

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790313

研究課題名（和文） がんの発生と染色体の不安定性における Rael の役割の解析

研究課題名（英文） Analysis of the role of Rael on carcinogenesis and chromosome instability.

研究代表者 Wong W・R

(Wong W・R)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任准教授

研究者番号：30464035

研究成果の概要（和文）：

核膜孔複合体タンパク質 Rael の異常発現は、多くの癌で見いだされる染色体の異数化・多極紡錘体を引き起こす。Rael は乳癌患者における最も決定的な危険因子のうちの一つであると報告されたことから、本研究では Rael の乳癌への関与を生体内、及び生化学的に解析することを試みた。その結果、Rael の高発現と癌の関係を生体内で解析できる Rael 発現トランスジェニックマウスの樹立に成功した。さらに、生化学的解析に有用な Rael の昆虫細胞 Sf9 での発現、及び精製に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Abnormal expression of nuclear pore complex protein Rael makes aneuploidy and multi-polar spindles. It has been reported that Rael is one of the risk factors in breast cancer patients. In this study, we tried to analyze the relationship between Rael and breast cancer in vitro and in vivo. Therefore we successfully generated Rael transgenic mice in order to analysis of Rael expression in vivo. Moreover, we established Rael expression in insect cell Sf9 and purification it, which are useful for biochemical analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：(1) 核膜孔複合体、(2) Rael、(3) RNA 輸送、(4) 染色体不安定性、(5) 乳癌、(6) トランスジェニックマウス、(7) 染色体異数化、(8) 多極紡錘体

1. 研究開始当初の背景

有糸分裂期の核膜崩壊に伴い、核膜孔複合体がいくつかのサブ複合体に脱集合することは以前からよく知られていたが、有糸分裂期でのそれらの役割は未知であった。しかし最近、それら核膜孔サブ複合体の中には紡

錘体形成、及び、有糸分裂後期開始に影響を与えるものがあることが明らかになってきた。申請者らは、2006 年、及び 2008 年に Rael が微小管の成長を安定化させる NuMA 及び、紡錘体極の安定化に必須なコヒーシンのサブユニットである SMC1 と相互作用し、

紡錘体集合に関わるという重要な知見を見出し、Rae1 による微小管安定化のより詳細なメカニズムを明らかにした。加えて、Rae1 の異常発現が、多くの癌で見いだされる染色体の異数化・多極紡錘体を引き起こすことを発見した。(Wong et.al. PNAS, 2006, Wong & Blobel PNAS, 2008)。その他、2006年に Orjalo らがアフリカツメガエルの卵抽出液を用いて、Nup107-Nup160 サブ複合体が紡錘体形成に関係することを明らかにしている(Orjalo et.al. Mol.Biol.Cell., 2006)。興味深いことに、2000年に Kalitsis らは Rae1 ノックアウトマウスを作製した結果、ホモ(-/-)では胎生致死であったが、ヘテロ(+/-)では染色体が異数化する傾向にあり化学物質暴露による肺がん発生が増加することを発表している(Kalitsis et.al. Gene Dev, 2000)。

2. 研究の目的

癌の発症・悪性化は環境適応応答の手段のひとつであり、癌細胞は環境に応じて巧みに新形質を発現させる。その中でも染色体・遺伝子の不安定性と異数性の発見された癌細胞を持った患者の予後は不良だとされながらも、これら遺伝子の変異が癌細胞の悪性形質獲得においてどのように影響しているかについては、残念ながら未だ解明されていないのが現状である。申請者は最近、核膜孔複合体タンパク質 Rae1 の異常発現が、多くの癌で見いだされる染色体の異数化・多極紡錘体を引き起こすことを発見した(Wong et.al., PNAS, 2006; Wong and Blobel, PNAS, 2008)。Rae1 は核膜孔複合体を構成する約 30 種類のタンパク質のうちの一つであり、RNA の核から細胞質への輸送に関与しており、さらには近年 Rae1 が肺がん及び乳がん患者における最も決定的な危険因子のうちの一つであると報告され、Rae1 に対する注目が一段と高まった。本研究ではトランスジェニックマウス法を用いて Rae1 の発がんへの関与を生体内で検討すること、及びヒトがん細胞株を用いて、Rae1 が関与するがん悪性化の詳細な分子メカニズムを解明することを目的とした。また、本研究によって得られる疾患モデル動物という成果を長い目で見れば分子標的療法と新規がんワクチンスクリーニングに斬新的なコンセプトを作り出すことになると考えている。がん治療のための新規創薬ターゲットと厚生労働行政上の貢献、人類の生存を脅かすがんに対する有効な予防措置の確保によって、国民の保健・医療・福祉の向上に繋がるものと考えた。

3. 研究の方法

計画 1: Cre-loxP 条件的発現系を用いた FLAG 融合 Rae1 発現トランスジェニックマウス (Tg) を作製し、癌悪性化過程における Rae1

の役割を解析する。

核膜孔タンパク質である Rae1 はどの臓器でも発現がみられるため、申請者は以前、CMV プロモーターを用いた Rae1 Tg マウスを作製したが、Rae1 の過剰発現は精巣でしかみられなかった。そこで、哺乳類細胞で高発現能力のある CAG プロモーターを用い、Cre-loxP 条件的発現系にて Rae1 の発現を制御する Tg を作製することにした。

1-1) Rae1 遺伝子導入マウスの作製 : CAG プロモーターの下流に loxP 配列、FLAG 融合 Rae1 遺伝子、IRES 配列、GFP 遺伝子、ポリアデニル化配列を含む DNA 断片を構築し、マウスに導入して loxP-FLAG 融合 Rae1 Tg マウス (F0) を得る。次に Cre Tg マウスと掛け合わせ、FLAG 融合 Rae1 Tg マウス (F1: 以下 Rae1 Tg マウスと呼ぶ) を得る。この F1 マウス胎児由来初代繊維芽細胞 (MEF) の成長能の解析を FACS 解析により行う。

1-2) Rae1 遺伝子導入マウスの解析 : Rae1 Tg マウスの系を確立した後、詳細な解析を行う。マウス諸臓器・組織のパラフィン切片や凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色法や免疫染色法で染色することにより、癌悪性化への関与を組織学的に検討する。

1-3) Rae1 過剰発現 MEF の分裂中期延展位を用いた染色体解析 : 野生型と Rae1 Tg マウスにおける染色体異数性の頻度を比較するため、9 月齢のマウスから脾臓細胞を収集し、また MEF 由来の分裂中期延展位も調整して染色体を観察する。

1-4) Rae1 Tg マウスと Nup98-HoxA9 Tg マウスとの交配マウスの解析 : 申請者がすでに保有している Nup98-HoxA9 Tg マウス (急性骨髄性白血病 (AML) モデルマウス) と本研究で作製した Rae1 Tg マウスを交配させ、AML における Rae1 の影響を解析する。

計画 2: 細胞分裂周期における Rae1 との相互作用因子を同定・解析し、癌悪性化におけるこれらの相互作用の役割について解析する。

2-1) ヒト乳癌細胞 MCF-7 およびヒト子宮頸癌細胞 HeLa を用いた Rae1 安定発現細胞株の樹立 : HA もしくは FLAG タグを付加した Rae1 遺伝子導入後、G418 選択培地によって選択して安定発現細胞株を得る。樹立した細胞株は種々の試験に供する。

2-2) Rae1 相互作用パートナーの同定・解析 : 上記で樹立した Rae1 安定発現細胞株を用い、細胞周期間期または有糸分裂期の細胞に対してタグを用いてプルダウン法を行い、質量分析法により Rae1 の結合パートナーを同定する。さらにこの結合における Rae1 の結合部位を同定し、この相互作用の詳細な検討を行う。無細胞タンパク質発現系による免疫沈

降でもこの相互作用を確認する。

2-3)Rae1 複合体の共精製：組換え精製 Rae1 タンパク質を得るため、GST 融合もしくは His タグ融合 Rae1 を大腸菌あるいは Sf9 細胞で発現させる（共同研究：白川研究室、京都大学）。加えて Rae1 タンパク複合体を AKTA Explorer system (GE-Amersham) を用いて精製し、詳細な生化学的マッピングを行う。

4. 研究成果

計画 1：Rae1 発現トランスジェニックマウスの作製、及び癌悪性化過程における Rae1 の役割の解析；初年度作製した GFP-Rae1 発現 Tg マウスは、目的タンパク質の発現が精巢のみでしか確認できなかった。そこで、Rae1 を全身で発現させるため、CAG プロモーターを用いた遺伝子発現プラスミドを再構築した。CAG プロモーターの下流に loxP 配列、HA 融合 Rae1 遺伝子、IRES 配列、GFP 遺伝子、ポリアデニル化配列を含む DNA 断片を構築し、マウスに導入して loxP-HA-Rae1 Tg マウスを得た。さらに Cre Tg マウスと交配させ、HA-Rae1/Cre Tg マウスを得た。今後、Tg マウスの臓器を HE 染色、免疫染色し、癌悪性化と Rae1 の役割を解析していく。

計画 2：細胞分裂周期における Rae1 との新規相互作用因子の同定・解析、及び癌悪性化におけるこれら相互作用の役割の解析；2-1)ヒト乳癌細胞 MCF7 を用いた FLAG-Rae1 安定発現細胞株を樹立し、免疫沈降反応によって Rae1 の相互作用因子の同定・解析を行っている。2-2)Rae1 複合体の共精製：His タグ融合 Rae1 を昆虫細胞 Sf9 細胞で発現させることに成功した。現在、精製した His-Rae1 と細胞抽出液を用いて、Rae1 の新規相互作用因子の同定・解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件) (査読あり 9 件)
研究代表者には下線、責任著者には@

1. Funasaka T*, Nakano H*, Wu Y*, Hashizume C, Gu L, Nakamura T, Wang W, Zhou P, Moore M, Sato H and **Wong R@** (2011) RNA export factor RAE1 contributes to NUP98-HOXA9-mediated leukemogenesis. *Cell Cycle*. 10:1456-67 [*co-1st author]

2. Funasaka T and **Wong R@** (2011) The role of nuclear pore complex in tumor microenvironment and metastasis. *Cancer Metasta Rev.* 30(2):239-51.

3. Nakano H*, Wang W*, Hashizume C, Funasaka T, Sato H and **Wong R@** (2011) Unexpected role of nucleoporins in coordination of cell cycle progression. [*co-1st author] *Cell*

Cycle 10(3):425-433.

4. Sakr MA, Takino T, Domoto T, Nakano H, **Wong R**, Sasaki M, Nakanuma Y and Sato H (2010) GI24 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Sci.* 101(11):2368-2374.

5. Nakano H*, Funasaka T*, Hashizume C, and **Wong R@** (2010) Nucleoporin Tpr associates with dynein complex preventing chromosome lagging formation. [*co-1st author] *J. Biol. Chem.* 285(14): 10841-10849.

6. Hashizume C, Nakano H, Yoshida K and **Wong R@** (2010) Characterization of the role of the tumor marker Nup88 in mitosis. *Mol. Cancer* 9:119.[e-journal]

7. **Wong R@** (2010) An update on cohesin function as a "molecular glue" on chromosomes and spindles. *Cell Cycle* 9(9):1754-1758.

8. **Wong R@** (2010) Interaction between Rae1 and Cohesin subunit SMC1 is required for proper spindle formation *Cell Cycle* 9(1): 198-200.

9. Napetschnig J, Kassube SA, Debler EW, **Wong R**, Blobel G and Hoelz A (2009) Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup214 and the DEAD-box helicase Ddx19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(9):3089-3094.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. **Wong RW** Nucleoporin function and carcinogenesis. Peking University School of life Science, (Beijing, China, Peking University) 2011/2/18

2. **Wong RW** Nucleoporin function and tumorigenesis. Cancer Hospital, Breast Cancer Institute, Fudan University, (Shanghai, China, Fudan University) 2011/2/17

3. **Wong RW** Nucleoporin function and tumorigenesis. 金沢大学がん研究所 Oncology セミナー (石川県・金沢大学がん研究所) 2011/1/26

4. Funasaka T Nakano H and **Wong RW** Nucleoporin translocated promoter region (Tpr) associates with dynein complex is essential for accurate chromosome segregation. The 50th Annual Meeting of the American society of cell biology, (Philadelphia, USA. , Philadelphia

convention center) 2010/12/13

5. Hashizume C and **Wong RW** Nucleoporin Nup88 associates with Cdc20 during mitosis. The 50th Annual Meeting of the American society of cell biology, (Philadelphia, USA., Philadelphia convention center) 2010/12/12

6. 中野博、船坂龍善、橋爪智恵子、**Wong RW** Nucleoporin Translocated Promoter Region(Tpr) associates with Dynein complex, preventing chromosome lagging formation during mitosis. 第 33 回日本分子生物学会年会 (兵庫県・神戸ポートアイランド) 2010/12/9

7. 橋爪智恵子 , **Wong RW** 核膜孔タンパク質 Nup88 の有糸分裂期における役割の解析, 第 33 回日本分子生物学会年会 (兵庫県・神戸ポートアイランド) 2010/12/9

8. Nakano H, Funasaka T, Hashizume C, Wang W and **Wong RW** Nucleoporin Tpr associates with dynein complex preventing chromosome lagging formation. 17th Hong Kong International Cancer Congress (Hong Kong, China, Cheung Kung Hai Conference Centre) 2010/11/03

9. **Wong RW** Nucleoporin function and cancer pathogenesis. 17th Hong Kong International Cancer Congress (Hong Kong, China, Cheung Kung Hai Conference Centre) 2010/11/03

10. 船坂龍善、中野博、橋爪智恵子、**Wong RW** スクレオポリン Tpr の有糸分裂期における役割 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 (石川県・金沢市文化ホール) 2010/6/16

11. 橋爪智恵子、中野博、**Wong RW** 腫瘍マーカーNup88 の細胞分裂中における役割 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 (石川県・金沢市文化ホール) 2010/6/16

12. 中野博、佐藤博、**Wong RW** Nup88 トランスジェニックマウスの表現型解析 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 (石川県・金沢市文化ホール) 2010/6/16

13. **Wong RW** Rae1-Nup98 の準安定状態複合体間の相互作用解析に関する探索 新学術領域研究「過渡的複合体」班会議 (山梨県・リゾナーレ小淵沢) 2010/5/26

14. 中野 博、**Wong RW** Rae1-SMC1 is critical for proper spindle pole formation. 第 32 回日本分子生物学会年会 (神奈川県・パシフィコ横浜) 2009/12/09

15. 姉崎 健二 , 船坂 龍善, 橋爪 智恵子, 中野 博, **Wong RW** Characterization the role of nucleoporin Nup98 in tumorigenesis. 第 32 回日本分子生物学会年会 (神奈川県・パシフィコ横浜) 2009/12/09

16. 橋爪 智恵子 , **Wong RW** Characterization of the role of nucleoporin Nup88 in mitosis. 第 32 回日本分子生物学会年会 (神奈川県・パシフィコ横浜) 2009/12/09

17. **Wong RW** Nucleoporins Rae1 associates with mitotic microtubules at the spindle pole. 第 61 回日本細胞生物学会大会(愛知県・名古屋国際会議場) 2009/6/3

[その他]
ホームページ等
<http://fsowonglab.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 Richard Wong
金沢大学・フロンティアサイエンス機構・
特任准教授
研究者番号 : 30464035

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし