

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 5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590339

研究課題名（和文）非遺伝性乳癌発症における p53 mRNA 核外輸送分子 GANP の機能

研究課題名（英文）Functional role of a p53 mRNA export factor, GANP, in the occurrence of sporadic breast cancers

研究代表者

桑原 一彦 (KUWAHARA KAZUHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10263469

研究成果の概要（和文）：哺乳動物の mRNA 核外輸送機構は出芽酵母と異なり輸送される mRNA に選択性があることが明らかになった。この mRNA 輸送に関わる分子 GANP を乳腺特異的に欠損させると高率な肺転移を伴う乳癌を発症した。さらに GANP の発現が低下すると DNA 損傷応答が誘導され、乳腺構築に高度な障害を認めた。この乳腺構築異常は遺伝性乳癌の原因遺伝子 *Brca1* 欠損マウスで見られる表現系と類似しており、非遺伝性散発性乳癌発症に関して GANP 発現異常が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mammalian cells, unlike *Saccharomyces cerevisiae*, have the mechanism of selective mRNA export. GANP is involved in mRNA export in mammalian cells, and mammary-specific *ganp*-deficient mice developed mammary gland tumors with lung metastases. Moreover, decreased expression of GANP induced DNA-damage responses leading to the impaired formation of mammary glands. As this abnormality is similar to that observed in *Brca1*-deficient mice, GANP expression might be associated with the suppression of sporadic breast cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：非遺伝性乳癌、mRNA 核外輸送

1. 研究開始当初の背景

(1) p53 mRNA の核外輸送

哺乳細胞において、p53 は転写因子として細胞周期停止、アポトーシス、DNA 修復などに関わる多くの遺伝子群（Gadd45、Bcl-2、PUMA、p21、mdm2 など）の誘導に関わる。ヒトの癌では、p53 の機能障害は、遺伝子変異のみならず、様々な発現調節異常によって起

こる。p53 タンパクの合成や安定性に加えて、p53 遺伝子の発現、スプライシング、mRNA 輸送における安定性に異常がおこることが原因とされている。p53 遺伝子発現から mRNA の核外輸送を行い、細胞質内で p53 タンパク合成に至る過程は、発癌と密接に関連する重要事項であるが、いまだその詳細は明らかでない。わずかに p53 mRNA の 3' -UTR に HuR

が結合し、様々な immediate early response 遺伝子 (*c-fos*, *c-myc* など) の調節に働くことが明らかにされているのみである。HuR は細胞質-核間を移動していて、*p53* mRNA の核外輸送に関わる可能性があるものの、その詳細は明らかにされていない。

(2) 哺乳動物における mRNA 核外輸送

近年、出芽酵母における mRNA の核外輸送に関して、THO/TREX 複合体が中心的役割を果たしている、それに加えて Sac3 が Thp1 と結合して mRNA 核外輸送に関与することが報告されている。Sac3/Thp1 複合体と THO/TREX 複合体との関連や、輸送する mRNA の選択性、その標的遺伝子への機能等様々な問題が残されている。哺乳動物における mRNA の核外輸送に関する機能複合体の研究が十分に展開されているとはいえない。

(3) *p53* mRNA 選択的核外輸送経路

これまでに胚中心 B 細胞関連分子として GANP を同定し、この核内分子アミノ末端側に RNA プライマーゼドメインを、またカルボキシル末端側に DNA 複製に必須の分子群 MCM との結合領域を、さらに中央部分に出芽酵母の Sac3 相同領域を有することを見出した。この分子の欠損マウスは胎生致死であるが、その主因は mRNA の選択的な輸送障害であり、その結果 DNA の過剰な組み換えが生じることが原因であると考えている。さらに C57BL/6 背景ヘテロ欠損マウスの生育は正常だったが、高齢雌マウスの約 30% で aneuploidy を伴う乳癌を自然発症した。

