

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590326

研究課題名（和文）MORC3によるPMLボディ機能の調節機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of PML body function by MORC3

研究代表者

井上 徳光（INOUE NORIMITSU）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター（研究所）・研究所・部長

研究者番号：80252708

研究成果の概要（和文）：急性前骨髄球性白血病は、PMLとRAR $\alpha$ が融合した異常蛋白が作られることが原因で発症する。PMLは、通常、核内でPMLボディと呼ばれるドット状局在を示すが、白血病では破壊されている。私たちは、MORC3が、PMLボディに局在し、PMLと同様に白血病ではその局在が障害されている事から、白血病のターゲットとして注目している。今回、MORC3が、2ステップでPMLボディに局在化する分子機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The PML-RAR $\alpha$  fusion proteins cause acute promyelocytic leukemia (APL). The PML proteins form nuclear foci called PML-body in normal cells. However, PML-nuclear body is disrupted in APL cells. We focus on the localization mechanisms of MORC3 as a drug target of APL because the localization of MORC3 on PML-nuclear body is also disrupted in APL cells. In this study, we show that MORC3 colocalizes with PML by a two-step molecular mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学・腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：MORC3、PMLボディ、SUMO、白血病、核ダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

PMLは、ほとんどの急性前骨髄球性白血病（APL）において、レチノイン酸レセプター（RAR $\alpha$ ）と融合遺伝子を形成する遺伝子として同定された。PML蛋白によって形成されるPMLボディは、p53などの転写制御、細胞老化等の他、hematopoietic stem cell (HSC)やHSCの異常によって起こるChronic myeloid leukemia (CML)のleukemia-initiating cells (LIC)の維持に必

要であることが報告されている。しかし、PMLのマウスホモログのノックアウトマウスは、様々な異常が指摘されているが、マウスは正常に発育し、血液細胞における分化の異常も、きわめて軽微である。

MORC3は、よく保存されたGHL (Gyrase B, Hsp90, MutL) -ATPase domain、Zinc-finger type CW domain、Coiled-coil domainをもつ事の特徴とする4種類のMORCファミリーのうちの1つ（マウスは、

Morc1, 2a, 2b, 3, 4 の 5 種類存在する。)である。我々は、精子形成の減数分裂に異常のあるマウスを解析し (Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 14361-14366, 1998)、ポジショナルクローニングにより MORC ファミリー蛋白の 1 つである MORC1 を同定した (Hum. Mol. Genet. 8, 1201-1207, 1999)。そして、MORC3 が、その ATPase domain 依存的に、PML ボディに局在し、PML ボディに局在化する蛋白の局在化や機能の制御に関与する事を示してきた (Mol. Biol. Cell 18, 1701-1709, 2007)。さらに、PML-RAR $\alpha$  遺伝子を発現する APL の細胞では、PML ボディは破壊され、MORC3 による核ボディの形成も認められない。しかし、APL の治療薬であるレチノイン酸や亜ヒ酸による PML-RAR $\alpha$  融合蛋白の分解などによって、PML ボディは再形成されると共に、MORC3 も PML ボディへリクルートされ、核ボディを形成し、APL 細胞には、分化やアポトーシスが誘導される。

また、PML ノックアウトマウスの異常が軽微であるのに対し、PML 依存的に局在を変化させていると考えられる MORC3 のノックアウトマウスは、出生前後で死亡し、造血系に著しい異常が観察される。これらのことから、PML と MORC3 は、協調して PML ボディの機能を制御している可能性が考えられる。それ故、APL において、MORC3 の局在や機能を制御することにより、PML とは独立に APL 細胞を分化やアポトーシスに導く事ができる可能性が期待された。

## 2. 研究の目的

本研究は、MORC3 の機能解析を通じて、様々な機能を担う白血病関連蛋白 PML により形成される核内ドメイン PML ボディの核内での機能制御機構を解明することを目的としている。そして、APL において、PML ボディとは独立に、破壊された MORC3 機能を回復し、APL の新規ターゲットとしての MORC3 の役割を検討する事を最終目的とする。そこで、今回、MORC3 の核内ボディ形成機構及び PML ボディへの局在機構を解析した。さらに、MORC3 ノックアウトマウスを用いて、MORC3 の造血分化機構を解析する。

