

MORC3 の PML-nuclear body への局在化機構

三村 恭弘

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座

(竹家 達夫 教授)

平成22年 5月14日提出

所属 (主指導教員)	細胞増殖学（竹家 達夫）		
氏名	三村 恭弘	提出	平成 22 年 5 月 14 日
題目	MORC3 の PML-nuclear body への局在化機構		
要旨			
哺乳動物の細胞核には、多くの機能的サブコンパートメントが存在している。そのサブコンパートメントの一つである PML-NBs（<u>promyelocytic leukemia-nuclear bodies</u>）は、主として PML タンパクにより構成された構造体である。この PML-NBs は様々なタンパクが一時的に、または恒常的に局在化することで細胞周期や転写、アポトーシス、細胞老化などの様々な細胞プロセスを制御することが知られている。PML-NBs に局在化しているタンパクの一つである MORC3（<u>microchidia family CW-type zinc finger 3</u>）は、N 末端側に GHL-ATPase domain、CW domain、C 末端側に Coiled-coil domain と複数の SUMO（<u>small ubiquitin-like modifier</u>）化サイトを有している。我々は、<i>Pml</i> ノックアウトマウスから調製した MEFs（<u>mouse embryonic fibroblasts</u>）の核内で、MORC3 が Pml-NBs 非依存的にドメイン構造を形成していることを見いだした。本研究では、この MORC3-NDs（MORC3-<u>nuclear domains</u>）形成の分子機構と、PML-NBs との相互作用の分子機構の解明を目的としている。 MORC3 の各ドメインの核内局在における役割を検討するため、それぞれのドメイン変異体を作製し、それらの核内局在を免疫染色法により確認した。MORC3-WT（<u>wild type</u>）は核内でドット状の局在を示したのに対し、GHL-ATPase domain 変異体 E35A、Coiled-coil domain 欠損変異体ΔCC、CW domain 変異体 W419A は核内で拡散していた。さらに詳細な局在の解析を行うため、それぞれの変異体を発現させた細胞を、細胞質及び核質中のフリーなタンパクを抽出する CSK buffer、DNA 結合タンパクを抽出する High-salt buffer、コアヒストンなどを抽出する DNase buffer で処理し、免疫染色法および western-blotting によりそれぞれの局在を確認した。その結果、MORC3-NDs は核マトリックスに結合した構造体であり、ATPase domain 依存的に ND 構造の形成および解離・拡散を行い、核全体の核マトリックスに結合することが明らかになった。さらに、この構造体は DNase 処理により破壊され、核全体の核マトリックスに局在化することが明らかになった。このことは MORC3-NDs 形成には DNA もしくはヒストンが必要であることを示唆している。 次に MORC3-NDs の形成と、ATP の結合と加水分解の関係について検討するため ATP と非分解性 ATP アナログ AMP-PNP を用いた <i>in situ</i> MORC3-ND 拡散アッセイを行った。MORC3-NDs は ATP 存在下では核外へ溶出されたのに対し、AMP-PNP 存在下では核内で保持されていた。この結果は、			

MORC3 は ATP の結合と加水分解というサイクルによって、ND 構造の形成、ND 構造からの解離・拡散、核マトリックスへの結合という局在変化が制御されていることを示している。

GHL-ATPase ファミリータンパクは N 末端側に ATPase domain、C 末端側に Coiled-coil domain を有する共通した構造をもち、Coiled-coil domain を介して二量体を形成している。我々は MORC3 の二量体形成について検討するため、WT と各変異体とを共発現させ、免疫染色法と免疫沈降法によって相互作用を確認した。その結果、MORC3 は Coiled-coil domain を介して恒常的に二量体を形成し、ATP の結合によって ATPase domain 同士が相互作用することが明らかになった。

PML-NBs にタンパクが局在化するには直接的および、SUMO と SIM (SUMO interacting motif) による間接的な相互作用がある。Yeast two hybrid system スクリーニングにより、MORC3 が SUMO 化修飾を受けることが明らかとなっていたため、我々は MORC3 の SUMO 化が PML との相互作用に重要なのではないかと考え、全 SUMO 化サイトの同定を行った。MORC3 の SUMO 化サイト候補のリジン残基に点変異を導入し、western-blotting によりその影響を確認した。その結果、MORC3 の 597、650、651、740、794 番目のリジン残基が SUMO 化サイトであることを明らかにした。次に、この SUMO 化された MORC3 が PML の SIM と相互作用していると予想し、MORC3 の SUMO 化変異体と PML I の SIM 変異体を用いて免疫染色と免疫沈降法により相互作用の検討を行った。その結果、MORC3 と PML I は SUMO-SIM 相互作用によって共局在しており、それぞれに変異を加えることによって、互いに独立した構造体を形成することが明らかになった。

MORC3 と PML I が互いにどのように構造体を形成し、どのようなタイミングで共局在を行うかを明らかにするため、mEGFP-MORC3 と mCherry-PML I を作製し、HeLa 細胞へ共発現させ、ATP 枯渇処理後それぞれのタンパクの挙動を観察した。その結果、MORC3 は単独で ND 形成した後に PML-NB と相互作用する場合と、PML-NB に直接集積して ND 形成する場合が存在することが明らかとなった。

以上の結果から、MORC3 は拡散状態から ATP 依存的に ND 形成と解離・拡散を行い、SUMO 化依存的に PML-NBs と会合する非常にダイナミックな挙動をもつタンパクであることが明らかとなった。さらに MORC3-ND は DNA もしくはヒストンと結合している可能性が非常に高く、*Morc3* ノックアウトマウスにおいて *Mcsfr* の発現レベルの低下によるマクロファージ分化異常が確認されている (赤澤ら未発表データ)。これらのことから、MORC3-ND はそのダイナミックな挙動により、転写調節を行っていると考えられ、今後の重要な研究課題であると考えている。

目次

1. 序論	5
2. 材料と方法	8
3. 結果	1 3
4. 考察	3 7
5. 謝辞	4 4
6. 略号一覧	4 5
7. 参考文献	4 6

1. 序論

真核細胞はその細胞質内に小胞体やゴルジ体、リソソームなどの脂質二分子膜によって隔てられた様々な細胞内小器官を内包しており、それらは整然と配置されている。それらの器官は特定の機能に特化しており、協調的に機能することによって、細胞の恒常的な活動や、内因性、外因性のストレスなどに迅速に対応することが出来る。これらの細胞内小器官の中で、最も大きな構造体が核であり、近年、この核内にも細胞質同様に機能的なドメイン構造が多数存在していることが明らかにされた。核内ドメインは細胞内小器官とは異なり、脂質二分子膜で覆われた構造をとっていない。それらの代表的なものとしてユークロマチンやヘテロクロマチンを含む染色体領域やカハールボディ、核小体、promyelocytic leukaemia-nuclear bodies (PML-NBs) などがよく知られている (Handwerger and Gall, 2006; Lamond and Earnshaw, 1998)。これらの核内ドメインは細胞内小器官と同様、転写や DNA 修復、ストレス応答などに効率的に応答するため、規則正しく配置されている。しかし、これらの核内ドメインがどのように形成され、他のタンパクがそのドメインへどのようにしてリクルートされるか、その詳細はほとんど明らかにされていない。現在、ヌクレオステミンが核質-核小体間を自身の GTPase 活性依存的にシャトリングすることで、細胞周期の進行を調節していることが報告されているのみである (Tsai and McKay, 2005)。

PML は PML-NB を形成する主構成成分であり、acute promyelocytic leukaemia (APL) の原因遺伝子として同定された (de The et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; Pandolfi et al., 1991)。APL 細胞は t (15 ; 17) 相互転座による PML と retinoic acid receptor-alpha (RARA) の融合タンパク PML-RARA を発現しており、この融合タンパクがガン化の病因タンパクである。APL 治療薬として知られている all trans-retinoic acid (ATRA) や arsenic trioxide (ATO) はこの PML-RARA を標的としている (Degos and Wang, 2001; Zhang et al., 2001)。PML-NBs は、PML タンパクを足場として、多数の他のタンパクが会合している高次のタンパク集合体である。それらのタンパクは、恒常的に会合しているもの、外部刺激などによって一時的に会合するものなど様々であり、その結果、PML-NBs は DNA 損傷応答や転写、アポトーシス、細胞老化などのような多くの細胞プロセスの調節を行うことが出来る (Bernardi and Pandolfi, 2007)。PML は RBCC (一つの Ring domain、二つの B-box と一つの Coiled-coil ドメイン) モチーフを有する tripartite motif (TRIM) family に属するタンパクであり、small ubiquitin-like modifier (SUMO) family (SUMO1, SUMO2, SUMO3) によって修飾されるサイトを 3 カ所 (K65, K160, K490) 有している。さらに、SUMO と非共有結合的相互作用を行う SUMO interacting motif (SIM) を有している。SIM はコアとなる疎水性アミノ酸領域 [(V/I/L)-X-(V/I/L)-(V/I/L)] (V, valine; I, isoleucine; L, leucine; X, any aminoacids) および、その N 末端側もしくは C 末端側に酸性アミノ酸もしくはリシン残基からなる領域によって構成されている (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Minty et al., 2000; Shen et al., 2006)。

SUMO 化は標的タンパクのΨKXE/D モチーフ配列 (Ψ, 疎水性アミノ酸; K, リシン; X, any aminoacids; E, グルタミン酸; D, アスパラギン酸) のリシン残基の側鎖のイプシロン位のアミノ基に共有結合することで達成される。PML の SUMO 化は、自身の SIM との相互作用や、Daxx などのような SIM を有する他のタンパクが PML-NB へリクルートされるために必須である。また、PML の SIM も、自身との相互作用だけでなく、SP100 などのような SUMO 化されるタンパクのリクルートにも関与している。これらの相互作用によって適切な PML-NB 構造を形成することが出来る (Bernardi and Pandolfi, 2007; Lin et al., 2006; Zhong et al., 2000)。

NXP2 としても知られる MORC3 (Microchidia family CW-type zinc finger 3) は MORC family タンパクの一つであり、それらは共通して 3 つの保存されたドメインを含んでいる。N 末端側に GHL (Gyrase B, Hsp90, MutL) -ATPase domain (Dutta and Inouye, 2000)、中間に 4 つのシステインと 2 つのトリプトファンからなる CW-type zinc finger domain (CW domain) (Perry and Zhao, 2003)、C 末端側に Coiled-coil domain を有する核内タンパクである (Inoue et al., 1999; Kimura et al., 2002)。これまでに、我々は MORC3 が ATPase 活性依存的 PML-NBs へ局在化すること、p53 を PML-NBs へリクルートし、p53 の転写活性を活性化することで、ヒトやマウスの正常線維細胞に細胞老化を誘導することを明らかにした (Takahashi et al., 2007)。

GHL-ATPase family に属するタンパクは多様な機能を有しているが、基本構造と ATP 依存的な構造変化は非常に高度に保存されている。それらは N 末端側に ATPase domain を、C 末端側にホモダイマー形成に必要な Coiled-coil domain を有している (Dutta and Inouye, 2000; Sacho et al., 2008; Shiao et al., 2006)。GHL-ATPase タンパクは ATPase サイクル (ATP の結合から加水分解・解離) 依存的に、ATP-free の“オープン”構造と、ATP の結合した状態“クローズド”構造を繰り返している。クローズド構造は、ホモダイマー中の ATPase domain に ATP が結合することで分子内相互作用を行っている。結合した ATP は加水分解され、ホモダイマーはオープン構造に変化し、ADP が解離する (Richter and Buchner, 2006; Sacho et al., 2008)。このように、GHL-ATPase family タンパクは C 末端側の Coiled-coil domain を介した恒常的な二量化をヒンジとして、N 末端側の ATPase domain が ATP 加水分解サイクル依存的に開閉するクランプ構造として機能している。そして、この ATPase domain の開閉部分の根元に位置する middle domain が機能的な多様性を有しており、例えば、Hsp90 ではクライアントタンパクとの結合ドメインであり (Richter and Buchner, 2006)、Gyrase B などのタイプ II DNA トポイソメラーゼではチロシン特異的な DNA 切断の活性ドメインとなっている (Baird et al., 1999)。GHL-ATPase family に属する MORC3 では、この middle domain 部分に CW domain が存在している。この CW domain は Plant Homeo Domain (PHD) と構造的に相同であり、この PHD はメチル化されたヒストン H3 に結合するモジュールとして同定された (Iyer et al., 2008)。また、CW domain は DNA に結合することが予測されていることから (Perry and Zhao, 2003)、CW domain は DNA やヒストンコード、もしくはヌクレオソーム

ヘリクルートされる他のタンパクへの結合に関与していると予想される (Iyer et al., 2008)。

本研究は、我々が発見した PML 非依存的に形成される MORC3-nuclear domains (NDs) が、ATP サイクル依存的な ND 構造の形成および拡散の詳細な分子機構と、MORC3 の SUMO 化を介した PML-NBs との会合についての詳細な機構の解明を目的としている。

