

令和 4 年 5 月 24 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：19K06660

研究課題名(和文)クロマチンと核膜孔複合体タンパク質の相互作用による核構造構築の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of nuclear structure construction by interaction between chromatin and nuclear pore complexes

研究代表者

浅川 東彦 (Asakawa, Haruhiko)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：70399533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：間期の真核細胞では染色体は核膜によって細胞質と隔てられた細胞核に収納されており、染色体の機能が核膜タンパク質によって調節されることが示唆されている。本研究では核膜孔複合体と染色体の相互作用を明らかにすることを目的に、分裂酵母を用いた解析をおこない、核膜孔複合体の構造を明らかにするとともに、核膜孔複合体タンパク質と相互作用するタンパク質を網羅的に同定した。この過程で、分裂酵母の核膜孔複合体が他に類を見ない特異な構造をもつことが明らかとなった。また核膜孔複合体と遺伝学的に相互作用する因子をいくつか同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核膜孔複合体タンパク質と密接な関連する可能性のあるタンパク質を多く同定することができた。今後の研究の進展によって、核膜孔複合体タンパク質の異常と関連の深い、様々な疾患との関係が明らかになれば、原因の解明や治療につながる可能性がある。学術的には、新規の核膜孔複合体の構造が明らかとなり、真核細胞の進化を理解する上で重要な成果を上げることができた。本研究は真核細胞の核膜の機能についてヒトを始め高等動物にも普遍的な分子メカニズムの理解や、疾患の原因の特定とその治療にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In interphase eukaryotic cells, chromosomes are stored in the nucleus, which is separated from the cytoplasm by the nuclear membrane, suggesting that chromosome function is regulated by nuclear membrane proteins. In this study, we analyzed the interaction between the nuclear pore complex and chromatin structure using fission yeast to elucidate the structure of the nuclear pore complex and to comprehensively identify proteins that interact with the nuclear pore complex proteins. This process revealed that the nuclear pore complex of fission yeast has a unique structure that is not found in any other species. We also identified several factors that genetically interact with the nuclear pore complex proteins.

研究分野：分子遺伝学、細胞生物学

キーワード：核膜 核膜孔 染色体 クロマチン 分裂酵母

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムは核膜によって細胞質から隔離されて収納された状態で、転写、複製、組換え、修復などの調節を受けている。核内において、ゲノムは局所的なヒストン修飾や染色体間の相互作用によって形成される高次クロマチン構造をとりながら機能しており、そのための基盤構造のひとつとして核膜が機能していると考えられている。哺乳類では核膜内膜に数百種類の核膜タンパク質が存在することが報告されている。核内膜タンパク質や核膜孔複合体タンパク質の異常が原因となる病気(核膜病)や個体発生の異常が知られていることから、核膜タンパク質が遺伝子発現の調節に関与することが示唆されており、核膜タンパク質の機能についての国際的関心が高まっているが、クロマチンがどの核膜タンパク質とどのように相互作用しているのか、その詳細な分子機構は解明されていない。研究代表者は、核構造の研究に適したモデル生物として知られる分裂酵母を用いた研究によって、核内膜タンパク質 Lem2 が染色体の構造や安定維持に必須の機能を持つことを明らかにしてきたが、31種類の核膜孔複合体タンパク質のうち12種類がゲノムの安定保持に必要であることを最近発見し、分裂酵母において核膜孔複合体タンパク質がクロマチンと相互作用する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

真核細胞では、クロマチンの機能が核膜タンパク質によって調節されると言われている。しかし、核膜タンパク質の機能の詳細は不明であり、クロマチンが核膜周辺領域でどのように調節されるのか具体的な分子機構は明らかにされていない。本研究では核膜構成因子のうち核膜孔複合体(核膜孔複合体)に注目し、核膜孔複合体タンパク質の遺伝子破壊株それぞれのクロマチン関連機能を評価することによって、クロマチン機能に関わる核膜孔複合体タンパク質を見つけ出し、クロマチンと核膜孔複合体タンパク質が相互作用する分子機構を解明すること、また分裂酵母のみならず真核生物に普遍的な細胞核構造と機能を進化的観点から考察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

