

＜研究課題＞ 核膜修復メカニズムから迫る老化リプログラミング法の開発

代表研究者 広島大学大学院医系科学研究科 助教 上川 泰直

【まとめ】

本研究では、核膜の損傷を誘導する核膜ストレスと、その修復の分子機構の解明を通じて、将来的に老化をリプログラミングする方法の開発に繋がる発見を目指した。その結果、小胞体膜貫通型転写因子 OASIS が、核膜損傷部位において核膜修復に関与する因子と共局在することを見出した。また、骨格筋の分化・細胞老化の過程で、核膜修復因子の発現・局在・翻訳後修飾の変動が観察され、細胞の運命決定に関与する可能性が示唆された。

1. 研究の目的

核膜はゲノム DNA を細胞質から保護・隔離すると同時に、DNA 複製や RNA 転写といったゲノム機能制御に重要な役割を果たす。近年、様々なストレスにより核膜が損傷を受け、細胞老化や細胞死などを引き起こすことが報告されている。核膜損傷は数分以内に修復されることが知られているが、詳細な分子メカニズムに関しては不明な点が多い。我々は、小胞体膜タンパク質・OASIS が核膜損傷部位へ集積することを見出しており、OASIS やその他の因子による核膜修復メカニズムを分子レベルで明らかにすることで、将来的に老化のリプログラミング法開発に繋がる発見を目指した。

2. 研究方法と経過

2-1 核膜損傷部位における小胞体膜タンパク質の局在とその機能解析

核膜ストレス誘導系として核膜の強度維持を担う Lamin B1 のノックダウン細胞や多孔膜上に細胞を播き狭い隙間を通過させる Boyden Chamber Assay、垂直方向に細胞を圧縮する Compression Assay を用いて OASIS の局在を解析した。その結果、全ての系で OASIS は Lamin のシグナルの消失した核膜損傷部位に集積する局在パターンを示した。一方で、OASIS と同じく CREB/ATF6 ファミリーに属する Luman や AIBZIP は核膜損傷部位への集積を示さなかった。OASIS は小胞体ストレスに応答し膜内切断を受け、転写因子として機能することが知られている。そのため、N 末端と C 末端に FLAG-tag と HA-tag をそれ

ぞれ付与した融合タンパク質を用いて免疫染色を行った結果、核膜損傷部位に集積する OASIS が全長型であることが明らかとなった。さらに、OASIS が核膜損傷部位において、核膜修復を担う LEM タンパク質や ESCRT III 複合体と一部共局在することを見出した。

CRISPR/Cas9 を用い、内在性の OASIS に蛍光タンパク質をノックインした細胞を作成した。しかし、内在性の OASIS の発現量が極端に低く、アクセス可能な顕微鏡では live imaging が不可能であった。そこで、random integration により蛍光タンパク質を付与した OASIS の安定発現細胞株を作成し、live imaging を行った。その結果、OASIS が核膜損傷部位に数時間にわたり集積した状態が維持される様子が観察された。

また、核膜損傷部位で OASIS と共局在し、核膜の修復に重要な役割を果たす新規因子を同定するため、OASIS の近傍に局在する因子をビオチン標識し質量分析を行った。その結果複数の候補因子を見出しており、現在それらの局在と機能解析を進めている。

2-2 骨格筋分化及び細胞老化における OASIS の機能解析

In vitro で筋管へと分化誘導可能な筋芽細胞由来 C2C12 細胞から、CRISPR/Cas9 を用いて OASIS のノックアウト細胞の樹立を試みた。オフターゲットを低減した改良型 Cas9(eSpCas91.1) と OASIS の exon1 を標的とする sgRNA の発現ベクターを C2C12 細胞に導入し、一過的なセレクトシンの後、単一細胞由来のコロニーをピックアップし PCR 及びウエスタンブロットによるスクリーニングによりノックアウトクローンを取得した。得られた OASIS ノックアウト細胞を用いて、筋管への分化能、細胞周期、核の形態について解析した。OASIS ノックアウト細胞で筋管への分化能に大きな変化は見られなかった。一方で、OASIS ノックアウト細胞を PI 染色後フローサイトメーターにより解析したところ、野生型 C2C12 細胞と比較して G2/M 期の細胞の割合が増大していた。加えて、G2/M 期からさらに DNA content が倍加した細胞の出現が確認

された。また、頻度は低いものの、核が肥大化し異常な形態を示す細胞も観察された。Cdk1阻害薬であるRO-3306によりG2期に同調し、リリースと同時に、live cell imagingを行ったところ、OASIS ノックアウト細胞では有糸分裂において染色体が凝縮した後、分配を経ず脱凝縮する様子が高頻度に観察された。また、そのような細胞では核の形態異常が生じやすい傾向が見られた。CRISPRを用いたノックアウトではオフターゲットによる影響が考えられるためOASISを再導入したレスキュー細胞を作成し、現在その表現型の解析を進めている。

2-3 骨格筋分化及び細胞老化に伴う核膜構成因子の局在及び翻訳後修飾の解析

骨格筋分化に伴う核膜関連因子の発現変動をウェスタンブロットにより解析した。その結果、核膜の修復を担うDNA結合因子・BAFの分子量が分化に伴い大きく変化する様子が観察された。さらに、骨格筋分化におけるBAFの局在を明らかにするため、蛍光タンパク質を付与したBAFを安定発現するC2C12細胞を作成した。この細胞を筋管へと分化誘導したところ、BAFの局在が分化に伴い変化することを示唆する結果を得た。

また、DNA損傷による細胞老化を誘導し、核膜修復因子の発現変動を観察した。この条件において、核移行シグナルを付与した蛍光タンパク質が細胞質へ漏出する細胞の割合が上昇し、核膜が損傷を受けていることが確認された。ウェスタンブロットによる解析から、核膜修復を担うLEMドメインタンパク質のうち、emerinの発現がC2C12細胞の細胞老化に伴い減少することを見出した。さらに、emerinの強制発現により細胞周期の停止が抑制される可能性を示唆する結果が得られた。

3. 研究の成果

3-1 OASISによる核膜損傷応答の解明

OASISが様々な核膜ストレスにより誘導される核膜の損傷に応答し、損傷部位に集積する因子であることを明らかにすると同時に、既知の核膜修復因子と共局在することを明らかにした。

3-2 筋芽細胞におけるOASISの機能

筋芽細胞の細胞周期制御にOASISが関与する可能性を見出した。OASISの欠損によりゲノムサイズが倍加することとlive imagingの結果から、細胞老化誘導メカニズムとして知られる細胞分裂スキップの抑制に機能すること

が示唆される。

3-3 骨格筋分化に伴うBAFの局在変化

核膜の修復を担うBAFが骨格筋の分化前後で大きく局在変化することを見出した。骨格筋では核膜への物理的負荷が亢進しており、BAFの翻訳後修飾や局在を変化させることで核膜の強度維持や迅速な核膜修復が可能になるのではないかと考えられる。

3-4 筋芽細胞の細胞老化におけるemerinの発現変動

emerinは遺伝性の筋ジストロフィーであるエメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(EDMD)の原因遺伝子である。EDMDの病態発症に関しては、筋分化の異常と筋再生能の低下の関与が報告されている。本研究では、emerinによる細胞老化抑制の欠損がEDMDの病態発症に関与する可能性が示唆された。

4. 今後の課題

本研究の結果から、OASISやその他の核膜修復因子が骨格筋の細胞周期の進行や細胞老化の制御に密接に関与することが強く示唆される。また、細胞老化が誘導される条件では核膜の損傷が観察されることから、核膜損傷が細胞老化のトリガーとなっている可能性も考えられる。一方で、これらの因子が個体老化にどのような影響を与えるのか、あるいは核膜の修復を促進することで細胞老化を抑制出来るかは不明であり、さらなる解析が望まれる。また、核膜の損傷と修復過程におけるこれらの因子の動態に関しても未解明であり、核膜修復の分子メカニズムの全貌を明らかにする上で、今後の課題である。

5. 研究成果の公表方法

本研究の成果の一部は以下の査読付き原著論文及び学会で発表した。

査読付き原著論文

Kamikawa, Y., Saito, A., Matsuhisa, K., Kaneko, M., Asada, R., Horikoshi, Y., Tashiro, S., Imaizumi, K., 2021. OASIS/CREB3L1 is a factor that responds to nuclear envelope stress. *Cell Death Discov* 7, 152. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00540-x>

学会発表(一般口演)

小胞体膜貫通型転写因子OASISによる核膜ストレス応答機構解明

○上川 泰直, 松久 幸司, 齋藤 敦, 今泉 和
則, 第 94 回日本生化学会大会, on line 開催
2021 年 11 月 5 日

以上