可能性である。具体的には、ツメガエル胚は原腸胚まで、胚そのものの大きさを変えることなく細胞数を増やしていくため、発生が進むにつれて核当たりの細胞質体積は減少する。これに対応するように後期胞胚までは核サイズも減少していくが、後期胞胚から原腸胚にかけては、核のサイズがほとんど変化しない（図 3-2-2）。これにより、原腸胚では細胞質の体積に対する核の体積が大きくなる（Jevtić and Levy, 2015）ために、細胞質から核質へ輸送されるアクチンが減少し核 F-アクチンを十分に形成できない可能性がある。胞胚と原腸胚からそれぞれ単離した核を、それぞれ IFE 中でインキュベートした結果、胞胚由来の核は大きく成長し、核 F-アクチンを蓄積したが、原腸胚由来の核は、胞胚由来の核ほど大きく成長せず、核 F-アクチンの蓄積が全くないか、わずかだった（図 3-2-10、DMSO）。すなわち、細胞質環境を胞胚様にしても、原腸胚由来の核は、大きく成長し核 F-アクチンを蓄積するという胞胚型核の性質を獲得することはないことが示され、先に挙げた2つの可能性のうち、後者が否定された。

さらに、胞胚細胞の核内では、F-アクチンによってクロマチン - 核膜結合が維持されることが示されたが（図 3-2-10 A）、原腸胚期に核 F-アクチンがほぼ消失しても、クロマチンの核膜からの乖離は観察されない（図 3-2-1、図 3-2-2）。また、原腸胚由来の核を ICE でインキュベートしても、クロマチン - 核膜結合が維持されることが示された（図 3-2-10 A, st. 11, Lat. A）。このことから、原腸胚期以降の細胞では、F-アクチン以外の核内因子によってクロマチン - 核膜結合が維持されることが強く示唆される。これらのことは、胞胚の核は原腸胚以降の分化した細胞と比べ、構造的に全く異なる性質を有することを示すものである。核内 F-アクチンと未分化性の関連が示唆されていること（Miyamoto et al., 2011）、および核内 F-アクチンの急激に減少する時期が、細胞分化の開始する時期と一致していることから（図 3-2-2）、胞胚の核の構造的性質は、胞胚特有の核の機能、早い細胞周期や未分化性の維持に関連する可能性が高いと考えられる。

本研究は、ツメガエル胞胚細胞の核に豊富に F-アクチンが存在すること、および IFE を用いることで *in vitro* でも F-アクチン豊富な胞胚型核を再構築できることを初めて示したものである。また、ツメガエルの胚発生において、核内に高密度に F-アクチンが

存在する時期と、胚細胞の未分化性の保たれる時期が一致することは、核内 F-アクチンと細胞の未分化性の関連を強く示唆するものである。すなわち、核内 F-アクチンは核の物理的強度の向上やクロマチン - 核膜結合の維持、分裂中期の染色体の赤道面への整列のみならず、初期胚細胞の本質的な機能にも、重要な役割を果たす可能性が高いと考えられる。

## 第4章 核内膜タンパク質 LBR によるクロマチン - 核膜結合

### 4-1. 背景

#### 4-1-1. 核内膜層の構成とクロマチン - 核膜結合

真核細胞において、核膜は核質と細胞質を隔てており、核外膜と核内膜、両者を貫く核膜孔複合体 (NPC : Nuclear Pore Complex)、核内膜を裏打ちする核ラミナから構成されている。培養細胞や、分化した体細胞では、核周縁部に形成される核内膜層では、核内膜タンパク質や NPC がクロマチンや核内膜を裏打ちするラミンと相互作用している。近年、核の構造と機能との関連性に着目する研究が進み、核膜の中でも特に核内膜層は核の構造を維持するのみならず、クロマチンの複製や転写の制御に積極的に関わることが明らかになってきた (Gruenbaum et al., 2005; Zuleger et al., 2011)。例えば、体細胞においてはヘテロクロマチンが核辺縁に偏って局在している (Croft et al., 1999)。さらに、核ラミナを構成するラミン A の変異によって引き起こされる早老症 (Hutchinson-Gilford progeria syndrome) の患者の線維芽細胞においては、ヘテロクロマチンが核周縁部から乖離しているという報告がある (Sullivan et al., 1999; Goldman et al., 2004)。これらのことから、クロマチンと核膜の接する領域は、クロマチン複製や転写の制御が行われる重要な“場”であると考えられ、この制御機構には、核内膜タンパク質やラミンが関わることを示されてきた (Worman and Courvalin et al., 2000; Gruenbaum et al., 2005)。その一方で、クロマチンと核膜との結合性を核内で維持する機構については不明な点が多い。

#### 4-1-2. ラミン

ラミンは、タイプ V 中間径フィラメントの一種であり、核内膜を裏打ちする網目構造である核ラミナを形成する。ラミンは、発現パターンや生化学的な性質の違いから大きく A-type と B-type に分類される。A-type ラミン はラミン A とそのスプライシングバリエーションであるラミン C であり、分化した細胞に発現しており、未分化な細胞では発現していない (Stewart and Burke., 1987; Rober et al., 1989; Constantinescu et al., 2006)。B-type ラミンは、卵母細胞や未分化な胚発生初期の細胞から分化した細胞まで、共通に発現している。A-type ラミンは、分裂期には核膜小胞から乖離するのに対し、B-type ラミン分裂期にも膜小胞と結合している (Gerace and Blobel, 1980) という特徴がある。魚類および両生類には、卵母細胞および初期胚に特有の B-タイプラミ



ンのサブタイプ、ラミン L3 が存在する (Benavente et al., 1985; Stick and Hausen 1985; Hofemeister et al., 2002)。ツメガエルにおいては、卵母細胞や胞胚期の核では、ラミン L3 が主要に発現しており、分化した細胞で主要に発現している B-type ラミンであるラミン B1 はわずかししか発現しておらず、ラミン B2 は発現していない (Lourim et al., 1996)。

ラミンは多くの核内膜タンパク質 emerin、MAN1、LBR、LAP2 (Foisner and Gerace 1993; Furukawa et al., 1997; Dechat et al., 2000) などと相互作用することが知られている。また、コアヒストン (Höger et al., 1991; Yuan et al., 1991; Taniura et al., 1995; Goldberg et al., 1999) や DNA と直接結合する (Shoeman and Traub, 1990; Baricheva et al., 1996; Rzepecki et al., 1998. Stierle et al., 2003) ことも報告されている。これらの分子との相互作用により、ラミンは DNA 複製や、転写に関わることが示されている。例えば、ツメガエルの初期胚に発現するラミン L3 を免疫除去した卵抽出液を用いて核を形成させると、DNA 複製が起こらないことが示されている (Newport et al., 1990; Meier et al., 1991; Goldberg et al., 1995)。また、卵抽出液で形成した核では、ラミン L3 が、DNA ポリメラーゼを DNA 上につなぎとめるタンパク質である PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) と共局在を示すうえ、PCNA とラミン L3 の結合が、PCNA のクロマチン上への局在に必要であることが示されている (Shumaker et al., 2008)。また、ラミン A/C を欠損したマウスの胚性線維芽細胞では、野生型のマウスの胚性線維芽細胞に比べ、DNA 複製の速度が遅いことが報告されており (Johnson et al., 2004)、核ラミナは DNA 複製の制御に重要であると考えられている。さらに、HeLa 細胞にラミン A/C を過剰発現させると、RNA polymerase II 依存的な転写が抑制される (Kumaran et al., 2002) ことや、重合できないラミン変異体を用いて核ラミナ構造が形成できないようにした細胞でも、RNA polymerase II 依存的な転写が抑制される (Spann et al., 2002) ことから、核ラミナは転写制御に関わると考えられている。

#### 4-1-3. 核内膜タンパク質

プロテオミクス解析によれば、核内膜タンパク質 (INMP: Inner Nuclear Membrane Protein) は 80 種類以上もあるとされている (Schimer et al., 2003) が、解析が進んでいるのはいくつかのタンパク質にすぎない。それらの核内膜タンパク質はいずれも、一つまたは複数の膜貫通ドメインによって核内膜に局在しており、多くが N 末端側を核質

に伸ばして、ラミンやクロマチンと相互作用している (Ellenberg et al., 1997; Ostlund et al., 1999; Soullam and Worman, 1993; 1995; Wu et al., 2002)。核内膜タンパク質は、核形成の初期にクロマチンに結合し、核膜の形成に役割を果たすことが報告されている (Haraguchi et al., 2000)。さらに、核内膜タンパク質は、転写調節因子と相互作用することや (Furukawa, 1999; Lee et al. 2001; Mansharamani and Wilson, 2005)、クロマチンのエピジェネティック修飾部位と相互作用する可能性も示されている (Makatsori, et al. 2004)。また、近年の研究から、多くの核内膜タンパク質の変異体は、筋ジストロフィーなどの重篤な疾患の原因遺伝子となることや (Worman and Courvalin, 2005)、組織幹細胞の分化抑制などを引き起こすことも示されている (Subramanian et al., 2012)。このように、核内膜タンパク質とクロマチンとの相互作用は、転写の調節や細胞周期の進行などに重要であると考えられているが、培養細胞などの一般的な細胞の核では複数種類の核内膜タンパク質が発現しており、いずれかをノックダウンしても明確な影響が現れない (Anderson et al., 2009)。このことは、複数種類の核内膜タンパク質が相互補償的に機能することを示唆するものであるが、このために、それぞれの核内膜タンパク質の機能の解明は困難である。

#### 4-1-4. Lamin B receptor

LBR は核内膜タンパク質として初めて報告されたタンパク質で、約 200 アミノ酸からなる (Worman et al., 1988)。N 末端側を核質に伸ばし、C 末端側には 8 回の膜貫通ドメインと短い核質領域を持つ (Worman et al., 1990; Ye and Worman 1994)。N 末端側は、名前の由来の通りラミン B と結合することが報告されている (Worman et al., 1988; Ye and Worman 1994)。また、N 末端側は二本鎖 DNA およびヒストン H3、H4 と相互作用することが報告されている (Ye and Worman 1994; Duband-Goulet and Courvalin 2000; Polioudaki et al., 2001; Makatsori et al., 2004)。また、ヒトの LBR では HP1 (Heterochromatin Protein 1) の結合モチーフ (PxVxL; Lechner et al., 2005) に似た配列 (VEVKL; hLBR 113-117 aa) が存在し、HP1  $\alpha$  や HP1  $\gamma$  と結合することが、*in vitro* の実験で明らかにされている (Ye and Worman 1996; Ye et al., 1997)。さらに、LBR は膜貫通ドメインの間に、ステロールレダクターゼドメインに類似した配列を 2 つ持ち (Schuler et al., 1994; Holmer et al., 1998)、この配列を酵母で発現させると、C-14 ステロールレダクターゼ活性を持つことが明らかになっているが、実際の細胞内でステロールレダクターゼ活性が機能を果たしているかは不明である (Silve et al.,

1998)。

LBR は分裂期の核膜崩壊の際に、ラミン B とともにクロマチンから乖離し、膜小胞に局在したのち、分裂終期には、娘細胞の凝縮した染色体上に局在する (Haraguchi et al., 2000)。間期核膜では、HP1 $\gamma$ との結合により、ヘテロクロマチンを核膜付近につなぎとめると考えられている (Shultz et al., 2003; Zwerger et al., 2008)。特に、夜行性生物の網膜の桿体細胞では、LBR の発現量が極僅かであるために、ヘテロクロマチンが核辺縁から乖離することが報告されている (Solovei et al., 2013)

LBR はウニ、ショウジョウバエから哺乳類まで保存されており (Mann et al., 2004)、分化した細胞に一般的に発現して、核形成や核の成長に関与することが予想されているが、実際に LBR をノックダウンしても、細胞の生存や核構造に明確な影響が出ない (Wagner et al., 2004)。ヒトのホモ変異体は胚性致死、ヘテロ変異体は、症状を呈さない核の分葉化を生ずるのみであり (Best et al., 2003)、LBR の具体的な機能は明らかになっていない。

#### 4-1-5. ツメガエル胞胚の核内膜組成

アフリカツメガエルの卵母細胞及び胞胚期の細胞の核では、核ラミナを構成するラミタンパク質の組成が、一般的な培養細胞などの分化した細胞とは異なることが知られている。主に発現しているのはラミン L3 であり、加えてラミン B1 がわずかに発現しているが、ラミン B2 および、A-type ラミンは発現していない (Benavente et al., 1985; Stick and Hausen 1985; Lourim et al., 1996; Hofemeister et al., 2002)。また、ツメガエル未受精卵や胞胚期における、核内膜タンパク質の組成も、分化した一般的な体細胞とは大きく異なる。例えば、代表的な核内膜タンパク質のうち、ラミン A と相互作用することが知られている emerin が発現していないことに加え (Gareiss et al., 2005; Gareiß et al., 2015)、LAP2 $\beta$  (Lamin Associated Polypeptide beta, Lang et al., 1999) も発現しておらず、代わりに分子量の大きいスプライシングバリエントである LAP2 $\omega$ が発現することが知られている (Chmielewska et al., 2011)。さらに、当研究室のこれまでの研究により、ツメガエルの未受精卵では LBR の発現量が培養細胞の 1/10 以下であること (野本、修士論文、平成 20 年度)、胞胚期の間は LBR の発現量が低く保たれ、原腸胚以降に LBR の発現量が増加することが明らかになっている (岩渕ら、未発表) また、MAN1 (Foisner and Gerace, 1993) の発現量も培養細胞に比べ 1/3 程度と少ないことが明らかになっている (梅原、修士論文、平成 23 年度)。このように、

ツメガエル胞胚期の核内膜の構成要素は、複数種類の核内膜タンパク質が相互補償的に機能するとされている分化した細胞の核と比べ、シンプルであるといえる。胞胚期の特徴的な核内膜構成要素は、胞胚特有の核の機能と関連する可能性が考えられる。

#### 4-1-6. 原腸胚期以降にクロマチン - 核膜結合に関わる分子の候補

第3章で示した通り、ツメガエルの胞胚期の核には、豊富な F-アクチンが存在し、クロマチン - 核膜結合の維持に関与している。一方、原腸胚期に入ると核 F-アクチンは急激に減少し、原腸胚以降は核 F-アクチンによるクロマチンと核膜の結合機構は働かないことが強く示唆された。しかしながら、原腸胚の核を単離して観察しても、クロマチンは核膜から乖離しなかった (図 3-2-1、図 3-2-2)。さらに、原腸胚から単離した核を、アクチン重合阻害剤を添加した卵抽出液 (ICE) でインキュベートしても、クロマチンが核膜から単離しなかったことから、原腸胚以降の細胞の核では、F-アクチン以外の因子によって、クロマチン - 核膜結合が維持されることが予想された。そこで第4章では、原腸胚以降の細胞の核でクロマチンを核膜につなぎとめる因子(分子 X)の同定を目指した。胞胚期までの細胞では、核 F-アクチンによってのみクロマチン - 核膜結合が維持されていることから (第3章)、分子 X は胞胚期には発現していないか、発現量が非常に少なく、原腸胚期以降に発現量が上昇すると考えられた。このことから、分子 X の候補として、クロマチンを核膜につなぎとめることができると予想される核内膜タンパク質のうち、胞胚期に発現量がわずかであるか、または発現していないことが明らかになっている核内膜タンパク質に着目した。

## 4-2. 結果

### 4-2-1. ツメガエル未受精卵や胞胚期の INMP 構成要素

脊椎動物の主要な核内膜タンパク質 (INMP) であり、且つツメガエル未受精卵から胞胚期にかけて発現していないか、発現量がわずかであることが明らかとなっている LBR、MAN1、LAP2 $\beta$  について、ツメガエル未受精卵および、ツメガエル腎臓由来培養細胞: A6 を用いてウエスタンブロッティングを行い、発現量が培養細胞に比べわずかであることを確認した (図 4-2-1 A)。また、受精卵 (st. 1)、胞胚 (st. 7)、原腸胚 (st. 12)、神経胚 (st. 16) を破碎し、スクロース不連続密度勾配を用いて、遠心により脂質と卵黄を除き、核と細胞質を含む画分を得てウエスタンブロッティングを行い、受精卵から胞胚までの間は、LBR の発現量は非常に少なく、原腸胚から発現量が上昇することを確認した (図 4-2-1 B)。

