

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790309

研究課題名(和文)核内外輸送の異常が関わる細胞がん化機構の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanism of tumorigenesis related to aberrant nuclear-cytoplasmic transport

研究代表者

齋藤 祥子(Saito, Shoko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70344885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核細胞質間物質輸送異常と細胞がん化の相関を明らかにすることを旨とし、核細胞質間物質輸送の介助をする核膜孔タンパク質NUP214の白血病で観察される変異型タンパク質SET-NUP214, DEK-NUP214の機能解析を行った。SET-NUP214, DEK-NUP214発現細胞では核外輸送運搬体CRM1/XPO1およびNXF1/TAPの局在が変化し、生体高分子の核外輸送に変調を来すことが明らかとなった。加えて、SET-NUP214, DEK-NUP214発現細胞ではNF- κ B構成タンパク質の局在が変化し、NF- κ B活性が抑制されることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the relationship between aberrant nuclear-cytoplasmic transport and oncogenesis, we examined cellular functions of fusion proteins, SET-NUP214 and DEK-NUP214. NUP214 is one of the nuclear pore complex components, and critical for efficient nuclear-cytoplasmic export of macromolecules.

We found SET-NUP214 and DEK-NUP214 interact with not only XPO1/CRM1 but also NXF1/TAP preferentially among several nuclear transport receptors. We observed that nuclear accumulation of endogenous proteins harboring NES in cells expressing SET-NUP214 or DEK-NUP214. By contrast, nuclear accumulation of mRNA was not so clear in cells expressing SET-NUP214 or DEK-NUP214. We also observed that endogenous NF- κ B complex, whose subcellular localization is regulated in a XPO1-dependent manner, accumulates in nuclei in cells expressing SET-, DEK-NUP214. NF- κ B activity was partially suppressed in the presence of SET-, DEK-NUP214.

研究分野：細胞生物学

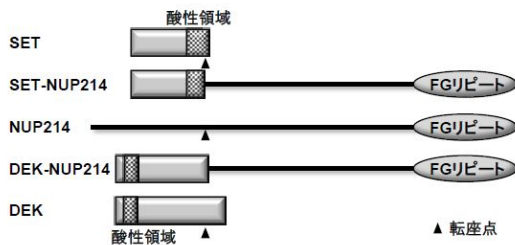
キーワード：核細胞質間物質輸送 細胞がん化 核膜孔複合体 核外輸送 CRM1/XPO1 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

細胞内分子輸送は細胞の機能や秩序を維持するのに必要な機構である。その中で、核-細胞質間の物質輸送は、核膜によって核と細胞質が隔てられている真核生物で見られる機構である。タンパク質や RNA は核と細胞質を移動することによってしばしばその活性が制御されている。

核膜は正常な細胞機能維持に必須で、核膜構成因子の遺伝子異常はさまざまな疾患を引き起こすことが知られている。例えば、核細胞質間物質輸送は核膜孔複合体を介して行われているが、これまでに核膜孔タンパク質をコードする遺伝子が白血病で転座型遺伝子を形成することが報告されている。その中の一つ *nup214/can* は染色体転座により *set-nup214* や *dek-nup214* などの融合遺伝子を形成する(図1)。Nup214 は核膜孔タンパク質にしばしば見られる Phe-Gly(FG)リピート領域を介してタンパク質や RNA の核細胞質間運搬体である CRM1/Exportin-1(XPO1)や importin- β 等と結合し、選択的な核-細胞質間分子輸送の介助を行っている。

図1 SET-NUP214, DEK-NUP214の模式図



nup214 ノックアウトマウスは胎生致死であり、ノックアウト細胞では polyA RNA の核への蓄積が見られること、*nup214* をノックダウンした細胞ではタンパク質の核外移行が強く抑制されていることから、Nup214 は核膜孔が正常に生体高分子輸送の介助を果たすのに必須であり、白血病発症にはタンパク質や RNA の細胞内輸送の異常が関連するものと想定される。

