

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650611

研究課題名(和文)核膜孔複合体タンパク質の発現異常による白血病の分子機構の解析

研究課題名(英文)The molecular mechanism of nuclear pore proteins and leukemogenesis

研究代表者

WONG W・R (WONG, RICHARD)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：30464035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞の核膜孔を形成する核膜孔複合体(NPC)は、30種類以上のNPCタンパク質で構成されており、核細胞質間のRNA、及びタンパク質の輸送を制御している。申請者らは、NPCタンパク質であるRae1、及びNup98が白血病発症に関与することを発見した。NPCタンパク質は重要な転写因子の輸送、及び有糸分裂期での機能を持っているため、申請者はNPCタンパク質が白血病発症の際にエピジェネティクスを解析することを目的とした。申請者はNup98/JARID1Aトランスジェニックマウスの樹立に成功した。現在、引き続き白血病発症メカニズムの解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Nuclear pore complexes are embedded in the nuclear envelope and act as molecular sieves, selectively facilitating the transport of proteins and RNA in and out of the nucleus. Recently, we showed that NUP98 binding partner, RAE1 involved in the development of NUP98-HOXA9 leukemogenesis. We want to investigate epigenetic mechanism in carcinogenesis through a novel approach of nucleoporins-histone modifiers orchestration. We also plan to compare the difference between the difference of NUP98 fusions, HOX genes (NUP98-HOXA9) and those fusions with PHD domain (NUP98-JARID1A). Through this grant support, we have generated NUP98-JARID1A mice. We are still investigating the NUP98-JARID1A and the leukemogenesis via this mice. Meanwhile, we also published several related NPC papers and presented some of our data in the international and domestic conferences.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：核膜孔複合体 Rae1 Nup98 JARID1A 白血病 エピジェネティクス トランスジェニックマウス 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、白血病を始めとした癌において癌幹細胞の存在が確認されつつあり、種々の癌で少数の自己複製能をもった癌幹細胞を中心とした幹細胞システムが形成されているものと考えられている。中でも、急性骨髄性白血病 (AML) のような造血系腫瘍は癌幹細胞システムの良いモデルとされている。興味深いことに、多くの AML 患者において核膜孔複合体因子 (ヌクレオポリン) の遺伝子に染色体転座が多く観察されている。核膜孔複合体は真核細胞の核膜に存在し、核 - 細胞質間の RNA、及び、タンパク質の物質輸送を制御する筒状の巨大タンパク質チャネルである。核膜孔複合体は 30 種類以上のヌクレオポリンで構成されているが、中でもヌクレオポリン *NUP98*, *NUP214*, 及び、*Tpr* 遺伝子を含む染色体転座が AML 患者において多く観察されている。特に *NUP98* とホメオボックス遺伝子 *HOX* 群やトポイソメラーゼ、*JARID1A*, *PHF23* などとの融合が多く報告されている。*HOX* 遺伝子群の中でも *HOXA9* と *NUP98* の染色体転座産物 *NUP98-HOXA9* は骨髄細胞やマウス線維芽細胞 NIH3T3 の癌性形質転換を誘導し、また幹細胞の増殖を促進することが報告されており、さらに最近申請者も *NUP98* の結合パートナーである核膜孔複合体因子 *RAE1* が *NUP98-HOXA9* による白血病発症に深く関与していることを明らかにした。加えて最近、ヒストン修飾や DNA メチル化などによるエピジェネティックな遺伝子発現制御の関与が数々の疾患、例えば癌などで報告されている。エピジェネティック制御の破たんが癌関連遺伝子の発現制御にすることが明らかにされ、また癌治療における重要な標的である癌幹細胞の形成にも深く関わっていることが報告されている。これまでもいくつかのヌクレオポリン遺伝子の異常が白血病患者で見つかったが、その理由は不明であった。

## 2. 研究の目的

ヌクレオポリンは重要な転写因子の輸送、及び、有糸分裂期での機能を有している。申請者は、ヌクレオポリンが白血病発症の際にエピジェネティックに寄与するのではないかと仮説をたて、本研

究でヌクレオポリン - ヒストン修飾による発がんのエピジェネティックなメカニズムを解析することを目的とした。

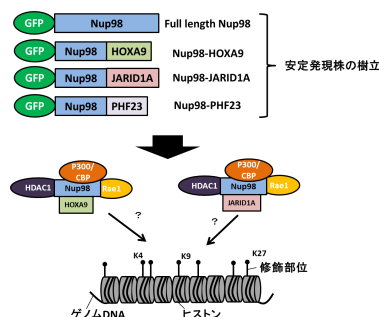
## 3. 研究の方法

核膜孔複合体を構成するタンパク質は約 30 種類存在するが、本研究では白血病の形成に重要な役割を果たしていると考えられる *NUP98* のキメラ遺伝子産物 *Nup98-HOXA9*, *Nup98-JARID1A* 及び、*Nup98-PHF23* 遺伝子機能解析の詳細な検討を *in vitro* と *in vivo* のレベル、即ち、1. エピジェネティクス制御機構の分子・細胞レベルでの詳細な解析 (*in vitro*)、2. マウスモデルを用いたエピジェネティクス制御機構の解析 (*in vivo*) の 2 つの計画を立てて行った。

## 4. 研究成果

(1) 核膜孔複合体因子のエピジェネティクスへの関与の検討 (*in vitro*)

