

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06629

研究課題名(和文)核ラミナの機能に必要な、新しい分子の発見

研究課題名(英文)PIGB maintains nuclear lamina organization in skeletal muscle of Drosophila

研究代表者

山本 美紀(日野美紀)(Yamamoto-hino, Miki)

立教大学・理学部・特定課題研究員

研究者番号：40301783

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):核ラミナ(NL)は、核の物理的保護、クロマチンの組織化、転写制御などを制御している。NLの主成分であるラミンは、核膜直下で均一な網目構造をとる。私達は、ショウジョウバエで、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)合成酵素PIGBが、均一なラミン網目構造の形成と維持に関わることを発見した。PIGB変異体で、ラミンとラミン結合タンパク質の分布が不均一になった。これらの表現型は、GPI合成活性を持たないPIGBの発現によって回復した。PIGB変異体では、NLと結合するクロマチン領域の変化や筋繊維の変形が認められた。以上より、PIGBはNLの均一性を維持し、核の機能に必須であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにラミンの分布を制御する因子は見つかっておらず、PIGBは初めての報告である。ラミンが均一な網目構造をとることの意義は不明であったが、本研究によって、核膜蛋白質の正常な分布やクロマチンの構造の維持に必要であることを示すことができた。さらにその異常は核膜の堅牢性や遺伝子発現などにも影響を与え、ラミンの均一な網目構造は核が適切に機能を発揮するために重要であることが示唆された。さらに変異ラミンによって引き起こされる核膜病の理解に発展する可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文):The nuclear lamina (NL) plays various roles and participates in nuclear integrity, chromatin organization, and transcriptional regulation. Lamin proteins, the main components of the NL, form a homogeneous meshwork under the nuclear envelope. We found that PIGB, an enzyme involved in glycosylphosphatidylinositol (GPI) synthesis, is responsible for the homogeneous lamin meshwork in Drosophila. Loss of PIGB resulted in heterogeneous distributions of B-type lamin and lamin-binding proteins in larval muscles. These phenotypes were rescued by expression of PIGB lacking GPI synthesis activity. The PIGB mutant exhibited changes of lamina-associated domains that are large heterochromatic genomic regions in the NL and deformation of muscle fibers. These results suggest that PIGB maintains the homogeneous meshwork of the NL, which may be essential for chromatin distribution and nuclear mechanical properties.

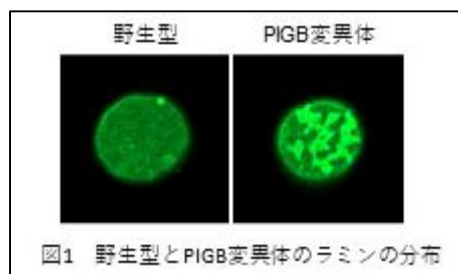
研究分野：細胞生物学

キーワード：核ラミナ ラミン クロマチン 核の脆弱性 核膜蛋白質 骨格筋

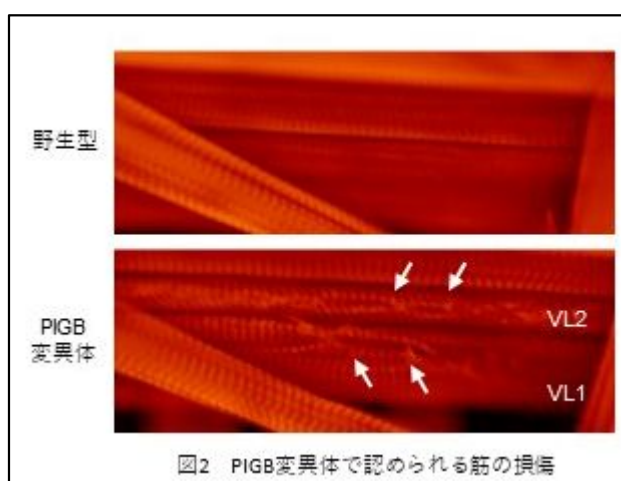
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核ラミナは、核二重膜の内側の核質側を裏打ちする安定な網目状の構造体であり、ラミンと呼ばれる中間系フィラメント蛋白質が主な成分である。ラミンは核ラミナに局在する様々な蛋白質と結合してその機能を調節するとともに、直接あるいは間接的に DNA やクロマチンに結合してクロマチンの構造維持や遺伝子発現の調節も行っている。そしてラミンやその結合蛋白質の変異は、Laminopathy と呼ばれる疾患の原因であることから、核ラミナの重要性は明らかである。しかし核ラミナの機能が安定に保たれるメカニズムについては、まだ未解明の部分が多く残されている。申請者はショウジョウバエを用いて、核膜に局在してラミンの正常な機能に必要な新規分子を同定した。その分子



