

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：26301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06226

研究課題名(和文)核膜タンパク質LINC複合体を介する核膜情報流通システムの解明

研究課題名(英文)LINC complex functions in signal transduction pathways at the nuclear envelope

研究代表者

檜枝 美紀(Hieda, Miki)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授

研究者番号：00380254

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)：細胞質から核への情報伝達は、一般的に核膜孔を介したタンパク質輸送により行われることが知られている。一方、核膜には多様な膜タンパク質が存在しており、それら膜タンパク質の構築変化等により、情報が伝達される可能性も考えられる。本研究では核膜に局在し、細胞内外の力学刺激を核へ伝達することが知られているLINC複合体に焦点をあて、核膜タンパク質による情報流通システムの解明に取り組んできた。その結果、LINC複合体は核内の核小体構築に関与すること、また細胞質のゴルジ体構築制御にも機能すること、さらに放射線照射によって誘発される細胞運動活性化にも寄与することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞核は、遺伝情報の維持と複製、遺伝情報発現の出発点である転写を行うオルガネラである。本申請研究では、核膜に存在し、LINC複合体と呼ばれるタンパク質複合体の機能解明に取り組んだ。LINC複合体は、核内において核骨格と、細胞質において細胞骨格と結合し、細胞内における核の位置決定や、メカノトランスダクション、DNA修復、染色体動態の制御、細胞運動など多岐にわたる生理機能と、ある種の筋ジストロフィーや早老症、聴覚障害など組織を限定しない多様な疾病の発症に関与する。そのためLINC複合体が担う機能を明らかにすることはそれら発症機序の解明、治療法の開発へ繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The primary functions of the nuclear envelope are to isolate the nucleoplasm and its contents from the cytoplasm; however, the nuclear envelope also plays a role in the transfer of various molecules and signals to and from the nucleus. Signal transduction across the nuclear envelope is essential for cellular functions such as transcriptional regulation and cell cycle progression, but remains poorly understood. LINC complex is a molecular bridge that spans the nuclear envelope and connects the nucleoskeleton and cytoskeleton. In this study, we revealed a regulation of the Golgi organization by the LINC complex. In addition, our study suggests that the LINC complex plays a role in modulating nucleolar morphology and numbers via chromatin. Moreover, we also revealed that LINC complex contributed to photon-enhanced cell migration and invasion. These results support a model that the LINC complex is capable of transmitting information bidirectionally between the nucleus and the cytoplasm.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核膜 LINC 複合体 メカノトランスダクション ゴルジ体 核小体

## 1. 研究開始当初の背景

核膜は、ゲノム等核内の構造物を細胞質から隔離し保護している。しかし細胞の生存には、核-細胞質間における物質や情報の流通が必要不可欠である。研究開始当初までに、核膜孔を介した物質輸送メカニズムについては詳細に解析されており、物質輸送に依存した情報伝達は広く知られていた。一方、核膜には100種類以上の膜タンパク質が存在するため、それらを利用した情報伝達機構の存在も予想されるが、ほとんど解析されていなかった。

LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) 複合体は、核膜内膜を貫通するSUNタンパク質と、核膜外膜を貫通するnesprinタンパク質が核膜間腔内で結合したタンパク質複合体である。LINC複合体は細胞質においてアクチンや微小管モータータンパク質といった細胞骨格因子と結合し、核内においてクロマチンや核ラミナといった核骨格と結合する。そしてLINC複合体は、細胞内外の力学刺激を核へ伝達することが示されていたが、核膜における情報伝達の分子メカニズムは不明であった (Chambliss et al., 2013, Sci. Rep.)。

ヒトの体細胞では2つの SUN (SUN1, SUN2) と、4つの nesprin (nesprin1~4) ファミリー分子が発現し、さらにSUNの断片を用いた結晶構造解析では、SUN1は3量体を形成し、3分子の nesprin と結合することが示されていた (Sosa et al., 2012, Cell; Wang et al., 2012, Cell Res.)。私たちは、SUN1とSUN2がそれぞれ特異的な因子と結合し、個別の機能を担うことを明らかにしていた (Matsumoto et al., 2016, Nucleus; Nishioka et al., 2017, Nucleus)。このような研究背景を基に、LINC複合体は細胞質または核の情報に応答して、組成の異なる複合体を形成（あるいは解離）し、核-細胞質間において情報を伝達するという仮説を立てていた (Hieda, 2017, Cells)。

## 2. 研究の目的

核-細胞質間の情報伝達は、核膜孔を介した物質輸送により行われることが広く知られている。核膜には多様な膜タンパク質が存在することが明らかにされており、核膜タンパク質を利用して、情報が核膜を両方向に通過するシステムの存在が予想される。中でもLINC複合体は2枚の核膜とともに貫通して存在しており、核質において核骨格と、細胞質において細胞骨格と相互作用している。さらにLINC複合体は細胞外の物理刺激を核内へ伝達することが報告されている。そこで本研究は、LINC複合体に焦点をあて、核または細胞質のどのような情報が、LINC複合体を介して、どのように隣の区画に伝わるのか明らかにすることから、核膜タンパク質を利用した情報伝達経路の存在を明確に示すことを目的とした。そしてさらにLINC複合体を利用した核-細胞質間の情報流通網の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

LINC 複合体による細胞質への情報伝達機構を解析するためにゴルジ体構築に焦点をあて、LINC 複合体による核内への情報伝達機構を解析するために核小体に焦点をあて研究をすすめた。

## 4. 研究成果

### (1) SUN2-nesprin-2 LINC 複合体は KIF20A 機能を介してゴルジ体構築を制御する

ゴルジ体は細胞の分化や運動、細胞周期など種々の細胞プロセスに応答し、ダイナミックにその構造が変化する。それら細胞プロセスは核機能に深く関与するため、核とゴルジ体間の緊密な連携が存在すると予想されるが、その分子メカニズムは明らかでない。

私たちは、方向性を持った細胞運動に SUN1 タンパク質が必要であることを見出ししていた (Nishioka et al., 2017, Nucleus)。ライブセルイメージングの解析結果は、SUN1 の発現抑制によって、細胞運動能が低下するのではなく、細胞運動の方向性が失われることを示していた。そこでゴルジ体が核近傍に集積したりボン状の構造をとる HeLa 細胞を用いて、SUN1 タンパク質を発現抑制しゴルジ体を解析した。その結果、SUN1 の発現抑制により、ゴルジ体が細胞質に分散することを見出した (図 1)。一方、SUN2 の発現抑制によってゴルジ体構築に変化は観察されなかった。ところが SUN1 の発現抑制と同時に SUN2 を発現抑制すると、SUN1 の発現抑制により誘導されるゴルジ体の分散が抑制された。また、SUN1 の発現抑制により誘導されるゴルジ体分散には nesprin ファミリー分子のうち、nesprin-2 が必要であった。さらに SUN1 発現抑制細胞を、ゴルジ体のシス槽、メディアル槽、トランス槽のマーカー分子に対する抗体を用いて解析すると、細胞質に分散したゴルジ体に、これらマーカー分子が共局在することが示された。そしてモデルタンパク質を用いた解析により、SUN1 発現抑制細胞は細胞膜へのタンパク質輸送能を保持しており、ゴルジ体はミニスタックゴルジ体として細胞質に分散していることが明らかになった。

次に免疫沈降法によって SUN1 および SUN2 と結合する因子を探索し、質量分析により解析したところ、SUN2 特異的に結合する分子として、微小管プラス端へのモータータンパク質 KIF20A を見出した。そこで KIF20A の発現を抑制したところ、SUN1 の発現抑制により誘導されるゴルジ体分散が阻害された。同様に SUN1 の発現抑制により誘導されるゴルジ体分散は、KIF20A に対する阻害剤 paprotrain の存在により抑えられた。これらの結果は SUN1 の発現抑制により誘導されるゴルジ体分散に SUN2、nesprin-2、KIF20A が必要であることを示している。

SUN1 のノックアウトマウスは小脳の発達障害が引き起こされ、小脳性運動失調を呈する (Wang et al., 2015, Dis. Model. Mech.)。そこで 30 日齢の SUN1 ノックアウトマウスを用いて、プルキンエ細胞のゴルジ体を解析したところ、ゴルジ体構築に異常が観察された。これらの結果は、生体内においてもゴルジ体構築に SUN1 が関与することを示している。

Nesprin-2 の発現量は SUN1、SUN2 と比べ、はるかに少ない。また SUN1、SUN2 はともに nesprin-1 ~4 と相互作用するが、SUN1 は SUN2 よりも nesprin-2 と複合体を形成しやすいことが報告されている (May et al., 2018, PLoS ONE)。これらのことから定常状態では SUN1/nesprin-2 を含む LINC 複合体が作成され、セントロソーム微小管に依存してゴルジ体が核近傍へ集積し (図 2 左)、一方 SUN1 が発現抑制された細胞には、SUN2/nesprin-2 LINC 複合体が形成され、その結果 KIF20A が活性化されゴルジ体が分散する (図 2 右) と考えられる。

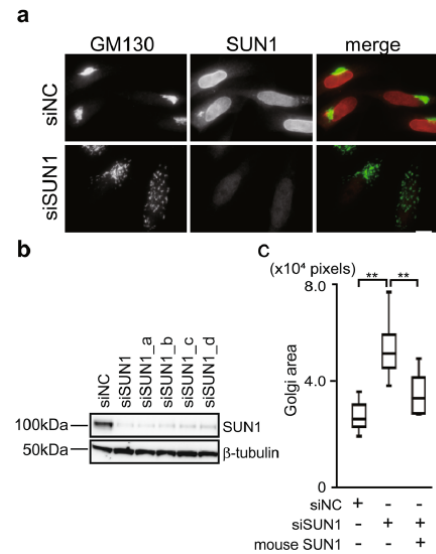


図 1 SUN1 の発現抑制によりゴルジ体は細胞質に分散する (a) HeLa 細胞に SUN1 特異的な siRNA (siSUN1) またはネガティブコントロール siRNA (siNC) を発現させて抗 GM130 抗体によりゴルジ体を観察した。(b) siSUN1 発現によるノックダウン公立の確認。(c) siSUN1, siNC を発現または siSUN1 を発現させた後、siRNA に耐性のあるマウス SUN1 を発現させた細胞のゴルジ体面積の定量化した。

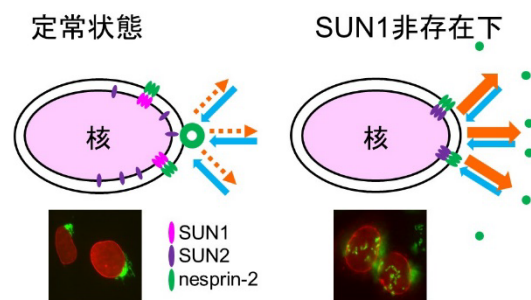


図 2 LINC 複合体によるゴルジ体構築制御モデル

## (2) SUN1 スプライシングバリエント SUN1\_916 と SUN1\_888 による核小体構築制御機構

ヒト乳がん組織では SUN1 を含む LINC 複合体構成因子の発現が顕著に低下しており、さらに機械学習を用いた解析では、SUN1 の発現低下はヒト乳腺上皮細胞由来の非腫瘍形成性細胞株 MCF10A において核小体肥大を引き起こすことを私たちは見出していた。またヒト乳がん組織では SUN1 の発現量と核小体の大きさに相関が観察される (Matsumoto et al., Cancer Medicine, 2015; Matsumoto et al., Nucleus, 2016)。核小体は細胞増殖の速度を反映すると考えられており、活発な癌細胞の指標として長い間使用されてきた。しかし、増殖速度と核小体の大きさが正の相関を示さないケースもしばしば存在し、核小体の大きさや数の制御に関しては未だよくわかっていない。

ヒト SUN1 遺伝子は染色体位置 7p22.3 に位置し、22 個のエクソンを有する。こ

のうち exon6-9 は variable region と呼ばれ、選択的スプライシングにより複数の SUN1 スプライシングバリエントが産生される。

SUN1 スプライシングバリエントには、全ての exon を含み 916 個のアミノ酸からなる SUN1\_916、exon7 を欠き 888 個のアミノ酸からなる SUN1\_888 および、exon6-8 を欠き 785 個のアミノ酸からなる SUN1\_785 等が存在する (Nishioka et al., Nucleus, 2016 ; 図 3)。

定常状態の hTERT RPE-1 細胞では、球状を示す核小体が、平均 3 個観察される。全ての SUN1 タンパク質を発現抑制した細胞では、一部変形した核小体が観察され、数の有意な増加が見られた。次に SUN1 スプライシングバリエント特異的な siRNA を用いて (図 3)、SUN1\_888 または SUN1\_916 を発現抑制したところ SUN1\_888 発現抑制細胞ではほとんど全ての細胞で球状形態の崩壊がみられ非常に不整な形態を示した。SUN1\_916 発現抑制細胞では、比較的球状が保たれていたが、一つあたりの大きさが小さくなり、数は有意に増加した (図 4)。一方、クロマチンの分布は、コントロール細胞では均等で、核小体周囲には凝集したヘテロクロマチン領域が観察される。全ての SUN1 タンパク質を発現抑制した細胞でも比較的均等であったが、核小体周囲のヘテロクロマチンは低下した。それに対し、SUN1\_888 を発現抑制した細胞では粗大顆粒状の凝集が観察され、核小体周囲のヘテロクロマチンが消失した。SUN1\_916 を発現抑制した細胞ではクロマチンは均等で、核小体周囲のヘテロクロマチンが明瞭になった。

これらの結果は、SUN1\_888 と SUN1\_916 はともに核小体構築に必須の因子であり、それぞれ異なる機能を有していることを示す。しかし、核膜に局在化する SUN1 が核小体因子と相互作用して直接的に核小体構築を制御している可能性は考え難い。一方で、SUN1 発現の有無および発現抑制したスプライシングバリエントの違いにより、核小体形態が異なるとともに核内のクロマチン分布も異なることから、SUN1 スプライシングバリエントは SUN1 および核小体の両方に相互作用するクロマチンを介して核小体構築を制御している可能性を示唆する (図 5)。

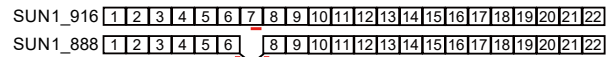


図 3 SUN1 のスプライシングバリエント SUN1\_916 と SUN1\_888 の構造 HeLa 細赤線は SUN1\_916 および SUN1\_888 特異的 siRNA のターゲッティング部位を示す。緑線はすべての SUN1 スプライシングバリエントの発現を抑制するし siRNA を示す。

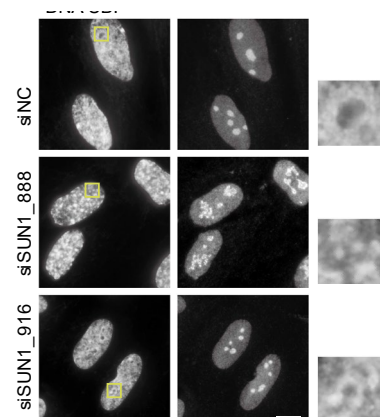


図 4 SUN1 スプライシングバリエントの発現抑制がクロマチン (左) と核小体 (右) に与える影響

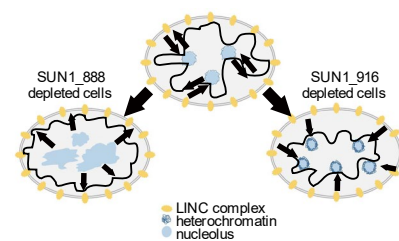


図 5 SUN1 スプライシングバリエントによる核小体構築制御機構モデル

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Katahira J, Senokuchi K, Hieda H.	4. 巻 25
2. 論文標題 Human THO maintains the stability of repetitive DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 334-342.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12760	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 Watanabe R, Maekawa M, Hieda M, Taguchi T, Miura N, Kikugawa T, Saika T, Higashiyama S.	4. 巻 31
2. 論文標題 SPOP is essential for DNA-protein crosslink repair in prostate cancer cells: SPOP-dependent removal of topoisomerase 2A from the topoisomerase 2A-DNA cleavage complex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Biol Cell	6. 最初と最後の頁 478-490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E19-08-0456	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 Katahira, J., Ishikawa, H., Tsujimura, K., Kurono, S., Hieda, M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Human THO coordinates transcription termination and subsequent transcript release from the HSP70 locus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 272-283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12672.	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 Hieda, M.	4. 巻 8, pii
2. 論文標題 Signal Transduction across the Nuclear Envelope: Role of the LINC Complex in Bidirectional Signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 E124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8020124.	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 Imaizumi, H., Sato, S., Nishihara, A., Minami, K., Koizumi, M., Matsuura, N., Hieda, M	4. 巻 109
2. 論文標題 X-ray-enhanced cancer cell migration requires the linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1158-1165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13545	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 Hieda, M., Matsumoto, T., Isobe, M., Kurono, S., Yuka, K., Kametaka, S., Wang, J.Y., Chi, Y.H., Kameda, K., Kimura, H., Matsuura, N., Matsuura, S.	4. 巻 11
2. 論文標題 The SUN2-nesprin-2 LINC complex and KIF20A function in the Golgi dispersal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 5358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84750-4.	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 Satomi, E., Ueda, M., Katahira, J., Hieda, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 The SUN1 splicing variants SUN1_888 and SUN1_916 differentially regulate nucleolar structure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene to Cells	6. 最初と最後の頁 730-740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12807	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 里見えりな 植田雅子 檜枝美紀
2. 発表標題 核膜タンパク質LINC複合体による核小体構築制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本真吾, 未武勲, 窪田裕美, 門屋孝志, 三好陽子, 石原香菜子, 松本優衣, 高石治彦, 水野洋輔, 大城由美, 檜枝美紀
2. 発表標題 子宮体癌におけるメチル化DNA結合タンパク質を用いた, DNAメチル化解析
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawabata, T., Ikeda, T., Noguchi, T., Hirata, H., Takamori, N., Komiyama, I., Igarashi, M., Hieda, M., Tani, T.
2. 発表標題 Functional analysis of RNA binding protein YB-1 involved in nuclear lobulation in HeLa cells
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satomi, E., Ueda, M., Hieda, M.
2. 発表標題 The SUN1 splicing variants SUN1_888 and SUN1_916 differentially regulate nucleolar structure
3. 学会等名 アメリカ細胞生物学会・EMBO meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺隆太, 前川大志, 檜枝美紀, 田口友彦, 三浦徳宣, 菊川忠彦, 東山繁樹, 雑賀隆史
2. 発表標題 前立腺癌細胞のtopoisomerase2A制御におけるSPOPの新規機能解明とDNA修復標的治療の治療マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺隆太, 前川大志, 檜枝美紀, 田口友彦, 三浦徳宣, 菊川忠彦, 東山繁樹, 雑賀隆史
2. 発表標題 前立腺癌細胞のtopoisomerase2A制御におけるSPOPの新規機能解明とDNA修復標的治療の治療マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ueda, N., Matsui, T., Deguchi, S., Hieda, M.
2. 発表標題 LINC complex component SUN1 is required for the generation of traction force and maturation of focal adhesions
3. 学会等名 6 th Zoo Meeting, Cell Adhesion and migration in inflammation and cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto, T., Isobe, M., Kametaka, S., Hieda M.
2. 発表標題 Golgi organization is mediated by the LINC complex and the nuclear pore complex
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology / EMBO meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本泰三, 檜枝美紀
2. 発表標題 核膜タンパク質 LINC 複合体によるゴルジ体構築制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 高森 規維、池田 智哉、野口 貴史、平田 久峰、小宮 依琳、五十嵐 雅之、檜枝 美紀、佐藤 賢文、谷 時雄
2. 発表標題 細胞核の分葉化を抑制する化合物の作用機構解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto, T., Nishioka, Y., Isobe, M., Kametaka, S., Kimura, H., Matsuura, N., Hieda, M.
2. 発表標題 LINC complex component, SUN1 play a role in the Golgi complex organization without nesprins
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会（日本発生生物学会合同大会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 檜枝美紀（曾我部正博編集）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 219
3. 書名 実験医学増刊 Vol.38 疾患に挑むメカノバイオロジー 循環器、運動器、がん、再生・発生に生体内の力はどうかかわるのか	

〔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
研究 分担者	東山 繁樹  (Higashiyama Shigeki)  (60202272)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授   (16301)	

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
---------	---------