## 3. 研究の方法

### MORC3 の細胞レベルの解析

MORC3 の様々なドメインの機能欠損変異体 (ATPase ドメイン変異体 E35A、コイルドコイルドメイン欠損変異体、CW ドメイン変異体 W419A) を作成し、それらの局在を検討した。また、MORC3 の SUMO 化の作用を検討するために、MORC3 の 5ヶ所のリシンをアルギニンへ置換した変異体

(K597R, K650R, K651R, K740R, K794R) と PML I の SUMO 結合ドメイン変異体 (556-559 番のアミノ酸 VVVI を AAAS に置換) を作成し、MORC3 と PML との相互作用における SUMO 修飾の関与を検討した。

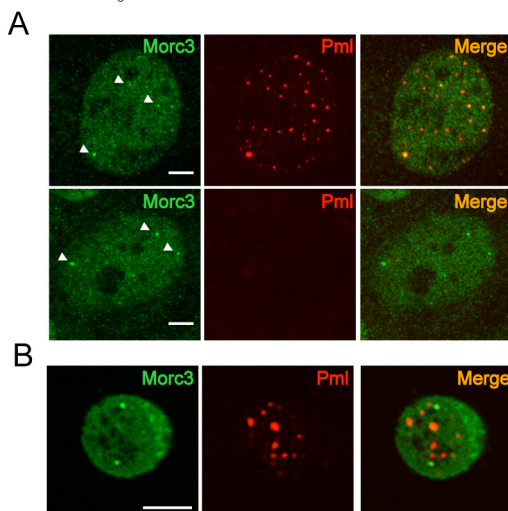
### マウス個体における MORC3 の機能および白血病での役割

マウス Morc3 ノックアウトマウスは、出生前後で死亡するため、14.5 日胎児肝臓から造血細胞を取り出し、致死量の放射線照射したマウスに移植し、造血細胞の分化状態を表面マーカーを用いて観察した。また、白血病細胞における MORC3 の発現量と細胞内局在を Western blotting および蛍光抗体法で観察した。

## 4. 研究成果

### MORC3 の細胞レベルの解析

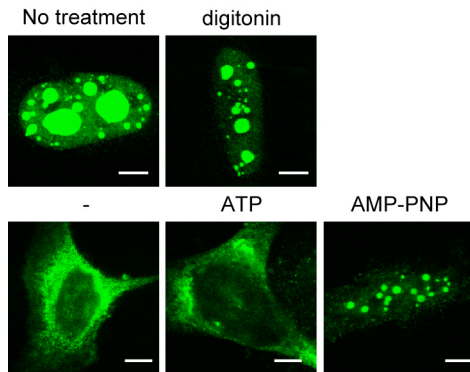
PML ボディが破壊された APL 細胞や、PML をノックダウンした骨肉腫細胞株 Saos2 細胞では、MORC3 による核ボディ形成は、著しく抑制されたが、PML ノックアウト胎児繊維芽細胞 (MEF) においては、数的減少はあるが、確かに検出された (図 A 緑: Morc3、赤: Pml)。また、MEF における MORC3 のほとんどは、PML ボディに局在したが、マウス骨髄細胞の 78% が、PML ボディとは、独立な MORC3 ボディを形成していた (図 B 緑: Morc3、赤: Pml)。それ故、MORC3 には、MORC3 ボディを形成するステップと PML と共局在するステップと独立の分子機構が働いている事が予想された。そこで、本研究で、その分子機構を明らかにした。



我々は、以前、MORC3 の ATPase ドメインの酵素活性を欠損させた E35A 変異体が、MORC3 ドメインを形成することができない事を示した。今回、拡散状態では、核マトリックスへ結合しており、また、MORC3 の核

内ボディの形成は、DNase I 感受性である事から、DNA もしくはクロマチン依存的である事が明らかになった。また、50 $\mu$ g/ml Digitonin によって膜透過処理された細胞を ATP または ATPase により加水分解されない AMP-PNP 存在下で、37 $^{\circ}$ C で 30 分間処理すると、ATP 存在下では、MORC3 は拡散し、核内から洗い流されてしまったが、AMP-PNP 存在下では、MORC3 は、核内ボディを維持し続けた (図 C 緑: MORC3)。それ故、MORC3 は、Hsp90 などの他の GHL-ATPase 蛋白と同様、ATP が結合した状態 (実験では、AMP-PNP が結合した状態) では、ATPase ドメイン同士が結合して”クローズド”状態となり、核内ボディを形成する事が明らかとなった。この事は、Hsp90 の ATPase 阻害剤と同じように、MORC3 特異的な ATPase 阻害剤が開発できれば、MORC3 の核内ドメイン形成の誘導が可能であると考えられた。

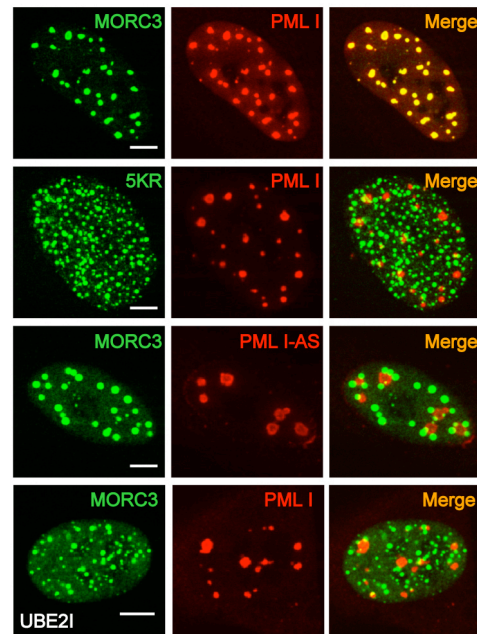
C



次に、形成された MORC3 ボディが、PML ボディと互いに相互作用するかを検討した。MORC3 は、SUMO 化蛋白のため、その SUMO 化サイト全てを同定し、5 つの SUMO 化リシンを全てアルギニンに置換した SUMO 化されない MORC3-5KR 変異体を作成した。そして、MORC3-5KR と PML を HeLa 細胞に発現させ、それらの局在を観察した (図 D 緑: MORC3 及びその変異体、赤: PML I 及びその変異体)。その結果、MORC3-5KR は、核内ボディを形成したが、PML I とは共局在する事ができなかった。また、PML の SUMO 結合ドメインを欠損した PML I-AS 変異体もやはり、MORC3 の野生型と同時に発現させた時、共局在しなかった。さらに、SUMO 化に関わる E2 結合酵素 UBC9/UBE2I を siRNA によってノックダウンすることにより、MORC3 と PML I の共局在は阻害された (図 D 緑: MORC3、赤: PML I)。それ故、MORC3 と PML I は、MORC3 の SUMO と PML の SUMO 結合ドメインの結合を介して、相互作用すると考えられた。

また、マウス骨髄細胞において、PML ボディと共局在しない MORC3 ボディを抗 SUMO1 抗体で染色した所、これらの MORC3 ボディは、SUMO1 抗体で染色されなかった。それ故、MORC3 の SUMO 化依存的な PML ボディへの局在化が、内在性の蛋白でも認められた。

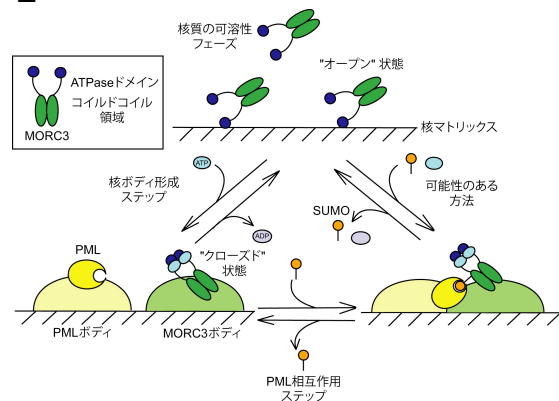
D



(まとめ)

