

【総 説】

ラミンA—その多彩な機能と老化

中村 愛、森澤 拓、戸田 年総

東京都健康長寿医療センター研究所（東京都老人総合研究所）

老化機構研究チーム プロテオーム

要約

ラミンは細胞の核膜を裏打ちする核ラミナの構成成分として発見された。ラミンはラミンA、ラミンB、ラミンCの三つのタイプが知られており、核内因子と相互作用して核の構造形成や遺伝子の複製・発現の制御に重要な役割を果たしている。近年、ラミンA遺伝子の変異がハッチンソン・ギルフォード早老症候群（HGPS）、筋ジストロフィー、ニューロパチーなど多様な疾患を引き起こすことが明らかになった。それらの病態の解析からラミンの新たな機能がわかってきた。本稿ではラミンAに焦点をあて、HGPSの分子メカニズム、ラミンAの正常老化や酸化ストレスとの関わりについて紹介する。

キーワード: lamin A/C, Hutchinson-Gilford progeria syndrome, oxidative stress, proteomics,

はじめに

我々はヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて酸化ストレス負荷におけるタンパク質の変化をプロテオーム解析により検討してきた(第6節参照)。リン酸化タンパク質を特異的に染色するPro-Q Diamondで二次元電気泳動のゲルを染色したところ、ストレス負荷後のゲルで非常に強く染まってリン酸化が亢進しているタンパク質スポットが見つかった[1]。このスポットは質量分析によりラミンA/Cと同定された。「基礎老化研究あれこれ」[2]ですでに紹介されているが、ラミンA/Cはハッチンソン・ギルフォード早老症候群（HGPS）の原因遺伝子LMNA遺伝子の産物である[3,4]。LMNA遺伝子異常はHGPSの他にも様々な遺伝病を引き起こすことが知られており、核構造や核膜タンパク質の機能の重要性が注目されることとなった。近年、ラミンAの正常な老化過程への関与も明らかにされてきている。本稿ではラミンの構造とHGPS発症の分子メカニズムを概説し、核ラミンの新たな機能を紹介する。

1. ラミンA/C

ラミンA/Cは中間径フィラメントの一種で、核内膜の核質側を裏打ちする核ラミナの構成成分である[5]。ラミンには他にB1、B2があり、それぞれLMNB1、LMNB2遺伝子から合成される[6,7]。これに対し、ラミンAもラミンCも第1番染色体1q21に存在するLMNA遺伝子の産物である。LMNAは12個のエクソンからなり、その

mRNAは骨格筋、心筋、胎盤に多く発現している。mRNAのスプライシングの違いによりラミンA（分子量74 kDa,等電点6.57）とラミンC（分子量65 kDa,等電点6.40）という2つのアイソフォームが産生される。ラミンAは664アミノ酸、ラミンCは572アミノ酸からなり、N末端側の566個のアミノ酸は共通である(図1)[8,9]。ラミンは核膜の構造を安定化し染色体を核膜につなぎとめる役割を果たしている。細胞分裂の際にはリン酸化により核ラミナ構造を可逆的に崩壊させる調節因子として機能している。22番目、390番目と392番目のSer残基のリン酸化が細胞分裂期の核膜崩壊に関わっていることが報告されている[10,11]。

2. ラミノパチー

LMNAの変異はハッチンソン・ギルフォード早老症候群（HGPS）[3,4]、常染色体型Emery-Dreifuss筋ジストロフィー（A-EDMD）[12,13]、近位筋優位の筋障害と心筋症を示す肢帯型筋ジストロフィー1B型（LGMD1B）[14]、家族性拡張型心筋症[15]、Dunnigan型家族性（部分性）リボジストロフィー（FPLD）[16]、軸索ニューロパチー（Charcot-Marie-Tooth病2型）[17]など常染色体優性および劣性の遺伝形式をとる様々な疾患を引き起こすことが知られており、これらの疾患はラミノパチーと総称される[18,19]。ラミノパチーは主に、横紋筋症、リボジストロフィー、末梢神経障害、早老症の4種類に分けることができ、表1に病名とそれらの代表的な変異と主症状をまとめて示した。ヒト遺伝病を生じるラミンAの変異に関しては、現在までに200以上の変異が報告されている。しかしながら、横紋筋症を生じる変異はラミンAのコーディング領域全体にわたっているなど、変異と症状を関連づけるのは困難であった。LMNA欠損

