

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591263

研究課題名(和文)核内膜タンパク質群による核ラミナ制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of nuclear lamina by the inner nuclear membrane proteins

研究代表者

三尾 和弘(MIO, KAZUHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：40470041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核の内面にはV型中間径フィラメントのラミンからなる核ラミナが存在し、核内膜特異的に発現する膜タンパク質群と相互作用しながら核の形態維持、遺伝子発現制御、クロマチン局在制御を行っている。本研究ではラミンAタンパク質の発現精製系を構築し、ラミン分子解析から重合制御に至る過程を電子顕微鏡解析や分析超遠心などの手法を用いて物理化学的見地から解析を行った。その結果これまで動きが少なかったと思われていたラミンが大きく分子運動をしていることや、実際の疾病変異体がラミン重合過程に障害が見られることなどを明らかにした。ラミンの変異によって発症するラミノパチー(ラミノパチー)理解につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Nuclear lamin is a type V intermediate filament protein, and in association with the inner nuclear membrane proteins, maintains nuclear structure, regulates gene expression, and controls chromatin localization. In this research, we established the expression and purification systems of Lamin A protein, and analyzed its physiological function by several biophysical techniques such as electron microscopy and analytical ultracentrifugation. Research was conducted from the level of single molecule of lamin A to its polymerization process into the high ordered structure. In contrast to the previous concept of lamin A as a static molecule, we showed that the lamin moves frequently inside the molecule. In addition, we found several abnormality in its polymerization process of mutant lamins related to the onset of laminopathies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：核膜 ラミノパチー 電子顕微鏡 タンパク質構造解析 中間径フィラメント

1. 研究開始当初の背景

高等生物の核内面は中間径フィラメント、ラミンのメッシュ様構造で裏打ちされており、核構造の保持やクロマチン繋ぎ留めに伴う遺伝子発現制御が行われている。この構造体は核内面での骨格として核の形態維持に機能する一方、細胞分裂に伴い核膜崩壊/再構築を起こすダイナミックなシステムである。近年の研究からはLamin Aやそれを制御するタンパク質の遺伝子変異によりEDMD (Emery-Dreifuss muscular dystrophy)等の筋疾患、MAD (mandibuloacral dysplasia)等の骨形成不全、HGPS (Hutchinson-Gilford progeria syndrome)等の老年症を引き起こすことが明らかになっている。それらは総称してラミン病 (laminopathy) と呼ばれる。核膜構造の変化は細胞の癌化、個体の老化でも現象として認めうる。分子レベルでの詳細には未だ不明な点が多いが、様々な細胞活動を担う根源として今後ますます機能メカニズム解明が期待されている。

ラミン A は球状の Ig-fold domain と rod 状の coiled-coil 構造を併せ持つ、分子量約 74kDa のタンパクであり、2 量体構造が重合・高分子化して線維状構造を作る。分子重合に関しては、ラミン分子が head-to-tail にタンデムに結合する様式と、隣の分子の rod 領域が side-by-side で結合する様式の 2 つの結合が組み合わさって巨大分子を形成する。様々な核内タンパク質がラミン結合領域を持っており、特に核内膜タンパク質の介在によりクロマチンの核膜へのアンカーに働く。しかし、どのようにして重合ラミンが認識され、核内膜ラミナが形成されるのか、またラミンや制御タンパクの変異がどうして上記のような重篤な疾患を引き起こすのかについてはほとんど解明されていない。

また核ラミナはラミンタンパク質と、それを核内膜に繋ぎ止める核膜タンパク質群 (ラミン受容体、Emerin、MAN など) が

ら構築されており、それらの遺伝子変異によって、様々なラミノパチー、核膜病が発症する。プロテオーム解析から核内膜には 67 種類もの核膜特異的に発現する膜タンパク質の存在が推定されているが (Schirmer, *Science* **301**, 1380-2, 2003)、核ラミナ構築や疾病発症への関与についてはほとんど判っていない。これら疾病の発症原因を理解し、治療法開発に向けた指針を示すことを目的に構造学的視点からの解析を行った。

2. 研究の目的

200 以上ものラミン A の遺伝子変異が報告され、臨床的にも 16 もの疾病群に分類されている。しかしそれらラミン A の変異がどのような機構で発症と結びついているかに関してはほとんど明らかになっていない。発症機構の理解には分子レベルの解析が不可欠である。そこで本研究ではラミン A の精製タンパク質を調整し、電子顕微鏡を用いた構造学的見地から解析を行い、核ラミナ形成とその制御メカニズム解明を目指す。核近傍におけるクロマチン制御機構の解明と、核膜病発症と治療に関する構造学的基盤の構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラミンタンパク質および制御核膜タンパク質の発現・精製方法の検討: ラミンタンパク質や多くの核内タンパク質はきわめて疎水性が高く、通常の可溶性タンパク質の精製方法を用いることはできない。安定的な発現系と精製方法の確立を目指す。

(2) 電子顕微鏡解析および物理化学的手法による疾病関連ラミン変異の解析:

