

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310151

研究課題名(和文)核膜孔複合体ダイナミクス機序の解明とナノポア再構成へのアプローチ

研究課題名(英文)Characterization of nuclear pore complex re-assembly dynamics in cell cycle

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核膜上に多数ある核膜孔は核膜孔複合体から成り立っており、その複合体は約30種類の核膜孔複合体因子(ヌcleoポリン)から構成されている。本研究課題では、NPCタンパク質の詳細な細胞内動態を解析すると共に、ナノポアの再構成を試みることを目的としている。これら見出した結果について、Cell Cycle誌の表紙を含む7つの論文を発表した(図1)(インパクトファクターは平均～5)本研究課題で本研究室に在籍した4人の大学院生は、全員に受賞実績がある。

研究成果の概要(英文)：The nuclear pore complex (NPC) is the major gatekeeper of macromolecular traffic between the nucleus and cytoplasm. It is composed of multiple subunits comprising ~30 proteins called nucleoporins. During cell division, transmembrane nucleoporins and nuclear envelope membrane fragments move to the endoplasmic reticulum, while other nucleoporins are disassembled into subcomplexes that are distributed throughout the mitotic cytoplasm to kinetochore, spindle and centrosome regions. In this project, we are investigating the association of NPC proteins assembly and disassembly during cell division. We constantly published peer-reviewed papers with impact factor 5 and our graduate students all received awards in the society or conferences.

研究分野：複合新領域

キーワード：核膜孔複合体 細胞周期 オートファジー Tpr Nup62 Nup358 中心体 p 5 3

1. 研究開始当初の背景

細胞核膜上に多数ある核膜孔は核膜孔複合体から成り立っており、その複合体は約 30 種類の核膜孔複合体因子 (ヌクレオポリン) から構成されている。この核膜孔複合体の機能は細胞質-核間の分子輸送の制御であり、これによって、転写因子は核内に移行する一方、mRNA などは核外に輸送される。細胞内の物質輸送は物質を正確に分配し輸送するために精密に制御されており、この分子輸送の異常が原因となり、癌や発育欠陥・障害等、数々の疾患をもたらすことが多数報告されている。近年、この核膜孔を介した物質輸送の異常と特に癌との関連性が多数指摘されている。

核膜孔複合体は、核膜とともに細胞分裂初期に崩壊後、細胞分裂終期に再構築される。この細胞分裂期における核膜孔複合体の役割が盛んに議論されるようになり、核膜孔複合体の既知の機能とは異なる、細胞分裂期における重要な新規機能が研究代表者を中心に見出されてきた。ヌクレオポリンが正常な細胞分裂に非常に重要であり、その異常発現・機能が染色体分離異常を誘発し、癌の発症・悪性化に深く関わっていることを明らかにしてきた。このように研究代表者によって核膜孔複合体の細胞分裂期における新規機能、つまり分裂期におけるヌクレオポリンによる物質輸送機構、そして癌との関連性が明らかにされつつあるが、分裂期におけるその詳細なダイナミクスのメカニズム、分裂期チェックポイントにおける分子間相互作用については未だ不明である。また、様々な局面でヌクレオポリンによる物質輸送機構の重要性が明らかになってきており、ヌクレオポリンと相互作用因子との複合体の機能と構造の解析は今後の生命科学の分野において重要な知見をもたらすと考えられる。本研究課題では、NPC タンパク質の詳細な細胞内動態

を解析すると共に、ナノポアの再構成を試みることを目的としている。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は二つある。

目的 1 : 核膜孔複合体の細胞分裂時における崩壊・再構築ダイナミクスの時系列動態解析
目的 2 : ヌクレオポリン複合体の構造特性に基づく機能・動態の解析

3. 研究の方法

目的 1 : 核膜孔複合体の細胞分裂時における崩壊・再構築ダイナミクスの時系列動態解析
共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光タグ融合ヌクレオポリンを発現するよう樹立した細胞株をライブセルイメージングにより観察することにより、有糸分裂期間におけるヌクレオポリン (個別に、および複合体として) の挙動を解析する。さらに蛍光共鳴エネルギー移動法や全内部反射蛍光法を用いて解析し、ヌクレオポリンの相互作用の詳細な検討や高解像度一分子ライブセルイメージング実験を行う。

目的 2 : 所属大学内あるいは他大学との共同研究を通じて、以下の方法を用いる。高速原子間力顕微鏡、核磁気共鳴法、X線結晶解析法などによりヌクレオポリン複合体の立体構造を解析し、さらに蛋白質細胞内核磁気共鳴法 (in cell NMR) により生きた細胞内でのヌクレオポリン蛋白質の立体構造を精密に解析する。

4. 研究成果

目的 1 に関して、いくつかのヌクレオポリンについては GFP 蛍光タグを付加したヌクレオポリンを発現する細胞株を樹立した。有糸分裂期間におけるヌクレオポリンの挙動をライブセルイメージング解析により行っており良好な結果を得ている。また、そ

これらのヌクレオポリンをノックダウンした際に染色体分離異常などの表現型を認めるなど、有糸分裂期におけるヌクレオポリンの重要性も明らかにしている。これら見出した結果について、Cell cycle 誌 (2013) の表紙も含む 7 つの論文を発表した (図 1) (インパクトファクターは平均 ~ 5 (下記研究論文リスト参照))



LANDIS (図 1)

目的 2 に関して、数物科学系の安藤教授、ロックフェラー大学の Blobel 教授と連携して研究を行い、ヌクレオポリン複合体の構造と機能・動態の解析を進めている。さらに京都大学の朽尾教授、カリフォルニア工科大学の Hoelz 教授との連携によりヌクレオポリン複合体の立体構造解析に着手している (Ohnishi H et al. 2012 PLOS ONE)。すでにヌクレオポリン Rae1 のタンパク質を昆虫細胞を用いて大量に精製する手法を確立し、順次実験に供している。現在、2 報の論文を投稿準備中である。平成 27 - 28 年度中にはこれらの論文が受理されることを目標にしていきたい。

また、発表した論文の共著者である本研究室に在籍した 4 人の大学院生は、全員に受賞実績がある。金沢大学高安賞 (本学医学博士優秀論文賞 - 2011 年、1 人)、生化学会北陸支部学生ベスト発表賞 (2 人)、日本消

化器癌発生学会総会優秀演題賞 (1 人)、金沢大学学長賞 (1 人)。また、本研究は国内・国外の研究組織に関わらず積極的な交流・意見交換を行っている。実際に研究者が他研究組織に赴き、新しい実験手法を学んだり情報の収集などを行ってきた。今後も国内・国外問わず大学院生・研究者を交換・招聘・派遣する準備がある。

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 7 件)

1 Kobayashi A, Hashizume C, Dowaki T and Wong RW Therapeutic potential of mitotic interaction between the nucleoporin Tpr and Aurora kinase A. Cell Cycle. 査読有、14(9): 1447-1458 (2015) DOI:10.1080/15384101.2015.1021518#sthash.k8FJQ76k.dpuf

2 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):3804-16. (2013) DOI: 10.4161/cc.26671.

3 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

4 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.

5 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)

6 Funasaka T, Tsuka E and Wong RW Regulation of autophagy by Nucleoporin Tpr. Sci. Rep. 査読有、2: 878 (2012) DOI:10.138/srep00878

7 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 8 件)

1 Richard Wong, Unexpected role of nucleoporins in coordination of cell cycle and carcinogenesis. CASB seminar, Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland 2014年11月05日、Brisbane、St Lucia、Australia (招待講演)

2 Richard Wong, Mitotic Nucleoporins Control Chromosome Dynamics to Ensure Proper Chromosome Segregation. BIT's 4th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2014 2014年04月25日、(Dalian, China) (招待講演)

3 Richard Wong, The role of Nuclear Pore Proteins in coordination of cell cycle progression and tumorigenesis. West China hospital, Sichuan University 2014年03月10日、(Chengdu, Sichuan, China) (招待講演)

4 Richard Wong, Nucleoporins mitotic functions and carcinogenesis. QBIC 生命システム研究センター 理化学研究所 2013年09月27日、大阪 (招待講演)

5 Richard Wong, Nucleoporin Nup88 regulates chromosome dynamics during mitosis. 2013 International Conference on Biological, Medical and Chemical Engineering (BMCE2013) (Hong Kong, China) 2013年12月1日、(招待講演)

6 Richard Wong, Nuclear Pore Proteins and Carcinogenesis. Department of Health Technology and Informatics, Faculty of Health and Social Sciences, The Hong Kong Polytechnic University (PolyU) 2012年09月03日、(Hong Kong, China) (招待講演)

7 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、札幌

8 Richard Wong, Nucleoporin Nup358/RanBP2 associates with Karyopherin beta 1 to orchestrate accurate chromosome segregation in mitosis. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of JSDB and The

64th Annual Meeting of JSCB 2012年05月31日、神戸 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://fsowonglab.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
Richard Wong (WONG, Richard)
金沢大学・自然システム学系・教授
研究者番号：30464035