### 4-2-2. 核内膜タンパク質 LBR によるクロマチン - 核膜結合の促進

上記の LBR、MAN1、LAP2 $\beta$  (図 4-2-1) に加え、ツメガエル胞胚期にはほとんど発現しないことが示されている emerin (Gareiß et al., 2005) と、ヒト培養細胞での発現が確認されている nurim (Hofemeister and O'Hare et al., 2005) を分子 X の候補とした。ツメガエルのそれら INMP ホモログに Flag タグを付加し、各々の mRNA を作製した。これら mRNA を、アクチン重合阻害剤を用いて調製したツメガエル卵抽出液 (ICE) に添加して翻訳させた。抗 Flag 抗体を用いて卵抽出液のウエスタン解析を行い、各々の外来性核内膜タンパク質の発現量が同程度になるように mRNA 量を調整した (図 4-2-2)。これらの ICE で核を形成させ、賦活後 60 分で核を固定し、カバーガラス上に回収し、抗 Flag 抗体で免疫染色した結果、外来性 INMP はいずれも核に局在していた (図 4-2-3 A)。ICE で形成される核は、成長につれクロマチンが核膜から乖離する (図 4-2-3 B、-)。そこで、上記のように ICE に外来性 INMP を発現させ、核を成長させ、クロマチン - 核膜結合の状態を解析した。その結果、クロマチン - 核膜結合は LBR-Flag を発現させた場合にのみに維持され、その他の外来性 INMP では維持されなかった (図 4-2-3 B)。このことから、LBR は核 F-アクチンの存在しない核において、クロマチン - 核膜結合の維持に働くことが示された。

### 4-2-3. クロマチン - 核膜結合に関与する LBR の内部配列

LBR は N 末端側に核質領域 (N1~N3)、C 末端側に 8 回の膜貫通領域 (TM1~8)、C

末端に短い核質領域 (Ct) を持つ (図 4-2-5; Worman et al., 1990)。N 末端側の核質領域中、初めの約 60 アミノ酸は籠状の立体構造をとり (Liokatis et al., 2012)、続く約 40 アミノ酸は、アルギニンとセリンに富んだヒンジ領域である (Nikolakaki et al., 1996)。膜結合ドメインの手前の N 末端核質領域、約 110 アミノ酸は、HP1 $\gamma$  の結合モチーフ (124-128 aa) に類似した配列を持つ以外は、他のタンパク質と共通する構造が見つかっていない。この立体構造に基づき、N 末端側から N1 (1-64 aa)、N2 (65-105 aa)、N3 (106-216 aa) ドメインとした。また、3 番目の膜貫通ドメイン (TM3) から C 末端までを含む領域を C ドメインとした (図 4-2-4 A)。C ドメインには 2 つのステロールレダクターゼドメインが含まれることが、アミノ酸配列から推定されている (Schuler et al., 1994)。クロマチン - 核膜結合に関わる LBR のドメインを同定するため、LBR 全長 (WT) と、N1、N2、N3 をそれぞれ欠損した変異体 LBR ( $\Delta$ N1,  $\Delta$ N2,  $\Delta$ N3)、N2 と N3 の両ドメインを欠損した変異体 LBR ( $\Delta$ N2-3)、C ドメインを欠損した変異体 LBR ( $\Delta$ C) の C 末端に Flag タグを付加し、mRNA を作製した (図 4-2-4 A)。これらを ICE 中で翻訳させ、それぞれの発現量がほぼ同程度となるよう mRNA の濃度を調節した (図 4-2-4 B)。この ICE 中で核を形成させ、核形成開始から 60 分の核を固定してカバーガラス上に回収し、抗 Flag 抗体を用いて免疫蛍光染色して観察した (図 4-2-5 A)。これら LBR の発現の有無によって、ICE における核の形成や成長に差はみられなかった。次に、核の Flag 蛍光強度を測定し、各々の LBR 変異体の核局在量を比較した (図 4-2-5 B)。WT の核局在量を 1 としたとき、 $\Delta$ N2、 $\Delta$ N2-3、 $\Delta$ C の核局在量は 0.6-0.7 程度、 $\Delta$ N3 の核局在量は 0.95 であった。一方、 $\Delta$ N1 の核局在量は 0.28 であり、核にほとんど局在性がみられなかった。このことから、N1 ドメインは LBR の核局在に必要であることが示された。

次に、クロマチン - 核膜結合に関与するドメインについて検討した。WT と変異体を発現させた ICE で核を大きく成長させ、DNA を Hoechst 33342 で脂質膜を DiOC<sub>6</sub> で染色して観察し、クロマチン - 核膜結合状態を解析した (図 4-2-6 A)。クロマチン - 核膜結合状態を定量的に解析するため、各々から核を無作為に 105-120 個抽出し、目視により whole-attachment (クロマチンが核膜全体に結合している)、partial-attachment (クロマチンが核膜の一部にのみ結合している)、detachment (クロマチンが完全に核膜から乖離し、核内で凝集している) に分類し、それぞれの割合を算出した (図 4-2-6 B)。mRNA を発現させない対照実験は全ての核が detachment であり、WT を導入した全ての核が whole-attachment であった。また、上述の結果より

相対核局在量が 0.62 であった  $\Delta C$  では、91%の核が whole-attachment であった。このことから、C ドメインはクロマチン - 核膜結合に関与しないことが示された。一方、 $\Delta N2$  または  $\Delta N3$  を導入した場合は、whole-attachment を示した核は 2-4%程度に過ぎず、 $\Delta N2$  を導入した核の 68%、 $\Delta N3$  を導入した核の 80%が partial-attachment であった。いずれも、相対核局在量が  $\Delta C$  と同等であることを踏まえると、LBR によるクロマチンと核膜の結合には、N2 および N3 ドメインの両方が必要であると考えられた。さらに、 $\Delta N2-3$  を導入した核の 99%が、detachment となった。このことから、N1 ドメインはクロマチン - 核膜結合の維持に関与しないことが確かめられた。

#### 4-2-4. LBR の核局在メカニズム

LBR の核局在に N1 ドメインが関与することが示されたことから (図 4-2-5)、N1 ドメイン中の核局在に必要な配列を明らかにしようと試みた。N1 ドメインは、構造解析によりバスケット状の立体構造をとることが報告されているが (Liokatis et al., 2012)、特徴的な配列を持たないことから、N1 のアミノ酸配列の前半部 ( $\Delta N2-36$ ) と後半部 ( $\Delta N34-64$ ) の欠損変異体を作製した。さらに、ヒト LBR において、16 番目のトリプトファン (ツメガエルでは 20 番目のトリプトファン) が、20 番目のリシンがジメチル化修飾されたヒストン H4 の (H4K20me2) と特異的に結合する報告がある (Hirano et al., 2012) ことから、このトリプトファンをアラニンに置換した変異体 LBR (W20A) を作製した。これら変異体 LBR の C 末端に各々 Flag タグを付加して以下の実験に用いた。WT、 $\Delta N2-36$  と W20A の mRNA を間期 ICE に添加して翻訳させ、それぞれの発現量が同程度となるようにした (図 4-2-7 A)。 $\Delta N34-64$  についても WT の発現量と同程度となるように mRNA 量を調節して ICE で翻訳させた (図 4-2-7 B、 $\Delta 37-64$ , 5.63 ng/ $\mu$ l)。WT および変異体 ( $\Delta N2-36$ , W20A,  $\Delta 37-64$ ) を同レベルで発現させた ICE で核を形成させ、賦活後 60 分の核を固定して抗 Flag 抗体を用いて免疫蛍光染色した。核当たりの Flag 蛍光強度を測定し、WT の値を 1 とした相対値を求めた (図 4-2-7 C)。その結果、 $\Delta N2-36$  および  $\Delta N37-64$  の核局在量は約 0.4-0.5 であり、 $\Delta N1$  (0.28、図 4-2-6) より高い値を示した。一方、W20A の核局在量は約 0.2 であり、核にほとんど局在しないことが示された。

#### 4-2-5. LBR の N 末端核質領域に結合する分子

LBR によるクロマチン - 核膜結合の分子メカニズムを明らかにするため、N 末端側

核質領域に結合する分子を探索した。N1-3、N1、N2 および N3 の C 末端に GST タグを付加したリコンビナントタンパク質 (LBR-GST) を大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースビーズに結合させたのち、間期 ICE と反応させプルダウンした。プルダウン後のビーズ画分に含まれる各々の LBR-GST を定量したのち(図 4-2-8 A)、各々泳動量が同じになるようにサンプルを調整してビーズ結合成分のウエスタンブロッティングを行った。その結果、N2-GST にはヒストン H3、H4 および H2AX-F が検出された (図 4-2-8 B)。ヒストン H2AX-F は、ヒストン H2A の初期胚型バリエーションである (Shechter et al., 2009)。N2 ドメインには DNA が結合するという報告があることから (Ye and Worman, 1994)、リコンビナントタンパク質作成の際に大腸菌由来の DNA が N2 ドメインに結合し、その DNA にヒストンが結合したために、N2-GST のビーズ画分にヒストンが検出された可能性も考えられた。これを検証するため、N2-GST をヌクレアーゼ処理して核酸を分解したのち(図 4-2-9 A)、プルダウン解析に用いた。プルダウン産物を抗ヒストン H3 抗体でウエスタンブロッティングした結果、ヌクレアーゼ処理の有無にかかわらず、ヒストン H3 は N2-GST に結合することが確かめられた (図 4-2-9 B)。したがって、LBR の N2 ドメインにはヒストン H3, H4, H2AX-F が結合することが示された。また、N3 ドメインにはラミン B1 と HP1 $\gamma$  が結合することが示された (図 4-2-8 B)。ツメガエル胞胚の主要なラミンサブタイプであるラミン L3 (Stick and Hausen 1985; Hofemeister et al., 2002) は、卵抽出液における濃度がラミン B1 より 10 倍程度高い (Lourim et al., 1996) ことを考慮すると、N1、N2、N3 のどのドメインに対しても結合性は高くないと考えられた (図 4-2-8 B)。

#### 4-2-6. LBR によるクロマチン - 核膜結合の維持は、DNA 複製に影響を与えない

卵や胞胚期には LBR はわずかししか発現していない (図 4-2-1)。それらで形成される核 (胞胚型核) に、LBR によるクロマチン - 核膜結合を導入した場合、核内膜層構造が変化し、DNA 複製などの核の機能に影響を及ぼすことが考えられた。これらを検証するため、まず LBR によるクロマチン - 核膜結合が DNA 複製に影響を与えるかを調べた。LBR WT の mRNA を翻訳させた ICE に DY-590-dUTP を添加し、精子クロマチンを加えたのちに賦活して核を形成させた。賦活後 45 分、60 分、90 分で核を固定し、DNA を Hoechst 33342 で、ラミン L3 を特異抗体で免疫染色して共焦点蛍光顕微鏡で観察した (図 4-2-10 A)。次に、核当たりの DY-590 の蛍光強度を測定し、DNA 複製によって核に取り込まれた dUTP とした。対照実験には、LBR の mRNA を加えない



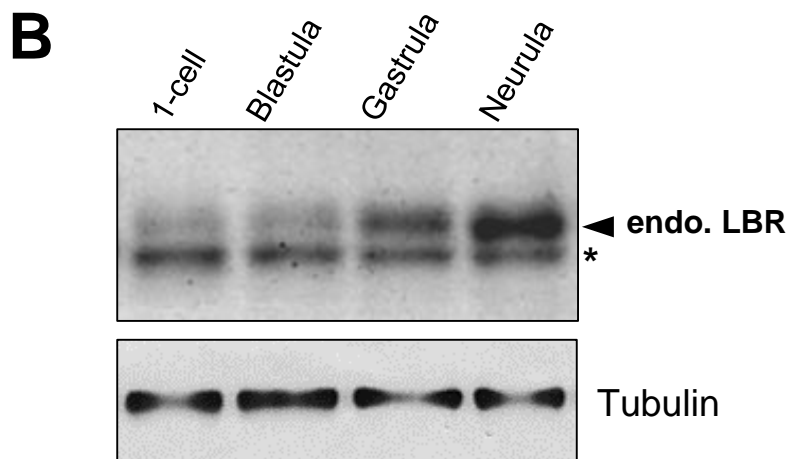
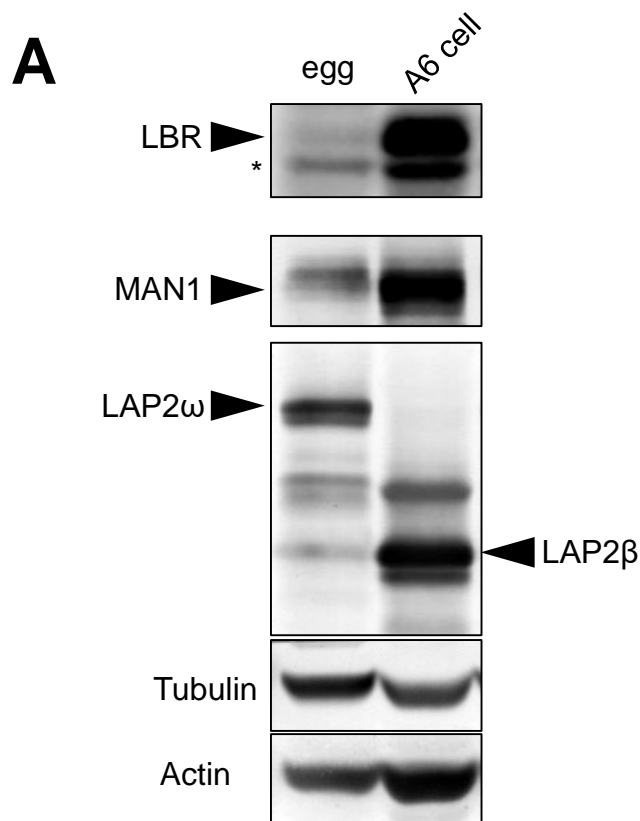
ICE と、LBR の mRNA および DY-590-dUTP の両方を加えない ICE を用いた。その結果、dUTP の取り込みは、45 分では極僅かであり、60 分では取り込み量が増え、90 分ではさらに増大した (図 4-2-10 B)。いずれの時間においても、外来性 LBR の有無によらず dUTP の取り込み量に差はなく、LBR によるクロマチン - 核膜結合は DNA の複製には影響を与えないことが示された。

#### 4-2-7. LBR によるクロマチン - 核膜結合は胞胚型核の核ラミナ構造を乱す

次に、LBR によるクロマチン - 核膜結合が核内膜層の構造に影響を与えるかを調べた。LBR (WT) -Flag とその変異体 ( $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$ ) の mRNA を添加した ICE に、精子クロマチンを加えて賦活し、核を形成させた。賦活後 60 分でシクロヘキシンミドを添加して細胞周期を間期に停止させ、180 分までインキュベートして核を大きく成長させた。卵抽出液を固定したのち、強い遠心力で核をカバーガラス上に回収し、シート状となった核膜について、DNA を Hoechst 33342 で、外来性 LBR を抗 Flag 抗体で、核ラミナを抗ラミン L3 抗体で免疫蛍光染色して観察した (図 4-2-12、4-2-13)。その結果、WT、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$  は、いずれも核膜に局在していた。WT を導入した核膜では、クロマチンが核膜全体に結合している様子が観察されたが、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$  を導入した核では、対照実験 (ー)と同様に、核膜上に存在するクロマチンはわずかだった (図 4-2-12、4-2-13)。核膜上のクロマチンと外来性 LBR、および核ラミナを詳しく観察するため、図 4-2-12 で示した、白枠領域を拡大した (図 2-4-13)。その結果、WT を導入した核では、核膜に結合したクロマチンと WT は、クラスターを形成していた。一方、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$  は核膜上で均一な分布を示した。また、対照実験 (ー) や  $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$  を導入した核では、ラミン L3 の均一でスムーズな核ラミナ構造が観察されたが、WT を導入した核では、核ラミナ構造が不均一で、部分的に疎な領域が観察された (図 4-2-13 A)。すなわち、クロマチンと核膜の結合を維持できない LBR 変異体の導入では、核ラミナは対照実験と同様に均質に形成されるが、WT によってクロマチンが核膜に結合した核では、核ラミナ構造に乱れが生じることが示された。

WT を導入した核で、ラミナ構造の乱れが観察されたが、ラミナ構造が疎な領域とクロマチンの結合している領域、および LBR WT のクラスターが形成された領域の関係を明らかにするため、クロマチンと LBR WT、クロマチンとラミン L3、LBR とラミン L3 の局在を観察した (図 4-2-13 B)。その結果、クロマチンと LBR WT のクラスター

は、近接して存在した (図 4-2-13 B、下段、Hoechst/ $\alpha$ -Flag)。さらに、ラミン L3 が疎の領域と、クロマチンおよび LBR WT のクラスターの局在が一致した (図 4-2-13 B、下段、Hoechst/ $\alpha$ -Lamin L3、 $\alpha$ -Lamin L3/ $\alpha$ -Flag)。このことから、クラスター化した LBR によってクロマチンが核膜に結合した領域では、ラミン L3 による核ラミナ構造が疎になることが示された。

