

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 7 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06617

研究課題名(和文)核ラミナが核膜孔複合体の構築を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms for reassembling the nuclear lamina and NPCs

研究代表者

志見 剛 (Takeshi, Shimi)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、レーザーを照射して細胞の核膜の一部を破壊する顕微鏡技術を用いて、核膜が破損した直後におけるラミンの分子動態を解析した。その結果、すべてのラミンの中で、破損部位にラミンCだけが迅速に集積すること、核膜が破損した直後にラミンCが集積するためには、核移行シグナル(NLS)によってラミンCが核質に豊富に存在すること、Ig-foldドメインを介したBAFとの結合が重要であること、ラミンA/Cが核膜タンパク質をリクルートするBAFが破損部位に集積すること、および破損部位で損傷したDNAを感知するcGASがDNAと結合することに関与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

本研究では、ラミンCが破損した核膜に迅速に集積し、核膜の修復機構に関与することが明らかとなった。さらに、ラミンの変異が原因するラミノパシーにおいて、核膜の修復機構に遅延が生じることが判明した。これらの研究成果は、破損した核膜の修復と核膜の恒常的な維持を行う分子機構の解明につながるという観点から細胞生物学的な意義が高いだけでなく、核膜の破損を伴う早老症、心筋症、筋ジストロフィーに代表されるラミノパシーの分子レベルでの病態解明と新規治療戦略の探索などの応用研究へと展開する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In mammalian cell nuclei, the nuclear lamina (NL) underlies the nuclear envelope to maintain nuclear structure. The major structural components of the NL, the nuclear lamins are involved in the protection against NE rupture induced by mechanical stress. A-type lamins are derived from the single gene LMNA by alternative splicing to produce long and short splicing variants, lamin A (LA) and lamin C (LC), respectively. Numerous LMNA mutations are known to cause human genetic disorders collectively called as laminopathies. We revealed that among all the lamin isoforms, only nucleoplasmic LC rapidly accumulated at the rupture sites. Some of laminopathy mutations in the immunoglobulin-like fold domain of LC disrupted the binding of BAF, leading to the inhibition of the recruitment from the nucleoplasm to the rupture sites. BAF accumulation at the rupture sites and DNA sensing of cytoplasmic cGAS were partially dependent on LA/C.

研究分野：核膜の構造と機能に関する細胞生物学的研究

キーワード：核ラミナ ラミン 核膜孔複合体ヌクレオポリン BAF cGAS

### 1. 研究開始当初の背景

動物細胞では、巨大なゲノム DNA の構造と機能を制御するために、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ることが必要不可欠である。核膜の内側を裏打ちする核ラミナは、核の大きさ、形、硬さを調節し、凝集した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、緩んだユークロマチンと結合する。このように、ゲノム DNA の構造と転写、複製、修復などの機能を局所的に制御するために、ラミナと核膜孔複合体が各々の独自の構造と機能を持つ。

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る。近年、我々は、直径約 3.5 ナノメートルのラミンフィラメントが重なり合って厚み約 14 ナノメートルのラミナを形成し、これらのラミンフィラメントが不均一に分布することによってラミナが網目構造を取ることを明らかにした。一方、核膜孔複合体は直径約 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。核膜孔複合体がラミナの網目構造のファイバーの隙間に 1 つずつ挿入されている。

最近になって、我々は、ラミンフィラメントと核膜孔複合体が接触して、相互の構造、分布ならびに数を制御することを見出した。これらの結果から、各々が独自の構造と機能を持つ一方で、核膜上で相互に作用しながら連携して機能すると考えられる。癌細胞が浸潤の過程で組織内を遊走する時、近接する細胞から物理的に圧縮され、核膜の一部が破損すると同時に、核膜の破損部位のゲノム DNA は損傷を受ける。その際、BAF (Barrier-to-autointegration factor) と ESCRT-III 複合体 (endosomal sorting complex required for transport-III) が核膜の成分を運び込んで、核膜の破損部位を修復する。これらの知見から、核膜の形成・修復機構は細胞機能の維持に極めて重要だが、核膜の破損部位でラミナと核膜孔複合体を再構築する分子メカニズムは不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

