

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460087

研究課題名(和文) 新たに見出した核膜孔因子Nup88のビメンチン結合によるがん増悪化の分子機序解明

研究課題名(英文) A novel interaction of nucleoporin Nup88 with vimentin and its role in cancer malignancy.

研究代表者

牧瀬 正樹 (MAKISE, Masaki)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：80433001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織で過剰発現したヌクレオポリンNup88が癌を悪性化する機構は不明である。我々は、新規に見出したNup88とビメンチン中間径フィラメントタンパク質の相互作用を解析し、この細胞運動性への関与を検討した。Nup88はビメンチンに特異的かつ直接的に結合した。Nup88のN末端541アミノ酸残基がビメンチン分子のN末端の96アミノ酸残基に結合した。この相互作用はビメンチンの重合・脱重合過程に影響した。細胞に過剰発現させたNup88はビメンチン存在下で細胞運動性を促進した。Nup88はビメンチンの重合・脱重合過程を変化させることによって細胞の運動性に寄与するのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：It has been unclear whether nucleoporin Nup88 overexpressing in tumor tissues promotes cancer malignancy such as cell motility. In this study, we characterized a novel interaction between Nup88 and vimentin intermediate filament protein and examined its involvement in cell motility. Nup88, but not other nucleoporins we tested, bound to vimentin specifically. In addition, Nup88 interacted with vimentin directly. The N-terminal 541 amino acid residues of Nup88 bound to the N-terminal 96 amino acid residues of vimentin molecule. This interaction affected the vimentin organization process. Nup88 overexpressed in cells promoted cell motility in the presence of vimentin. Nup88, thus, may contribute to cell motility through changing the organization of vimentin.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：Nup88 vimentin cancer

1. 研究開始当初の背景

Nup88 は、核膜輸送を担う因子 (ヌクレオポリン) でありながら、転移・浸潤性の高い腫瘍細胞に異所性に過剰発現することが知られている。その発現量は癌の悪性度によく相関することから、腫瘍マーカーとしての臨床利用が期待されている。しかしながら、Nup88 の過剰発現とがんの因果関係については不明な点が多く残っている。

これまでに「がんの発生」に関するNup88の機能については一定の理解が得られている。すなわち、Nup88の発現量変化が紡錘体形成異常に伴う染色体DNAの分配異常を導くことが示されている。したがって、Nup88は分裂期を制御する機能を持ち、この破綻が「がん発生」の原因になり得ると考えられている。一方、「がんの転移・浸潤」といった悪性化に関する機能については、解析が遅れていた。

2. 研究の目的

このような状況の下、我々は解析を進めるための端緒を捉えた。すなわち、Nup88 を持続的に過剰発現した培養細胞では、悪性度の指標となる間葉系細胞様の形態変化が観察された。さらに、Nup88 が間葉系細胞のマーカー分子でもある細胞骨格因子ビメンチンと結合することも見出した。以上から我々はNup88 が、癌の悪性転換過程である上皮間葉転換を促進する可能性を考えた。そこで本課題では、Nup88とビメンチンの相互作用を解析するとともに、Nup88が与える上皮間葉転換への影響を解析した。

3. 研究の方法

[1] Nup88 のビメンチン結合とその生理的意義の解明

以前に見出したNup88とビメンチンの結合の詳細を明らかにするために、両因子の部分欠損タンパク質を利用して結合ドメインの絞り込みを行った。また、両者の結合が直接的であるか否かを両者のリコンビナントタンパク質を用いて検討した。Nup88とビメンチンの細胞内共局在性は免疫蛍光染色法によって調べた。

[2] 結合阻害ペプチドのスクリーニング

Nup88のビメンチン結合ドメインが同定できた場合には、これに対して特異的に結合するペプチドをファージディスプレイ法により同定する。同定できた場合には、ペプチド合成機により、そのペプチドを大量合成し、細胞実験に供する。

[3] Nup88 発現に依存した上皮間葉転換促進機構の解析

上皮系細胞が高い運動性を獲得するためには間葉系細胞に変化する (上皮間葉転換が起こる) 必要がある。そこで、Nup88を過剰発現した細胞における上皮間葉転換関連分子の遺伝子発現レベルおよびタンパク質発現レベ

ル検討した。また逆に、上皮間葉転換を誘導した細胞に起こる内因性Nup88の発現量変化も検討した。

4. 研究成果

[1] Nup88 -ビメンチン結合の解析

Nup88 のビメンチン結合ドメインとして、N 末端からの 541 アミノ酸残基を同定した。またビメンチンの Nup88 結合ドメインとして、リン酸化されるアミノ酸残基のクラスターを持つ N 末端の 96 アミノ酸残基を同定した (図1)。Nup88 以外のヌクレオポリンである Nup214, Nup358 および Nup50 はいずれもビメンチンと結合しなかった。以上から Nup88 はビメンチンに特異的に結合することを示唆した。一方、リコンビナント Nup88 がリコンビナントビメンチンに結合したため、両者は介在タンパク質なしに直接的に結合することがわかった。

次に細胞内における局在性を調べたところ、Nup88 とビメンチンは核膜あるいは核膜の周辺に共局在することがわかった。しかしながら、細胞質における共局在は明確にならなかった。

Nup88 を過剰発現した細胞では、細胞内の可溶性ビメンチンプールが増加した。一旦繊維化したビメンチンは、リン酸化によって脱重合し可溶性が増大する。過剰発現した Nup88 は、ビメンチンのリン酸化状態を保つ役目があることがわかった。ビメンチンの繊維化-脱重合サイクルの亢進は細胞の運動性を促進すると考えられているので、Nup88 は細胞の運動性に影響することが期待された。

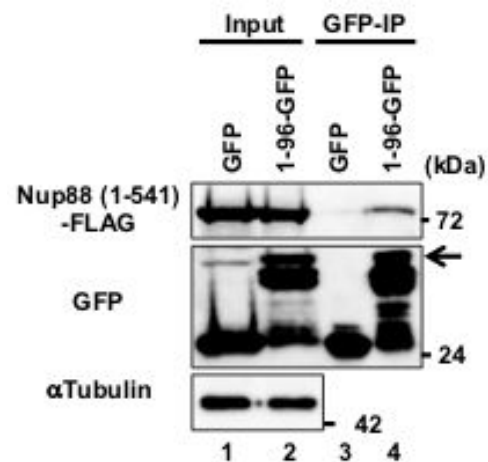


図1 Nup88-ビメンチン結合

Nup88 の N 末端の 541 アミノ酸残基 (1-541-FLAG) およびビメンチンの N 末端の 96 アミノ酸残基 (1-96-GFP) を免疫沈降法に供し、両者の結合を確認した。

[2] 結合阻害ペプチドのスクリーニング

当初計画では、Nup88 のビメンチン結合ドメインを同定後に、ファージディスプレイ法によって結合阻害ペプチドをスクリーニン

グする予定であった。しかしながら、結合ドメインの同定が課題実施最終年にずれ込んだため、着手しなかった。

[3] Nup88 発現に依存した上皮間葉転換促進機構の解析

上皮系細胞であるビメンチンを発現していない MCF-7 細胞に Nup88 を過剰発現させ上皮系細胞のマーカ分子である E-カドヘリンおよび間葉系細胞のマーカ分子であるビメンチンの発現を調べた。結果として両者の発現に変化は見られなかった。同様に上皮間葉転換の誘導因子である Twist および Snail1 の発現も変化しなかった (図 2)。

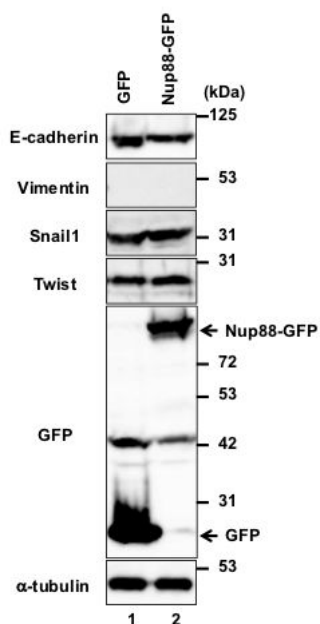


図 2 Nup88 過剰発現による各因子の発現変化

Nup88 を MCF-7 細胞に過剰発現した。上皮性細胞のマーカ分子 E-カドヘリン、間葉系細胞のマーカ分子であるビメンチン、または上皮間葉転換の誘導因子である Snail1、Twist の発現は変化しなかった。

さらに DNA マイクロアレイ法によって Nup88 の過剰発現に依存して発現変化する遺伝子を検索したが、有意な発現変化を示す上皮間葉転換関連因子は見つからなかった。以上は、Nup88 の発現のみでは上皮間葉転換を誘導できないことを示唆している。

次に、上皮間葉転換が Nup88 の発現に及ぼす影響を検討した。上皮間葉転換の誘導因子 Twist を上皮系細胞である MCF-7 細胞に発現させたが、Nup88 の発現変化は起こらなかった。同様に上皮系細胞由来でありながら間葉系細胞の特徴も有する HeLa 細胞および MDA-MD231 細胞においても Nup88 の発現変化は起きなかった。以上から、上皮間葉転換は Nup88 の過剰発現を誘発しないことがわかった。

最後に、過剰発現した Nup88 が与える細胞運動性への影響を、ビメンチンを全く発現し

ていない MCF7 細胞およびわずかに発現している HeLa 細胞で検討した。結果として、過剰発現した Nup88 は HeLa 細胞の運動性のみを有意に促進することがわかった (図 3)。

これまでの結果から我々は、過剰発現した Nup88 がビメンチンの重合-脱重合過程に作用して細胞の運動性を促進する可能性を考えている。

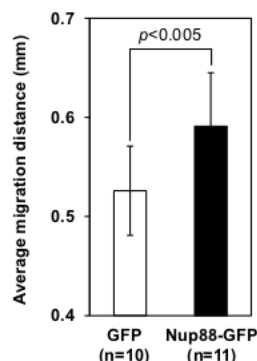


図 3 Nup88 発現による細胞運動性の促進

HeLa 細胞に GFP または GFP 融合型 Nup88 を過剰発現させ、スクラッチアッセイにより細胞の運動性を調べた。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Makise M, Nakamura H, Kuniyasu A. (2018) The role of vimentin in the tumor marker Nup88 dependent multinucleated phenotype. *BMC Cancer (in press)*

[学会発表](計 12 件)

1. Kuniyasu A, Kurogi M, Setoguchi M, Makise M. Hybrid peptide tat-Ram13-induced necrosis-like cell death depends on expression of PTEN in human leukemia cell lines. EACR 23 (Munich, Germany) July 7, 2014.
2. 牧瀬正樹、國安明彦
核膜孔因子 Nup88 と Vimentin の相互作用解析 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015 年 3 月 28 日
3. 國安明彦、村本沙祐里、森山恵里奈、牧瀬正樹
ペプチドミメティック化合物によるミクログリアターゲティング 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015 年 3 月 27 日
4. Makise M, Shutoku Y, Shiraishi R, Shirakawa H, Wada H, Kuniyasu A. Nucleoporin Nup88 facilitates cancer cell motility through interacting with vimentin. BMB2015 (Kobe, Japan) Dec 2, 2015.

國安 明彦 (KUNIYASU, Akihiko)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号：90241348

5. 牧瀬正樹、秀徳優美、白石梨花子、白川裕貴、和田曜、國安明彦
核膜孔因子 Nup88 とピメンチンの相互作用とその細胞運動性への役割 日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016 年 3 月 28 日
6. 國安明彦、今泉友理、牧瀬正樹
細胞選択的膜透過性ペプチドのレトロインバーソ体の合成と活性評価 日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016 年 3 月 29 日
7. Kuniyasu A, Makise M.
Leukemic cell death induced by the Notch-1 fragment-derived peptide evokes the immunogenic inflammation. EACR 24 (Manchester, UK) July 10, 2016.
8. 牧瀬正樹、秀徳優美、白石梨花子、白川裕貴、和田曜、國安明彦
核膜孔因子 Nup88 の過剰発現が誘導する細胞多核化に対するピメンチンの関与 日本薬学会第 137 年会 (仙台) 2017 年 3 月 26 日
9. 國安明彦、牧瀬正樹
Notch-1 断片ペプチドが誘導する白血病細胞選択的ネクローシスと PTEN 発現 日本薬学会第 137 年会 (仙台) 2017 年 3 月 26 日
10. Masaki M, Kuniyasu A.
The tumor marker Nup88 contributes to the activation of Hedgehog signaling pathway through suppressing Kif7 expression. ConBio2017 (Kobe, Japan) Dec 6, 2017.
11. 牧瀬正樹、安藤早織、國安明彦
腫瘍マーカーNup88の過剰発現はヘッジホッグシグナル経路の活性化を導く 日本薬学会第 138 年会 (金沢) 2018 年 3 月 26 日
12. 國安明彦、牧瀬正樹、高妻咲慧、友永遥香、香月博志、川原浩一、Fernanda-I. STAQUICINI、Wadih ARAP、Renata PASQUALINI
ミクログリア選択的結合ペプチドの受容体分子解析 日本薬学会第 138 年会 (金沢) 2018 年 3 月 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧瀬 正樹 (MAKISE, Masaki)
崇城大学・薬学部・准教授
研究者番号：80433001

(2) 研究分担者