クロマチンの機能に特に関係が深いことが予想される核膜孔複合体タンパク質の具体的な機能を調べるために、核膜孔複合体タンパク質の遺伝子を破壊した細胞を作成し、どのような不具合が生じるかを詳しく調べた。調べる方法としては、感度の高い方法として知られるミニ染色体の脱落頻度を調べたほか、複製、転写、組換え、修復などに異常がないかを調べた。さらに、核膜孔複合体タンパク質同士の間関係を調べるために、二重遺伝子破壊株を作製し、異常が強まるかどうかを調べた。また、核膜孔複合体タンパク質と相互作用する核内タンパク質の探索をおこなった。核膜孔複合体タンパク質を免疫沈降法によって回収し、相互作用によって同時に回収されるタンパク質を網羅的に同定した。同定した既知のタンパク質の機能から、核膜孔複合体タンパク質の構造的機能的役割を考察した。他の生物種の核膜孔複合体タンパク質と比較し、進化的観点からも考察をおこない、核膜構造としての核膜孔複合体の意義を明らかにした。また核膜孔複合体と関連のあるタンパク質因子についても積極的に解析をおこない、多くの知見を得ることができた。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫電子顕微鏡法による核膜孔複合体タンパク質の局在同定

分裂酵母の核膜孔複合体の構造を知るために、30種類の核膜孔複合体タンパク質それぞれの局在を免疫電子顕微鏡法によって決定した。核膜孔複合体の基盤構造のひとつとして知られているNup107-160サブ複合体は、核膜孔複合体の細胞質側と核質側の両方で環状構造(アウターリング)を形成することが多くの生物で知られているが(図1)、分裂酵母の核膜孔複合体では一部のタンパク質は核内側に、その他は細胞質側にと、分かれて配置していることがわかった(図2)。免疫電子顕微鏡法は細胞を化学固定処理して観察するのに対し、次に、生きた細胞で核膜孔複合体タンパク質の局在位置の解析を試みた。任意の2種類の核膜孔複合体タンパク質をそれぞれ緑色と赤色の蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させ、画像処理を利用した高精度計測に

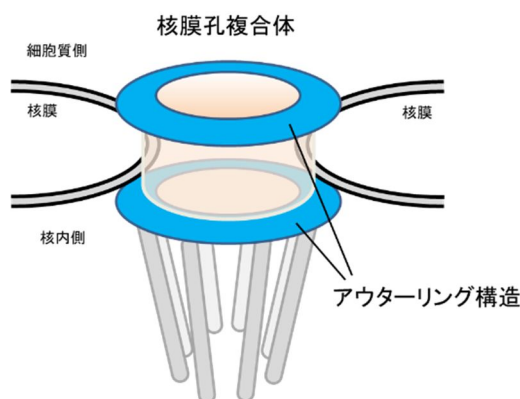


図1 核膜孔複合体アウターリングの配置と構造

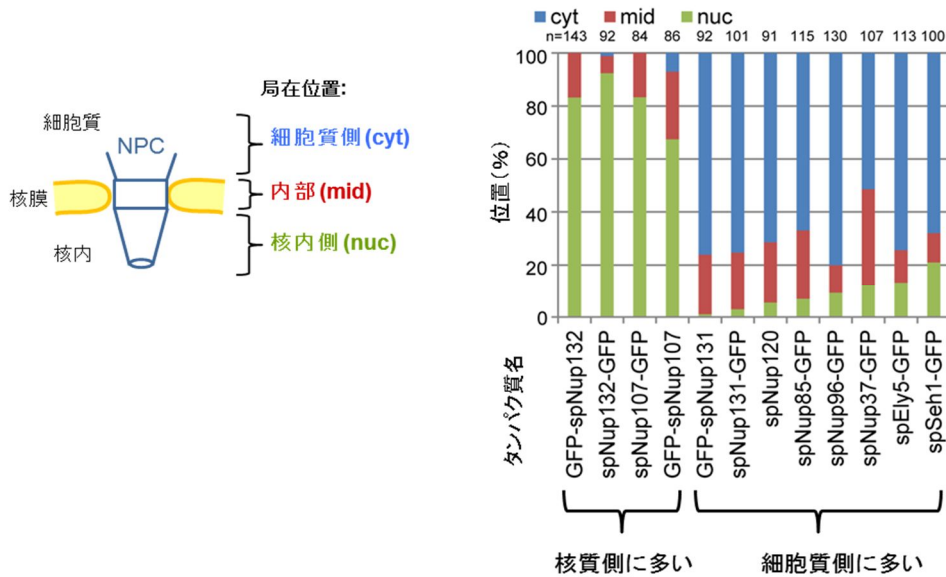


図 2 免疫電子顕微鏡法による核膜孔複合体タンパク質の局在解析

よって 2 色間の距離を測定したところ、生きた細胞の中でアウターリング複合体のタンパク質が分かれて局在していることが明らかとなった (図 3)。また、それ以外の核膜孔複合体タンパク質は他の生物で報告されている局在と同じであることがわかった。このことは核膜孔複合体アウターリングの構造が、真核生物全体で必ずしも共通ではなく、生物種によって多様化していることを示している (図 4)。また、興味深いことに、核内側に分かれて配置している核膜孔複合体タンパク質を、人為的に細胞質側に配置するように遺伝子融合によって操作すると、減数分裂の異常が見られたことから、核膜孔複合体の構造の特異性が、染色体の挙動に直接影響を及ぼすことを示すことができた。(Asakawa et al., 2019; Hirano et al., 2020)。