ラミナと核膜孔複合体が相互作用する分子メカニズムと、破損した核膜の修復においてラミナと核膜孔複合体を再構築する分子メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

クライオ電子顕微鏡トモグラフィー (cryo-ET) とコンピュータービジョンと組み合わせた超解像顕微鏡 (3D-SIM) を使って、ラミンのノックアウト細胞やヌクレオポリンのノックダウン細胞の核膜におけるラミナと核膜孔複合体の構造、分布ならびに数を解析した。

また、405 nm のレーザー照射またはマイクロキャピラリーの先端を用いて核膜の一部を破壊する前後で共焦点顕微鏡によって生細胞観察を行い、ラミンのノックアウト細胞の核膜の破損部位に集積するラミンの分子動態を解析した。

### 4. 研究成果

cryo-ET を用いて、ラミン A と B1 のフィラメントが核膜複合体の核質側アウターリングと相互作用することが判明した。また、コンピュータービジョン解析と組み合わせた 3D-SIM を使って、Elys をノックダウンすると拡大するラミンファイバーの隙間で核膜孔複合体が凝集することを見出した。この研究成果は、2 報の研究論文において報告された (Kittisopikul et al., *Bioinformatics*, 2020, DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa627; Kittisopikul and Shimi et al., *J. Cell. Biol.* 2021, DOI: 10.1083/jcb.202007082)。

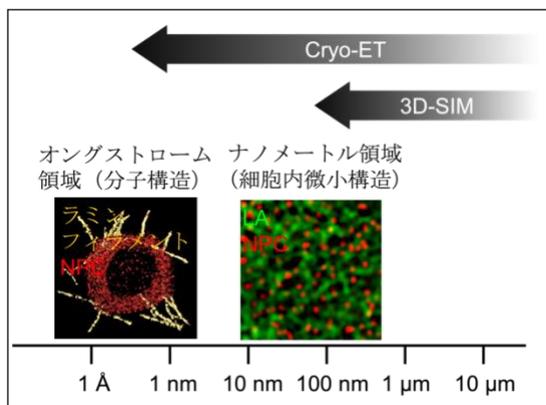
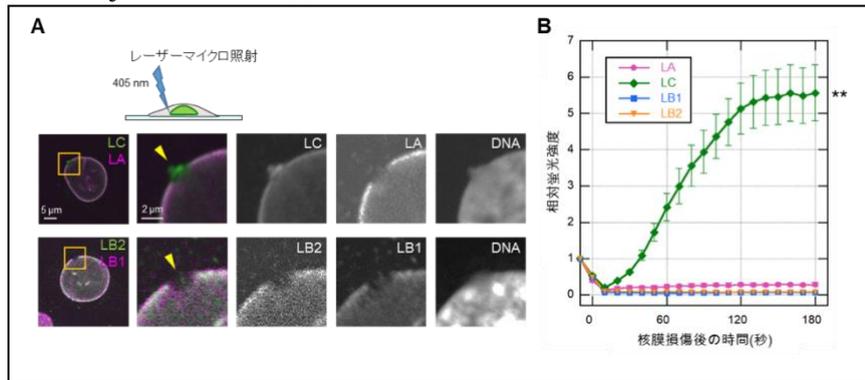


図 1 cryo-ET とコンピュータービジョンと組み合わせた 3D-SIM を用いて、ラミナと核膜孔複合体の相互作用を解析した。

次に、共焦点顕微鏡を用いた固定して免疫染色した細胞と生細胞観察によって、すべてのラミンの中で、破損部位にラミン C だけが迅速に集積すること、核膜が破損した直後にラミン C が集積するためには、核移行シグナル (NLS) によってラミン C が核

質に豊富に存在すること、Ig-fold ドメインを介した BAF との結合が重要であること、ラミン A/C が核膜タンパク質をリクルートする BAF が破壊部位に集積すること、および破損部位で損傷した DNA を感知する cGAS が DNA と結合することに関与していることを見出した。この研究成果は、1 報の研究論文において報告された (Kono et al., *J. Cell. Biol.* 2022, DOI: 10.1083/jcb.202201024)。

