

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870053

研究課題名(和文)核膜孔複合体構成因子による染色体分配の制御機構と染色体不安定性との関連

研究課題名(英文)Relationship between the mechanisms of chromosome segregation mediated by nucleoporins and the chromosomal instability

研究代表者

伊藤 剛 (Go, Itoh)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60607563

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)：分裂期における正確な染色体分配は適切な細胞増殖にとって必須である。申請者は染色体分配に機能する分子を同定してきた(EMBO J. 2011, Cancer Sci. 2013)。近年、核膜孔複合体構成因子は染色体分配に関与することがわかった。本研究は、染色体分配に関連する核膜孔複合体構成因子のスクリーニングを行った。構成因子であるRae1もしくはNup188との結合因子を関連分子として注目した。Flagタグを付加したNup188やRae1を安定発現するヒトHEK293細胞を樹立し、Flag抗体による免疫沈降を行った後、免疫沈降産物に含まれる分子をマスペクトロメリーで同定し、機能解析した。

研究成果の概要(英文)：Precise chromosomes segregation in mitosis is essential for proper cell growth. So far, we have identified molecules related to chromosomes segregation (EMBO J. 2011, Cancer Sci. 2013). In recent years, Nucleoporins in human cells have been shown to work in chromosomes segregation. In this study, we were carried out the screening of the nucleoporins associated with chromosome segregation. Nucleoporins were characterized as a binding partner of the Rae1 or Nup188 related with chromosomes segregation. After an establishment of human HEK293 cells expressing Nup188 and Rae1 recombinant protein tagged with Flag, we carried out immunoprecipitation with Flag antibody, and then identified molecules contained in immunoprecipitation product by mass spectrometry.

研究分野：細胞生理学

キーワード：染色体分配

### 1. 研究開始当初の背景

複製された染色体は分裂期に細胞中央部の分裂面へと移動した後、娘細胞へとすみやかに分配される。染色体分配が異常となった場合、個々の細胞において染色体数が異なる染色体不安定性と呼ばれる状態を導き、異数体細胞が増加してしまう。異数体細胞は遺伝情報の攪乱を蓄積することで、がん細胞へと形質転換する可能性が示唆されている。そのため、染色体分配に関わる分子を同定し、その分子機構を理解・制御することでがん細胞産生を抑制できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

応募者はこれまで染色体分配に働く分子を同定してきた(*EMBO J* 2011, *Cancer Sci* 2013)。近年、核膜孔複合体構成因子である Nup188 が染色体分配に関与することを報告した。核膜孔複合体は 30 種類程度の核膜孔複合体構成因子で構成されており、間期の細胞において、核膜孔複合体は核膜に埋め込まれて核膜を介した核 - 細胞質間の物質輸送の場となっていることが知られている。

一方、核膜孔複合体は間期から分裂期へと移行する際、核膜の崩壊と共に解体してしまう。その後、複数の核膜孔複合体構成因子 (Nup107-160 コンプレックス、Rae1、Nup88、Nup188) は中心体、動原体、紡錘体微小管に局在していき、染色体分配の進行に機能することが報告されている。

核膜孔複合体構成因子の構造や発現の異常は、種々のがんと関係することがわかってきた。これまで、核膜孔複合体構成因子の Nup88 では種々のがんにおいて発現量が増加することが報告されている。また Nup98、Nup214、Tpr では、主に白血病で染色体転座により他のタンパク質との融合タンパク質が形成され、がん化に関連していると考えられる。これらの融合タンパク質が存在する例では核膜輸送の異常は見られず、がん化には核膜輸送以外の機能が関連している可能性

がある。

本研究では 30 種類程度ある核膜孔複合体構成因子の中から染色体分配の進行に関する因子を新たに同定し、これら因子を中心として染色体分配に関する分子機構を明らかにする。また、染色体分配への関係の認められる核膜孔複合体構成因子が染色体不安定性に関与するかを検討していく。これらにより、核膜孔複合体構成因子の染色体分配に関する機能が、細胞のがん化と関連するかを解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

核膜孔複合体構成因子は因子間で複数の巨大なコンプレックスを形成し、間期細胞における核膜孔複合体はそれらサブコンプレックスの集合により構築される。一方、分裂期にはこれらのサブコンプレックスは一旦解体され、再構築される。本研究ではまず染色体分配に関与する核膜孔複合体構成因子である Rae1 と Nup188 に注目し、分裂期に Rae1 もしくは Nup188 を構成因子としたサブコンプレックスに含まれる因子を染色体分配進行の関連因子として同定し、機能解析していった。

(1). Flag 標識した Rae1 もしくは Nup188 を安定発現させた HEK293 株を作成する。

(2). HEK293 細胞株に対してノコダゾール処理を行うことで細胞分裂期に同調させ、細胞の抽出液について Flag に対する抗体による免疫沈降を行う。免疫沈降産物中に含まれる分子をマスマスペクトロメトリーにて同定する。さらに、結果より間期の核膜孔におけるサブコンプレックスが、分裂期においても維持されているかを検討する。