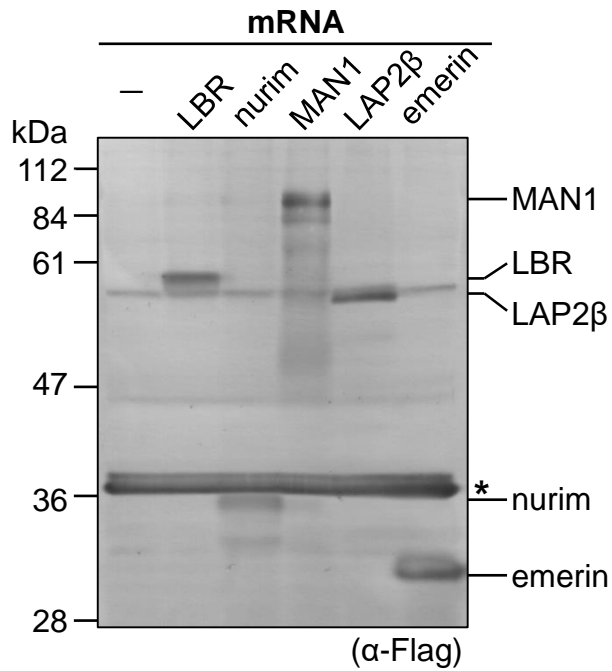


**図 4-2-1 ツメガエル未受精卵の核内膜タンパク質組成**

(A) 核内膜タンパク質LBR、MAN1、LAP2について、それぞれの特異抗体を用いて、ウエスタン解析を行い、ツメガエルの未受精卵(egg)とツメガエル腎臓由来培養細胞:A6における発現量を比較した。チューブリンとアクチンをローディングコントロールとした。

\*: non-specific signal

(B) 受精卵(st.1)、胞胚(st. 7)、原腸胚 (st. 12)、神経胚 (st. 16)から核と細胞質を含む画分を調製し、培養細胞A6の細胞抽出液とともに、抗LBR抗体と抗チューブリン抗体を用いてウエスタンブ解析を行った。\*: non-specific signal



#### 図 4-2-2 卵抽出液における外来性核内膜タンパク質の発現

Flag タグを付加した LBR、nurim、MAN1、LAP2β、emerin の mRNA を、アクチン重合阻害剤を添加して調整した卵抽出液 (ICE) 中で翻訳させ、抗 Flag 抗体を用いたウエスタン解析により、発現量を確認した。\*: non-specific signal

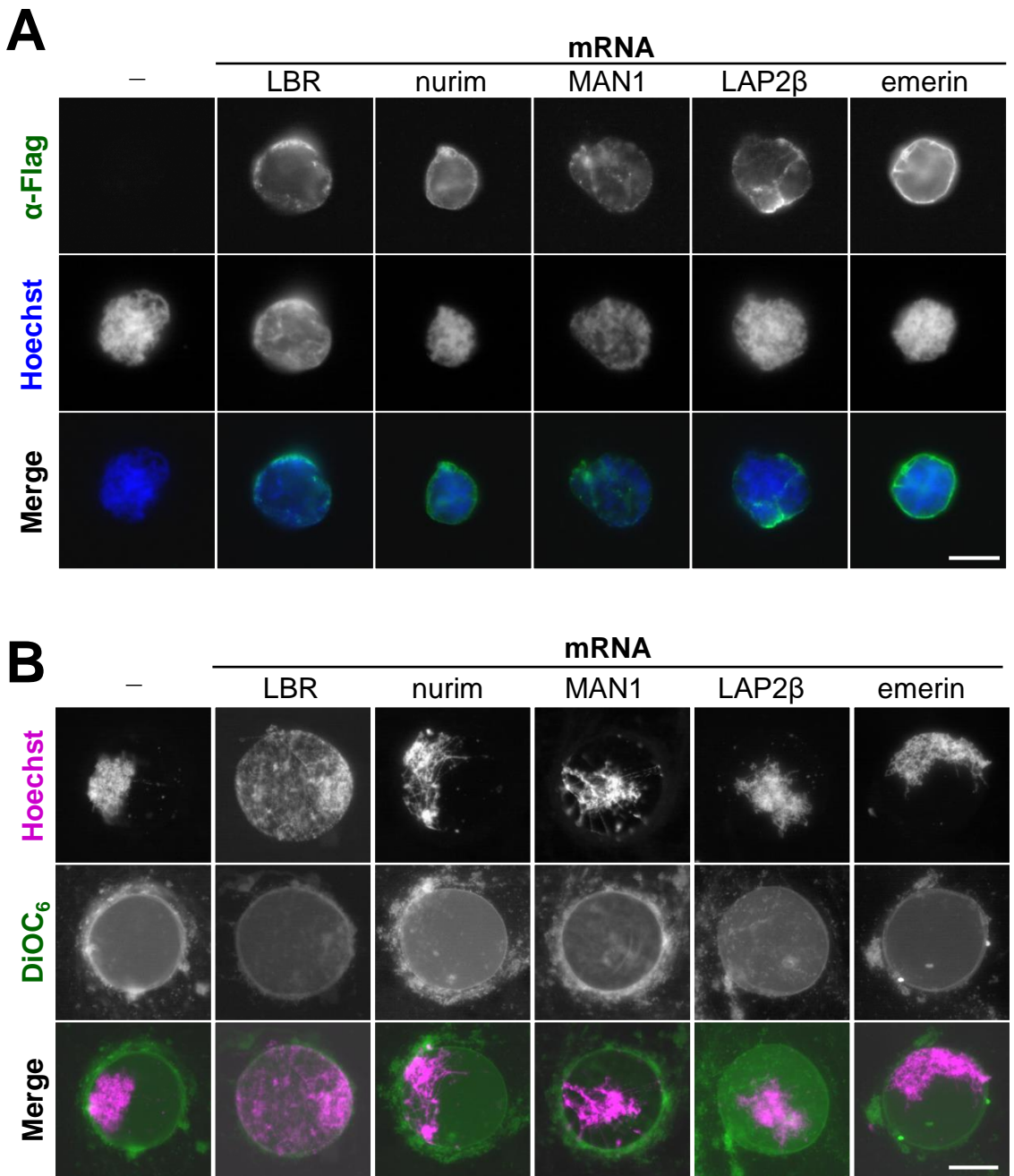
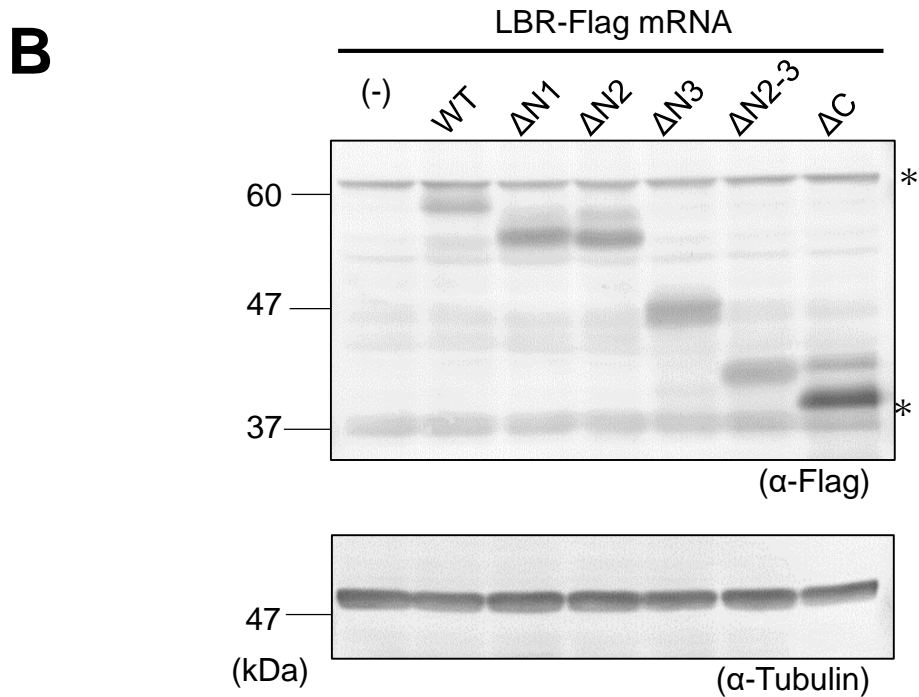
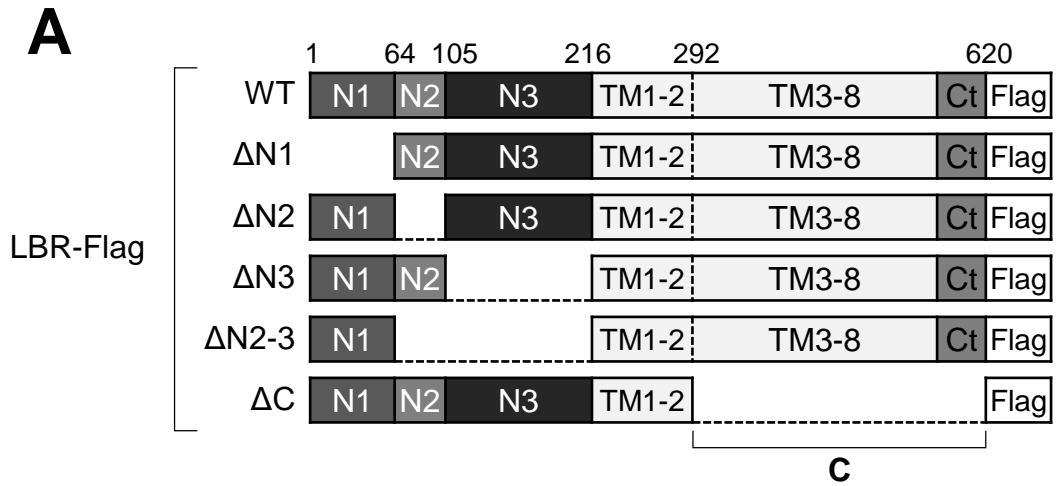


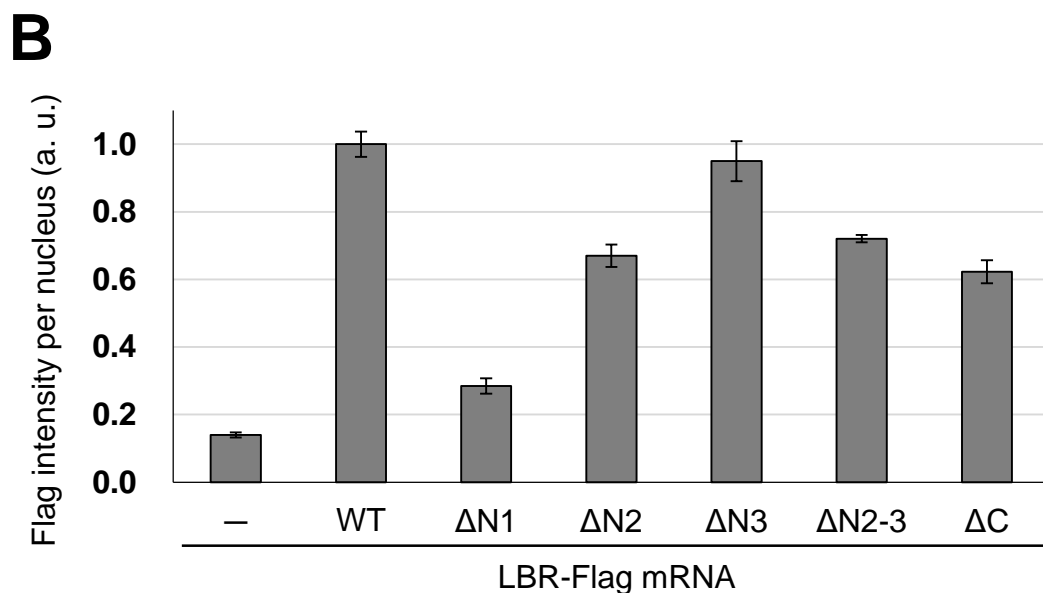
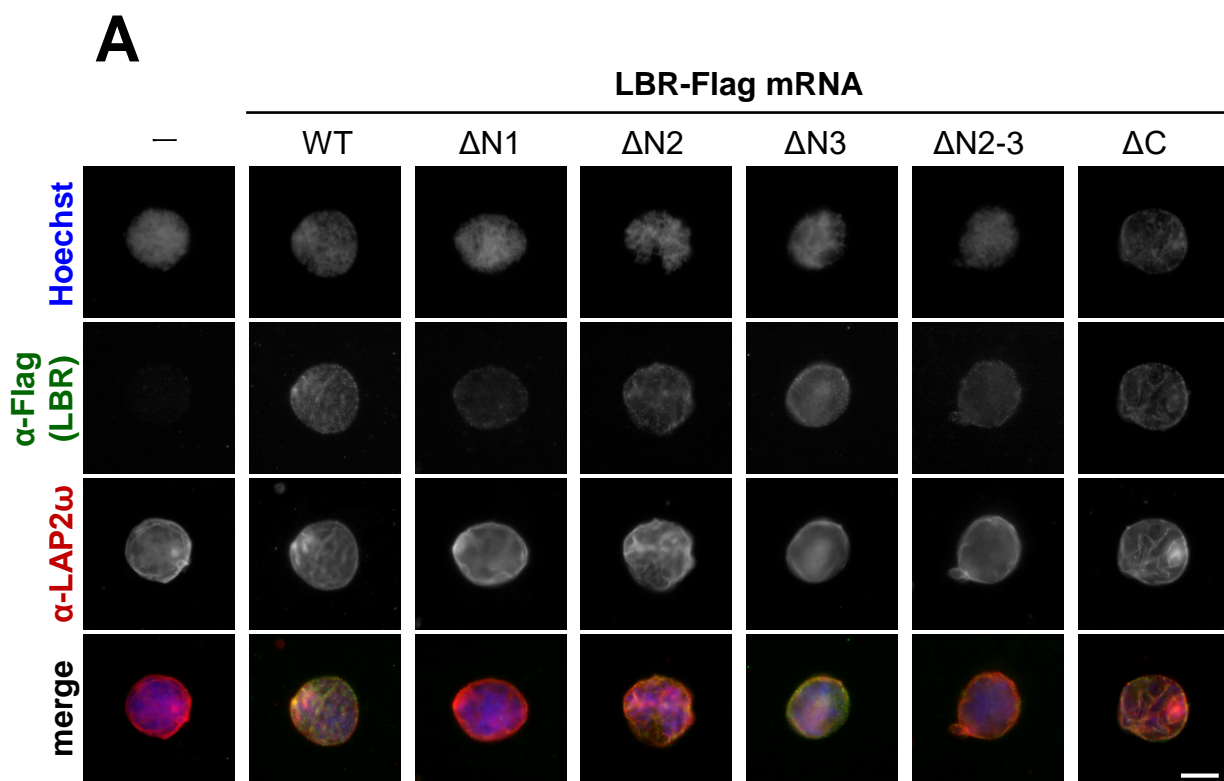
図 4-2-3 核内膜タンパク質LBRによるクロマチン - 核膜結合

- (A) Flagタグを付加したLBR、nurim、MAN1、LAP2 $\beta$ 、emerinを発現させたICEに精子クロマチンを加えて賦活し、核を形成させた。賦活後60分の核を固定し、カバーガラス上に回収して、抗Flag抗体を用いて免疫蛍光染色し、DNAをHoechst 33342で染色して、全視野蛍光顕微鏡で観察した。Flagの蛍光シグナルにより、各外来性核内膜タンパク質が核に局在することを確認した。Scale bar: 10  $\mu$ m
- (B) (A)の核を、賦活後180分までインキュベートして大きく成長させた。核を固定し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で染色し、全視野蛍光顕微鏡を用いて、クロマチン - 核膜結合状態を解析した。Scale bar: 20  $\mu$ m



