

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06045・19K21178

研究課題名(和文)核ラミナが核膜孔の分布を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Structural study of the association between the nuclear lamina and nuclear pore complexes

研究代表者

志見 剛 (Shimi, Takeshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任准教授

研究者番号：60817568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：核ラミナの網目構造の研究でも用いた、最新のクライオ電子線トモグラフィー法(cryo-ET)とコンピュータービジョンによる3次元構造化照明顕微鏡法(3D-SIM)によって、核膜孔複合体とラミンの結合を定量解析した。その結果、核膜孔複合体は、ラミンのファイバー構造に沿って分布していること、LA/CとLB1を含むファイバー構造が核膜孔複合体の正常な分布に必要なものであること、ELYSが核膜孔複合体とラミンのファイバー構造の結合に重要な役割を果たしていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラミンと核膜孔複合体の結合は、それぞれの構造と機能に働きかける局所場であり、本研究でこの結合について定量解析をおこなったことは、細胞生理学的な意義が極めて大きいと考えられる。今回の成果は今後、心筋症、筋ジストロフィー、早老症に代表される、ラミンの変異を原因とする遺伝病(ラミノパシー)の分子レベルでの解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the structural relationship between the lamina/lamin and the nuclear pore complex (NPC) in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) using fluorescence three-dimensional structured illumination microscopy (3D-SIM) combined with computer-vision and cryo-electron tomography (cryo-ET). We showed that the NPC followed the perimeter of lamin fibers of the lamina, and the NPC was redistributed by Knockout of LA or LB1. Furthermore, Lamin filaments were structurally associated with the nucleoplasmic ring of the NPC. We also found that knockdown of a nucleoporin, ELYS altered the spatial relationship between the lamin fiber and the NPC. These results indicated that LA/C and LB1 are required for regulating the normal structure of the lamina and the NPC through ELYS. Our quantitative approach combining 3D-SIM and cryo-ET may shed light on the physiological properties of and pathological changes in lamin-NPC interactions.

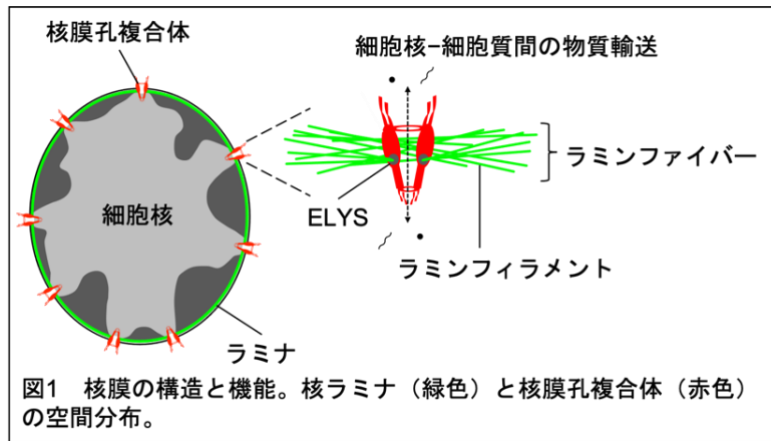
研究分野：細胞生物学

キーワード：Lamina lamin Nuclear pore complex Nucleoporin Laminopathies

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物細胞では、ゲノム DNA が折り畳まれて高次クロマチン構造を取り、核膜によって包み込まれている(図1)。核膜の内側を裏打ちする核ラミナは、核構造を維持し、凝集したクロマチン構造(ヘテロクロマチン)と結合する。核膜を貫通する核膜孔複合体は、核-細胞質間における高分子の輸送を調節し、緩んだクロマチン構造(ユークロマチン)と結合する。このように、独自の構造を持つラミナと核膜孔複合体は、転写、ゲノム DNA の複製と修復を含むゲノム DNA の機能を制御するために必須である(図1)。



核ラミナの主要な構造タンパク質であるラミンは、タイプ V 中間径フィラメントタンパク質の一種であり、A型ラミン(LA、LC)とB型ラミン(LB1、LB2)からなる。従来、主要な細胞骨格のうち、ラミンフィラメントを含む中間径フィラメント(直径約8~12ナノメートル)は、アクチンが形成するマイクロフィラメント(直径約5~9ナノメートル)よりも太く、チューブリンが形成する微小管(直径約25ナノメートル)よりも細いと考えられていた。しかし近年、我々は、マウス胚線維芽細胞(MEF)において4量体を形成したラミン分子がつながって直径約3.5ナノメートルのラミンフィラメントを形成し、これらのラミンフィラメントが不均一に分布してファイバー構造となり、厚さ約14ナノメートルの網目構造を取ることを明らかにした(図1と2、*Mol. Biol. Cell* 26:4075-4086.2015; *Nature* 543:261-264.2017)。さらに、全てのラミンが異なる網目構造が重なってラミナを形成していることが判明した。さらに、LA/CまたはLB1のノックアウトによってラミナ構造の網目が拡大することから、これらのラミンが正常なラミナ構造の形成に必要であることが示された(図3、*Mol. Biol. Cell* 26:4075-4086.2015)。

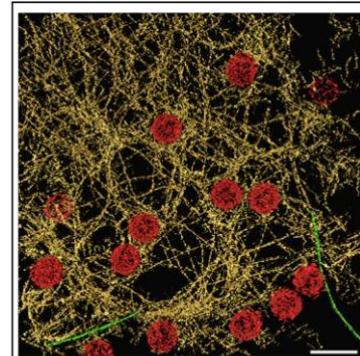


図2 レンダリング処理を施されたcryo-ET画像。MEFにおける核膜付近のラミンフィラメントと核膜孔複合体の分布。

2. 研究の目的

核膜孔複合体は外径約120ナノメートルの筒状構造をとり、約30種類のヌクレオポリンから構成される。核膜孔複合体が核ラミナの網目構造の穴に1つずつ挿入されていることはわかっている(*Science* 2008 Jun 320:1332-6)。近年、我々は、ラミンフィラメントと核膜孔複合体が構造的に繋がっていることを解明した(図2、*Nature* 543:261-264.2017)。この結果は、ラミンとヌクレオポリンが結合するという生化学的知見とも一致する(*Proc Natl Acad Sci USA* 111:E2453-61.2014)。しかし、これらの知見からだけでは、「ラミンがどのようにして核膜孔複合体の分布を制御するのか?」という問いに答えることはできない。したがって、この問いを検証することが、本研究の目的である。

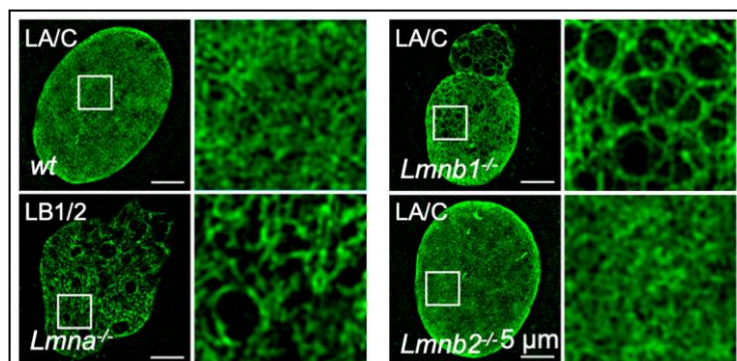


図3 3D-SIM画像。LA/CまたはLB1のノックアウトによって拡大したラミナの網目構造。

この結果は、ラミンとヌクレオポリンが結合するという生化学的知見とも一致する(*Proc Natl Acad Sci USA* 111:E2453-61.2014)。しかし、これらの知見からだけでは、「ラミンがどのようにして核膜孔複合体の分布を制御するのか?」という問いに答えることはできない。したがって、この問いを検証することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

ラミンフィラメントと核膜孔複合体の結合を調べるために、LAとLB1を直径の異なる金粒子で標識した特異的抗体によって二重染色して、クライオ電子線トモグラフィー法(cryo-ET)を

行った。また、ラミンファイバーと核膜孔複合体の結合を調べるために、不死化した野生型 (wt)、ラミン欠損型 (*Lmna*^{-/-}、*Lmnb1*^{-/-}、*Lmnb2*^{-/-}) の MEF において、各ラミン (LA, LB1, LB2, LC) と FXFG リピート含有のヌクレオポリンを特異的抗体によって二重染色した後に、コンピュータービジョンと組み合わせた 3 次元構造化照明顕微鏡法 (3D-SIM) を行った。さらに、ラミナと核膜孔複合体を構造的に繋げるために必要なヌクレオポリンを特定するために、wt の MEF において LA と結合するヌクレオポリンである NUP153、ELYS、TPR を siRNA によってノックダウンした後、上記と同様の実験を行った。ノックダウン効率を調べるために、これらのヌクレオポリンの特異的抗体によって免疫染色とウエスタンブロッティングを行った。

4. 研究成果

免疫 cryo-ET を用いた実験結果から、wt の MEF における LA と LB1 のフィラメントは、核膜孔複合体のアウターリング付近と接触することを明らかにした (図 4)。コンピュータービジョンと組み合わせた 3D-SIM を用いた実験結果から、wt、*Lmna*^{-/-}、*Lmnb1*^{-/-} の MEF における核膜孔複合体がラミンファイバーに沿って分布することが判った (図 5)。これらの結果から、LA/C または LB1 が核膜孔複合体の正常な分布に必要であると示された。次に、ELYS、NUP153、TPR を siRNA によってノックダウンした後、ラミンと核膜孔複合体の分布を調べたところ、ELYS のノックダウンによって核膜孔複合体の凝集体が形成されることを見出した。一方、NUP153 と TPR をノックダウンした場合は、核膜孔複合体の分布に顕著な変化は確認されなかった。これらの結果から、ELYS は、ラミンファイバーと核膜孔複合体の相互作用に必要であることが示された (図 6)。

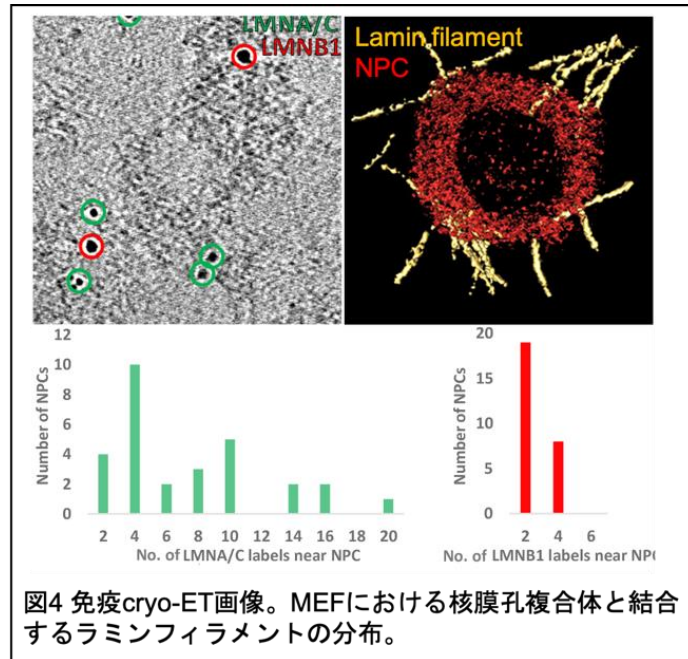


図4 免疫cryo-ET画像。MEFにおける核膜孔複合体と結合するラミンフィラメントの分布。

これらの知見は、核ラミナと核膜孔複合体を構造的に繋げる場所が両者の機能を制御

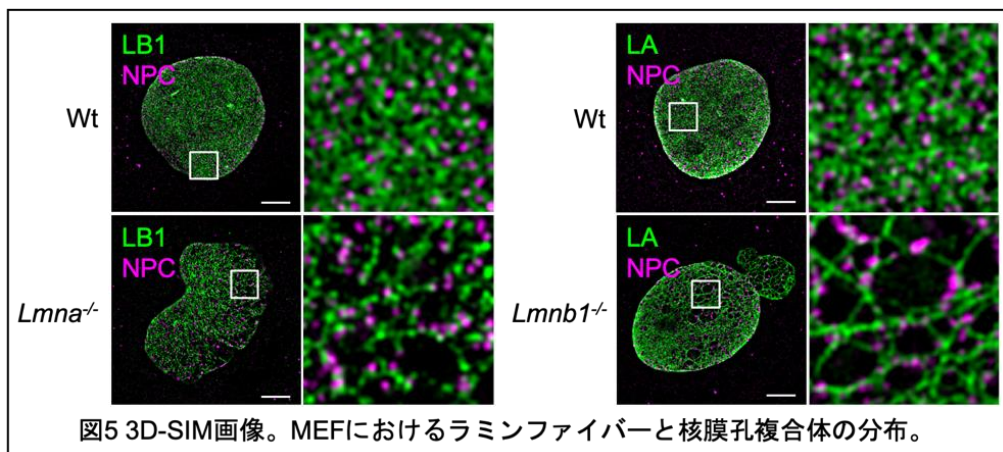
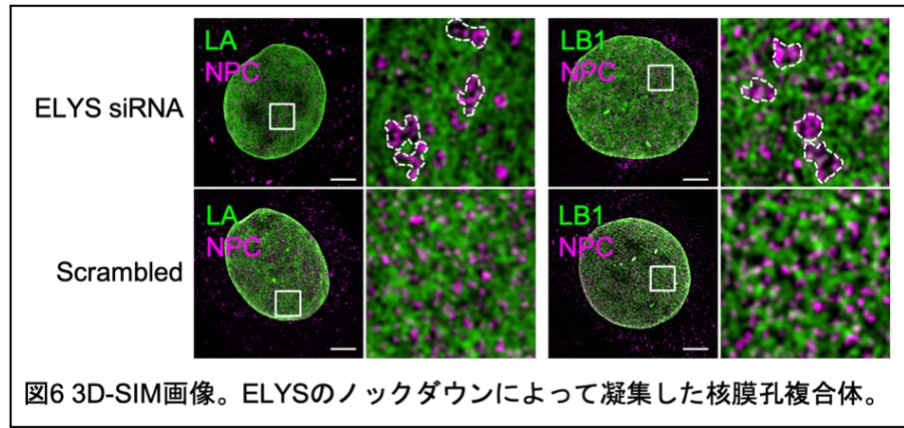


図5 3D-SIM画像。MEFにおけるラミンファイバーと核膜孔複合体の分布。

する局所場として作用することを示唆するのみならず、ラミン遺伝子の変異によって引き起こされる様々な遺伝病を含むラミノパチーの発症機序の解明にも光を当てると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Shimi Takeshi, Kimura Hiroshi | 4. 巻 218 |
| 2. 論文標題 A mosaic of old and young nucleoporins | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 385 ~ 386 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201811170 | 査読の有無 無 |
| 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 Kittisopikul Mark, Vahabikashi Amir, Shimi Takeshi, Goldman Robert D., Jaqaman Khuloud | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Adaptive-Resolution Multi-Orientation Analysis of Complex Filamentous Network Images | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/757005 | 査読の有無 無 |
