

脊椎動物の発生過程を制御する核膜タンパク質の解析

Analysis of nuclear envelope proteins regulating vertebrate development

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者 東京大学 平良眞規

University of Tokyo Masanori TAIRA

Roles of nuclear envelope proteins in the regulation of vertebrate development remain to be elucidated. We recently identified a novel protein, referred to as Nemp1 (nuclear envelope integral membrane protein 1) in *Xenopus laevis*. Nemp1 has a putative signal peptide (SP), transmembrane domains (TMs), and two evolutionarily conserved regions, named A and B. Nemp1 is expressed in the anterior neuroectoderm at the neurula stage, and in the head region, predominantly in the eyes, at later stages. Functional analyses with *Xenopus* embryos showed that both overexpression and knockdown of Nemp1 reduce the expression of early eye-specific regulatory genes at the neurula stage, and later cause severe eye defects, suggesting that a proper level of the Nemp1 protein is required for early eye development. Deletion analysis of Nemp1 showed that both SP and TMs are necessary for biological activity and nuclear envelope localization, and that regions A and B are important for biological activity. Analyses of proteins interacting with region B revealed that this region can interact with various chromatin- or nuclear transport-related proteins. These data suggest that Nemp1 regulates eye-specific early genes possibly at the inner nuclear membrane with region B faced to the nucleoplasm.

研究目的

核膜は真核生物の主要な特徴の1つであるが、細胞の分化や動物の発生における役割との関連においてはほとんど解析されていなかった。核膜は外膜と内膜の二重膜からなり、外膜は小胞体と繋がるが、内膜は核膜孔を境にして外膜とは異なる膜タンパク質もつ。核膜タンパク質は、細胞分裂時の核膜の消失と形成における役割や、核内膜の裏打ち構造である核ラミナと結合することで、核の構造を維持する役割が主として解析されてきた。しかし、我々の先行研究により、それまで機能未知であった核内膜タンパク質 MAN1 が BMP シグナル伝達因子 Smad1 と相互作用しシグナル伝達を制御することが示された (Osada et al. *Development* 130:1783, 2003)。この解析結果は核膜タンパク質の新たな役割として注目されている (Gruenbaum et al. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:21, 2005)。このような核膜タンパク質の遺伝子発現や発生における役割が普遍的なものであるかを理解するためには、そのような活性をもつ他の核膜タンパク質を同定し解析する必要がある。

以上を背景に本研究では、最近当研究室で同定されたアフリカツメガエル胚に発現する新規の核膜タンパク質に注目し、(1) アフリカツメガエル胚を用いた機能解析を行うことで核膜タンパク質の発生における役割を明らかにし、(2) Nemp1 と相互作用する因子を同定することで核膜タンパク質を介した遺伝子発現調節機構の解明への基礎を得ることを目指した。本研究は、核膜タンパク質の役割としてこれまで十分に解析されていない発生における役割と、最近注目された核膜タンパク質によるシグナル伝達あるいは遺伝子発現の調節機構に新たな知見を与えるものであり、大きな意義をもつ。

研究経過

本研究を始めるにあたって、Nemp1 に関して得られていた知見は以下の通りである。Nemp1 のアミノ酸配列の解析から、N 末端にシグナルペプチド (SP) と中央に5つの膜貫通ドメイン (5TMs) が予想された (図1)。また2箇所に進化的に保存された領域 A と領域 B をもち、それらはヒトから線虫まで40%以上の一致率を示すが、既知のドメインは存在しない。領域 A は、Nemp1 の5TMs 内にあり、領域 B は5TMs のC末端側にある。Nemp1 は神経胚期には前方神経外胚葉に、尾芽胚期には目を含む頭部領域に発現する。Nemp1 の過剰発現実験では眼の形成阻害が見られた。そこで本研究では以下の4点、(1) 眼の形成阻害に関わる Nemp1 の機能ドメインの同定と細胞内局在との関連性、(2) 眼形成の初期遺伝子の発現に対する Nemp1 の影響、(3) Nemp1 の機能低下による表現型、(4) Nemp1 と相互作用する因子、について解析した。