2. 材料と方法

2-1 プラスミドの作製

pME-FLAG-MORC3w (wild type)-I-P (Internal ribosomal entry site-puromycin resistance gene)や pME-FLAG-MORC3-E35A-I-Pは以前に報告したものと同様の物を使用した (Takahashi et al., 2007)。pME-HA-PML IVw I-P は pLNCX-HA-PML IVw から PML IV フラグメントを *Sal I* と *Not I* で切り出し、pME-HA-I-P ベクターと pME-HA ヘクローニングして作製した。pLNCX-HA-PML Iw と pLNCX-HA-PML I-3KR は国立がんセンター研究所の北林一生博士より提供していただいた (Nguyen et al., 2005)。pME-HA-PML I w-I-P は、pLNCX-HA-PML Iw と pME-HA-PML IVw- I-P を *Mlu I* と *Not I* でスワッピングし作製した。pME-HA-PML I-3KR I-P は pLNCX-HA-PML I-3KR と pME-HA-PML IV-I-P を *Sfi I* と *Not I* でスワッピングし作製した。PML I の SIM の 556-VVVI-559 を AAAS へ置換した PML I-AS 変異体は、以前に述べられたとおり (Shen et al., 2006)、変異を含むプライマーを用いた PCR 法によって変異を導入、増幅した。増幅した PML I-AS フラグメントは pME-HA-I-P ベクターへクローニングした。SUMO1 と SUMO2 は PCR 法により増幅し、pME-HA ベクターへクローニングした。MORC3 の Coiled-coil domain 欠損変異体 (Δ CC, C 末端領域の 350 アミノ酸の欠損) と SUMO1- Δ GG 変異体 (C 末端側の 6 アミノ酸の欠損) は、PCR 法により増幅した変異を含むフラグメントをそれぞれ pME-FLAG ベクターと pME-FLAG-I-P ベクター、pME-HA ベクターにクローニングした。MORC3 の SUMO 化サイト変異体はサイト中のリシンをアルギニンへ、CW-type zinc finger domain の変異体である MORC3-W419A 変異体は保存されたトリプトファンをアラニンへ、QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA)により置換し、pME-FLAG-I-P ベクターへクローニングした。Monomeric EGFP を融合した mEGFP-MORC3 発現ベクターは、pME-EGFP-MORC3-I-P に S206K の点変異を導入し作製した (Zacharias et al., 2002)。pME-Cherry-PML I ベクターは Dr. Tsien より譲っていただいた mCherry の cDNA をストップコドンの代わりに *Sal I* サイトを導入し、pME-HA-PML I の HA タグと置き換えることで作製した。

2-2 細胞培養とレトロウイルスを用いた感染実験

HeLa 細胞と mouse embryonic fibroblast s (MEFs) は DMEM (Sigma, St. Louis, MO) 中で、CHO-K1 細胞は Ham's F12 (Sigma) 中で 37°C、5% CO₂ 濃度条件下で培養した。全ての培養液は 10% fetal bovine serum (FBS) と 100U/ml Penicillin、100mg/ml Streptomycin を加えた。HeLa 細胞と CHO-K1 細胞へのトランスフェクションには Fugene6 (Roche, Indianapolis, IN) を用い、実験条件は添付文書に従った。遺伝子導入された HeLa 細胞のセレクションは 1mg/ml Puromycin で 2 日間行い、次いで特定の実験に使用した。レトロウイルスベクターである

pLNCX2-FLAG-MORC3-I-P (Takahashi et al., 2007)と pLP/VSVG は、パッケージング細胞である Plat GP (東京大学北村博士より提供) に Fugene6 を用いてトランスフェクションし、その培養上清を用いて特定の細胞への感染実験を行った。

2-3 siRNA

UBE2I siRNA (siGENOME SMARTpool M-004910-00-0005, Thermo Fisher Scientific) と control siRNA (siCONTROL Non-Targeting siRNA#3, Thermo Fisher Scientific) は Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて HeLa 細胞へ導入し、24h 後、FLAG-MORC3 と HA-PML I 発現ベクターを cotransfection した。2 日後、細胞は anti-FLAG antibody、anti-HA antibody を用いて染色した。

2-4 ノックアウトマウス

Pml ノックアウトマウス (129/Sv-Pml^{mlpp}) は The National Cancer Institute (Mouse Models of Human Cancer Consortium) Mouse Repository より提供してもらった (Wang et al., 1998)。本研究で行ったすべての動物実験は大阪府立成人病センター研究所の施設の指針に基づいて行った。Pml^{+/+}と^{-/-}の MEFs は、PML^{+/+}マウスを交配し、リッターメイトの 14.5 日胚からそれぞれ調製した。

2-5 抗体

本研究で使用した抗体は、mouse monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma)、rabbit polyclonal anti-HA (MBL, Woburn, MA)、mouse monoclonal anti-PML (PG-M3 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、rabbit polyclonal anti-PML (H-238 ; Santa Cruz)、goat polyclonal anti-mouse PML (E-15 ; Santa Cruz) 、rabbit polyclonal anti-human UBE2I/UBC9 (ab33044, Abcam, Cambridge, MA)、mouse monoclonal anti- γ -tubulin (GTU-88, Sigma)であった。また、anti-MORC3 antibody は以前に述べられた mouse monoclonal antibody (17sA9 ; MBL, Nagoa, Japan) を使用した (Takahashi et al., 2007)。

Anti-SUMO1 rabbit polyclonal antiserum は、pET16-His-SUMO1-dc4 を導入した Rosetta DE3 (Novagene, Madison, WI) から C 末端の 4 アミノ酸を欠損した Histidine タグ融合 SUMO1-dc4 タンパクを精製して作製した。

2-6 ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE ゲル中のタンパクを Hybond-P (GE Healthcare) 膜、もしくは Immobilon-P

(Millipore, Bedford, MA) 膜へ転写し、特定の一次抗体と peroxidase を結合した二次抗体 (anti-mouse IgG と anti-rabbit IgG, MBL) と反応させ、ECL もしくは ECL-Plus (GE Healthcare) で可視化した。

2-7 免疫染色と共焦点顕微鏡

免疫染色実験は以前に述べられた方法 (Takahashi et al., 2007; Watanabe et al., 1996) に従って行った。Lab-Tek II Chamber Slides (Nalge Nunc) 中で培養した細胞を 4%PFA/PBS で固定し、透過処理後、特定の一次抗体と、Alexa Fluoro-488、Alexa Fluoro-594、Alexa Fluoro-648 を結合した二次抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) と反応させた。抗体で single もしくは double staining した細胞の共焦点画像は、Radiance 2000 laser-scanning system (Bio-Rad, Richmond, CA) を接続した BX51 microscope (Olympus, Melville) を用いて、60 倍の油浸対物レンズで撮影した。抗体で triple staining した細胞は Confocal Laser Scanning Biological Microscope FV10i (Olympus, Melville) を用いて、60 倍の油浸対物レンズで撮影した。全ての共焦点画像中のスケールバーは 5 μ m とした。

2-8 免疫沈降法

細胞は high salt extraction buffer [50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 300mM NaCl, 150mM KCl, 1mM dithiothreitol, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Complete Mini, EDTA free, Roche, Indiana, IN), 20mM *N*-ethylmaleimide] で溶解し、遠心によってデブリを除去した。上清を 3 倍量の No-Salt buffer [50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1mM dithiothreitol, Complete Protease Inhibitor, 20mM *N*-ethylmaleimide] で希釈し、anti-FLAG-M2 affinity agarose gel (Sigma) を加えインキュベートした。免疫沈降させたタンパクは 1 x buffer [50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 100mM NaCl, 100mM KCl, 1mM dithiothreitol, 20mM *N*-ethylmaleimide] でウォッシュし、ウエスタンブロッティングによって検出した。SUMO 化された MORC3 の検出には、RIPA buffer [10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate, 150mM NaCl, Complete Protease Inhibitor, 20mM *N*-ethylmaleimide] で可溶化し、anti-FLAG-M2 affinity agarose gel を加えインキュベートした。免疫沈降したタンパクは anti-SUMO antiserum と anti-FLAG antibody を用いて可視化した。

2-9 核マトリックス結合アッセイ

核マトリックス結合アッセイは以前に述べられた手順に従って行った (David L. Spector, 1998; Kimura et al., 2002)。FLAG-MORC3 WT (wild type) もしくは FLAG-MORC3 変異体

を発現させた HeLa 細胞を段階的にバッファー処理し、目的タンパクの局在を免疫染色によって確認した。始めに、細胞を Cytoskeletal (CSK) buffer [10mM PIPES, pH 6.8, 300mM sucrose, 100mM NaCl, 3mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.6% TritonX-100, Complete Mini Tablets, 2mM vanadyl riboside complex (VRC)] で 4℃、3 分間処理した。次いで、High salt buffer (250mM ammonium sulfate を含む CSK buffer) で 4℃、4 分間処理した。最後に、DNaseI buffer [250U/ml RNase-free DNase I (Takara Bio, Otsu, Japan)] もしくは RNase buffer [VRC を抜いた CSK buffer へ 250U/ml RNase-free DNase I と 2mg/ml RNase A (Wako Chemicals, Richmond, VA)] で 37℃、40 分間処理した。Buffer 処理後の細胞は 4% parahormaldehyde で 60 分間固定し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色により解析した。また、それぞれの buffer で抽出されたタンパクは抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析した。

2-10 ATP 枯渇アッセイ

ATP 枯渇アッセイは以前に記載された手順に従った (Platani et al., 2002)。FLAG-MORC3 WT (wild type) もしくは FLAG-MORC3 変異体を発現させた HeLa 細胞を 10mM sodium azide (Wako chemicals) と 50mM 2-deoxyglucose (Sigma) を含む glucose-free DMEM 中で 30 分間培養し固定した。固定後のサンプルは抗 FLAG 抗体などによって染色した。

2-11 *In situ* MORC3-ND 拡散アッセイ

MORC3-ND 拡散アッセイは以前に述べられた方法に基づいて行った (Kimura et al., 2006; Saitoh et al., 2006)。FLAG-MORC3 WT を導入した HeLa 細胞を、50mg/ml digitonin を含む Run-on buffer [10mM Hepes-KOH, pH7.3, 100mM potassium acetate, 1mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, Complete Mini Tablets] を用いて、5 分間、氷上で semi-permeabilize した。透過処理後の細胞は、Run-on buffer でリンスし未添加、10mM ATP (Sigma) もしくは、10mM AMP-PNP (Adenyl-imidodiphosphate, Roche) を含む Run-on buffer 中で 37℃、30 分間インキュベートした。インキュベート後の細胞は、固定後、抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色によって解析した。

2-12 ATP-depletion タンパク動態解析

35mm ガラス底ディッシュ (Ashahi Glass, Tokyo, Japan) 中の CHO-K1 細胞に 9 : 1 の比率で mEGFP-MORC3 と mCherry-PML I を Fugene6 を用いて導入した。24h 後、細胞中の ATP を枯渇させるため、10mM sodium azide を含む glucose-free 培養液中で 37℃、3h 培養した。

ATP-recovery のため通常の培養液に置き換え、10min 毎に High quality cooled CCD カメラシステム (Keyence, Osaka, Japan) と 0.75 NA 40x Plan Fluor objective (Nikon) を接続した蛍光倒立顕微鏡 Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

3. 結果

3-1 MORC3 は PML 非依存的な方法によって核内ドメイン構造を形成する

我々は以前、PML-RARA の発現によって PML-NBs 構造が破壊された APL 細胞や、PML をノックダウンした SaOS-2 細胞において MORC3-NDs の形成が抑制されることを報告した (Takahashi et al., 2007)。しかし、我々は *Pml*^{+/+}MEFs と同様に、*Pml*^{-/-}MEFs において Morc3-NDs が形成されていることを発見した (Fig. 1A)。それらの MEFs にヒトの MORC3 である FLAG-MORC3 WT を過剰発現させた場合においても核内でドメイン構造を形成していた (Fig. 1B)。MEFs において、全 Morc3-NDs の内 5% が Pml 依存的に形成されており、Pml 非依存的 ND を有する細胞は全体の 8% であった (Fig. 1A と D)。興味深いことに、マウスの骨髄細胞において、全 Morc3-NDs の内 69% が Pml 非依存的に形成されており、Pml 非依存的な ND を有する細胞は全体の 78% を占めていた (Fig. 1C と D)。Pml 非依存的 ND を有するマウス骨髄細胞の内、35% は Pml-NBs 依存的 NDs と共存していた。さらに、マウス脾臓細胞や CD11b 陽性細胞においても同様の結果が得られた (Fig. 2A と B)。これらの結果は、MORC3 は PML 非依存的に ND 構造を形成することが出来ることを示唆しており、MORC3-NDs は ①MORC3 が ND 構造を形成する、②MORC3 が PML と相互作用を行うという二段階のステップを経て PML-NBs と共局在していると考えられる。