MORC3 の PML ボディへの共局在には、2 段階のステップが存在する事を明らかにした (図 E)。

E



すなわち、PML ボディとは独立な MORC3 ボディ形成過程と PML ボディとの相互作用の過程である。MORC3 は、核質に存在するときには、核マトリクスに結合した状態で存在する (N 末の ATPase ドメインは、オープン状態)。何らかの作用によって ATP が N 末の ATPase ドメインに結合すると (クローズド状態)、MORC3 は、核内ボディを形成する。そして、さらに、MORC3 の SUMO 化により、PML ボディと相互作用し、融合し

た核内ボディを形成する事を明らかにした。MORC3 特異的な ATP アナログと SUMO 化を抑制する化合物を開発できれば、PML とは独立に MORC3 ボディの形成を誘導できると考えられた。

#### マウス個体における MORC3 の機能および白血病での役割

マウス個体において、MORC3 ノックアウトマウスでは、出生前後で死亡し、造血系に著しい異常を伴う肝腫大を認めた。14.5 日胎児肝細胞を移植したマウスの解析では、単球系、リンパ球系の細胞の著しい減少と顆粒球系細胞の著しい増加を示した。また、赤血球造血は、骨髄ではなく、脾臓で起こっており、髄外造血を示した。現在、白血病細胞での MORC3 の異常も含め、投稿準備中である。

#### 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 11 件)

1. Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., Tahara, H., Inoue, N. and Seya, T. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(6) 2066-2071, **2012** (査読有)

DOI: 10.1073/pnas.1113099109

2. Murakami, Y., Inoue, N., Shichishima, T., Ohta, R., Noji, H., Maeda, Y., Nishimura, J., Kanakura, Y. and Kinoshita, T. Deregulated expression of *HMGA2* is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Brit. J. Haematology* 156(3), 383-387 **2012** (査読有)

DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08914.x

3. Inoue, N. and Akazawa, T. IL17A (interleukin 17A). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 15(8), 662-666 **2011** (査読無)

DOI: 10.4267/2042/46016

4. Sawahata, R., Shime, H., Yamazaki, S., Inoue, N., Akazawa, T., Fujimoto, Y., Fukase, K., Matsumoto, M. and Seya, T. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes and Infection* 13, 350-358 **2011** (査読有)

DOI: 10.1016/j.micinf.2010.12.003

5. Yabu, M., Shime, H., Hara, H., Saito, T., Matsumoto, M., Seya, T., Akazawa, T. and Inoue, N. IL-23 dependent and -independent enhancement pathway of IL-17A production by lactic acid. *Intl*

*Immunology* 23(1), 29-41 **2011** (査読有)

DOI: 10.1093/intimm/dxq455

6. Inoue, N. IL23A (interleukin 23, alpha subunit p19). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 15(2), 191-194 **2011** (査読無)

DOI: 10.4267/2042/44965

7. Mito, K., Sugiura, K., Ueda, K., Hori, T., Akazawa, T., Yamate, J., Hatoya, S., Inaba, M., Inoue, N., Ikehara, S. and Inaba, T. Interferon-gamma markedly cooperates with intratumoral DC vaccine in dog tumor models. *Cancer Research* 70(18), 7093-7101 **2010** (査読有)

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0600

8. Akazawa, T., Inoue, N., Shime, H., Kodama, K., Matsumoto, M. and Seya, T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: Development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Science* 101 (7), 1596-1603 **2010** (査読有)

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01583.x

9. Sugiura, K., Wijewardana, V., Fujimoto, M., Akazawa, T., Yahata, M., Mito, K., Hatoya, S., Inoue, N. and Inaba, T. Effect of IL-12 on the canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Veterinary immunology and immunopathology* 137, 322-326 **2010** (査読有)

DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.06.006

10. Mimura, Y., Takahashi, K., Kawata, K., Akazawa, T. and Inoue, N. Two-step colocalization of MORC3 with PML nuclear bodies. *J. Cell Science* 123(12), 2014-2024 **2010** (査読有)

