

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640071

研究課題名(和文)核膜孔複合体蛋白の細胞分裂時中心体間の相互作用解析に関する探索

研究課題名(英文)Characterization the role of nuclear pore proteins in mitosis

研究代表者

WONG W・R (Wong, Richard)

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：30464035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核膜上に多数ある核膜孔は核膜孔複合体から成り立っており、その複合体は約30種類の核膜孔複合体タンパク質(ヌクレオポリン)から構成されている。ヌクレオポリンは核膜を介する物質輸送だけではなく様々な働きを持つ。我々はその中でもヌクレオポリンの細胞有糸分裂期における役割を研究している。本研究課題は有糸分裂期における集合・脱集合時に、ある種のヌクレオポリンが動原体、紡錘体、中心体に局在していることを明らかにした中で、中心体に局在するヌクレオポリンの役割について4報の論文を発表したこれらの論文はすべてインパクトファクターは平均5である。

研究成果の概要(英文)：Nuclear pore complexes (NPC) are large protein channels that act as the sole mediators of molecular exchange between the nucleus and the cytoplasm of eukaryotic cells. Besides its function in controlling nucleocytoplasmic transport, the NPC and its components have been found to exert many transport independent functions. One of the most studied ones are the mitotic roles of nucleoporins. We and others discovered that NPCs disassemble during mitotic nuclear envelope breakdown, many soluble nucleoporins have been found to relocate to kinetochores, mitotic spindles and centrosomes. In this project, we are investigating the NPC proteins at the centrosomes. We have published 4 papers (IF5) or above.

研究分野：総合生物

キーワード：核膜孔複合体 細胞周期 Tpr Nup62 Nup358 中心体

1. 研究開始当初の背景

核 - 細胞質間の物質輸送は、内外の核膜を貫く特別な筒状の孔を通して行われる。この孔は筒状の巨大分子の集合体でできており、核膜孔複合体(Nuclear pore complex: NPC)と呼ばれる。二重膜でできている核膜は、この NPC によって孔が開けられているのである。核膜の外膜は小胞体へと続き、内膜はそれぞれの NPC を取り囲む曲面膜部に結合している。核内と細胞質をつなぐ唯一の通り道である NPC は細胞中で最大のタンパク質集合体であり、30 種類以上のヌクレオポリン(核膜孔複合体タンパク質) の多量体によって形成されている。

最近ヌクレオポリンの新たな機能として注目されている有糸分裂期での役割、及び、癌化への関与について焦点をあてる。高等真核生物は核膜崩壊後に、紡錘体微小管がキネトコアへ結合し、細胞質中に紡錘体を形成する。有糸分裂の初期に核膜が崩壊する時、核膜が分解するだけでなく、NPC やラミナのような巨大分子も分解される。有糸分裂後期に染色体が分離した後、核膜は核の境界を再構築するために、それぞれの姉妹染色体の周りに再形成される。

しかし最近、個々のヌクレオポリンの局在や機能がわかり始め、さらに有糸分裂中のヌクレオポリンのキネトコア - 紡錘体 - 中心体領域での局在を示すデータが多数報告され、NPC が有糸分裂期進行において必要不可欠な役割を果たすことが明らかになってきた。

2. 研究の目的

常軌を逸した中心体の生合成は中心体の機能障害を引き起こし、ゲノムの不安定化と異数化につながり、さらに 90%以上のヒト固形腫瘍で異数化が確認されている。我々は、ヌクレオポリンの一つである Tpr, Nup62 と Nup358/RanBP2 などが中心体の恒常性の維持に貢献していることを見出した。Tpr の発現低下により、細胞は多中心体化、異数化を示すが、その詳細なメカニズムは明らかとはなっていない。本研究の目的は、ヌクレオポリンが中心体/中心小体の正常な生合成に関与しているのではないかと仮定し、ヌクレオ

ポリン Tpr, Nup62 と Nup358 の中心体形成への関与とそのメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP 融合ヌクレオポリンを発現するよう樹立した細胞株をライブセルイメージングにより観察することにより、有糸分裂期におけるヌクレオポリン(個別あるいはサブ複合体として) の挙動を解析することで、ヌクレオポリンの相互作用の詳細な検討を行う。

4. 研究成果

我々は、ヌクレオポリンの一つである、Tpr をノックダウンすることにより、多中心体化、染色体の異数化が引き起こされること、またラギング染色体が現れることを見出した(図 1)。

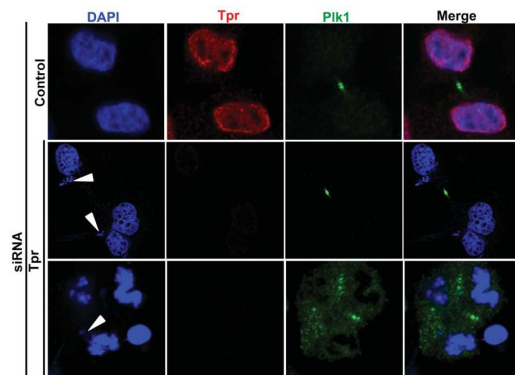


図 1 HeLa 細胞で Tpr をノックダウンし共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

さらに我々は、有糸分裂期に重要な役割を持つ Aurora A kinase が Tpr と相互作用していることを明らかにした(図 2)。

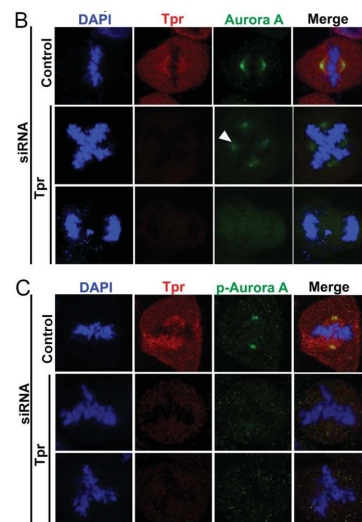


図 2

HeLa 細胞で Tpr をノックダウンし、共焦点レーザー顕微鏡で Tpr と Aurora A kinase の局在を観察した。

この結果について、論文で発表した (Kobayashi et.al., Cell Cycle, 2015)。また、我々は Nup62, Nup358 が細胞周期全般で中心体に局在することを見出した。そこで、Nup62 と Nup358 が中心体タンパク質であることを確認するために、不連続ショ糖密度勾配遠心を用いて HeLa 細胞のライセートから細胞分画を分離し、中心体タンパク質 -tubulin と Nup62, Nup358 が共分画にあることを見出した (論文投稿準備中)。

さらに、我々は樹立した GFP-Nup62 安定発現 SW480 細胞株、GFP-Nup358 安定発現 HCT116 細胞株を用いて、高解像共焦点レーザー顕微鏡により、中心体生合成における Nup62 と Nup358 の空間的・時間的情報を調べた。この中で、Nup358 が輸送タンパク質 Importin と相互作用していることを見出した。詳細なメカニズムは解析中である。

特筆すべきこととして、以前我々は Nup358/RanBP2 抑制によって誘導される分裂死メカニズムを明らかにしたが、最近、BRAF 遺伝子に変異が認められる大腸がんでは Nup358/RanBP2 が過剰発現しており、BRAF 遺伝子変異細胞の生存に重要であることが報告されました。これらのことで、我々の研究 [Hashizume et al. 2013 CDD] の高い再現性が示された。また、彼らのモデルは我々が提唱したものとほぼ同じである。これは、大腸癌細胞の機能に Nup358/RanBP2 と分裂死メカニズムが重要であることが明らかにされた一例である [Vecchione et al. 2016 Cell]。

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 5 件)

1. Wong RW and D'Angelo (2016) Nucleoporins, mitosis and colon cancer. Cell Chem Biol 23(5):537-539. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.05.004. 査読有
2. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, ...

Wong RW et al. (multiple authors) (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12(1):1-222. DOI:10.1080/15548627.2015.1100356. 査読有

3. Wong RW (2015) Nuclear Pore Complex: From structural view to chemical tools. Chem. Biol. 22(10):1285-1287. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.10.001. 査読有
4. Wong RW Mamede J, and Hope TJ (2015) The impact of nucleoporin mediated chromatin localization and nuclear architecture on HIV integration site selection. J. Virol. 89(19):9702-9705. DOI:10.1128/JVI.01669-15 査読有
5. Kobayashi A, Hashizume C, Dowaki T and Wong RW (2015) Therapeutic potential of mitotic interaction between the nucleoporin Tpr and Aurora kinase A. Cell Cycle 14(9): 1447-1458 DOI:10.1080/15384101.2015. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Richard Wong Aiding and Abetting oncogenesis: the nuclear pore complex 金沢大学新学術創成研究機構がん進展制御研究シンポジウム (金沢) 2016/02/15
2. 遠藤 葵、小林 亜紀子、Richard Wong 神経芽腫細胞における Rae1-Nup98 機能の探索「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム (東京) 2016/02/09
3. Richard Wong The impact of nucleoporin Tpr mediated chromatin dynamics and nuclear architecture. The second symposium between Chi Mai University and Kanazawa University (Kanazawa, Japan) 2015/09/29
4. 堂脇貴之、小林亜紀子、橋爪智恵子、遠藤葵、Richard Wong ヌクレオポリン Tpr の有糸分裂期での役割 第 67 回日本細胞生物学会大会 (東京) 2015/ 6/30

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://fsowonglab.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Richard Wong (WONG, Richard)
金沢大学 新学術創成研究機構 教授
研究者番号：30464035

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：