

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22389

研究課題名(和文)ゲノムの安定性維持における超長鎖脂肪酸の役割に関する研究

研究課題名(英文) Study on the role of very-long-chain fatty acids in maintaining genome stability

研究代表者

平岡 泰 (Hiraoka, Yasushi)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10359078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：超長鎖脂肪酸は、炭素鎖が21以上の脂肪酸である。総脂肪酸量のわずか数%しか存在しないにもかかわらず、長鎖脂肪酸には代替できない重要な生理的な働きがある。しかし、細胞内での超長鎖脂肪酸の働きは不明なままであった。本研究は、超長鎖脂肪酸の細胞内での機能を明らかにするものである。特に、核膜と染色体の機能維持に働く仕組みの理解を目指して研究を行った。細胞内の核膜構造の形成・維持に、超長鎖脂肪酸合成酵素とその活性が重要な働きをすることが明らかとなった。さらに、核膜と小胞体膜の境界維持に核膜タンパク質Lem2とERタンパク質Lnp1が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超長鎖脂肪酸は、総脂肪酸量のわずか数%しか存在しないにもかかわらず、長鎖脂肪酸には代替できない重要な生理的な働きがある。そのひとつが皮膚のバリアー機能である。超長鎖脂肪酸はセラミド(スフィンゴシンと脂肪酸が結合したもの)として皮膚の脂質膜に含まれることが知られている。しかし、細胞内での、超長鎖脂肪酸の局在や機能など多くの問題が謎のままであった。本研究により、皮膚のない生物である分裂酵母でも、超長鎖脂肪酸が存在し、生存に必須の働きをすることが分かった。さらに、その合成酵素は核膜やER膜に存在し、その活性は、核膜構造の維持を通して、ゲノムの安定維持に働くことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Very long-chain fatty acids are fatty acids with more than 21 carbon chains. Despite being present in only a few percent of total fatty acids, very-long-chain fatty acids have important physiological functions that cannot be replaced by long-chain fatty acids. However, their functions within a cell remain unclear. This study aimed to clarify the intracellular function of very-long-chain fatty acids. In particular, our research focused on the function of the very-long-chain fatty acids on the maintenance of the nuclear envelope and chromatin structure. Our study clarified that very long chain fatty acid synthase and its activity play an important role in the formation and maintenance of the nuclear envelope structure, which is required for genomic stability. Furthermore, it clarified that the nuclear envelope protein Lem2 and ER protein Lnp1 is important for maintaining the boundary between the nuclear envelope and the endoplasmic reticulum membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：超長鎖脂肪酸 染色体 ゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長鎖脂肪酸は炭素鎖が 10 から 21 までの脂肪酸を指すのに対して、21 以上のものは超長鎖脂肪酸と呼ばれる。超長鎖脂肪酸は、総脂肪酸量のわずか数%しか存在しないにもかかわらず、長鎖脂肪酸には代替できない重要な生理的な働きがある。そのひとつが皮膚のバリアー機能である。超長鎖脂肪酸はセラミド（スフィンゴシンと脂肪酸が結合したもの）として皮膚の脂質膜に含まれる。超長鎖脂肪酸が合成できないノックアウトマウスでは新生児が生育できないことから、ほ乳類の成育に必須であることが示されているが、細胞内での超長鎖脂肪酸の局在・機能・合成のメカニズムなど多くの問題が謎である。

一方、真核細胞のゲノムは核膜に覆われており、核膜は生存にとって重要な役割を持つ。高等動物においては、数 100 種類に及ぶ核膜タンパク質が存在し、機能的な重複のために、その機能の解明が困難である。それに対して、分裂酵母では、核膜タンパク質が比較的少数であり(図 1)、また機能重複があっても遺伝子破壊を多重に導入することで、遺伝子の機能に迫ることができる。また、ゲノム不安定性を検出できるアッセイ系も構築されている。従って、これらを組み合わせることで、核膜タンパク質の欠損とゲノム安定性との関連を調べることができる。

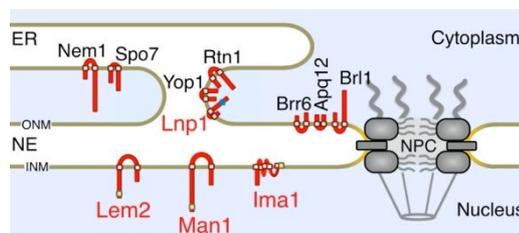


図1 分裂酵母の核膜・ER膜タンパク質の模式図

我々は、これまでに、分裂酵母の核膜タンパク質の異常が、ヘテロクロマチン形成不全や染色体分離異常などゲノムの不安定性を引き起こすことを報告している(Hiraoka et al, 2011; Tange et al, 2016; Hirano et al, 2018)。これらの研究の過程で、超長鎖脂肪酸合成酵素 Elo2 が核膜に局在することを見いだした(Kinugasa et al, 2019)。この超長鎖脂肪酸合成遺伝子を過剰発現することによって、核膜タンパク質の欠損株で見られた多様な表現型(核膜形態異常およびヘテロクロマチン形成不全・染色体分離異常などのゲノム不安定化)がすべて消失する(Kinugasa et al, 2019)。この結果は、超長鎖脂肪酸が核膜構造に重要な働きをすることを示唆している。また、分裂酵母の超長鎖脂肪酸合成酵素の欠損を、ヒトの相同遺伝子が相補できることから、超長鎖脂肪酸が、ゲノム機能維持に普遍的な役割を持つことが予想された。

Hiraoka Y, Maekawa H, Asakawa H, Chikashige Y, Kojidani T, Osakada H, Matsuda A, Haraguchi T.

Inner nuclear membrane protein Ima1 is dispensable for intranuclear positioning of centromeres. *Genes Cells* 16:1000-1011. (2011).

Tange Y, Chikashige Y, Takahata S, Kawakami K, Higashi M, Mori C, Kojidani T, Hirano Y, Asakawa H, Murakami Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. *Genes Cells* 21: 812-832. (2016).

Hirano Y, Kinugasa Y, Asakawa H, Chikashige Y, Obuse C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lem2 is retained at the nuclear envelope through its interaction with Bqt4 in fission yeast. *Genes Cells* 23: 122-135. (2018).

Kinugasa Y, Hirano Y, Sawai M, Ohno Y, Shindo T, Asakawa H, Chikashige Y, Shibata S, Kihara A, Haraguchi T, Hiraoka Y. Very-long-chain fatty acid elongase Elo2 rescues lethal defects associated with loss of the nuclear barrier function. *J. Cell Sci.* pii: jcs.22902.1 (2019).

### 2. 研究の目的

本研究は、分裂酵母を実験材料として、超長鎖脂肪酸が、核膜の構造・機能を介してゲノム安定維持に働く仕組みを分子レベルで解明するものである。

### 3. 研究の方法

ゲノム安定保持に対する目的遺伝子破壊の影響を検定するために、分裂酵母で確立されているアッセイ系を用いる。このアッセイ系は、特殊な人工染色体を導入したものであり、寒天上で生育している分裂酵母の白いコロニーが、ゲノムが不安定になると赤くなることで、異常を目視で検出できる。まず、核膜や小胞体タンパク質・脂肪酸伸長酵素・セラミド合成酵素の様々な変異体に対して、この人工染色体を持たせた株を作成し、アッセイ系を構築する。

作成した様々な変異体を検定して、染色体分離異常の原因となるタンパク質因子(遺伝子)を絞り込む。このような変異株に対して、超長鎖脂肪酸伸長酵素の欠損や過剰発現による表現型(核形態・染色体機能および致死性)の変化を生細胞蛍光イメージング解析して、超長鎖脂肪酸とゲノム安定性との遺伝的な因果関係を明らかにする。超長鎖脂肪酸伸長酵素の欠損は致死なので、条件的欠損細胞を作製し、欠損表現型を解析する。目的遺伝子の欠失あるいは過剰

発現による影響を評価するために、蛍光イメージング法に加えて電子顕微鏡を用いる。変異体に対して条件的に超長鎖脂肪酸伸長酵素を発現させて、脂質組成の変化を比較し、超長鎖脂肪酸と表現型との関連を調べ、超長鎖脂肪酸がゲノム安定性維持を支える仕組みを解明する。

#### 4. 研究成果

核膜や核膜孔複合体、小胞体タンパク質・脂肪酸伸長酵素・セラミド合成酵素などのさまざまな変異体に対して、この人工染色体を持たせた株を作成した。これらの変異株に対して、超長鎖脂肪酸伸長酵素 Elo2 が、表現型を相補するかどうかの検定を行った。その結果、超長鎖脂肪酸が相補するものとして、複数のタンパク質が同定された。その中で、我々は、Lnp1 や Apq12 など、核膜と小胞体膜に存在する膜タンパク質に関して解析を進めた。その結果、核膜タンパク質 Lem2 と協調して働く因子として、小胞体タンパク質 Lnp1 を発見した。

Lnp1 は、ヒトを含む哺乳類にも存在するなど、進化的に高度に保存された小胞体膜タンパク質である。膜が3方に分岐した箇所が存在すると考えられ、膜の湾曲に重要と考えられている。我々は、核膜タンパク質 Lem2 と小胞体タンパク質 Lnp1 の両者を欠質すると、細胞が生育できないことを発見した。その原因を、蛍光イメージング法で観察したところ、核タンパク質が、一過的に、核から漏出すること分かった。このことから核膜に異常がある可能性があったため、核タンパク質が漏出した細胞を蛍光電顕相関顕微鏡

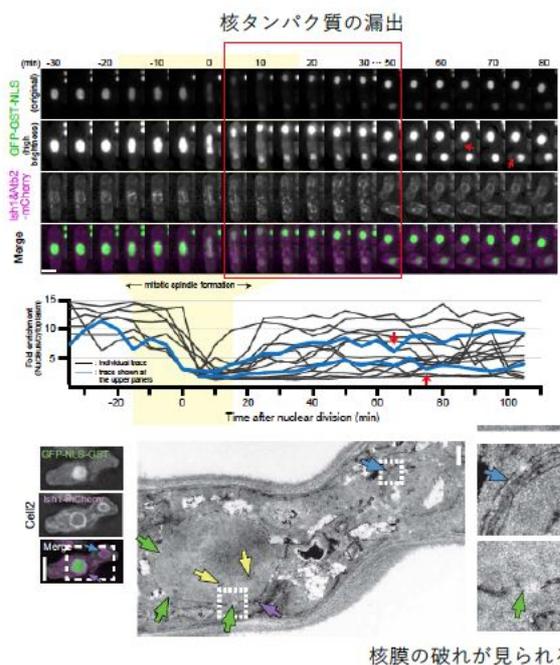


図2 Lem2とLnp1の二重変異で見られる核膜異常

法 (Correlative Light and Electron Microscopy; CLEM) で観察したところ、核膜構造に異常があることが分かった。遺伝学的な解析により、Lem2 と Lnp1 は、協調して働くことで、核膜と ER との境界を形成していることが分かった (Hirano et al, *Commun Biol* 2020) (図2)。Lem2 と Lnp1 の二重欠質による異常は、超長鎖脂肪酸合成酵素である Elo2 を発現させることにより、かなりの部分が回復することが分かった。このことから、超長鎖脂肪酸合成は、細胞内の膜構造形成を促進し、膜構造の安定維持に貢献しているものと思われる。このような解析を通して、ゲノム維持に働く、超長鎖脂肪酸合成酵素 Elo2 を含む核膜タンパク質のネットワークの存在を提唱した (図3)。