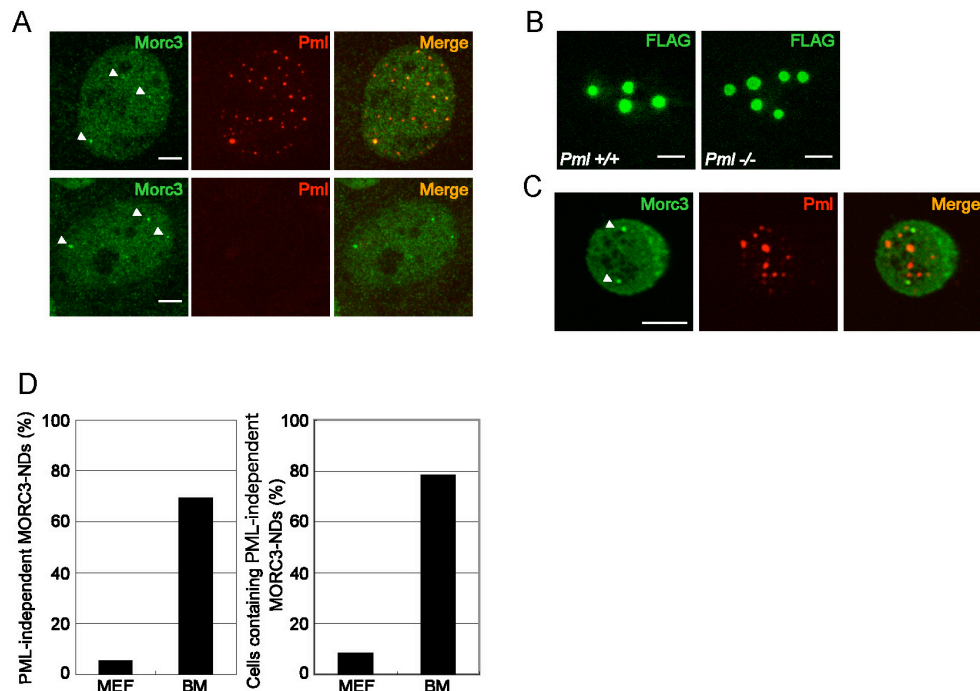


Figure 1 MORC3はPML-NB非依存的にND構造を形成する。

(A) *PML*^{+/+} (上図) と *-/-* (下図) MEFsを抗MORC3抗体 (右図) と抗PML抗体 (中図) で免疫染色した。オーバーラップしたものは右図で示してある (Merge)。*PML*^{-/-}MEFsの核内ではMORC3-NDの数は減少していたものの、依然として形成されていた。矢印はMORC3-NDsを示す。

(B) *PML*^{+/+} (左図) と *-/-* (右図) MEFsにレトロウイルスを用いてFLAG-MORC3 WTを発現させ、抗MORC3抗体で免疫染色を行った。*PML*^{+/+}と *-/-*両方でFLAG-MORC3 WTはND構造を形成していた。

(C) マウスの骨髄細胞を抗MORC3抗体 (左図) と抗PML抗体 (中図) を用いて免疫染色した。オーバーラップしたものは右図で示してある (Merge)。骨髄細胞中ではMORC3-NDsとPML-NBsはそれぞれ独立して存在していた。矢印はPML-NBs非依存的MORC3-NDsを示している。

(D) MEFsとマウス骨髄細胞中のPML依存的、非依存的MORC3-NDsの数をカウントした。全MORC3-NDsに対するPML非依存的MORC3-NDsの割合 (左図) 及び、全細胞数に対するPML非依存的MORC3-NDsを有する細胞の割合を示している。MEFsは36個、マウス骨髄細胞は51個カウントした。

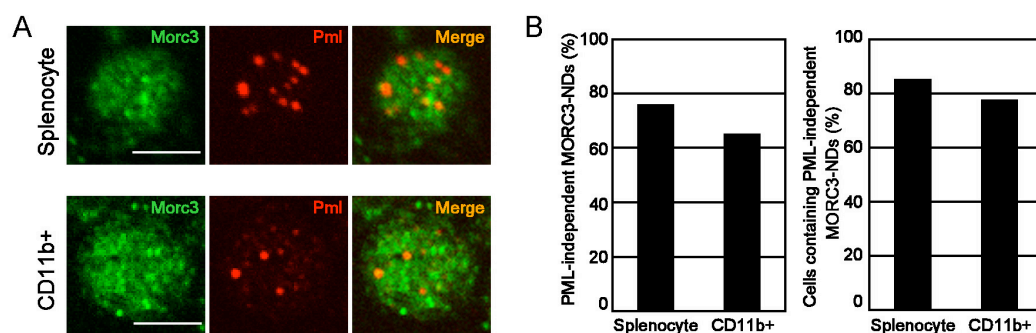


Figure 2 splenocyte中のPML-NB非依存的MORC3-NDの形成

(A) マウスの成熟した血球がPML-NB非依存的MORC3-NDを含むかどうか検討するため、全splenocyte（下図）および、主に単球から構成されるCD11b+細胞を（上図）を免疫染色した。CD11b+細胞は57BL/6Jのsplenocyteから抗マウスCD11b抗体マイクロビーズ（Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany）を用いてポジティブセレクションにより精製した。精製した細胞はCytospin4 centrifuge（Thermo Scientific, Waltham, MA）を用いてスライドガラスへ固着させ、抗MORC3抗体（右図）と抗PML抗体（中図）を用いて免疫染色を行った。

(B) 全splenocyteおよびCD11b+細胞の含むPML依存的、非依存的MORC3-NDsの数をカウントした。全MORC3-NDsに対するPML非依存的MORC3-NDsの割合（splenocyte, 76%; CD11b+, 65%）（左図）及び、全細胞数に対するPML非依存的MORC3-NDsを有する細胞の割合（splenocyte, 85%; CD11b+, 77%）（右図）を示している。

3-2 MORC3 のドメイン変異体は核内で異常な局在を示す

上記で示した MORC3 の二段階局在化機構の内、まず、①どのようにして MORC3 が ND 構造を形成するのか、について解析するため、我々は ATPase domain に変異をもつ変異体 E35A や Coiled-coil domain を欠損した変異体 Δ CC、さらにこれら二つの変異を同時に有する変異体 E Δ CC を作製し、発現ベクターに組み込んだ (Fig. 3A)。次に、これらの変異体を HeLa 細胞へ導入し、その局在を確認した (Fig. 3B)。MORC3 WT は核内で ND 構造を形成し、PML-NBs と共局在しているのに対して、E35A、 Δ CC、E Δ CC の全ての変異体は核内全体に拡散しており、PML-NBs はドット状の局在のままであった。

さらに、これら変異体の核内局在について詳細に解析するため、我々はそれぞれの変異体を導入した HeLa 細胞を段階的に様々なバッファーで処理、抽出を行い、免疫染色 (Fig. 3B) とウェスタンブロッティング (Fig. 3C) によって解析した。MORC3 WT の ND 構造は 0.5% TritonX-100 を含む CSK buffer や、250mM ammoniumsulfate を含む High salt buffer 処理では保持されたが、DNase I buffer 処理により崩壊し、核内全体へ広がっていた (Fig. 3B)。このときの PML-NBs の局在は依然としてドット状のままであった。また、RNase A を含む buffer で処理した場合、完全に抽出されていた (data not shown)。これらの結果から、MORC3-NDs は DNA もしくはヌクレオソームと結合することで特定の構造を形成しており、DNaseI 処理によってその構造が崩壊し、核全体に拡散し、核マトリックスに結合することを示唆している。

また、 Δ CC 変異体は CSK buffer 処理によって核外に流出し、抽出された (Fig. 3B と C)。 Δ CC と比較して、E35A 変異体はそのほとんどが DNase I buffer で抽出されず、核マトリックスに結合していた (Fig. 2B と C)。E Δ CC 変異体は、E35A と同様の局在パターンを示し、核マトリックスに結合していた (Fig. 3B と C)。従って、E35A の変異をもつ ATPase domain の変異体は、Coiled-coil domain の存在の有無に関わりなく、核マトリックスに結合する。

MORC3-NDs が DNase I 処理によって崩壊することから、我々は MORC3 が DNA もしくはヌクレオソームに結合するドメインをもっていると予想した。他の GHL-ATPase タンパクは機能的な middle domain を有している。Hsp90 はクライアントタンパクとの結合ドメインを (Richter and Buchner, 2006)、Gyrase B などのタイプ II DNA トポイソメラーゼは DNA 切断ドメインを有している (Baird et al., 1999)。我々は CW domain が MORC3 の middle domain として、DNA もしくはヌクレオソームとの結合に関与していると考え、CW domain 中の 419 番目のトリプトファンをアラニンに置換した変異体、W419A 変異体を作製し、詳細な局在を確認した。W419A 変異体は ATPase domain や Coiled-coil domain が正常であるにも関わらず、ほぼ核内で拡散しており、PML-NBs と会合している部分以外、CSK buffer によって抽出された (Fig. 3B)。その抽出のパターンは Δ CC とほぼ同じであった (Fig. 3C)。

我々は以前に、MORC3-NDs が細胞内の ATP の枯渇によって核内全体に拡散することを示した (Takahashi et al., 2007)。この ATP の枯渇によって拡散した MORC3 が核マトリックスに結合しているか否か検討するため、FLAG-MORC3 WT を発現させた HeLa 細胞を ATP 枯渇条件下でインキュベートし、CSK buffer 処理を行い、局在を確認した (Fig. 3D)。その結

果、FLAG-MORC3 WT は E35A 変異体と同様に、CSK buffer での流出が抑制されていた。これは ATP-free な状態の MORC3 は核全体に拡散し、核マトリックスへ結合することを示している。

他の GHL-ATPase タンパクに保存されている motif I 中のグルタミン酸残基を、E35A 変異体と同様に、アラニンへ置換した場合、ATP の加水分解活性のみが欠損し、ATP の結合へはほとんど影響がないことが報告されている (Ban et al., 1999; Ban and Yang, 1998; Tran and Liskay, 2000)。しかしながら、ATP 枯渇条件下での MORC3-E35A 変異体は核全体に拡散し、核マトリックスに結合したままであった (Fig. 3D)。さらに、我々は ATPase domain の motif II と motif III の保存されているアスパラギン酸残基、グリシン残基をそれぞれアスパラギンとアラニンに置換した変異体 D67N と G101A を作製した。他の GHL-ATPase タンパクの解析結果から、これらのアミノ酸残基はともに ATP の結合に関与していることが明らかにされている (Panaretou et al., 1998; Tran and Liskay, 2000)。D67N と G101A 変異体の細胞内局在を確認した結果、D67N 変異体は核内で ND 構造を形成し、G101A は核内全体に拡散していた (Fig. 4A)。また、これらの変異体を発現した細胞を ATP 枯渇条件下でインキュベートした結果、D67N 変異体は WT より早い段階で拡散が開始し、G101A 変異体は元の拡散した局在のまま変化はなかった。従って、MORC3 の ND 構造の形成にとって、ATP の結合は必須であると考えられる。

また、我々は W419A 変異体を発現させた細胞を ATP 枯渇条件下でインキュベートし、CSK buffer 処理した。その結果、W419A 変異体は、WT 同様に核マトリックスへ結合していた (Fig. 4B)。

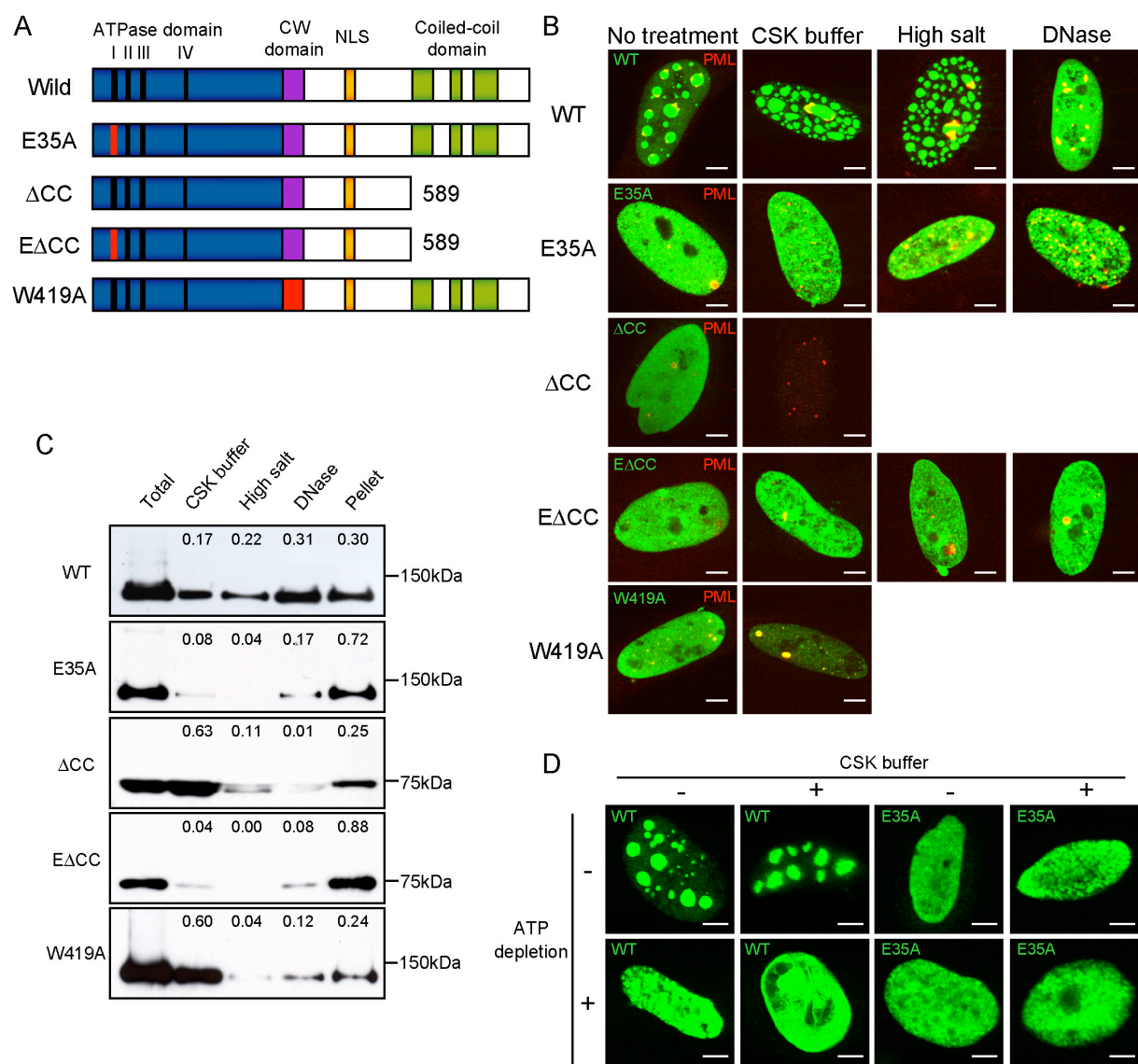


Figure 3 MORC3 domain変異体の核内局在

(A) MORC3ドメイン変異体の二次構造の模式図。保存されたGHL-ATPase motifs (I、II、III、IV) を含むGHL-ATPase domain、CW-type zinc finger domain、nuclear localization signal (NLS)、Coiled-coil domainはそれぞれ青、黒、紫、オレンジ、緑で示してある。GHL-ATPase domain変異体 (E35A) はGHL-ATPase domain motif Iのグルタミン酸残基をアラニンに置換して作製した。ΔCC変異体はCoiled-coil domainを欠損している (589-989アミノ酸)。EΔCC変異体は二つの変異を有している：E35A置換とCoiled-coil domain欠損。CW-type zinc finger domainの変異体であるW419A変異体は419番目のトリプトファンをアラニンに置換して作製した。

(B)と(C) MORC3の核マトリックスへの結合。FLAG-MORC3 WTもしくは変異体 (E35A、ΔCC、EΔCC、W419A) 発現ベクターを導入したHeLa細胞に種々のbuffer (CSK buffer、High salt buffer、DNeas I-containing buffer) で連続的に処理した。(B) FLAG-MORC3 核内局在は抗FLAG抗体 (緑) と抗PML抗体 (赤) を用いて免疫染色により確認した。共局在している箇所は黄色で示されている。FLAG-MORC3 WTはND構造を形成しており、全ての変異体は核内全体に拡散していた。MORC3-NDsはDNeas I処理によって崩壊した。WTとE35A、EΔCC変異体は核マトリックスに結合しており、ΔCCとW419A変異体は結合していなかった。(C) 全てのbufferで抽出されたFLAG-MORC3の各フラクションを抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。抽出されたフラクション全体に対する各フラクションの割合はNIHイメージソフトウェアを用いて計算した。

(D) FLAG-MORC3 WTとFLAG-E35A変異体をそれぞれ発現させたHeLa細胞をATP枯渇処理後、CSK buffer処理を行い、免疫染色によってその局在を確認した。FLAG-MORC3 WTはATPの枯渇処理によって拡散し、核マトリックスに結合した。E35A変異体はATPの枯渇処理の前後でその局在を変化させることはなかった。

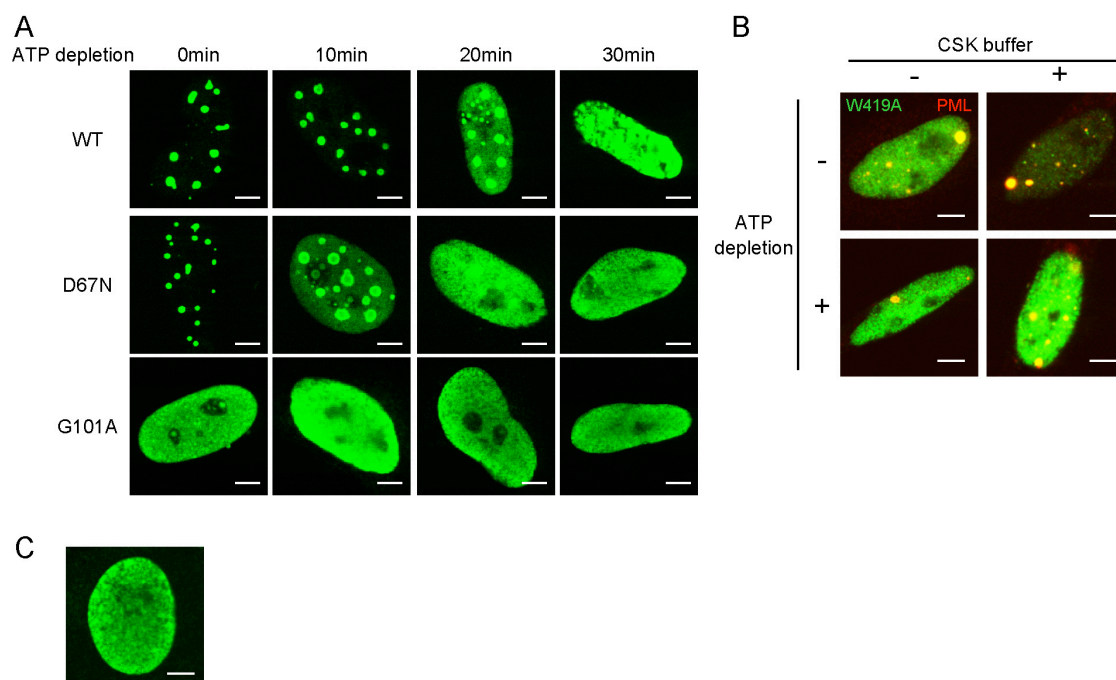


Figure 4 MORC3 ATPase domain変異体の核内局在とCW domain変異体の核マトリックスへの結合

(A) FLAG-MORC3のATPase domain変異体D67NとG101Aは、他のGHL-ATPase familyタンパクで保存されている、ATPの結合活性に重要なサイトと相同なアミノ酸残基に変異を導入し作製した。D67NとG101A変異体を発現したHeLa細胞をそれぞれの時間ATP枯渇処理した。D67N変異体（中図）は、WT（上図）に比べより迅速にND構造が拡散した。G101A変異体はATPの枯渇処理に関係なく核全体に拡散していた。

(B) FLAG-MORC3-W419A変異体を発現させたHeLa細胞をATP枯渇処理（下図）及びCSK buffer処理し（右図）、抗FLAG抗体（green）と抗PML抗体（red）で免疫染色した。W419A変異体はATP枯渇処理によって核マトリックスへ結合していた。

(C) HeLa細胞にD67NとE35Aの変異を併せ持つ変異体を発現させ、抗FLAG抗体を用いてその局在を確認した。D67N単独の変異体のもつND形成能は、E35Aの変異を加えることによって完全に消失した。

3-3 MORC3 は ATP の結合によって NDs を形成し、加水分解することによって核内全体へ拡散する

前項で MORC3 の ND 構造形成にとって ATP の結合が必須であることが明らかにした。さらに、我々は MORC3-ND 形成と ATPase 活性の関係について検討するため、ATP もしくは、非分解性 ATP アナログである AMP-PNP を用いた *in situ* MORC3-ND 拡散アッセイを行った。FLAG-MORC3 WT を発現させた HeLa 細胞を ATP もしくは AMP-PNP を含むバッファー中にインキュベートし、抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色によって MORC3-ND 形成について確認した (Fig. 5A)。その結果、コントロールおよび ATP を含むバッファー処理した細胞では、MORC3-NDs は完全に核外へ溶出してしまったのに対し、AMP-PNP を含むバッファーで処理した細胞では MORC3-NDs は保持されていた。興味深いことに、DNaseI を含むバッファー処理による MORC3-NDs の拡散も、AMP-PNP 存在下では抑制された (Fig. 5B)。これらの結果は、MORC3 の ND 構造形成にとって ATP の結合が必須であり、ATP が加水分解されることによって ND 構造から解離することを示している。

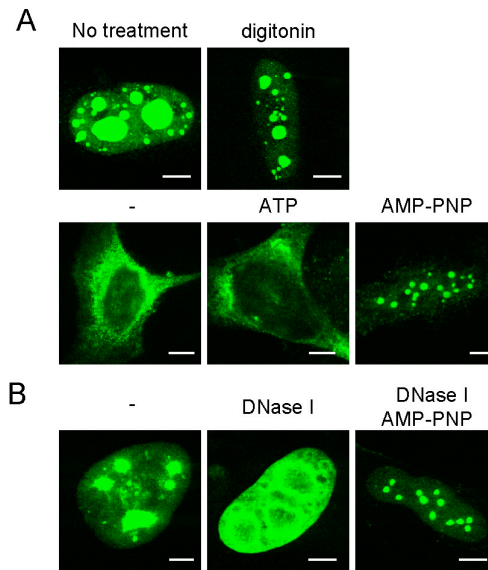


Figure 5 ATPの結合と加水分解依存的なMORC3の局在

(A) FLAG-MORC3 WTを発現させたHeLa細胞を0.05% digitonin (digitonin、上右図) により semipermeabilize し、ATP (下中図) もしくはAMP-PNP (下右図) を含むbuffer中で30min、37°Cでインキュベートした。AMP-PNPを含むbuffer中ではMORC3-NDsの崩壊が抑制された。

(B) FLAG-MORC3 WTを発現させたHeLa細胞をAMP-PNP存在下で40min、37°CでDNase I処理を行った。AMP-PNP存在下では、DNase IによるMORC3-NDsの拡散は抑制された。

3-4 MORC3 は Coiled-coil domain と ATPase domain を介してホモダイマー形成を行う

GHL-ATPase family に属するほとんどのタンパクは、C 末端側に存在する Coiled-coil domain が恒常的にホモダイマーを形成するために機能し、N 末端側の ATPase domain が ATP の結合依存的にホモダイマー内で相互作用を行う (Dutta and Inouye, 2000; Richter and Buchner, 2006)。我々は MORC3 がホモダイマーを形成しているか検討するため、HeLa 細胞に FLAG-MORC3 WT および変異体 (Fig. 6A, green) と HA-MORC3 WT (Fig. 6A, red) を共発現させ、免疫染色 (Fig. 6A) および免疫沈降法 (Fig. 6B) によって相互作用の検討を行った。FLAG-MORC3 WT と HA-MORC3 WT は共に共局在し、ND 構造を形成していたが (Fig. 6A; 一段目)、FLAG-E35A 変異体と HA-MORC3 WT は共に核全体に拡散していた (Fig. 6A; 二段目)。以前に我々は FLAG-MORC3 WT と HA-MORC3 WT が非常に高効率に共沈することを報告した (Takahashi et al., 2007)。FLAG- Δ CC 変異体は HA-MORC3 WT と共発現させることで、ND 構造を形成し、共局在していた (Fig. 6A; 三段目)。この結果は、MORC3 のホモダイマー形成において、Coiled-coil domain 以外にも相互作用を行っていることを示唆している。そこで、我々は他の GHL-ATPase タンパクと同様に、MORC3 も ATPase domain 間で相互作用を行っているのではないかと予想し、HeLa 細胞に FLAG-E Δ CC 変異体と HA-MORC3 WT を共発現させ、局在を確認した (Fig. 6A; 四段目)。HA-MORC3 WT は ND 構造を形成していたのに対して、FLAG-E Δ CC 変異体は核内で拡散しており、互いに排他的な局在を示した。さらに、この免疫沈降法を用いて FLAG-E Δ CC 変異体と HA-MORC3 WT の相互作用を検討した結果、MORC3 同士の相互作用は Coiled-coil domain の欠損だけでは完全に消失していなかったが、さらに ATPase domain の変異を加えることによって完全に消失することが明らかとなった (Fig. 6B)。以上の結果から、MORC3 のホモダイマー形成には、他の GHL-ATPase タンパクと同様に、Coiled-coil domain の相互作用だけでなく ATP の結合依存的な ATPase domain 間の相互作用が必要であることが明らかになった。

CW domain の変異体である W419A 変異体では、 Δ CC 変異体の場合と同様に、MORC3 WT 依存的な ND 構造の形成が確認された (Fig. 6A; 五段目)。Fig. 3 および Fig. 5 の結果から、W419A 変異体は DNA もしくはヌクレオソームへの結合能が欠損しているため、フリーな状態で核質中に存在していると考えられる。

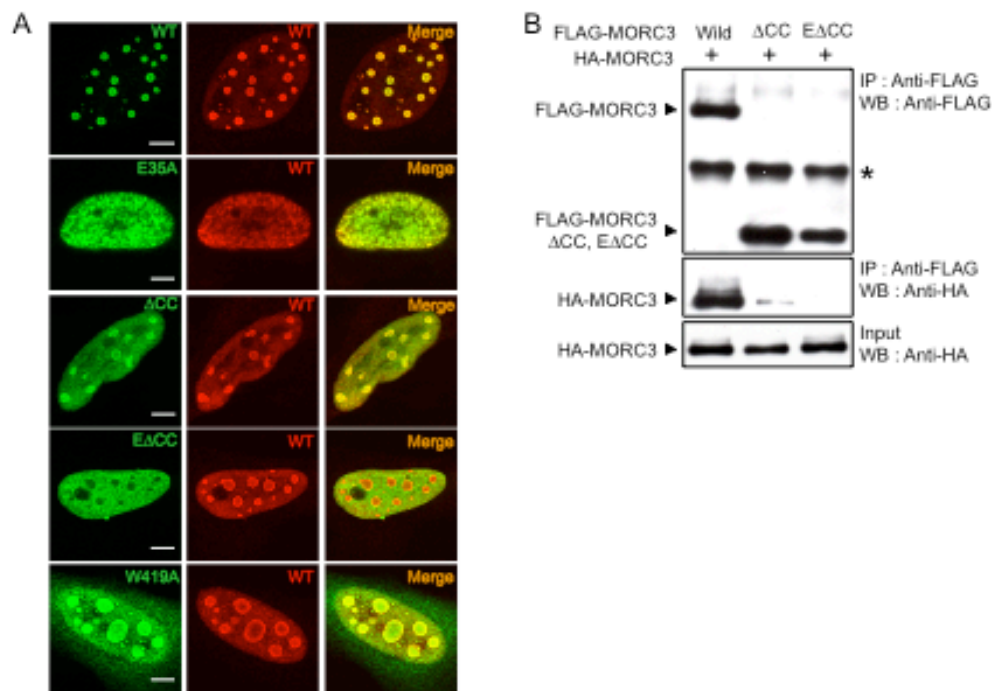


Figure 6 ATPase domainとCoiled-coil domainを介したMORC3のホモダイマー形成

(A) MORC3はATPase domainとCoiled-coil domainを介してホモダイマーを形成する。HA-MORC3 WTとFLAG-MORC3変異体 [E35A (二段目)、ΔCC (三段目)、EΔCC (四段目)、W419A (五段目)] 発現ベクターを共発現させたHeLa細胞を抗FLAG抗体 (緑、左図) と抗HA抗体 (赤、中図) を用いて免疫染色した。MORC3 WTとEΔCC変異体はそれぞれND、核質と異なる局在を示した。

(B) HA-MORC3 WTとFLAG-MORC3 WT、もしくは変異体 (ΔCC、EΔCC) 発現ベクターを共発現させたHeLa細胞からタンパク抽出液を調製し、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降し、抗FLAG抗体と抗HA抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。Inputには5%のタンパク抽出液を使用した。アスタリスクは抗FLAG抗体のheavy chainを示している。

3-5 MORC3 は5カ所の SUMO 化サイトを有する

PML-NBs に局在化するタンパクの多くは SUMO による修飾を受ける (Bernardi and Pandolfi, 2007)。そして、プロテオミクス解析の結果から、MORC3 も SUMO 化修飾を受けることが報告されている (Zhao et al., 2004)。我々も SUMO1 と SUMO E2-conjugating enzyme である UBE2I/UBC9 をクローニングしており、それらを用いた yeast two-hybrid system スクリーニングによって、MORC3 が SUMO 化修飾を受けることを明らかにしていた (Takahashi et al., 2007)。まず、我々は実際に MORC3 が SUMO 化修飾を受けるかどうか確認するため、FLAG-MORC3 と HA-SUMO1 を共発現させた HeLa 細胞を用いて、抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。その結果、3 本の SUMO 化された MORC3 であると考えられるバンドが検出された (Fig. 7B)。この SUMO 化された MORC3 のバンドは、FLAG-MORC3 と HA-SUMO1 を共発現させた HeLa 細胞から調製した lysate を抗 FLAG 抗体で免疫沈降法し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングでも確認することが出来た (Fig. 8)。この MORC3 の SUMO 化サイトを特定するため、その候補となる 5 つの典型的な SUMO 化モチーフ (Ψ KXE/D) 中のリシンをそれぞれアルギニンに置換した変異体 (K139R、K650R、K740R、K794R、K855R) を作製し (Fig. 7A)、ウェスタンブロッティングにより SUMO 化への影響を確認した (Fig. 7B)。その結果 K650R、K740R 変異体で SUMO 化バンドの減少が確認された。しかし、この二つの変異 (K650R、K740R) を含む 2KR 変異体は、依然として SUMO 化のバンドが存在していた (Fig. 7C)。次に、我々はこの 2KR 変異体に、さらに他の SUMO 化サイトの候補の変異を加えた 3KR (K650R、K740R、K794R)、4KR (K650R、K651R、K740R、K794R)、5KR (K597R、K650R、K651R、K740R、K794R) 変異体を作製し、SUMO 化のバンドへの影響を確認した (Fig. 7C)。SUMO 化修飾された MORC3 のバンドが 5KR 変異体で完全に消失したことから、MORC3 は 597、650、651、740、794 番目のリシンが SUMO 化サイトであることが明らかとなった。3KR 変異体と、それに 651 番目のリシンに変異を加えた 4KR 変異体とを比較した場合、SUMO 化のバンドの減少はほとんどみられていない (Fig. 7C)。ただし、651 番目のリシンは 650 番目のリシンと隣接して存在していることから、650 番目のリシンに変異を導入した事によって、二次的に SUMO 化サイトとなった可能性が挙げられる。

哺乳類細胞において、多くのタンパクが SUMO1 による修飾と同様に SUMO2 や SUMO3 による修飾を受ける (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007)。我々は、FLAG-MORC3 と HA-SUMO3 を導入した HeLa 細胞において、MORC3 が SUMO3 によって修飾されることを見いだした (Fig. 8)。

また、MORC3 が実際に SUMO 化されているか検討するため、我々は SUMO family の内で SUMO1 のみを認識する、抗 SUMO1 抗血清を作製した (Fig. 8)。FLAG-MORC3 WT を発現させた HeLa 細胞を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 SUMO1 抗血清を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、FLAG-MORC3 WT は内在性の SUMO1 によって修飾されることが分かった。興味深いことに、この 5KR 変異体は、WT に比べてより小さく、より多数の

ND を形成する傾向があった (Fig. 7E)。このことは、MORC3 の SUMO 化がドメインの成熟に関与している可能性を示唆している。

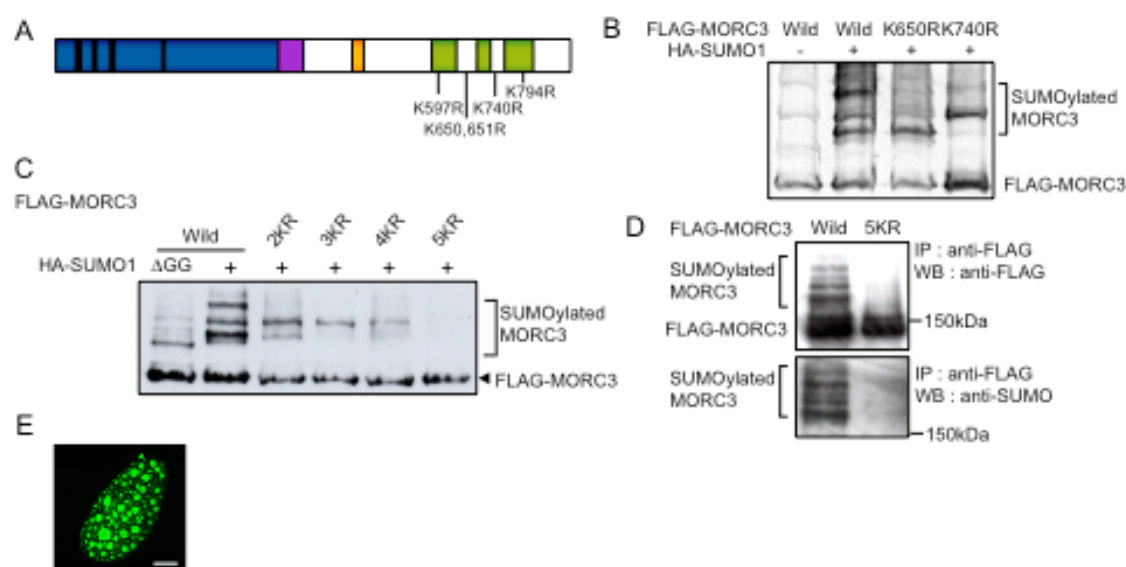


Figure 7 MORC3は5カ所のSUMO化サイトを有している。
 (A) MORC3-SUMO変異体 (5KR変異体) の模式図を示す。全てのSUMO化サイトはC末端Coiled-coil domain中に存在している。5KR変異体は5カ所のSUMO化サイト内のリシンをアルギニンに置換し作製した。
 (B)と(C) HeLa細胞にFLAG-MORC3-SUMO変異体とHA-SUMO1発現ベクターを共発現させ、抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティングによりSUMO化されたMORC3を検出した。HA-SUMO1-ΔGGはC末端の6アミノ酸の欠損した変異体であり、標的タンパクに結合することが出来ない。2KR、3KR、4KR、5KR変異体はそれぞれK650RとK740R、K650RとK740RとK794R、K650RとK651RとK740RとK794R、K597RとK650RとK651RとK740RとK794Rの変異を有している。5KR変異体は完全にSUMO1による修飾が消失していた。これら5カ所サイトがMORC3のSUMO化にとって重要である。
 (D) FLAG-MORC3 WTもしくは5KR変異体を発現させたHeLa細胞を抗FLAG抗体で免疫沈降し、抗FLAG抗体（上図）と抗SUMO抗体（下図）を用いたウェスタンブロッティングを行った。FLAG-MORC3 WTは内在性SUMO1による修飾を受けるが、5KR変異体は全く修飾されなかった。
 (E) HeLa細胞中のFLAG-5KR変異体の局在。MORC3 WTに比べ、細かいドット状の局在を示している。

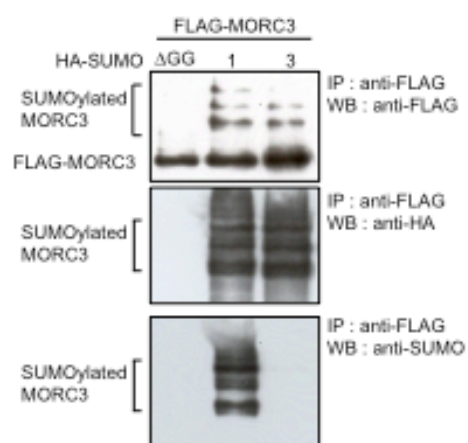


Figure 8 抗SUMOポリクローナル抗体はSUMO3ではなくSUMO1のみを認識する。
 FLAG-MORC3 WTとHA-SUMO1-ΔGG、HA-SUMO1、HA-SUMO3を発現させたHeLa細胞を
 抗FLAG抗体で免疫沈降し、抗FLAG抗体（上図）、抗HA抗体（中図）、抗SUMO1抗体
 （下図）でウェスタンブロッティングを行った。高発現したMORC3 WTは、SUMO3ではな
 くSUMO1によって効率的に修飾される。作製した抗SUMO1抗体はSUMO3ではなくSUMO1
 のみを認識する。

3-6 MORC3 は SUMO-SIM 相互作用を介して PML I と結合する

SUMO 化されたタンパクは、他の SUMO-interacting motif (SIM) を有するタンパクと非共有結合的相互作用を行う (Minty et al., 2000)。PML は一つの SIM (556-559aa) と 3 カ所の SUMO 化サイト (K65、K160、K490) を有し (Kamitani et al., 1998) (Fig. 9A)、PML 自身や SUMO 化される Sp100、SIM を有する Daxx などのタンパクと SUMO-SIM 相互作用を行う (Bernardi and Pandolfi, 2007; Shen et al., 2006)。我々は SUMO 化された MORC3 が PML の SIM と相互作用することによって共局在しているのではないかと予想し、PML の SIM 変異体である PML I-AS 変異体を作製し (Fig. 9A と B)、MORC3 WT と 5KR 変異体および PML I WT と PML I-AS 変異体との間の相互作用について免疫染色と免疫沈降法で確認した (Fig. 10A と B)。MORC3 WT と PML I WT は完全に共局在するのに対して (Fig. 10A; 一段目)、5KR 変異体と PML I WT (Fig. 10A; 二段目)、MORC3 WT と PML I-AS 変異体 (Fig. 10A; 三段目) はそれぞれ独立した ND 構造を形成していた。また、MORC3 WT と PML I WT は免疫沈降法により共沈し、強く相互作用しているのに対して、5KR 変異体と PML I WT、MORC3 WT と PML I-AS 変異体は相互作用が減少しており、5KR 変異体と PML I-AS 変異体では完全に消失していた (Fig. 10B)。原因は不明であるが、5KR 変異体と PML I-AS 変異体は共局在しているのが観察されたが (Fig. 10A; 四段目)、免疫沈降では相互作用は検出できなかった (Fig. 10B)。また、PML I と同様に、SIM を有する PML スプライシングバリエーションである PML III もしくは IV と MORC3 との局在を確認した結果、PML III および IV と MORC3 の部分的な共局在と、PML 非依存的 MORC3-NDs、MORC3 非依存的 PML-NBs が観察された (Fig. 11A)。

我々は核内で拡散した局在を示す E35A 変異体を用いて、MORC3 と PML I 間の相互作用と、PML I と PML-NBs 間の相互作用の強さを比較した。E35A 変異体発現下では内在性の PML および、高発現させた PML III、PML IV (PML のスプライシングバリエーション) は NB 構造を形成していた (Fig. 2B と Fig. 11B) (Takahashi et al., 2007)。しかし、E35A 変異体と PML I WT を発現させた場合では、共に核内で拡散していた (Fig. 10C; 一段目)。この E35A 変異体による PML I WT の拡散は、E-5KR 変異体と PML I WT を共発現させた細胞 (Fig. 9C; 二段目)、E35A 変異体と PML I-AS を共発現させた細胞 (Fig. 10C; 三段目)、E-5KR 変異体と PML I-AS を共発現させた細胞 (Fig. 10C; 四段目) では起こっておらず、全て PML I はドット状の局在を示していた。MORC3 と PML I の結合が SUMO-SIM 相互作用を介しているかどうか検討するため、SUMO 特異的イソペプチダーゼ阻害剤である N-ethylmaleimide (NEM) を加えずに免疫沈降法を行った (Fig. 10D)。NEM 非存在下では、MORC3 と PML I の共沈は確認できなかった。さらに、UBE2I siRNA を用いて SUMO 化を抑制し、MORC3-PML I 間の相互作用に SUMO 化が必須であるか確認した。UBE2I のタンパクの発現が高効率で抑制された結果 (Fig. 10E)、SUMO 化された MORC3 が減少した (Fig. 10F)。UBE2I ノックダウン細胞では、PML I 非依存的な MORC3 の ND 形成が増加していた (Fig. 10G)。これらの結果は、MORC3 と PML I の相互作用によって、MORC3 の SUMO 化と PML I の SIM が重要であることを示唆している。

