

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16076

研究課題名(和文)小胞体膜貫通型転写因子OASISの核膜異常構造への集積と核膜恒常性との関連性解明

研究課題名(英文) Analysis on relationship between nuclear envelope homeostasis and accumulation of ER-resident transmembrane transcription factor OASIS at nuclear bleb

研究代表者

松久 幸司 (Matsuhisa, Koji)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：60735299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は核膜によりゲノムDNAを保護している。一方で、DNA損傷をはじめとする様々な刺激により核膜が損傷することが知られている。この核膜の損傷は更なるDNA損傷を誘発し、細胞の癌化を引き起こす。我々は小胞体膜貫通型転写因子OASISが損傷した核膜へと集積することを見出した。この集積は核膜の裏打ち構造である核ラミナの崩壊が引き金になっていること、OASISのN末端側細胞質領域が核膜損傷部位への集積に重要であることが分かった。さらにOASISは核膜修復に関与する核内膜構成分子LAP2と相互作用しており、OASISが核膜修復において何らかの機能を発揮している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、核膜の構造異常は早老症や癌の発症・病態形成に関与していると言われている。本研究課題においてOASISが核膜の異常構造へと集積して核膜の保護あるいは修復に重要な役割を果たすことが示唆された。このことは、上記疾患の病態形成メカニズムを理解するための重要な知見となる。またそのメカニズムを基に核膜保護や損傷修復を亢進させることが出来れば、上記疾患の予防法あるいは治療法の開発へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Genomic DNA is protected by nuclear membrane. It is known that various stresses including DNA damage, induce injury of nuclear membrane. The nuclear membrane damage facilitate DNA damage and cause oncogenic transformation. We found that endoplasmic reticulum-resident transcription factor OASIS accumulate at the damage sites of nuclear membrane. The accumulation is triggered by disruption of nuclear lamina. N-terminal cytoplasmic region of OASIS is important for the accumulation. Furthermore, we observed that OASIS interacts with inner nuclear membrane protein LAP2beta, which plays important roles in nuclear envelope repair. These results suggest the possibility that OASIS plays pivotal roles in the repair of nuclear envelope.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核膜ストレス OASIS

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の本体であるゲノム DNA を格納する細胞内小器官である細胞核は、核外膜および核内膜と呼ばれる 2 つの脂質二重膜(核膜)により覆われている。核外膜と核内膜は核質への物質移行を制限するポアである核膜孔を隔てて接続している。一方、核外膜は膜タンパク質や分泌タンパク質の合成や修飾、脂質合成などの場である小胞体の膜と連続している。すなわち、核外膜、核内膜、小胞体膜は 1 つのシートとして見る事が出来る。また、核内膜に局在するタンパク質は小胞体で合成された後、核外膜および核膜孔を経由して核内膜へと移行する。したがって、核膜と小胞体膜は構造的・機能的に連携していると考えられる。しかしながら、DNA 損傷をはじめとする細胞核内で起こる事象に対して小胞体が果たす役割は不明である。

DNA 損傷時には核膜がダイナミックに形態変化を起こす。その一つとして損傷を受けたゲノム DNA を核外へと排出する微小核の形成が知られている。この微小核の形成初期では核膜構造が部分的に崩壊し、細胞核の一部が外側へと膨らみ瘤のようになった構造(核ブレブ)が形成される。核ブレブは DNA 損傷の他にウイルス感染、タンパク質 RNA 複合体(mRNP)の細胞質移行、細胞核への物理的刺激によって生じることが報告されており、いずれの場合も核膜の裏打ち構造である核ラミナの破綻が引き金になると考えられている。核ブレブを形成する膜は通常の核膜とは構造が異なり、核内への物質の流入を制限するバリア機能も低下している。その結果、核ブレブが形成された細胞では更なる DNA 損傷が起こり遺伝子の変異が生じて細胞の癌化や悪性化へとつながる。したがって核膜の修復機構は細胞の恒常性を維持し癌化を防ぐうえで非常に重要なものである。しかしながら細胞内でどのような分子が核膜の破綻を感知し、修復機構を起動させているのか、その詳細は未だ解明されていない。

