

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570184

研究課題名（和文）ヌクレオポリン機能異常による細胞癌化メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of the potential roles of Nucleoporin in oncogenesis

研究代表者

岡 正啓 (OKA MASAHIRO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：40432504

研究成果の概要（和文）：細胞がん化に関する事が知られている核膜孔構成因子（ヌクレオポリン）であるNup98の機能解析を行った結果、Nup98は核外輸送因子Crmlと結合し、核外輸送に関与していることが明らかになった。また、Nup98は核一細胞質間を行き来（シャトリング）しながら核外輸送に関与していることが分かった。更に、白血病において見られるNup98-HoxA9融合遺伝子の発現により、核外輸送が阻害されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Nup98 is a frequent target of chromosomal rearrangements in leukemia, which is associated with the disease development. Our study revealed that Nup98 binds to Crml, a nuclear export factor, and is involved in protein export from the nucleus to the cytoplasm. In addition, we demonstrated that the expression of Nup98-HoxA9 fusion inhibits the nuclear export.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：ヌクレオポリン、核外輸送、Nup98、Crml

1. 研究開始当初の背景

核膜孔複合体は核膜上に位置する分子量約125Md aの巨大な複合体であり、真核生物の核一細胞質間分子輸送における通過点である。核膜孔複合体は約30種類の構成因子（ヌクレオポリン）により形成されるが、近年、ヌクレオポリンの機能異常と様々な病

態の関連が報告されている。ヌクレオポリンのひとつであるNup98は、白血病において染色体転座により20種類以上のパートナー遺伝子とNup98融合遺伝子を生成する事が知られていた。また、Nup98融合遺伝子の発現が細胞がん化の要因となることが証明されていた。しかしながら、その

分子メカニズムについては不明のままであった。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やRNAヘリケース、DNAトポイソメラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、グアニンヌクレオチド交換因子をはじめ、様々な生理活性を持つ遺伝子が報告されていたが、一方で、全てのNup98融合遺伝子にはNup98のN末端部位であるフェニルアラニン-グリシン反復配列（FGリピート）領域が含まれることから、Nup98FGリピートの機能に着目して研究を進めることにした。また、予備実験の結果、Nup98の機能異常による細胞がん化メカニズムの解明に繋がる可能性のあるデータとして、研究開始当初までに（i）N末端にGFPタグを付けたNup98（GFP-Nup98）を培養細胞で発現させると核内で複数のドット構造を形成するが、その核内ドットには核外輸送因子であるCrm1が共局在を示す事、（ii）GFP-Nup98が形成する核内ドットはCrm1の阻害剤であるレプトマイシンBで細胞を処理することにより速やかに消失する事、等のNup98と核外輸送の関連性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究は核膜孔構成因子であるヌクレオポリンの機能異常による細胞癌化のメカニズムを明らかにする事を目的とした。白血病において染色体転座により様々なパートナーと融合遺伝子を生成する事が知られているヌクレオポリンであるNup98に焦点を当て、Nup98融合遺伝子による細胞がん化メカニズムの解明を目的とした。特に全てのNup98融合遺伝子において共通に保存されているNup98のN末端FGリピート部位に着目し、その機能と細胞がん化機

