

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16147

研究課題名（和文）細胞外シグナル伝達を制御する核膜蛋白質の翻訳後プロセッシング機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of post-translational processing of the nuclear membrane protein regulating the extracellular signaling pathway

研究代表者

佐藤 夢子（小林夢子）（Kobayashi, Yumeko）

帝京大学・先端総合研究機構・助教

研究者番号：00756447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：核内膜蛋白質のMAN1は、TGF- $\beta$ ファミリーのシグナル経路下流で作用する転写因子のR-Smadsと結合し、シグナル伝達を抑制する。本解析によって、MAN1蛋白質のリン酸化修飾と、アクチビンによるMAN1の細胞内局在変化が示された。加えて、アクチビン処理によってMAN1が転写レベルでも抑制されることが示された。以上の解析により、MAN1自身がTGF- $\beta$ /アクチビンによって多様な制御を受けることが示唆され、TGF- $\beta$ シグナル制御機構を理解する上での新たな手がかりが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、TGF- $\beta$ シグナル伝達を負に制御するMAN1自身が、TGF- $\beta$ /アクチビンによって制御を受けることを示しており、多様なTGF- $\beta$ シグナル伝達様式の一端の解明に繋がると考えられ、学術的意義が高い。また、TGF- $\beta$ /アクチビンによる核膜蛋白質の輸送制御や核のリモデリングが予想され、核膜の性質変化がもたらす細胞外シグナル応答や組織分化への影響について、次の展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：The inner nuclear membrane protein MAN1 functions as a negative regulator of the TGF- $\beta$  family signaling pathway by interacting with its downstream transcription factors, R-Smads. We found that Man1 protein was phosphorylated and altered subcellular localization upon activin treatment. Furthermore, activin treatment resulted in reduction of man1 gene expression. Our data suggest that Man1 is itself regulated by TGF- $\beta$ /activin, and provide new insights into the regulatory mechanisms of TGF- $\beta$  signaling pathway.

研究分野：発生生物学

キーワード：核膜蛋白質 翻訳後修飾 TGF- $\beta$  シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核膜蛋白質は、核構造を安定的に維持することが主な役割とされてきた。しかし近年、転写因子を核膜近傍に捕捉することで、遺伝子発現を直接制御するという新たな役割が注目されている。中でも、核内膜蛋白質の MAN1 は、TGF- $\beta$  シグナル経路の下流で作用する転写因子の R-Smad と直接結合し、シグナル伝達を抑制する。しかし、どのように MAN1 の活性が制御され、またどのように TGF- $\beta$  シグナルを制御するのか、詳細な分子機構は明らかにされていない。現在までに、MAN1 が核膜付近に R-Smad をターゲティングすることで、他の転写因子や Co-Smad との転写複合体形成を阻害するモデルや、MAN1 が脱リン酸化酵素の PPM1A による R-Smad の脱リン酸化反応と R-Smad の核外輸送を促進するモデルが考えられている。しかし、多様な生命現象に関わる TGF- $\beta$  シグナルの情報が正確に細胞内に伝わるためには、まだ知られていない新たな制御機構が存在している可能性がある。近年、MAN1 ヒトオースログ LEMD3 の翻訳後プロセシングが確認され、MAN1 の翻訳後制御を介した TGF- $\beta$  シグナル伝達調節が予測されたが、その実状は十分に分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、MAN1 蛋白質の翻訳後修飾に注目し、核膜蛋白質の新たな制御機構と細胞外シグナル伝達への役割を明らかにすることを目的とした。また、実験モデルとしてアフリカツメガエルの初期胚を用いることで、核膜蛋白質による細胞外シグナル制御が胚発生にどのような影響を与えるかについて検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) データベースを用いた翻訳修飾部位の予測と MAN1 蛋白質の発現解析

MAN1 蛋白質の翻訳後修飾部位をアミノ酸の配列情報から予想するため、各種データベースを確認した。また、MAN1 蛋白質の翻訳後制御の有無を確認するため、Myc タグ付き MAN1 コンストラクト (Myc-MAN1) をアフリカツメガエル初期胚に発現させ、蛋白質発現解析 (ウェスタンブロット) を行った。この時、検出された Myc-MAN1 蛋白質のバンドの位置から、翻訳後修飾の有無を検討した。さらに、脱リン酸化酵素反応を行うことで、リン酸化修飾の有無を検討した。

#### (2) MAN1 蛋白質の細胞内局在の検討

蛍光蛋白質を融合した MAN1 コンストラクト (Venus-MAN1, MAN1-mRFP) をアフリカツメガエル初期胚に発現させ、蛍光観察、及び免疫蛍光染色像の観察を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。この時、TGF- $\beta$  ファミリーのアクチビンをつメガエル初期胚の胞胚腔に発現させ、MAN1 の局在変化を検討した。加えて、Venus-MAN1 を発現させた予定外胚葉の外植体 (アニマルキャップ) を単離し、アクチビン添加時の Venus-MAN1 の細胞内局在変化を検討した。

#### (3) アクチビン処理による *man1* 遺伝子の発現変化 (トランスクリプトーム解析)

アフリカツメガエル初期胚から単離したアニマルキャップに、アクチビンを投与し、アクチビン処理時間に伴う遺伝子発現遷移を、RNA-seq 後のトランスクリプトームデータを用いて解析した。この時、投与するアクチビンの濃度は 50 ng/mL とし、筋肉や脊索などの中胚葉組織を誘導する条件で処理した。発現変動する遺伝子のうち、特に *man1* 遺伝子の発現に着目して調べた。また、発現が増加する遺伝子群と抑制する遺伝子群の機能を Gene Ontology (GO) 解析を用いて推測した。