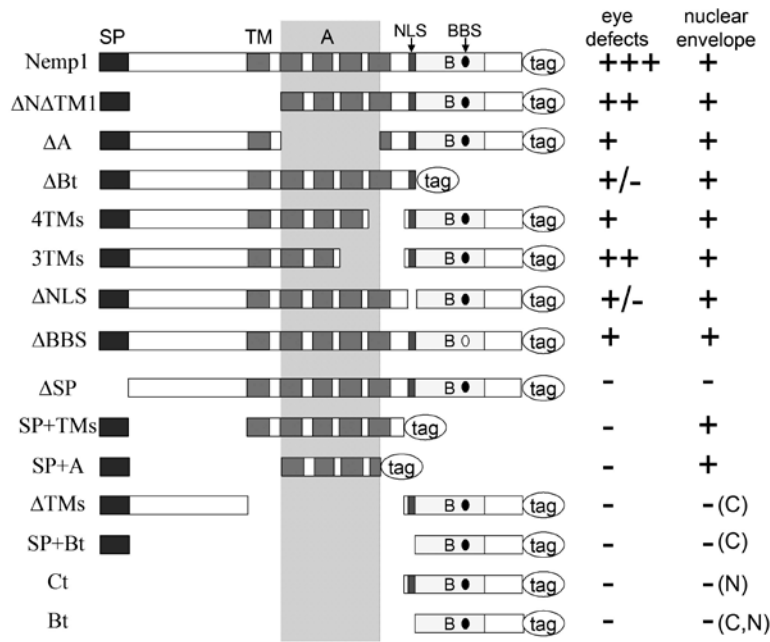


Fig. 1. Activity and nuclear envelope localization of Nemp1 and its deletion constructs. Percentages of 'eye defect' phenotypes of no eye and trace eye are shown as follows: +++, >60%; ++, 40%-60%; +20%-40%; +/-, 5%-20%; -, <5%. 'Nuclear envelope' indicates subcellular localization of Myc-tagged Nemp1 constructs: +, nuclear envelope; -, not +; C, cytoplasmic; N, nuclear. A, region A; B, region B; BBS, BAF binding site; NLS, nuclear localization signal; SP, signal peptide; tag, Myc tag; TM, transmembrane domain.

1. 眼の形成阻害に関わる Nemp1 の機能ドメインの同定と細胞内局在との関連性

Nemp1 の野生型あるいは種々の欠失コンストラクトの合成 mRNA を、アフリカツメガエル胚 4 細胞期の予定前方神経外胚葉領域に顕微注射し、尾芽胚期における眼の形成阻害を観察した。細胞内局在は、それらのタグ付きコンストラクトを培養細胞 COS7 に発現させ、免疫染色後共焦点レーザー顕微鏡で観察した。作成した欠失コンストラクトおよびそれらの眼形成阻害活性と細胞内局在を図 1 にまとめた。得られた結論は以下の通りである。

1-1) 核膜局在には SP と TMs で必要十分である

核膜への局在には SP と領域 A があれば十分であり (図 1 ; SP+A)、また領域 A の一部 (4TMs、3TMs) あるいは全部 (ΔA) が欠失しても核膜局在が認められた。しかし TM を全て欠失すると核膜局在はなくなり細胞質側に分布した (ΔTMs、SP+Bt)。これは SP が ER (小胞体) 内で切断された後、残りのペプチド鎖がそのまま ER 内に留まったためと考えられる。一方、SP のみを欠失させると (ΔSP)、核膜とは異なる膜状の構造に局在を示した。以上より、Nemp1 の核膜局在には、SP と TMs が必要であり、かつ SP といずれかの TMs があれば十分である。

1-2) 核内膜に局在し、C 末側は核質側に配向する

C 末端に HA タグを付けた Nemp1-HAc を COS7 細胞に発現させ、digitonin 処理後に細胞を免疫染色した。digitonin 処理は通常の triton X-100 処理と異なり、核内に抗体を浸透させないため、核質側に配向した抗原は検出されない。対照として細胞全体に一様に分布する Bt (Myc タグ付き Bt) を Nemp1-HAc と共に発現させた。結果、digitonin 処理で Bt は細胞質のみが染色されたが、その細胞において Nemp1-HAc の核膜染色は検出されなかった。一方、triton 処理では Bt は核内にも染まり、かつ Nemp1 は核膜に局在して染まった。これらの結果は Nemp1-HAc が核内膜に局在し、Ct 領域は核質側に配向していることを示している。

1-3) 領域 A、領域 B、核移行シグナル (NLS) が活性に必要である

眼形成の阻害活性は、領域 A あるいは領域 B を欠失すると大きく減少したこと (図 1; ΔA 、 ΔB)、進化的に保存されたこれらの領域が活性に必要であることが示された。したがって領域 A と領域 B は他のタンパク質と相互作用するドメインであるか、あるいは何らかの触媒活性をもつドメインの可能性もある。また領域 A は TMs 内にあることより、チャネルの可能性も考えられる。

Ct あるいは Bt のみを発現させると、興味深いことに Ct は核内に局在し、Bt は細胞全体に分布した (図 1; Ct、Bt)。Bt で欠失した配列には典型的な NLS 配列 K-K/R-X-K/R が含まれ、その配列単独で NLS として機能することが示された (データ省略)。NLS が核内膜タンパク質の核内膜への移行に関与することが最近報告されたことより、Nemp1 も同様な機構で核内膜に移行することが考えられた (図 2)。そこで NLS を欠失させたところ、活性はほとんど消失したが、核膜への局在は見かけ上変化しなかった (図 1; ΔNLS)。可能性として、Nemp1 はこの NLS を欠いても核内膜に移行できるが、NLS と相互作用する因子が活性に必要であることが考えられる。また ΔNLS が核外膜に留まっている可能性もあり、今後の課題である。

1-4) 活性には核膜局在が必要である

領域 B を欠失すると Nemp1 の活性が大きく減少することから、領域 B が何らかの因子と相互作用することが予想される (図 1、2)。しかし領域 B を含む Ct あるいは Bt が核内に存在しても、ほとんど活性は認められなかったことより (図 1; Ct、Bt)、領域 B は核内膜に局在することで始めて活性を示すことが示唆される。一方、領域 A を欠失すると活性が減少し、NLS を欠失するとほとんど活性を失うことから (前述)、核内膜に局在した領域 B が NLS や領域 A と協調的に作用する可能性が考えられる。

細胞内局在に関する以上の結果はタグ付きタンパク質を用いたものである。そこで内在性 Nemp1 の細胞内局在を抗 Nemp1 抗体で検討するため、Bt 領域を GST たんぱく質に融合させた GST-Bt を大腸菌で発現させ、精製後外注によりウサギを免疫した。しかし得られた抗血清のタイターが低かったため、抗原とする領域を再検討中である。

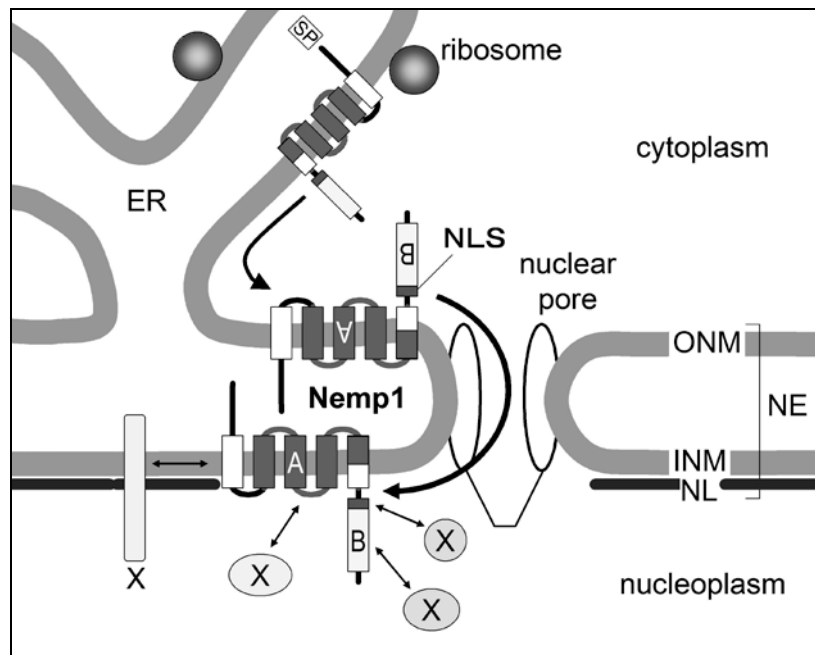


Fig. 2. A possible model of nuclear envelope localization of Nemp1 and its interactions with other proteins in the nucleus. See the text for details. A, region A; B, region B; ER, endoplasmic reticulum; INM, inner nuclear membrane; NE, nuclear envelope; NL, nuclear lamina; NLS, nuclear localization signal; ONM, outer nuclear membrane; SP, signal peptide; X, putative interacting proteins.