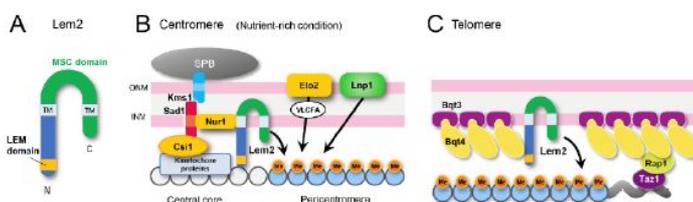


図3 超長鎖脂肪酸合成酵素Elo2と核膜タンパク質ネットワーク

このような変異株を作成するなかから、副次的な産物として、以下の事も明らかになってきた。核膜孔複合体を構成するタンパク質のひとつである nup184 の遺伝子と、合成致死となる機能未知の遺伝子 cdb4 を発見し、さらにこの合成致死をヒト Ebp1 (cdb4 ホモログ) が異種間相補することを明らかにした (Osemwenkhae et al, *Genes Cells* 2020)。また、核膜の一過的な破裂が、プロテオソーム因子の移動制御を通して、胞子形成に影響を与えることを明らかにした (Yang et al, *J Fungi* 2020)。核膜が、どのような仕組みでヘテロクロマチン形成を制御するかについて、核膜タンパク質 Lem2 や超長鎖合成酵素 Elo2 など、核膜タンパク質の機能について報告した (Hirano et al, *Cells* 2020)。相同染色体対合の仕組みについて報告した (Hiraoka, *Curr Genet* 2020)。また、細胞内の ATP 代謝の研究の一環として、細胞性粘菌の分化過程において細胞内 ATP 濃度が分化運命を左右することを発見し、エネルギー代謝と分化の関係の一端を明らかにした (Hiraoka et al, *Genes Cells* 2020)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hirano Yasuhiro, Kinugasa Yasuha, Osakada Hiroko, Shindo Tomoko, Kubota Yoshino, Shibata Shinsuke, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 3
2. 論文標題 Lem2 and Lnp1 maintain the membrane boundary between the nuclear envelope and endoplasmic reticulum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0999-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiraoka Yasushi	4. 巻 66
2. 論文標題 Phase separation drives pairing of homologous chromosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 881 ~ 887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00294-020-01077-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yang Hui-Ju, Asakawa Haruhiko, Ohtsuki Chizuru, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Transient Breakage of the Nucleocytoplasmic Barrier Controls Spore Maturation via Mobilizing the Proteasome Subunit Rpn11 in the Fission Yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 242 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jof6040242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Sakuno Takeshi, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Nuclear Envelope Proteins Modulating the Heterochromatin Formation and Functions in Fission Yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1908 ~ 1908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9081908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Haruka, Nakano Tadashi, Kuwana Satoshi, Fukuzawa Masashi, Hirano Yasuhiro, Ueda Masahiro, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Intracellular ATP levels influence cell fates in Dictyostelium discoideum differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 312 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osemwenkhae Osaretin P., Sakuno Takeshi, Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Hayashi Takanaka Yoko, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Human Ebp1 rescues the synthetic lethal growth of fission yeast cells lacking Cdb4 and Nup184	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 288-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yasushi Hiraoka
2. 発表標題 Nuclear membrane homeostasis and genome stability
3. 学会等名 The Nucleus Science Talks (オンライン) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasushi Hiraoka
2. 発表標題 Nuclear membrane protein and genome stability
3. 学会等名 NIH seminar (オンライン) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平岡泰、丁大橋、岡正香澄、中山潤一、原口徳子
2. 発表標題 非コードRNAタンパク質複合体の液相分離が相同染色体を対合させる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（オンライン）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirano Y, Kinugasa Y, Osakada H, Shindo T, Kubota Y, Shibata S, Haraguchi T, Hiraoka Y
2. 発表標題 Lem2 and Lnp1 cooperatively maintain the nuclear membrane integrity through ESCRT-III functions
3. 学会等名 EMBO The International Fission Yeast Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinugasa Y, Hirano Y, Asakawa H, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y
2. 発表標題 Very-long-chain fatty acid elongase Elo2 rescues chromosomal defects associated with loss of nuclear membrane protein Lem2
3. 学会等名 EMBO The International Fission Yeast Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野泰弘、衣笠 泰葉、原口徳子、平岡泰
2. 発表標題 Lem2による核膜形態維持機能とゲノム安定化における役割
3. 学会等名 第11回光塾
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野泰弘、衣笠泰葉、原口徳子、平岡泰
2. 発表標題 Lem2と Lnp1は Vps4-ESCRT-III複合体の機能を制御することで核膜-小胞体構造を維持する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ホームページ  <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_group/detail/4">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_group/detail/4</a>  <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html</a></p>
---

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
研究協力者	平野 泰弘  (Hirano Yasuhiro)		
研究協力者	木原 章雄  (Kihara Akio)		

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			
その他の国・地域	台湾 National Health Research Institutes			