

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570228

研究課題名(和文) Nup98機能異常による細胞がん化メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of Nup98-fusion mediated oncogenesis.

研究代表者

岡 正啓 (Oka, Masahiro)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：40432504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレオポリンNup98融合遺伝子産物は白血病の病因因子として知られているが、その発がんメカニズムは依然として不明な点が多い。本研究によってNup98融合遺伝子産物Nup98-Hoxが局在する核内ドット構造はヘテロクロマチン近傍で特異的なヒストン修飾と高頻度に共局在を示すことが分かった。さらに、これらのドット構造はNup98のFGリピート領域、そしてNup98-Hox結合因子群によって維持されていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The function of oncogenic Nup98-fusion protein remains almost unknown. Our study demonstrated that Nup98-Hox localizes as small dots in the nucleus that frequently associated with specific histone modifications. Furthermore, the formation of these nuclear dots was dependent on the FG repeats of Nup98 and its associated factors.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ヌクレオポリン 核膜孔 Nup98 白血病 Hox ヒストン

1. 研究開始当初の背景

核膜孔複合体は約30種類のクレオポリンと呼ばれる構成因子により形成されている。ヌクレオポリンは、核-細胞質間物質輸送のみならず、遺伝子発現や細胞周期の制御といった様々な生命現象と深く関わっていることが近年明らかとなってきた。一方、これまで複数のヌクレオポリンの機能異常が様々な病態に結びついていることが報告されているが、それらのメカニズムは依然として不明な点が多い。ヌクレオポリンのひとつである Nup98 は現在までに少なくとも30種類の異なる生理活性を持つパートナー遺伝子との融合遺伝子を形成することが報告されており、これらは急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、骨髄異形成症候群(MDS)において発現が確認されている。さらにマウスを用いた実験により、Nup98 融合遺伝子の発現が白血病の病因となる事が証明されている。Nup98 のパートナー遺伝子としてはホメオボックス転写因子(HoxA9, HoxD13, PMX1 等)、DNA トポイソメラーゼ(TOP1, TOP2B)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ(NSD1, NSD3)、グアニンヌクレオチド交換因子(RAP1GDS1)、膜骨格タンパク質(Adducin-3)など、様々な生理活性を持つ遺伝子が知られているが、これらの Nup98 融合遺伝子の発現による発がんメカニズムを説明できるモデルは未だに存在しない。

2. 研究の目的

本研究では Nup98 融合遺伝子産物による発がんメカニズムを解明する。特にヒト Nup98 の N 末端 FG 領域とホメオボックス転写因子 HoxA9 のホメオドメインを含む C 末端領域から成る融合タンパク質 Nup98-HoxA9 (以下、Nup98-Hox) に着目し、その核内ドット構造の解析、結合因子群の同定・機能解析などを行い、Nup98-Hox 発現による細胞がん化メカニズムの解明を目指す。さらに、ホメオボックス転写因子以外のパートナーを持つ Nup98

融合タンパク質についても解析を行い、すべての Nup98 融合タンパク質で共通に保存されている Nup98FG リピートの機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Nup98 融合タンパク質 Nup98-Hox 核内ドット構造の解析、および結合因子の同定、機能解析：Nup98-Hox の発現ベクターを作成し、哺乳培養細胞に発現させ、Nup98-Hox の核内ドット構造の局在を各種抗体を用いた共免疫染色により解析した。さらに、タグ付き Nup98 - Hox 融合遺伝子産物を安定に発現する培養細胞株を樹立し、Pull-down を行い結合タンパク質を単離し、質量分析法により同定した。更にこれらの因子に関して遺伝子ノックダウンを行い、その影響を解析した。

(2) Nup98 融合タンパク質のドメイン解析：Nup98 融合タンパク質は様々なパートナー因子と Nup98FG リピート領域の融合で形成されることが分かっている。そこで、Hox 以外のパートナーを持つ Nup98 融合遺伝子、さらに Nup98FG リピート領域を他のヌクレオポリンの FG リピート領域に置き換えた新規の融合タンパク質の発現ベクターを作成し、哺乳細胞で発現させ、細胞内動態を解析した。

4. 研究成果

(1) Nup98 融合タンパク質 Nup98-Hox 核内ドット構造の解析：Nup98-Hox ドット構造は高頻度に DAPI 染色で濃く染まるヘテロクロマチン領域近傍に配置していることが分かった。さらに、様々な抗修飾ヒストンモノクローナル抗体で共染色を行った結果、特異的なヒストン修飾と高頻度に共局在を示すことが分かった。

(2) Nup98 融合タンパク質のドメイン解析：Nup98 - Jarid1a、Nup98-NSD1 などの Nup98-Hox 以外の融合タンパク質も核内でドット構造を形成することが分かった。しかしながら、ドットを形成する細胞の割合や、ド

ットの数、大きさなどは Nup98-Hox とは相違が認められた。また、Nup98-Hox の Nup98FG 領域を、Nup214、Nup153、POM121 などの FG リピート領域と入れ換えた融合タンパク質の発現ベクターを作成し、局在を解析した。その結果、Nup98 以外の FG リピート領域と Hox の融合タンパク質では、核内ドット構造への局在化は観察されなかったことから、Nup98FG 領域特異的な機能が核内ドット構造の形成に重要であることが分かった。

(3) Nup98 融合タンパク質結合因子の同定、機能解析: Nup98-Hox に結合する複数の因子を同定した。さらに、これらの因子の siRNA ノックダウンを行い、Nup98-Hox への影響を観察した。その結果、一部の結合因子に関しては、それらのノックダウンによって Nup98-Hox の核内ドットの数や大きさが減少することが分かった。また、これまで Nup98-Hox との関連が示唆されている幾つかの Hox 遺伝子の発現が有意に低下することが分かった。これらのことから、Nup98-Hox 融合タンパク質の核内ドット構造は Nup98FG リピート領域、そして特異的な結合因子群によって維持され機能していることが示唆された。

〔雑誌論文〕(計4件)

Sangel P, Oka M, Yoneda Y. The role of Importin- s in the maintenance and lineage commitment of mouse embryonic stem cells. FEBS Open Bio., 4:112-120, 2014 査読有
DOI: 10.1016/j.fob.2014.01.001.

Mizuguchi-Hata C, Ogawa Y, Oka M and Yoneda Y. Quantitative regulation of nuclear pore complex components by O-GlcNAcylation. Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research, 1833:2682-2689, 2013 査読有
DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.06.008

Tanaka S, Nakano K, Sekimoto T, Oka M and Yoneda Y. Cell density- dependent nuclear accumulation of ELK3 is involved in suppression of PAI-1 expression. Cell Struct. Funct. 38:

145-154, 2013 査読有
DOI:10.1247/csf.13007

Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K and Yoneda Y. Differential role for transcription factor Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. J. Biol. Chem., 288: 15085-15097, 2013 査読有
DOI:10.1074/jbc.M112.448837.

〔学会発表〕(計13件)

村 苑子, 岡 正啓, 米田 悦啓: 様々な Nup98 融合タンパク質の細胞内局在・機能の解析: 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3日~6日

岡 正啓, 米田 悦啓: Nup98 融合遺伝子による細胞がん化のメカニズム: 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3日~6日

盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦啓: Estrogen receptor の核 - 細胞質間移動機構とその生理的意義の解明、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3日~6日

辻井 聡, 盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦啓: Importin によるヒストン結合タンパク RBBP4 の核内移行と細胞老化: 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3日~6日

盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦啓: エストロゲンレセプターの核 - 細胞質間移動機構とその生理的意義の解明: 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜、横浜

辻井 聡, 盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦啓: Importin によるヒストン結合タンパク RBBP4 の核内移行: 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜、横浜

岡 正啓, 米田 悦啓: Nup98 融合遺伝子による細胞がん化のメカニズム: 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜、横浜

Sangel P, Oka M, Yoneda Y: Comparative Expression/Functional Analysis of Karyopherin- s in Mouse Embryonic Stem Cells and Differentiated Cells. International Conference on Life Science & Biological Engineering, Mar 13-15, 2013, Tokyo, Japan

辻井 聡, 盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦

啓：Importin によるヒストン結合タンパク RBBP4 の核内移行：第 6 5 回日本細胞生物学会、2 0 1 3 年 6 月 1 9 - 2 1 日、ウイックあいち、愛知

Moriyama T, Oka M, Yoneda Y.: Nucleocytoplasmic shuttling of estrogen receptor . 第 6 4 回日本細胞生物学会、5 月 28 - 31 日、神戸国際会議場、神戸 (2012)

Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K, Yoneda Y: Differential role for Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. 第 6 4 回日本細胞生物学会、2 0 1 2 年 5 月 28 - 31 日、神戸国際会議場、神戸

Moriyama T, Oka M, Yoneda Y :Estrogen receptor Subcellular Distribution and Functions. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡 正啓 (OKA, Masahiro)
大阪大学・生命機能研究科・助教
研究者番号：40432504