連絡先: 〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

Tel: 03-3964-3241 内線3010

Fax: 03-3579-4776

E-mail: megumi@tmig.or.jp

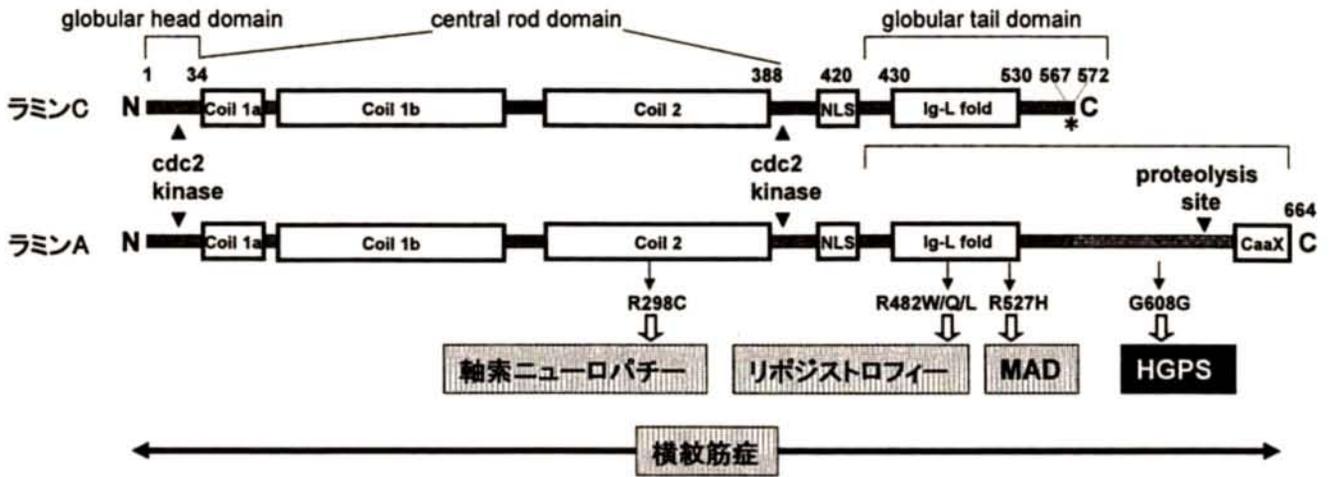


図1 ラミンA/Cのタンパク質構造の模式図

LMNA遺伝子は12個のエクソンから成り、選択的スプライシングによりラミンAとラミンCが生じる。ラミンAはエクソン10の途中から選択的スプライシングが生じ、エクソン11と12を用いて合成される。そのため、ラミンAとラミンCはN末端からほとんどの領域のアミノ酸配列は同じで、567番目から異なり、VSGSRR (図の*部分) がラミンCのC末端固有の配列である。ラミンAはC末端にCaaXモチーフが有り、ここでファルネシル化され、⁶⁶YL⁶⁶でプロテアーゼによる限定分解を受け成熟ラミンAとなる (図2参照)。核移行シグナル (NLS) は420番目のアミノ酸周辺に有り、Ig様の構造 (Ig-L fold) は430~530番目の領域に存在する。細胞分裂の際には22番目と392番目のセリン残基がcdc2 kinaseによってリン酸化される。ラミノパチーの主な変異の部位を示しているが、横紋筋症を生じる変異はラミンAのコーディング領域全体にわたっている。

マウスなどの研究から、ラミンA/C欠損により核の脆弱性が高まり、NF-κBシグナルが低下し機械的なストレスを受けやすくなることが筋ジストロフィーなどの発症につながると考えられている[20]。また、脂肪生成には細胞の増殖と分化を調節するretinoblastoma protein (Rb)やsterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1)などが関わっているが、LMNA異常によりRbの減少や局在の変化[21]やSREBP1のプロジェリン (第3節参照) との結合による局在の変化[22]が認められ、これらのことがリポジストロフィーの引き金になると考えられている。早老症として知られるウェルナー症候群はWRN遺伝子の変異によるヘリケース異常が主要因とされているが[23]、脂肪萎縮や糖尿病を伴う重症の非典型的ウェルナー症候群ではLMNAの変異も見つかっている[24]。

一方、LMNBの異常によるヒト遺伝病はほとんど知られていなかった。ラミンBが発育に必須でありLMNBの異常が致死的であることを反映しているのかもしれない[25]。最近、LMNB1の重複が常染色体優性白質ジストロフィーの病因となること[26]や、後天性部分性リポジストロフィー患者にLMNB2の変異があること[27]が報告されたが、ラミンBとヒト遺伝病発症との関連についての詳細はまだ明らかになっていない。ラミンは核膜内の様々なタンパク質と相互作用して核の機能を保っているが、それらのタンパク質の異常も多様な遺伝病を引き起こすことが知られており、核膜病と総称されている。エメリンの欠損によるX染色体型Emery-Dreifuss筋ジストロフィー (X-EDMD) [28]、ラミンB受容体をコードするLBRの変異によるPelger-Huët異常[29]やGreenberg骨格異形成[30]、MANIの変異による骨斑紋症、Buschke-Ollendorff症候群、蠟流骨症[31]などがあり、核膜の破綻がもたらすこれらの病気の分子機構の研究から核膜タンパク質の機能が明らかになりつつある。