*NUP98* のキメラ遺伝子産物 *Nup98-HOXA9*, *Nup98-JARID1A* 及び、*Nup98-PHF23* 遺伝子に GFP タグを付加したプラスミドを構築し、リポフェクション法を用いてヒト白血病細胞 K562 に導入後、G418 選択培地によって選択し、安定発現細胞株を得た (図 1)。樹立したクローンをウエスタンブロット法、及び、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、*Nup98-HOXA9*, *Nup98-JARID1A* 及び、*Nup98-PHF23* がウエスタンブロット法によりタンパク質レベルで、細胞の蛍光免疫染色により核内に発現しているのを確認できた。今後はこれらの細胞株を用いて核膜孔複合体因子のエピジェネティクスへの詳細な関与の検討を行う予定である。

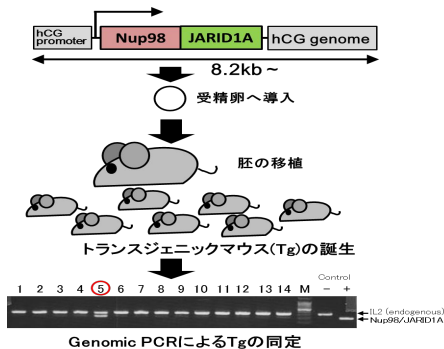


(図 1)

(2) 核膜孔複合体因子トランスジェニックマウスを用いたエピジェネティクスへの関与の検討 (*in*

vivo)

すでに白血病モデルマウスとして樹立されている *Nup98-HOXA9* キメラ遺伝子の発現カセットと同様に、*Nup98-JARID1A* の全長 cDNA を PCR によって増幅し、hCG (ヒトカセプシン G) 遺伝子プロモーターの下流に挿入した。hCG 遺伝子は白血球特異的に発現するため、トランスジーンである *Nup98-JARID1A* が効率よく白血球のみで発現することで白血病を発症しやすくすることを狙っている。この DNA 断片を精製し、マウス (C57BL/6J) の受精卵にマイクロインジェクション法により導入した。遺伝子断片導入卵を偽妊娠マウスの子宮に移植し、生まれてきたマウスの尾からゲノム DNA を抽出し、トランスジェニックマウス特異的プライマーを用いて PCR を行ったところ、3 系統のトランスジェニックマウス (F0) の作出が確認できた (図 2)。今後、すでに樹立されている *Nup98-HOXA9* トランスジェニックマウスとあわせて、造血関連する脾臓や骨髄などの組織を病理学的に解析することで、核膜孔複合体因子のエピジェネティクスへの関与の検討を *in vivo* で行っていく予定である。



(図 2)

## 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 6 件)

Hashizume C\*, Moyori A\*, Kobayashi A, Yamakoshi N, Endo A and Wong RW, Nucleoporin Nup62 maintains centrosome homeostasis., *Cell Cycle*, 査読有、12:24, 2013

DOI: 1-13 doi.org/10.4161/cc.26671

Hashizume C, Kobayashi A and Wong RW, Down-modulation of nucleoporin RanBP2-induced chromosome mis-alignment and mitotic catastrophe., *Cell Death Dis.*, 査読有、4, e854, 2013

DOI: 10.1038/cddis.2013.370

Endo A\*, Moyori A\*, Kobayashi A and Wong RW, Nuclear Mitotic Apparatus protein, NuMA modulates p53 mediated transcription in cancer cells., *Cell Death Dis.*, 査読有、4,e713, 2013  
DOI: 10.1038/cddis.2013.239.

Funasaka T@, Balan V, Raz A, and Wong RW, Nucleoporin Nup98 mediates galectin-3 nuclear-cytoplasmic trafficking., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、434(1): 155-161, 2013

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.052.

Funasaka T, Tsuka E and Wong RW, Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr., *Sci. Rep.*, 査読有、2, 878, 2012

DOI: 10.1038/srep00878

Ohnishi H@, Tochio H@, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shiragawa M and Kondo N, TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88., *PLoS ONE*, 査読有、7(6):e38423, 2012

DOI: 10.1371/journal.pone.0038423

[学会発表](計 6 件)

Richard Wong, The role of Nuclear Pore Proteins in coordination of cell cycle progression and tumorigenesis., West China hospital, Sichuan University, 2014 年 3 月 10 日、中国 (招待講演)

Richard Wong, Nucleoporins mitotic functions and carcinogenesis., 理化学研究所生命システム研究センター、2013 年 9 月 27 日、大阪 (招待講演)

Richard Wong, Nuclear Pore Proteins and Carcinogenesis., The Hong Kong Polytechnic University, 2012 年 9 月 3 日、中国 (招待講演)

Richard Wong, The role of Nuclear Pore Proteins in coordination of cell cycle checkpoints during mitosis., 第 70 回日本癌学会学術総会 International sessions, 2012 年 9 月 21 日、北海道 (招待講演)

Richard Wong, Nucleoporin Nup358/RanBP2 associates with Karyopherin  $\beta$ 1 to orchestrate accurate chromosome segregation in mitosis., Joint Meeting of The 45<sup>th</sup> Annual meeting of JSDB and The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of JSCB, 2012 年 5 月 31 日、兵庫 (招待講演)

Richard Wong, Nucleoporin の準安定状態複合体間の相互作用解析に関する探索、新学術領域研究「過渡的複合体」班会議、2012 年 5 月 17 日、山梨 (招待講演)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://fsowonglab.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

Richard Wong (WONG, Richard)

金沢大学・理工学域自然システム学系・教授

研究者番号：30464035