

# 研 究 成 果 報 告 書

---

## 核膜形成・崩壊機構

—細胞周期に伴う核膜内膜蛋白質とクロマチンの結合の調節—

---

16570154

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 堀米 恒好  
新潟大学自然科学系教授

## はしがき

「核膜形成・崩壊機構—細胞周期に伴う核膜内膜蛋白質とクロマチンの結合の調節—」は科学研究費補助金（基盤研究（C））を受けた研究計画に基づいて、平成16年度から平成17年度までの2年間実施された。本研究は、堀米恒好が研究代表者となり主に新潟大学理学部において大学院生の協力のもとに進められた。また他大学や医院の共同研究者の協力を得ることによって研究を推進することができた。ここにこれらの協力者に深く感謝する。

本研究は、核膜形成・崩壊機構を解明するため、主にアフリカツメガエル卵の抽出液の無細胞系での核膜形成・崩壊反応を用いて行われた。

2年間にわたる研究によって得られた研究成果のほとんどは学会等で口頭発表され、一部は学会誌に印刷発表されたが、一部はまだ印刷発表されていない。本研究は当研究室での研究活動の中心であるが、本書は本課題の内容を中心にしつつ、これまでの当研究室の流れに沿った成果もつけ加えた。最初に研究成果の概要を述べ、次に得られた研究成果を発表した原著論文、総説、著書を上げるという形で編集した。

2年間にわたり科学研究補助金を与えられたことに対して深く感謝の意を表すものである。

## 研究組織

研究代表者： 堀米 恒好

研究協力者： 古川和広（新潟大学理学部助教授）

萩原正敏（東京医科歯科大学教授）

竹安邦夫（京都大学教授）

山河芳夫（国立感染症研究所室長）

宮地清光（慶宮医院院長）

## 研究経費

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,500,000	0	2,500,000
平成17年度	900,000	0	900,000
総計	3,400,000	0	3,400,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in *Xenopus* egg extracts. Makoto Takano, Yuhei Koyama, Hiromi Ito, Satomi Hoshino, Hiroshi Onogi, Masatoshi Hagiwara, Kazuhiro Furukawa and Tsuneyoshi Horigome (2004) *J. Biol. Chem.* **279** (13), 13265-13271
2. Autoantibodies from primary biliary cirrhosis patients with anti-p95c antibodies bind to recombinant p97/VCP and inhibit *in vitro* nuclear envelope assembly. K. Miyachi, Y. Hirano, T. Horigome, T. Mimori, H. Miyakawa, Y. Onodera, M. Shibata, M. Hirakata, A. Suwa, H. Hosaka, S. Matsushima, T. Komatsu, H. Matsushima, R. W. Hankins and M. J. Fritzler (2004) *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 568-573
3. Autoantigens of the nuclear pore complex. Paul Enarson, J. B. Rattner, Young Ou, Kiyomitsu Miyachi, Tsuneyoshi Horigome and Marvin Fritzler (2004) *J. Mol. Med.* **82**, 423-433
4. Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of emerin in a *Xenopus* egg cell-free system. Yasuhiro Hirano, Masashi Segawa, Fumiko S. Ouchi, Yoshio Yamakawa, Kazuhiro Furukawa, Kunio Takeyasu and Tsuneyoshi Horigome (2005) *J. Biol. Chem.* **280** (48), 39925-39933
5. Anti-p97/VCP antibodies: an autoantibody marker for a subset of primary biliary cirrhosis patients with milder disease? Kiyomitsu Miyachi, Hiroo Hosaka, Noriko Nakamura, Hiroshi Miyakawa, Tsuneyo Mimori, Minoru Shibata, Shouzoh Matsushima, Hiroaki Chinoh, Tsuneyoshi Horigome, Raleigh W. Hankins, Meifeng Zhang, Marvin J. Fritzler (2006) *Scand. J. Immun.* **63**, 376-382

### (2) 口頭発表

1. Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated by mitotic phosphorylation of emerin.

○Yasuhiro Hirano, Masashi Segawa, Satomi Honma, Fumiko S Ouchi, Yoshio Yamakawa, Kunio Takeyasu, Kazuhiro Furukawa, and Tsuneyoshi Horigome

日本生化学会大会 2004年10月(横浜) ポスターおよび口頭発表

2. Application of mass spectrometry-based phosphopeptide analysis used a titania column to biological samples.

○Satomi Honma, Minami Matsuzaki, Kazuhiro Furukawa, and Tsuneyoshi Horigome 日本生化学会大会 2004年10月(横浜) ポスターおよび口頭発表

3. Participation of PPI to the targeting of nuclear membrane vesicles to chromatin.

○Yuhei Koyama, Hiromi Ito and Tsuneyoshi Horigome 分子生物学会大会 2004年12月(神戸) ポスター発表

### (3) 出版物

1. 再構成核による核膜の再構成機構の解析 (2004) 堀米恒好、古川和広 細胞核のダイナミクス 竹安邦夫・米田悦啓編 pp87-94 シュプリンガー・フェアラーク東京

## 研究成果の概要

核膜は核質と細胞質を隔てる隔壁であるばかりでなく核構造の基盤となる重要な構造体でありまた高等生物においては細胞周期ごとに形成と崩壊を繰り返すダイナミックな構造体である。しかし核膜の形成と崩壊がどのように調節されているかはほとんどわかっていない。そこで本研究では、核膜の形成と崩壊の機構の中でも重要な部分である、核膜内膜蛋白質とクロマチンの結合調節機構に焦点を絞って研究を行うことにした。具体的には、核膜とクロマチンの結合を担う主要な核膜内膜蛋白質であるラミンB受容体とエメリンについて、これらに作用するキナーゼとホスファターゼを明らかにする。次にこれらの酵素によるリン酸化部位と脱リン酸化部位を明らかにすると同時に結合調節を担っている酵素及びリン酸化部位を同定することを主な目標として研究を行い次のような結果を得た。

1. まず核膜内膜蛋白質ラミンB受容体 (LBR) と細胞周期依存的なアフリカツメガエル卵抽出液を用いて、LBRとクロマチンの結合調節機構を調べた。その結果、
  - (1) 分裂期抽出液中の cdc2 キナーゼと未知キナーゼによるLBRのリン酸化によって、LBRとクロマチンの結合が阻害されることが明らかとなった。
  - (2) また合成期抽出液中のSRキナーゼによってLBRとクロマチンの結合が促進されることが示された。
2. 細胞周期依存的なアフリカツメガエル卵抽出液を膜成分とサイトソル成分に分け、膜成分のクロマチンへのターゲティングの調節機構を調べた。その結果、
  - (1) 分裂期抽出液から調製した膜成分はクロマチンに結合しなかったが、合成期のサイトソルで処理するとクロマチンに結合するようになった。
  - (2) この時合成期サイトソル中で働いている成分を酵素阻害剤等で調べたところ、蛋白質脱リン酸化酵素1 (PP1) であることが示唆された。
  - (3) そこでアフリカツメガエルのPP1に対する抗体を調製し、これを用いて確かに合成期サイトソル中のPP1が分裂期の膜に働いて膜がクロマチンにターゲットするようになることを確認した。
  - (4) この膜とクロマチンの結合系にLBRとエメリンの断片を加えたところ、LBRの断片はこの結合を阻害したが、エメリンの断片は同じ濃度でも阻害しなかったことから、膜とクロマチンの結合は主にLBRによっていると考えられた。

3. 次に核膜内膜蛋白質でクロマチンと結合することが知られているエメリンについて、やはりアフリカツメガエルの卵抽出液の系を用いてクロマチン結合の調節機構を調べた。その結果、
- (1) エメリンは分裂期サイトソル中のキナーゼによってリン酸化され、クロマチンと解離することが示された。
  - (2) エメリンはクロマチン上のBAF蛋白質と結合しており、この結合がリン酸化で調節されているということが示された。
  - (3) LC-MS/MS型質量分析装置と新しく開発したリン酸化ペプチド濃縮カラムを用いた解析で、エメリンは分裂期サイトソルで、49, 66, 120および175番目のセリンと67番目のスレオニン残基がリン酸化されることが明らかとなった。
  - (4) エメリンの点突然変異体を用いた解析で、175番目のセリンのリン酸化がエメリンとBAFとの結合を調節していることが示唆された。このセリンはこれまで言われていたBAFとの結合部位以外に存在した。
  - (5) エメリンとBAFの解離に働く分裂期サイトソル中のキナーゼは、cdc2キナーゼと未知のキナーゼであることが推測された。
  - (6) LAP-2 $\beta$ の核質側にでている部分をGST融合蛋白質として大腸菌で発現して、エメリンの場合と同様な解析を試みたが、LAP-2 $\beta$ は短い断片を多く含む試料しか得られず、はっきりした結果を得ることができなかった。
4. その他。一部の原発性胆汁性肝硬変患者血清に含まれる97k抗原蛋白質が、核膜形成に関与しているp97蛋白質であると同定した。また、これらの抗体を含む血清は核形成を抑制することが示された。

これらの結果より、細胞周期のM期における核膜とクロマチンの解離には、cdc2キナーゼと他の未知のキナーゼによるLBRのリン酸化が働いていることが示唆された。また、M期からS期に移行するところでは、PP1による膜蛋白質の脱リン酸化、特にLBRの脱リン酸化が重要であることが示唆された。今回の研究で核膜形成・崩壊に働くリン酸化・脱リン酸化機構の大枠を明らかにすることができた。今後さらにLAP2 $\beta$ についても調べ、また、LBRとエメリンのクロマチンからの解離に寄与するもう一種類のキナーゼを同定しこの調節機構の全容を明らかにしたい。