3. ハッチンソン・ギルフォード早老症候群の分子メカニズム

HGPSは800万人に一人という極めてまれな常染色体優性の遺伝病であり、早老症の中では最も重篤な症状を呈する。ほとんどのHGPS患者でLMNA遺伝子のエクソン11の608番目のコドンに点変異 (C₁₈₂₄→T) が見つかっている。その結果G608Gのサイレント変異が生じる[3,4]。変異を持つ胎児はほぼ正常に生まれるが生後6~24ヶ月で発達遅滞、脱毛、骨形成異常、強皮症などを示し、通常5~10倍の速度で老化が進行し、平均13歳で冠動脈疾患や脳卒中によって死に至る。しかし、一般に脳は正常に機能し成長するため認知症等の症状は見られず、体格の急速な老化進行と正常な精神の発達との乖離が著しい。図2に正常なラミンAの成熟過程とHGPSの分子メカニズムを示した。通常、ラミンAはC末端にCAAXモチーフを持つプレラミンとして翻訳合成され、システイン残基のファルネシル化、メタロプロテアーゼ (FACE1, マウスホモログはZmpste24) によるプロセッシングを経て成熟ラミンと成る。HGPSの場合はLMNAの1824番目のCがTに変異しているため異常なスプライシングが生じ、メタロプロテアーゼによる切断部位を含む50アミノ酸を欠損したラミンAが生じる。その結果C末端がファルネシル修飾されたままの異常なラミンA (プロジェリン) が作り出される[32-34]。これが核ラミナへ取り込まれてプレブ形成などの核形態の異常を引き起こされるのである[35]。プロジェリンは細胞分裂時に細胞質や膜へ不溶物となって存在し、染色体分離異常や二核化が生じて細胞分裂が正常に進行しなくなる[36,37]。

拘束性皮膚障害 (Restrictive dermopathy (RD)) や下顎末端異形成症 (Mandibuloacral dysplasia (MAD)) 患者の中にはLMNAの変異が認められない症例が有り、これらはZmpste24の異常によりプロセッシングが起こら

A. ラミンAの成熟過程



B. Hutchinson-Gilford早老症候群(HGPS)

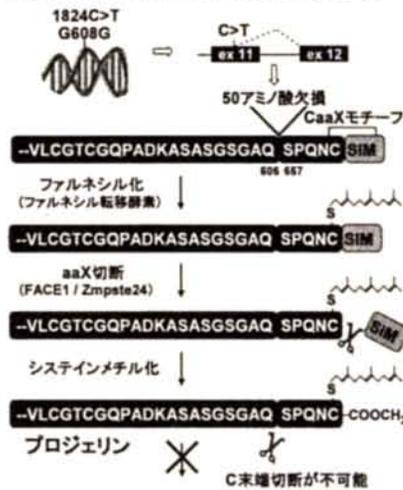


図2 ラミンAの成熟過程とハッチンソン・ギルフォード早老症候群の分子メカニズム (参考文献[63, 64]より改変)

A. ラミンAはC末端にCaaX (C:システイン, a:脂肪酸炭化水素を持つアミノ酸, X: どのアミノ酸でも可)モチーフを持つプレラミンとして翻訳合成される。まず、システイン残基がファルネシル化され、3アミノ酸残基(-aaX)が切断された後メチル化を受け、メタロプロテアーゼFACE1/Zmpste24によりC末端15アミノ酸が切断されて成熟ラミンとなる。B. HGPSではラミンAの1824番目のCがTに変異することにより、通常には無いmRNAスプライシング部位が生じて、FACE1/Zmpste24認識部位を含む50アミノ酸を欠損する。そのためプロセッシングが起これず、ファルネシル化されたままのラミン(プロジェリン)が生産される。

ずファルネシル修飾されたままの異常なラミンAが蓄積されHGPSと同様な早老症を呈する[32,38]。

HGPSの発症がプロジェリンの蓄積が引き金になることが明らかになったので、プロジェリンの発現を抑制する試みがなされた。ラミンAのファルネシル修飾を抑えるファルネシル転移酵素の阻害剤 (*rac*-R115777) によりGFP-プロジェリンを導入したHeLa細胞の核の形態異常やヘテロクロマチン異常の回復が認められた[39]。HGPS変異を導入したマウスでもファルネシル転移酵素阻害剤投与により症状が緩和され[40]、治療法として期待されている。また、HGPSのスプライシングを阻害する修飾オリゴヌクレオチドで細胞を処理することにより、核の形態異常やヘテロクロマチンの異常が回復することも明らかにされた[41]。

4. 生理的老化とラミン

しかし、ラミンAが正常な老化においても何らかの役割を担っているかどうかについてはわかっていなかった。2006年、Scaffidi と Misteliは、健康な細胞でもHGPSを引き起こす分子メカニズムが働いていることを報告した[42]。彼らは皮膚線維芽細胞を用いて、高齢者の核ではHGPS患者と同様に形態異常、DNA損傷の増加、ヒストンH3修飾の変化などの欠陥があり、そのような加齢に伴う核の欠陥はラミンAの隠れたスプライス部位が散発的に使用されることによって誘導されることを明らかにした。またMcClintockらは、新生児から97歳までの150人の非罹患者の皮膚生検の結果、低レベルではあるがあらゆる年齢でHGPSと同様のスプライシングが *in vivo* で起こっており、高齢者の皮膚ではプロジェリンの蓄積が認められることを報告した[43]。プロジェリン陽性の線維芽細胞は若齢者では基底膜・真皮の乳頭層に見られるが、高齢者では陽性細胞が増加しその局在も真皮の網状層に及ぶことが明らかになり、プロジェリンの発現は正常な細胞老化におけるバイオマーカーとなることが示唆された。HGPS患者と非罹患者の皮膚の線維芽細胞を用いた *in vitro* における細胞老化でも、継代後期で

はいずれもlamin A Delta 150 transcript (プロジェリン転写物)の増加が認められている[44]。また、正常な線維芽細胞に少量のプロジェリン発現細胞が存在しそれらが二核化していることが確認され、正常な老化過程でも細胞分裂異常が起きていることが明らかになった[36]。

5. 幹細胞とラミン

HGPS患者では間葉系起源の組織(骨、心筋、脂肪組織等)が侵されているが[45]、その詳細については不明であった。Scaffidi と Misteli はプロジェリンを過剰発現させた皮膚線維芽細胞でノッチシグナル経路の下流のエフェクターである *HES1*、*HES5*、*HEY1* などの発現が増加していることを見出した[46]。ノッチシグナル経路は幹細胞の分化における主要な制御機構である。そこでHGPSの患者の細胞のノッチシグナル関連因子を調べたところ、*HES1*、*HES5*、*HEY1* などの発現が健常者の細胞に比して多く、ノッチシグナルが活性化されていることがわかった。さらにヒトの間葉系幹細胞にプロジェリンを発現させるとノッチシグナルが活性化し骨細胞や脂肪細胞への分化能に異常を来して組織の機能低下をもたらすことを明らかにした。早老症のモデル動物である *Zmpste24* 欠損マウスでは前述のようにプロセッシングが起これず異常なラミンAが蓄積されて核ラミナの異常が見られる。この *Zmpste24* 欠損マウスにおいても毛包上皮幹細胞の増殖能と分化能の低下が認められ、その変化は核の形態異常と相関し、Wntシグナルの不活性化が認められた[47]。

6. 酸化ストレスとラミン

酸化ストレスは老化の要因の一つである[48,49]。高齢者の認知症やパーキンソン病の一因としても脳内で発生する酸化ストレスの関与が考えられている。特にドパミン神経細胞はドパミン代謝に伴い細胞質内で絶えず活性酸素が作られているために最も酸化ストレスの影響を受けやすい細胞である。我々はドパミン代謝能を持つヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞が6-hydroxydopamine (6-

OHDA) による酸化ストレス負荷を受けるとelongation factor 2、Lamin A/C、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3、およびT-complex protein 1のリン酸化状態が変化することを見出した[1]。細胞分画により、このラミン A/Cと同定されたスポットは核分画にのみ認められた。抗ラミン A/C抗体を用いたWestern blottingにより、このスポットと他の等電点の異なるPro-Q Diamond陰性スポットが検出され、酸化ストレス負荷によりリン酸化されたスポットへのシフトが生じていることが明らかになった。さらに、酸化ストレス負荷におけるラミンの挙動を、できるだけ生理的条件下で他の蛋白質との相互作用を保った状態で解析することを試みた[50]。「ブルーネーティブ電気泳動 (BN-PAGE)」法は、非変性条件下で複合体構造を保ったまま蛋白質を分離することが可能であるとされている[51,52]。そこで、6-OHDAによる酸化ストレス負荷後、中性非変性条件下で蛋白質を抽出しBN-PAGEを行った。1-D BN-PAGE後のWestern blottingの結果、ラミン A/C抗体陽性のバンド (300kDa) は酸化ストレス負荷により増加することがわかった。2-D BN/SDS-PAGEによりタンパク質複合体の構成成分を分離させ、タンパク質スポットを切り出しトリプシン消化を行って質量分析による同定を試みた結果、300 kDaバンドの主たる蛋白質はheat shock protein 90 (Hsp90)であることが明らかになった。さらにHsp90抗体を用いて1-D BN-PAGE後のWestern blottingを行ったところ、ラミン A/C抗体陽性のバンドはHsp90抗体でも陽性であった。細胞全体のラミン A/Cの発現量の酸化ストレス負荷による顕著な変化は認められず、Hsp90結合型のラミン A/Cがストレス応答により増加することがわかった。このラミンがどのような構造変化を受けているか、またHsp90との相互作用の詳細について現在検討を進めている。

