

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03444

研究課題名(和文) HOXクラスター上に形成されるCRM1依存的な相分離構造体の実体解明

研究課題名(英文) The analysis of phase-separated nuclear bodies of NUP-fusion

研究代表者

岡 正啓 (Oka, Masahiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：40432504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヌクレオポリン融合遺伝子産物がCRM1依存的に形成する相分離構造体の構成因子を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。本研究の成果としてヌクレオポリン融合遺伝子産物とCRM1の双方と相互作用する複数の因子を見出した。さらにゲノム上でもヌクレオポリン融合遺伝子産物と、これらの相互作用因子が共に集積して遺伝子を活性化していることが分かった。また変異体の解析から、ヌクレオポリン融合遺伝子産物の相分離が相互作用因子の標的遺伝子領域への集積に重要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヌクレオポリン融合遺伝子産物がどのように白血病に寄与しているかについては不明な部分が多い。本成果により、ヌクレオポリン融合遺伝子産物が形成する相分離構造体の構成因子やその重要性の一端が明らかとなった。病理メカニズムの解明や治療法の開発へと繋がる成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the components of the phase-separated body formed by nucleoporin fusion gene products (nucleoporin fusion proteins) and to determine their function. We found several proteins that interact with nucleoporin fusion proteins. In addition, these interacting proteins and nucleoporin fusion protein co-accumulated on the genome to activate the target genes. Furthermore, analysis of the mutants revealed that phase separation of nucleoporin fusion proteins is important for the accumulation of interacting molecules on target gene regions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヌクレオポリン 融合遺伝子 CRM1 相分離 HOX遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白血病で見られる核膜孔構成因子(ヌクレオポリン)と様々なパートナーで形成される融合遺伝子産物の機能は、依然として不明な点が多い。我々は、ヌクレオポリン融合遺伝子産物が HOX クラスター領域上で核外輸送因子 CRM1 を有する相分離構造体を形成することを見出した。さらに、CRM1 阻害剤がこの構造体を崩壊させることから、CRM1 の機能に依存して形成・機能する相分離構造体であることが示唆された。一方、急性骨髄性白血病(AML)で最も高頻度に見られる遺伝子変異の一つである変異型 NPM1 の機能にも CRM1 が重要であることが分かった。変異型 NPM1 では、野生型 NPM1 の C 末端付近にフレームシフトが生じ、その結果、新たな核外輸送シグナル(NES)が付加される。この変異型 NPM1 はクロマチンに結合した CRM1 により HOX クラスター上ヘトリクルートされ遺伝子を活性化していることが明らかとなった(Oka et al., eLife, 2019)。以上のように、白血病関連因子の機能における CRM1 の重要性が見出されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ヌクレオポリン融合遺伝子産物が CRM1 依存的に形成する相分離構造体の構成因子を同定して、その機能を明らかにすることを目的とした。また、変異体や薬剤の利用により相分離構造体の形成と機能の相関を明らかにすることを目的とした。さらに、副作用の少ない新規 CRM1 阻害剤の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1)ヌクレオポリン融合遺伝子産物、ならびに CRM1 と相互作用する因子の網羅的同定:

免疫沈降と質量分析を組み合わせた RIME 法を用いて、クロマチン上で相互作用する因子の同定を行う。

(2)ヌクレオポリン融合遺伝子産物と結合因子の関連の検証:

同定した結合因子のノックダウン等を行い相分離構造体との関連を明らかにする。また、各種変異型ヌクレオポリン融合遺伝子産物を用いた機能解析を行う。

(3)新規 CRM1 阻害剤の開発研究

4. 研究成果

(1)ヌクレオポリン融合遺伝子産物 SET-NUP214、CRM1 と相互作用する因子の網羅的同定:

クロマチン上で SET-NUP214 や CRM1 と相互作用する因子を同定するため、NUP214 抗体、ならびに CRM1 抗体を用いた RIME を行った。コントロール IgG を用いた RIME でも見られる因子(ノンспе)を除き、NUP214 抗体と CRM1 抗体で共通に見出される結合因子を見出すことで、相分離構造体に含まれる因子の同定を試みた。NUP214 と CRM1 の共通結合因子としては、核膜孔構成因子や核輸送因子が多く見出された。興味深いことに、核輸送に関連しない幾つかの分子が SET-NUP214 と CRM1 の双方に強く結合する候補因子として見出された。

(2)ヌクレオポリン融合遺伝子産物と結合因子の関連の検証:

上記(1)で見出された結合因子について相分離構造体の機能との関連を検証した。siRNA による遺伝子ノックダウンを行ったところ、結合候補因子の KMT2A/MLL1 と Striatin のノックダウンで SET-NUP214 の標的遺伝子である HOX 遺伝子の発現低下が見られた。また、MLL1 については、SET-NUP214 の相分離構造体と共局在を示すことが分かった。さらにゲノム上でも SET-NUP214/CRM1/MLL1 が共局在しており、特に HOX クラスター領域に集積していることが分かった。さらに MLL1 をノックダウンすると、SET-NUP214 ならびに CRM1 の HOX 領域への結合が極端に低下することが明らかとなった。しかしながら、相分離構造体の形成自体には影響しなかったことから、MLL1 の機能は相分離構造体の形成ではなく、特定ゲノム領域へのターゲティングに重要であることが示唆された。一方、我々は以前、CRM1 阻害剤である KPT-330 によって SET-NUP214 の相分離構造体が崩壊することを見出していたが、同薬剤によって MLL1 の HOX 領域への集積も大きく低減することが明らかとなった。

SET-NUP214 といくつかの共通点を有する NUP98-HOXA9 について解析を行った。その結果、NUP98-HOXA9 が形成する相分離構造体にも、MLL1 が濃縮されて機能していることが明らかとなった。次に NUP98-HOXA9 の NUP98FG リピートの変異(FG AG)により相分離しない変異体、ならびに HOXA9 ホメオドメイン部位の変異により DNA 結合能を欠損した変異体を作成して解析を進めた。その結果、野生型の NUP98-HOXA9 に比べて両者でともに HOX 遺伝子発現、ならびに HOX 遺伝子領域への結合の低下が見られた。さらに、これらの変異体と MLL1 との関連を解析したとこ

る、相分離変異体、ならびに DNA 結合変異体を発現する細胞の双方において、MLL1 の HOX 遺伝子領域への集積がほとんど見られなかった。

以上から、NUP98-HOXA9 の NUP98FG 部位による相分離と、ホメオドメイン部位による DNA との相互作用、それぞれの協調的な作用が NUP98-HOXA9 による MLL1 の集積を伴う転写活性化に重要であることが示唆された。