DOI: 10.1242/jcs.063586

11. 志馬寛明、井上徳光、松本美佐子、瀬谷司 TLR 刺激による Th17 細胞の増加 臨床免疫・アレルギー科 51(5), 479-486 **2009** (査読無)

[学会発表] (計 15 件)

1. 大橋敏充・赤澤隆・井上徳光 腫瘍における乳酸産生の制御は、抗腫瘍免疫応答を増強する 第 70 回日本癌学会学術集会 2011.10 名古屋

2. 井上徳光 乳酸は、がん微小環境の炎症メディエーターとして働く 平成 23 年度遺伝病制御研究所共同研究集会 2011.9 札幌

3. 井上徳光 抗がん免疫療法のターゲットとしての乳酸シグナル経路の可能性 第 48 回補体シンポジウム 2011.9 名古屋

4. Murakami Y Inoue N., Shichishima T, Noji H, Nishimura J, Kanakura Y,

Kinoshita T Expression of HMGA2 in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria 52nd ASH annual meeting 2010.12 Orland, USA

5. 井上徳光、藪政彦、志馬寛明、松本美佐子、瀬谷司、赤澤隆 乳酸による IL-23 非依存的な IL-17 産生増強経路 第47回補体シンポジウム 2010.9 福島

6. Inoue N Yabu M, Akazawa T, Matsumoto M, Seya T, Shime H Mechanisms of increased IL-17A production by lactic acid 第14回 国際免疫学会 2010.8 神戸

7. Inoue N Mimura Y, Takahashi, K, Akazawa T Two-step colocalization mechanism of MORC3 with PML-nuclear body LXXV Cold Spring Harbor Symposium -Nuclear organization & function 2010.6 New York, USA

8. 三村恭弘、高橋桂子、河田規予、赤澤隆、井上徳光 MORC3 は、2ステップで PML ボディと共局在する 第62回日本細胞生物学会大会 2010.5 大阪

9. 藪政彦、志馬寛明、赤澤隆、井上徳光 乳酸は Th1/Th17 バランスを Th17 細胞側に傾ける 第39回日本免疫学会総会 2009.12 大阪

10. 井上徳光 Lactic acid is a new inflammatory mediator secreted from tumor 第32回分子生物学会年会 2009.12 横浜

11. 三村恭弘、赤澤隆、井上徳光 Novel molecular mechanism of nuclear domain formation via ATP-cycle and SUMOylation 第32回分子生物学会年会 2009.12 横浜

12. 井上徳光 PML ボディに局在する Morc3 ノックアウトマウスの造血分化異常 第71回日本血液学会学術集会 2009.9 京都

13. 井上徳光 Promyelocytic leukemia (PML) 蛋白と相互作用する MORC3ATPase による造血分化異常 第15回血液学セミナー 2009.9 東京

14. 三村恭弘、赤澤隆、高橋桂子、井上徳光 MORC3 の核内ドメイン形成と PML-NB との会合メカニズム 第8回核ダイナミクス研究会 2009.6 伊豆

15. 井上徳光 乳酸はトル様受容体リガンドを用いた抗癌免疫療法の効果を増強する 第13回がん免疫学会総会 2009.6 北九州

[図書] (計1件)

井上徳光 補体と獲得免疫 補体への招待・メディカルビュー社 104-113 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：新規人工設計リポペプチド

発明者：赤澤隆・井上徳光

権利者：大阪府立病院機構

種類：特許

番号：特願 2012-076273

出願年月日：2012年3月29日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/genetics.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 徳光 (INOUE NORIMITSU)

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪府立成人病センター (研究所)

研究所・部長

研究者番号：80252708

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

赤澤 隆 (AKAZAWA TAKASHI)

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪府立成人病センター (研究所)

研究所・研究員

研究者番号：80359299

(4) 研究協力者

高橋 桂子 (TAKAHASHI KEIKO)

Lawrence Berkeley National Laboratory

Postdoctoral fellow

三村 恭弘 (MIMURA YASUHIRO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・大学院生

現在 理化学研究所・特別研究員