(3). 同定した因子を siRNA により HeLa 細胞からノックダウンする。ノックダウンの効果を確認するために、ウェスタンブロットによるノックダウン後の発現量の低下と免疫染色法によるその局在の消失を確認する。

(4). ノックダウン後に染色体分配異常が認

められるかどうかを生細胞観察により明らかにする。H2B-GFP を発現させた HeLa 細胞から同定した因子を siRNA によりノックダウンした後、染色体分配に異常があるかどうかを観察する。同定した因子が分裂期にどのように機能するかを生細胞観察から得た結果の解析により検討する。

(5). Rae1 もしくは Nup188 において、同定した因子との重要な結合領域を特定する。Rae1 もしくは Nup188 の C 末端、中央、N 末端領域の変異体を安定発現する HEK293 株を作成する。細胞株に対してノコダゾール処理を行うことで細胞分裂期に同調させ、細胞の抽出液について Flag に対する抗体による免疫沈降を行う。同定した因子が免疫沈降産物中に含まれるかウェスタンブロットにより検出する。さらに、さらに Rae1 もしくは Nup188 の変異体により分裂期におけるサブコンプレックスが維持されているかを検討する。

#### 4 . 研究成果

(1). Flag-Rae1 および Flag-Nup188 の安定発現株を樹立した。

(2). 分裂期における Rae1 に対する結合分子を検討した結果、核膜孔複合体構成因子である Nup214, Nup188, Nup98, Nup93, Nup88 を特定した。また核膜輸送を担う CRM1 が見つかった。Rae1 と特定した分子はチミジン処理により間期に同調された細胞でも同様に結合することが認められた。細胞周期を通じて結合が維持されている可能性が考えられた。

(3). 分裂期における特定した分子間での結合を詳細にした。ノコダゾール処理した HeLa 細胞の細胞抽出液を用いた免疫沈降により、内在性 Nup93 の免疫沈降産物中に RAE1, CRM1, Nup88, Nup188 が検出された。同様に、内在性 Nup188 の免疫沈降産物中に RAE1, CRM1, Nup88, Nup93 が検出さ

れた。これらの結果より、RAE1, CRM1, Nup88, Nup93, Nup188 は分裂期に結合していることがわかった。

(4). 分裂期の HeLa 細胞における RAE1, CRM1, Nup88, Nup93, Nup188 の細胞内局在を調べるため、各抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、各分子は間期においては核膜に分布する一方、分裂期では中心体を含む紡錘体に局在することが示された。これらの分子は分裂期で紡錘体上にて複合体を形成している可能性が考えられた。

(5). 各分子が染色体分配の進行に関与しているかどうかを検討した結果、いずれの分子でも染色体分配の欠損が認められた。RAE1, CRM1, Nup88, Nup188 と染色体分配の関連についてはすでに報告されているが、Nup93 ノックダウンにより染色体分配欠損の可能性が示唆された点が新しい。

Nup188 の C 末端、中央、N 末端領域の変異体を安定発現する HEK293 株を樹立した。

今後の研究では、同定した核膜孔複合体構成因子により構築されるサブユニットが正常細胞における染色体不安定性に関連するかどうかを検討する。染色体不安定性による異数体細胞の増加が認められた場合、この細胞をヌードマウス皮下や臓器へと移植することで発がんとの関係を明らかにしていく。

#### 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2件)

Identification of anti-cancer chemical compounds using *Xenopus* embryos. Tanaka M, Kuriyama S, Itoh G, Kohyama A, Iwabuchi Y, Shibata H, Yashiro M, Aiba N. *Cancer Science*. (2016) 査読有 DOI: 10.1111/cas. 12940.

Amin, MA, Itoh, G, Iemura, K, Ikeda, M, Tanaka, K. CLIP-170 recruits PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment. *J Cell Sci*. (2014) 127, 2818-2824. 査読有. DOI: 10.1242/jcs. 150755.

〔学会発表〕(計3件)

第74回日本癌学会学術総会  
間質細胞による浸潤性癌の排除機構について  
伊藤剛、田中正光(秋田大院・医・分子生化学)  
平成27年10月9日(金)  
名古屋国際会議場

第81回日本生化学会東北支部会  
間質細胞による胃がん細胞の浸潤抑制に働くがん細胞排除システムの解明(ポスター発表)  
伊藤剛、田中正光(秋田大院・医・分子生化学)  
平成27年5月9日(土)  
東北大学 さくらホール

第73回日本癌学会学術総会  
染色体整列制御分子CAMPは分裂期停止時におけるがん細胞の生存に寄与する  
家村顕示、伊藤剛、田中耕三  
平成26年9月27日(土)  
パシフィコ横浜

〔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://www.med.akita-u.ac.jp/~seika2/>

## 6. 研究組織

研究代表者

伊藤 剛 (ITO, Go)  
秋田大学大学院 医学系研究科・助教  
研究者番号：60607563