

氏名	Michaela Clever
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 857 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	The nucleoporin ELYS/Mel28 governs formation of nuclear envelope (NE) subdomains in post-mitosis (核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 による細胞分裂終期の核膜サブドメイン形成制御)
論文審査委員	委員長 連携教授 今本 尚子 委員 教授 大西 純一 委員 教授 松本 幸次 委員 連携教授 小林 俊秀

論文の内容の要旨

Background:

The eukaryotic nucleus is separated from the cytoplasm by the nuclear envelope (NE), containing thousands of nuclear pore complexes (NPCs), which mediate the transport across the NE. In mammalian cells, a filamentous meshwork of A-type lamin (lamin A/C) and B-type lamin (lamin B) called the nuclear lamina, lies beneath the NE. Localization and distribution of the NPCs and lamins determine the A-type lamin-rich/NPC-free and B-type laminrich/NPC-rich subdomains on the assembled NE during interphase, which correlate with the core region and the noncore region on mitotic chromosomes, respectively. As the lamina and their binding partners are linked to various human diseases, it is of special interest how the lamina collaborates with other nuclear components in the formation and maintenance of the nuclear architecture.

During “open” mitosis the NE, the NPCs and the lamina are disassembled to allow formation of a mitotic spindle, requiring them to rearrange in a spatially and temporally organized manner on chromosomes at the end of mitosis. The interdependence of the NE and NPC assembly is not fully understood.

While only little is known about the reformation of the NE, significant progress has been made to understand the postmitotic assembly of the NPC, which consists of ~30 different NPC proteins, also designated as nucleoporins (nups). Essential for post-mitotic NPC assembly is the nucleoporin ELYS/Mel28. ELYS/Mel28 acts to “seed” the NPC on chromosomes through interaction with the Nup107-160 complex, a NPC subcomplex, and sequential recruitment of other nucleoporins. In addition, ELYS/Mel28 localizes together with the Nup107-160 complex to kinetochores, where its role in mitotic spindle formation is unclear so far.

Aim of this study:

The aim of the present study was to address how NPC and NE interact during post-mitotic reassembly by

establishing experimental systems to analyze NE and NPC assembly in HeLa cells *in vivo* by live imaging and *in vitro* by indirect immunofluorescent staining.

Summary of results:

The present study gives new insights into the coordination of NPC and NE formation and focuses on functions of the essential nucleoporin ELYS/Mel28 during mitosis. Based on RNAi-induced knockdown of ELYS/Mel28 in HeLa cells, immunofluorescence (IF) and live imaging data revealed that depletion of ELYS/Mel28 directly inhibits the membrane bound NE protein lamin B receptor (LBR) from binding to mitotic chromatin and A-type lamin-binding proteins like emerin from accumulating at the core region on mitotic chromosomes. RNAi knockdown of nucleoporins, which are recruited during NPC formation, demonstrated that ELYS/Mel28 has a specific role in recruiting the LBR to mitotic chromosomes, which was further confirmed by biochemical studies. The fusion protein LBR-EGFP specifically co-precipitated ELYS/Mel28 from mitotic extracts. The interaction was regulated in a phosphorylation-dependent manner. Pull-down experiments with the bacterially expressed recombinant N-terminal region of the LBR verified the interaction between the LBR and ELYS/Mel28.

Furthermore, depletion of the LBR had neither an effect on post-mitotic NPC assembly nor on the transport function of the NPC, suggesting that the dependency between the LBR and ELYS/Mel28 is not mutual.

On the other hand, the effect of ELYS/Mel28 on the localization of emerin during post-mitotic NPC assembly was completely different from the recruitment of the LBR, as depletion of the LBR did not affect the localization of A-type lamin-binding proteins. In the absence of ELYS/Mel28, A-type lamin-binding proteins, emerin, Lap2 α and Barrier-to- Autointegration Factor (BAF), lost their focused localization at the chromosomal core region in mitosis. Furthermore, live imaging revealed that cytokinesis was accelerated in ELYS/Mel28-depleted cells. In this context, the chromosomal passenger complex (CPC), which is a regulator of cytokinesis, was mislocalized from centromeres and from the midzone in the absence of ELYS/Mel28. In addition, depletion of ELYS/Mel28 impaired the function of Aurora B kinase, the central activity of the CPC, which also supports formation of the central spindle. The results of the present study suggest that ELYS/Mel28 might influence the formation of the core region through the central spindle, which is important for the accumulation of A-type lamin-binding proteins at the core region.