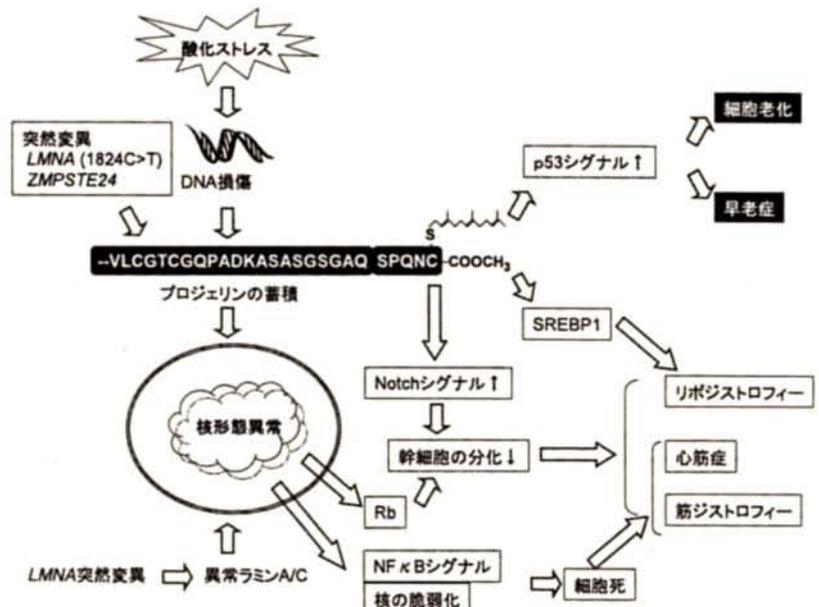


図3 細胞老化および疾患におけるラミンAの関わり

ラット腎臓におけるプロテオミクス解析においても酸化ストレスによりS-チオール化されるタンパク質の一つとしてラミンA/Cが同定されている[53]。

LMNA遺伝子異常を伴うamyotrophic quadricipital syndromeの患者は血液中のチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) とカルボニル化タンパク質の濃度が健常者に比べて高く、酸化ストレスが亢進していることが示唆された[54]。また、R439CあるいはR482Wのアミノ酸置換による家族性 (部分性) リポジストロフィー (FPLD) 患者の線維芽細胞では、通常の培養条件下では健常者の細胞と顕著な差は認められなかったが、過酸化水素による酸化ストレス負荷により細胞内ROSが異常に亢進することから、これらの変異が酸化ストレスに対する感受性を高める可能性が示唆された[55]。

p53過剰発現マウスは早老症状を示すことなどからp53タンパク質は老化過程に重要な役割を果たしていることが知られている[56,57]。酸化ストレスによる細胞老化促進機構においてもNAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素を介してp53活性が制御されている[58,59]。

表1 ラミノパチー

病名 (略称)	遺伝形式	原因遺伝子 ²⁾	症状	文献
横紋筋症	優性遺伝	LMNA	骨格筋異常、心筋症	12
			常染色体型Emery-Dreifuss筋ジストロフィー (A-EDMD)	13
			拡張型心筋症 (DCM)	15
肢体型筋ジストロフィー 1B型 (LGMD1B)	優性遺伝	LMNA	骨格筋異常、心筋症	14
リポジストロフィー	優性遺伝	LMNA ³⁾ (R482W/Q/L)	インスリン抵抗性糖尿病、脂肪萎縮	16
末梢神経障害症	劣性遺伝	LMNA (R298C)	運動・感覚神経障害	17
早老症	優性遺伝	LMNA (G608G)	脱毛、頭部肥大、骨粗鬆症、動脈硬化	3, 4
			非定型Werner症候群 (aWS)	24
下顎末端異形成症 ¹⁾ [mandibuloacral dysplasia (MAD)]	劣性遺伝	LMNA ⁴⁾ (R527H)	糖尿病、骨粗鬆症、動脈硬化、脂肪萎縮	62
			ホモ接合体 ZMPSTE24	38
拘束性皮膚障害 (RD)	劣性遺伝	LMNA ⁴⁾ ZMPSTE24	皮膚異形成、子宮内胎児発育遅延、小下顎症	32