この腫瘍発症の分子機構を探索する目的でマウス胎仔線維芽細胞株 (MEF) を樹立し、正常 MEF と *ganp* ヘテロ欠損 MEF で発現に違いがある分子を種々解析した。その結果、*ganp* ヘテロ欠損 MEF では *p53* タンパクの発現が著明に減少していた。さらにこの原因を調べたところ、*ganp* ヘテロ欠損 MEF では *p53* mRNA の核外輸送が障害されて、核内に *p53* mRNA が蓄積していることが判明した。このことは GANP が出芽酵母 Sac3 同様、mRNA 核外輸送に関与することを示しており、GANP 欠損が *p53* タンパクの発現低下を誘導し、乳癌発症に至る可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) *p53* mRNA 核外輸送機構の確定に関しては、*ganp* siRNA を用いたノックダウンにより、*p53* mRNA の核外輸送が障害されていることが判明している。*p53* mRNA がどのようにして GANP の標的になっているのか、mRNA のどの部分を認識して mRNA 核外輸送を行うのか、*p53* ゲノム遺伝子に対して標的としているのか、その転写 bubble に対してアクセスしているのかを解析する。GANP によって類似の mRNA 核外輸送が行われている分子を探索し、その選択性と mRNA 輸送の輸送における機能

を *in situ* RNA hybridization (ISH) とリアルタイム RT-PCR 法によって検証する。細胞質と核内における該当する mRNA の存在を正確に検証することによって、その機能を確定することが出来る。

(2) ヒトの癌細胞で mRNA 輸送異常が原因となる細胞変化を引き起こすかの確定に関しては、GANP と *p53* の発現が激減しているヒト細胞株をスクリーニングしてその細胞を用いて、*p53* リボプローブによる ISH を行い、*p53* mRNA の細胞内局在を解析する。*p53* 経路の下流の分子群の機能解析を行い、実際に *p53* の発現低下が発癌に至る程度の異常を発生しているのかを検討する。

(3) 哺乳動物で mRNA 輸送異常が発癌の原因となることの検証に関しては、*ganp* ヘテロ欠損 MEF 細胞が造腫瘍性を有するかをコロニーアッセイ、NOD-SCID マウスへの移植実験で検証する。また乳腺特異的 GANP 欠損マウスの作成で、mRNA 輸送異常が発癌に関わるか、確定する。

(4) *p53* 選択的 mRNA の核外輸送に関わる分子コンプレックスに関しては、出芽酵母では mRNA 核外輸送の機構は Sac3/Thp1 複合体が関与することが証明されている。果たしてヒト、マウスのほ乳動物では相同分子が mRNA の核外輸送の主要分子群であるのか、異なった要素の機能分子が関与するのか、そして輸送する mRNA の選択性を規定しているのはどのような分子構造と機能に基づいているのかを明らかにするため、*p53* mRNA/GANP 結合コンプレックスの構造をプロテオミクス解析する。相同分子に関してはマウス Thp1 を同定している。この分子の欠損マウスを作成してその機能関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 乳腺特異的 GANP 欠損マウスの作成

乳癌発症マウスモデルとして確定した GANP ヘテロ欠損マウスの成果をさらに細胞分化系譜の異なる細胞、組織、期間での発癌を検証することが重要である。*Wap-Cre* マウスと *ganp*-floxed マウスとの交配により乳腺特異的 GANP 欠損マウスを作成して、発癌に至る経過を観察し、発癌関連因子の検証を行う。*Wap-Cre-ganp*^{f1/f1} マウスの樹立後、それらのマウスを妊娠させて *Wap* プロモーターを作動させて乳腺特異的に GANP を欠損させる。マウス発癌実験で長期観察を行い、乳癌発症の経過追跡調査を完成させる。

(2) GANP による *p53* mRNA 核外輸送制御の解析

ganp ヘテロ欠損 MEF を用いた解析で、正常 MEF と比較して *p53* タンパクの発現が激減していること、このメカニズムとして *p53* mRNA 核外輸送が障害されていることを示す。これらの細胞株は SV40 で不死化していて *p53* が

恒常的に発現している。また他の細胞株を用いて X 線照射後に p53 のタンパクを誘導して解析する。ganp ノックダウンを行い、p53 タンパク発現の異常の有無を解析する。ganp ヘテロ欠損 MEF で p53 の発現が抑制されていることを確定する。p53 ホモ欠損 MEF と同様の細胞異常が起こっているかを X 線照射やノコダゾール処理後の異常、コロニー形成能、免疫不全マウスへの移植による造腫瘍性などで検討する。

(3) Immediate early response 遺伝子としての GANP の機能解析

細胞に X 線照射などの genotoxic stress を与えると 12-24 時間後に p53 タンパクが誘導されてくる。GANP が p53 mRNA の核外輸送における主要責任分子である可能性が高い。その場合は immediate early response 遺伝子の発現に先立って GANP 分子が細胞内で準備されている必要があると予想される。ストレス直後に ganp mRNA の誘導が起こるかどうかわを様々な細胞を用いて確認する。その精度をリアルタイム RT-PCR で確定する。新規の immediate early response 遺伝子と位置づけ、その遺伝子誘導経路を解析する。Ganp mRNA の転写制御領域でストレス誘導領域の検討を行う。

(4) GANP による mRNA 核外輸送メカニズムの解析

出芽酵母では Sac3 が Thp1 と結合してヘテロ二量体を形成し、mRNA の核外輸送に関わることが明らかにされている。Thp1 のマウスホモログは実際に GANP と結合し、両者は核内に局在することを見いだしている。Thp1 欠損成熟 B 細胞を用いて脾臓、リンパ節でその数が激減しているか、Thp1 ノックダウンの解析で Thp1 は細胞の生存維持に重要であるかを確定する。また Thp1 欠損マウスの表現系と GANP 欠損マウスのそれと同一かどうかを検証する。生体内で GANP と Thp1 が常に 1:1 で結合しているかどうかを調べる。Thp1 ノックダウン細胞を用いて p53 分子の発現が低下するかを調べる。Thp1 が GANP 同様 p53 mRNA の核外輸送に関わっている場合は、GANP 単独、Thp1 単独、GANP/Thp1 複合体のそれぞれが p53 mRNA と結合するかを RIP アッセイ等によって解析する。直接結合している場合は、GANP もしくは Thp1 の種々の欠失変異体で同様の解析を行い、その結合ドメインを決定する。

4. 研究成果

(1) Wap-Cre マウスと ganp-floxed マウスを交配し、C57BL/6 背景乳腺特異的 GANP 欠損マウス (wap-cre-ganp^{f1/f1} マウス) を作成し、乳癌の自然発症が見られるかを観察した。50 週齢を過ぎると約 36% のマウスで見られること、発症したマウスの約 80% で肺転移を起こすことを確定した。GANP の発現低下が乳癌発

症の原因となりうることをマウスモデルで初めて示した。マウス乳癌検体から複数の細胞株を樹立し、染色体解析を行うと染色体切断を高頻度に認め、染色体が高度に不安定になっていることが示された。さらに wap-cre-ganp^{f1/f1} マウスにおける乳腺組織の異常の有無を検討した。出産後 2 週間の乳腺組織を摘出し、組織学的解析を行ったところ、wap-cre-ganp^{f1/f1} マウスの乳腺組織は野生型マウスに比べて管腔形成が障害され乳汁分泌も低下していることが判明した。この組織異常は乳腺特異的 Brca1 欠損マウスの乳腺組織と類似しており、GANP も Brca1 同様乳腺組織発達に重要な分子であることが示唆された。

(2) ganp ヘテロ欠損 MEF を用いた解析で、p53 mRNA 核外輸送が障害されていることを示したが、この MEF は SV40 で不死化され恒常的に p53 が発現している系のため、この現象が普遍性を持つのかを明確にする必要があった。ヒト細胞株を用いて GANP を siRNA でノックダウンすると逆に p53 タンパク量が増加し、DNA 損傷応答が誘導されていた。この差異は解析した多くの細胞株で見られた。なおヒト HeLa 細胞を用いた解析から GANP は Shugoshin-1 mRNA の核外輸送に関与することを明らかにし、哺乳細胞における mRNA 核外輸送に選択性があることを初めて示した。また GANP が分裂時の染色体分配到に重要な機能を果たすことも明らかにした。

(3) GANP が p53 mRNA の核外輸送における主要責任分子である可能性を仮定し、immediate early response 遺伝子の発現に先立って GANP 分子が細胞内で準備されている必要があると予想した。しかし、放射線、紫外線照射など種々のストレスを与えても GANP の mRNA 誘導は早期には見られなかった。

(4) 出芽酵母では Sac3 が Thp1 と結合してヘテロ二量体を形成し、mRNA の核外輸送に関わることが明らかにされているため、Thp1 のマウスホモログ Pcid2 を同定した。遺伝子導入実験では細胞内で GANP と結合し、両者は核内に局在することを見いだしている。しかし、Pcid2 に対する良い抗体が入手できていないため、実際に細胞内で複合体を形成しているかは確定できていない。哺乳動物での Pcid2 の詳細な機能を明らかにするためにコンディショナル Pcid2 ノックアウトマウスを樹立し、B 細胞特異的 Pcid2 ノックアウトマウスの解析を行った。このマウスでは成熟 B 細胞数が激減し、Pcid2 が B 細胞の生存維持に必須であることが示された。この分子機構を明らかにするために、HeLa 細胞で Pcid2 ノックダウンを行ったところ、M 期チェックポイント分子 MAD2 の発現低下を認め、この低下は MAD2 mRNA の核外輸送が障害されていた。Ganp あるいは Pcid2 ノックアウトマウスの表

現型が異なること、遺伝子ノックダウンにより輸送に関わる mRNA が異なることより、哺乳動物における mRNA 核外輸送には選択的機構が働いていることが示唆された。出芽酵母においては Sac3-Thp1-Sem1 は複合体を形成し、どの分子の発現が低下しても高度に mRNA 核外輸送が障害される。一方、哺乳動物の相同分子 GANP-Pcid2-DSS1 は複合体を形成することが報告されているが、各々の遺伝子ノックダウンでは核外輸送が障害される遺伝子に選択性があることをマイクロアレイ解析により示した。哺乳動物においてこれらの分子がどのように mRNA 核外輸送に関与するのかを解明することが、遺伝子転写に共役した DNA 傷害の意義を理解する上で重要となる。

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 Toda, T., Kuwahara, K., Kondo, N., Matsuda, Z., Maeda, Y., Maeda, K. & Sakaguchi, N. Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4. *Immunobiology* (印刷中) (2012) 査読有り
- ② Phimsen, S., Kuwahara, K., Nakaya, T., Ohta, K., Suda, T., Kitabatake, M., Rezano, A., Vaeteewoottacharn, K., Okada, S., Tone, S. & Sakaguchi, N. Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. *Apoptosis* 17:679-690 (2012) 査読有り
- ③ Sakaguchi, N., Maeda, K. & Kuwahara, K. Molecular mechanism of immunoglobulin V-region diversification regulated by transcription and RNA metabolism in antigen-driven B-cells. *Scand. J. Immunol.* 73:523-526 (2011). 査読有り
- ④ Silsirivanit, A., Araki, N., Wongkham, C., Pairojkul, C., Narimatsu, Y., Kuwahara, K., Narimatsu, H., Wongkham, S. & Sakaguchi, N. A novel serum carbohydrate marker on MUC5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer* 117:3393-3403 (2011). 査読有り
- ⑤ Nakaya, T., Kuwahara, K., Ohta, K., Kitabatake, M., Toda, T., Kondo, E. & Sakaguchi, N. Critical role of Pcid2 in B cell survival through the regulation of MAD2 expression. *J. Immunol.* 185:5180-5187 (2010). 査読有り

⑥ Kasama, Y., Sekiguchi, S., Saito, M., Tanaka, K., Satoh, M., Kuwahara, K., Sakaguchi, N., Takeya, M., Hiasa, Y., Kohara, M. & Tsukiyama-Kohara K. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* 116:4926-4933 (2010). 査読有り

⑦ Okamoto, N., Kuwahara, K., Ohta, K., Kitabatake, M., Takagi, K., Mizuta, H., Kondo, E. & Sakaguchi, N. Germinal center-associated nuclear protein (GANP) is involved in mRNA export of Shugoshin-1 required for centromere cohesion and in sister-chromatid exchange. *Genes Cells* 15:471-484 (2010). 査読有り

⑧ Ohta, K., Kuwahara, K., Zhang, Z., Makino, K., Komohara, Y., Nakamura, H., Kuratsu, J. & Sakaguchi, N. Decreased expression of germinal center-associated nuclear protein is involved in chromosomal instability in malignant gliomas. *Cancer Sci.* 100:2069-2076 (2009). 査読有り

⑨ Chan-on, W., Kuwahara, K., Kobayashi, N., Ohta, K., Shimasaki, T., Banchob, S., Leelayuwat, C. & Sakaguchi, N. GANP, involved in immunoglobulin V-region diversification, is co-expressed with AID in cholangiocarcinomas associated with long-term inflammation caused by liver fluke infestation. *Int. J. Oncol.* 35:287-195 (2009). 査読有り

⑩ Sakaguchi, N., Toda, T., Nakaya, T., Kitabatake, M., Maeda, K. & Kuwahara, K. Generation of high affinity monoclonal antibodies for the prevention of HIV infection. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 3:88-95 (2009). 査読有り

⑪ Igarashi, H., Kuwahara, K., Yoshida, M., Xing, Y., Maeda, K., Nakajima, K. & Sakaguchi, N. GANP suppresses the arginine methyltransferase PRMT5 regulating IL-4-mediated STAT6-signaling to IgE production in B cells. *Mol. Immunol.* 46:1031-1041 (2009). 査読有り

[学会発表] (計 22 件)

- ① 桑原一彦、Suchada Phimsen、竹森利忠、渡辺武、阪口薫雄、Lyn を介するシグナルターゲットである GANP は末梢リンパ組織における高親和性抗体産生 B 細胞の維持に重要である、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、幕張メッセ (千葉)
- ② 桑原一彦、阪口薫雄、乳腺特異的 GANP 欠損マウスにおける乳管形成障害と相関する高頻度乳癌発症、第 70 回日本癌学会学術

総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場
(愛知)

③ Kuwahara, K. and Sakaguchi, N. Role of GANP in prevention of cancer development. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場(大阪)

④ Kuwahara, K., Nakaya, T., Watanabe, T. and Sakaguchi, N. GANP plays a critical role in activation of B cell proliferation as a Lyn-mediated signaling target. 第14回国際免疫学会、2010年8月24日、神戸国際会議場(兵庫)

⑤ Kuwahara, K. and Sakaguchi, N. Role of GANP family members in the maturation of germinal center B cells. 第39回日本免疫学会学術集会、2009年12月4日、大阪国際会議場(大阪)

⑥ Kuwahara, K. and Sakaguchi, N. Critical role of GANP in nuclear export of mRNA involved in mammalian cell division. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜(神奈川)

[図書] (計1件)

① 桑原一彦、Suchada Phimsen、阪口薫雄、羊土社、細胞死実験プロトコール、2011、pp65-69

[その他]

ホームページ : <http://www.k-immu.jp/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 一彦 (KUWAHARA KAZUHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号 : 10263469