また、PML I の SUMO 化が MORC3 と PML I の相互作用に影響を与えるかどうかを検討するため、PML I の SUMO 化変異体である PML I-3KR 変異体を作製し、FLAG-MORC3 との相互作用について免疫染色 (Fig. 11C) と免疫沈降法で確認した (Fig. 11D)。核内で PML I-3KR 変異体は FLAG-MORC3 とドット状に共局在しており、免疫沈降においても共沈してきた。従って、PML I の SUMO 化は MORC3-PML I 間の相互作用に寄与していないと考えられる。さらに、PML-NBs と会合していない MORC3 が SUMO 化されているかどうか確認するため、マウスの骨髄細胞を抗 MORC3 抗体、抗 PML 抗体、抗 SUMO1 抗体で共染色した (Fig. 10H)。ほとんどの SUMO1 は単独の Morc3-NDs とは共局在しておらず、Pml-NBs と共局在していた。

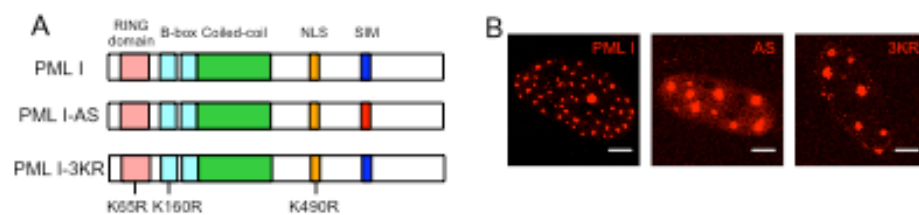
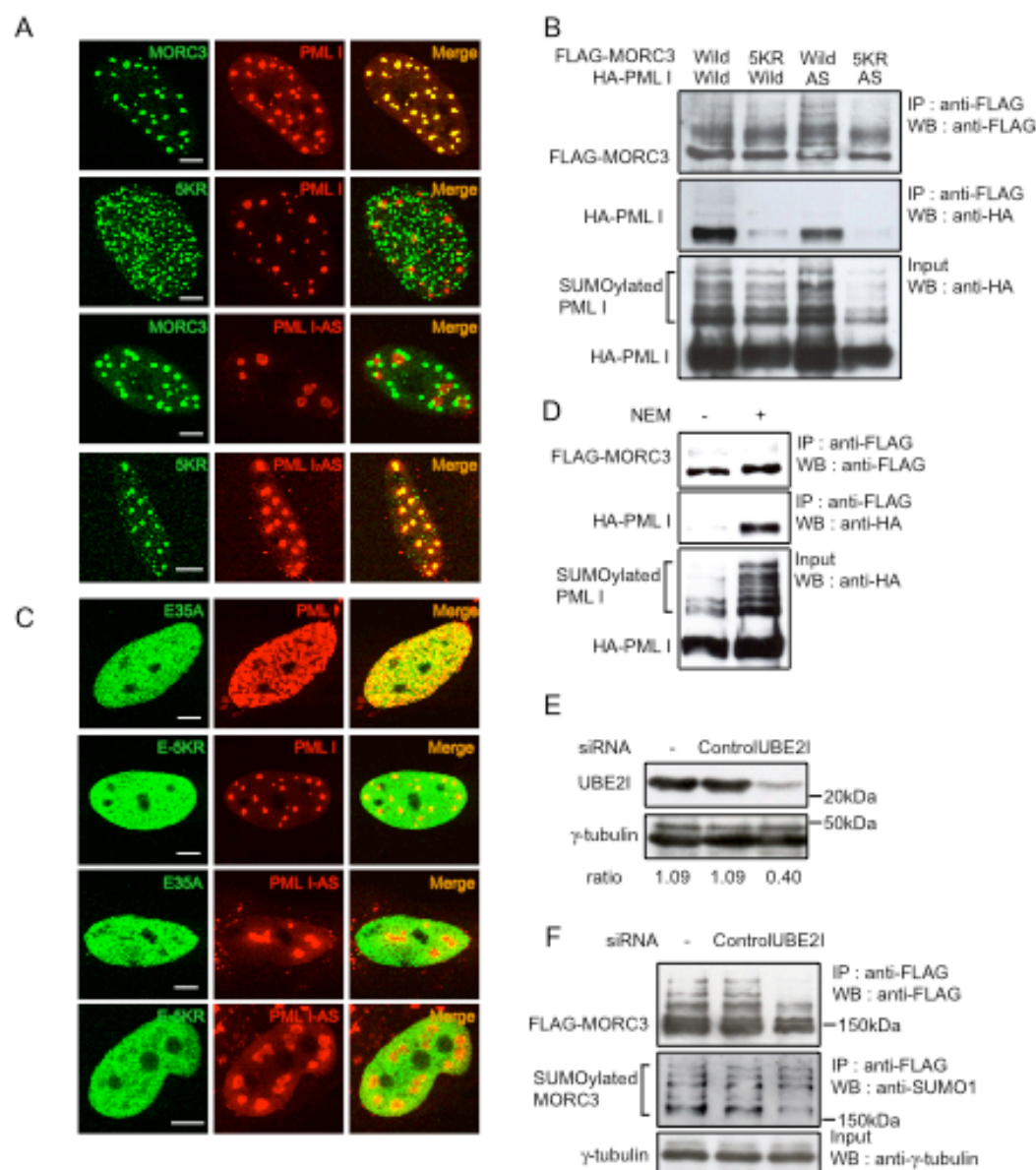


Figure 9 PML I WTと変異体の構造と核内局在

(A) PML I WTと変異体の二次構造の模式図示す。PML I-AS変異体はSUMO interacting motif (VVVI、アミノ酸556から559番目) をAAASに置換して作製した。PML I-3KR変異体は3カ所のSUMO化サイトのリシン (K65、K160、K490) をアラニンに置換して作製した。

(B) PML I WT、PML I-AS変異体、PML I-3KR変異体の核内局在。HeLa細胞にHA-PML I WTおよび変異体を発現させ、抗HA抗体で免疫染色した。PML I-AS変異体とPML I-3KR変異体は、PML I WTと比べ、より大きなNB構造を形成する。



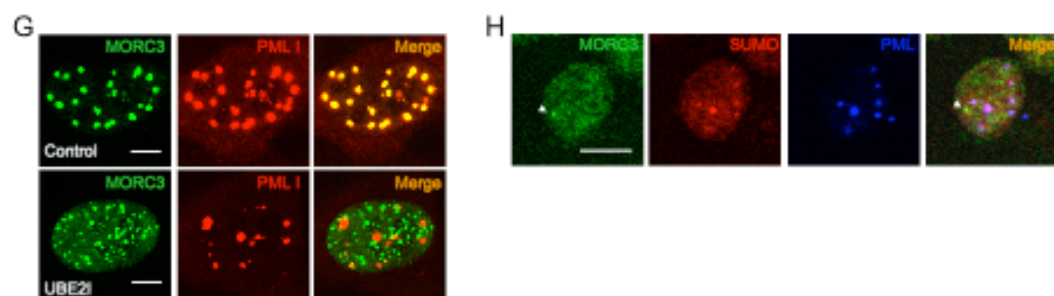


Figure 10 SUMO化されたMORC3はPMLのSUMO-interacting motif (SIM)を介して会合する。
 (A) FLAG-MORC3 WTもしくは5KR変異体とHA-PML I WTもしくはSIMに変異をもつAS変異体をHeLa細胞に発現させ、抗FLAG抗体（緑、左図）と抗PML抗体（赤、中図）を用いて免疫染色を行った。MORC3 WTとPML I WTは完全に局在が一致した（一段目）。しかし、5KR変異体とPML I WT（二段目）、MORC3 WTとAS変異（三段目）ではそれぞれ独立したND構造を形成した。また、5KR変異体とAS変異も局在は一致していた（四段目）。
 (B) FLAG-MORC3 WTもしくは5KR変異体とHA-PML I WTもしくはAS変異体をHeLa細胞に発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降し、抗FLAG抗体と抗HA抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。FLAG-MORC3 WTとHA-PML I WTの相互作用は5KR変異体やAS変異体では減少していた。
 (C) FLAG-MORC3 E35Aもしくは5KR変異体とHA-PML I WTもしくはAS変異体をHeLa細胞に発現させ、抗FLAG抗体（緑、左図）と抗PML抗体（赤、中図）を用いて免疫染色を行った。E35A変異体はPML-NBsを崩壊させたが、E-5KR変異体やAS変異体では互いに影響を及ぼすことはなかった。
 (D) FLAG-MORC3とHA-PML Iを発現させたHeLa細胞から調製したタンパク抽出液を、*N*-ethylmaleimide (NEM) 存在下および非存在下で抗FLAG抗体による免疫沈降を行い抗FLAG抗体および抗HA抗体でウェスタンブロットティングを行った。脱SUMO化酵素の阻害剤であるNEMはFLAG-MORC3とHA-PML Iの相互作用に必須である。(C)と(D)におけるインプットは免疫沈降を行ったタンパク抽出液の5%を使用した。
 (E) ControlもしくはUBE2I siRNAを導入した HeLa細胞を抗UBE2I抗体を用いてブロットティングした。下部の数値は、NIH imageによる γ -tubulinに対するUBE2Iの相対的発現量を示す。
 (F) ControlもしくはUBE2I siRNAを導入した HeLa細胞に、FLAG-MORC3 WTとHA-PML I WTを発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降後、抗FLAG抗体と抗SUMO抗体でブロットティングした。UBE2Iノックダウンによって、MORC3のSUMO化は部分的に抑制されていた。
 (G) ControlもしくはUBE2I siRNAを導入した HeLa細胞に、FLAG-MORC3 WTとHA-PML I WTを発現させ、抗FLAG抗体（緑、左図）と抗PML抗体（赤、中図）を用いて免疫染色を行った。UBE2Iのノックダウンによって、MORC3とPML Iの共局在は抑制された。
 (H) マウスの骨髄細胞を抗MORC3抗体（緑、左図）、抗SUMO抗体（赤、中図）、抗PML抗体（青、右図）で免疫染色した。PML非依存的MORC3-NDはSUMO1と共局在していない。

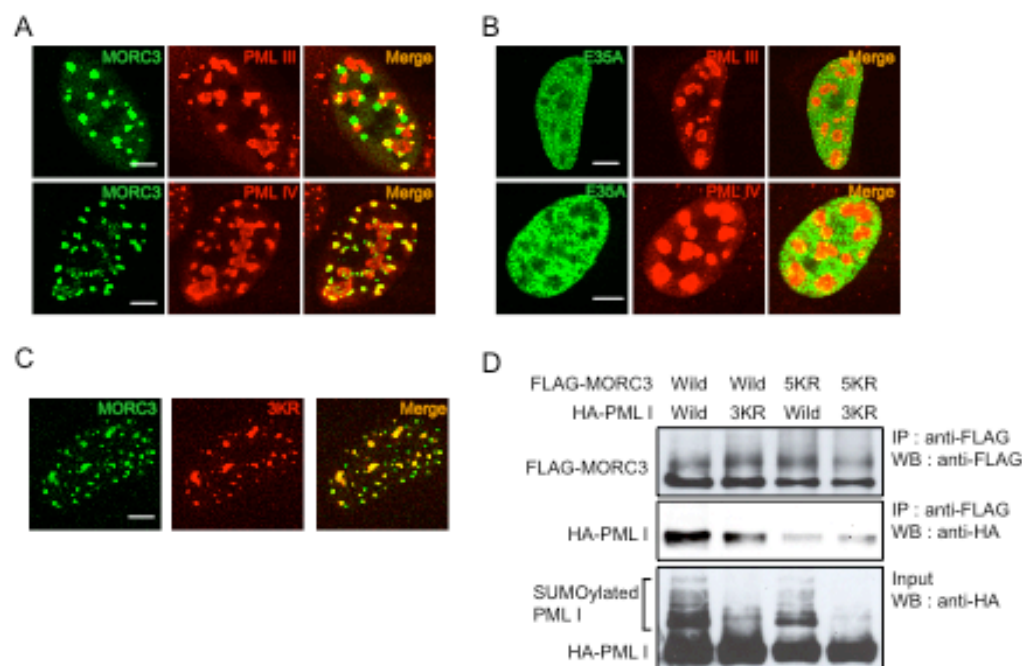


Figure 11 PML IIIとPML IV及びSUMO化変異体と、MORC3との相互作用

HeLa細胞にHA-PML IIIもしくはHA-PML IVとMORC3 (A)もしくはE35A変異体 (B)と発現させ、抗FLAG抗体 (緑、左図) と抗HA抗体 (赤、中図) で免疫染色し、局在を確認した。

(A) MORC3 WT、PML III、PML IVは共ドット状の局在を示したが、部分的にしか共局在していなかった。

(B) E35A変異体は核内で拡散、PML IIIやPML IVはドット状に局在し、お互いに共局在していなかった。

(C) MORC3 WTとPML I-3KR変異体の核内局在。FLAG-MORC3とHA-PML I-3KR変異体をHeLa細胞に発現させ、抗FLAG抗体 (緑、左図) と抗HA抗体 (赤、中図) を用いて免疫染色を行った。MORC3 WTとPML-3KR変異体は共局在していた。