表1. ラミノパチー

1) MADはリポジストロフィー症状を伴うため、リポジストロフィーの分類に入れることもある。LMNA異常が病因と考えられる病気の中には多様な症状を呈しこれらの混合型とされるものもある。
2) LMNAの変異は代表的なものを示した。横紋筋症を生じる変異はラミンAのコーディング領域全体にわたっており、アミノ酸置換か1アミノ酸の欠失変異が生じていることが多い。
3) FPLDを発症する変異の多くはLMNAのエクソン8領域に集中しており85%は482番目のアルギニンが置換されている。
4) MADおよびRD患者ではLMNA異常が認められない症例がある。その場合、プロセシング酵素を発現するZMPSTE24に変異が生じていてプロジェリンの蓄積が確認された。LMNAとZMPSTE24がともに異常を呈する症例もある。

早老症モデルであるZmpste24欠損マウスではp53シグナル経路が活性化されていることが明らかになった[60]。さらに大腸癌由来のHCT116細胞のプロテオーム解析により、マイトマイシンで細胞内p53を活性化するとラミンA/Cの発現が増加しp53シグナルの標的タンパク質の一つであることもわかった[61]。

おわりに

遺伝情報が集積している核は細胞の要である。核膜は核の構築に必須であり、核・細胞質間の分子輸送、シグナル伝達、遺伝子発現制御、核の高次構造の決定などの機能に関与していることが知られていた。この10年間のラミノパチーの解析から、ラミンAがいかに重要な役割を担っているかがクローズアップされることとなった。現在までに明らかになったラミンAの機能をまとめると以下の通りである。1) 他の核膜タンパク質や細胞骨格タンパク質との相互作用による核構造の物理的な安定化とNF κ Bシグナルによるストレス応答で機械的なストレスに対処する。2) Rbと結合しRb-E2Fによる転写抑制を安定化して細胞分裂を制御する。3) SREBP1を介した脂肪合成を制御する。4) 間葉系幹細胞の分化に関与するノッチシグナル経路を制御する。5) 細胞老化に関わるp53シグナル経路を制御する(図3)。

HGPS患者は世界で50人に満たない。HGPSの分子機構が明らかになり、HGPS診断用遺伝子検査キットが開発され、2008年にファルネシル転移酵素の阻害剤を用いた臨床治験が開始された。HGPSの研究によってごくわずかの不運な人々に福音がもたらされたと思われていたが、HGPS非罹患高齢者でもプロジェリンが作られるというScaffidiとMisteli[42]の画期的な発見により、すべての人々の関心事となった。ラミンAをはじめとする核膜タンパク質が抗老化薬の標的物質としても注目を集めることとなり、老化メカニズムの研究が急展開したのである。もちろんたった一つの遺伝子で老化は語れないが、HGPSの分子メカニズムが老化の謎解きの鍵となったことは間違いない。上述したタンパク質以外にも多くのタンパク質がラミンA/Cと相互作用することが知られているが、それらの詳細やラミンA/C自体の翻訳後修飾などについてはまだ不明な点が多く、今後の研究が期待される。

参考文献

1. Nakamura, M., Yamada, M., Ohsawa, T., Morisawa, H., Nishine, T., Nishimura, O., Toda, T. Phosphoproteomic profiling of human SH-SY5Y neuroblastoma cells during response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 977-989, 2006.
2. 白澤卓二 基礎老化研究あれこれ(4) 映画と老化研究. *基礎老化研究*. 29: 53-54, 2005.
3. De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., Le Merrer, M., Levy, N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300: 2055, 2003.
4. Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W., Collins, F. S. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423: 293-298, 2003.
5. Stuurman, N., Heins, S., Aebi, U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* 122:42-66, 1998.
6. Lin, F., Worman, H. J., Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics*. 27: 230-236, 1995.
7. Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S., Falaschi, A. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-Phase. *Mol. Cell Biol.* 12: 3499-3506, 1992.
8. Mckeon, F.D., Kirschner, M. W., Caput, D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319: 463-468, 1986.
9. Fisher, D. Z., Chaudhary, N., Blobel, G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6450-6454, 1986.
10. Heald, R., Mckeon, F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61: 579-589, 1990.
11. Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., Nigg, E. A. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61: 591-602, 1990.
12. Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizbereá, J. A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D., Schwartz, K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* 21: 285-288, 1999.
13. Raffaele di Barletta, M., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Morandi, L., Ro-

- morini, A., Voit, T., Orstavik, K. H., Merlini, L., Trevisan, C., Biancalana, V., Housmanowa-Petrusewicz, I., Bione, S., Ricotti, R., Schwartz, K., Bonne, G., Toniolo, D. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1407-1412, 2000.
14. Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, A. J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P. A., de Visser, M., Schwartz, K. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Molec. Genet.* 9: 1453-1459, 2000.
15. Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H. J., Jr, Spudich, S., De Girolami, U., Seidman, C. E. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New Eng. J. Med.* 341: 1715-1724, 1999.
16. Cao, H., Hegele, R. A. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Molec. Genet.* 9: 109-112, 2000.
17. De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J. M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepietowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C. L., Grid, D., Levy, N. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 726-736, 2002.
18. Broers, J. L. V., Ramaekers, F. C. S., Bonne, G., Ben Yaou, R., Hutchison, C. J. Nuclear Lamins: Laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol. Rev.* 86: 967-1008, 2006.
19. Worman, H. J., Bonne, G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell Res.* 313: 2121-33, 2007.
20. Lammerding, J., Schulze, P. C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R. D., Stewart, C. L., Lee, R. T. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* 113: 370-378, 2004.
21. Johnson, B. R., Nitta, R. T., Frock, R. L., Mounkes, L., Barbie, D. A., Stewart, C. L., Harlow, E., Kennedy, B. K. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9677-9682, 2004.
22. Capanni, C., Mattioli, E., Columbaro, M., Lucarelli, E., Parnaik, V. K., Novelli, G., Wehnert, M., Cenni, V., Maraldi, N. M., Squarzoni, S., Lattanzi, G. Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 14: 1489-1502, 2005.
23. Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G. M., Mulligan, J., Schellenberg, G. D. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272: 258-62, 1996.
24. Chen, L., Lee, L., Kudlow, B. A., Dos Santos, H. G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E. G., Garg, A., Hanson, N. B., Martin, G. M., Mian, I. S., Kennedy, B. K., Oshima, J. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362: 440-445, 2003.
25. Vergnes, L., Peterfy, M., Bergo, M. O., Young, S. G., Reue, K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10428-10433, 2004.
26. Padiath, Q. S., Saigoh, K., Schiffmann, R., Asahara, H., Yamada, T., Koeppen, A., Hogan, K., Ptaček, L. J., Fu, Y-H. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nature Genet.* 38: 1114-1123, 2006.
27. Hegele, R. A., Cao, H., Liu, D. M., Costain, G. A., Charlton-Menys, V., Rodger, N. W., Durrington, P. N. Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 383-389, 2006.
28. Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G., Toniolo, D. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet.* 8: 323-327, 1994.
29. Hoffmann, K., Dreger, C. K., Olins, A. L., Olins, D. E., Shultz, L. D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Müller, D., Vayá, A., Aznar, J., Ware, R. E., Sotelo Cruz, N., Lindner, T. H., Herrmann, H., Reis, A., Sperling, K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). *Nat*

- Genet. 31:410-414, 2002.
30. Waterham, H. R., Koster, J., Mooyer, P., Noort Gv, G., Kelley, R. I., Wilcox, W. R., Wanders, R. J., Hennekam, R. C., Oosterwijk, J. C. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 72:1013-1017, 2003.
 31. Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P. C., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S. J., Savarirayan, R., Van Hul, W., Vanhoenacker, F., Huylebroeck, D., De Paepe, A., Naeyaert, J. M., Vandesompele, J., Speleman, F., Verschueren, K., Coucke, P. J., Mortier, G. R. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet.* 36:1213-1218, 2004.
 32. Navarro, C. L., Cadin˜anos, J., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Courrier, S., Boccaccio, I., Boyer, A., Kleijer, W. J., Wagner, A., Giuliano, F., Beemer, F. A., Freije, J. M., Caul, P., Hennekam, R. C. M., Lo´pez-Ot˜n, C., Badens, C., Le´vy, N. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of lamin A precursors. *Hum. Mol. Genet.* 14: 1503-1513, 2005.
 33. Bergo, M. O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., Wisner, E. R., van Bruggen, N., Carano, R. A. D., Michaelis, S., Griffey, S. M., Young, S. G. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13049-13054, 2002
 34. Young, S. G., Meta, M., Yang, S. H., Fong, L. G. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J. Biol. Chem.* 281: 39741-39745, 2006.
 35. Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., Collins, F. S. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8963-8968, 2004.
 36. Cao, K., Capell, B. C., Erdos, M. R., Djabali, K., Collins, F. S. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 4949-4954, 2007.
 37. Dechat, T., Shimi, T., Adam, S. A., Rusinol, A. E., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Sinen-sky, M. S., Goldman, R. D. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 4955-4960, 2007.
 38. Agarwal, A. K., Fryns, J. P., Auchus, R. J., Garg, A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1995-2001, 2003.
 39. Mallampalli, M. P., Huyer, G., Bendale, P., Gelb, M. H., Michaelis, S. Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14416-14421, 2005.
 40. Yang, S. H., Meta, M., Qiao, X., Frost, D., Bauch, J., Coffinier, C., Majumdar, S., Bergo, M. O., Young, S. G., Fong, L. G. A farnesyl-transferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J. Clin. Invest.* 116: 2115-2121, 2006
 41. Scaffidi, P., Misteli, T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med.* 11: 440- 445, 2005.
 42. Scaffidi, P., Misteli, T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312: 1059-1063, 2006.
 43. McClintock, D., Ratner, D., Lokuge, M., Owens, D. M., Gordon, L. B., Collins, F. S., Djabali, K. The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS ONE* 2 (12): e1269, 2007.
 44. Rodriguez, S., Coppedˆ, F., Sagelius, H., Eriksson, M. Increased expression of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging. *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 928-937, 2009.
 45. Hennekam, R. C. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* 140: 2603-2624, 2006.
 46. Scaffidi, P., Misteli, T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* 10: 452-459, 2008.
 47. Espada, J., Varela, I., Flores, I., Ugalde, A.

- P., Cadiñanos, J., Pendás, A. M., Stewart, C. L., Tryggvason, K., Blasco, M. A., Freije, J. M. P., López-Otin, C. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J. Cell Biol.* 181: 27-35, 2008.
48. Butterfield, D. A., Kanski, J. Brain protein oxidation in age-related neuro-degenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech. Ageing Dev.* 122: 945-962, 2001.
49. Harman, D. Free radical theory of Aging: An update. Increasing the functional life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067: 10-21, 2006.
50. Nakamura, M., Morisawa, H., Imajoh-Ohmi, S., Takamura, C., Fukuda, H., Toda, T. Proteomic analysis of protein complexes in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by using blue-native gel electrophoresis: An increase in lamin A/C associated with heat shock protein 90 in response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress. *Exp. Gerontol.* 44: 375-382, 2009.
51. Schägger, H., von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231, 1991.
52. Schägger, H., Cramer, W. A., von Jagow, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230, 1994.
53. Eaton, P., Jones, M. E., McGregor, E., Dunn, M. J., Leeds, N., Byers, H. L., Leung, K., Ward, M. A., Pratt, J. R., Shattock, M. J. Reversible cysteine-targeted oxidation of proteins during renal oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: S290-S296, 2003.
54. Charniot, J. C., Bonnefont-Rousselot, D., Marchand, C., Zerhouni, K., Vignat N., Peynet, J., Plotkine, M., Legrand, A., Artigou, J. Y. Oxidative stress implication in a new phenotype of amyotrophic quadricipital syndrome with cardiac involvement due to lamin A/C mutation. *Free Radic. Res.* 41: 424-431, 2007.
55. Verstraeten, V. L., Caputo, S., van Steensel, M. A., Duband-Goulet, I., Zinn-Justin, S., Kamps, M., Kuijpers, H. J., Ostlund, C., Worman, H. J., Briedē, J. J., Le Dour, C., Marcelis, C. L., van Geel, M., Steijlen, P. M., van den Wijngaard, A., Ramaekers, F. C., Broers, J. L. The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress. *J. Cell Mol. Med.* 13: 959-971, 2009.
56. Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Hee Park, S., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A., Donehower, L. A. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415:45-53, 2002.
57. Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M., Scrable, H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* 18: 306-319, 2004.
58. Furukawa, A., Tada-Oikawa, S., Kawanishi, S., Oikawa, S. H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. *Cell Physiol. Biochem.* 20:45-54, 2007.
59. 及川伸二、古川絢子、村田真理子、川西正祐 酸化ストレスによるDNAやタンパク質の損傷を介した老化促進機構. *基礎老化研究* 33: 9-16, 2009.
60. Varela1, I., Cadiñanos1, J., Penda's1, A. M., Gutierrez-Fernandez1, A., Folgueras1, A. R., Sa'nchez1, L. M., Zhou, Z., Rodriguez1, F. J., Stewart, C. L., Vega, J. A., Tryggvason, K., Freije1, J. M. P., López-Oti'n, C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437: 564-568, 2005.
61. Rahman-Roblick, R., Roblick, U. J., Hellman, U., Conrotto, P., Liu, T., Becker, S., Hirschberg, D., Jo' rnvall, H., Auer, G., Wiman, K. G. p53 targets identified by protein expression profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 5401-5406, 2007.
62. Novelli, G., Muchir, A., Sangiuolo, F., Helbling-Leclerc, A., D'Apice, M. R., Massart, C., Capon, F., Sbraccia, P., Federici, M., Lauro, R., Tudisco, C., Pallotta, R., Scarano, G., Dallapiccola, B., Merlini, L., Bonne, G. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 426-431, 2002.
63. Mattout, A., Dechat, T., Adam, S. A., Goldman, R. D., Gruenbaum, Y. Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:335-341, 2006.
64. Scaffidi, P., Gordon, L., Misteli, T. The cell nucleus and aging: Tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS Biology* 3: e395, 2005