

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23725

研究課題名（和文）核膜タンパク質Lem2・Lnp1による核膜構造制御機構の解析

研究課題名（英文）Nuclear membrane maintenance by nuclear membrane protein Lem2 and Lnp1

研究代表者

衣笠 泰葉（Kinugasa, Yasuha）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：60852118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は核膜タンパク質Lem2・Lnp1に着目し、核膜タンパク質が核膜制御を行うメカニズムの解明を目指したものである。生細胞観察法と光電子顕微鏡相関観察法（CLEM法）を用いた解析を行ったところ、Lem2とLnp1には核膜と小胞体膜の境界を調整する役割があることが分かった。さらに、膜修復を担うESCRT-III複合体因子を用いた解析により、Lem2・Lnp1がVps4を膜上に局在させ、ESCRT-IIIによる正常な膜修復を促すことが核膜維持に繋がっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核膜の機能維持は真核細胞の生存にとって最も重要な要因の一つであり、そのメカニズムの解明は学術的に重要な課題である。また、核膜タンパク質の変異は、筋ジストロフィー、早老症といった様々な重篤疾患を引き起こすことが知られており、核膜タンパク質の機能解明は社会的にも重要である。解析が容易な分裂酵母で得られた成果は、ヒトをはじめとする真核生物に普遍的な仕組みの理解に繋がるため、今後多様な分野へ応用することが出来る可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：This study focuses on the nuclear envelope proteins Lem2 and Lnp1 and aims to elucidate the mechanism by which the nuclear envelope proteins regulate the morphology and function of the nuclear membrane. Analysis using live cell imaging and correlative light-electron microscopy (CLEM) revealed that Lem2 and Lnp1 maintain the boundary between the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum membrane. Furthermore, by analysis with components of membrane repairing complex ESCRT-III, it was clarified that Lem2 and Lnp1 correctly localize Vps4 on the membrane and maintain membrane remodeling, which leads to the maintenance of the nuclear membrane.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：Lem2 Lnp1 ESCRT-III 核膜 小胞体膜 脂質 生細胞イメージング CLEM

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核膜は小胞体 (ER) と連続した二重の脂質膜で構成され、膜上には多様な核膜タンパク質が存在している。核膜タンパク質はクロマチンと相互作用することで遺伝子発現制御を行う。この核膜タンパク質の変異は筋ジストロフィー、早老症といった重篤な疾患を引き起こすため、核膜タンパク質によるクロマチン制御機構の解明は急務の課題である。しかし、ヒトなどの高等生物の核膜タンパク質は数百種にも及び、その多くが機能重複しているため、分子メカニズムの解析が困難であることが以前より指摘されている。

一方、単細胞真核生物である分裂酵母は、核膜タンパク質の種類が少なく、遺伝学を用いた解析が容易なため、個々の核膜タンパク質の機能解析に適している。研究代表者らはこの分裂酵母をモデル生物として用い、核膜タンパク質の機能解析を行ってきた。中でも特に **Lem2** は酵母からヒトまで進化的に保存された重要な核膜タンパク質で、ヘテロクロマチン形成や染色体の安定性といった、広範なクロマチン機能に影響することが明らかとなっている。さらに最新の研究成果では、**Lem2** は核膜そのものの構造にも影響することが明らかとなり、核膜構造とクロマチン機能の間に密接な関係性があることが分かってきた。

また、**Lem2** の欠損で生じるあらゆるクロマチンの機能異常は、ER 膜の形態形成に関わる膜タンパク質 **Lnp1** によって相補される。さらに、**Lem2**・**Lnp1** の二重欠損で核膜が変形し増殖阻害を引き起こすことより、**Lem2** と **Lnp1** が関与する核膜構造の制御機構がクロマチン機能に重要であることが予想される。

2. 研究の目的

Lem2 と **Lnp1** の機能的相関に着目し、これら核膜タンパク質が核膜構造を維持する仕組みを遺伝学・細胞生物学・生化学的手法を用いて解析することで、核膜タンパク質が核膜を形態的・機能的に維持するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では以下の 2 つの解析テーマを設定し、**Lem2**・**Lnp1** が核膜構造を制御する分子メカニズムを遺伝学・細胞生物学・生化学的手法を用いて解析する。

【解析 1】**Lem2**・**Lnp1** 欠損が核膜構造・機能に与える影響の解析

核膜の構造、及び機能を以下の方法で評価し、**Lem2**・**Lnp1** による影響を解析する。

(1) 蛍光タンパク質を付加した核膜マーカーを生細胞観察し、核膜の形態変化を観察すると同時に、核移行シグナルを付加した蛍光タンパク質の局在を観察することで、核膜機能についても評価する。

(2) 核膜形態の変異をより詳細に確認するため、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の利点を組み合わせた光-電子顕微鏡相関観察法 (情報通信研究機構・原口徳子主任研究員との共同研究) により、膜厚や脂質膜の連続性など核膜形態に異常が見られないか観察し、評価する。

(3) **Lem2**・**Lnp1** の各ドメインを欠損した断片を用いて同様の解析を行い、核膜構造・機能制御に影響する **Lem2**・**Lnp1** の機能ドメインを同定する。

【解析 2】**Lem2**・**Lnp1** による核膜構造の制御機構に関与する因子の同定

近年、**Lem2** は小胞輸送複合体 ESCRT の機能と関連があることが報告されている。この ESCRT 複合体は核膜の修復も行っているため、**Lem2**・**Lnp1** による核膜構造の制御機構にも関与している可能性が高い。そこで、以下の解析により **Lem2**・**Lnp1** による核膜構造の制御機構に関与する因子の同定を行う。

(1) **Lem2**・**Lnp1**・ESCRT 複合体因子の欠損を組み合わせ、解析 1 同様の核膜構造・機能の評価、さらにヘテロクロマチン状態の解析を行う

ことでクロマチン機能への影響も評価し、**Lem2**・**Lnp1** と ESCRT 複合体の関係性を解析する。

(2) ESCRT 複合体以外の因子についても検討するため、**Lem2**・**Lnp1** 二重欠損が増殖遅延となることを利用し、増殖遅延を相補する遺伝子を酵母ゲノムライブラリを用いたスクリーニングにより探索し、取得された候補遺伝子を用いて同様の評価を行う。

4. 研究成果

(1) **Lem2**・**Lnp1** は核膜-小胞膜間の境界維持を行うことで核膜機能を保つ

Lem2・**Lnp1** 欠損下での核膜の形態と機能を調べるため、膜マーカーである **Ish1-mCherry** と核局在タンパク質 **GFP-GST-NLS** を発現させ、蛍光顕微鏡下で生細胞観察を行った。その結果、**Lem2**・**Lnp1** 二重欠損株では、異常な膜構造が発達し、核局在タンパク質が細胞質へと漏れ出していたことから、**Lem2**・**Lnp1** 二重欠損によって核膜の形態と機能が損なわれていることが分かった (図 1)。

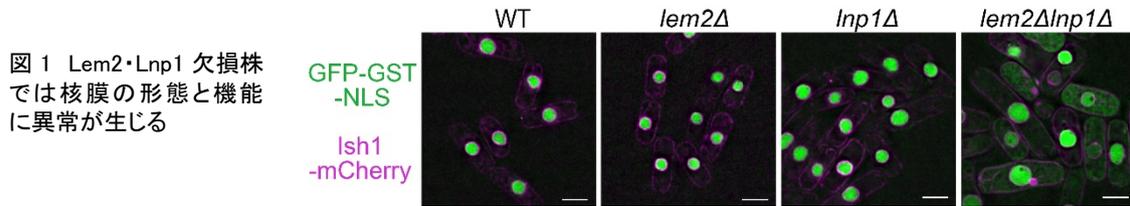


図1 Lem2・Lnp1 欠損株では核膜の形態と機能に異常が生じる

続いて、これらの異常な膜構造の構成を調べるために、Cut11 や Nup120 といった核膜孔タンパク質、小胞体膜マーカーである ADEL、細胞表層の小胞体膜にのみ局在する Rtn1 に GFP を付加して Ish-mCherry と共に発現させ、蛍光顕微鏡にて観察を行った。その結果、余剰膜構造には核膜孔タンパク質は局在しないが、ADEL、Rtn1 は局在していたことから、この余剰膜は小胞体膜に近い構成をしていることが分かった (図2)。さらに、光一電子顕微鏡相関観察法を用いてより細かな構造を観察したところ、膜断裂をはじめとした様々な膜構造異常が見られた (図3)。中でも、膜陥入や凝集膜構造、液胞様の構造体が核内に見られ、これらは核膜・小胞体膜間の境界が失われたことによる核膜の機能異常である。これらより、Lem2・Lnp1 は核膜と小胞体膜の境界を維持する役割を持っていることが明らかとなった。

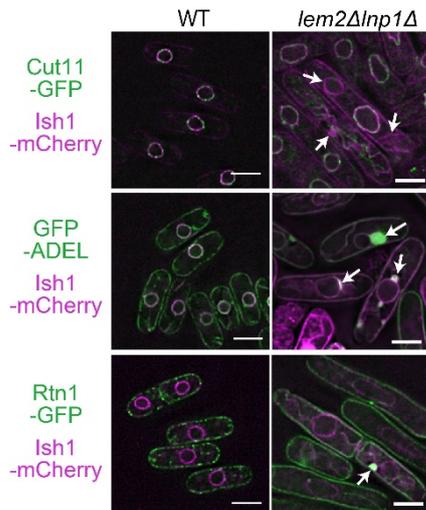


図2 Lem2・Lnp1 欠損株では小胞体膜由来の余剰膜が形成される

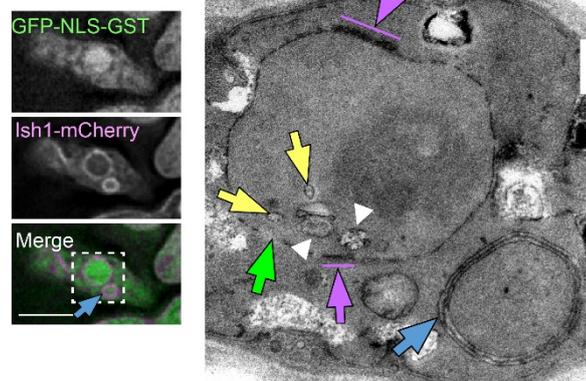


図3 Lem2・Lnp1 欠損株の蛍光顕微鏡像(左)と電子顕微鏡像(右) 矢印は、凝集膜構造(白)、断裂(緑)、陥入(黄)、多重膜(紫)、核ではない膜構造物(青)を示す。

(2) Lem2 と Lnp1 の機能ドメイン

Lem2・Lnp1 の機能ドメインを同定するため、Lem2・Lnp1 二重欠損株に Lem2、Lnp1 の各断片を発現させ、増殖の回復を調べた。その結果、Lem2 は N 末端と核膜内腔ドメインが、Lnp1 は N 末端と lunapark ドメインが機能として重要であることが明らかとなった (図4)。中でも、Lem2 の核膜内腔ドメインについてはこれまでその機能が明らかになっておらず、本研究で初めて機能が確認出来た。

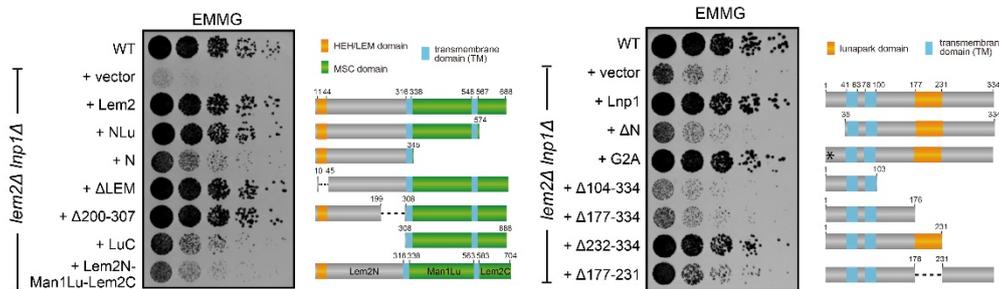


図4 Lem2・Lnp1 のドメイン解析

(3) Lem2・Lnp1 は Vps4 の局在制御を介して核膜の維持に働く

膜修復を担う ESCRT-III 複合体と Lem2・Lnp1 の関連を調べるために、Lem2・Lnp1 欠損株における ESCRT-III 複合体関連因子の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、以前より報告のあった ESCRT-III 複合体構成因子の Cmp7 は Lem2 欠損にて細胞内局在が失われたが、その他の ESCRT-III 複合体構成因子については局在に影響は見られなかった。一方で、ESCRT-III 複合

体による膜修復の完了に必須である ATP アーゼ、Vps4 が Lem2・Lnp1 二重欠損下において細胞内局在を失うことが分かった (図5)。Vps4 は ESCRT-III 複合体を分解することにより、膜修復を完了する。Vps4 の欠損では ESCRT-III による膜破壊が増長し、Lem2・Lnp1 二重欠損時と同様の膜の異形成、機能異常が見られる。よって、Lem2・Lnp1 欠損による膜の異常は、Vps4 の異所局在による機能損失を介していると考えられる。このことは、Vps4 を過剰発現することによって Lem2・Lnp1 欠損株の増殖が回復したことから、推察される。

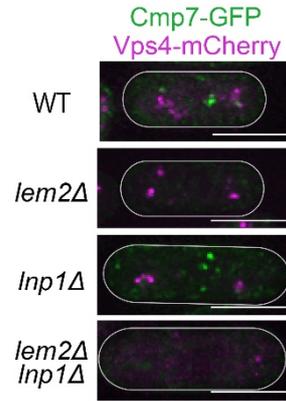


図5 Lem2・Lnp1 二重欠損株では Vps4 の細胞内局在が失われる

(4) 脂質代謝に関連する小胞体膜タンパク質 Apq12 が Lem2・Lnp1 の機能を相補する

Lem2・Lnp1 の機能に関与する因子をさらに同定するため、Lem2・Lnp1 二重欠損株の増殖を回復する因子を酵母ゲノムライブラリによりスクリーニングを行った。その結果、小胞体膜タンパク質遺伝子 *apq12* が同定された。Lem2・Lnp1 二重欠損株に *Apq12* を過剰発現させることにより、細胞増殖、膜構造と核膜機能、そして Vps4 局在が回復することが分かった (図6)。Apq12 は脂質代謝経路に関与しており、膜の脂質構成制御を行っている考えられている。以前の研究により、Lem2・Bqt4 による核膜維持機能を脂質合成因子 *Elo2* が相補していたことから、Lem2・Lnp1 による核膜維持機構においても膜脂質制御が関係していることが示唆される。

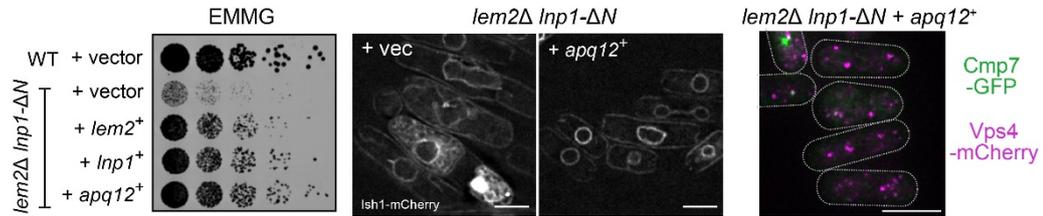


図6 Apq12 は Lem2・Lnp1 の機能を相補する *apq12* の過剰発現は Lem2・Lnp1 欠損株の増殖(左)、膜構造異常(中央)、Vps4 細胞内局在(右)を回復する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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 -
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 Nakano Tadashi, Okaie Yutaka, Kinugasa Yasuha, Koujin Takako, Suda Tatsuya, Hiraoka Yasushi, Haraguchi Tokuko	4. 巻 118
2. 論文標題 Roles of Remote and Contact Forces in Epithelial Cell Structure Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1466 ~ 1478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2020.01.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imano Nobuki, Nishibuchi Ikuno, Kawabata Emi, Kinugasa Yasuha, Shi Lin, Sakai Chiemi, Ishida Mari, Sakane Hiroaki, Akita Tomoyuki, Ishida Takafumi, Kimura Tomoki, Murakami Yuji, Tanaka Kimio, Horikoshi Yasunori, Sun Jiying, Nagata Yasushi, Tashiro Satoshi	4. 巻 195
2. 論文標題 Evaluating Individual Radiosensitivity for the Prediction of Acute Toxicities of Chemoradiotherapy in Esophageal Cancer Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1667/rade-20-00234.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinugasa Yasuha, Hirano Yasuhiro, Sawai Megumi, Ohno Yusuke, Shindo Tomoko, Asakawa Haruhiko, Chikashige Yuji, Shibata Shinsuke, Kihara Akio, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 132
2. 論文標題 The very-long-chain fatty acid elongase Elo2 rescues lethal defects associated with loss of the nuclear barrier function in fission yeast cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs229021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.229021	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

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構とゲノム安定化における役割
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回細胞核ダイナミクス研究会
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

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 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 The International Fission Yeast Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------