

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870022

研究課題名（和文） 核膜形成機構の 1 分子解析

研究課題名（英文） Single molecular analysis of the nuclear membrane formation

研究代表者

平野 泰弘 (HIRANO YASUHIRO)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員

研究者番号：10508641

研究成果の概要（和文）：本研究は、分裂期終期に起こる核膜の再形成機構を 1 分子レベルで解析する基盤を作ることを目的とした。この中でも特に、‘コア領域’と呼ばれる染色体上の特異的な構造に着目し、その形成因子である LEM タンパク質の立体構造と BAF の染色体結合部位に関する研究を行った。LEM タンパク質の 1 つである emerin の立体構造を核磁気共鳴法により解析し、LEM ドメインと呼ばれる部分以外は特定の構造を取らないことを明らかにした。また、コア領域形成の主導的な役割を果たす BAF は、染色体上の転写活性の高い部位に結合することが示唆され、コア領域形成に関与する分子の動きが 1 分子レベルで明らかになりつつある。

研究成果の概要（英文）：The unique structure termed ‘core region’ is formed on the center of chromosome at telophase. In this study, I aimed to analyze the core formation mechanism at a single molecular level. To approach this issue, I investigated 1) the 3D-structure of emerin, and 2) a BAF binding site on the chromosomes, those of which were crucial factors to form the core region. By a nuclear magnetic resonance analysis, it was revealed that emerin did not take a solid structure in a solution except the LEM domain, which directly binds to BAF. On the other hand, BAF relatively binds to a transcription-active region at telophase although it binds to a transcription-negative region at interphase. From these evidences, the molecular dynamics of the proteins needed to form the core region are gradually uncovered at a single molecular level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生化学、構造生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：核膜、1 分子解析、LEM タンパク質、BAF、リン酸化、コア領域

1. 研究開始当初の背景

核膜の崩壊と再構成は、オルガネラの動態の中でも特に劇的でダイナミックな現象である。分裂期における核膜形成の初期段階（脂質膜形成）には、(1) 核膜小胞のクロマチンへのターゲティング、(2) クロマチン表面上での核膜小胞の融合、という2つの重要なステップが存在する。脂質膜形成の第1段階である核膜小胞のターゲティングには、核膜内膜に特異的に局在する LEM タンパク質 (emerin、MAN1、LAP など) やラミン B 受容体 (LBR) が関与することが示唆されている (Haraguchi T. *et al.* (2000) *J. Cell Sci.*, 113, 779-794)。しかし、これら核膜内膜タンパク質が安定的にクロマチン表面に結合していく機構は明らかになっていない。

LEMタンパク質は、分裂期終期にBAF依存的に“コア領域”と呼ばれる特徴的な染色体領域に集積する。これに対し、他の核膜内膜タンパク質は、コア領域には集積しない。つまり、コア領域ではLEMタンパク質-BAF-染色体の3者が非常に安定な複合体を形成していると考えられる。

申請者のこれまでの成果から、LEMタンパク質とBAFの結合は、BAF結合領域であるLEMドメインから1次配列上非常に離れた“調節部位”で制御されていることが分かった。これは、調節部位のリン酸化が(1) LEMドメインの立体構造変化を引き起こす、(2) 調節部位自体の立体構造変化を引き起こし、LEMドメインとBAFの結合を抑制する、といった3次構造の変化を引き起こすことを示唆している。

以上の点から、1分子レベルの解析を元にした LEM タンパク質-BAF-染色体複合体形成メカニズムの解析が、核膜の形成機構の全貌解明への重要なステップになると考えるに至った。

2. 研究の目的

LEMタンパク質-BAF-染色体の結合安定化メカニズムを徹底した1分子解析により記述し、核膜の染色体ターゲティング機構解明の基盤とすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究目的達成のため、以下に示す3つのアプローチを取った。

(1) LEM タンパク質の立体構造解析

LEM タンパク質は、リン酸化によりその立

体構造を変化させることで BAF と解離することが示唆された。そこで、リン酸化による LEM タンパク質の立体構造の変化を、核磁気共鳴 (NMR) を用いて明らかにすることで、LEM タンパク質-BAF の結合機構を解明する。

(2) コア領域が形成される染色体部位の同定

形態学的な観察から、コア領域には微小管が結合していることが示されているが、具体的に染色体のどの部分がコア領域となるかは不明である。そこで、コア領域が形成される部位をゲノムワイドに解析し、コア領域の全貌を明らかにする。

(3) LEM タンパク質-BAF-染色体複合体の安定化メカニズムの解明

核膜の再構成には、LEM タンパク質-BAF-染色体が安定に結合することが必要である。LEM タンパク質-BAF、BAF-染色体の結合がどのように安定化されるかを、1分子力計測技術を用いて解明する。

4. 研究成果

(1) LEM タンパク質の立体構造解析

NMR 測定に用いる LEM タンパク質として、リン酸化部位が明らかになっていて、かつ分子量の小さい emerin を用いた。His タグを付加した emerin を小麦胚芽を用いた無細胞タンパク質合成系により発現させ、回収を試みたが、ほとんどが不溶化した (図 1 A)。

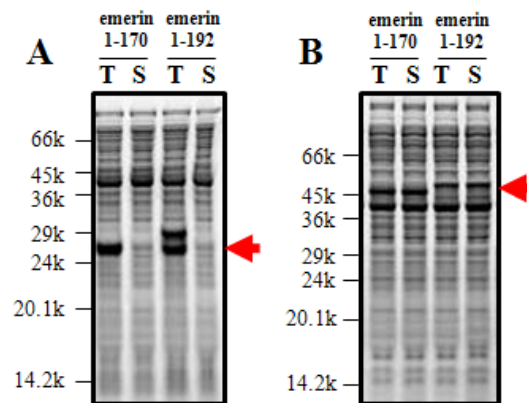


図 1. emerin の精製条件の検討

emerin1-170、emerin1-192 を小麦胚芽を用いた無細胞タンパク質合成系により発現させ、全画分 (T) および可溶性画分 (S) を SDS-PAGE で分離した。図右の赤矢印が発現させた emerin を示す。条件検討前 (A) は、emerin はほとんど可溶性画分に回収されなかったが、タグやリンカー長を変更 (B) することで、大部分を可溶性画分に回収できるようになった。

そこで、タグの種類や位置（N末 His タグ → N末 GST タグ - C 末 His タグへ）、emerin とタグを結ぶリンカー長（12 アミノ酸 → 32 アミノ酸へ）を検討し、この問題を解決した（図 1 B）。

上記条件下で、 ^{15}N 安定同位体標識した emerin を精製し、 ^{15}N - ^1H の HSQC スペクトルを測定した（図 2）。

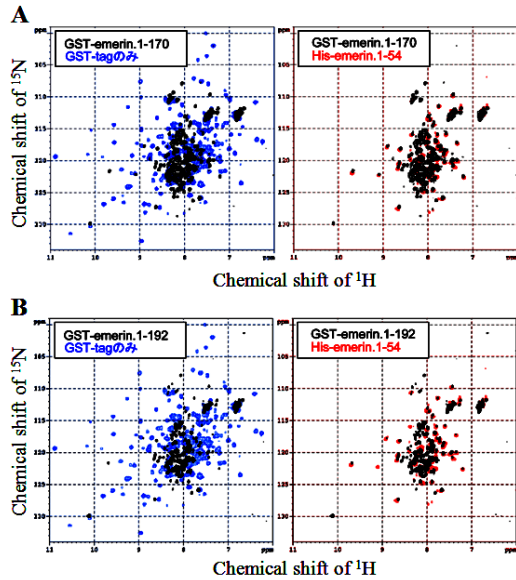


図 2. emerin の HSQC スペクトル
emerin1-170 (A) と emerin1-192 (B) の HSQC スペクトル (黒) を GST のみ (青) もしくは LEM ドメインのみ (赤) のスペクトルと比較した。

BAF との結合を調節するリン酸化部位である 175 番目セリンを含む emerin1-192、含まない emerin1-170、BAF の結合ドメインである LEM ドメイン (emerin1-54) の HSQC スペクトルをそれぞれ比較すると、LEM ドメイン由来のシグナル以外は、 ^1H 軸のシグナルが 8ppm 付近に集積した。これは、特定の立体構造を取らない時のアミド-アミドプロトン結合の化学シフトに相当することから、emerin は水溶液中において、LEM ドメイン以外は特定の構造を取らないと結論することができた。

現在は、精製した emerin を分裂期特異的アフリカツメガエル卵抽出液で処理し、分裂期特異的リン酸化が emerin の立体構造に与える影響を検討している。

(2) コア領域が形成される染色体部位の同定

コア領域形成の主導的な役割は、BAF が担う。そこで、DamID 法を用い、BAF がコア領域形成の際結合する染色体部位を検討する

ことにした。コア領域は分裂期終期のわずかな時間にのみ形成されるため、同調的に培養した均一な細胞集団が必要とされる。そこで、GFP-EcoDam-BAF を恒常的に発現させる細胞株の作製を行った。しかし、EcoDam を付加したことによる細胞毒性のためか、細胞株を樹立することができなかつたため、GFP-BAF を用いたクロマチン免疫沈降法に変更して、以下の実験を進めた。

GFP-BAF を恒常的に発現する HeLa 細胞株を double-thymidine、nocodazol 処理により同調培養し、間期、分裂期中期、分裂期終期（コア領域形成時期）の細胞集団を回収した（図 3）。

