

平成 22 年 4 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790257
 研究課題名（和文）ヌクレオフォスミン変異が腫瘍にもたらす分子病態の解明
 研究課題名（英文）Molecular basis of Nucleophosmin mutation in tumor
 研究代表者
 坂下 暁介 (SAKASHITA GYOSUKE)
 島根大学・医学部・助教
 研究者番号：00397457

研究成果の概要（和文）：Aurora-B は *in vitro* において、NPM1 の S293 および S143 をリン酸化した。しかしながら、細胞内において S143 のリン酸化を検出することはできなかった。S293 のリン酸化は NPM1 の細胞内局在、オリゴマー形成能および p19ARF、Nucleolin などの既知の NPM1 結合タンパク質との相互作用のいずれにも影響を及ぼさないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Aurora-B phosphorylates NPM1 on S293 and S143 *in vitro*. However, phosphorylation of S143 was not detected *in vivo*. Phosphorylation of NPM1 on S293 does not involve in its subcellular localization, oligomerization and interaction with known NPM1 binding protein such as p19ARF or Nucleolin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

1) NPM1 と癌

NPM1 は全ての組織に豊富に発現するリン酸化タンパク質である。ほとんどの NPM1 は核小体に局在しているが、一部は中心体にも存在することが知られている。現在までに、癌における NPM1 の過剰発現、変異、遺伝子転座が多数報告され、NPM1 の異常と腫瘍の発生・進行との関係が注目されている。NPM1 は

細胞内で NPM1 同士のオリゴマーを形成し、核小体でリボソーム RNA の生合成、p53 や ARF などの癌抑制遺伝子を制御し、中心体では中心体複製の制御を介して染色体の安定性の維持など多様な機能を発揮する。NPM1 ノックアウトマウスの解析では、ホモ欠損は胎生致死、ヘテロ欠損においても中心体の異常な複製による染色体の不安定性を示し、NPM1 が細胞の生存と恒常性の維持に必須な役割を果たすことが裏付けられた。

最近、AML患者の約30%においてNPM1遺伝子の終止コドン近傍に、4塩基の挿入にともなうフレームシフト変異が見つかった。フレームシフト型NPM1では、NPM1タンパク質のC末端に存在する核小体移行シグナルが消失し、NPM1は核小体ではなく細胞質に局在ようになる。このようなNPM1の変異の有無は、AMLの病態と強い相関があり、NPM1の細胞内局在の変化がAMLの発生および予後に深く関与していると考えられている。

NPM1にはC末端側37アミノ酸を持たないスプライシングバリエーションが存在し、NPM1.2と呼ばれている。NPM1.2は核小体移行シグナルを持たないため、ほとんどが核質に存在する。しかしNPM1.2はNPM1とオリゴマーを形成するため、一部は核小体にも存在する。NPM1.2はNPM1と比べて発現量が低いこともあり、これまであまり注目されておらず、癌との関連も不明である。

2) NPM1のリン酸化による制御

現在のNPM1研究は、核小体や中心体でその機能がどのように制御されているか、そしてフレームシフトをはじめとした変異型NPM1の脱制御が細胞に及ぼす影響に焦点が当てられている。とりわけ重要と考えられているのが、NPM1のリン酸化による制御である。これまでに、NPM1は複数のプロテインキナーゼによりリン酸化されることが報告されている。しかしその詳細に関しては不明な点が多い。注目すべきは、NPM1のリン酸化酵素には細胞周期関連のプロテインキナーゼが多いことである。このことは、NPM1の機能が細胞周期と密接な関係にあることを示唆している。NPM1.2にも同様のリン酸化部位が存在するが、実際にリン酸化を受けるかは検討されていない。

3) Auroraと癌

Auroraは細胞周期のG2/M期特異的に活性化するセリン/スレオニンキナーゼであり、哺乳類には3種類(Aurora-A、Aurora-B、Aurora-C)が存在する。Aurora-AとAurora-B/Cの機能はまったく異なっており、Aurora-Aが中心体に局在して中心体の成熟や分裂期での紡錘体極のはたらきを制御するのに対し、Aurora-B/Cはセントロメア内側からダイナミックに局在を移行しながら染色体の均等分配や細胞質分裂を制御する。いずれも癌細胞において高発現しており、標的タンパク質の過剰なリン酸化が癌形質の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