Conclusion:

Besides its well-established role in post-mitotic NPC assembly, observations and results of the present work gather evidences for novel roles of ELYS/Mel28 in NE formation.

This study describes a tight association of the nucleoporin ELYS/Mel28 and the INM protein LBR for the first time. Presented data reveal a predominant role of ELYS/Mel28 among other nucleoporins in the recruitment of LBR to noncore regions of chromosomes during post-mitosis, which is part of the B-type lamin/NPC-rich NE subdomain during interphase. Additionally, ELYS/Mel28 turned out to anchor LBR at the NE in interphase.

The interaction of LBR with ELYS/Mel28 gives a new direction to examine NE subdomains. Future studies of a functional relation between LBR and ELYS/Mel28 during interphase will help to understand the physiological significance of the association of LBR and B-type lamin with NPCs. Moreover, the present study demonstrates that recruitment of LBR in post-mitosis is different from recruitment of A-type lamin-binding proteins as it is not tubulin-dependent but requires the targeting of ELYS/Mel28 to chromosomes.

Further observations present a novel function of ELYS/Mel28 in the regulation of the A-type lamin-rich NE subdomain, which is influenced by late mitotic events under control of the chromosomal passenger complex (CPC).

ELYS/Mel28 regulates the localization and activity of the CPC and indirectly affects cytokinesis. A prerequisite for recruitment of A-type lamin-binding proteins to the core region and formation of the A-type lamin-rich subdomain is the central spindle. ELYS/Mel28 might affect the stability of the central spindle, which in turn regulates the focused binding of A-type lamin-binding proteins to the core region. This role of ELYS/Mel28 also demonstrates its involvement in a checkpoint during prophase, which senses the presence of essential nucleoporins. Thus, ELYS/Mel28 plays an overall significant role for the outcome of mitosis.

This conclusion underlines that nucleoporins do not only have a structural role in the NPC, but contribute to other essential processes in mitosis and interphase, for which evidences have accumulated in the recent literature (Xylourgidis and Fornerod, 2009; De Souza and Osmani, 2009; Hou and Corces, 2010; Wozniak et al., 2010). Elucidating the mechanisms of the regulation of the CPC through ELYS/Mel28 or the Nup107-160 complex will deepen the understanding of the versatile character of these nucleoporins.

Importantly, results of this study clearly show that both functions are independent from each other, and thereby reveal new aspects of how post-mitotic reassembly of NPCs and the nuclear envelope are coordinated. In summary, this study leads to the conclusion that ELYS/Mel28 is a key player for reformation processes of the NE and the NPC in mitosis by its essential function in NPC formation and the newly assigned function in NE subdomain formation.

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 24 年 2 月 9 日（木）10：00～11：00 に埼玉大学理学部 3 号館 2 階第 3 会議室で論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

真核細胞の細胞質と核を隔てる核膜は、小胞体膜と繋がった核外膜と、染色体と結合する核内膜の 2 層の脂質膜から形成されている。核外膜と核内膜が融合するところに核膜孔複合体と呼ばれる巨大なタンパク質複合体が存在し、核と細胞質の間の物質流通を制御している。核膜は細胞周期を通してダイナミックに変化する膜構造体である。"open mitosis" を呈する細胞では、核膜と核膜孔複合体は、細胞分裂期に崩壊して分裂終期に再形成する。また、初期 G1 期から次の細胞分裂期に至る間期に核膜の面積はおよそ 2 倍に成長するとともに核膜孔複合体の数が倍化する。このように、核膜と核膜孔複合体の崩壊と形成は同時に進行し、また、間期に核膜が成長するのに伴って核膜孔複合体が形成される。これらの事実から、核膜と核膜孔複合体の間に、その成長や形成を調和させる仕組みが細胞に備わっていると考えられる。しかし、その分子機序は不明である。本学位論文の研究は、核膜形成と核膜孔複合体形成を調和させる分子機構の存在を明らかにすることを目指したものである。