OASIS は小胞体膜に局在する型の 1 回膜貫通型転写因子である。この転写因子は、小胞体ストレスを感知するとゴルジ体へと輸送されて 2 段階の膜内切断を受ける。切断により遊離した転写活性化領域を含む N 末端断片が核内へと移行することで転写因子として機能する。OASIS は主にアストロサイトや骨芽細胞で強く発現しており、アストロサイトへの成熟や骨芽細胞への分化に重要な役割を果たすことが明らかになっている。申請者はこれまでに小胞体ストレストランスデューサーである OASIS の機能を解析する中で、細胞が X 線照射やドキシソルピシンなどの薬剤処理により DNA 損傷を受けた際に形成される核膜の異常構造(核ブレブ)の膜上に OASIS が集積する現象を見出した。また OASIS が集積した核ブレブを詳細に解析すると、その部位では細胞核の内張り構造である核ラミナを構成するラミンタンパク質が消失しており、OASIS とラミンタンパク質の間に相互排他的な関係が観察された。さらにこの核ブレブへの OASIS の集積は核ラミナ構成分子であるラミン B1 をロックダウンした際にも生じることから、OASIS は核膜上のラミン分子の消失を感知して集積していると考えられた。さらに野生型細胞と比べて OASIS ノックアウトマウス由来アストロサイトでは DNA 損傷が増強していた。核ブレブの形成を含む核膜構造の異常に伴い核膜の膜透過性に異常を来すと核内のゲノム DNA が傷害されることが知られている。以上のことから OASIS は核膜上のラミン分子の消失を感知することで核膜の損傷部位へと集積し、核膜損傷に伴う DNA 損傷の増加を抑制していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、小胞体局在型転写因子 OASIS が DNA 損傷などの刺激に応答して形成される核ブレブに移行する詳細な分子機構およびその生理的意義を明らかにする。OASIS ノックアウト細胞を用いた検討から、OASIS が早期の DNA 損傷抑制に関わることが示唆されている。そのため、特に核膜破綻時の修復における OASIS の役割に焦点を当てて解析を行う。

3. 研究の方法

DNA 損傷などを与えて細胞に核膜損傷を引き起こし、小胞体膜局在型転写因子 OASIS の細胞内局在を解析した。また OASIS の欠損変異体シリーズや、損傷した核膜へは集積しない OASIS ファミリー分子である Luman とのキメラ発現コンストラクトを作製し、核膜への集積に関わる OASIS の領域を解析した。免疫沈降質量分析法により OASIS と相互作用する核膜局在分子の解析を実施した。

4. 研究成果

小胞体膜局在型転写因子 OASIS の核膜損傷部位への集積；ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞に OASIS を遺伝子導入した細胞に DNA 損傷誘発剤であるドキシソルピシンを処理した。その後、免疫染色により OASIS や核膜の裏打ち構造である核ラミナを構成するタンパク質、LaminA/C や LaminB1 の細胞内局在を解析した。その結果、OASIS が核ブレブに集積している様子が観察された。また OASIS が集積している核膜の領域をよく観察すると、核ラミナ構成タンパク質である LaminA/C および LaminB1 が OASIS が集積している領域から消失していた。LaminB1 の発現量が低下することで核ブレブの形成が誘発することが報告されている。そこで、LaminB1 遺伝子をノ

ックダウンした HeLa 細胞を作成し、核ブレブの形成と OASIS の集積を解析した。その結果、LaminB1 をノックダウンすることで親株の細胞と比べて核ブレブの形成が亢進していた。さらに、形成された核ブレブに OASIS が集積している様子が観察された。以上のことから、OASIS は核ラミナの崩壊を引き金に核膜損傷部位へと集積していることが示唆された。

OASIS の核膜集積に重要なドメインの同定；OASIS は N 末端が細胞質に配向した型の膜貫通型タンパク質である。OASIS の核膜集積に係るドメインの解析にあたり、まずは N 末端側の細胞質領域と C 末端側の小胞体内腔領域のいずれが重要であるか解析した。この解析に当たり、OASIS の細胞質領域または小胞体内腔領域のいずれかを核ブレブに集積しない OASIS ファミリー分子である Luman にスワップしたキメラ変異体を作成し、その細胞内局在を解析した。その結果、OASIS の C 末端側を Luman のものに置換したキメラ変異体は野生型の OASIS と同様に核ブレブへと集積した。一方で、N 末端側を Luman へと置換したキメラ変異体は核ブレブには集積しなかった。この結果から、OASIS の N 末側細胞質ドメインが核ブレブへの集積に需要であることが分かった。OASIS には N 末端側から転写活性化領域、OASIS ファミリー間で相同性の高いドメイン、DNA 結合に重要な basic leucine-zipper ドメイン (basic ドメインと leucine-zipper ドメインから成る) が存在する。OASIS の核膜損傷部位への集積に重要なドメインを詳細に解析するために、これらのドメインを N 末端側から欠損させた変異体シリーズを作製し、それぞれの核膜損傷部位への集積を評価した。その結果、OASIS ファミリー間で相同性の高いドメイン、および leucine-zipper ドメインが核膜損傷部位への集積に重要であることが分かった。

OASIS と相互作用する核膜局在タンパク質の網羅的解析；LaminB1 をノックダウンすることで核膜損傷を起こしやすくした HeLa 細胞に FLAG タグを融合した OASIS を強制発現させ、さらにドキシソルピシンを処理することで核膜損傷を誘発した。その後細胞を回収し、免疫沈降法により OASIS と相互作用する分子を回収した。回収したサンプルを質量分析法により解析してその中に含まれるタンパク質を同定した。同定したタンパク質を詳細に解析すると、核膜の内膜に局在する膜貫通タンパク質の一つ、LAP2 が再現よく検出された。そこで細胞に FLAG タグを融合した OASIS と HA タグを融合した LAP2 を同時に発現させて免疫沈降法 ウェスタンブロット法により相互作用を解析したところ、OASIS と LAP2 が相互作用している様子が観察された。LAP2 は他の核膜構成分子とともに核膜の修復に重要なタンパク質の一つである。以上の結果から OASIS は核膜修復因子と相互作用することで、核膜の修復に何らかの寄与をしている可能性が示唆された。

近年、核膜損傷はハッチンソン・ギルフォード症候群をはじめとする早老症や癌の発症に関与しているのではないかとされている。したがって、核膜損傷を抑制、あるいは損傷後の修復を促進することでこれら疾患の発症を抑える、あるいは病状の進行を緩和することが可能になると期待できる。OASIS と核膜損傷修復との関連をさらに解析することで、核膜修復機構についての理解を深め、核膜損傷に端を発する様々な疾患の予防や治療へと応用することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松久幸司、齋藤敦、金子雅幸、今泉和則
2. 発表標題 核膜ストレス応答に対する小胞体膜貫通型転写因子OASISの関与.
3. 学会等名 第3回オルガネラ・ゾーン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松久幸司、齋藤敦、金子雅幸、今泉和則
2. 発表標題 核膜ストレス応答に対する小胞体膜貫通型転写因子OASISの関与
3. 学会等名 第2回オルガネラ・ゾーン若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松久幸司、金子雅幸、齋藤敦、浅田梨絵、今泉和則
2. 発表標題 アストロサイトにおける核膜ストレスに対する小胞体膜タンパク質OASISの役割.
3. 学会等名 第56回広島神経医科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松久幸司、金子雅幸、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISによる核膜ストレス応答機構の解析
3. 学会等名 新学術領域「オルガネラ・ゾーン」班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上川泰直、松久幸司、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 核膜ストレスにตอบสนองして活性化する小胞体膜貫通型転写因子OASISの機能解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上川泰直、齋藤敦、松久幸司、金子雅幸、今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISによる核膜ストレス応答機構解明
3. 学会等名 新学術領域研究 第3回オルガネラ・ゾーン若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今泉和則、齋藤敦、上川泰直、松久幸司、金子雅幸
2. 発表標題 核膜ストレスと細胞老化、癌化の制御
3. 学会等名 2020年度 新学術領域「オルガネラゾーン」Zoom班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松久幸司、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 希少疾患原因遺伝子産物のERAD回避による機能回復と疾患治療薬の探索
3. 学会等名 オルガネラ疾患研究拠点第1回ミーティング
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------