は、蛋白質を膜に係留する Glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) アンカーの合成を司る酵素の1つ、PIGB である。PIGB 変異体の骨格筋では、本来核膜直下で均一な網目構造をとるラミンが、不均一な局在を示した(図1)。また骨格筋が脆弱になっている兆候を認めた(図2)。以上の観察によって、PIGB がラミンの均一な網目構造の形成と維持に必須であり、その欠失によって筋機能が低下していることが示唆されていた。



2. 研究の目的

そこで本研究課題の問いは、「GPI 合成酵素 PIGB が、核ラミナでどのような役割を担っているか」ということである。具体的には、「ショウジョウバエ GPI 合成酵素 PIGB が核ラミナに果たす役割を分子レベルで解明する」、「PIGB 変異体でその役割が損なわれた結果として、骨格筋にどのような異常が生じているか明らかにする」、そして「その役割に GPI アンカー蛋白質は関与しているのか検証する」ことを目的とした。

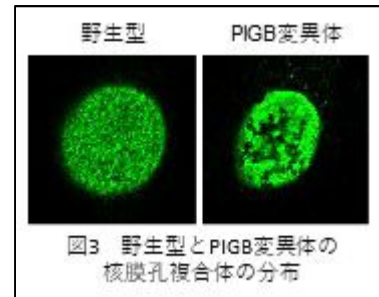
3. 研究の方法

- (1) PIGB 変異体における核膜蛋白質、クロマチン、遺伝子発現など分子レベルの変化
核膜蛋白質の細胞内局在や発現量を、野生型と PIGB 変異体で比較した。クロマチン状態については、ラミンと結合するクロマチン領域 (LAD) の変化を検討した。遺伝子発現は、定量的 PCR によって解析を行った。
- (2) 骨格筋の構造異常
筋の形成や維持が正常に行われているか、筋のサルコメア構造について、アクチンやミオシンの抗体染色を行い、詳細に観察した。また核膜の強度について検討した。
- (3) (1)、(2)で明らかになった異常に GPI アンカー蛋白質が関与しているかどうか、GPI 合成活性を持たない PIGB を発現させ、その表現型が回復するかどうか、検討した。

4. 研究成果

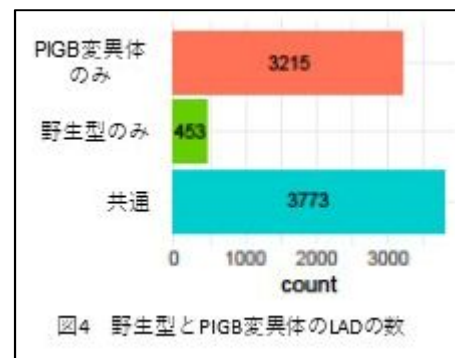
(1) PIGB 変異体における核膜蛋白質、クロマチン、遺伝子発現など分子レベルの変化

PIGB 変異体幼虫の骨格筋核では、本来核膜直下に均一に分布するラミンが、不均一な分布を示した（図1）。そこでラミンに結合して核ラミナに局在する蛋白質の局在を検討した。核膜孔複合体は、ラミンに接しながらラミンの網目構造の中に埋め込まれるように均一に配置されている。しかし PIGB 変異体では、核膜孔複合体も不均一な分布を示した（図3）。興味深いことに、ラミンと核膜孔複合体は乖離した局在を示しており、

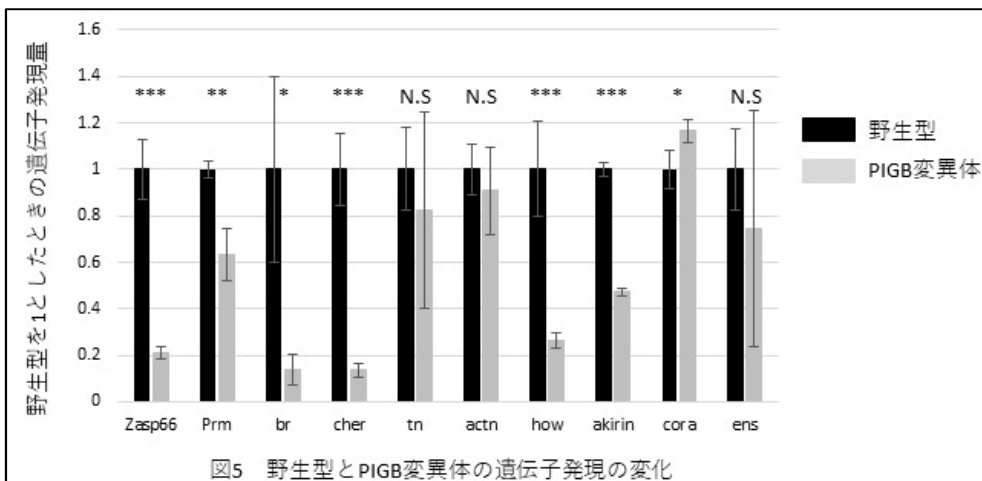


PIGB はラミンと核膜孔の association を制御している可能性が示された。その他、核膜に局在している LEM 蛋白質ファミリーの一つである Otefin も、ラミンの不均一な分布と呼応するように分布異常を示すことが明らかになった。

またラミンはクロマチンの一部と結合して、Lamina-associated Domain (LAD) を形成している。一般にこの領域はヘテロクロマチン様の特徴を持ち、転写が抑制されていると考えられている。本研究では DamID 法を用いて、野生型と PIGB 変異体の LAD の変化を検討した。その結果、PIGB 変異体では、セントロメア近傍の LAD が減少していることが明らかになった。またさらに詳細な解析の結果、PIGB 変異体では小さい LAD が増加しており（図4）そこには筋の構造蛋白質や発生、分化に関わる遺伝子が含まれていることが明らかになった。



そこで PIGB 変異体で新たに LAD に含まれるようになった遺伝子の発現を定量的 PCR で解析した。その結果、いくつかの遺伝子については発現の低下が認められた（図5）。



このことは LAD では遺伝子の発現が抑制されていることと矛盾しない。以上の結果より、PIGB は核膜において、核ラミナに局在する蛋白質やクロマチンの分布を適切に保つ役割を担っており、それによって適切な遺伝子発現を支持している可能性が示唆された。

(2) 骨格筋の構造異

PIGB 変異体の幼虫では、筋の断裂が認められた（図2）。そこで筋の構造について、

アクチンやミオシンの抗体染色で観察を行った。その結果、PIGB 変異体では筋のサルコメア構造は正常であった。また筋繊維を覆う細胞接着因子ラミニンの分布を検討した。筋細胞の発生分化が不完全であるならば、断裂面にラミニンは局在しないが、PIGB 変異体では断裂面にもラミニンは局在していた。また PIGB 変異体の幼虫の中でも、発生段階が早い時期の幼虫では表現型はほとんど観察されないが、遅い時期の幼虫で表現型は顕著になる。以上の結果から、PIGB 変異体では、筋は一度正常に発生分化した後、損傷が起きていると考えられた。

ラミンの点変異によって引き起こされる筋ジストロフィーでは、筋は正常に発生分化するが、その後、筋力の低下が観察される。特に骨格筋など物理的ストレスの大きい組織において、ラミンの異常により核膜が脆弱であるために臨床症状が出ると考えられている。そこで PIGB 変異体の核膜の強度を野生型と比較したところ PIGB 変異体の核膜は柔らかくなっていることが明らかになった(図6)つまり PIGB は、ラミンを均一に分布させることによって核膜の強度を維持しており、その変異体では核膜の強度が低下したことによって、骨格筋の構造異常を誘発している可能性が考えられた。

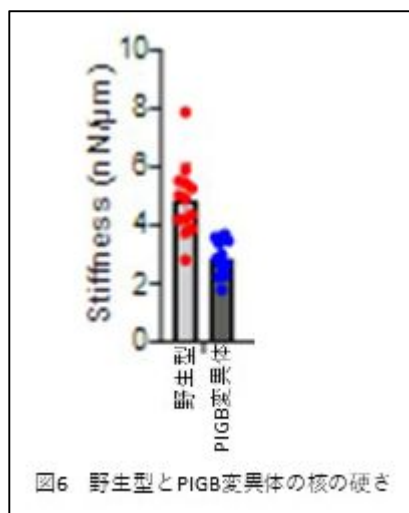


図6 野生型とPIGB変異体の核の硬さ

(3) (1)、(2)で明らかになった異常に GPI アンカー蛋白質が関与しているか。

まず GPI 合成活性を持たない変異 PIGB を作成した。PIGB はマンノース転移酵素活性を持つので、他のマンノース転移酵素とのアミノ酸配列を比較し、保存されている領域がマンノース転移活性に必要なアミノ酸であると推測した。それら候補のアミノ酸をアラニンに置換する変異を導入したところ、28 番目のアスパラギンと 29 番目のグルタミン酸をアラニンに置換することによって、GPI 合成活性を持たない変異 PIGB の作成に成功した。これを PIG 欠失変異体に発現させたところ、(1)のラミンや核膜蛋白質の不均一分布、(2)の骨格筋の損傷は回復することが示された(図7、8)つまり PIGB での核膜での機能には GPI 合成活性は必要なく、

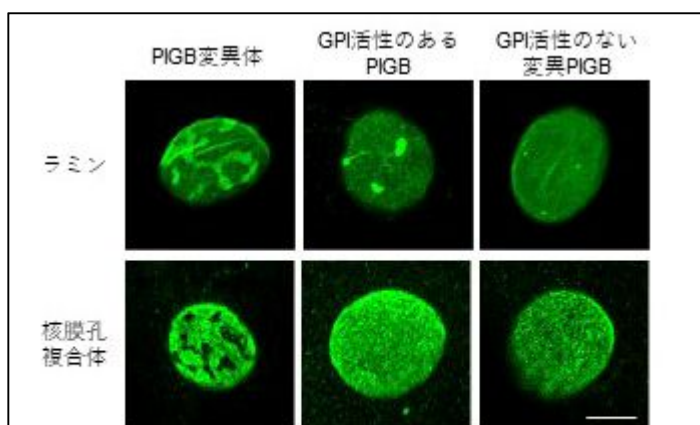


図7 PIGB変異体に、GPI活性のある、またはGPI活性のない変異PIGBを発現させた時のラミンおよび核膜孔複合体の分布

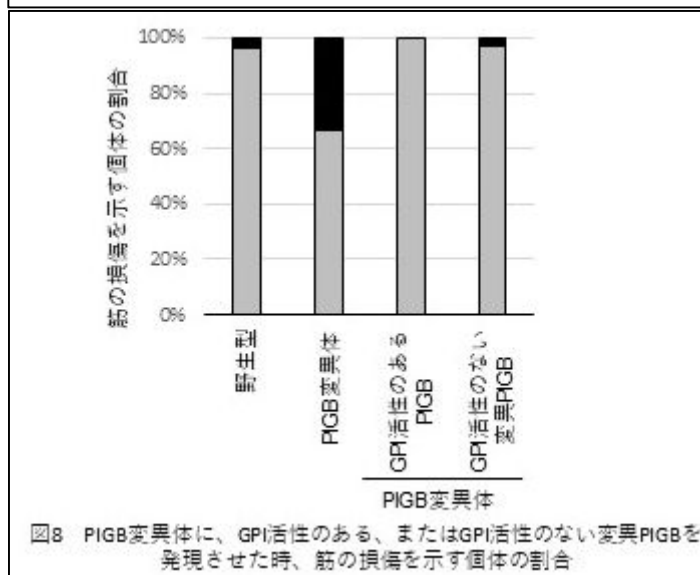
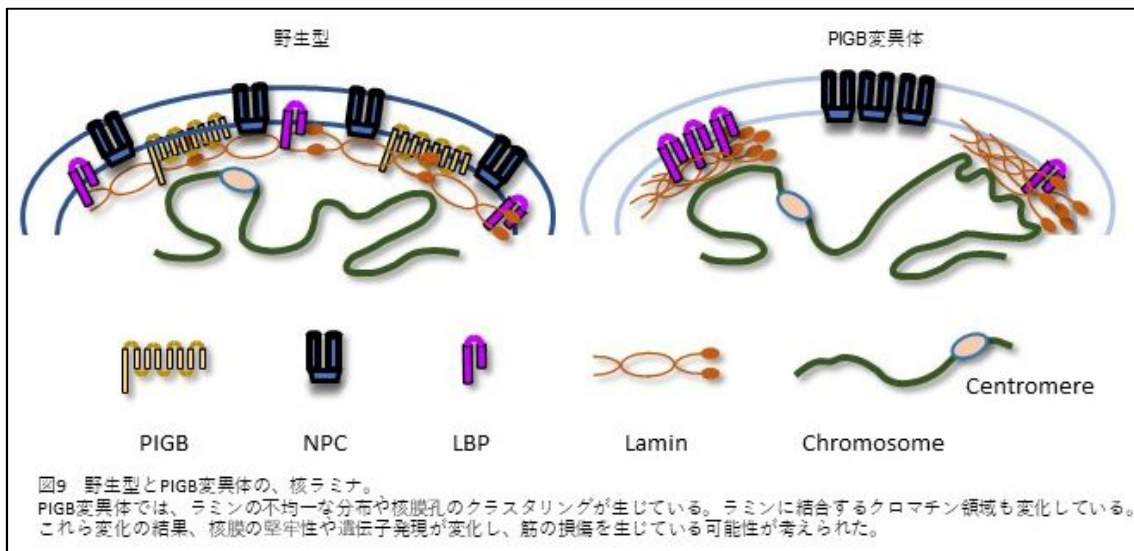


図8 PIGB変異体に、GPI活性のある、またはGPI活性のない変異PIGBを発現させた時、筋の損傷を示す個体の割合

様々な表現型は GPI アンカー蛋白質が正常にできないためではないと考えられた。PIGB は、GPI 合成と、核ラミナが適切に機能を発揮するために必要な、複数の役割を有する分子であることが明らかになった。

以上をまとめると、

ショウジョウバエ PIGB 変異体の骨格筋核では、核ラミナを形成するラミンやラミン結合蛋白質、ラミンに結合するクロマチン領域の分布に変化が見られた。これらの分布異常は核膜の堅牢性に影響を与え、核膜の物理的ストレスに対する感受性が高まった可能性が示唆された。さらにラミンに結合するクロマチン領域の変化や核膜強度の変化は、筋の構造や機能に関わる遺伝子発現に影響を与え、その結果として筋に損傷が生じている可能性が考えられた（図 9）。



これまでにラミンの分布を制御する因子は見つかっておらず、PIGB は初めての報告である。また本研究によって、ラミンが均一な網目構造をとることが、核が適切に機能を発揮するために重要であることを示唆することができた。さらに変異ラミンによって引き起こされる核膜病の理解に発展する可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kawaguchi Kohei, Yamamoto-Hino Miki, Murakami Yoshiko, Kinoshita Taroh, Goto Satoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Hrd1-dependent Degradation of the Unassembled PI3K Subunit of the GPI Transamidase Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 65 ~ 71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.21019	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 Kawaguchi Kohei, Yamamoto-Hino Miki, Goto Satoshi	4. 巻 571
2. 論文標題 SPPL3-dependent downregulation of the synthesis of (neo)lacto-series glycosphingolipid is required for the staining of cell surface CD59	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.093	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 Kawaguchi Kohei, Yamamoto Hino Miki, Matsuyama Nina, Suzuki Emiko, Goto Satoshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Subunits of the GPI transamidase complex localize to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 960 ~ 968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14048	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 聡
2. 発表標題 核ラミンの均一なメッシュワークの形成とその機能
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Yamamot-Hino, Kohei Kawaguchi, Satoshi Goto
2. 発表標題 核膜の恒常性を維持する新しい分子の発見
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本（日野）美紀
2. 発表標題 ショウジョウバエ骨格筋の核ラミナの組織化は、PIGBによって維持されている
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022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