#### 4. 研究成果

成果について研究項目ごとに分けて記述する。

##### (1) データベースを用いた翻訳修飾部位の予測と MAN1 蛋白質の発現解析

① アフリカツメガエルの MAN1 蛋白質のプロセシング部位、及び翻訳修飾部位を幾つかのデータベースを用いて予測した。MAN1 蛋白質のプロセシング部位は該当しなかったが、予想されたリン酸化やユビキチン化、メチル化などの翻訳後修飾部位が、アフリカツメガエルの MAN1 にも保存されている事が確認できた。特に、BMP による筋芽細胞から骨芽細胞への分化転換時にリン酸化されるアミノ酸部位が、アフリカツメガエルの MAN1 にも保存されていることを確認した。以上の事から、BMP 処理下での MAN1 のリン酸化修飾と、MAN1 による BMP シグナル伝達の抑制という、2つの制御機構の関連性が示唆された。

② Myc-MAN1 コンストラクトをアフリカツメガエル初期胚に発現させ、抗 Myc 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。新生蛋白質のバンド位置よりも上に複数本のバンドがうっすらと検出されたことから、アフリカツメガエル初期胚においても MAN1 が翻訳後修飾を受ける可能性が示唆された。一方、本解析では、培養細胞を用いた知見で報告された様な MAN1 蛋白質の断片化を確認する事ができなかった。以上より、アフリカツメガエル初期胚では、MAN1 のプロセシングは明確には起こらない事が示唆された。また、Myc-MAN1 を発現したアフリカツメガエル細胞抽出液に脱リン酸化酵素を反応させ、ウェスタンブロットを行ったところ、バンドの位置が下にずれたことから MAN1 蛋白質のリン酸化修飾が示唆された。

##### (2) MAN1 蛋白質の細胞内局在の検討

Venus-MAN1、及び MAN1-mRFP をアフリカツメガエルの初期胚に発現させ、蛍光観察、及び免疫蛍光染色により、MAN1 蛋白質の細胞内局在を検討した。これまでの知見と同様に、核膜での局在が確認されたが、細胞質中にも集積することが確認された。

次に、TGF- $\beta$ による MAN1 の制御を調べるために、Venus-MAN1 を発現させたアフリカツメガエル初期胚の胞胚腔にアクチピンを注入し、Venus-MAN1 の細胞内局在変化を検討した。しかし、この実験では、ネガティブコントロールと比較して、Venus-MAN1 の細胞内局在に大きな変化は見られなかった。この原因として、胞胚腔に注入したアクチピンが Venus-MAN1 に十分に作用しなかった、若くは、アクチピンは Venus-MAN1 の細胞内動態に影響を及ぼさない、という二通りが考えられた。そこで、Venus-MAN1 を発現させたアニマルキャップにアクチピンを添加・培養し、十分にアクチピンを作用させた条件での Venus-MAN1 の細胞内局在を検討した。その結果、アクチピン処理によって、Venus-MAN1 の核膜局在が低下することが示された。

##### (3) アクチピン処理による *man1* 遺伝子の発現変化 (トランスクリプトーム解析)

アフリカツメガエル初期胚からアニマルキャップを単離し、アクチピン処理時間に伴う遺伝子発現変化を RNA-seq.を用いたトランスクリプトーム解析によって包括的に調べた。その結果、アクチピン処理時間に伴い、*man1* 遺伝子の発現抑制が確認された。アクチピン処理後抑制される遺伝子の機能を GO 解析で予測したところ、小胞体-核間の蛋白質輸送や核膜のリモデリングに深く関与していることが示された。これらの事から、アクチピンによって、MAN1 などの核膜蛋白質をコードする遺伝子の発現が抑制され、核膜のリモデリングが起きている可能性が示唆された。

以上の成果をまとめると、アフリカツメガエル初期胚において、MAN1 はリン酸化修飾を受けること、またアクチピン処理下では MAN1 の核膜局在が抑制されることが新たに分かった。MAN1

のリン酸化修飾と細胞内局在変化との関連は不明なままであるが、TGF- $\beta$ /アクチピンによる MAN1 の動態変化が示唆された。加えて、アニマルキャップにアクチピン処理を施すと、MAN1 が転写レベルでも抑制されることが示された。本解析によって、TGF- $\beta$ /アクチピンによる MAN1 の動態制御だけではなく、TGF- $\beta$ /アクチピンによる核膜のリモデリングと、核構造や核機能の動的な変化が起こる可能性が新たに示唆された。

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<br>Yumeko Satou-Kobayashi, Jun-Dal Kim, Akiyoshi Fukamizu, Makoto Asashima   | 4. 巻<br>11(1)       |
| 2. 論文標題<br>Temporal transcriptomic profiling reveals dynamic changes in gene expression of <i>Xenopus animal cap</i> upon activin treatment | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>14537 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-021-93524-x   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小林夢子, 金俊達, 深水昭吉, 浅島誠                  |
| 2. 発表標題<br>アクチビン処理下でのツメガエルのアニマルキャップのトランスクリプトーム解析 |
| 3. 学会等名<br>第44回 日本分子生物学会年会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|