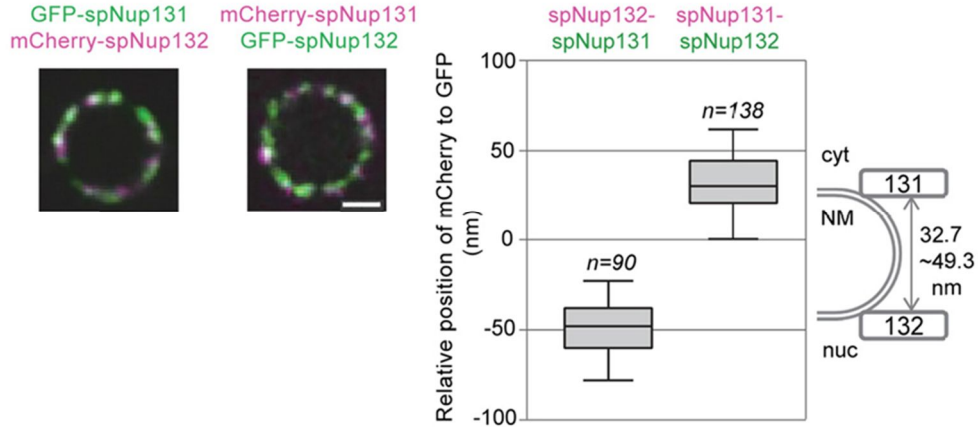


図 3 高精度蛍光顕微鏡測定法による距離測定

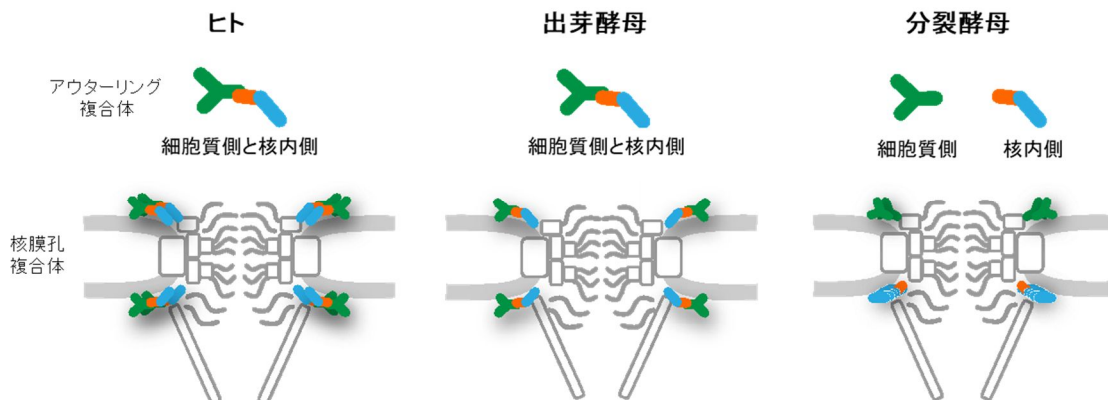


図 4 ヒト、出芽酵母、分裂酵母のアウターリング複合体と核膜孔複合体の構造



## (2) 核膜孔複合体タンパク質と相互作用するタンパク質の網羅的同定

核膜孔複合体タンパク質を免疫沈降によって回収し、相互作用因子として同時に回収されるタンパク質を質量分析によって同定した。Nup107-160 サブ複合体の核膜孔複合体タンパク質のうち、細胞質側に局在化するものからは細胞質に特異的なタンパク質が見つかり、核質側に局在化するものからは核に特異的なタンパク質が見つかり、(1)に述べた局在解析の結果を裏付ける結果が得られた。また核膜孔複合体に依存して核膜に局在化するタンパク質として Far8 を新たに見出した(図5)。また、核膜孔複合体タンパク質同士の相互作用も判明し、分裂酵母の核膜孔複合体の構造の理解が大きく進展した。(Asakawa et al., 2019; Hirano et al., 2020)

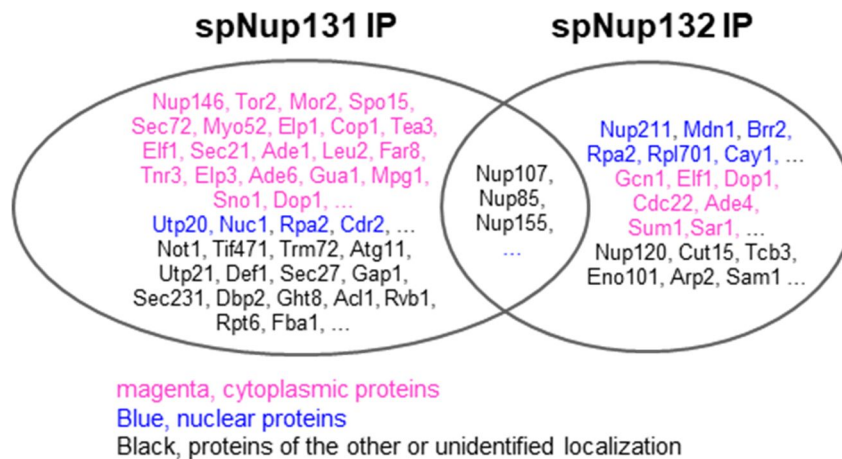


図5 核膜孔複合体の細胞質側タンパク質 spNup131 と核質側タンパク質 spNup132 の相互作用因子の同定

## (3) Sec13 タンパク質の核膜孔複合体における機能

核膜孔複合体タンパク質と相互作用するタンパク質として、小胞輸送に働く COP11 複合体の因子である必須タンパク質 Sec13 を同定した。蛍光顕微鏡解析により Sec13-GFP は細胞質中のドットとして、また同時に核膜領域にも局在が観察された。多くの真核生物と同様に、Sec13 は核膜孔複合体タンパク質 Nup96 と相互作用していた。Sec13 との相互作用が失われる Nup96 の変異体を作製したところ、変異体は生存可能であり、Sec13 の核膜領域への局在は失われたが、細胞質中のドットとしての局在はほとんど変わらなかった。従って、Sec13 は核膜孔複合体の機能には必須ではない可能性が示唆された。(論文準備中)

## (4) 核膜孔複合体タンパク質 Nup184 と DNA 結合タンパク質 Cdb4 の合成致死性の発見

生育に非必須の核膜孔複合体タンパク質 Nup184 と DNA 結合タンパク質 Cdb4 が二重に欠損すると細胞が生育できなくなることを発見した。これは、cdb4 遺伝子破壊株に cdb4 遺伝子を外来のプラスミドとして保持させた状態で薬剤による変異導入をおこない、プラスミドを欠落したときに致死となる変異をスクリーニングし、発見した(図6)。他の核膜孔複合体タンパク質についても Cdb4 との関連を調べたが、生育に必須でない核膜孔複合体タンパク質の遺伝子の中で cdb4 の欠損と特異的に合成致死性を示すのは Nup184 だけだった。Cdb4 の細胞内での機能は今までほとんど知られていなかったが、この結果を手掛かりに Nup184 と Cdb4 の機能が明らかになることが期待できる。(Osemwenkhae et al., 2020)

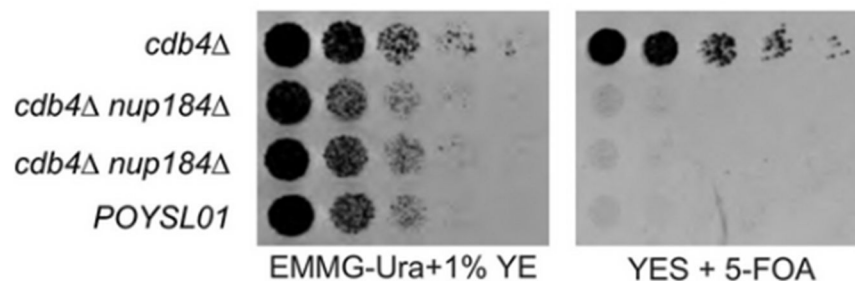


図6 *cdb4*, *nup184* 二重遺伝子破壊による合成致死性

### (5) 二重欠損によって合成致死性を示す核膜孔複合体タンパク質の遺伝子の同定

免疫電子顕微鏡法による局在解析の結果を元に、核内側に特異的に局在化する核膜孔複合体タンパク質について遺伝子破壊株を作成した。個別に遺伝子破壊をしても生育に影響のない、非必須核膜孔複合体遺伝子に注目し、二重欠損変異体を作成したところ、致死性を示すものはなかったが、温度感受性の生長を示す二重欠損変異体を単離することができた。この変異体では、ミト染色体の脱落頻度が高いことやセントロメアタンパク質の局在量が減少するなど、染色体の保持に欠損が見られることがわかった。

### (6) 核膜タンパク質 Lem2, Elo2 の解析

(2)の結果から、核膜孔複合体タンパク質と相互作用するタンパク質として、既知の核内膜タンパク質 Lem2 を見出した。Lem2 はさらに別の核内膜タンパク質 Bqt4 とともに二重欠損すると細胞が生育できなくなることが知られており、核膜の機能において重要な因子と考えられる。この致死性を相補する遺伝子として極長鎖脂肪酸合成酵素をコードする *elo2* 遺伝子を同定し、機能解析をおこなった。*Elo2* を欠損すると核膜に破れが生じることから、核膜の構造維持に極長鎖脂肪酸の合成が核膜の構造および機能に重要な意義をもつことが示された(図7)。(Kinugasa et al., 2019)

