

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06489

研究課題名(和文) 極長鎖脂肪酸合成における核膜タンパク質Lem2-Bqt4の役割

研究課題名(英文) Role of nuclear membrane protein Lem2-Bqt4 in very-long-chain fatty acid synthesis

研究代表者

平野 泰弘 (Hirano, Yasuhiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任講師

研究者番号：10508641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：核膜に局在する核膜タンパク質は細胞の分化運命決定に関与するなど、細胞の機能発現に重要な役割を果たす。本研究は核膜タンパク質であるLem2とBqt4の欠損が致死性を示す理由を明らかにすることを目的とした。Lem2とBqt4の両方が欠損した細胞では核膜に大きな穴が開き、そこから核のタンパク質が漏出することが原因で細胞が死ぬことが分かった。炭素鎖が21以上の極長鎖脂肪酸および極長鎖脂肪酸を含むセラミドと呼ばれる脂質を増加させる酵素Elo2の過剰発現によってこのような穴は開かなくなったことから、核膜タンパク質が脂質膜の組成を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で核膜が破れず機能するために核膜タンパク質が必須であることが分かった。核膜が破れずにいるためには脂質膜組成比が重要となることもわかった。本研究で明らかになった極長鎖脂肪酸は生体内の総脂肪酸量のわずか数%しかないので関わらず必須の機能を持つ重要な脂質である。極長鎖脂肪酸はスフィンゴシンとセラミドと呼ばれる脂質を形成し、皮膚を乾燥から防ぐバリア機能を持つ。これまでセラミドは主に細胞膜に存在すると考えられてきたが、核膜でも核内環境維持のためのバリア機能を果たすことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inner nuclear membrane proteins play an important role for cell functionalities such as differentiation. This study aimed to understand why and how the double deletion of inner nuclear membrane proteins, Lem2 and Bqt4, confer synthetic lethal phenotype. This study clarified that the double deletion of Lem2 and Bqt4 caused the breakage of nuclear membrane accompanied by the leakage of nuclear protein. Overexpression of the very-long-chain fatty acids synthase Elo2 rescued these phenotypes, indicating that inner nuclear membrane proteins involve in maintaining nuclear membrane lipid composition.

研究分野：分子生物学

キーワード：核膜 Lem2 Bqt4 極長鎖脂肪酸 Elo2

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)と連続した脂質膜(核膜外膜と内膜)、核膜タンパク質、核ラミナ、核膜孔複合体から成る構造体である(図1)。核膜は核と細胞質を空間的に隔てる障壁であるだけでなく、核膜タンパク質がクロマチンと相互作用することによって、ゲノムの核内への収納や転写制御を行う。ある種の核膜タンパク質の欠損や変異が

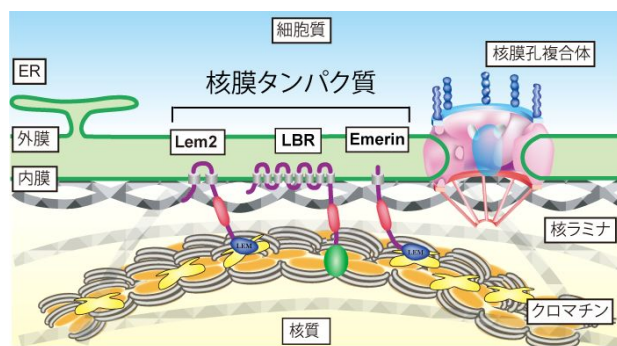


図1. 核膜の構造

様々な細胞の分化異常や筋ジストロフィー、早老症など重篤な病気を引き起こすため、核膜タンパク質によるクロマチンの機能制御機構の解析が精力的に進められている。しかしながら、高等真核生物では100種を越す核膜タンパク質同士が機能重複しているため、単一タンパク質の機能欠損変異が表現型につながりにくく、詳細な分子メカニズムの解析が難しいという問題がある。

この問題を解決する方法として、我々は単細胞真核生物である分裂酵母をモデル細胞として用いてきた。この方法を用いることで、Lem2と呼ばれる核膜タンパク質が栄養状態依存的にヘテロクロマチン形成を促進するなど、他の核膜タンパク質では見られないユニークな機能を持つことが明らかとなった。この中で最も注目すべきは、Lem2と別の核膜タンパク質であるBqt4、たった二つの核膜タンパク質を破壊すると致死となることであった。Bqt4は染色体末端であるテロメアを核膜につなぎ止め、クロマチンの核内配置維持に関与するため、Lem2-Bqt4の二重破壊によってクロマチン機能に重大な影響が起こり、致死となると推測された。ところが、極長鎖脂肪酸(側鎖の炭素数が21以上の脂肪酸)合成に関わる*elo2*遺伝子がLem2-Bqt4破壊株の致死性を相補することが分かった(図2)。

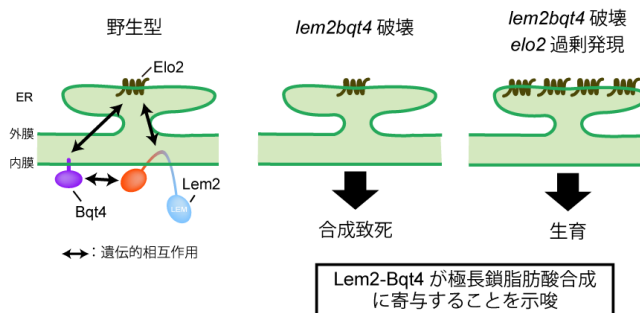


図2. 本研究で課題とした Lem2-Bqt4-Elo2 の関わり

2. 研究の目的

本研究では Elo2 が Lem2-Bqt4 二重破壊の致死性を相補する分子メカニズムの解析を通して、極長鎖脂肪酸鎖合成における Lem2-Bqt4 の役割を明らかにすることを目的とした。また、Lem2-Bqt4 と極長鎖脂肪酸合成との関わりや、極長鎖脂肪酸合成によってなぜ合成致死性が相補されるかを明らかにすることで、核膜タンパク質を基盤とした脂質合成制御の生物学的意義を検討する。

3. 研究の方法

本研究では分裂酵母をモデル生物とし、Elo2 が Lem2-Bqt4 二重破壊の合成致死性を相補する分子メカニズムを遺伝学・分子生物学・細胞生物学・生化学的手法を用いて解析する。

【解析1】Elo2が触媒する脂肪酸鎖合成段階の同定

分裂酵母 Elo2 はその配列相同性から極長鎖脂肪酸合成を行うことが推測されるが、実験的に証明されていない。これを機能相補実験と質量分析で明らかにする。

【解析 2】 Elo2 が Lem2-Bqt4 二重破壊の合成致死性を相補する分子メカニズムの解析

Elo2 による合成致死の相補メカニズムとしては、Elo2 過剰発現によって細胞内の極長鎖脂肪酸または極長鎖脂肪酸から合成されるスフィンゴ脂質量が変動する酵素活性依存的な可能性と、過剰発現によって他のタンパク質の局在や機能に影響を与えるなどの間接的な影響による可能性が考えられる。そこで Elo2 の酵素活性を失わせるような変異を導入し、これが相補活性に影響するかを検討する。

【解析 3】 極長鎖脂肪酸が核膜機能に与える影響の解析

Lem2-Bqt4 二重破壊の合成致死性が Elo2 で相補されたことから、Lem2-Bqt4 二重破壊によって核膜、特に脂質膜の機能が失われたことが致死に至る原因となったと推測される。そこで Lem2-Bqt4 二重破壊の核膜機能への影響を蛍光の位置情報と電子顕微鏡の解像度を組み合わせた、蛍光 電子顕微鏡相関観察法を用いて観察する。

4. 研究成果

始めに分裂酵母 Elo2 が触媒する脂肪酸合成段階の同定を行った。近縁種である出芽酵母 ELO 遺伝子との相補実験および質量分析の結果から、分裂酵母 Elo2 は側鎖 24 以上の極長鎖脂肪酸合成を行うことが分かった。極長鎖脂肪酸は細胞内ではセラミドという分子として存在する。質量分析の結果から、Lem2-Bqt4 二重破壊株ではこのセラミド分子が減少していることが分かり、それは Elo2 の過剰発現によって回復した (図 3)。Elo の酵素活性が相補活性に必要なかどうかを

検討するため、活性中心と考えられているヒスチジン残基をアラニンに変えた変異体 (H168A) を作製し、Lem2-Bqt4 二重破壊に導入した。この変異体の過剰発現では生育できなかったこと

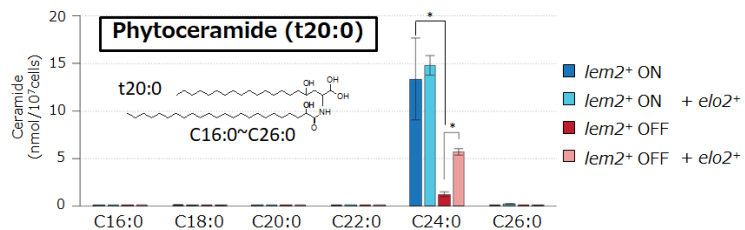


図 3. Elo2 過剰発現によるセラミド量の回復

から、Elo2 が極長鎖脂肪酸およびセラミドを合成することが Lem2-Bqt4 二重破壊株の相補に必要なことが分かった。

次に Lem2-Bqt4 二重破壊株の核膜形態や核膜のバリア機能への影響を蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて解析した。Lem2-Bqt4 二重破壊株では核膜が破れて核内のタンパク質が細胞質に漏出し、核膜のバリア機能が喪失することがわかった (図 4)。elo2 を過剰発現すると核膜のバリア機能が回復した。したがって、Elo2 を過剰発現することによって極長鎖脂肪酸量が増加し、核膜が破れにくくなったことで致死性を回復できたと考えられた。

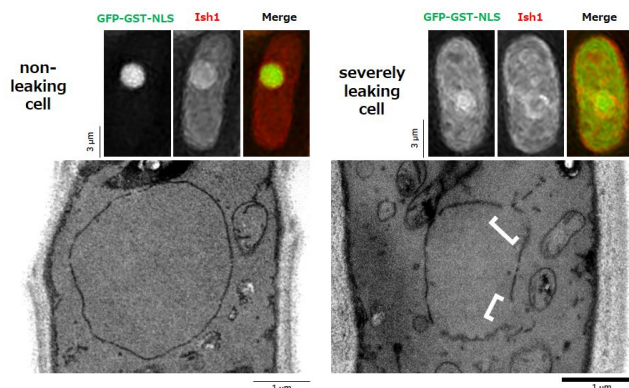


図 4. lem2bqt4 二重破壊に起因する核膜の破れ

Lem2-Bqt4 二重破壊株の致死性を相補する Elo2 以外の遺伝子のスクリーニングも進め、機能未

知の遺伝子を同定した。アミノ酸配列解析から、この遺伝子は極長鎖脂肪酸からセラミドを合成する酵素であることが示唆され、putative ceramide synthase1(PCS1)と名付けた。PCS1はElo2と協調して働くことで致死性を回避していると考えられた。PCS1はLem2-Bqt4二重破壊によって引き起こされるセラミドの減少をレスキューしたが、生化学的、遺伝学的解析などからそれ自身がセラミド合成活性を持つわけではなく、補助的に働いていることが示唆された。また、1) PCS1のLem2-Bqt4二重破壊の致死性に対する相補能がPCS1のゴルジ体局在に依存していたこと、2) Lem2とBqt4をともに働かなくするとPCS1がゴルジ体に局在できなくなったことから、PCS1はLem2-Bqt4の制御下で起こる、極長鎖脂肪酸もしくはセラミド分子のゴルジ体への運搬を担うことが考えられた。一方で、PCS1遺伝子を破壊しても、Elo2の相補能には影響がなかったことから、Elo2とPCS1は独立した機構で核膜・小胞体・ゴルジ体の脂質膜構成を制御している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Haraguchi Tokuko, Koujin Takako, Shindo Tomoko, Bilir Sukriye, Osakada Hiroko, Nishimura Kohei, Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Mori Chie, Kobayashi Shouhei, Okada Yasushi, Chikashige Yuji, Fukagawa Tatsuo, Shibata Shinsuke, Hiraoka Yasushi	4. 巻 5
2. 論文標題 Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03021-8	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 Watanabe Reito, Hirano Yasuhiro, Hara Masatoshi, Hiraoka Yasushi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 30
2. 論文標題 Mobility of kinetochore proteins measured by FRAP analysis in living cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 43 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10577-021-09678-x	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 Hayashi-Takanaka Yoko, Hayashi Yuichiro, Hirano Yasuhiro, Miyawaki-Kuwakado Atsuko, Ohkawa Yasuyuki, Obuse Chikashi, Kimura Hiroshi, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 49
2. 論文標題 Chromatin loading of MCM hexamers is associated with di-/tri-methylation of histone H4K20 toward S-phase entry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 12152 ~ 12166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab1068	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 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 276
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 Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Sakuno Takeshi, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Nuclear Envelope Proteins Modulating the Heterochromatin Formation and Functions in Fission Yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 E1908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9081908	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 Hiraoka Haruka, Nakano Tadashi, Kuwana Satoshi, Fukuzawa Masashi, Hirano Yasuhiro, Ueda Masahiro, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Intracellular ATP levels influence cell fates in Dictyostelium discoideum differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 312 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12763	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 Osemwenkhae Osaretin P., Sakuno Takeshi, Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Hayashi Takanaka Yoko, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Human Ebp1 rescues the synthetic lethal growth of fission yeast cells lacking Cdb4 and Nup184	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 288 ~ 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12757	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11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、荒神尚子、信藤知子、芝田晋介、浅川東彦、平岡泰、原口徳子
2. 発表標題 トランスフェクションされた外来DNAは細胞分裂終期の核膜再形成を介して核内に入る
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林陽子、平野泰弘、原口徳子、平岡泰
2. 発表標題 G1期のMCM複合体のクロマチン結合におけるヒストンH4K20メチル化修飾の役割
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野泰弘、荒神尚子、信藤知子、芝田晋介、浅川東彦、平岡泰、原口徳子
2. 発表標題 非ウイルスベクターを用いてトランスフェクションされた外来DNAは細胞分裂終期での核膜再形成を介して核内に入る
3. 学会等名 第44回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toan Khanh Le, Yasuhiro Hirano, Tokuko Haraguchi and Yasushi Hiraoka
2. 発表標題 Inner nuclear membrane protein Bqt4 is degraded by a Doa10-dependent proteasomal pathway to prevent nuclear membrane deformation
3. 学会等名 第44回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊励人、平野泰弘、原昌稔、深川竜郎
2. 発表標題 FRAP解析によるキネトコア分子の細胞周期依存的ダイナミクス
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊励人、平野泰弘、原昌稔、深川竜郎
2. 発表標題 FRAP解析により明らかにする細胞周期の進行に伴うキネトコアの構造変化
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平岡泰、Osaretin P. Osemwenkae、吉本翔一、平野泰弘、作野剛士、浅川東彦、原口徳子
2. 発表標題 DNA複製におけるヒストンH4アセチル化の役割
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
---------	---------