以前に、我々は、SET-Nup214 が核外移行シグナル(NES)を有するタンパク質の核外輸送を担う XPO1 と結合すること、*set-nup214* トランスジェニックマウスでは未分化な造血細胞が増加していることを報告している。しかし、DEK-Nup214 や SET-Nup214 の発現が、どのような細胞内輸送に影響を与えるのか、またそのことによりどのような遺伝子発現に変調が生じているのか、さらに、これらは *dek-nup214* や *set-nup214* が関与する細胞のがん化をどのように説明できるのか、など不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、核-細胞質間輸送異常と細胞がん化の相関を明らかにすることを旨とし、白血病でみられる融合遺伝子産物 SET-Nup214

および DEK-Nup214 の発現によって細胞内局在に変化が生じるタンパク質や RNA の実体を明らかにすること、局在変化を示した因子が関わる細胞内機能に、SET-, DEK-NUP214 がどのような影響を与えているか明らかにすることを目的として実験を進めた。

3. 研究の方法

(1) SET-, DEK-Nup214 が各種の核内外輸送機構に与える影響の検討

FG リピートを有する核膜孔タンパク質は、タンパク質の核外輸送以外にも、タンパク質の核内輸送や mRNA や非コード RNA 分子の核外輸送に関わる輸送因子とも結合し、輸送の介助を行っている。そこで、いくつかの輸送運搬体と SET-, DEK-Nup214 との相互作用を免疫沈降法により検討した。また、相互作用が見られた運搬体については、それが担うタンパク質や RNA の細胞内局在への影響についても免疫染色法により検討した。

(2) SET-, DEK-Nup214 発現によって核-細胞質間輸送に変調が起こる生体高分子の同定 (1)での結果を踏まえて実験を進める)

今までの報告から、細胞分化や細胞増殖、アポトーシスに関わっている因子で、核細胞質移行して機能を果たすタンパク質あるいは RNA を検索し、局在を免疫染色法により観察した。

SET-, DEK-Nup214 発現細胞から核抽出液および細胞質抽出液を調製し蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動を行った。コントロールの核あるいは細胞質抽出液と比較して、量がそれぞれ増加あるいは減少したタンパク質は SET-, DEK-Nup214 により核に蓄積した可能性がある。変化が見られたタンパク質を質量分析装置により同定を試みた。

(3) 同定因子による遺伝子発現調節機構の解明

細胞内輸送に異常が起きていた因子については、それにより遺伝子発現や細胞の性質にどのような影響が表れているのか、SET-, DEK-Nup214 発現細胞を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) SET-, DEK-Nup214 が各種核外輸送機構に与える影響

核-細胞質間輸送因子(IPO β , IPO7, XPO1, XPO2, XPO3, XPO5, NXF1)と SET-, DEK-Nup214 との免疫沈降実験を行い、Nup214 融合遺伝子産物が mRNA の核外輸送因子である NXF1/TAP 及びタンパク質の核外輸送因子である XPO1/CRM1 と結合することを見出した(図2)。NXF1 あるいは XPO1 との結合特異性が SET-, DEK-Nup214 のどの領域に依存しているかを調べるため、欠損変異

体を用いて同様の実験を行ったところ、FGリピート領域を含む Nup214 欠損変異体でも同様の因子の結合特異性を示した。このことから、SET-, DEK-Nup214 と核-細胞質間輸送因子との相互作用には特異性があること、その特異性は Nup214 領域によって生じていることが明らかとなった。Nup214 は IPOβ, Xpot, XPO1, NXF1 といった輸送因子と結合することが報告されており、我々の結果はこれらの報告とおおよそ一致している。このことは、SET-, DEK-Nup214 の SET あるいは DEK 領域は Nup214 領域の構造に影響を与えていないことを示唆している。

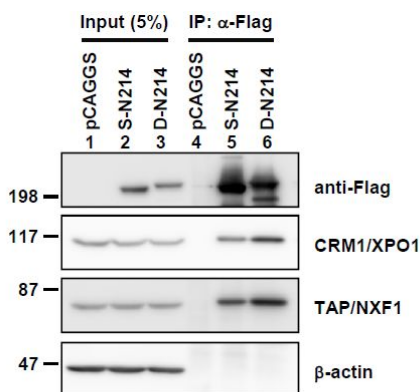


図2 SET/DEK-Nup214と核外輸送運搬体XPO1およびNXF1との相互作用 Flagタグ付きSET-Nup214(S-N214)あるいはDEK-Nup214(D-N214)を細胞で発現させ、抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行った。ウエスタンブロットニングの結果より、両タンパク質が内在性のXPO1およびNXF1と相互作用していることが明らかとなった

以前我々は SET-, DEK-Nup214 が内在性の XPO1 の細胞内局在を変化させていることを観察している。本研究で行った免疫沈降実験より SET-, DEK-Nup214 が NXF1 とも相互作用することが明らかとなったことから、SET-, DEK-Nup214 発現細胞における NXF1 の細胞内局在を調べたところ、SET-Nup214 細胞では NXF1 が SET-Nup214 の存在する顆粒状のドットへ一部集積していることが明らかとなった。

(2) SET-, DEK-Nup214 発現によって核 細胞質間輸送に変調が起こる生体高分子の同定

以前、我々は NES を融合させた EGFP タンパク質をモデルタンパク質として用い、SET-, DEK-Nup214 発現によってタンパク質の核外輸送が阻害されていることを見出している。しかし、実際 XPO1 で核外輸送が行われている内在性の NES タンパク質に対しても SET-, DEK-Nup214 が同様の影響を及ぼしているのかは不明であった。

そこで、NES を保持するタンパク質として知られている CyclinB1 および IκBα の局在について調べたところ、正常細胞では両タンパク質は主に細胞質に観察されるのに対して、SET-, DEK-Nup214 発現細胞では顕著に核へ局在していることが観察された。一方で、

NXF1 が輸送を担う mRNA の局在は、正常細胞と SET-, DEK-Nup214 発現細胞の間でそれほど大きな差はみられなかった。

免疫沈降実験では XPO1, NXF1 共に SET-, DEK-Nup214 と効率よく結合していることが観察されている。免疫沈降実験と局在を観察した実験での結果の違いについては、内在性 NXF1 への親和性が XPO1 のそれと比べて低かったためではないか、と推測している。

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動に用いる核抽出液の調製、二次元電気泳動の条件検討が終了した。コントロールの核あるいは細胞質抽出液と比較して、SET-, DEK-Nup214 発現細胞で量がそれぞれ増加あるいは減少したタンパク質を質量分析装置により同定するのが今後の課題である。

(3)同定因子による遺伝子発現調節機構の解明

今回の研究で、SET-, DEK-Nup214 の発現により、IκBα の細胞内局在が変化していることを見出した。IκBα は NF-κB の転写活性を阻害する因子である。そこで、IκBα が関与している NF-κB 経路の活性を検討した。TNF-α 添加により NF-κB 経路を活性化させ、レポーターアッセイ及び RT-qPCR 法により遺伝子発現量を測定することで、転写活性化の度合いを検討した。TNF-α 非添加時、SET-, DEK-Nup214 発現の有無に関わらず、転写活性はほとんど見られなかった(図3)。一方、TNF-α 添加時、Nup214 融合遺伝子産物の発現量に応じて、NF-κB 経路の抑制が検出された(図4)。

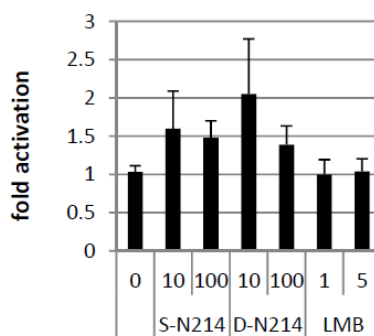


図3 SET/DEK-Nup214がNF-κB経路に及ぼす影響(TNF-α非存在下) NF-κB結合サイトを有するレポーターベクターとノーマライズ用のコントロールベクター、SET-Nup214(S-N214)あるいはDEK-Nup214(D-N214)発現ベクターを細胞で発現させ、2日後に細胞を回収してルシフェラーゼアッセイを行った。最も右の2レーンはSET/DEK-Nup214発現ベクターの代わりにXPO1阻害剤であるLMBを添加している。SET/DEK-Nup214の発現の有無に関わらず、転写の活性に変化は見られなかった

TNF-α 添加時の SET-, DEK-Nup214 による遺伝子発現抑制機構について、免疫沈降実験、免疫染色実験、ChIP アッセイ等を行った結果、

SET-, DEK-Nup214 発現細胞では TNF- α 添加後にも I κ B α が核内に存在しており、核内で転写因子 p65 と結合していること、p65 は SET/DEK-Nup214 発現細胞において DNA 結合領域への結合が減少していることが観察された。正常細胞では、I κ B α は TNF- α などによって NF- κ B 経路が活性化された後、細胞質でリン酸化され、分解される。SET-, DEK-Nup214 発現細胞では、核に局在している I κ B α が分解から逃れ、I κ B α が NF- κ B に結合することで、NF- κ B 転写活性が抑制されたと推測される。

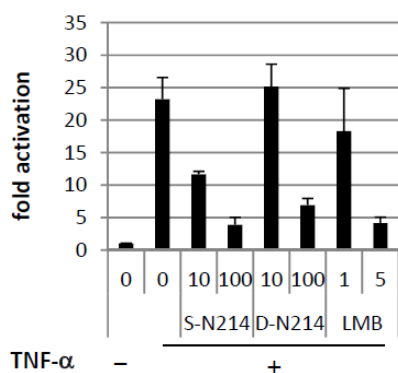


図4 SET/DEK-Nup214がNF- κ B経路に及ぼす影響(TNF- α 存在下) 図3と同様の実験を行い、トランスフェクション2日後TNF- α を添加し、添加3-4時間後に細胞を回収してルシフェラーゼアッセイを行った。SET/DEK-Nup214発現細胞では転写活性化に対する抑制が観察された

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)

Feillet C, Krusche P, Tamanini F, Janssens RC, Downey MJ, Martin P, Teboul M, Saito S, Lévi FA, Bretschneider T, van der Horst GT, Delaunay F, Rand DA. Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(27):9828-33, 2014. doi:10.1073/pnas.1320474111. 査読有

Billy F, Clairambault J, Fercoq O, Gaubert S, Lepoutre T, Ouillon T, Saito S. Synchronisation and control of proliferation in cycling cell population models with age structure. Math. Comp. Simul. 96:66-94, 2014. doi:10.1016/j.matcom.2012.03.005 査読有

[学会発表](計3件)

Shoko Saito, Cigdem Sadik, kyosuke Nagata. Aberrant nuclear-cytoplasmic transport by nup214-fusion gene products found in leukemia. Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Nuclear Organization

& Function/2014.08.19-23, Cold Spring Harbor (USA)

Cigdem Sadik, 齋藤 祥子, 永田 恭介 Effect of nucleoporin-related fusion proteins found in leukemia on NF- κ B pathway 平成 25 年度日本生化学会関東支部例会/2013.06.15 山梨大学(山梨県・甲府市)

齋藤 祥子, Cigdem Sadik, 永田 恭介細胞がん化に関わる核膜孔タンパク質の発現異常 第35回日本分子生物学会年会/2012.12.11-14 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 祥子 (SAITO, Shoko)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：70344885