図2 405 nm レーザー照射によって細胞の核膜の一部を破壊して、  
 (A) 10 分後に各ラミン特異的抗体で免疫染色を行なった。(B) 緑色蛍光タンパク質によって標識した各ラミンの破壊部位への集積を生き細胞で経時的に観察した。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kittisopikul Mark, Vahabikashi Amir, Shimi Takeshi, Goldman Robert D, Jaqaman Khuloud	4. 巻 36
2. 論文標題 Adaptive multiorientation resolution analysis of complex filamentous network images	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 5093 ~ 5103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bioinformatics/btaa627	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 Kittisopikul Mark, Shimi Takeshi, Tatli Meltem, Tran Joseph Riley, Zheng Yixian, Medalia Ohad, Jaqaman Khuloud, Adam Stephen A., Goldman Robert D.	4. 巻 220
2. 論文標題 Computational analyses reveal spatial relationships between nuclear pore complexes and specific lamins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202007082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202007082	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 Kono Yohei, Adam Stephen A., Sato Yuko, Reddy Karen L., Zheng Yixian, Medalia Ohad, Goldman Robert D., Kimura Hiroshi, Shimi Takeshi	4. 巻 221
2. 論文標題 Nucleoplasmic lamin C rapidly accumulates at sites of nuclear envelope rupture with BAF and cGAS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202201024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202201024	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 志見剛, 河野洋平, Pack CG, Adam SA, Zheng Y, Medalia O, Goldman RD, 木村宏
2. 発表標題 A型ラミンが損傷した核ラミナを修復する分子メカニズム
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 ~ 2022年

1. 発表者名 Shimi T, Kono Y, Pack CG, Adam SA, Zheng Y, Goldman RD, Kimura H
2. 発表標題 Laminopathy-associated defects in repairing the nuclear lamina after nuclear rupture
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 志見剛, 河野洋平, Pack CG, Adam SA, Zheng Y, Medalia O, Goldman RD, 木村宏
2. 発表標題 The differential dynamics of nuclear lamin A and C in repair of nuclear envelope ruptures
3. 学会等名 第 95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 志見剛, 河野洋平, Pack CG, Adam SA, Zheng Y, Medalia O, Goldman RD, 木村宏
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying defective repair of nuclear envelope ruptures in laminopathies
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Shimi T, Kono Y, Adam SA, Sato Y, Reddy KL, Zheng Y, Medalia O, Goldman RD, Kimura H
2. 発表標題 The role of A-type lamins in repair of nuclear envelope ruptures
3. 学会等名 6th NanoLSI Symposium: Nanoprobe Technology for Understanding Molecular Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【プレスリリース】 動物細胞の核膜における核膜孔複合体とラミンの結合の定量解析に成功 <a href="https://www.titech.ac.jp/news/2021/048787">https://www.titech.ac.jp/news/2021/048787</a> 細胞内で破壊された核膜の修復機構におけるラミン分子の役割を解明 <a href="https://www.titech.ac.jp/news/2022/065121">https://www.titech.ac.jp/news/2022/065121</a></p> <p>【研究者情報】 Google Scholar:<a href="https://scholar.google.com/citations?user=aVpG1K8AAAAJ&amp;hl=en&amp;oi=ao">https://scholar.google.com/citations?user=aVpG1K8AAAAJ&amp;hl=en&amp;oi=ao</a> 日本の研究:<a href="https://research-er.jp/researchers/view/835515">https://research-er.jp/researchers/view/835515</a></p> <p>【プロモーションビデオ】 YouTube:<a href="https://www.youtube.com/watch?v=7A9G8WMup3U&amp;ab_channel=wrhioffice">https://www.youtube.com/watch?v=7A9G8WMup3U&amp;ab_channel=wrhioffice</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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Northwestern University	Feinberg School of Medicine	Dept. of Cell and Developmental Biology	
米国	Carnegie Institution for Science	Dept. of Embryology		
米国	Johns Hopkins University	Dept. of Biological Chemistry		
スイス	University of Zurich	Dept. of Biochemistry		