1. 解析系のセットアップ

核膜形成と核膜孔複合体形成を調和させる分子機構を明らかにするため、核膜形成過程をライブイメージングする実験系を樹立し、様々な核膜孔複合体構成因子をターゲットとする RNAi 法を併用することで、核膜形成を乱す因子のスクリーニングを行った。具体的には先ず、様々な膜貫通型の核膜タンパク質に蛍光タンパク質を付加し、細胞内で発現させた安定発現株を取得した。次に、細胞周期を同調したのちに siRNA オリゴで細胞を処理して、細胞分裂終期の核膜形成過程をライブで観察できるようにした。RNAi による因子のノックダウン効率は、細胞によって違いがでるため、ライブ観察をする際に観察した特定の細胞をマーキングし、観察した 1 つ 1 つの細胞の中での因子のノックダウン効率を定量できる工夫をおこなった。

2. 核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 の同定

上記のスクリーニングをおこなった結果、核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 のノックダウンにより、sterol reductase 活性を有する膜貫通型の核内膜タンパク質 LBR (Lamin B receptor) が分裂終期の核膜再形成時に分裂期染色体上にリクルートされて核膜に組み込まれないこと、また、核内膜タンパク質エマリンの核膜形成時の挙動が乱されることがわかった。LBR は B-type ラミンと結合し、エマリンは A-type ラミンと結合することが知られており、それぞれの因子は細胞周期の初期 G1 期から S 期にかけて異なる核膜サブドメインに局在する因子である。その核膜サブドメインは、細胞分裂終期の核膜形成時に、"non-core" , "core" と呼ばれる分裂期染色体上の異なる部位に異なる核内膜タンパク質がターゲットして形成される。LBR とエマリンのそれぞれは、分裂期染色体の "non-core" と "core" にターゲットする。一方、ELYS/Mel28 は、AT-hook をもつ DNA 結合タンパク質として同定され、初期には転写因子ではないかと予想されていた。その後の機能解析で、ELYS/Mel28 は細胞分裂終期に分裂期染色体上で核膜孔複合体が形成される際に、分裂期染色体に結合して、巨大な核膜孔複合体を形成するための土台をつくる機能があると考えられてきた因子である。核内膜因子に対する作用も含め、その他の機能に関しては明らかにされていなかった。

3. 核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 の核膜形成における作用

ELYS/Mel28 を除去したときの LBR やエマリンに対する作用は ELYS/Mel28 に特異的であり、ELYS/Mel28 を除去することによって核膜孔複合体が形成されないためではないことが確認された。生化学的な解析から、ELYS/Mel28 はリン酸化に依存して LBR と結合することがわかった。そのため、ELYS/Mel28 の LBR に対する作用は、ELYS/Mel28 と LBR の分子間相互作用に基づくものであることが示された。このことから、核膜孔複合体形成に対する作用も含め、ELYS/Mel28 の分裂期染色体の”non-core”領域における核膜形成は 1 対 1 の分子間相互作用に基づくものであると考えられる。一方、ELYS/Mel28 を除去することで影響を受ける”core”領域の核内膜因子は、エマリンだけでなく、Lap2 α 、barrier-to-autointegration factor (BAF)、A-type ラミン などの複数因子に及ぶことが判明した。その分子基盤を探るために解析を続けると、ELYS/Mel28 を除去すると、細胞分裂期の Aurora B キナーゼの活性低下や chromosome passenger complex (CPC) 構成因子の局在が乱されることが示された。このことから、ELYS/Mel28 は細胞分裂期進行に必要なシグナリングカスケードに作用し、その作用を通して分裂期染色体の”core”領域に集積してくる核内膜因子群の挙動を制御すると推察される。

以上、本論文は核膜孔複合体構成因子 ELYS/Mel28 には、これまでに知られていなかった多角的な機能があること、また、核膜孔複合体形成と核膜形成を調和させる分子機構が細胞に備わっていること、の 2 点を明らかにした。本研究で影響が見られた核内膜因子のそれぞれは、様々な遺伝子疾患の原因因子（例 LBR: Pelger-Huët anomaly 遺伝子疾患, emerin: Emery-Dreifuss muscular dystrophy, A-type lamin: Hutchinson-Gilford progeria）としても知られており、その観点からもこれら因子の機能 / 挙動制御には興味を持たれている。

本研究の結果は査読制のある国際誌に 2 編の論文（筆頭著者および共著者）として掲載（および掲載決定）となった。よって本審査委員一同は、本論文が博士（理学）の学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と認めた。