構との関連を追及した。

3. 研究の方法

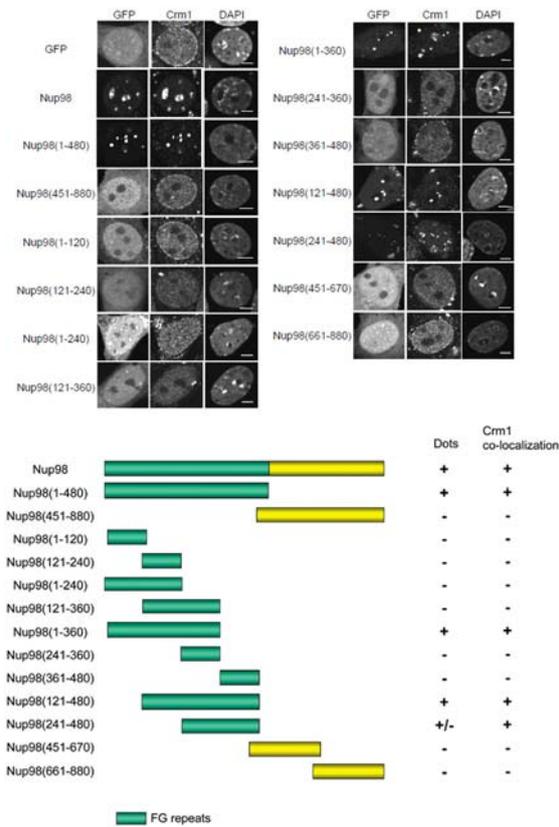
ヌクレオポリンNup98のFGリピートの機能を明らかにするために、様々な細胞生物学、分子生物学、生化学的手法を用いて研究を行った。具体的には（1）GFP融合タンパク質を用いた細胞内挙動の解析、そしてその挙動に対する様々な薬剤処理の影響の解析、（2）Nup98、Crm1、RanGTPなどのリコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析、（3）Nup98の様々な欠失変異体を用いたドメイン解析、（4）抗Nup98抗体のマイクロインジェクションによる核外輸送機能の阻害実験、などを行った。

4. 研究成果

（1）内在性Nup98の細胞内局在への様々な薬剤処理の影響を観察した。その結果、内在性Crm1と同様に、内在性Nup98は低濃度アクチノマイシンD存在下でリボゾームRNAの合成を阻害すると核小体に移行する事が分かった。更に、アクチノマイシンD存在下で核小体に移行したNup98は、同時にレプトマイシンB処理を行うことにより消失する事が分かった。以上のことから、内在性Nup98はCrm1依存的に核小体に局在している事が明らかとなった。

（2）Nup98の様々な欠失変異体を作製し、その内在性Crm1の局在・機能に対する影響を解析した（次頁の図参照）。その結果、Nup98のFGリピートのアミノ酸残基120-360の領域がCrm1と共局在を示す核内ドットの形成に必須である事が分かった。更に、これらの変異体の発現によりCrm1依存的な内在性RanBP1の核外輸送が阻害されることが明らかとな

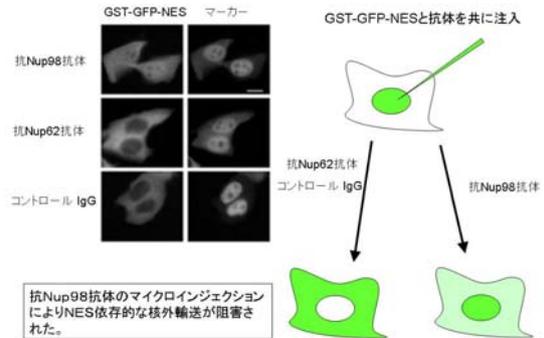
った。



(3) N u p 9 8 と C r m 1 の相互作用を生化学的手法により詳細に解析した。その結果、N u p 9 8 と C r m 1 の結合にはG T P 結合型の R a n が必要である事が明らかとなった。また、N u p 9 8 のN末側のF G リピート部位とC r m 1 との結合に比べ、C 末側のF G リピートを持たない領域ではその結合が弱い事が明らかとなった。

(4) 代表的なN u p 9 8 融合遺伝子として知られているN u p 9 8 -H o x A を細胞に発現させ、C r m 1 依存的な核外輸送への影響を観察したところ、その発現により顕著に核外輸送が阻害されることが分かった。これらの結果は、N u p 9 8 の機能異常によるC r m 1 の核外輸送の阻害と、細胞がん化の関連を示唆するものである。

(5) 抗N u p 9 8 抗体の核へのマイクロインジェクションを行った結果、マーカータンパク質であるG S T -G F P -N E S の核外輸送が顕著に阻害されることが分かった (図参照)。更に、細胞質へ抗N u p 9 8 抗体を

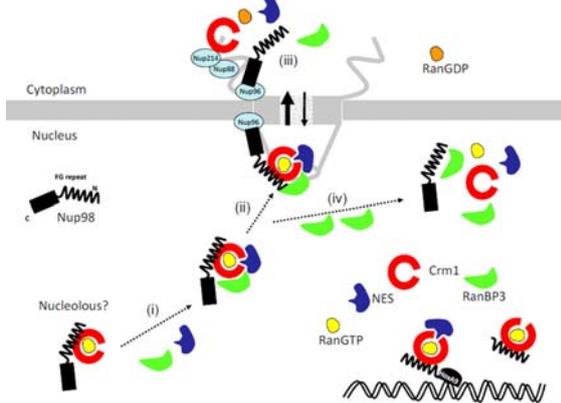


マイクロインジェクションした場合にも核外輸送の阻害活性が見られた。また、その際に細胞質に注入した抗N u p 9 8 抗体が核へと移行していることが分かった。これらのことからN u p 9 8 は核-細胞質間をシャトリングしながらC r m 1 依存的な核外輸送に関わっていることが示唆された。

(6) C r m 1 依存的な核外輸送においてコファクターとして機能するR a n B P 3 がN u p 9 8 -C r m 1 -N E S の相互作用に濃度依存的な影響を示す事が明らかとなった。

これらの結果から、次のモデルを提唱するに至った (次頁の図参照)。すなわち、N u p 9 8 は核と細胞質間をシャトリングしているが、核内ではR a n G T P 依存的にC r m 1、N E S、R a n B P 3 との核外輸送複合体を形成し、核外輸送に働く。細胞がん化の要因となるN u p 9 8 -H o x 融合遺伝子はC r m 1、N E S と複合体を形成するが、H o x のホメオドメインにより染色体へ結合しているため、結果としてN u p 9 8 のように効率よく核膜孔へと運ばれず核外輸送

に対して阻害的に働く。



細胞がん化との関連性が報告されている核タンパク質の中には核移行シグナル (NLS) と核外輸送シグナル (NES) を同時に持つものがあり、それらは核-細胞質間を行き来 (シャトリング) している。しかしながら、細胞がん化と分子のシャトリング活性の相関関係にはいまだ不明な点が多い。今回の結果から、Nup98 融合遺伝子の発現による核外輸送の阻害がシャトリング活性に影響し、細胞がん化の引き金となっている可能性が考えられる。今後は、これらの因子の細胞内局在制御と細胞がん化の関連性を更に明らかにしてゆく予定である。

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 6 件)

①Asally M, Yasuda Y, Oka M, Otsuka S, Yoshimura SH, Takeyasu K, Yoneda Y. (2010) Nup358, a nucleoporin, functions as a key determinant of the nuclear pore complex structure remodeling during skeletal myogenesis.

FEBS J. 278:610-621. 査読有

②Oka M, Asally M, Yasuda Y, Ogawa Y, Tachibana T, Yoneda Y. (2010) The mobile

FG nucleoporin Nup98 is a cofactor for Crm1-dependent protein export.

Mol Biol Cell. 21:1885-1896. 査読有

③Ogawa Y, Miyamoto Y, Asally M, Oka M, Yasuda Y, Yoneda Y. (2010) Two isoforms of npap60 (nup50) differentially regulate nuclear protein import.

Mol Biol Cell. 21:630-638. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

①岡 正啓, A mobile nucleoporin, Nup98, plays an important role in a Crm1-mediated nuclear export, 日本生化学会大会 2009年10月23日, 神戸

②岡 正啓, The role of Nup98 in a Crm1-mediated nuclear export, CSHL meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function, 2008年9月19日, ニューヨーク/USA

③岡 正啓, Analysis of potential roles of Nup98 FG repeat region in oncogenesis, 日本細胞生物学大会, 2008年7月1日, 横浜

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院・生命機能研究科ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 正啓 (OKA MASAHIRO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号: 40432504