

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：37401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890288

研究課題名(和文) Nup88の分子間相互作用解析によるがん発症・転移促進機構の解明

研究課題名(英文) The roles of Nup88-protein interaction in metastasis and invasion of cancer cells.

研究代表者

牧瀬 正樹(MAKISE, MASAKI)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：80433001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：細胞に過剰発現したNup88ががんの悪性化を促進するかどうかは不明瞭なままである。そこで本研究では、Nup88と結合する因子を検索し、この相互作用のがん促進効果を検討した。結果として、上皮間葉転換の指標分子であるビメンチンをNup88の新規な結合因子として同定した。細胞におけるNup88の強制発現は、ビメンチンの細胞内発現量に影響を与えなかったが、ビメンチンの重合を阻害した。単量体ビメンチンは、転写因子として機能することが報告されているので、Nup88がビメンチンを介した転写制御に影響してがんの悪性化を導く可能性を考えている。

研究成果の概要(英文)：It has been unclear whether Nup88 overexpression contributes to the malignant progression of cancer. In this study, we screened Nup88-binding proteins and examined the effects of the interaction on cancer progression. Using an immunoprecipitation technique, we identified vimentin, a marker for epithelial-mesenchymal transformation, as a novel binding partner for Nup88. Vimentin expression at the protein level was unaffected by Nup88 overexpression and vice versa. Nup88 interacted with the N-terminal region of vimentin and the interaction kept vimentin monomeric. Since monomeric vimentin was reported to work as a transcriptional factor, we assume that Nup88 overexpression induces cancer malignancy via modulating the vimentin-regulated gene transcription.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：Nup88 がん 分子間相互作用 ビメンチン

1. 研究開始当初の背景

(1) スクレオポリン Nup88 は、核膜孔を構成する一因子として核-細胞質間の分子輸送に関わる一方、分裂期イベントの制御にも関与することが報告されている。しかしながら、Nup88 の持つ機能の全体像はほとんど分かっていない。

(2) 組織学的な解析から Nup88 は、種々の悪性化した腫瘍組織に過剰発現していることが報告されており、腫瘍マーカーとしての臨床利用が期待されている。しかしながら、Nup88 の過剰発現とがんの悪性化の因果関係は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) Nup88 と結合する新規な因子を同定し、結合の分子機序を明らかにする。

(2) Nup88 とがん悪性化との因果関係を結合因子への効果から明らかにする。

(3) Nup88 とがん抑制分子と考えられている CD82 の結合を検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞

HeLa 細胞を 10%FCS を含む DMEM 培地に播種し、5% CO<sub>2</sub> を満たしたインキュベータにて、37°C で培養した。

(2) Nup88-GFP 安定発現株の樹立

初めに染色体 DNA 上に特異的な組換え部位と、Tet リプレッサー遺伝子を導入した HeLa 細胞 (T-Rex HeLa 細胞) をマニュアルに従って樹立した (Life Technologies)。続いて、細胞に導入した特異的な組換え部位に対して、GFP および Nup88-GFP 遺伝子を組み込み、テトラサイクリン依存的にこれらの蛋白質を発現する細胞株を樹立した。

(3) 免疫沈降法

確立したテトラサイクリン誘導型の GFP あるいは Nup88-GFP 発現細胞を最終濃度 1 $\mu$ g/ml のドキシサイクリンを含む培地に撒き、2 日間培養した。培養後、細胞をトリプシン処理によって回収して、PBS で洗浄し、氷冷した NP-40 lysis バッファー (10 mM Tris/HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM PMSF, protease inhibitors) に溶かして、遠心操作後の上清を細胞抽出液として回収した。この抽出液と GFP 抗体を結合させてあるビーズ (GFP-trap A beads, Chromotek) を、4°C で 20 分間転倒混和し、氷冷した NP-40 lysis バッファーで 3 回洗浄したあとに、ビーズを回収した。ビーズに結合した蛋白質は、SDS サンプルバッファーを加えることで溶出した。結合蛋白質は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、CBB 染色あるいはウェスタンブロッティング法によって

視覚化して解析した。結合蛋白質の同定を行うために、CBB 染色によって分離した蛋白質の一部をトリプシン処理してゲルから溶出し、質量分析装置に供した。

4. 研究成果

(1) Nup88 と結合する因子の網羅的解析

①一部のスクレオポリンは、細胞分裂期に他のスクレオポリンとのサブコンプレックスを形成して機能することが報告されている。一方、Nup88 の結合パートナーとして、Nup214 や Nup98 などが既に報告されている。そこで、これらの蛋白質と Nup88 の融合蛋白質を細胞内に発現させ、結合する因子を検索すれば、Nup88 を含むサブコンプレックスに結合する新たな因子が同定できるのではないかと考えた。そこで、融合蛋白質の発現ベクターの構築を試みたが、構築できなかった。このため、免疫沈降法によって Nup88 に結合する因子を検索する戦略に切り替えた。

②Nup88 に結合する因子を免疫沈降法によって検索するため、タグを付加した Nup88 (Nup88-GFP) を発現する細胞を構築した (図 1)。

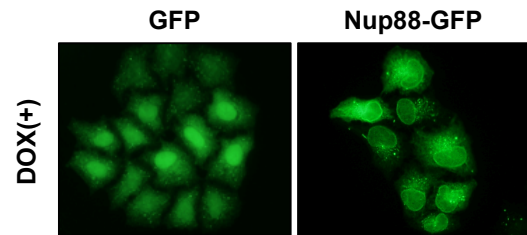


図 1 GFP および Nup88-GFP 発現細胞の樹立

③樹立した細胞を利用して、GFP をターゲットに免疫沈降法を行い、Nup88-GFP に特異的に結合する因子を検索した。その結果、ビメンチン、 $\alpha$ アクチン、GAPDH、HSC70 を得たが、分裂期との関連性が特に強いと思われる因子は見出せなかった。これらうち、結合が再現できたビメンチンの解析を推進した (図 2)。

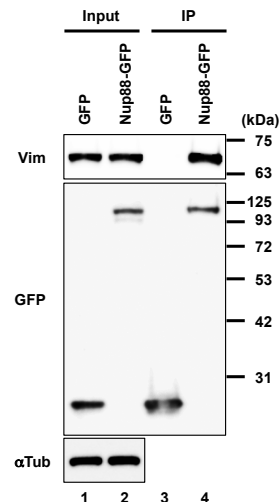


図 2 Nup88 とビメンチンの相互作用

④ビメンチンの Nup88 結合に関わるドメインを同定するために、ビメンチンの欠損変異蛋白質を FLAG タグとの融合蛋白質として発現するベクターを構築した。これらを、樹立した GFP および Nup88-GFP 発現細胞にトランスフェクションし、GFP をターゲットに免疫沈降を行った。その結果、完全長ビメンチンのみが、Nup88-GFP に結合すること、および、ビメンチンの N 末端から 96 アミノ酸残基を欠損しただけで、この結合が消失することを見出した (図 3)。Nup88 はビメンチンと同じ中間径フィラメントに属するラミン A とも結合することが報告されており、他の中間径フィラメントと Nup88 との結合があるか否か、Nup88 側の結合部位が同じ領域かどうかを検討することは今後の課題である。

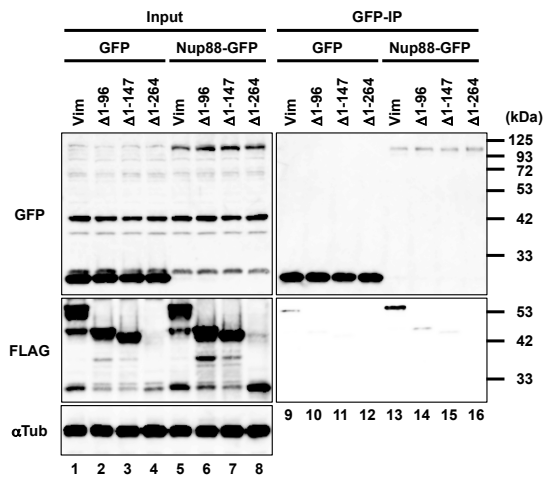


図 3 ビメンチンの Nup88 結合領域の同定

(2) Nup88 によるビメンチン機能の制御

①ビメンチンは上皮間葉転換のマーカー分子としても知られており、その発現亢進は細胞の運動性獲得を示唆する。そこで Nup88 の過剰発現が、ビメンチンの発現量に与える影響を明らかにするため、ビメンチン発現レベルが異なる 3 種類の細胞に Nup88 を過剰発現して、その発現量変化をウェスタンブロッティング法によって調べた。その結果、Nup88 の過剰発現は、いずれの細胞においてもビメンチンの発現量を変化させなかった (図 4)。

②ビメンチンには可溶性のモノマー型と不溶性のポリマー型が存在する。モノマー型からポリマー型への変換は、ビメンチンの N 末端領域が脱リン酸化されることで進行する。図 3 から Nup88 はビメンチンの N 末端領域に結合することが示唆されたので、次にリン酸化型のビメンチンに対する Nup88 の効果を検討した。ビメンチンモノマーを得るために、GFP あるいは Nup88-GFP 発現細胞を M 期に同調し、細胞抽出液を調製した。この抽出液に、フォスファターゼを作用させ、リン酸化型ビメンチンに特異的な抗体を用いて検出を行った。その結果、ビメンチンのリン酸化状態は、Nup88-GFP を含む場合の方が、GFP を含

む場合に比べて、維持され易いことが分かった (図 5、レーン 1-4)。さらに、フォスファターゼに対しても抵抗性を示した (図 5、レーン 5-10)。モノマー型ビメンチンは、転写因子としてはたらくとの報告がある。したがって、Nup88 はビメンチンをモノマー状態に維持することで、ビメンチンによって制御される遺伝子の発現を調節している可能性が考えられた。

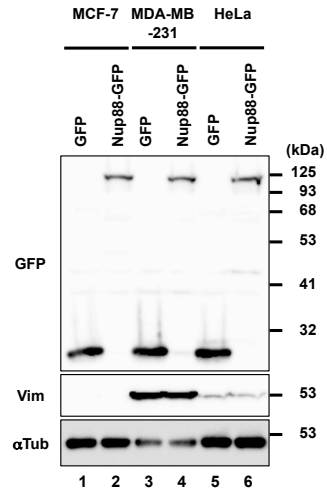


図 4 Nup88 過剰発現によるビメンチン発現量変化の検討

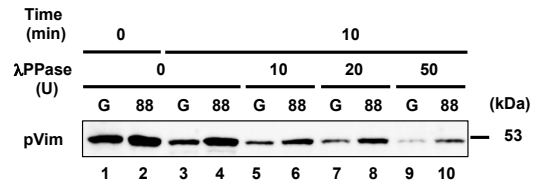


図 5 Nup88 によるビメンチンの脱リン酸化阻害

(3) CD82 との相互作用の検討

蛋白質結合データベースから、Nup88 はがん抑制分子と考えられている CD82 と結合することが示唆されている。そこで、先に樹立した細胞株に CD82 を過剰発現させ、免疫沈降法によって結合を調べた。結果として、両者の結合は確認できなかった (図 6)。

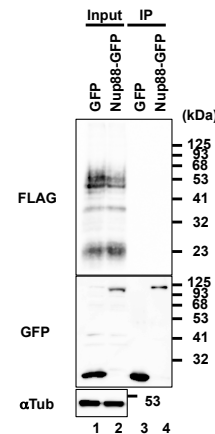


図 6 Nup88 と CD82 の相互作用の検出

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Makise M., Mackay DR., Elgort S., Shankaran SS., Adam SA., Ullman KS. (2012) The Nup153-Nup50 protein interface and its role in nuclear import. J. Biol. Chem. 287:38515-38522. doi: 10.1074/jbc.M112.378893 査読あり。

[学会発表] (計 5 件)

- ① 牧瀬正樹、福永晃右、猿渡康宏、國安明彦  
核膜孔因子 Nup50 と Nup153 の相互作用  
とその核内輸送への役割  
日本薬学会 134 年会 (2014 年 3 月 28 日 :  
熊本)
- ② 國安明彦、坂口隼、藤川典子、牧瀬正樹  
ハイブリッドペプチドによる白血病選択  
的ネクローシス様細胞死の誘導  
日本薬学会 134 年会 (2014 年 3 月 28 日 :  
熊本)
- ③ Akihiko Kuniyasu, Hayato Sakaguchi,  
Masaki Makise, Hitoshi Nakayama  
Hybrid peptide tat-RAM13 induces a  
tumor-selective necrosis-like cell death  
in human leukemic cells.  
The 2nd EACR Conference on Cell  
Death in Cancer (Jan 30th, 2014- Feb  
1st, 2014: Amsterdam, The  
Neatherlands)
- ④ Masaki Makise, Akihiko Kuniyasu  
The Nup153-Nup50 protein interface  
and its role in nuclear import.  
第 86 回生化学会大会 (2013 年 9 月 12 日 :  
横浜)
- ⑤ 中村優希、藤川典子、牧瀬正樹、國安明彦  
白血病細胞に特異的な非アポトーシス性  
細胞死の特性  
第 85 回日本生化学会大会 (2012 年 12 月  
16 日: 福岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当無し

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧瀬 正樹 (MAKISE, Masaki)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 80433001

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し