| 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 Kittisopikul Mark, Shimi Takeshi, Tatli Meltem, Tran Joseph R., Zheng Yixian, Medalia Ohad, Jaqaman Khuloud, Adam Stephen A., Goldman Robert D. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Nuclear Lamins A/C and B1 Provide a Structural Framework That Organizes and Anchors Nuclear Pore Complexes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.04.03.022798 | 査読の有無 無 |
| 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 |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Shimi, Mark Kittisopikul, Stephen A. Adam, Yixian Zheng, Khuloud Jaqaman, Robert D. Goldman |
| 2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡トモグラフィーと超解像度顕微鏡による核ラミン-核膜孔間の相互作用の解明 |
| 3. 学会等名 第42回分子生物学会・年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 ~ 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 M. Kittisopikul, T. Shimi, M. Tatli, S.A. Adam, Y. Zheng, O. Medalia, K. Jaqaman, R.D. Goldman |
| 2. 発表標題 Elys anchors the Nuclear Pore Complex to Nuclear Lamins |
| 3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mark Kittisopikul, Takeshi Shimi, Stephen A Adam, Yixian Zheng, Khuloud Jaqaman, Robert D Goldman |
| 2. 発表標題 Nuclear lamins provide a structural framework that anchors nuclear pore complexes |
| 3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory for the Nuclear Organization & Function meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Shimi, Mark Kittisopikul, Stephen A. Adam, Yixian Zheng, Khuloud Jaqaman, Robert D. Goldman |
| 2. 発表標題 核ラミナによる核膜孔複合体の分布を制御する分子機構 |
| 3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ・第17回核ダイナミクス研究会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------|---------|
|---------|---------|