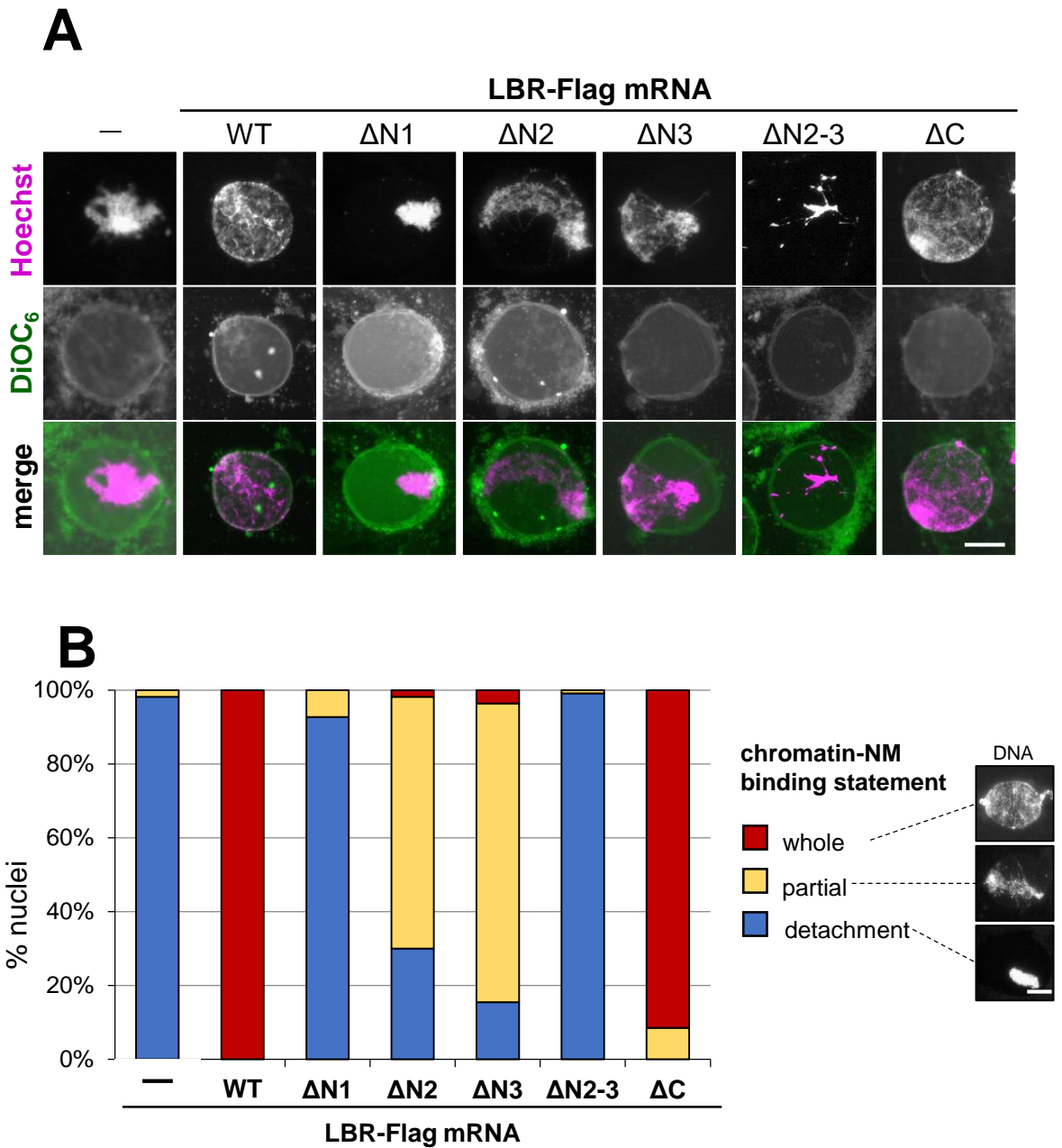
**図 4-2-4 LBRとその欠損変異体**

- (A) LBRの全長(WT)とその欠損変異体 (ΔN1、ΔN2、ΔN3、ΔN2-3、ΔC) のC末端にFlagタグを付加。TM: 膜貫通ドメイン、Ct: C末端核質領域、Cドメイン: TM3-8 + Ct
- (B) (A)で作製した各LBR-FlagのmRNAをin vitroで合成性、間期ICEで翻訳させ、卵抽出液を抗Flag抗体 (上) と抗チューブリン抗体 (下) を用いてウエスタン解析した。\*: non-specific signal



**図 4-2-5 LBR変異体の核局在性**

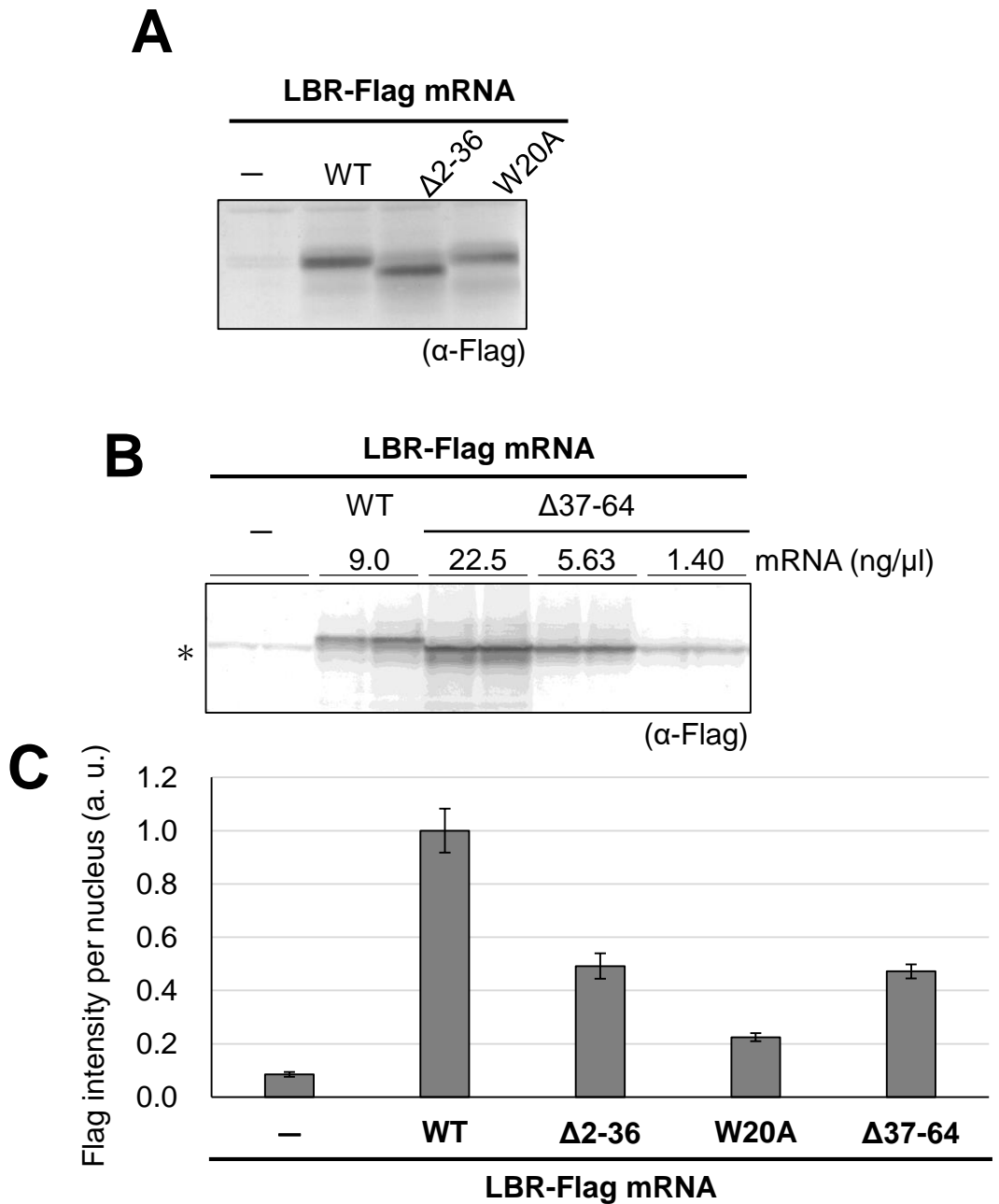
- (A) LBRの全長(WT)と変異体 ( $\Delta N1$ 、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$ 、 $\Delta C$ ) のC末端にFlagタグを付加し、ICEで発現させた。それらに精子クロマチンを加えて賦活し、核を形成させた。賦活後60分の核を固定し、カバーガラス上に回収して、抗Flag抗体、抗LAP2 $\omega$ 抗体、Hoechst 33342で免疫蛍光染色し、全視野蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 10  $\mu$ m
- (B) (A) の核について、核当たりのFlag蛍光量を計測し、外来性LBRの核局在量とした。WTの核局在量を1として各々の相対値をグラフに示した。Mean  $\pm$  SEM, N = 80-155



**図 4-2-6 クロマチン - 核膜結合に関するLBRの内部配列**

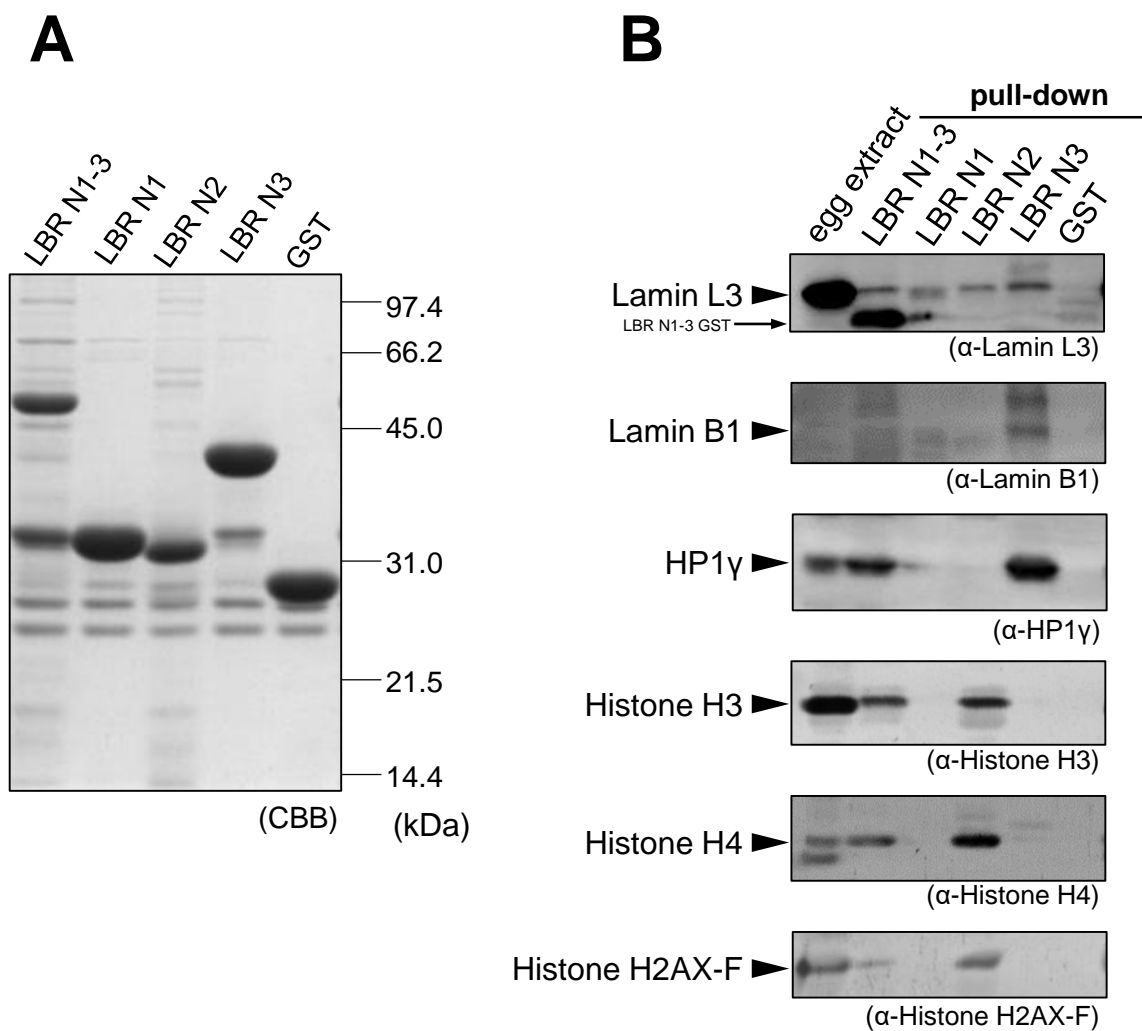
- (A) LBRの全長(WT)と変異体 ( $\Delta N1$ 、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$ 、 $\Delta C$ ) のC末端にFlagタグを付加しICEで発現させた。それらに精子クロマチンを加えて賦活し、150分までインキュベートして核を大きく成長させた。核を固定し、DNAをHoechst 33342で、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で染色し、全視野蛍光顕微鏡を用いて、クロマチン - 核膜結合状態を解析した。Scale bar: 20  $\mu$ m
- (B) (A) の核について、クロマチン - 核膜結合状態を目視により、whole-attachment (red)、partial-attachment (yellow)、detachment (blue) の3つに分類しそれぞれの割合をグラフに示した。Scale bar: 20  $\mu$ m, N = 105-120





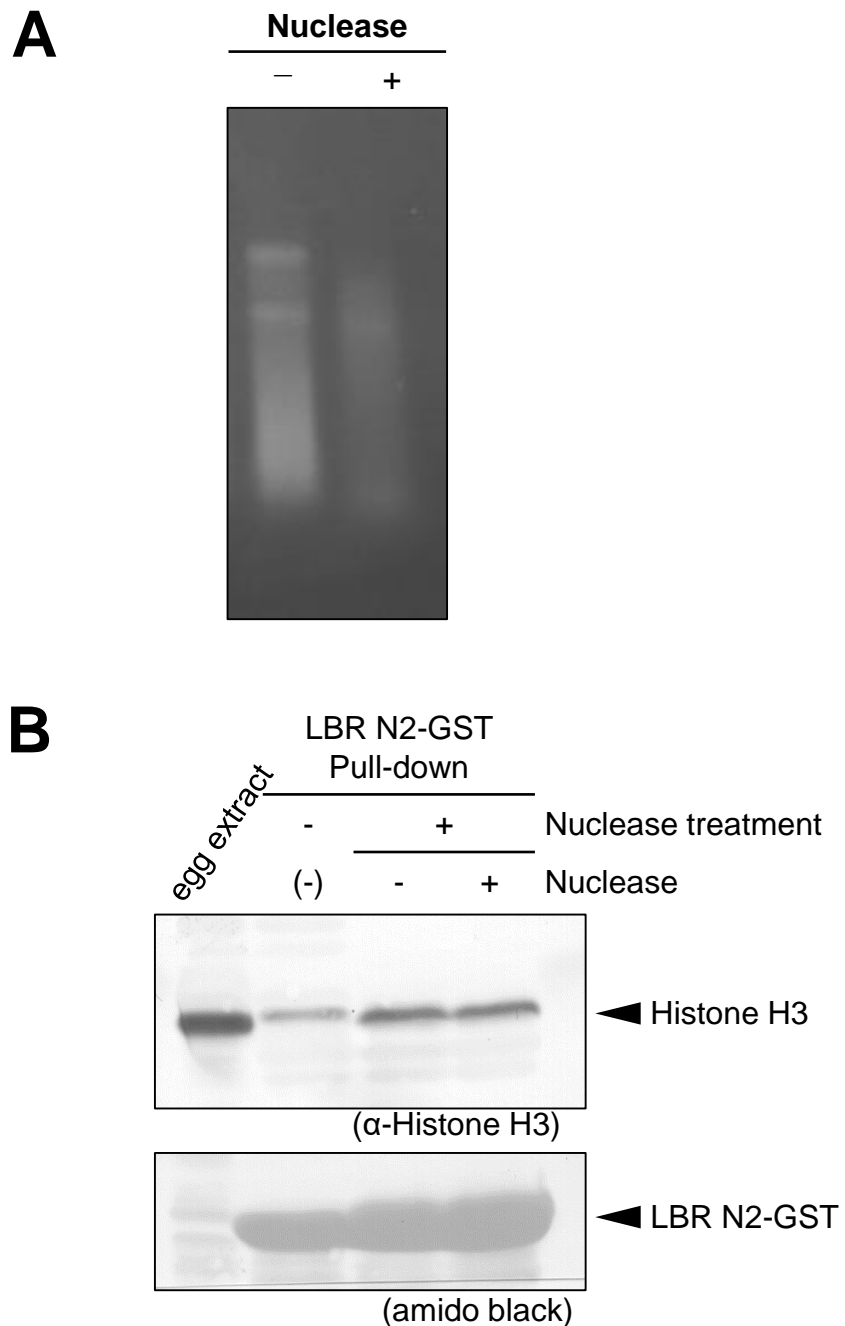
**図 4-2-7 LBRの核局在に関わる配列の探索**

- (A) LBRの全長 (WT) とN1ドメインの変異体 ( $\Delta 2-36$ 、W20A) のC末端にFlagタグを付加し、それらを発現させたICEを、抗Flag抗体を用い解析した。\*: non-specific signal
- (B) N1ドメインの変異体 ( $\Delta 37-64$ )のC末端にFlagタグを付加し、(A)と同様にICEに発現させてウエスタン解析した。 $\Delta 37-64$ の発現量がWTの発現量と同程度となるmRNAの濃度 (5.63 ng/μl) を以降の実験に採用した。
- (C) 上記のLBR-FlagをICEに発現させ、精子クロマチンを加えて賦活し、核を形成させた。賦活後60分の核を回収して、抗Flag抗体および核膜マーカーとして抗LAP2w抗体を用いて免疫蛍光染色し、抗Flag抗体、抗LAP2w抗体、Hoechst 33342で免疫蛍光染色した。これらの核を、全視野蛍光顕微鏡で観察し、核当たりのFlag蛍光量を定量して、外来性LBRの核局在量とした。WTの核局在量を1とした各々の相対値をグラフに示した。Mean  $\pm$  SEM, N = 30-31



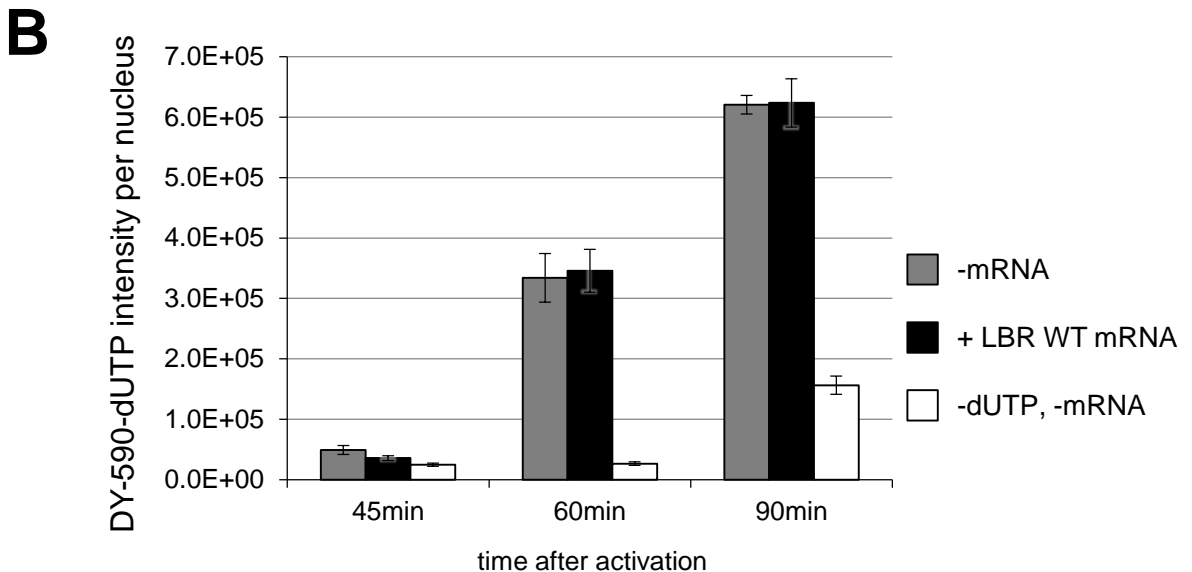
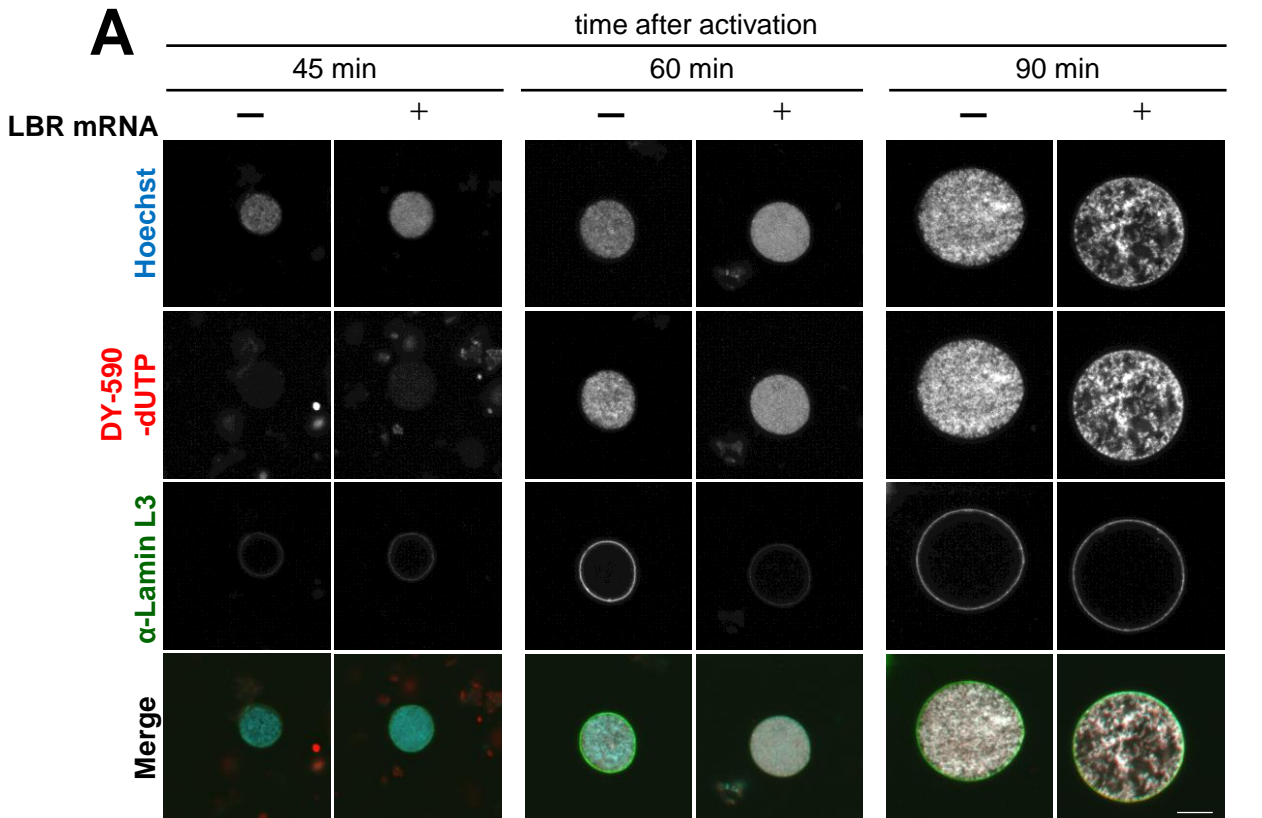
#### 図 4-2-8 LBRのN末端核質領域に結合する分子の探索

- (A) LBRのN末端側核質領域 (N1-3) およびN1、N2、N3の各ドメインのC末端にGSTタグを付加したリコンビナントタンパク質を大腸菌を用いて作製し、グルタチオンセファロースビーズに結合させた。間期ICEと反応させた後のビーズ溶出画分についてSDS-PAGEを行い、ゲルをCBB染色して、溶出画分に含まれるリコンビナントタンパク質の量を定量した。
- (B) (A)で求めたリコンビナントタンパク質量をもとに泳動量を補正し、抗ラミン L3抗体、抗ラミン B1抗体、抗ヒストンH3抗体、抗ヒストンH4抗体、抗ヒストンH2AX抗体を用いてウエスタン解析を行った。



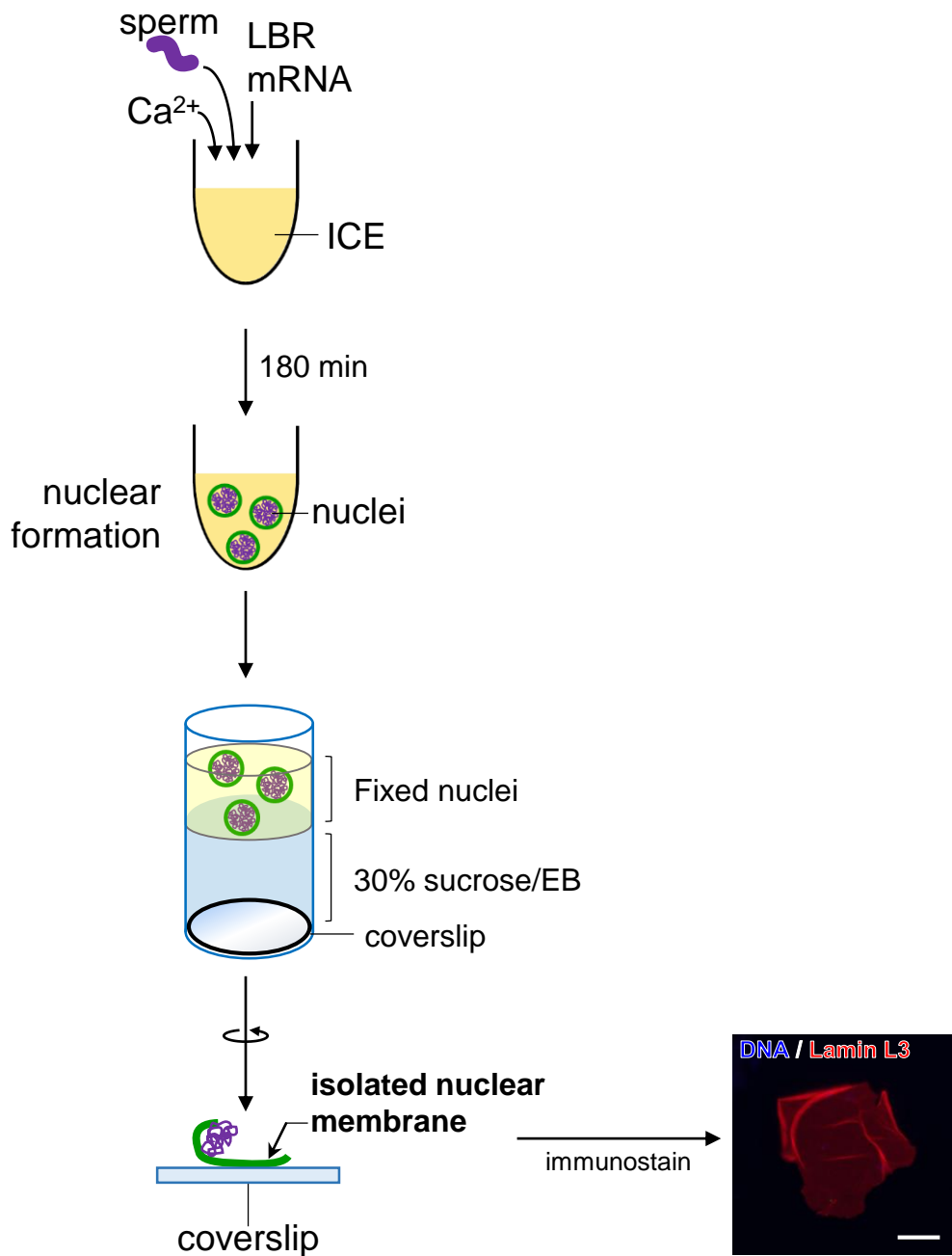
**図 4-2-9 LBRのN2ドメインへのヒストンの結合は大腸菌ライセート中のDNA/RNAに依存したものではない**

- (A) LBR N2-GSTを含む大腸菌ライセートに、ヌクレアーゼを加えて室温でインキュベートしたのち、除タンパクし、アガロースゲルで電気泳動したのちDNA/RNAを検出した。
- (B) (A)でヌクレアーゼ処理したLBR N2-GSTライセートをグルタチオンセファロースビーズに結合させ、間期ICEと反応させた。このビーズ画分に対し、抗ヒストンH3抗体(上)を用いてウエスタン解析を行った。ビーズ画分のN2-GSTはアミドブラックで検出した(下)。



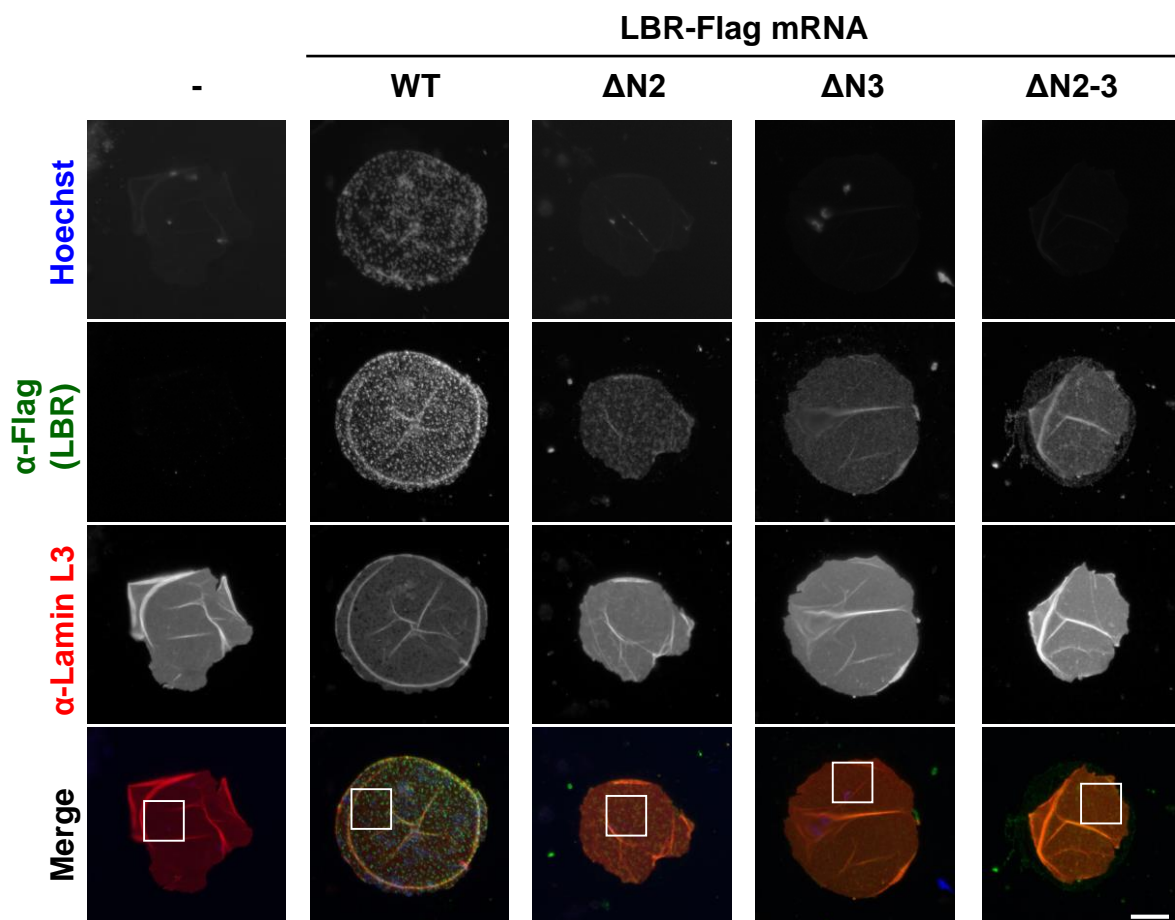
**図 4-2-10 LBRによるクロマチン - 核膜結合はDNA複製に影響を与えない**

- (A) LBR-Flag (WT) を発現させたICEにDY-590-dUTPを添加し、精子クロマチンを加えて核を形成させた。賦活後、45分、60分、90分の核を抗ラミンL3抗体とHoechst 33342で免疫蛍光染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。Scale bar: 10  $\mu$ m
- (B) (A)の核をカバーガラス上に回収して、DNAをHoechstで、脂質膜をDiOC<sub>6</sub>で染色し、核を全視野蛍光顕微鏡で観察した。HoechstとDiOC<sub>6</sub>で染色される核領域内のDY-590-dUTPのシグナルを、画像解析ソフトNIS-elements 3.14 (Nikon)を用いて解析し、核当たりのDY-590-dUTPの蛍光量を測定した。N = 15, Mean  $\pm$  SEM



#### 図 4-2-11 核膜単離法

ICEにLBR-FlagのmRNAを添加し、精子クロマチンを加えて賦活し、核を形成させた。シクロヘキシミドを添加して細胞周期を間期に停止させ、賦活後180分までインキュベートして、核を大きく成長させた。この核を固定し、30% スクロース/EBに重層して遠心することにより、カバーガラス上にシート状の核膜を回収した。回収した核膜は、免疫蛍光染色を行って、図2-4-12の核膜の観察に用いた。Scale bar: 10  $\mu$ m



**図 4-2-12 核膜上のLBRとクロマチンの観察**

LBR-Flag (WT、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$ ) を発現させたICEに、精子クロマチンを加えて賦活し、賦活後180分までインキュベートして、核を大きく成長させた。図2-4-11で示した方法で核膜を単離し、抗Flag抗体、抗ラミン L3抗体を用いて免疫蛍光染色し、DNAをHoechst 33342で染色して、全視野蛍光顕微鏡を用いて核ラミナを観察した。Scale bar: 10  $\mu$ m、白枠線: 拡大観察領域 (図 4-2-13 A)

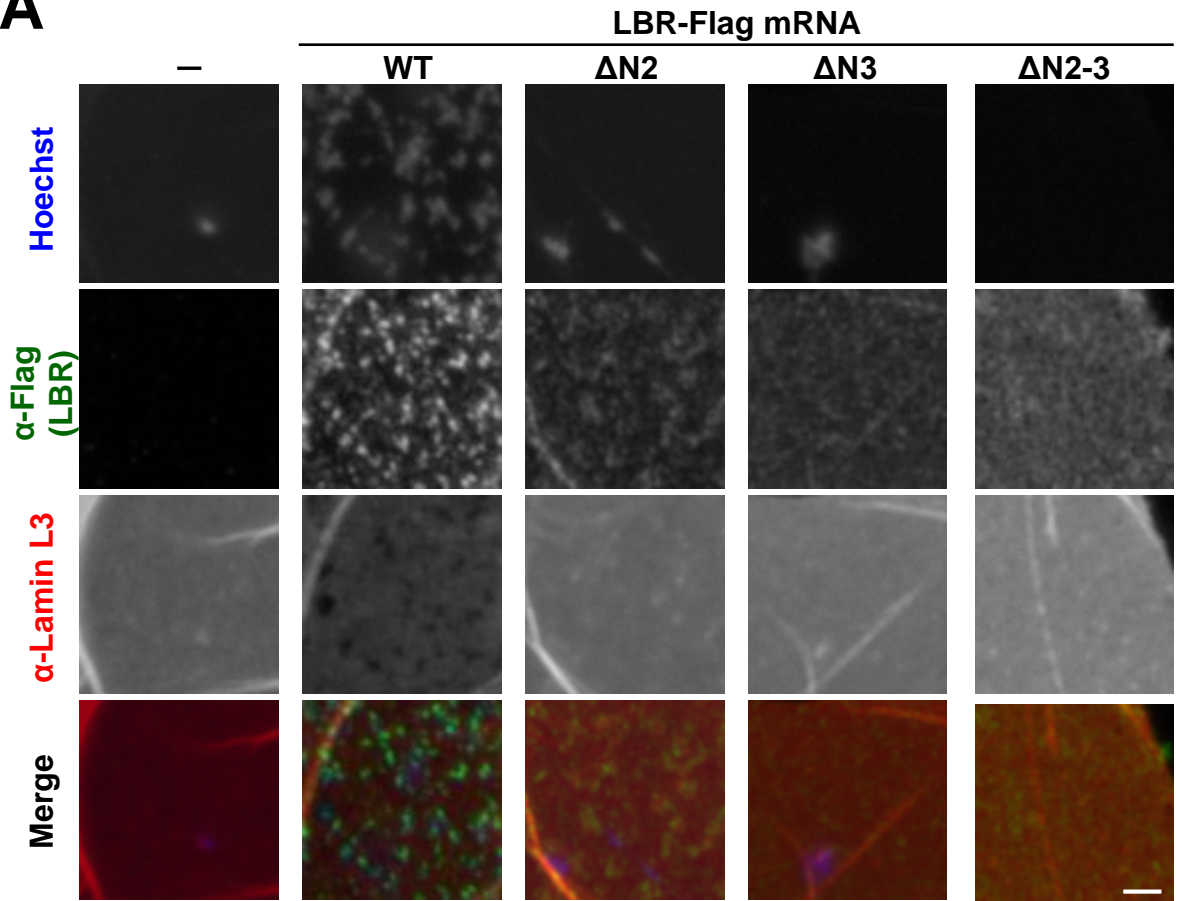
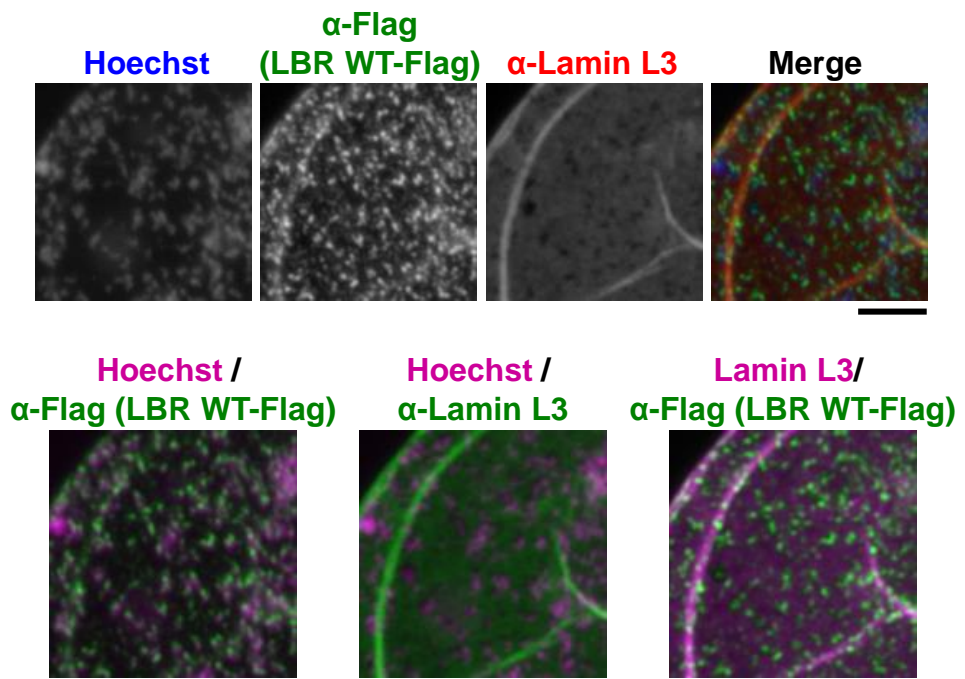
**A****B**

図 4-2-13 LBRによる核ラミナ構造の乱れ

- (A) 図4-2-13で示した白枠線の領域を拡大し、クロマチンと外来性LBRの局在およびラミン L3によって形成される核ラミナ構造を観察した。Scale bar: 2  $\mu$ m
- (B) LBRのWTを導入した核について、クロマチンとLBR、クロマチンとラミン L3、LBRとラミン L3についてそれぞれMerge画像を作製した。Scale bar: 5  $\mu$ m

### 4-3. 考察

#### 4-3-1. 核内膜タンパク質 LBR によるクロマチン - 核膜結合

アクチン重合阻害剤を添加して調製した ICE に、外来性核内膜タンパク質を発現させたのち、核を形成させてクロマチン - 核膜結合状態を解析した結果、F-アクチン以外にクロマチン - 核膜結合を維持できる因子として、LBR を同定した (図 4-2-3)。未受精卵には内在性 LBR がわずかに存在するが (図 4-2-1)、クロマチン - 核膜結合の維持には量的に十分でないと考えられる。LBR 以外の外来性核内膜タンパク質は、いずれもクロマチン - 核膜結合を維持できなかった。LAP2 $\beta$ 、emerin はいずれも、核質領域に共通したドメイン; LEM (LAP2, Emerin, MAM1) ドメインを持ち、この LEM ドメインに結合する BAF を介してクロマチンと相互作用することが報告されているが (Furukawa et al., 1999; Shumaker et al., 2001; Lee et al., 2001; Mansharanami et al., 2005)、LEM ドメインとクロマチンとの相互作用では、クロマチン - 核膜結合を維持できないことが示された。このことから、LBR が発現している細胞では、LBR によって核膜につながり留められたクロマチンに対して、ラミンや他の核内膜タンパク質が相互作用することで、遺伝子発現制御やクロマチン複製の制御が行われていると推測される。

また、LBR は胞胚期まではごくわずかししか発現していないが、原腸胚以降に発現量が増加することから (図 4-2-1)、核 F-アクチンが豊富な胞胚期までは、LBR によるクロマチン - 核膜結合維持機構は機能せず、原腸胚期に核 F-アクチン消失し、LBR の発現量が上昇して、LBR によるクロマチン - 核膜結合維持機構が機能すると考えられる。胞胚期から原腸胚期にかけて、クロマチン - 核膜結合維持機構が F-アクチンによるものから LBR によるものに転換することは、胞胚から原腸胚にかけて大きく変化する核の機能的性質である、転写の活性化に関与する可能性が考えられる。

#### 4-3-2. LBR の核局在メカニズム

LBR の核局在メカニズムについては、これまでに N 末端核質領域 (N1-3) が核局在に必要であることが報告されていたが (Smith and Blobel, 1993)、それよりも詳細な配列は明らかでなかった。また、ヒトの LBR の 63-79 aa と 93-108 aa にヌクレオプラスミンの NLS に似た配列があるとされていたが (Olins et al., 2010)、実際にこの配列が核局在に寄与するかについての報告はなかった。本研究のドメイン解析の結果、 $\Delta$ N1 が核に局在しないこと (図 4-2-5)、 $\Delta$ N2-3 は核に局在することから (図 4-2-6)、LBR



の核局在には N1 ドメインが必要であることが明らかとなった。N1 ドメイン領域を、さらに詳しく調べた結果、N1 ドメインの前半を欠損した  $\Delta 2-36$ 、および N1 ドメインの後半を欠損した  $\Delta 37-64$  は、いずれも  $\Delta N1$  より核局在量が多いものの、N1 以外のドメインを欠損した変異体に比べ、低い核局在量を示した (図 4-2-7 C)。このことは、N1 ドメインの広範な領域が LBR の核局在に必要であることを示すものである。また、H4K20me2 との相互作用に必要であることが示されている 20 番目のトリプトファン (Hirano et al., 2012) をアラニンに置換した W20A は、 $\Delta N1$  同様、ほとんど核に局在しなかった (図 4-2-7 C)。N1 ドメインは、5 つの  $\beta$  シートと 1 つの  $\alpha$  ヘリックスが、疎水性アミノ酸によってバスケット状の立体構造をとることが、構造解析によって示されている (Liokatis et al., 2012)。このうち、4 つのアミノ酸の側鎖が、バスケット構造の表面でクラスターを形成するとされている。この 4 つのアミノ酸は種間での保存性が非常に高く、20 番目のトリプトファンは、このクラスターを形成するアミノ酸の 1 つである (Liokatis et al., 2012)。このことから、W20A では N1 ドメインのアミノ酸の側鎖によるクラスターが形成されず、N1 ドメインの立体構造が変化したために、LBR の核局在が阻害されたと考えられる。以上の結果から、LBR の核局在には、N1 ドメインの広範な領域が必要であり、且つ、N1 ドメインの立体構造が維持されることが重要であると推測される。

#### 4-3-3. LBR によるクロマチン - 核膜結合の分子メカニズム

C 末端に Flag タグを付加した LBR WT、 $\Delta N1$ 、 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 、 $\Delta N2-3$  および  $\Delta C$  を発現させた ICE を用いて核を形成させ、クロマチン - 核膜結合状態を解析したところ、N2 および N3 ドメインの両方が、クロマチンと核膜の結合に関わることが明らかになった。 $\Delta N2$  および  $\Delta N3$  ではいずれも、クロマチン - 核膜結合状態が *partial-attachment* を示す核の割合が最も多く (図 4-2-6)、N2 および N3 ドメインを両方欠損した  $\Delta N2-3$  では、ほとんど全ての核でクロマチンが完全に乖離したことから、N2、N3 ドメインのそれぞれが、クロマチンと直接または間接的に相互作用することが予測された。さらに、GST プルダウン実験により、N2 ドメインにはヒストンが、N3 ドメインにはラミン B1 と HP1 $\gamma$  が結合することが示された (図 4-2-8)。このことから、LBR と N2 ドメインとコアヒストン、および N3 ドメインとクロマチン上の HP1 $\gamma$  の相互作用によって、クロマチン - 核膜結合が完全に維持される (*whole-attachment*) と考えられる。

これまでに、Solovei ら (2013) の報告によれば、哺乳類の桿体細胞の核において、LBR はヘテロクロマチンを特異的に核膜につなぎとめるとされている。本研究で用いた ICE で形成した核には、明確なヘテロクロマチン領域が存在しないとされているが、LBR によって、クロマチン全体が核膜に結合する様子が観察されたため (図 4-2-3、2-4-6)、この結果は一見 Solovei らの報告と矛盾する。しかしながら、LBR との相互作用が示された HP1 $\gamma$  (図 4-2-8) は、ヘテロ/ユークロマチンの両方に局在する (Minc et al., 2001) こと、ツメガエル卵には豊富な HP1 $\gamma$  が存在すること (図 4-2-8) を合わせて考えると、ICE で形成した核ではクロマチン全体に局在する HP1 $\gamma$  を介してクロマチン全体が LBR に結合すると考えられる。

#### 4-3-4. LBR によるクロマチン - 核膜結合が胞胚型核の構造へ与える影響

C 末端に Flag タグを付加した LBR WT と各変異体 ( $\Delta$ N2、 $\Delta$ N3、 $\Delta$ N2-3) を発現させた ICE を用いて核を形成させ、核膜を単離して解析した結果、WT を発現させクロマチン - 核膜結合が維持された核では、単離した核膜全体にクロマチンが結合している様子が観察された。一方、 $\Delta$ N2 および  $\Delta$ N3 では、クロマチン - 核膜結合状態の解析では *partial-attachment* を示す核が多かったにもかかわらず (図 4-2-6)、単離した核膜上にクロマチンはほとんど局在していなかった (図 4-2-12、図 4-3-13) ことから、N2 および N3 ドメインのいずれが欠けても完全なクロマチン - 核膜結合状態を保つことはできないが、N2 および N3 ドメイン両方を有する WT によるクロマチン - 核膜結合の維持は、非常に堅固であると考えられる。

単離核膜上で、WT はクラスターを形成しており、このクラスターは核膜上のクロマチンと近接して存在していた。一方で、クロマチン - 核膜結合領域を欠損している  $\Delta$ N3、 $\Delta$ N2-3 では、変異体 LBR は WT のようなクラスターを形成していない。 $\Delta$ N2 はわずかにクラスター様の構造が観察されるものの、WT のような鮮明な構造をとらない (図 4-2-13)。このことから、クロマチン - 核膜結合の維持と、LBR が核膜上でクラスター構造を形成することには関連があると考えられる。しかしながら、LBR がクラスター構造を形成するために、クロマチンが核膜に結合するのか、クロマチンが核膜に結合した結果、LBR がクラスター構造を形成するのかについては不明である。

興味深いことに、LBR WT を導入しクロマチン - 核膜結合が維持された核では、ラミン L3 で構成される核ラミナ構造に乱れが生じた (図 4-2-13)。特に、クロマチンと LBR がクラスターを形成する部分では、ラミン L3 が疎になり、核ラミナ構造に穴が

開いていた (図 4-2-13)。さらに、LBR は N 末端核質領域で B-type ラミンに結合することが知られている (Worman et al., 1988; Simos et al., 1992) が、プルダウン実験の結果、B-type ラミンであるラミン L3 は卵抽出液中には豊富に存在しているにもかかわらず (Lourim et al., 1996)、LBR の N 末端核質領域にはごくわずかしか結合しなかった (図 4-2-8)。これらのことから、LBR はラミン L3 と親和性が低いことが示され、このために LBR がクラスターを形成している領域で、ラミン L3 によるラミナ構造が疎になったと考えられる。ラミナ構造の乱れは、転写やゲノムの安定性に影響を及ぼす可能性が考えられる。例えば、培養細胞を用いた研究により、核ラミナ構造の乱れは核内の RNA polymerase II の局在を変化させることが報告されている (Shimi et al., 2008)。また、ラミン A の変異による早老症 (Hutchinson-Gilford progeria syndrome) の患者の細胞では、DNA 損傷の増加や、ヘテロクロマチン特異的なヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化修飾 (H3K9me3) の減少などが起こることが報告されている (Liu et al., 2005; Scaffidi and Midteli 2005)。これらのことから、LBR によるクロマチンと核膜の結合は、ツメガエル胞胚期の核に適さないために、受精卵から胞胚期までは LBR の発現量が低く保たれていると推察される。

ツメガエル同様に MBT が存在する胚発生過程をたどるゼブラフィッシュでは、胞胚期までは LBR の発現量が少なく、MBT 以降に発現量が上昇し (Schild-Prüfert et al., 2006)、ショウジョウバエでも LBR が核に局在するのは細胞性胞胚期以降であること (Hampeolz et al., 2016) が報告されている。このことから、核の構造や機能が特殊な胚発生の初期では、LBR によるクロマチン - 核膜結合が働かないことが重要であると考えられる。一方で、LBR は、ホヤからヒトまで保存されており (Olins et al., 2010)、分化した細胞に一般的に発現している核内膜タンパク質であることから、LBR によるクロマチン - 核膜結合の維持は、一般的な体細胞の核の機能にとって重要であると考えられる。

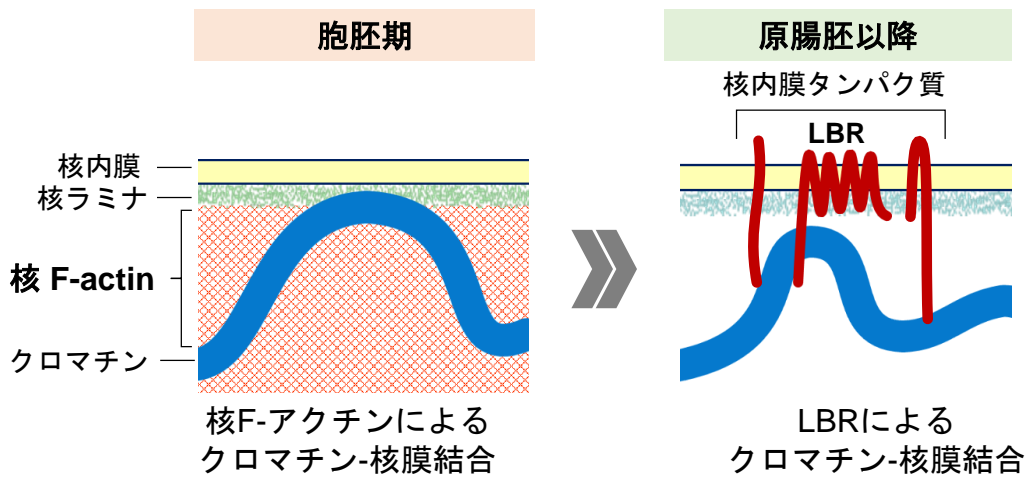
## 第5章 総括

本研究により、ツメガエル胞胚期の核内に、F-アクチンが豊富に存在することが初めて明らかになった。ツメガエルやヒトデの卵母細胞のGV (Clark and Marriam, 1997; Clark and Rosenbaum, 1979; Mori et al., 2014) 以外で、これほど高密度のF-アクチンが核に存在するという報告はこれまでにない。また、本研究で胞胚期の核F-アクチンの解析を可能とする卵無細胞系 (IFE) が確立された。IFEを用いて、核F-アクチンが胞胚細胞核のクロマチン-核膜結合を促進し、クロマチンが核内で凝集するのを防ぐ役割を果たすことが示された。また、核F-アクチンは核の強度を高め、さらに分裂中期染色体の紡錘体赤道面への整列を促進することが示された。これらのことから、核F-アクチンは、胞胚細胞の核において様々な機能を担っていると考えられる。

他方、原腸胚期に進行した胚では核F-アクチンがほぼ消失することが見出された。原腸胚の核では、体細胞型のINMPの発現レベルが上昇する。ICEを用いた検討により、INMPの一つのLBRがクロマチン-核膜結合の維持に働くことが示された。LBRは胞胚期までは発現量がわずかで、原腸胚期以降に発現量が上昇することから、原腸胚期以降のクロマチン-核膜結合の維持には主にLBRが関与すると考えられる。また、ICEで形成される核にLBRによるクロマチン-核膜結合を導入したところ、初期胚型のラミンL3で形成される核ラミナ構造に乱れが生じた。このことから、LBRによるクロマチン-核膜結合は、胞胚期の核には適さないことが示唆され、胞胚期の核のクロマチン-核膜結合の維持はLBRではなく、F-アクチンによって行われる必要があることが示唆される。

本研究で明らかにされた、二つのクロマチン-核膜結合維持機構は、胞胚および原腸胚以降の細胞核の様々な機能的特質と関連すると考えられる。ツメガエルGVに培養細胞核を移植すると、核F-アクチンが発達し、核F-アクチン依存的に*Oct4*の転写が活性化され、培養細胞核のリプログラミングが進行するという報告がある (Miyamoto et al., 2011)。また、核アクチンの形態は、転写の調節に関与することが近年の研究で明らかにされている (Hofmann et al., 2004; Philimonenko et al., 2004; Vartiainen et al., 2007; Mouilleron et al., 2011; Dopie et al., 2012; Serebryanny et al., 2016)。このようなことから、胞胚期の核に高密度で蓄積するF-アクチンは、上記で述べた役割のみならず、核の未分化性維持やMBTにも関与する可能性が高い。一方で、原腸胚以降、核F-アクチンが急激に減少することから、核F-アクチンは、原腸胚以降の分化を開始する細胞にとっては、不都合であるのかもしれない。LBRによるクロマチン-核

膜結合は胞胚期の核には適さないが、核内膜直下で行われる転写制御に重要である可能性が高い。胞胚期までは未分化性が維持され、MBT以降に転写が活性化する両生類と魚類においては、核 F-アクチンによるクロマチン - 核膜結合は転写の抑制に、LBR によるクロマチン - 核膜結合は転写に重要である可能性が考えられる (図 5-1)。両生類や魚類以外の動物では、明確な MBT が存在しないが、胚発生の初期には転写が抑制されており、胚発生過程で転写が活性化される。このことから、ツメガエル以外の動物においても、胚発生のごく初期には核 F-アクチンが存在する可能性がある。また、ゼブラフィッシュやショウジョウバエでも、ツメガエル同様に胚発生の初期には LBR の発現量が低く (Schild-Prüfert et al., 2006; Hampoelz et al., 2016)、細胞分化の開始する時期から発現量が上昇する。すなわち、本研究で見出した、二つのクロマチン - 核膜結合機構とその転換は、多くの生物種の胚発生過程で共通する重要な仕組みであるかもしれない。



|         |     |       |
|---------|-----|-------|
| 未分化性    | +++ | ±     |
| 細胞周期    | 30分 | 約24時間 |
| 転写      | —   | ++    |
| クロマチン複製 | +++ | ++    |

図 5-1 胚発生過程におけるクロマチン - 核膜結合の分子機構の転換

## 第 6 章 参考文献

- Abu Shah, E., Malik-Garbi, M., Keren, K., 2015. Reconstitution of cortical actin networks within water-in-oil emulsions. *Methods Cell Biol.* 128, 287–301. doi:10.1016/bs.mcb.2015.01.011
- Anderson, D.J., Vargas, J.D., Hsiao, J.P., Hetzer, M.W., 2009. Recruitment of functionally distinct membrane proteins to chromatin mediates nuclear envelope formation in vivo. *J. Cell Biol.* 186, 183–191. doi:10.1083/jcb.200901106
- Baarlink, C., Wang, H., Grosse, R., 2013. Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science* 340, 864–867. doi:10.1126/science.1235038
- Baricheva, E.A., Berrios, M., Bogachev, S.S., Borisevich, I. V., Lapik, E.R., Sharakhov, I. V., Stuurman, N., Fisher, P.A., 1996. DNA from *Drosophila melanogaster*  $\beta$ -heterochromatin binds specifically to nuclear lamins in vitro and the nuclear envelope in situ. *Gene* 171, 171–176. doi:10.1016/0378-1119(96)00002-9
- Belin, B.J., Cimini, B.A., Blackburn, E.H., Mullins, R.D., 2013. Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei. *Mol. Biol. Cell* 24, 982–994. doi:10.1091/mbc.E12-09-0685
- Belin, B.J., Lee, T., Mullins, R.D., 2015. DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *Elife* 4, e07735. doi:10.7554/eLife.07735
- Benavente, R., Krohne, G., Franke, W.W., 1985. Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* 41, 177–190. doi:10.1016/0092-8674(85)90072-8

- Best, S., Salvati, F., Kallo, J., Garner, C., Height, S., Thein, S.L., Rees, D.C., 2003. Lamin B-receptor mutations in Pelger-Huët anomaly. *Br. J. Haematol.* 123, 542–544. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04621.x
- Blow, J.J., Laskey, R.A., 1986. Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell* 47, 577–587. doi:10.1016/0092-8674(86)90622-7
- Bohnsack, M.T., Stüven, T., Kuhn, C., Cordes, V.C., Görlich, D., 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nat. Cell Biol.* 8, 257–263. doi:10.1038/ncb1357
- Burkel, B.M., von Dassow, G., Bement, W.M., 2007. Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 822–832. doi:10.1002/cm.20226
- Chmielewska, M., Dubińska-Magiera, M., Sopol, M., Rzepecka, D., Hutchison, C.J., Goldberg, M.W., Rzepecki, R., 2011. Embryonic and adult isoforms of XLAP2 form microdomains associated with chromatin and the nuclear envelope. *Cell Tissue Res.* 344, 97–110. doi:10.1007/s00441-011-1129-2
- Clark, T.G., Merriam, R.W., 1977. Diffusible and bound actin in nuclei of *xenopus laevis* oocytes. *Cell* 12, 883–891. doi:10.1016/0092-8674(77)90152-0
- Clark, T.G., Rosenbaum, J.L., 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell* 18, 1101–1108. doi:10.1016/0092-8674(79)90223-X
- Clute, P., Masui, Y., 1997. Microtubule dependence of chromosome cycles in *Xenopus laevis* blastomeres under the influence of a DNA synthesis inhibitor, aphidicolin. *Dev. Biol.* 185, 1–13. doi:10.1006/dbio.1997.8540



- Constantinescu, D., Gray, H.L., Sammak, P.J., Schatten, G.P., Csoka, A.B., 2006. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 24, 177–185. doi:10.1634/stemcells.2004-0159
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Peter, T., Bickmore, W.A., 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145, 1119–1131. doi:10.1083/jcb.145.6.1119
- Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O.A., Vlcek, S., Hutchison, C.J., Foisner, R., 2000. Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19, 3473–3484.
- Dopie, J., Skarp, K.-P., Rajakylä, E.K., Tanhuanpää, K., Vartiainen, M.K., 2012. Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E544-52. doi:10.1073/pnas.1118880109
- Duband-Goulet, I., Courvalin, J.-C., 2000. Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochemistry* 39, 6483–6488. doi:10.1021/bi992908b
- Feric, M., Brangwynne, C.P., 2013. A nuclear F-actin scaffold stabilizes ribonucleoprotein droplets against gravity in large cells. *Nat. Cell Biol.* 15, 1253–1259. doi:10.1038/ncb2830
- Field, C.M., Nguyen, P.A., Ishihara, K., Groen, A.C., Mitchison, T.J., 2014. *Xenopus* egg cytoplasm with intact actin. *Methods Enzymol.* 540, 399–415. doi:10.1016/B978-0-12-397924-7.00022-4
- Foisner, R., Gerace, L., 1993. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73, 1267–1279. doi:10.1016/0092-8674(93)90355-T
- Friedl, P., Wolf, K., Lammerding, J., 2011. Nuclear mechanics during cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* doi:10.1016/j.ceb.2010.10.015

- Furukawa, K., 1999. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J. Cell Sci.* 112, 2485–2492.
- Furukawa, K., Glass, C., Kondo, T., 1997. Characterization of the chromatin binding activity of lamina-associated polypeptide (LAP) 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 240–246. doi:10.1006/bbrc.1997.7235
- GareiB, M., Eberhardt, K., Krüger, E., Kandert, S., Böhm, C., Zentgraf, H., Müller, C.R., Dabauvalle, M.-C., 2005. Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 295–309. doi:10.1016/j.ejcb.2004.11.006
- Gareiss, M., Eberhardt, K., Krüger, E., Kandert, S., Böhm, C., Zentgraf, H., Müller, C.R., Dabauvalle, M.-C., 2005. Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 295–309. doi:10.1016/j.ejcb.2004.11.006
- Gerace, L., Blobel, G., 1980. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277–287. doi:10.1016/0092-8674(80)90409-2
- Goldberg, M., Jenkins, H., Allen, T., Whitfield, W.G., Hutchison, C.J., 1995. *Xenopus* lamin B3 has a direct role in the assembly of a replication competent nucleus: evidence from cell-free egg extracts. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 1), 3451–3461.
- Goldberg, M., Harel, A., Brandeis, M., Rechsteiner, T., Richmond, T.J., Weiss, A.M., Gruenbaum, Y., 1999. The tail domain of lamin Dm0 binds histones H2A and H2B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2852–2857. doi:10.1073/pnas.96.6.2852
- Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Gordon, L.B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., Collins, F.S., 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8963–8968. doi:10.1073/pnas.0402943101

- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Wilson, K.L., 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 21–31. doi:10.1038/nrm1550
- Gurdon, J.B., 1960. The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 8, 505–526.
- Hampoelz, B., Mackmull, M.T., Machado, P., Ronchi, P., Bui, K.H., Schieber, N., Santarella-Mellwig, R., Necakov, A., Andrés-Pons, A., Philippe, J.M., Lecuit, T., Schwab, Y., Beck, M., 2016. Pre-assembled nuclear pores insert into the nuclear envelope during early development. *Cell* 166, 664–678. doi:10.1016/j.cell.2016.06.015
- Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y., Hiraoka, Y., 2000. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 5), 779–794.
- Hase, M., Yoshikawa, K., 2006. Structural transition of actin filament in a cell-sized water droplet with a phospholipid membrane. *J. Chem. Phys.* 124, 104903-1–104903-6. doi:10.1063/1.2174004
- Hofemeister, H., Kuhn, C., Franke, W.W., Weber, K., Stick, R., 2002. Conservation of the gene structure and membrane-targeting signals of germ cell-specific lamin LIII in amphibians and fish. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 51–60. doi:10.1078/0171-9335-00229
- Hofemeister, H., O'Hare, P., 2005. Analysis of the localization and topology of nurim, a polytopic protein tightly associated with the inner nuclear membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 2512–2521. doi:10.1074/jbc.M410504200
- Hofmann, W.A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G.M., Mavrommatis, E., Philimonenko, V., Kysela, K., Goodrich, J.A., Lessard, J.L., Hope, T.J., Hozak,

- P., de Lanerolle, P., 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* 6, 1094–1101. doi:10.1038/ncb1182
- Höger, T.H., Krohne, G., Kleinschmidt, J.A., 1991. Interaction of *Xenopus* lamins A and LII with chromatin in vitro mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exp. Cell Res.* 197, 280–289. doi:10.1016/0014-4827(91)90434-V
- Holmer, L., Pezhman, A., Worman, H.J., 1998. The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family. *Genomics* 54, 469–476. doi:10.1006/geno.1998.5615
- Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T.M., Kishimoto, T., 2002. Coordinated regulation of M phase exit and S phase entry by the Cdc2 activity level in the early embryonic cell cycle. *Dev. Biol.* 243, 34–43. doi:10.1006/dbio.2001.0562
- Johnson, B.R., Nitta, R.T., Frock, R.L., Mounkes, L., Barbie, D.A., Stewart, C.L., Harlow, E., Kennedy, B.K., 2004. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9677–9682. doi:10.1073/pnas.0403250101
- Kapoor, P., Chen, M., Winkler, D.D., Luger, K., Shen, X., 2013. Evidence for monomeric actin function in INO80 chromatin remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 426–432. doi:10.1038/nsmb.2529
- Karsenti, E., Gounon, P., Bornens, M., 1978. Immunocytochemical study of lampbrush chromosomes—presence of tubulin and actin. *Biol. Cell.* 31, 219–224.
- Kiseleva, E., Drummond, S.P., Goldberg, M.W., Rutherford, S.A., Allen, T.D., Wilson, K.L., 2004. Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear

- pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Cell Sci.* 117, 2481–2490. doi:10.1242/jcs.01098
- Kumaran, R.I., Muralikrishna, B., Parnaik, V.K., 2002. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J. Cell Biol.* 159, 783–793. doi:10.1083/jcb.200204149
- Lang, C., Paulin-Levasseur, M., Gajewski, A., Alsheimer, M., Benavente, R., Krohne, G., 1999. Molecular characterization and developmentally regulated expression of *Xenopus* lamina-associated polypeptide 2 (XLAP2). *J. Cell Sci.* 112, 749–759.
- Lechner, M.S., Schultz, D.C., Negorev, D., Maul, G.G., Rauscher, F.J., 2005. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 929–937. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.016
- Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y., Wilson, K.L., 2001. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J. Cell Sci.* 114, 4567–4573.
- Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y., Wilson, K.L., 2001. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J. Cell Sci.* 114, 4567–4573.
- Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y., Wilson, K.L., 2001. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J. Cell Sci.* 114, 4567–4573.
- Lénárt, P., Bacher, C.P., Daigle, N., Hand, A.R., Eils, R., Terasaki, M., Ellenberg, J., 2005. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature* 436, 812–818. doi:10.1038/nature03810