着想および予備実験

筆者はこれまでにAuroraのG2/M期特異的な活性化メカニズムの解析や、新規標的タンパク質の探索をおこなってきた。この過程において、Aurora-Bの結合タンパク質を質量分析で解析したところ、NPM1が見つかった。さ

らに、ごく一部のAurora-BがG2後期の細胞において核小体にも局在することを見出した。NPM1がNPM1.2とオリゴマーを形成することからも、AuroraとNPM1/NPM1.2には何らかのつながりがあるのではないかと考えた。さらに興味深いことにNPM1のC末端のアミノ酸配列R-K-S₂₉₃-Lは、Auroraの標的配列R-X-S/T(Xは任意)に合致した。そこで筆者はまず、NPM1のS293がAuroraによってリン酸化される可能性について検討を重ね、以下の結果を得た。

- Aurora-AとAurora-Bはin vitroにおいてNPM1のS293に加え、S293をもたないNPM1.2もリン酸化した。これらの部位は、NPM1の既知のリン酸化部位とは異なっていた。
- 特異的リン酸化抗体を作製し、NPM1のS293がin vivoでもG2/M期特異的にAuroraによってリン酸化されることを明らかにした。
- NPM1.2特異的な抗体を作製し、細胞内でNPM1.2もAuroraによりリン酸化されることを見出した。

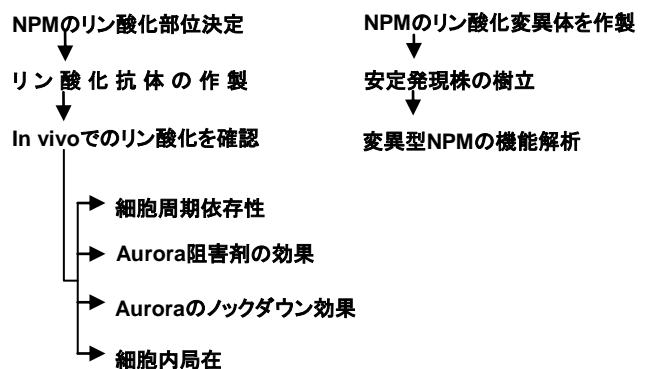
2. 研究の目的

①AuroraによるNPM1とNPM1.2のリン酸化部位をすべて決定し、これらのリン酸化の細胞内における特徴づけをおこなう。②AuroraによるNPM1およびNPM1.2のリン酸化が、NPM1/NPM1.2の局在や機能に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、NPMのAuroraによるリン酸化部位の同定から細胞内での特徴づけまでを第一段階、リン酸化によるNPMの機能制御を第二段階と位置付けることにした(下図参照)。

第一段階ではまず、in vitroにおいてAuroraによるNPMのリン酸化部位をすべて決定することを試みた。つぎに、それぞれ同定した部位に対する特異的リン酸化抗体を作製した。そして作製したリン酸化抗体をもちいて、



細胞内での G2/M 期特異的なリン酸化を検討した。さらに、Aurora のノックダウンあるいは阻害剤の使用により、そのリン酸化酵素が Aurora であることを証明する。リン酸化抗体をもちいた免疫染色をおこない、リン酸化 NPM の G2/M 期における細胞内局在を明らかにする。G2/M 期での Aurora-A と Aurora-B の細胞内局在はまったく異なるので、リン酸化 NPM の細胞内局在の情報から、リン酸化を担うのが Aurora-A なのか Aurora-B なのかを裏付けることができる。以上の実験により、細胞内で Aurora と NPM がキナーゼと基質タンパク質の関係にあることを証明する。

第二段階ではまず、同定したリン酸化部位に対するそれぞれ 2 種類の変異体を作製する。ひとつは非リン酸化タイプであるアラニン置換型、もうひとつはリン酸化模倣タイプであるアスパラギン酸置換型である。これらを哺乳類発現ベクターに組み込んだ後、培養細胞に導入して安定発現株を樹立する。この細胞株をもちいて、変異型 NPM の細胞増殖、特に中心体複製と分裂期の進行への影響を明らかにする。同時に免疫染色およびタイムラプス顕微鏡観察により NPM の動態を検討し、Aurora による NPM のリン酸化が NPM の細胞内局在に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

- オーロラによるヌクレオフォスミンのリン酸化部位を検討した。ヌクレオフォスミンを 3 つの断片に分割し、それぞれ大腸菌より精製し、試験管内においてオーロラ B によるリン酸化反応をおこなった。その結果、すでに同定した 293 番目のセリン残基の他に、143 番目のセリン残基が弱いながらもリン酸化を受けることが明らかとなった。そこで、143 番目のセリン残基のリン酸化ペプチドを合成し、特異的リン酸化抗体の作製を試みた。6 匹のマウスに免疫をおこなったが、抗体の力価は上昇が認められたものの、オーロラが活性化する分裂期に同調培養した細胞抽出液には反応が見られなかった。この結果から、143 番目のセリン残基のリン酸化は試験管内反応におけるアーチファクトであることが示唆された。したがって、現在までに明らかになっているヌクレオフォスミンのオーロラによるリン酸化部位は 293 番目のセリン残基のみである。
- siRNA により、オーロラ B の活性化因子である INCENP をノックダウンしたときのみ、分裂期における NPM1293 番目のセリン残基のリン酸化が抑制された。

この結果より、細胞内においてオーロラ B が NPM1 の 293 番目のセリンに対するリン酸化酵素であることが明らかとなった。

- NPM1 の 293 番目のセリン残基のリン酸化は、ヌクレオフォスミンのオリゴマー形成能および細胞内局在には影響を及ぼさないことが明らかとなった。
- 野生型、S293A、S293D およびフレームシフト型 NPM 遺伝子に FLAG-HA-EGFP タグを付加した。これらをレトロウイルスベクターに組み込み、セルソーティングにより安定発現細胞株を樹立した。得られた NPM1 の安定発現細胞株を用いて、タイムラプス蛍光観察をおこなった。間期および分裂期を通して、野生型および S293 の変異型 NPM1 の時間的および空間的な挙動に差異は認められなかった。また、フレームシフト型 NPM はこれまでの報告通り、細胞質に局在していた。
- NPM1 の 293 番目のセリン残基のリン酸化は、NPM1 と既知の NPM1 結合タンパク質である p19ARF、Nucleolin との結合には影響しなかった。

本研究により、細胞内において NPM1 がオーロラ B により受けるリン酸化部位は 293 番目のセリン残基のみであることが明らかとなった。このリン酸化は、NPM1 の細胞内局在、NPM1 のオリゴマー形成能、既知の NPM1 結合タンパク質として知られる p19ARF および Nucleolin との結合には影響を及ぼさないことが明らかとなった。この結果は NPM1 の 293 番目のリン酸化が、分裂期における NPM1 の未知の機能への関与を示唆するものであり、更なる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- Ban R, Matsuzaki H, Akashi T, Sakashita G, Taniguchi H, Park S-Y, Tanaka H, Furukawa K and Urano T.: Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases. *J. Biol. Chem.* 284: 28367-28381, 2009, 査読有
- Ishikawa Y, Xu J, Sakashita G, Urano T, Suzuki T, Tomita A, Kiyoi H, Nakamura S, Naoe T.: Abnormal cytoplasmic dyslocalisation and/or reduction of nucleophosmin protein level rarely occurs in myelodysplastic syndromes.

Leuk. Lymphoma. 49: 2359-2364, 2008、
査読有

[学会発表] (計1件)

①坂下 暁介、浦野 隼、新規シタキシン
ファミリーの同定と機能解析、BMB2008, 2008
年12月9日、神戸

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂下 暁介 (SAKASHITA GYOSUKE)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 00397457

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: