

## 研究題目 ラミン変異による核膜病発症の分子機構の解析

### 研究組織

研究代表者：後藤 聡（立教大学理学部生命理学科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：山本（日野） 美紀（立教大学理学部生命理学科）

### 【1】研究の概要

#### [1-1] 本研究の目的・概要

核膜を裏打ちするラミンの変異は、その変異したアミノ酸の位置や種類によってミオパチーや脂肪萎縮症、早老症といった異なる症状を呈する核膜病を引き起こす。しかし、「同じラミン遺伝子の変異にも関わらず、変異の種類によってなぜ異なる症状を示すのか？」については明らかになっていない。本研究では、正常ラミンとそれぞれの変異ラミンに相互作用する蛋白質の変化に着目し、異なる症状を引き起こす分子機構を明らかにすることを目的としている。

#### [1-2] 研究の方法・経過

本研究では核膜病の中でも、特に変異数の多いミオパチーと脂肪萎縮症を引き起こす変異ラミンに着目した。Flag タグ配列を付加した正常型ラミン及びミオパチー、脂肪萎縮症を引き起こす変異ラミン（それぞれ L489P, R482W）を HeLa 細胞に発現させた。細胞を可溶化し、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降法によって、それぞれに結合する蛋白質を回収した。こうして回収されたラミンと相互作用する蛋白質を網羅的に同定した。

まず、正常型ラミンを発現させた細胞では、ベクターのみを導入した細胞と比較して、LEM ドメイン蛋白質や核膜孔複合体など、既にラミンと相互作用することが知られているタンパク質が検出されており、本方法が適切にワークしていることが確認できた。

次に、正常型ラミンとミオパチーを発症する変異ラミン L489P において、それぞれに相互作用しているタンパク質を比較したところ、結合が強くなった 216 個のタンパク質、結合が弱く

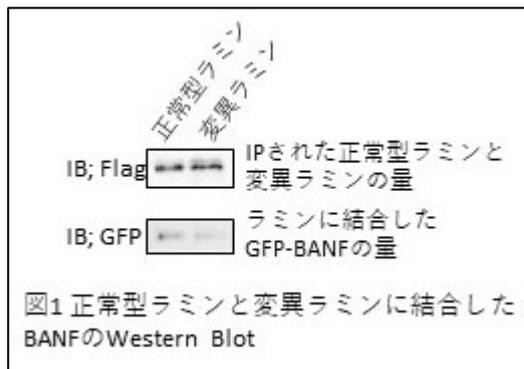
なった 3 個のタンパク質が検出された。また正常型ラミンと脂肪萎縮症を引き起こす変異ラミン R482W において、それぞれに相互作用しているタンパク質を比較したところ、結合が強くなった 6 個のタンパク質、結合が弱くなった 2 個のタンパク質が検出された。

### 【2】研究成果

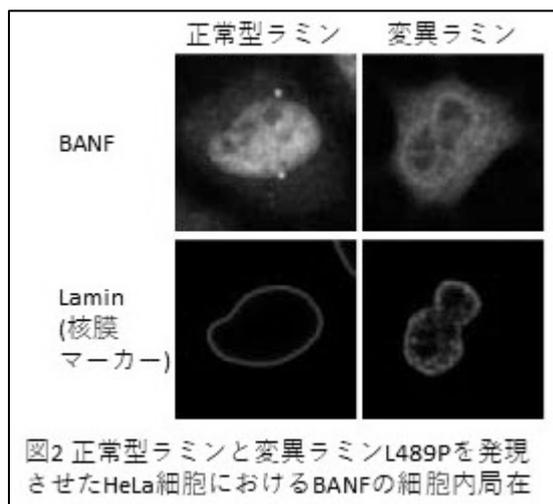
#### [2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

ミオパチー発症変異ラミン L489P に強く結合するようになったタンパク質 216 個のうち 212 個は、脂肪萎縮症発症変異ラミン R482W との結合には変化が認められなかった。また結合が弱くなったタンパク質も、両者でそれぞれ特異的であった。このことは、発症する疾患のタイプによって、相互作用する蛋白質の変化に特徴がある可能性を示唆していると考えられる。

特筆すべきは、正常型ラミンと比較して、ミオパチーを発症する変異ラミン L489P では、Barrier-to-autointegration factor (BANF) との結合が低下していたことである。私達はプロテオミクス解析の結果を検証するため、GFP を付加した BANF と正常型ラミン、変異型ラミンを共発現させ、ラミンと共沈した GFP-BANF の量を検討したところ、変異型ラミンとの結合低下が確認できた（図 1）。BANF は、ラミンや核膜蛋白質、クロマチンと結合して複合体を形成し、クロマチンの修飾や、DNA 修復、核膜損傷時の修復など、核の多岐にわたる機能を調節している分子である。ミオパチーを発症する変異ラミンにおいて、BANF との結合が低下することはこれまでに報告がなく、初めての発見である。



さらに私達は正常型ラミンまたはミオパチー発症変異ラミンL489Pを発現させた細胞におけるBANFの局在を検討した。正常型ラミン発現細胞ではBANFは主に核質に局在していたが、ミオパチー変異ラミンL489P発現細胞では、細胞質に局在するBANFの量が増加していた(図2)。このことは、変異ラミンとBANFの結合が低下した結果であると考えられ、核質でBANFが充分機能していない可能性が示唆された。



また興味深いことに、早老症を発症する変異ラミンでもBANFとの結合が低下することが報告されている。しかし早老症ではBANFは核質内で凝集体を形成することが知られており、ミオパチーを発症する場合とは細胞内局在が異なることが明らかになった。つまりBANFの細胞内局在の違いが、異なる疾患の発症に関与している可能性が考えられた。

#### [2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究によって「同じラミン遺伝子の変異にも関わらず、変異の種類によってなぜ異なる症状を示すのか？」という問いに対して、変異の種類によって相互作用する蛋白質に違いがあることを明らかにし、その違いが異なる疾

患の発症に関与している可能性を示唆することができた。これまで核膜病の原因として考えられてきた遺伝子発現の変化や、構造体としての核の脆弱性に加えて、結合蛋白質の変化という新しい切り口を与えたことで、様々な核膜病発症や進行の理解に対して波及効果がある。

また今後は、L489P以外のミオパチーを発症する変異ラミンについても相互作用が変化したタンパク質を検討して、ミオパチー発症の新たな手掛かりをえるという発展性がある。

#### 【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

なし

[3-3] 成果資料等

なし

#### 【4】 今後の課題等

今後は、本共同研究で得られたBANFとの結合低下がミオパチーの発症に関与しているかどうか、明らかにする予定である。

また今回は、強制発現させたタグ付きタンパク質を免疫沈降することで、相互作用する蛋白質の解析を行ったが、より*vivo*での相互作用状態を反映する近接ラベル法を用いての解析も順次行う予定である。