

令和元年6月6日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07161

研究課題名(和文) 分裂期終期染色体上に存在するLamin A 相互作用因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors interacting with lamin A on the telophase chromosome

研究代表者

廣瀬 富美子 (Hirose, Fumiko)

兵庫県立大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：60208882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラミナの主要構成因子であるラミンAは、SIM (SUMO interacting motif) 配列をもつ。このSIM配列を破壊すると、分裂期の終期に起こる核ラミナの再構築とその後のヘテロクロマチンの核膜直下への配置が乱されることを見つけた。ラミンAのSIMと相互作用する因子を探索し、PP1 /RepoMan複合体を同定した。さらに、その相互作用はRepoManのSUMO化とラミンAのSIM配列に依存していることを証明した。これらの結果から、SUMO-SIM相互作用に依存したPP1 /RepoManとラミンAの相互作用が、ラミンAの分裂期終期における脱リン酸化を制御しているという結論に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝物質であるDNAが細胞分裂を経た後も正確に2つの娘細胞に受け継がれる。細胞分裂では染色体の分配と分離を正確に遂行するための仕組みがあり、リン酸化と脱リン酸化のカスケードを介した緻密な制御機構が明らかとなっている。一方で、分裂期の最後に形成される核ラミナと核膜形成のタイミングや場所を調節する仕組みについては不明な点が多かった。本研究では、核ラミナと核膜を再形成させるきっかけが、核ラミナの構成因子であるラミンAたんぱく質の脱リン酸化であり、これを行う酵素が分裂期終期の染色体上にあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I demonstrated evidence that a SUMO-interacting motif (SIM) resided on lamin A polypeptide is required for dephosphorylation of lamin A during telophase and subsequent nuclear lamina formation. I tried to identify factors which allow the recruitment of lamin A to the telophase chromosome and dephosphorylation of the mitotic lamin A phosphorylation. As a result, I found that RepoMan, a regulatory subunit of protein phosphatase 1gamma contributes to lamin A recruitment to telophase chromosomes and dephosphorylation of the mitotic lamin A phosphorylation. Expression of a SUMO2 mutant defective in SUMO-SIM interaction resulted in failure of the lamin A and RepoMan association, along with abrogation of lamin A dephosphorylation and subsequent nuclear lamina formation. These findings strongly suggested that RepoMan/PP1gamma recruits lamin A through SUMO-SIM interaction.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SUMO化 核ラミナ 有糸分裂期 脱リン酸化 クロマチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では遺伝情報である DNA はクロマチンを形成し、核膜で包まれている。核膜とクロマチンの間には Lamin A/C, B からなる中間径フィラメントの網目構造 (核ラミナ) が存在する。核ラミナは核膜・クロマチンの両者と相互作用し、遺伝子機能の発現を調節する。動物細胞では、核ラミナは核膜とともに有糸分裂ごとに崩壊と再形成を繰り返すが、核ラミナとクロマチンの相互作用の特異性は細胞分裂を越えて娘細胞に受け継がれる。しかしながら、核ラミナとクロマチンの特異的かつ機能的な相互作用に関わる因子や相互作用が形成される時期、その調節機構については不明であった。

2. 研究の目的

核ラミナとクロマチンの相互作用が構築されると考えられる分裂終期の細胞を用いて、核ラミナの構成因子ラミン A と相互作用するクロマチン結合因子を同定し、同定因子の役割を明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

この研究計画では、Lamin A ポリペプチドの SIM を認識して結合する分裂期終期染色体結合性 SUMO 化タンパク質を精製し、同定する。研究計画の進め方は以下のとおりである。

細胞周期を同調し、効率のよい分裂期終期細胞の収集法を確立する。

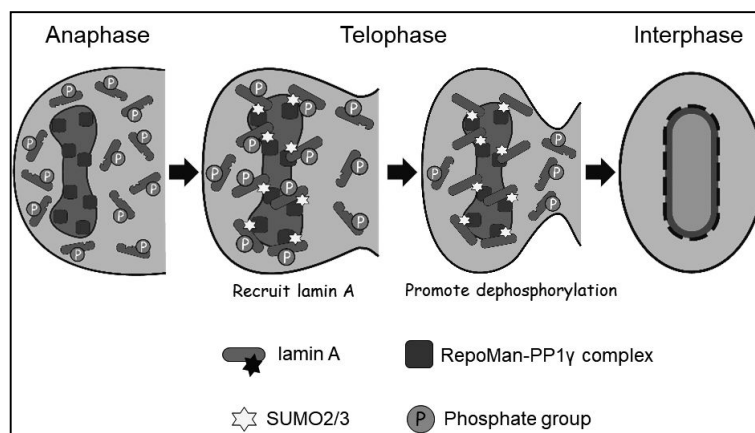
分裂期終期の FLAG-SUMO2 安定発現 HeLa 細胞を収集する。染色体結合タンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体アフィニティーカラムにより SUMO 化因子を精製し、さらに Lamin A と相互作用する因子を免疫沈降させる。

精製されたタンパク質を質量分析により同定する。

同定された因子の cDNA を合成し、発現プラスミドにクローニングし目的の因子であるかどうかを確かめたのち、この因子の性質や機能を調べる。

4. 研究成果

ラミナの主要構成因子であるラミン A は、SIM (SUMO interacting motif) 配列をもつ。この SIM 配列を破壊すると、分裂期の終期に起こる核ラミナの再構築とその後のヘテロクロマチンの核膜直下への配置が乱されることと細胞分裂後の細胞の核の変形や核内におけるヘテロクロマチンの核膜付近への局在が減少することを観察した。ラミン A の SIM と相互作用する因子を探索し、PP1 /RepoMan 複合体を同定した。PP1 /RepoMan 複合体は分裂期で機能する脱リン酸化酵素である。同調培養した HeLa 細胞を用いたリン酸化ラミン A の検出実験を行い、ラミン A の脱リン酸化は分裂期終期の後半の 15 分以内に起こることを明らかにした。一方、ラミン A を脱リン酸化する PP1 /RepoMan 複合体は分裂期後期以降に染色体上に局在する。そこで、なぜ、分裂期終期の後半までラミン A の脱リン酸化が起こらないのか、換言すれば分裂期終期に一過性に起こるラミン A の脱リン酸化の制御メカニズムを明らかにすることにした。免疫沈降実験や FRET 解析などによりラミン A と PP1 /RepoMan 複合体の相互作用する時期を調べたところ、両者の相互作用自体が分裂期終期に強まることが分かった。さらに、この時期特異的に RepoMan の SUMO 化が、SUMO 化は RepoMan とラミン A との結合アフィニティーを強めることを証明した。両者の相互作用はラミン A の SIM 配列に依存していることを証明した。これらの結果から、分裂期終期に起こる RepoMan の一過性の SUMO 化と SUMO-SIM 相互作用に依存した PP1 /RepoMan とラミン A の相互作用が、ラミン A の分裂期終期における脱リン酸化を制御しているという結論に至った。以上の結果から、分裂期終期に起こるラミン A の脱リン酸化のモデルを以下に示す。



RepoMan/PP1 以外のラミン A と相互作用する因子の免疫沈降による精製も行った。しかしながら、分裂期終期の細胞抽出液を安定的に調製することや、ラミン A の相互作用因子がそもそも多数存在することもあり、分裂期終期特異的にラミン A と結合する因子を絞り込むには至らなかった。今後は、細胞内での相互作用を可視化できるような two hybrid システムや遺伝学的な方法論など、全く別のアプローチが必要であると考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Moriuchi Tet al., Lamin A reassembly at the end of mitosis is regulated its SUMO-interacting motif. *Exp. Cell Res.* (2016) 342, 83-94.

(2) Yamashita D, Moriuchi T, Osumi T and Hirose F. Transcription Factor hDREF Is a Novel SUMO E3 Ligase of Mi2 α . *J Biol Chem.* (2016) doi: 10.1074/jbc.M115.713370.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 廣瀬富美子: SUMO-SIM 相互作用による分裂期終期の核膜構築の制御、第 13 回 SUMO 研究会 (平成 28 年 1 月、大阪)

(2) 楠本 史也、森内 昂文、廣瀬 富美子、大隅 隆: 分裂期におけるラミン A の核ラミナ再構築に必要な領域の決定, 1P-0075、第 38 回日本分子生物学会年会 (平成 27 年 12 月、神戸)

(3) 森内昂文、長栄良平、木藤健太、廣瀬富美子. RepoMan/PP1 複合体は分裂期終期における lamin A の脱リン酸化に関わる. 第 39 回日本分子生物学会年会

(4) 木藤健太、森内昂文、廣瀬富美子. 有糸分裂期における RepoMan の SUMO 化の解析. 有糸分裂期における RepoMan の SUMO 化の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会

(5) 森内 昂文、大隅 隆、廣瀬 富美子: 分裂期終了時の核ラミナ再構築は SUMO 化によって制御される、1P-0121、第 38 回日本分子生物学会年会 (平成 27 年 12 月、神戸)

(6) 長栄 良平、森内 昂文、木藤 健太、大隅 隆、廣瀬 富美子: M 期におけるラミン A-RepoMan 間相互作用の時空間的解析、第 38 回日本分子生物学会年会 (平成 27 年 12 月、神戸)

(7) 廣瀬富美子: Dephosphorylation of lamin A at the end of mitosis is regulated by SUMOylation, 第 40 回日本分子生物学会年会

(8) 河合淳史、廣瀬富美子: Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. 第 41 回日本分子生物学会年会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。