2. 眼形成に関わる初期遺伝子の発現に対する影響

眼の初期形成に関わる遺伝子のカスケードとして $Otx2 \rightarrow Tbx3 \rightarrow Rx \rightarrow Pax6$ が報告されている。そこで Nemp1 を過剰発現した神経胚を全胚 *in situ* ハイブリダイゼーションでこれらの遺伝子発現について解析した。その結果、Nemp1 は $Otx2$ の発現に影響を与えなかったが、 $Tbx3$ 、 Rx 、 $Pax6$ の発現をいずれも阻害した。種々の欠失コンストラクトを用いて Rx の阻害程度を検討した結果、図 1 で示された眼の形成阻害の程度と同様の結果を得た。一方、汎神経組織特異的遺伝子の $Sox2$ や $Nrp1$ の発現には影響を与えなかった。したがって Nemp1 は $Otx2$ から $Tbx3$ と Rx に至るカスケードを特異的に阻害することで眼形成を阻害したと考えられる。可能性としては過剰発現した Nemp1 が直接あるいは間接的に $Otx2$ の活性を阻害することが考えられ、その検討が今後の課題である。

3. 機能低下実験による解析

胚発生過程で Nemp1 の機能を低下させるためエクソン・イントロン境界に対するアンチセンス・モルフォリーノ・オリゴ (MO) を外注により作成した。陰性対照として 5 箇所 mismatches を導入した 5mmMO を作成した。MO の特異性を検討した後、MO 注入胚の眼の形成に対する効果を検討した。その結果、予想外なことに過剰発現の場合と同様に、眼の欠失あるいは縮小が認められた。この表現型は 5mmMO では認められず、また Nemp1 mRNA を共注入することで MO の阻害効果が抑制されたことより、MO は特異的に Nemp1 の機能低下をもたらしたと

考えられる。眼の初期マーカー遺伝子に対しても Otx2 の発現には影響を与えなかったが、Tbx3、Rx、Pax6 の発現が阻害された。以上の結果は、Nemp1 は眼の形成に必須の因子であり、その作用点は Otx2 と Tbx3 の間であることを示唆する。

4. Nemp1 と相互作用するタンパク質の同定

Nemp1 の眼形成の阻害活性に関わる領域のうち、領域 B に注目し、その領域と相互作用するタンパク質の同定を、既知の核タンパク質との GST プルダウン法による解析と、酵母 2 ハイブリッド系を用いた解析を行った。

4-1) GST プルダウン法による解析

Nemp1 と相互作用する因子として BAF (barrier-to-autointegration factor) に注目した。BAF は核内膜タンパク質 MAN1 や Emerin と結合するクロマチンタンパク質で、転写因子 Crx と結合する。また BAF の結合配列 S(R/K)Vx(t/v)x(t/f)(R/K) の類似配列 SRIQSPKR が Nemp1 の領域 B に存在し (BAF-binding site, BBS と呼ぶ)、それを欠失したコンストラクト Δ BBS で活性が低下した (図 1)。そこで GST 融合タンパク質 GST-Bt と、陰性対照として GST 単独および BBS を欠失した GST-Bt Δ BBS を用いて、BAF とのプルダウン・アッセイを行った。BAF は FLAG タグで標識し (FLAG-BAF)、カエル胚に発現させ、その抽出液を用いた。解析の結果、FLAG-BAF は陰性対照に比べ GST-Bt により強く結合することが示された。次に細胞内での Nemp1 と BAF との相互作用を検討するため、Nemp1-HAc と FLAG-BAF を COS7 細胞に発現させた。FLAG-BAF は単独では核内に一様に分布するが、Nemp1-HAc との共発現により核膜周辺に偏在することが認められた。この偏在は Nemp1 Δ BBS-HAc との共発現では見られなかったことより、核内膜に局在した Nemp1 の BBS に BAF が結合することで核膜周辺に偏ったものと解釈される。Emerin は BAF を仲介して Crx と 3 者複合体を形成しその転写活性を抑えることが培養細胞の系で報告されている。Otx2 は Crx のパラログであり、Crx と同様に BAF との結合が報告されている。したがって過剰発現の Nemp1 が BAF を介して Otx2 の活性に影響を与える可能性が示された。

4-2) 酵母 2 ハイブリッド系による解析

Nemp1 の領域 B に結合する因子を探索するため、酵母 2 ハイブリッド系の「餌」 (bait) としてマウス Nemp1 の Bt 領域を用いた。マウス Nemp1 を用いた理由は、市販のマウス胚 (E11) cDNA ライブラリーを用いることが可能であること、また将来的に、核膜タンパク質による遺伝子発現の解析にはマウス培養細胞を用いることが有利である点である。そこでマウス Nemp1 cDNA を入手し Bt 領域を含む cDNA 断片を GAL4DBD ベクターに組み込み「餌」とし、定法に従いスクリーニングを行った。その結果、高率に取れた遺伝子には Ubc9 と Ran (small GTPase) があつた。Ubc9 は SUMO (small ubiquitin-related modifier) の E2 連結酵素 (conjugating enzyme) であり、種々の核タンパク質を SUMO 修飾することで、核内移行や転写活性の制御などに関わる。一方、GTP 型 Ran は核内移行されたタンパク質複合体から importin β を解離させ、その際生じた GTP 型 Ran/importin β 複合体を核外に排出する役割をもつ。したがって Nemp1 がこれらの過程に関わる可能性が考えられる。

考察

本研究により、新規の核膜タンパク質 **Nemp1** の発生における役割と、その分子性状について多くの知見が得られた。脊椎動物の眼の形成には種々の制御タンパク質が関わっているが、核膜タンパク質の関与を示したのは本研究が初めてである。発生過程に関わる核膜タンパク質としては当研究室で解析した **XMAN1** がある。**XMAN1** は核質側に配向した C 末端領域で **BMP** シグナル伝達因子 **Smad1** と結合し、**BMP** シグナルを負に制御する。**XMAN1** の場合、細胞内に一様に分布する C 末領域のみでも **BMP** シグナルを抑制することから、活性には核内膜への局在は必要でない。また **XMAN1** の機能低下は、過剰発現の場合と逆の作用である **BMP** シグナルの亢進を示す。これらの点において、**Nemp1** は **XMAN1** と大きく異なる。すなわち **Nemp1** の活性には核膜局在が必要であり、また過剰発現と機能低下で同じ表現型を示す。その解釈としては、**Nemp1** は核内膜上で、**BAF**、**Ubc9**、**Ran**、**importin α** や他のタンパク質と適切な量比で複合体を形成することで、正常な機能を発揮すると考えられる (図 2)。これを仮定すると、機能低下により複合体形成が阻害されること、および過剰発現によっては適切な複合体の形成が損なわれ異常を生じることを説明できる。その結果、眼形成の初期遺伝子カスケードの **Xotx2** から **Tbx3** や **Rx** へのステップが障害を受けると考えられる。

核膜タンパク質がどのように遺伝子の発現制御に関わるかは、最近注目されつつある分野である。これまで核膜近傍には発現抑制を受けた遺伝子が集まり、転写は主に核の中央部で行われると考えられてきた。例えば **Emerin** は **GCL/DP3-E2F**、**BAF/Crx** と核内膜上で結合することで遺伝子を負に制御することが示唆されており、**XMAN1** は **Smad1** と結合して **BMP** シグナルを負に、**Emerin** は **β -catenin** に結合して **Wnt** シグナルを負に制御する活性をもつ。このように核膜タンパク質は遺伝子に対しては発現抑制に働く例が多い。ところが最近、核膜孔の近くは転写活性の高い遺伝子が存在し、それらは転写活性化に伴い核膜孔近傍に移動することが酵母で示された。このことは核膜孔近くの核膜タンパク質は遺伝子発現に対して正に働くことを示唆している。したがって **Nemp1** が核膜孔近傍に局在するか否かを検討することは重要であり、今後行う電子顕微鏡解析で注目すべき点である。**Nemp1** との相互作用が示唆された **Ubc9** と **Ran** は共に核膜孔近辺で機能するタンパク質であり、現在盛んに研究されている。**Nemp1** がこれらのタンパク質と何らかの機能的関連性を示したならば非常に興味深いことであり、またそれにより眼の初期形成における遺伝子発現との関わりがさらに明らかになると期待される。

研究発表

口頭発表

M. Taira “Identification and functional analyses of uncharacterized neural genes in *Xenopus* early development” International Symposium on Advanced Functional Genomics, Kazusa (2007 年 10 月 11 日 - 12 日)

ポスター発表

儘田博志、柴野卓志、伯野史彦、高橋伸一郎、古閑比佐志、平良眞規 “アフリカツメガエル

初期眼発生における新規核膜タンパク質 Nemp1 の解析” 第 30 回分子生物学会年会、横浜（2007 年 12 月 11 日－15 日）

H. Mamada, T. Shibano, F. Hakuno, S.-I. Takahashi, H. Koga, M. Taira “Analysis of a novel nuclear envelope protein, Nemp1, in early *Xenopus* eye development” International Symposium on Advanced Functional Genomics, Kazusa（2007 年 10 月 11 日－12 日）

H. Mamada, N. Takahashi, M. Taira “Nemp1, a novel nuclear envelope integral membrane protein 1, is involved in eye formation in *Xenopus laevis*” 11th International *Xenopus* Conference, Kazusa, Chiba, Japan（2006 年 9 月 12 日－16 日）

誌上発表（投稿準備中）