(D) FLAG-MORC3 WTもしくは5KR変異体とHA-PML I WTもしくは3KR変異体をHeLa細胞に発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降し、抗FLAG抗体 (上図) と抗HA抗体 (中図) を用いてウェスタンブロッティングを行った。FLAG-MORC3 WTとHA-PML I WTの相互作用は5KR変異体やAS変異体では減少していた。インプットは免疫沈降を行ったタンパク抽出液の5%を使用した (下図)。MORC3 WTとPML-3KR変異体の相互作用はMORC3 WTとPML I WTに比べ、僅かに減少していたものの、そのほとんどは維持されていた。

3-6 MORC3-ND の核内ダイナミクス

最後に、生細胞中での MORC3-NDs のダイナミクスを解析するため、ATP 枯渇処理によって拡散させた MORC3 を、ATP-リカバリーにより ND 構造の再形成を誘導し、その過程を観察した。以前に報告したように、EGFP-MORC3 によって形成された ND 構造は、FLAG-MORC3 のものに比べ非常に固く、ATP 枯渇処理によって拡散しない (Takahashi et al., 2007)。我々は monomeric EGFP タグした MORC3 発現ベクターを作製した。HeLa 細胞では、mEGFP-MORC3 は 10mM sodium azide を添加した glucose-free 培養液中で拡散することはなかった。しかしながら、我々は mEGFP-MORC3 と mCherry-PML I を共発現させた CHO 細胞では、3 時間 10mM sodium azide を添加した glucose-free 培養液中で培養することで拡散することを確認した。そこで、mEGFP-MORC3 と mCherry-PML I を共発現させた細胞を ATP 枯渇処理し、mEGFP-MORC3 の拡散を確認後、通常の培養液に戻し MORC3-ND の再形成を観察した。MORC3 の拡散しているほとんどの細胞で、MORC3-NDs は PML-NBs に徐々に集積することで再形成していた (Fig. 12)。PML-NBs 非存在領域に形成された MORC3-ND は経時的にシグナル強度を増大し、40 分後には PML-NB と融合した (Fig. 12)。

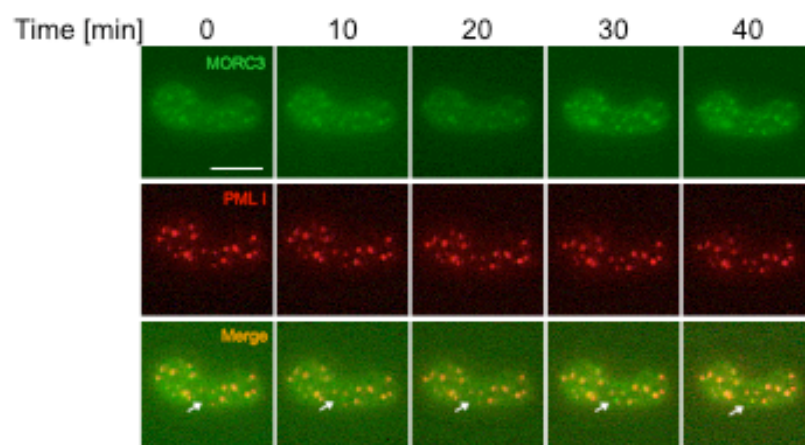


Figure 12 生細胞中のATP依存的なMORC3の挙動

CHO-K1細胞にmEGFP-MORC3とmCherry-PML Iを発現させ、10mM sodium azideを含む glucose-free培養液中で37℃、3h培養した。核内でmEGFP-MORC3の拡散を確認後、培養液を通常のものに置き換え、10min毎にMORC3-NDsの再形成を観察した。PML-NBs非依存的な領域に形成されたMORC3-ND（矢印）は徐々に明るさとサイズを増加させ、次にPML-NBsと融合した。画像内のスケールは5 μ m。

4. 考察

4-1 二段階による MORC3 の PML-NBs 局在化メカニズム

本研究では、*Pml*^{-/-}MEFs やマウス骨髄細胞において MORC3 が PML 非依存的に ND 構造を形成している事象から、この PML 非依存的な MORC3-NDs 形成の分子機構について詳細に解析を行った。以前に我々は、MORC3 の PML-NBs への局在化に自身の ATPase 活性が関与しているということを報告した (Takahashi et al., 2007)。今回、我々はこの MORC3 と PML の共局在プロセスにおいて、厳密な 2 つの段階を経ることで達成されることを明らかにした。それは①MORC3 が ATP 依存的に ND 構造を形成すること、②MORC3-NDs が PML-NBs と会合することの 2 つである (Fig. 13)。MORC3 の ATPase domain に ATP が結合することで ND 構造は形成され、結合した ATP の加水分解によって ND 構造から解離し、核内全体に拡散する。MORC3-NDs が PML-NBs に会合は、MORC3 が SUMO1 による修飾を受け、PML I の SIM を介して相互作用することによって調節されている。少なくともマウスの骨髄細胞において、Morc3-NDs は、Pml-NBs と共局在していない限り Sumo1 との共局在はほとんど起こっていなかった。このことは、MORC3 の SUMO 化が PML との会合にとって重要であることを示唆している。さらに、mEGFP-MORC3 と mCherry-PML I を共発現した細胞において、我々は MORC3-NDs と PML-NBs との共局在が二つのステップを経ていることを明らかにした。まず始めに、mEGFP-MORC3 は核内の PML 非存在領域にサイズと明るさを徐々に増加させながら ND 構造を形成する。次いで、形成された MORC3-ND と PML-NB が融合する。しかしながら、MORC3 は PML 非依存的な MORC3-ND の形成は非常に少なく、そのほとんどは PML-NBs へ集積することで形成されている (Fig. 13)。ほとんどの MORC3 は PML-NBs に局在化しているが、SUMO 化修飾を受けているものはごく僅かである (Fig. 7D)。我々は、非常に少数の SUMO 化修飾を受けた MORC3 が、MORC3-NDs と PML-NBs の相互作用に関与していると予想している。

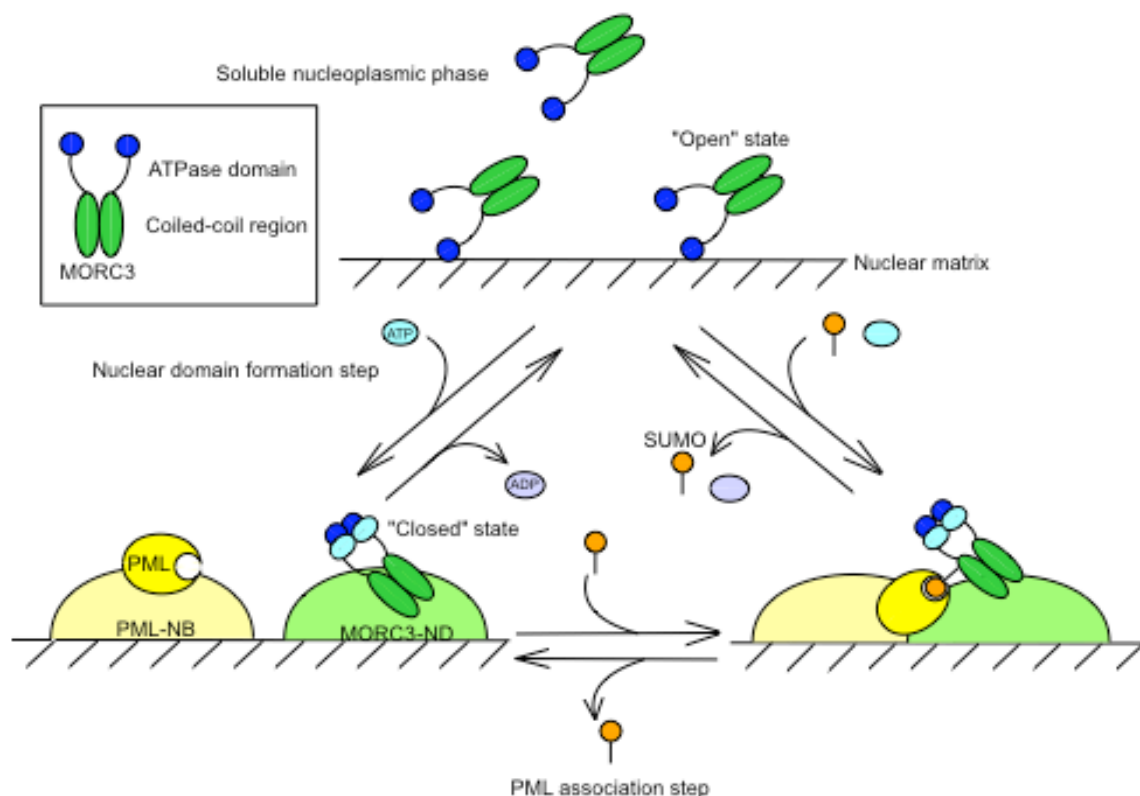


Figure 13 MORC3-NDsのPML-NBsへの2ステップ局在化モデル図

MORC3 とPMLの共局在の過程は2ステップに分けることが出来る。MORC3はATPサイクルを通じて”モレキュラークランプ”として機能し、MORC3-NDsを形成する（ND形成ステップ）。MORC3とPMLは、SUMO化されたMORC3とPMLのSIMを介して会合する（PML会合ステップ）。いくつかのMORC3がはじめにSUMO化され、次にATPの結合によるND構造を形成とPML-NBsと会合が同時に起こっているかもしれない。

4-2 他の GHL-ATPase タンパクと同様に、MORC3 は“モレキュラークランプ”として機能し、核ドメインを形成する

我々は、MORC3 が C 末端側の Coiled-coil domain を介した恒常的な相互作用と、N 末端側の ATPase domain への ATP の結合依存的な相互作用により、MORC3-MORC3 間相互作用を行っていることを示した (Fig. 13)。ATP-free 条件下での MORC3 は、Coiled-coil domain を介して二量化し、“オープン”構造をとっており、核内で拡散、核マトリックスに結合している。そこへ ATP が結合することにより、N 末端側の ATPase domain を介した二量化が誘発されることで“クローズド”構造をとり、ND 構造を形成する。そして、結合している ATP が加水分解され、ATPase domain から解離、再び“オープン”構造をとることにより ND 構造から核マトリックスへと移動する。我々の実験結果は、この MORC3 の移動がいくつかの段階を経て達成されるものであることを示唆している。*In situ* MORC3-ND 拡散アッセイにおいて、コントロールである CSK buffer や ATP を添加した CSK buffer では MORC3 は流出してしまったこと (Fig. 5A)や、CW domain や Coiled-coil domain 変異体が CSK buffer によって流出してしまうということ (Fig. 3B)から、MORC3 は ATP の加水分解により ND 構造から解離した後、一度核質中でどの構造にも結合していない完全にフリーな状態を経てから、核マトリックスへ結合していると予想される (Fig. 13)。

我々は、現在の所 MORC3 の ATPase 活性や ATP の結合活性について直接的な測定を行う事が出来ていないが、ATP 非分解性アナログである ATP-PNP によって MORC3 の拡散が抑制され、ATP では抑制することが出来ないことを明らかにしている (Fig. 5A)。従って、この結果は MORC3 が ATPase 活性と ATP 結合活性の両方を持っていることを示していると考えられる。

4-3 E35A 変異体と D67A 変異体は ATPase 活性ではなく ATP 結合活性が欠損している

バクテリアおよび酵母の GHL-ATPase タンパクの結晶構造解析によって、ATPase 活性と ATP 結合活性に重要なアミノ酸残基が明らかにされている (Dutta and Inouye, 2000; Sacho et al., 2008; Shiao et al., 2006)。GHL-ATPase domain のモチーフ I に保存されているグルタミン酸残基は、ATP の γ -リン酸基のリン酸エステル結合を加水分解する際の水分子による求核攻撃の活性化に関与しており、ATPase domain の活性中心であることが明らかとなっている。他の全ての GHL-ATPase タンパクでは、この保存されたグルタミン酸残基に点変異を加えアラニンへ変異させることによって、結合活性は影響せず、ATPase 活性のみが阻害される (Panaretou et al., 1998; Tran and Liskay, 2000)。他にもモチーフ II に保存されているアスパラギン酸 (Panaretou et al., 1998) やモチーフ III に保存されているグリシン (Tran and Liskay, 2000) は、それぞれアデニンの N6-アミンと ATP の α -および γ -リン酸基と相互作用する。これらの変異体 (D を N、G を A に置換) は ATP の結合活性が阻害される。本研究で我々はこれらの保存されたアミノ酸残基について 3 つの変異体 (E35A、D79N、G101A) を作製し、機能解析を行った。他の GHL-ATPase family タンパクとは異なり、MORC3-E35A 変異体は ATPase 活性ではなく、ATP 結合活性が阻害されていると考えられる。その理由として、第一には E35A 変異体を示す拡散した局在は、ATP の結合活性が阻害されている変異体である G101A 変異体や ATP 枯渇条件下での MORC3-WT の局在と非常に酷似していること (Fig. 3D と Fig. 4A)。第二には ATP 非分解性アナログである AMP-PNP 存在下では、MORC3-WT は Run-on buffer 処理や DNaseI 処理による拡散が阻害されること (Fig. 5)。さらに、他の GHL-ATPase family タンパクと同様であるならば、保存されているアスパラギン酸残基の変異体は ATP 結合活性が阻害されているはずであるが (Panaretou et al., 1998)、MORC3-D67N 変異体は ND 構造を形成しており、ATP 枯渇条件下において WT より早く拡散した (Fig. 4A)。E35A と D67N の二つの変異をもつ変異体では、核全体に拡散した局在を示した (Fig. 4C)。これらの結果は、D67N 変異体が弱い ATP 結合活性を有していること、E35A および G101A 変異体が ATP 結合活性をほぼ完全に欠損していることを示している。我々は MORC3 の ATPase 活性や ATP 結合活性を直接測定してはいないが、MORC3 の ATPase domain は ATP の加水分解と結合における必須のアミノ酸残基の機能が、他の GHL-ATPase family タンパクと僅かに異なっている可能性があると予想している。今後、MORC3 の結晶構造解析が行われることによって、ATPase 活性や結合活性に重要なアミノ酸残基が明らかとなっていくと考えられる。

4-4 MORC3 の SUMO 化は PML との結合に重要である

我々は MORC3 の Coiled-coil domain 中に 5 カ所の SUMO1 によって修飾されるサイトが存在することを明らかにした (Fig. 7B と C)。そして、SUMO 化の変異体である 5KR 変異体は PML I との相互作用が著しく抑制される (Fig. 10A と C)。さらに、MORC3 と PML I との間の相互作用は、脱 SUMO 化酵素 (イソペプチダーゼ) の阻害剤である NEM の非存在下で完全に消失し (Fig. 10D)、UBE2I ノックダウン条件下では MORC3-NDs と PML-NBs がそれぞれ独立して形成されていた (Fig. 10G)。従って、MORC3 の SUMO 化が PML I との相互作用にとって必須であると考えられる。しかし、PML I の SIM 変異体では、MORC3 との相互作用は部分的にしか抑制されていなかった (Fig. 10A と B)。その理由として、Fig. 10A では、MORC3 と PML I-AS は互いに独立した構造体を形成しながらも、隣接した位置に存在しているということから、PML I は SIM に加えて、他の SIM をもつタンパクと相互作用し、そのタンパクと SUMO 化された MORC3 とが相互作用している可能性が考えられる。

以前に我々は、E35A 変異体を発現している細胞内で、内在性の PML が NB を形成していることを報告した (Takahashi et al., 2007)。しかし、今回の研究で E35A 変異体と共に PML I を発現させた場合、PML I は NB 構造を形成せず、核全体に拡散することが明らかになった (Fig. 10C)。同様の実験を他のオルタネイティブスプライシングバリエントである PML III や IV で行った場合、E35A 変異体の発現に関係なく、どちらのバリエントも核内で NB 構造を形成していた (Fig. 11B)。この結果は、E35A 変異体を発現させた細胞内で内在性 PML が、NB 構造を形成していた理由として、PML I 以外のバリエントによって形成されたものである可能性を示唆している (Fig. 3B)。また、PML III と IV は、PML I と同様に SIM を有しているが、C 末端側のエキソン 9 をもっていない。このことから、PML I のエキソン 9 に SUMO-SIM 相互作用を補助、増強し得るようなサイトが存在し、それによって PML I は他のスプライシングバリエントに比べ、SUMO 化された MORC3 と強く相互作用することが可能なのではないかと考えられる。

4-5 MORC3 は CW domain を介して DNA もしくはヌクレオソームに結合している

CW domain は 4 つのシステイン残基と 2 つのトリプトファン残基から構成される mononuclear zinc-finger であり、脊椎動物から高等植物まで非常に良く保存されている (Perry and Zhao, 2003)。CW domain は PHD domain と構造的に相同であり、PHD domain はメチル化されたヒストン H3 に結合する。それに加えて、CW domain を有するファミリーのいくつかは、メチル化された DNA や SNF (sucrose non-fermenting) 2 helicase、SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax)、PWWP (Pro-Trp-Trp-PRO) domain、MBDs (methyl-binding domains) のようなクロマチンと相互作用する他のドメインを有している。従って、CW domain はヒストンコードやヌクレオソームもしくは DNA 自体との結合に関与していると予想される (Iyer et al., 2008; Perry and Zhao, 2003)。しかし、現在まで CW domain の機能についてはほとんど明らかにされていない。今回の研究で、我々は MORC3 の ND 構造の形成が DNA 依存的であり、DNase I 処理によって MORC3-NDs は崩壊してしまうことを明らかにした (Fig. 2B)。この結果は、MORC3 が ND 構造を形成する際に、DNA もしくは DNA 結合タンパクとの相互作用が必要であることを示唆している。CW domain の変異体である W419A 変異体は ATPase domain と Coiled-coil domain が正常であり、“クローズド” 構造を形成することが出来ると予想される。しかし、実際にはこの変異体は核内で拡散しており、そのほとんどが CSK buffer 処理によって溶出してしまう (Fig. 2B と C)。僅かに PML-NBs への局在化も認められるが、それは内在性 MORC3 との相互作用を介したものだとは予想され、ほとんどは核質中にフリーな状態で存在していると考えられる (Fig. 2C)。さらに、W419A 変異体は ATP 枯渇条件下で核マトリックスに結合することから ATPase domain は正常に機能していると考えられる (Fig. 4B)。従って、W419A 変異体は ATP 結合状態、言い換えると “クローズド” 構造を形成しているにも関わらず、ND 構造を形成することが出来ない変異体である。以上の結果は、CW domain は MORC3 が DNA もしくはヌクレオソームに結合するための middle domain として機能していることを示唆している。興味深いことに、DNase I 処理による MORC3-NDs の拡散は、AMP-PNP 存在下では阻害された (Fig. 5B)。このことは、ATP の結合した “クローズド” 構造の MORC3 が DNA やヌクレオソームと同時に、核マトリックスもしくは核マトリックス結合タンパクとも相互作用していることを示唆している。

4-6 MORC3-ND 形成の機能

MORC3-NDs は細胞の種類などによってその大きさや数は様々である。MEFs の MORC3-NDs は小さく、数も少ないが、一方でヒトやマウスの造血系細胞では数は少ないが、非常に大きな ND 構造を形成している (Fig. 1A と C、Fig. 2A)。MEFs では形成された MORC3-NDs の内、PML-NBs と局在が異なるものは 5.45%であったのに対し、マウスの骨髓細胞では 68.75%であった (Fig. 1D)。WT と比較して、5KR 変異体は多数の小さな ND 構造を形成する (Fig. 7E)。MORC3 WT は PML I と完全に局在が一致し、スプライシングバリエントである PML III や IV は部分的に一致していた (Fig. 11A)。これらの結果から、PML-非依存的な MORC3-NDs の数とサイズは、MORC3 の SUMO 化の状態と PML のスプライシングバリエントの発現パターンによって調節されており、それらは細胞の分化やストレス応答、細胞周期の調節に関与していると予想される。

我々は、*Morc3* ノックアウトマウスを既に作製しており、このマウスは出産された直後、もしくはその一両日中に死んでしまう。現在の所、*MORC3* ノックアウトマウスの死因についてほとんど知見を得られていない (Takahashi et al., 2007)。今後、MORC3-ND の機能を理解するにあたって、この *MORC3* ノックアウトマウスの解析が有効であると考えている。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、全くの素人であった私を一から御指導下さいました大阪府立成人病センター研究所分子遺伝学部門、井上徳光博士に深く感謝致します。

始終適切なご指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究細胞増殖学講座、竹家達夫教授、構造生物学講座、箱嶋敏雄教授、動物遺伝子機能学、石田靖雅准教授、並びに大阪府立成人病センター疾患分子遺伝学部門、加藤菊也教授に深く感謝致します。急な博士論文の審査を快くお引き受け下さった動物遺伝子機能学、川市正史教授に深く感謝いたします。

始終快く御指導、御討論下さいました大阪府立成人病センター研究所分子遺伝学部門、赤澤隆博士、北海道大学医学研究科感染症制御学分野、志馬寛明博士に深く感謝致します。

大阪府立成人病センター研究所の皆様には、常に暖かく接して頂いたことを深く感謝いたします。

2010年6月 三村恭弘

6. 略号一覧

PML; promyelocytic leukaemia

PML-NBs; PML-nuclear domains

APL; acute promyelocytic leukaemia

RARA; retinoic acid receptor-alpha

ATRA; all trans-retinoic acid

ATO; arsenic trioxide

SUMO; small ubiquitin-like modifier

PHD; Plant Homeo Domain

MORC3; Microchidia family CW-type zinc finger 3

GHL -ATPase domain; (Gyrase B, Hsp90, MutL)-ATPase domain

MORC3- NDs; MORC3-nuclear domains

WT; wild type

MEF; mouse embryonic fibroblast

SIM; SUMO interacting motif

NEM; N-ethylmaleimide

7. 参考文献

Baird, C. L., Harkins, T. T., Morris, S. K., and Lindsley, J. E. (1999). Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13685-13690.

Ban, C., Junop, M., and Yang, W. (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* 97, 85-97.

Ban, C., and Yang, W. (1998). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* 95, 541-552.

Bernardi, R., and Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 1006-1016.

David L. Spector, R. D. G., Leslie A. Leinwand (1998). *Cells a Laboratory Manual*.

de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.

Degos, L., and Wang, Z. Y. (2001). All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20,

7140-7145.

Dutta, R., and Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 25, 24-28.

Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.

Handwerger, K. E., and Gall, J. G. (2006). Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* 16, 19-26.

Inoue, N., Hess, K. D., Moreadith, R. W., Richardson, L. L., Handel, M. A., Watson, M. L., and Zinn, A. R. (1999). New gene family defined by MORC, a nuclear protein required for mouse spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 8, 1201-1207.

Iyer, L. M., Anantharaman, V., Wolf, M. Y., and Aravind, L. (2008). Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol* 38, 1-31.

Kakizuka, A., Miller, W. H., Jr., Umesono, K., Warrell, R. P., Jr., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E., and Evans, R. M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66, 663-674.

Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E. T. (1998). Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273, 26675-26682.

Kimura, H., Takizawa, N., Allemand, E., Hori, T., Iborra, F. J., Nozaki, N., Muraki, M., Hagiwara, M., Krainer, A. R., Fukagawa, T., and Okawa, K. (2006). A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2Cgamma, mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B. *J Cell Biol* 175, 389-400.

Kimura, Y., Sakai, F., Nakano, O., Kisaki, O., Sugimoto, H., Sawamura, T., Sadano, H., and Osumi, T. (2002). The newly identified human nuclear protein NXP-2 possesses three distinct domains, the nuclear matrix-binding, RNA-binding, and coiled-coil domains. *J Biol Chem* 277, 20611-20617.

Lamond, A. I., and Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547-553.

Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., *et al.* (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 24, 341-354.

Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* 275, 36316-36323.

Nguyen, L. A., Pandolfi, P. P., Aikawa, Y., Tagata, Y., Ohki, M., and Kitabayashi, I. (2005). Physical and functional link of the leukemia-associated factors AML1 and PML. *Blood* 105, 292-300.

Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in

vivo. *Embo J* 17, 4829-4836.

Pandolfi, P. P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F., Grignani, F., and Pelicci, P. G. (1991). Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* 6, 1285-1292.

Perry, J., and Zhao, Y. (2003). The CW domain, a structural module shared amongst vertebrates, vertebrate-infecting parasites and higher plants. *Trends Biochem Sci* 28, 576-580.

Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A. I., and Swedlow, J. R. (2002). Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 4, 502-508.

Richter, K., and Buchner, J. (2006). hsp90: twist and fold. *Cell* 127, 251-253.

Sacho, E. J., Kadyrov, F. A., Modrich, P., Kunkel, T. A., and Erie, D. A. (2008). Direct visualization of asymmetric adenine-nucleotide-induced conformational changes in MutL alpha. *Mol Cell* 29, 112-121.

Saitoh, N., Uchimura, Y., Tachibana, T., Sugahara, S., Saitoh, H., and Nakao, M. (2006). In situ SUMOylation analysis reveals a modulatory role of RanBP2 in the nuclear rim and PML bodies. *Exp Cell Res* 312, 1418-1430.

Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., and Pandolfi, P. P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24, 331-339.

Shiau, A. K., Harris, S. F., Southworth, D. R., and Agard, D. A. (2006). Structural Analysis of *E. coli* hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* 127, 329-340.

Takahashi, K., Yoshida, N., Murakami, N., Kawata, K., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., Zinn, A. R., Shime, H., and Inoue, N. (2007). Dynamic regulation of p53 subnuclear localization and senescence by MORC3. *Mol Biol Cell* 18, 1701-1709.

Tran, P. T., and Liskay, R. M. (2000). Functional studies on the candidate ATPase domains of *Saccharomyces cerevisiae* MutLalpha. *Mol Cell Biol* 20, 6390-6398.

Tsai, R. Y., and McKay, R. D. (2005). A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 168, 179-184.

Wang, Z. G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F., and Pandolfi, P. P. (1998). Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 279, 1547-1551.

Watanabe, R., Kinoshita, T., Masaki, R., Yamamoto, A., Takeda, J., and Inoue, N. (1996). PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271, 26868-26875.

Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916.

Zhang, T. D., Chen, G. Q., Wang, Z. G., Wang, Z. Y., Chen, S. J., and Chen, Z. (2001). Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 20, 7146-7153.

Zhao, Y., Kwon, S. W., Anselmo, A., Kaur, K., and White, M. A. (2004). Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *J Biol Chem* 279, 20999-21002.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., and Pandolfi, P. P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.