

核膜崩壊・再形成における Lamina-Associated Peptide (LAP) 2 の機能

Molecular function of Lamina-Associated Peptide (LAP) 2 for Nuclear structure and Behavior.

研究代表者 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻助手 古川和広
Division of Biological Science, Graduate
School of Science, Nagoya University.
Kazuhiro FURUKAWA

Lamina-Associated Polypeptide (LAP) 2, which directly interact with B-type lamins and chromosomes, is an integral membrane protein that is specifically localized to the inner nuclear membrane of the nuclear envelope. Our previous study showed that multiple regions of its large nucleoplasmic domain promote localization of LAP2 to the nuclear envelope. The first (residues 1-296) and second (residues 298-409) half of the N-terminal regions of LAP2 independently functioned in targeting to the nuclear envelope. In this study, to further assess the function of these regions, we have analyzed interaction of LAP2 with B-type lamin and chromatin by *in vitro* binding assay with bacterial expressed LAP2 proteins and yeast 2-hybrid system, and also analyzed the inner cellular localization of serial deletion mutants of LAP2 in cultured cells by gene transfection. We found that a region within residues 298-373 of the second half of the N-terminus directly binds to residues 153-275 of the rod domain of lamin B1, and that region within residues 244-296 of the first half of the N-terminus binds to single and double strand DNA cellulose. Furthermore, in the transfection experiment, LAP2 mutants containing residues 244-296 were found to localize to the nucleus, but pyruvate kinase fusion proteins containing this sequence remained in cytoplasm, so that residues 244-296 does not contains functional nuclear localization signals. These data indicate that the first and second half of the N-terminus of LAP2 have separate functions which are involved in chromatin binding and stable nuclear lamina association, respectively.

研究目的・経過

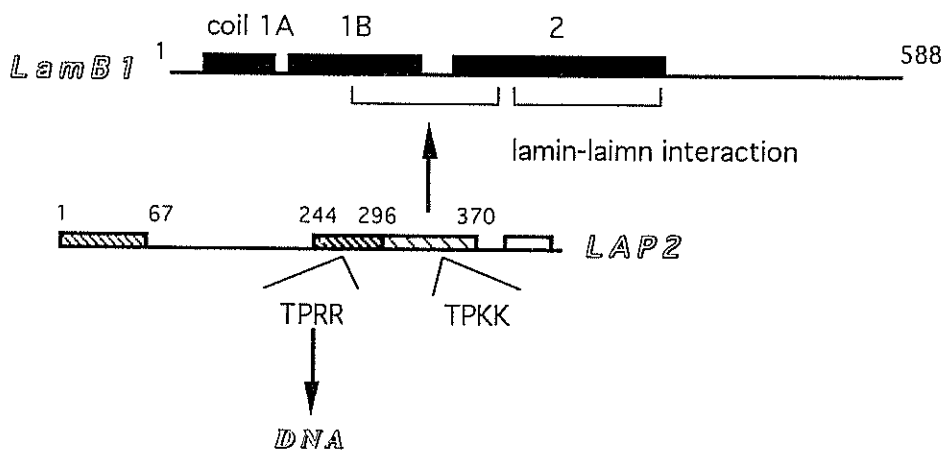
Lamina-Associated Polypeptide (LAP) 2は脂質2重膜、核膜孔複合体、及び核ラミナの3種の構造体から構成されている真核生物に特徴的な核膜内の核脂質2重膜中に内在する膜タンパク質として同定された分子であり、核ラミナの主成分であるラミン、特にラミンBや染色体と直接結合することができ、核脂質2重膜と核内のクロマチンを核ラミナにリンクさせるという重要な機能を持っていると考えられている。そしてこの様なラミンや染色体とLAP2との相互作用は細胞周期に対応したタンパク質のリン酸化の状態に依存して調節されている事から、細胞分裂初期・終期に見られる核構造の崩壊・再形成の動態の制御は、ラミン及びLAP2を含めた核膜構造体上の多くのタンパク質の複雑な相互作用により成立しているものと考えられる。

核膜及び核構造の崩壊・再形成の制御におけるLAP2の機能を明らかにするため、今回の研究はクローン化したLAP2の遺伝子を用い*in vitro*及び*in vivo*の結合解析系によりLAP2の各ドメインの機能を詳細に解析し、ラミン及びクロマチンとLAP2との相互作用を分子レベルで解析を行った。

研究成果

約410個のアミノ酸から成るLAP2の核質側へ突出した領域はこのタンパク質が核膜へ移行するために重要である。前半部分のアミノ酸領域1-296と後半部分の298-409の領域には核膜への移行及びこのタンパク質が核膜上で保持される事に関してそれぞれ独立した機能を持っている事を我々は既に明らかにしている(図参照)。これらの2つの領域がどのような核成分と相互作用し、LAP2が核膜へ移行し保持されるようになるかを明らかにするため大腸菌により発現させたタンパク質及びイーストを用いた2-ハイブリッド法を用いBタイプラミン及びクロマチンとLAP2の相互作用の解析を行うと共に、さらに細かい欠失変異をLAP2に導入し細胞内での局在の挙動を

観察した。その結果後半部分のアミノ酸領域 298-409 は B タイプ ラミン と相互作用することが明らかになり、特に 298-370 のドメインが ラミン B 1 の ロッドドメイン内の前半部分およそ 150-280 の領域と直接結合している事が明らかになった。ラミン B 1 の 150-280 の領域はラミンがダイマーを形成するために必要なドメインに隣接しており、ダイマー形成を安定化する機能がある事が知られているので、このドメインに LAP 2 が直接結合する事は LAP 2 がラミンの高次構造形成の調節因子の一つとなっていることを示唆している。又前半部分 1-296 の領域においては核ラミナではなく核内のクロマチンと相互作用している知見が得られ、特に 244-296 ドメインは *in vivo* では低分子のレポータータンパク質を核内に移行させると共に、*in vitro* では DNA に結合する性質を示す事が明かになった。以上の結果は LAP 2 の前半及び後半の領域では機能が大きく異なっており前半部分は核内のクロマチンの構造形成に、そして後半部分は核ラミナの構造形成に 関与することを示唆すると考えられる。



ラミンB 1 及びDNAとLAP2の相互作用を示した図。LAP2の244-296のアミノ酸ドメインはDNAと、298-370のドメインはラミンB 1と相互作用する。

今後の課題と発展

今回の本研究よりLAP2の298-370のアミノ酸ドメインがB-タイプのラミンと又244-296のアミノ酸ドメインがDNAと直接結合する機能を持っていることが明らかになった。LAP2のこのような機能が核膜形成時のラミン及びクロマチンの高次構造形成にどのような影響をあたえるかはラミンの重合に対する効果及びDNAとの結合特性をさらに解析を進める必要がある。又、さらに1-243のアミノ酸領域もその他の細胞性因子と相互作用する知見が得られたのでこれらの因子を明らかにするため酵母細胞を用い *in vivo* の2-ハイブリッド法、及び大腸菌を用いタンパク質を大量に発現・精製し標識しプローブとし、*in vitro* のプロットバインディング法などを用いて標的因子のクローニングを試みる計画を現在検討中である。

発表論文リスト

Furukawa, K., Glass, C., and Kondo, T. : Characterization of the chromatin binding activity of lamina-associated polypeptide (LAP)
2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.