- Liokatis, S., Edlich, C., Soupsana, K., Giannios, I., Panagiotidou, P., Tripsianes, K., Sattler, M., Georgatos, S.D., Politou, A.S., 2012. Solution structure and molecular interactions of lamin B receptor Tudor domain. *J. Biol. Chem.* 287, 1032–1042. doi:10.1074/jbc.M111.281303
- Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J., Pei, D., Pendas, A.M., Cadiñanos, J., López-Otín, C., Tse, H.F., Hutchison, C., Chen, J., Cao, Y., Cheah, K.S.E., Tryggvason, K., Zhou, Z., 2005. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat. Med.* 11, 780–785. doi:10.1038/nm1266
- Lohka, M.J., Maller, J.L., 1985. Induction of nuclear-envelope breakdown, chromosomes condensation, and spindle formation in cell free extracts. *J. Cell Biol.* 101, 518–523.
- Lohka, M.J., Masui, Y., 1983. Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* 220, 719–721. doi:10.1126/science.6601299
- Lourim, D., Kempf, A., Krohne, G., 1996. Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 7), 1775–1785.
- Ma, L., Rohatgi, R., Kirschner, M.W., 1998. The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15362–15367. doi:10.1073/PNAS.95.26.15362
- Mahbubani, H.M., Paull, T., Eider, J.K., Blow, J.J., 1992. DNA replication initiates at multiple sites on plasmid DNA in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res.* 20, 1457–1462. doi:10.1093/nar/20.7.1457
- Makatsori, D., Kourmouli, N., Polioudaki, H., Shultz, L.D., McLean, K., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B., Georgatos, S.D., 2004. The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links

- epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* 279, 25567–25573. doi:10.1074/jbc.M313606200
- Mans, B.J., Anantharaman, V., Aravind, L., Koonin, E. V., 2004. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle* 3, 1612–1637. doi:10.4161/cc.3.12.1316
- Mansharamani, M., Wilson, K.L., 2005. Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J. Biol. Chem.* 280, 13863–13870. doi:10.1074/jbc.M413020200
- Meier, J., Campbell, K., Ford, C., Stick, R., Hutchison, C., 1991. The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* 98, 271–279.
- Minc, E., Allory, Y., Courvalin, J.C., Buendia, B., 2001. Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes. *Methods Cell Sci.* 23, 171–174. doi:10.1007/978-94-010-0330-8\_18
- Miyamoto, K., Pasque, V., Jullien, J., Gurdon, J.B., 2011. Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. *Genes Dev.* 25, 946–958. doi:10.1101/gad.615211
- Mori, M., Monnier, N., Daigle, N., Bathe, M., Ellenberg, J., Lénárt, P., 2011. Intracellular transport by an anchored homogeneously contracting F-actin meshwork. *Curr. Biol.* 21, 606–611. doi:10.1016/j.cub.2011.03.002
- Mori, M., Somogyi, K., Kondo, H., Monnier, N., Falk, H.J., Machado, P., Bathe, M., Nédélec, F., Lénárt, P., 2014. An Arp2/3 nucleated F-actin shell fragments nuclear membranes at nuclear envelope breakdown in starfish oocytes. *Curr. Biol.* 24, 1421–1428. doi:10.1016/j.cub.2014.05.019

- Mouilleron, S., Langer, C.A., Guettler, S., McDonald, N.Q., Treisman, R., 2011. Structure of a pentavalent G-actin\*MRTF-A complex reveals how G-actin controls nucleocytoplasmic shuttling of a transcriptional coactivator. *Sci. Signal.* 4, ra40. doi:10.1126/scisignal.2001750
- Murray, A.W., 1991. *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology. Chapter 30 Cell Cycle Extracts. *Methods Cell Biol.* 36, 581–605. doi:10.1016/S0091-679X(08)60298-8
- Murray, A.W., Kirschner, M.W., 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339, 275–280. doi:10.1038/339275a0
- Murray, A.W., Solomon, M.J., Kirschner, M.W., 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339, 280–286. doi:10.1038/339280a0
- Newport, J., Dasso, M., 1989. On the coupling between DNA replication and mitosis. *J. Cell Sci. Suppl.* 12, 149–160.
- Newport, J.W., Wilson, K.L., Dunphy, W.G., 1990. A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* 111, 2247–2259. doi:10.1083/jcb.111.6.2247
- Newport, J., Kirschner, M., 1982. A major developmental transition in early xenopus embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30, 675–686. doi:10.1016/0092-8674(82)90272-0
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1967. *Normal Tables of Xenopus laevis*: A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Garland Science.
- Nikolakaki, E., Simos, G., Georgatos, S.D., Giannakouros, T., 1996. A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and



- modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 8365–8372. doi:10.1074/jbc.271.14.8365
- Ohsumi, K., Yamamoto, T.M., Iwabuchi, M., 2006. Oocyte extracts for the study of meiotic M-M transition. *Methods Mol. Biol.* 322, 445–58. doi:10.1007/978-1-59745-000-3\_32
- Olins, A.L., Rhodes, G., Welch, D.B.M., Zwerger, M., Olins, D.E., 2010. Lamin B receptor: multi-tasking at the nuclear envelope. *Nucleus* 1, 53–70. doi:10.4161/nucl.1.1.10515
- Ostlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., Worman, H., 1999. Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *J. Cell Sci.* 112, 1709–1719.
- Philimonenko, V. V., Zhao, J., Iben, S., Dingová, H., Kyselá, K., Kahle, M., Zentgraf, H., Hofmann, W.A., de Lanerolle, P., Hozák, P., Grummt, I., 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 6, 1165–1172. doi:10.1038/ncb1190
- Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B., Giannakouros, T., Georgatos, S.D., 2001. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep.* 2, 920–925. doi:10.1093/embo-reports/kve199
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R., 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5, 605–607. doi:10.1038/nmeth.1220
- Rober, R.-A., Weber, K., Osborn, M., 1989. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105, 365–378.

- Rungger, D., Rungger-Brändle, E., Chaponnier, C., Gabbiani, G., 1979. Intranuclear injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosome condensation. *Nature* 282, 320–321. doi:10.1038/282320a0
- Rzepecki, R., Bogachev, S.S., Kokoza, E., Stuurman, N., Fisher, P.A., 1998. In vivo association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* 111, 121–129.
- Sawin, K.E., Mitchison, T.J., 1991. Mitotic spindle assembly by two different pathways in vitro. *J. Cell Biol.* 112, 925–940.
- Scaffidi, P., Misteli, T., 2005. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat. Med.* 11, 440–445. doi:10.1038/nm1204
- Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W.W., Jockusch, B.M., 1984. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* 39, 111–122. doi:10.1016/0092-8674(84)90196-X
- Schild-Prüfert, K., Giegerich, M., Schäfer, M., Winkler, C., Krohne, G., 2006. Structural and functional characterization of the zebrafish lamin B receptor. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 813–824. doi:10.1016/j.ejcb.2006.04.009
- Schirmer, E.C., Florens, L., Guan, T., Yates, J.R., Gerace, L., 2003. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* 301, 1380–1382. doi:10.1126/science.1088176
- Schuler, E., Lin, F., Worman, H.J., 1994. Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Biol. Chem.* 269, 11312–11317.
- Serebryanny, L.A., Parilla, M., Annibale, P., Cruz, C.M., Laster, K., Gratton, E., Kudryashov, D., Kosak, S.T., Gottardi, C.J., de Lanerolle, P., 2016. Persistent

- nuclear actin filaments inhibit transcription by RNA polymerase II. *J. Cell Sci.* 129, 3412–3425. doi:10.1242/jcs.195867
- Shechter, D., Chitta, R.K., Xiao, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D., 2009. A distinct H2A.X isoform is enriched in *Xenopus laevis* eggs and early embryos and is phosphorylated in the absence of a checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 749–754. doi:10.1073/pnas.0812207106
- Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S., Pack, C.-G., Solovei, I., Goldman, A.E., Adam, S.A., Shumaker, D.K., Kinjo, M., Cremer, T., Goldman, R.D., 2008. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* 22, 3409–3421. doi:10.1101/gad.1735208
- Shoeman, R.L., Traub, P., 1990. The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *J. Biol. Chem.* 265, 9055–9061.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Samuels, R., Schweitzer, P.A., Dreger, C., Herrmann, H., Kalscheuer, V., Olins, A.L., Olins, D.E., Sperling, K., Hoffmann, K., 2003. Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly. *Hum. Mol. Genet.* 12, 61–69. doi:10.1093/hmg/ddg003
- Shumaker, D.K., Lee, K.K., Tanhehco, Y.C., Craigie, R., Wilson, K.L., 2001. LAP2 binds to BAF·DNA complexes: Requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *EMBO J.* 20, 1754–1764. doi:10.1093/emboj/20.7.1754
- Shumaker, D.K., Solimando, L., Sengupta, K., Shimi, T., Adam, S.A., Grunwald, A., Strelkov, S. V, Aebi, U., Cardoso, M.C., Goldman, R.D., 2008. The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication. *J. Cell Biol.* 181, 269–280. doi:10.1083/jcb.200708155

- Sider, J.R., Mandato, C. a, Weber, K.L., Zandy, a J., Beach, D., Finst, R.J., Skoble, J., Bement, W.M., 1999. Direct observation of microtubule-f-actin interaction in cell free lysates. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 12), 1947–1956.
- Silve, S., Dupuy, P.H., Ferrara, P., Loison, G., 1998. Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1392, 233–244. doi:10.1016/S0005-2760(98)00041-1
- Simon, D.N., Zastrow, M.S., Wilson, K.L., 2010. Direct actin binding to A- and B-type lamin tails and actin filament bundling by the lamin A tail. *Nucleus* 1, 264–272. doi:10.4161/nucl.1.3.11799
- Simos, G., Georgatos, S.D., 1992. The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *EMBO J.* 11, 4027–4036.
- Smith, S.S., Blobel, G., 1993. The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 120, 631–637.
- Solovei, I., Wang, A.S., Thanisch, K., Schmidt, C.S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T. V, Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., Herrmann, H., Blum, H., Engelkamp, D., Stewart, C.L., Leonhardt, H., Joffe, B., 2013. LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation. *Cell* 152, 584–598. doi:10.1016/j.cell.2013.01.009
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S., Goldman, R.D., 2002. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J. Cell Biol.* 156, 603–608. doi:10.1083/jcb.200112047
- Stewart, C., Burke, B., 1987. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* 51, 383–392. doi:10.1016/0092-8674(87)90634-9

- Stick, R., Hausen, P., 1985. Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell* 41, 191–200. doi:10.1016/0092-8674(85)90073-X
- Stierlé, V., Couprie, J., Östlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., Worman, H.J., Courvalin, J.C., Duband-Goulet, I., 2003. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 42, 4819–4828. doi:10.1021/bi020704g
- Stüven, T., Hartmann, E., Görlich, D., 2003. Exportin 6: A novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *EMBO J.* 22, 5928–5940. doi:10.1093/emboj/cdg565
- Subramanian, G., Chaudhury, P., Malu, K., Fowler, S., Manmode, R., Gotur, D., Zwerger, M., Ryan, D., Roberti, R., Gaines, P., 2012. Lamin B receptor regulates the growth and maturation of myeloid progenitors via its sterol reductase domain: implications for cholesterol biosynthesis in regulating myelopoiesis. *J. Immunol.* 188, 85–102. doi:10.4049/jimmunol.1003804
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Harshida, B., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L., Burke, B., 1999. Loss of A-type Lamin Expression Compromises Nuclear Envelope Integrity Leading to Muscular Dystrophy. *J. Cell Biol.* 147, 913–920. doi:10.1083/jcb.147.5.913
- Szerlong, H., Hinata, K., Viswanathan, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cairns, B.R., 2008. The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 469–476. doi:10.1038/nsmb.1403
- Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J., Mitchison, T.J., 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76, 505–517. doi:10.1016/0092-8674(94)90114-7

- Tosi, A., Haas, C., Herzog, F., Gilmozzi, A., Berninghausen, O., Ungewickell, C., Gerhold, C.B., Lakomek, K., Aebersold, R., Beckmann, R., Hopfner, K.P., 2013. XStructure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell* 154, 1207–1219. doi:10.1016/j.cell.2013.08.016
- Valentine, M.T., Perlman, Z.E., Mitchison, T.J., Weitz, D.A., 2005. Mechanical properties of *Xenopus* egg cytoplasmic extracts. *Biophys. J.* 88, 680–689. doi:10.1529/biophysj.104.048025
- Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., Treisman, R., 2007. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316, 1749–52. doi:10.1126/science.1141084
- Wagner, N., Weber, D., Seitz, S., Krohne, G., 2004. The lamin B receptor of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* 117, 2015–2028. doi:10.1242/jcs.01052
- Woolner, S., O'Brien, L.L., Wiese, C., Bement, W.M., 2008. Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 182, 77–88. doi:10.1083/jcb.200804062
- Worman, H.J., Courvalin, J.C., 2000. The inner nuclear membrane. *J. Membr. Biol.* 177, 1–11.
- Worman, H.J., Yuan, J., Blobel, G., Georgatos, S.D., 1988. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8531–8534. doi:10.1073/pnas.85.22.8531
- Worman, H.J., Courvalin, J.-C., 2005. Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease. *Int. Rev. Cytol.* 246, 231–279. doi:10.1016/S0074-7696(05)46006-4
- Worman, H.J., Evans, C.D., Blobel, G., 1990. The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential

- transmembrane domains. *J. Cell Biol.* 111, 1535–1542.  
doi:10.1083/jcb.111.4.1535
- Wu, W., Lin, F., Worman, H.J., 2002. Intracellular trafficking of MAN1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Cell Sci.* 115, 1361–1371.
- Yamamoto, T.M., Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Kishimoto, T., 2005. APC/C-Cdc20-mediated degradation of cyclin B participates in CSF arrest in unfertilized *Xenopus* eggs. *Dev. Biol.* 279, 345–355. doi:10.1016/j.ydbio.2004.12.025
- Ye, Q., Worman, H.J., 1994. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J. Biol. Chem.* 269, 11306–11311.
- Ye, Q., Worman, H., 1996. Interaction between an Integral Protein of the Nuclear Envelope Inner Membrane and Human Chromodomain Proteins Homologous to *Drosophila* HP1. *J. Biol. Chem.* 271, 14653–14656.  
doi:10.1074/jbc.271.25.14653
- Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J.-C., Worman, H.J., 1997. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J. Biol. Chem.* 272, 14983–14989.  
doi:10.1074/jbc.272.23.14983
- Yuan, J., Simos, G., Blobel, G., Georgatos, S.D., 1991. Binding of lamin A to polynucleosomes. *J. Biol. Chem.* 266, 9211–9215.
- Zuleger, N., Robson, M.I., Schirmer, E.C., 2011. The nuclear envelope as a chromatin organizer. *Nucleus* 2, 339–349. doi:10.4161/nucl.2.5.17846
- Zwergler, M., Herrmann, H., Gaines, P., Olins, A.L., Olins, D.E., 2008. Granulocytic nuclear differentiation of lamin B receptor-deficient mouse EPRO cells. *Exp. Hematol.* 36, 977–987. doi:10.1016/j.exphem.2008.03.003

## 謝辞

本研究の遂行ならびに本稿の執筆にあたり、恵まれた研究環境を与えて下さるとともに、丁寧なご指導、貴重なご助言を賜りました大隅圭太教授ならびに岩渕万里博士に厚く御礼申し上げます。細やかな技術指導をいただくとともに、物事の捉え方、考え方、研究者としてのあり方について、多くのことを学びました。心から感謝申し上げます。

共焦点蛍光顕微鏡観察の手法につきまして、有益なるご助言を賜りました名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所ライブイメージングセンターのチーフコーディネーター 佐藤良勝博士、名古屋大学大学院生命農学研究科の柴田秀樹博士、東北大学大学院農学研究科の原田昌彦博士に深謝いたします。共焦点顕微鏡の利用にあたり多大なご支援をいただきました、名古屋大学遺伝子実験施設の松尾拓哉博士に、心より御礼申し上げます。

アフリカツメガエル胚への顕微注射実験および胚発生実験につきまして、何度も相談に乗ってくださるとともに、快くインジェクターをお貸しいただきました進藤麻子博士に厚く御礼申し上げます。

副指導教員として、研究へのご助言をいただきました西山朋子博士、学位論文の審査を引き受けてくださいました五島剛太教授ならびに本間道夫教授に感謝いたします。

研究生生活の中で親身に相談に乗って頂き、叱咤激励して下さいました赤坂茉莉博士に深く感謝申し上げます。また、研究に当たり、技術指導だけでなく様々な局面で多大なお力添えとご助言を頂きました朱睿斌氏に心より御礼申し上げます。ともに研究に取り組み、研究の推進を助けてくださいました浦菜緒子氏、白井菜月氏、加藤さつき氏をはじめ、研究生生活を充実したものにして下さいました大隅研究室の皆様にも深く感謝いたします。

また、博士課程の合計 3 年間、奨学金の支援を頂きました日本学生支援機構と、RA 雇用による経済支援を頂きました名古屋大学博士課程教育リーディングプログラムに感謝いたします。

最後に、時に厳しくも、いつも私を励まし、研究生生活を全面的に支えてくれる両親に感謝します。

本研究は、科研費 14J11135 の助成を受けたものです。