

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K08620  
研究課題名(和文)核膜孔タンパク質の質的变化による細胞運命の決定

研究課題名(英文)Oncogenic mechanisms by nucleoporin

研究代表者

齋藤 祥子 (Saito, Shoko)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：70344885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：核膜孔タンパク質(Nup)は核膜孔の構成因子で、核膜孔の構造維持や核-細胞質間物質輸送の介助を担う。Nupはがん細胞において変異が生じているが、変異型Nupのがんにおける機能については未解明な点が多く残されている。本研究では、白血病でみられるNup98、Nup214融合遺伝子産物の機能解明を目指し、実験を進めた。その結果、変異型Nupが他のNupの細胞内局在に影響を与えていること、様々な核外輸送受容体の細胞内局在に変調を引き起こすことを明らかにした。また、変異型Nupの一つであるSET-Nup214がヒストンメチル化酵素と相互作用し、転写活性に影響を及ぼしている可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、予後の悪い、あるいは治療薬に抵抗性との報告がある白血病症例で見られるがん遺伝子産物の機能解析を行った。他のタンパク質との相互作用を明らかにしながら新たな分子機構を解明した点が、学術的に意義がある。そして、がん遺伝子産物の相互作用機構を分子レベルで明らかとすることは、核膜孔タンパク質の質的異常によって引き起こされるがん化の治療法開発の基礎となることを期待している。この点が、本研究成果の社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Nuclear pore complexes are comprised of about 30 different proteins, known as nucleoporins (Nups). Several nup mutations have been found in cancer. However, the molecular mechanisms of these proteins in oncogenesis remain unclear. This study aimed to clarify molecular functions of Nup fusion proteins. We found that Nup fusion proteins have effects on subcellular localization of some Nups and nuclear transport receptors. In addition, SET-Nup214, one of nup fusion proteins, interacts with a histone methyltransferase and affects transcription activity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核膜孔 核-細胞質間物質輸送 核外輸送 nucleoporin 白血病 転写

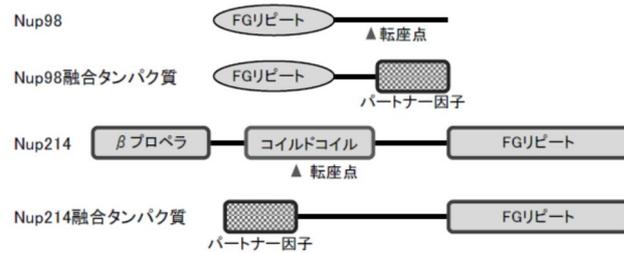
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核膜孔タンパク質(Nup)は核膜孔の構成因子で、核膜孔の構造維持や核 - 細胞質間物質輸送の介助を担う。その一方、Nup が核膜以外の場所で物質輸送の介助を行ったり、輸送介助以外の役割を果たしたりすることも報告され、細胞内での多彩な機能が近年明らかになりつつある。Nup はがん細胞において増加や変異が生じており、その品質管理は細胞を正常な状態に保つのに必要である。しかし、輸送異常が生じた因子とがん化との関係や変異型 Nup の輸送介助以外の機能については未解明な点が多く残されている。

Nup98 および Nup214 は、CRM1/Exportin 1 や NXF1/TAP など核外輸送受容体と相互作用してタンパク質や RNA の輸送介助を行う核膜孔タンパク質である。造血器腫瘍では様々なパートナータンパク質と 30 種類以上の転座型融合遺伝子産物を形成する(図1)。これ以外にも、癌細胞において核膜孔タンパク質の質的、量的異常が観察されることから、このことが細胞の性質に深く関与することが示唆される。しかしながら、核膜孔タンパク質の量と質の変動が、どのような遺伝子発現パターンの変化につながり細胞性質を決定するのは、不明な点が多く残されている。本研究を遂行することで、新規のがん化機構を解明し、治療法開発の基礎となることを期待している。

図1 Nup98, Nup214および融合遺伝子産物の模式図



### 2. 研究の目的

上述の背景より、本研究では、核膜孔タンパク質の質的変動が引き起こす細胞性質の変化を分子レベルで解明することを目指して実験を進めることとした。

具体的には、核膜孔タンパク質 Nup98、Nup214 を含む融合タンパク質(以下変異型 Nup)が核-細胞質間物質輸送へ与える影響を解明すると同時に、輸送以外の核内機能を明らかにし、Nup98、Nup214 の質的变化が引き起こす細胞性質の変化を分子レベルで解明した。

### 3. 研究の方法

本研究では 293T 細胞、HeLa 細胞、U2OS 細胞を用いた。また、患者由来細胞株として FKHI (DEK-Nup214 発現細胞) 及び Loucy (SET-Nup214 発現細胞) を用いて実験を行った。タンパク質の細胞内局在は、培養細胞へ発現ベクターのトランスフェクションを行う、あるいは患者由来細胞株を用い、間接蛍光抗体法による免疫染色実験により検出した。得られたサンプルは共焦点顕微鏡で観察し、定量は Imaris ソフトウェアを用いて行った。遺伝子発現解析は、細胞から得た RNA を用いて逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法により様々な hox 遺伝子の発現量を測定した。レポーターアッセイは、ヒト hoxa9,10 遺伝子の上流約 2kb をクローニングし、pGL3-basic ベクターに挿入したものをを用いて行った。タンパク質間の相互作用については、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降により検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) Nup 融合遺伝子産物がリボソーム前駆体の核外輸送に及ぼす影響

今までの研究で、変異型 Nup が核外輸送受容体 CRM1/Exportin 1 と結合すること、変異型 Nup 発現細胞では CRM1 が核外輸送を担っている基質タンパク質 IκB 及び cyclinB の核外への移行が抑制されていることが明らかとなっている。CRM1 が輸送を担う基質タンパク質の一つにリボソーム前駆体の核外輸送を担うタンパク質 NMD3 がある。リボソーム生合成の異常は癌化との関係が示唆されていることから、変異型 Nup 発現による NMD3 機能への影響について検討を行った。変異型 Nup 発現細胞における NMD3 の細胞内局在を観察したところ、本来細胞質に多く存在する NMD3 が核への局在が増加していることが観察された。そこで、NMD3 の細胞内局在変化がリボソーム前駆体の核外輸送に影響を与えているか、*in situ* ハイブリダイゼーション法により rRNA の局在を検討したところ、核への蓄積が確認された。以上の結果から、変異型 Nup は CRM1 の機能抑制を介して rRNA の局在に影響を与える可能性が示された。

#### (2) Nup 融合遺伝子産物が他の核膜孔複合体構成因子へ与える影響

核膜孔は約 30 種類の nucleoporin (Nup) と呼ばれる核膜孔タンパク質により形成される巨大複合体である。それぞれの核膜孔タンパク質は、互いに結合して特徴的な構造を形成している。野生型 Nup98 及び Nup214 の多くは核膜上に存在する。一方、染色体転座によりパートナー遺伝子産物とのキメラとなった変異型 Nup98 及び Nup214 は主に核に局在し、野生型とは異なる局在

様式を示す。従って、変異型 Nup 発現細胞では普段とは異なる核膜孔レパートリーが生じている可能性が考えられる。

そこで、変異型 Nup が核に局在することにより、他の核膜孔タンパク質の局在に影響を与えるか検討した。まず、変異型 Nup214 を発現する患者由来細胞株と非発現血球細胞株において複数の核膜孔タンパク質の細胞内局在を観察したところ、変異型 Nup214 発現細胞では Nup62 及び Nup98 が核に多く存在することが観察された。そこで、この局在の変化が、変異型 Nup214 の発現に依存しているのかを検討するため、DEK-Nup214 及び SET-Nup214 を培養細胞で発現させ、核膜孔タンパク質の細胞内局在を観察した。その結果、一部の核膜孔タンパク質が正常とは異なり核に分布する割合が増加していることが明らかとなった。変異型 Nup214 タンパク質に含まれる Nup214 領域のみを発現させた細胞でも同様の局在変化が見られたことから、この局在の移動は Nup214 領域に依存していることが示唆された。

近年、いくつかの野生型 Nup は核内において遺伝子発現制御に関与していることが明らかとなっている。今回の実験より、変異型 Nup が野生型 Nup の細胞内局在に変化を与えていることが明らかとなり、変異型 Nup による発がん機構において、野生型 Nup が影響を及ぼしている可能性を提案することができた。

### ( 3 ) Nup 融合遺伝子産物及び野生型の Nup98 が様々な核外輸送受容体へ及ぼす影響

生体高分子の核内輸送及び核外輸送には、多くの場合受容体が介在する。現在までに、核外輸送受容体として Exportin 1 から 7 と NXF1/TAP が知られている。前述のように、変異型 Nup98 及び Nup214 は CRM1/Exportin1 と結合し、その機能に影響を与えていることが明らかとなっている。そこで、変異型 Nup が他の核外輸送受容体とその機能にも影響を与えているか検討を行うこととした。変異型 Nup 及びタグ付き Exportin2-7 を細胞で共に発現させ、免疫染色により検討を行った。HeLa 細胞あるいは U2OS 細胞では過剰発現した Exportin2-7 は核と細胞質に局在しているのに対し、変異型 Nup 発現細胞では、核にいる Exportin の割合が上昇していることが明らかとなった。このことは、変異型 Nup が、直接的あるいは間接的な作用により Exportin の細胞内動態に影響を与えている可能性を示唆している。また、Nup98 をノックダウンした細胞でも Exportin2-7 の細胞内局在が同様の変化を示していた。

今回の実験結果から、変異型 Nup が CRM1 以外の受容体を介した物質輸送にも影響を及ぼす可能性が提案された。核外輸送因子が局在変化する分子機構の解明は今後の課題である。

### ( 4 ) Nup214 融合遺伝子産物の輸送以外の核内機能の解明

DEK-Nup214 あるいは SET-Nup214 を発現する患者由来の細胞株を用いて遺伝子発現パターンの解析を行ったところ、共に白血病細胞でしばしば高発現がみられる一部のホメオボックス (Hox) 遺伝子群の発現が上昇していることが明らかとなった。転写が促進されている Hox 遺伝子領域では、転写がアクティブな遺伝子領域に見られるヒストン H3K4 のトリメチル化及びヒストン H3K79 のジメチル化の割合が高いことが認められた。

SET-Nup214 発現細胞では一部の Hox 遺伝子群において特に顕著な発現上昇が見られた。このことは、Nup に含まれる Nup214 領域が発現上昇に影響を与えているのに加え、SET 領域が影響を与えている可能性が考えられる。以前に、研究室では、SET が MLL と相互作用すること、それは、SET の酸性アミノ酸領域を介していることを明らかにしている。SET の酸性アミノ酸領域は、SET-Nup214 にも含まれている。そこで、SET-Nup214 と MLL との相互作用について検討を行った結果、免疫沈降及び免疫染色の実験により両者の相互作用が明らかとなった。SET-Nup214 が MLL へ及ぼす影響を Hox 遺伝子のエンハンサー領域を用いたレポーターアッセイを用いた実験により検討した。その結果、少量の SET-Nup214 存在下では、MLL 依存的な転写活性化を数倍程度促進することが明らかとなった。

以上の結果は、SET-Nup214 による発がん機構において MLL が関与している可能性を示している。今後は、より発がん状態を模した状態における両者の機能、及び阻害剤による細胞増殖への影響について検討を行いたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito S, Yokokawa T, Iizuka G, Cigdem S, Okuwaki M, Nagata K.	4. 巻 487(1)
2. 論文標題 Function of Nup98 subtypes and their fusion proteins, Nup98-Top11 and Nup98-SETBP1 in nuclear-cytoplasmic transport.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 96-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.04.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lin J, Kato M, Nagata K, Okuwaki M.	4. 巻 45(7)
2. 論文標題 Efficient DNA binding of NF- B requires the chaperone-like function of NPM1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 3707-3723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkw1285.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueshima S, Nagata K, Okuwaki M.	4. 巻 37(22)
2. 論文標題 Internal Associations of the Acidic Region of Upstream Binding Factor Control Its Nucleolar Localization.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e00218-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00218-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe M, Lin J, Nagata K, Okuwaki M.	4. 巻 592(2)
2. 論文標題 Selective regulation of type II interferon-inducible genes by NPM1/nucleophosmin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 244-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.12952.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 奥脇暢
2. 発表標題 核小体の構造と機能におけるNPM1の役割
3. 学会等名 第5回リボソームミーティング
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nguyen Thi Thanh Nhan, Kyosuke Nagata, Shoko Saito
2. 発表標題 Leukemia-associated Nup98 fusion proteins have the same effect as Nup98 knockdown on nucleocytoplasmic transport.
3. 学会等名 The 1st University of Tsukuba-University of Science Joint Young Researcher Meeting in Biomedical Science
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen Thi Thanh Nhan, Kyosuke Nagata, Shoko Saito
2. 発表標題 Leukemia-associated Nup98 fusion proteins impair nucleocytoplasmic transport through changing the localization of Nup98.
3. 学会等名 The 44th FEBS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奥脇 暢  (Okuwaki Mitsuru)  (50322699)	北里大学・薬学部・教授    (32607)	