ラミンは細胞周期や細胞機能に応じて一分子状態から超分子体であるパラクリスタル状態まで多様な形態を取りうる。それぞれの状態での機能を解析するための電子顕微鏡観察技術を検討する。精製したラミン A タン

パク質を用いて線維形成を行わせ、その重合化に対する核内膜タンパク質の作用を検討する。ラミノパチー患者に見られる変異タンパク質を用いることで、疾病発症との関連を明らかにする。

タンパク質の構造解析には様々な手法が用いられるが、本タンパク質のように自己重合により超分子複合体を形成するものには電子顕微鏡が適しており、電子顕微鏡解析を主軸に解析を行う。

4. 研究成果

(1) A型ラミンは分子の疎水性が高く、通常の精製方法では沈殿してしまい回収できない。高濃度尿素存在下で変性状態で精製し、バッファー置換による高次構造の巻き戻しとタグの酵素切断のタイミングを調節することで野生型および各種疾病変異型の大量精製が可能となった。また核ラミナを制御する候補核内膜蛋白質である emerin, SUN1, SUN2, Lap2 タンパクが精製可能となった。

(2) 一分子状態のラミンの形態観察のために低角ロータリーシャドウ法とAFMによる観察を行った。低角ロータリーシャドウ法はミオシンなどの線維状タンパク質の解析に良く用いられる方法であるが、ラミンはその半分程度の長さしかないため検出に苦労したが、蒸着角度と蒸着量を検討することにより可視化が可能になった。Ig-fold 領域と rod 領域は明瞭に区別され、また rod 内での屈曲を観察することができた。さらに制御タンパク質との混合物を作成しロータリーシャドウ法で観察したところ、Ig-fold 領域で結合していることが示された。現在その詳細な結合状態の解析を進めている。

(3) 細胞内で起こっている現象を模するために、ラミンの重合・解離を試験管内で再現させるための条件検討を行った。ラミン分子

はバッファー中での溶解度が低いため、溶液の塩濃度を低下させることにより side-by-side の重合が加速されパラクリスタル構造が作られる。種々の条件検討を通じて定量的評価が可能になった。ラミンの重合条件を詰めることができたため、ラミン病発症に関連する変異ラミンとの比較を行った。疾病ラミンには重合過程に障害が見られるものがいくつか見つかった。その中には重合が抑えられるものだけではなく、野生型よりも重合が促進される変異体も見つかっている。細胞機能との関連と併せた解析を行った。

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 11 件)

(1) Moriya T, Mio K, Sato C. Novel convergence-oriented approach for evaluation and optimization of workflow in single-particle two-dimensional averaging of electron microscope images. *J Electron Microscop*, 62, 491-513, 2013. (査読有り)

DOI: 10.1093/jmicro/dft026

(2) Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani R, Goto E, Noguchi T, Mio K, Kamei K, Ma A, Iwai K, Nureki O. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. *EMBO J*, 31, 3856-3870, 2012 (査読有り)

DOI: 10.1038/emboj.2012.241.

(3) Sakai H, Furihata M, Matsuda C, Takahashi M, Miyazaki H, Konakahara T, Imamura T, Okada T. Augmented autocrine bone morphogenic protein (BMP) 7 signaling increases the metastatic potential of mouse breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 29(4):327-338, 2012 (査読

有り)

DOI: 10.1007/s10585-012-9453-9.

(4) Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi Y. The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). PLoS Curr. 2012 Nov 5;4:e5035add8caff4. (査読有り)

DOI: 10.1371/5035add8caff4

(5) Miyashita H, Maruyama Y, Isshiki H, Osawa S, Ogura T, Mio K, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T. Three-dimensional structure of the signal peptide peptidase. J Biol Chem. 286:26188-26197, 2011 (査読有り)

DOI: 10.1074/jbc.M111.260273.

[学会発表](計 19件)

(1) Mio K, 他, Conformational dynamics of nuclear lamin A and laminopathic mutated proteins revealed by electron microscopy and high speed atomic force microscopy, 2013 Scientific Workshop Progeria Research Foundation, 2013/04/24, Bethesda, MD, USA

(2) Mio K, 他, Three dimensional reconstruction of HLA-G2/G6 isoform, International Conference on Structural Genomics 2013, 2013/07/30, Keio Plaza Hotel, Sapporo, Japan

(3) Mio K, 他, Conformational dynamics of nuclear lamin A and laminopathic mutated proteins revealed by electron microscopy and high speed atomic force microscope, 第36回日本分子生物学会, 2013/12/04, 神戸

(4) Matsuda C, 他, Sarcolemmal repair and reorganization of microtubule, 17th International Congress of the World Muscle Society, 2013/10/02, Perth, Australia

(5) Matsuda C, 他, Affixin is involved in sarcolemmal repair, 16th International Congress of the World Muscle Society, 2012/10/10, Almancil, Portugal

[図書](計 1件)

三尾和弘, 他, 羊土社, 実験医学, 32(4), 2014年, 9ページ

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三尾 和弘 (MIO KAZUHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号: 40470041

(2)研究分担者

松田 知栄 (MATSUDA CHIE)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50344099

(3)連携研究者

林 由起子 (HAYASHI YUKIKO)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号: 50238135