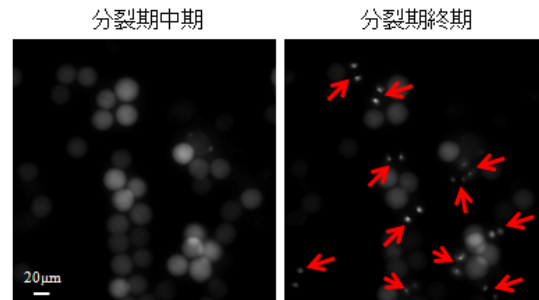


図 3. 同調培養による分裂期終期細胞の濃縮
GFP-BAF を恒常的に発現させた HeLa 細胞を分裂期中期に同調し、蛍光顕微鏡観察下でコア領域が形成される時点まで細胞周期を進行させた。赤矢印がコア領域を形成している時期の細胞。最大 15% まで分裂期終期の細胞を濃縮できた。

この細胞集団を用いてクロマチン免疫沈降を行い、間期において遺伝子転写活性の高い領域 (RPL10-promoter 領域) および低い領域 (β -globin promoter 領域) への BAF の結合量を調べた（図 4）。

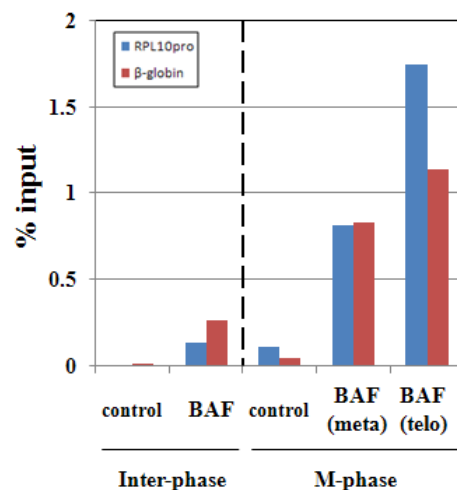


図 4. GFP-BAF を用いたクロマチン免疫沈降
GFP-BAF を発現する HeLa 細胞を、間期 (Inter-phase) もしくは図 3 のように分裂期中期 (meta)、終期 (telo) に同調し、クロマチン免疫沈降を行った。

BAFは、間期では転写活性の高い領域より低い領域に結合しやすかったが、分裂期終期ではそれが逆転し、転写活性の高い領域に結合することが示唆された。

今後は、クロマチン免疫沈降によって得られたサンプルをマイクロアレイによってさらに詳細に解析し、ゲノムワイドなレベルでコア領域形成部位を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Y. Hirano, Y. Iwase, K. Ishii, M. Kumeta, T. Horigome and K. Takeyasu. "Cell cycle-dependent phosphorylation of MAN1." *Biochemistry*, 48, 1636-1643 (2009) 査読有
- ② Y. Hirano, K. Ishii, M. Kumeta, K. Furukawa, K. Takeyasu and T. Horigome. "Proteomic and targeted analytical identification of BXDC1 and EBNA1BP2 as dynamic scaffold proteins in the nucleolus" *Genes Cell*, 14, 155-166 (2009) 査読有
- ③ K. Ishii, Y. Hirano, N. Araki, T. Oda, M. Kumeta, K. Takeyasu, K. Furukawa and T. Horigome. "Nuclear matrix contains novel WD-repeat and disordered-region-rich proteins" *FEBS Lett.*, 582,3515-3519 (2008) 査読有
- ④ Y. Hirano, H. Takahashi, M. Kumeta, K. Hizume, S. Ohtsuka, S. H. Yoshimura and K. Takeyasu "Nuclear architecture and chromatin dynamics revealed by atomic force microscopy in combination with biochemistry and cell biology" *Pflugers Arch.*, 456(1),139-153 (2008) 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Y. Hirano, K. Hizume, Y. Suzuki, H. Takahashi, T. Horigome and K. Takeyasu "Roles of the Tudor Domain of Lamin B Receptor for Chromatin Condensation" Annual meeting of American Society of Cell Biology, San Francisco, USA, December 13-17 (2008)
- ② M. Kumeta, Y. Hirano, K., Hashida, S. Yoshimura, K. Takeyasu "Functional Characterization of Nuclear Alpha-actinin 4" Annual meeting of

American Society of Cell Biology, San Francisco, USA, December 13-17 (2008)

- ③ Y. Hirai, Y. Hirano, M. Kumeta, K. Takeyasu "Structural and Functional Domains of a Nucleolar Protein, NO66" Annual meeting of American Society of Cell Biology, San Francisco, USA, December 13-17 (2008)
- ④ M. Kumeta, Y. Hirano, K. Hashida, S. H. Yoshimura and K. Takeyasu "FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NUCLEAR α -ACTININ 4." Dynamic organization of nuclear function, Cold Spring Harbor, USA, September 17-22 (2008)
- ⑤ M. Kumeta, Y. Hirano, Y. Hirai, K. Hashida, S. H. Yoshimura and K. Takeyasu "Mitotic specific translocation of one of the focal adhesion proteins, α -actinin 4, to the nucleolar organizer regions" EMBO workshop On The Nucleolus and The Disease, Derby, UK, June 23-25 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 泰弘 (HIRANO YASUHIRO)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員
研究者番号：10508641

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし