

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790367

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病におけるヌクレオフォスミンの新たな機能損失の分子基盤

研究課題名（英文）Mechanism of loss of function by nucleophosmin mutation in AML patients

## 研究代表者

坂下 暁介（GYOSUKE SAKASHITA）

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00397457

研究成果の概要（和文）：核小体タンパク質ヌクレオフォスミンはC末端領域を介してリボソームタンパク質 RPL22 と結合していた。この結合は直接的ではなく、RNA を介したものであった。また、ヌクレオフォスミンのC末端領域のリン酸化は、細胞内局在および RPL22 との結合のいずれにも影響を与えなかった。しかし、フレームシフト変異型ヌクレオフォスミンは RPL22 と結合することができなかった。

研究成果の概要（英文）：Nucleolar protein nucleophosmin was associated with ribosomal protein RPL22 through its C-terminal region. This association was not direct but mediated by RNA. Both cellular localization nor association with RPL22 were influenced by phosphorylation on C-terminal region of nucleophosmin. However, mutant nucleophosmin found in AML patients, did not associate with RPL22.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

（1）ヌクレオフォスミン 1（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。N末端領域を介して5量体を形成し、主に核小体、核質、そして一部は中心体に局在している。その機能は多岐にわたり、リボソーム RNA の生合成、p53 や ARF などの癌抑制遺伝子の制御、染色体の安定性の維持などを通して、細胞の生存あるいは恒常性の維持に必須な役割を果たしている。NPM1 のノックアウトマウスが胎生致死であることも、その重要性を裏付けている。多くの癌において NPM1 の過剰発現、変異、遺伝子転座が報告されている。また、NPM1 のヘテロ欠損マウスが中心体の異常な複製による染色体の不安定性を示すことから、NPM1 の量的・質

的異常が腫瘍の発生・進行に深く関与することが指摘されている。

（2）このような中で急性骨髄性白血病（AML）における NPM1 の変異はきわめて特徴的である。すなわち NPM1 遺伝子の第 12 エクソンに存在する終止コドン近傍に、4 塩基の挿入にともなうフレームシフト変異を生じ、NPM1 タンパク質の C 末端の 7 アミノ酸が別の 11 アミノ酸に置換される。その結果、NPM1 の C 末端に存在する核小体移行シグナルが消失し、新たに核外移行シグナルが出現するため、フレームシフト型 NPM1 は細胞質に局在する。このような NPM1 のフレームシフト変異は AML 患者で高頻度（約 30%）に認められる一方で、現在までに固形癌を含む他の悪性腫

瘍では一例も見つかっていない。また、この種の変異が AML でのみ引き起こされるメカニズムは今もって不明である。しかし NPM1 のフレームシフト変異の有無が、AML の病態と強い相関があることから、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。

## 2. 研究の目的

(1) 我々はこれまでに分裂期キナーゼ オーロラ (Aurora) が、NPM1 の S293 をリン酸化することを見出した。AML に特徴的なフレームシフト変異の結果、NPM1 の Aurora によるリン酸化部位は例外なく消失していた。

(2) AML における NPM1 のフレームシフト変異が NPM1 タンパク質にもたらす変化は、これまで核小体移行シグナルの消失と核外移行シグナルの出現のみであると考えられていた。我々はさらに「Aurora によるリン酸化部位 S293 の消失」という変化をここに見出した。このことは、フレームシフト型 NPM1 には分裂期における S293 のリン酸化を介した制御機構が存在しないことを意味しており、AML の病態に分裂期異常という新たな要因が存在することを強く示唆するものである。

よって、本研究は Aurora による NPM1 のリン酸化の生理的意義を明らかにし、この制御機構が破綻している AML の治療戦略を練る上で分子基盤の構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) まず、野生型および S293 に対する点変異型 NPM1 の安定発現細胞株を樹立した。Aurora による NPM1 の S293 のリン酸化は、検討したすべての細胞株において認められたため、広く一般的な現象であるといえる。したがって、このリン酸化の生理的意義を検討するにあたっては、同調培養をはじめとした細胞周期研究に広く用いられている HeLa 細胞を使用した。変異体としては非リン酸化型 NPM1 (S293A) および 2 種類のリン酸化模倣型 NPM1 (S293D および S293E) を使用した。まず、野生型および変異型 NPM1 遺伝子を発現ベクターに組み込んだ。このベクターにはマルチクローニングサイトの 5' 側にすでに FHG (FLAG-His-EmGFP) 遺伝子が組み込まれている。EmGFP は、EGFP 遺伝子にさらなる変異を導入し、1 分子あたりの蛍光強度を約 2 倍に高めたものである。この結果発現された FHG-NPM タンパク質は、内在性 NPM との区別が可能であるばかりでなく、細胞内における動態をリアルタイムで可視化することもできる。さらに、異なる標識タグの存在により、

アフィニティ精製あるいは免疫沈降をおこなう際の抗体の選択肢が増え、たとえ heavy chain に近い分子量をもつ結合タンパク質であっても検出抗体の種を変更することでバックグラウンドを制御することが可能となる。安定発現株は、EmGFP の蛍光を指標としたセルソーティングにより樹立した。これにより少量の細胞から、1 日でポジティブ細胞を効率良く得ることができた。

(2) 目的タンパク質のリン酸化の意義を検討する上では、非リン酸化型変異体を導入しその効果を調べることが最も簡便な方法である。しかし NPM1 に関しては、内在性 NPM1 のタンパク質量がきわめて豊富であること、また NPM1 は N 末端領域を介して五量体を形成するなどの理由から、たとえ変異型 NPM1 遺伝子を導入しても、豊富に存在する内在性 NPM1 との五量体形成により、変異型 NPM の表現型がマスクされて検出できない可能性が考えられた。この問題を克服するため、1) において樹立した各種 NPM1 の安定発現株に、NPM1 または NPM1,2 遺伝子の 3' UTR に対してデザインした siRNA を導入することとした。変異型 NPM 遺伝子は 3' UTR を持たないため siRNA の標的とはならず、内在性 NPM のみがノックダウンされる。この結果観察される変異型 NPM1 の挙動は、純粋な変異型 NPM1 の表現型を反映したものであると予想された。観察は、EmGFP の蛍光を指標に共焦点レーザー顕微鏡をもちいたタイムラプス観察により検討した。

(3) NPM1 の C 末端領域のみを FHG 融合タンパク質として発現する安定発現株を樹立した。この細胞株から調整した抽出液を、抗 FLAG 抗体カラムに通した。用いた抗 FLAG 抗体は、所属研究室において作製されたものであり、市販の抗 FLAG 抗体に比べて特異性はもちろん、高い力価を有するものである。また、溶出には独自に設計した FLAG ペプチドを用いた。精製純度をさらに高めるため、次に溶出液を Ni-ATA ビーズに通し、溶出液として変性剤である塩酸グアニジンを用いた。溶出液中のタンパク質はトリクロロ酢酸を用いて沈殿させ、塩酸グアニジンを除去した後、マススペクトルにより結合タンパク質の網羅的な解析・同定をおこなった。

(4) 3) において同定した NPM1 の C 末端領域に対する結合タンパク質の遺伝子クローニングをおこない、このタンパク質と野生型およびフレームシフト型 NPM1 との結合を

免疫沈降により確認し、このタンパク質をノックダウンした際の NPM1 の細胞内局在への影響を検討した。次に、その結合が直接的か間接的か、NPM1 の S293 のリン酸化により解離するか、および双方の結合領域を、大腸菌より精製したタンパク質を用いて詳細に検討し、生化学的な解析をおこなった。

#### 4. 研究成果

(1) 安定発現細胞株の樹立は予定通り完了した。FHG-NPM1と内在性NPM1の発現レベルをウェスタンブロットにより比較したところ、FHG-NPM1の発現レベルは内在性NPM1の10分の1程度であった。また、抗GFP抗体を用いて免疫沈降をおこない、NPM1オリゴマーに含まれる外来性FHG-NPM1と内在性NPM1の存在量を検討した。その結果、すべての細胞株において、NPM1オリゴマーには外来性FHG-NPM1よりも内在性NPM1の方が多く含まれていることが判明した。このような背景を有する各細胞株においてFHG-NPM1の細胞内局在をEmGFPの蛍光を指標に検討したところ、いずれも核小体に強く局在した。しかし、ここで観察している外来性FHG-NPM1には、それ以上に多くの内在性NPM1が結合していることを考えると、多くの内在性NPM1の結合により変異体の効果がマスクされている可能性を否定できなかった。このため、当初の予定通り内在性NPM1をノックダウンすることで問題の回避を試みた。

(2) 細胞内におけるNPM1の量はきわめて豊富であり、その豊富さがNPM1の正常な機能に必要であると考えられている。実際、siRNAにより細胞内のNPM1レベルが半分に低下すると、細胞の増殖は著しく低下する。(1)の結果を受けて、内在性NPM1の影響を受けない条件、すなわち内在性NPM1のみをノックダウンした状況下において、NPM1のS293のリン酸化と細胞内局在との関係を検討することとした。NPM1遺伝子のsiRNAとして、3'UTRを標的とした市販品を用い、内在性NPM1のノックダウンをおこなった。しかし、内在性NPM1のタンパク質レベルの低下が認められる時期において、すべての細胞株が著しくダメージを受け、FHG-NPM1の細胞内局在を観察することが困難だった。これはFHG-NPM1のタンパク質レベルが想定よりも低かったため、siRNAによる内在性NPM1のノックダウン効果をFHG-NPM1が量的に相補できないことに起因すると考えられた。このため、リン酸化と局在の関係を検討するには異なるアプローチを取らざるを得なかった。そこでふたつの方法で検討することにした。ひとつはNPM1タンパク質のN末端に

存在するオリゴマー形成領域を欠損したNPM1遺伝子を使用することである。この方法は内在性NPM1とのオリゴマーの形成を回避できるため、導入したNPM1遺伝子だけの細胞内局在を検討できる半面、オリゴマー形成領域を欠損したことによる影響を受けることが考えられた。実際、オリゴマー形成領域を欠損したFHG-NPM1は、全長FHG-NPM1と比べても核質に局在する割合が上昇していることが蛍光観察において認められた。しかし、核小体への局在も十分に検出可能なレベルであった。この条件におけるS293の非リン酸化型およびリン酸化模倣型変異体の細胞内局在を検討したところ、いずれもオリゴマー形成領域を欠損した野生型と同じ局在を示した。

もうひとつの方法として、大腸菌より精製した組み換え型全長NPM1を用いた。野生型およびリン酸化部位に対する変異体を、それぞれ試験管内において蛍光標識して再度精製した。蛍光標識した全長のNPM1タンパク質を直接培養細胞に注入した。その結果、蛍光標識したNPM1は、いずれも導入5分後にはほとんどが核小体に集積するのが認められた。以上の結果より、NPM1のS293は、核小体移行シグナルのきわめて近傍に位置するものの、そのリン酸化はNPM1の核小体への局在に対して影響を及ぼさないことが明らかとなった。

近年、NMRによるNPM1のC末端領域の構造が解析され、NPM1のC末端領域は3つのヘリックス構造をとることが明らかとなった。この際に、核小体移行シグナルを構成するアミノ酸配列は3つのヘリックス構造の位置関係を保つ役割を担っていた。このことから、NPM1のS293のリン酸化は、C末端領域が形成する3つのヘリックス構造に対して影響を及ぼさないことが考えられた。

(2) FHG-NPM1のC末端領域に対する結合タンパク質を質量分析により解析した。その結果、60Sの構成因子であるリボソームタンパク質RPL22を同定した。NPM1/RPL22複合体は培養細胞においても認められ、細胞周期間期の核内でrRNAを介して形成されることが明らかとなった。また細胞分裂期では、活性化したCDK1によりNPM1がリン酸化されてrRNAとの結合能を失うため、結果的にNPM1/RPL22複合体が解離することが明らかとなった。RPL22の細胞内局在は、NPM1のノックダウンによる影響を受けなかった。同様に、NPM1の細胞内局在もまた、RPL22のノックダウンによる影響を受けなかった。分裂期におけるNPM1のRNA結合能制御には、オーロラによるリン酸化は関与しな

った。これまでの研究成果と考え合わせると、分裂期におけるNPM1のS293のリン酸化はNPM1の核小体への局在とRNA結合能のいずれにも関与しないことが明らかとなった。

急性骨髄性白血病患者の約3割に認められる変異型NPM1 (NPM1c) は、核小体移行シグナルが消失し、新たに核外移行シグナルを獲得しているため、細胞質に局在する。試験管内における再構成実験から、NPM1cはRNA結合能を完全に失っており、培養細胞を用いた実験においても間期でのNPM1/RPL22複合体を形成しなかった。この結果から、NPM1cがRPL22と複合体を形成できないのは、NPM1cが細胞質に局在することに加えて、本質的にRNA結合能を失っていることが原因と考えられた。

#### 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)

[その他]

ホームページ等

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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

坂下 暁介 (GYOSUKE SAKASHITA)

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：