

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06066

研究課題名(和文) G1期における核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析

研究課題名(英文) Interaction between nuclear lamina and heterochromatin during G1 phase

研究代表者

廣瀬 富美子 (Hirose, Fumiko)

兵庫県立大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60208882

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)：動物細胞は分裂期に入ると、核膜の崩壊とクロマチンの染色体への凝縮が起こり、分裂期の最後には核膜が染色体の周囲で再構築される。転写が起こらないヘテロクロマチンの核膜付近への配置には、核膜直下に存在する網目構造の核ラミナが関与していることが示唆されていたが、これを規定する分子機構は明らかではなかった。本研究では、核ラミナ構成因子 lamin A とヘテロクロマチン結合因子 HP1 の相互作用が分裂期終期の染色体上で起こり、G1期初期に相互作用の場が核内部から核辺縁部へと移動することを見出した。以上の結果から、ヘテロクロマチンの核辺縁部へ配置には核ラミナの形成過程が関与していることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物細胞は細胞分裂期に入ると、核膜の崩壊とクロマチンの染色体への凝縮が起こり、分裂期の最後には核膜が染色体の周囲で再構築される。この染色体テリトリーは細胞周期ごとにリセットされると言える。転写が起こらないヘテロクロマチンの核膜付近への配置には、核膜直下に存在する網目構造の核ラミナが関与していることが示唆されていたが、本研究の結果から、核ラミナの構成因子であるラミンAとヘテロクロマチン結合因子HP1の細胞周期特異的な細胞分裂後の細胞でのヘテロクロマチンの核膜周縁への配置に重要な役割を果たしていることを示唆できた。

研究成果の概要(英文)：When animal cells enter mitosis, the nuclear envelope collapses and chromatin condenses into mitotic chromosomes, and the nuclear envelope is reconstituted around the chromosomes at the end of mitosis. It has been suggested that the network structure of the nuclear lamina, which exists just below the nuclear membrane, is involved in the arrangement of non-transcribed heterochromatin near the nuclear membrane, but the underlying molecular mechanism remains unclear. In this study, the interaction between lamin A, the major component of nuclear lamina and the heterochromatin-binding protein HP1 begins to interact on telophase chromosomes, and the interaction observed in living cells dynamically moves from the interior to the periphery of the nucleus in the early G1 phase. These results suggest that nuclear lamina formation is involved in the arrangement of heterochromatin to the nuclear periphery.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：核ラミナ ヘテロクロマチン 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

動物細胞の染色体は、遺伝子密度や遺伝子の発現状態と関連して核内での位置が規定されている。一般的に、遺伝子密度が低くヘテロクロマチン領域が多い染色体は核膜付近に位置することが分裂期前期の細胞を用いた染色体ペインティング法を用いて証明されている。また、クロマチン免疫沈降法によるヘテロクロマチンに結合する因子の同定や、候補因子の遺伝子ノックダウンやノックアウト実験などが行われ、いくつかの関連因子の報告はあるが、ヘテロクロマチンの核膜周囲への配置についての仕組みも、細胞周期の観点からの観察も遂行されていなかった。我々は、核ラミナの構成因子である lamin A の特定の変異体を動物細胞で発現させると核ラミナの形成異常と核膜周縁部のヘテロクロマチンの消失を観察しており、ヘテロクロマチンの核膜直下への配置には lamin A が関与していると考え、lamin とヘテロクロマチンをつなぐ相互作用因子を探索してきた。これまでに lamin A ポリペプチド上に存在する SUMO 化タンパク質との相互作用に関わる配列 (SIM) 依存的に結合する因子を捉えている。

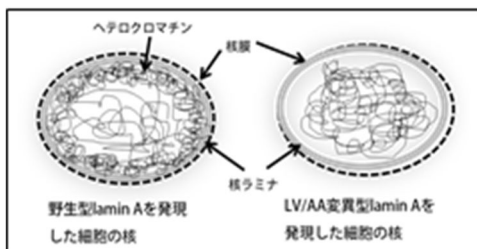


図1. SIM配列欠損変異型 lamin A を発現させると核膜周縁部にヘテロクロマチンが分布しなくなる。

2. 本研究の目的

ヘテロクロマチンとユークロマチンは核内で住み分けをしている。例えば、核膜付近にはヘテロクロマチンが配置され、この状態は細胞分裂を越えて娘細胞へ受け継がれる。しかしながら、細胞周期ごとに繰り返されるクロマチンの再配置が起こる詳細なタイミングやこれに関わる因子については未解明である。本研究では、ヘテロクロマチンの核膜付近への配置に関与することが知られている核ラミナの構成因子 lamin A をツールに用いて、ヘテロクロマチンの核膜付近への配置が規定される時期と、この反応に関わる因子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) lamin A と SUMO 化依存的に結合する因子の精製を精製する。具体的には、野生型 lamin A および SUMO 化タンパク質との結合に関わる配列 (SIM) の欠損変異体 lamin A にそれぞれ HA タグを付けて HeLa 細胞で強制発現し、それぞれの細胞から免疫沈降法により相互作用因子を精製する。両者の比較から SUMO 化依存的に結合する因子を質量分析にかけて同定する。

(2) 分裂期終期から G1 期の細胞を観察するための厳密な細胞同調法を確立する。一方で、蛍光タンパク質を利用してヘテロクロマチン、lamin A、lamin A の相互作用因子 (候補因子) を生細胞で観察するための融合たんぱく質発現系を作る。最終的には、分裂期終期 - G1 期までの関連因子のライブイメージングを行い、分裂期から G1 期にかけてのヘテロクロマチンの核内配置の時空間的ダイナミクスを明らかにする。

(3) 核ラミナ (lamin A) とその相互作用因子の生細胞内での相互作用を観察するための BiFC 実験系を確立し、これを利用して相互作用のライブイメージングを行う。

4. 研究成果

(1) RepoMan/protein phosphatase 1 がlamin Aの分裂期特異的リン酸化を分裂期終期染色体上で脱リン酸化されることを見出した。この結果から、分裂期終期に起こる核ラミナ再構築の時間的調節機構を提唱することができた。

(2) HA-tag 付きのラミンAと相互作用する因子を免疫沈降法 で精製し、ヘテロクロマチン結合因子であるHP1タンパク質ファミリーとヒストンH3をその候補因子として同定することができた。

(3) Kusabira Green(イシサンゴ由来蛍光タンパク質)を利用したタンパク質断片コンプリメンテーション法(BiFC)を確立し、lamin AとHP1の3つのオルソログ(HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ)との生細胞内での相互作用の有無、時期、場所などについて解析を行った。共焦点顕微鏡による観察結果から、lamin AはHP1 β とのみ分裂期終期の核ラミナ形成時期から染色体上で相互作用が始まり、その後のG1期の初期においても核内部での相互作用があることが示唆された。



図2. A型ラミンとHP1 の組み合わせのみで相互作用が検出された。

(4) 長時間のライブイメージングを行った結果、lamin AとHP1 β の相互作用の場は G1期の開始から5時間程度で核内部から核膜辺縁かの核ラミナ層に時間とともに移動する様子が観察された。このことは、lamin AとHP1 β の相互作用は分裂期終期の染色体上で始まり、G1期の初期に相互作用の場は、核辺縁部へ移動することを意味する。

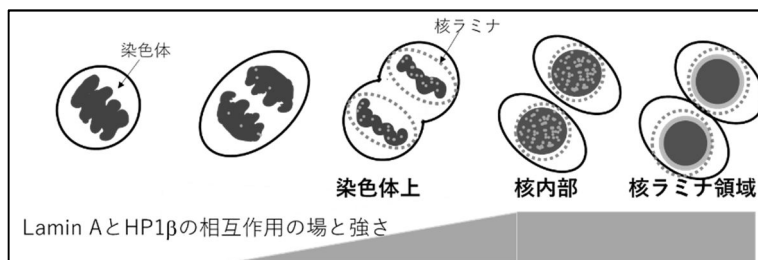


図3. BiFCを利用したライブイメージングの結果のまとめ

Lamin AとHP1 β の相互作用は分裂期終期の染色体上ではじまる。G1期初期に核内部で見られる相互作用は、その後核周縁部に移動し、G1期開始から5時間程度で核ラミナ層に限定された。

この研究により、核内部に存在するlamin Aの新規な役割を示すことができた。また、HP1タンパク質ファミリーの中でHP1 β のみがヘテロクロマチンの核周縁部への配置に関与していることを示唆することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Moriuchi T, Hirose F. | 4. 巻 134 (17) |
| 2. 論文標題 SUMOylation of RepoMan during late telophase regulates dephosphorylation of lamin A | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J. Cell Sci. | 6. 最初と最後の頁 247171-247184 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.247171 | 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0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|