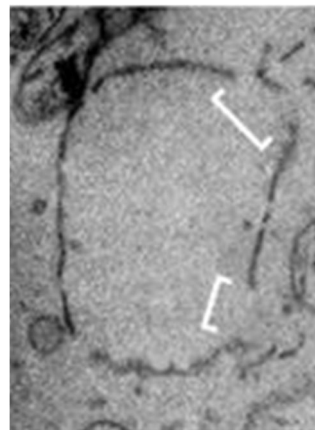


図7 *Elo2* の欠損による核膜の破れ

### (7) 分裂酵母の減数分裂で見られる核膜バリア機能の消失の意義

分裂酵母は、減数分裂に伴って細胞内に孢子細胞を新生し、孢子細胞核にゲノムを継承する。酵母では核分裂をしても核膜崩壊はせず、クロマチンは核膜に包まれたまま分配されるため(closed mitosis)細胞内の分子は混ざることなく核内や細胞質内に局在を維持する。研究代表者は以前に減数分裂の際に核膜を維持したまま一時的に核と細胞質の分子が局在を保つことなく混ざり合うことを発見している。核膜の機能調節が関わると思われるこの現象の意義を理解するために解析をおこない、核膜に局在化するタンパク質分解酵素プロテアソームの構成因子 Rpn11 がこの過程において一時的に細胞質へ局在を変えることが、次世代の細胞である孢子を正常に形成し、ゲノムを次世代に継承するために必須であることがわかった。(Yang et al., 2020)

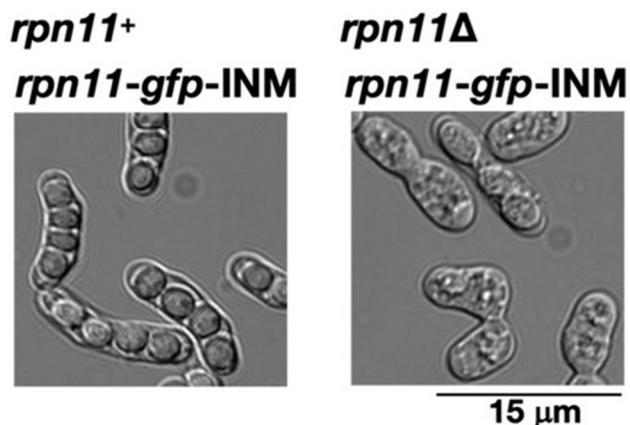


図8 野生株(左, *rpn11*<sup>+</sup>)と *rpn11* 遺伝子破壊株(右, *rpn11*<sup>Δ</sup>)で Rpn11 を核内膜に人為的に係留させたときの表現型。野生株 Rpn11 をもつ左の株は細胞内に4つの孢子を形成するが、もない右の株では孢子形成に異常が見られる。

### (8) ゴルジ体内におけるタンパク質輸送機構

核膜孔複合体タンパク質のいくつかは膜輸送にも関わることが知られている。膜輸送の中心的細胞内小器官のひとつであるゴルジ体において、タンパク質がどのように輸送されるのかは不明な点が多かった。CLEM イメージングを利用して、細胞内の膜の動態を解析し、タンパク質がゴルジ体の「槽成熟」に伴って形成されるゴルジ体内の領域間を移動しながら輸送されることが明らかとなった。(Kurokawa et al., 2019)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yang Hui-Ju, Asakawa Haruhiko, Ohtsuki Chizuru, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Transient Breakage of the Nucleocytoplasmic Barrier Controls Spore Maturation via Mobilizing the Proteasome Subunit Rpn11 in the Fission Yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 242 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof6040242	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 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 1908 ~ 1908
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 Osemwenkhae Osaretin P., Sakuno Takeshi, Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Hayashi Takanaka Yoko, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi	4. 巻 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Haruhiko, Kojidani Tomoko, Yang Hui-Ju, Ohtsuki Chizuru, Osakada Hiroko, Matsuda Atsushi, Iwamoto Masaaki, Chikashige Yuji, Nagao Koji, Obuse Chikashi, Hiraoka Yasushi, Haraguchi Tokuko	4. 巻 15
2. 論文標題 Asymmetrical localization of Nup107-160 subcomplex components within the nuclear pore complex in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008061	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 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 -

1. 著者名 Kurokawa Kazuo, Osakada Hiroko, Kojidani Tomoko, Waga Miho, Suda Yasuyuki, Asakawa Haruhiko, Haraguchi Tokuko, Nakano Akihiko	4. 巻 218
2. 論文標題 Visualization of secretory cargo transport within the Golgi apparatus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1602 ~ 1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201807194	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13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 浅川東彦, 大槻千鶴, 長尾恒治, 信藤知子, 芝田晋介, 小布施力史, 平岡 泰, 原口徳子
2. 発表標題 分裂酵母の核膜孔複合体へのSec13の局在とその必要性
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会 (合同開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅川東彦, 大槻千鶴, 長尾恒治, 信藤知子, 芝田晋介, 小布施力史, 平岡 泰, 原口徳子
2. 発表標題 分裂酵母の核膜孔複合体にはNup96を介したSec13の局在化は必須ではない
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口徳子、浅川東彦、楊 恵如、平岡 泰
2. 発表標題 分裂酵母の核膜孔複合体：その構造と減数分裂における機能
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅川東彦、大槻千鶴、長尾恒治、信藤知子、芝田晋介、小布施力史、平岡 泰、原口徳子
2. 発表標題 分裂酵母の核膜孔複合体へのSec13の局在とその必要性
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会（合同開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅川東彦、大槻千鶴、長尾恒治、信藤知子、芝田晋介、小布施力史、平岡 泰、原口徳子
2. 発表標題 分裂酵母の核膜孔複合体にはNup96を介したSec13の局在化は必須ではない
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口徳子、浅川東彦、楊 恵如、平岡 泰
2. 発表標題 分裂酵母の核膜孔複合体：その構造と減数分裂における機能
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Asakawa H, Kojidani T, Matsuda A, Yang H-J, Ohtsuki C, Osakada H, Iwamoto M, Chikashige Y, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T.
2. 発表標題 Asymmetrical localization of outer ring nucleoporins within the nuclear pore complex in fission yeast
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅川東彦
2. 発表標題 核膜孔複合体：分裂酵母に見られる特異的構造とその意義
3. 学会等名 第50回広島大学健康長寿研究拠点 (HiHA) Webinar (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asakawa H, Kojidani T, Yang H-J, Ohtsuki C, Osakada H, Matsuda A, Iwamoto M, Chikashige Y, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T.
2. 発表標題 Asymmetrical localization of Nup107-160 subcomplex components within the nuclear pore complex in fission yeast
3. 学会等名 EMBO Workshop on Fission Yeast (Pombe2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅川東彦、梶谷知子、松田厚志、楊 惠如、大槻千鶴、小坂田裕子、岩本政明、近重裕次、長尾恒治、小布施力史、平岡泰、原口徳子
2. 発表標題 分裂酵母核膜孔複合体タンパク質の生細胞蛍光イメージング解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅川東彦、梶谷知子、松田厚志、大槻千鶴、平岡 泰、原口徳子
2. 発表標題 分裂酵母に特異的な核膜孔複合体構造の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻山友貴、久保田佳乃、浅川東彦、平岡 泰、石井浩二郎
2. 発表標題 新規形成セントロメアの減数分裂における安定性
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinuagusa 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 EMBO Workshop on Fission Yeast (Pombe2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院生命機能研究科 平岡研究室ホームページ  <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html</a>  大阪大学 研究者総覧 (浅川東彦)  <a href="https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/357ad57b98356ab3.html">https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/357ad57b98356ab3.html</a>  Researchmap (浅川東彦)  <a href="https://researchmap.jp/read0124848">https://researchmap.jp/read0124848</a>  定説を覆す発見！分裂酵母が独特の核膜孔複合体アウターリング構造を持つことを解明  <a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190607_2">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190607_2</a>  Nuclear pore complex outer rings  <a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/en/research/2019/20190607_2">https://resou.osaka-u.ac.jp/en/research/2019/20190607_2</a></p>
--

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
研究協力者	平岡 泰  (Hiraoka Yasushi)		

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			
その他の国・地域	National Health Research Inst. in Taiwan			
ドイツ	欧州分子生物学研究所 (EMBL)			