(3) 新規 CRM1 阻害剤の開発研究：

既存の CRM1 阻害剤にはすでに FDA に承認されているものも含まれるが、その副作用が懸念されている。そこで、新規 CRM1 阻害剤の開発研究を進めた。その結果、既存の CRM1 阻害剤とは異なる作用機序を有すると考えられる薬剤を見出すことが出来た。薬剤の特性について解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Oka Masahiro, Otani Mayumi, Miyamoto Yoichi, Adachi Jun, Tomonaga Takeshi, Asally Munehiro, Ohkawa Yasuyuki, Yoneda Yoshihiro	4. 巻
2. 論文標題 Phase-separated nuclear bodies of nucleoporin fusions, SET-NUP214 and NUP98-HOXA9, promote condensation of MLL1 and CRM1 to activate target genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.05.24.493212	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Kohji, Motohashi Saya, Oikawa Tsunekazu, Tago Naoko, Koizumi Rei, Ono Masaya, Tachibana Toshiaki, Yoshida Ayano, Yoshida Saishu, Shimoda Masayuki, Oka Masahiro, Yoneda Yoshihiro, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 119
2. 論文標題 Extended-synaptotagmin 1 engages in unconventional protein secretion mediated via SEC22B⁺ vesicle pathway in liver cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2202730119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2202730119	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 Aomine Yoshiatsu, Sakurai Koki, Macpherson Tom, Ozawa Takaaki, Miyamoto Yoichi, Yoneda Yoshihiro, Oka Masahiro, Hikida Takatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Importin 3 (KPNA3) Deficiency Augments Effortful Reward-Seeking Behavior in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 905991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.905991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto Yoichi, Itoh Yumi, Suzuki Tatsuya, Tanaka Tomohisa, Sakai Yusuke, Koido Masaru, Hata Chiaki, Wang Cai-Xia, Otani Mayumi, Moriishi Kohji, Tachibana Taro, Kamatani Yoichiro, Yoneda Yoshihiro, Okamoto Toru, Oka Masahiro	4. 巻 5
2. 論文標題 SARS-CoV-2 ORF6 disrupts nucleocytoplasmic trafficking to advance viral replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03427-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagatake T, Kishino S, Urano E, Murakami H, Kitamura N, Konishi K, Ohno H, Tiwari P, Morimoto S, Node E, Adachi J, Abe Y, Isoyama J, Sawane K, Honda T, Inoue A, Uwamizu A, Matsuzaka T, Miyamoto Y, Hirata S, Saika A, Shibata Y, Hosomi K, Matsunaga A, Shimano H, Arita M, Aoki J, Oka M et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Intestinal microbe-dependent 3 lipid metabolite KetoA prevents inflammatory diseases in mice and cynomolgus macaques	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 289 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-021-00477-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakurai K, Itou T, Morita M, Kasahara E, Moriyama T, Macpherson T, Ozawa T, Miyamoto Y, Yoneda Y, Sekiyama A, Oka M, Hikida T	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of Importin 1/KPNA1 deletion and adolescent social isolation stress on psychiatric disorder-associated behaviors in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0258364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0258364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Junpei, Inuki Shinsuke, Matsuda Yuka, Miyamoto Yoichi, Otani Mayumi, Oka Masahiro, Oishi Shinya, Ohno Hiroaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Total Synthesis of Dictyodendrins A-F by the Gold Catalyzed Cascade Cyclization of Conjugated Diyne with Pyrrole	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 11064 ~ 11064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202002563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Yoichi, Sasaki Mitsuho, Miyata Haruhiko, Monobe Yoko, Nagai Masahiro, Otani Mayumi, Whiley Penny A. F., Morohoshi Akane, Oki Shinya, Matsuda Junichiro, Akagi Ken ichi, Adachi Jun, Okabe Masaru, Ikawa Masahito, Yoneda Yoshihiro, Loveland Kate L., Oka Masahiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Genetic loss of importin 4 causes abnormal sperm morphology and impacts on male fertility in mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 16224 ~ 16242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000768RR	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 該当する

1. 著者名 Moriyama Tetsuji, Yoneda Yoshihiro, Oka Masahiro, Yamada Masami	4. 巻 10
2. 論文標題 Transportin-2 plays a critical role in nucleocytoplasmic shuttling of oestrogen receptor-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75631-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計21件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡正啓
2. 発表標題 ヌクレオポリン融合遺伝子産物が形成する核内構造体の役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原大輝、高崎輝恒、富本尚史、Golam Iftakhar Khandakar、佐藤亮介、岡正啓、杉浦麗子
2. 発表標題 MAPK活性依存的抗がん剤シースACA-28がMAPKシグナル上流因子の輸送に与える影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木佐貫玲央、宮本洋一、岡正啓、斉藤寿仁
2. 発表標題 Importin- の微小核への分子濃縮
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青峰良淳、櫻井航輝、マクファーソントム、小澤貴明、宮本洋一、米田悦啓、岡正啓、疋田貴俊
2. 発表標題 核輸送因子 Importin 3/KPNA3 欠損による動機づけの上昇とその脳内ネットワーク変化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井航輝、宮本洋一、森田真規子、マクファーソントム、小澤貴明、米田悦啓、岡正啓、疋田貴俊
2. 発表標題 核輸送因子 Importin 4/KPNA4 ノックアウトマウスにおける疾患様行動異常の要因探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野克俊、菅原将樹、加藤諒大、野宮廣貴、宮本洋一、岡正啓、疋田貴俊、伊藤貴文、藤田聡、山田雅己
2. 発表標題 KPNA1/インポーチン 1のマウス神経軸索輸送・神経遊走における新規機能
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤諒大、水野克俊、菅原将樹、野宮廣貴、宮本洋一、岡正啓、疋田貴俊、藤田聡、山田雅己
2. 発表標題 神経細胞遊走活性を指標としたKPNA1/Importin 1の新規機能の解明
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野宮廣貴、疋田貴俊、宮本洋一、岡正啓、山田 雅巳
2. 発表標題 KPNA1機能不全による統合失調症発症への関与
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原将樹、水野克俊、加藤諒大、野宮廣貴、伊藤貴文、宮本洋一、岡正啓、疋田貴俊、藤田聡、山田雅巳
2. 発表標題 軸索輸送におけるKPNA1複合体関連因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本洋一、斉藤寿仁、岡正啓
2. 発表標題 核輸送分子の微小核局在に関する研究
3. 学会等名 2022年度生物機能研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oka M, Otani M, Miyamoto Y, Adachi J, Tomonaga T, Asally M, Ohkawa Y, Yoneda Y
2. 発表標題 The Roles of Phase-separated Nuclear Bodies of Nucleoporin Fusions
3. 学会等名 14th International Congress of Cell Biology & 9th Asian Pacific Organization for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡 正啓
2. 発表標題 核外輸送因子CRM1の新たな機能
3. 学会等名 公益財団法人蓬庵社研究助成発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原大輝; 高崎輝恒; 富本尚史; 豊田教幹; Golam Khandakar; 佐藤亮介; 岡正啓; 米田悦啓; 杉浦麗子
2. 発表標題 核外輸送システムに注目した新規抗がん剤シースACA-28のERK MAPK経路調節機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野宮廣貴, 疋田貴俊, 宮本洋一, 岡正啓, 山田雅巳
2. 発表標題 importin 5は統合失調症の環境因子暴露への影響を変動させる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本洋一, 伊東祐美, 鈴木達也, 田中智久, 坂井祐介, 小井土大, 波田千彰, 王彩霞, 大谷真弓, 森石恆司, 立花太郎, 鎌谷洋一郎, 米田悦啓, 岡本徹, 岡正啓
2. 発表標題 SARS-CoV-2構成因子ORF6による核輸送制御機構
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原将樹,水野克俊,山口楓香,加藤諒大,野宮廣貴,宮本洋一,岡正啓,疋田貴俊,藤田聡,山田雅巳
2. 発表標題 Importin alpha 5 (KPNA1) の神経細胞内における新規機能的役割の解明
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡 正啓
2. 発表標題 ヌクレオポリン融合タンパク質と白血病
3. 学会等名 第43回、日本分子生物学会年会 核膜孔複合体に関するワークショップ
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 菅原 将樹、水野 克俊、山口 楓香、野宮 廣貴、宮本 洋一、岡 正啓、疋田 貴俊、藤田 聡、山田 雅己
2. 発表標題 KPNA1の軸索輸送における機能的役割の解明
3. 学会等名 第43回、日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 盛山 哲嗣、米田 悦啓、岡 正啓、山田 雅己
2. 発表標題 Estrogen receptor- の核-細胞質間シャトリングにおけるTransportin-2の重要な役割
3. 学会等名 第43回、日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 宮本 洋一、徳永 詢、鈴木 達也、大谷 真弓、井貫 晋輔、江崎 剛史、長尾 知生子、水口 賢司、大野 浩章、米田 悦啓、岡本 徹、松浦 善治、岡 正啓
2. 発表標題 核小体形成を標的とした抗フラビウイルス薬の同定
3. 学会等名 第43回、日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 櫻井航輝、宮本洋一、盛山哲嗣、森田真規子、伊藤大一、岡正啓、疋田貴俊
2. 発表標題 核輸送因子Kpna1 ノックアウトマウスにおける行動異常の環境による増悪
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsumura M, Oka M, Yoneda Y	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 8
3. 書名 Molecular Architecture of the Nuclear Pore Complex	

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 SARS-CoV-2を含む広範なウイルス感染症に対する治療薬	発明者 宮本洋一、岡本徹、齋藤暁、岡正啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-63554	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 SARS-CoV-2を含む広範なウイルス感染症に対する治療薬	発明者 宮本洋一、岡本徹、齋藤暁、岡正啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/015292	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 インボータイン阻害によるウイルス抑制	発明者 岡本徹、宮本洋一、岡正啓、米田悦啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/022829	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 インボータイン阻害によるウイルス抑制	発明者 岡本徹、宮本洋一、 岡正啓、米田悦啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-104588	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 フラビウイルス感染に対する抗ウイルス治療	発明者 宮本洋一、岡正啓、 米田悦啓、岡本徹、 徳永詢、松浦善治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/020916	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	加藤 明良 (Katoh Akira) (00167339)	大分大学・医学部・特任教授 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------