

**研究テーマ****トランスジェニック法によるNup88の機能とがんの発症メカニズムの解析****1. 背景及び目的**

当該申請課題では、様々な悪性腫瘍で過剰発現が確認されている核膜孔タンパク質の一つNup88 (1)に注目し、Nup88の細胞生物学的な分子機能を解明すること、及びNup88によるがんの発生と進行における医学的な役割について新たな知見を得ることを目的とした。

細胞の核膜に存在する「核膜孔複合体」は、総分子量66MDa、約30種類のタンパク質から構成された巨大な自己集合体だが、近年、核膜孔は孔を形作っている構造体であるだけでなく、核-細胞質間でのタンパク質、RNA等の物質輸送を制御していることが明らかされてきた。細胞内物質輸送は、細胞の機能、形作り、及び生存のために必須で重要なメカニズムであるため、この機能の障害が未知の疾患の成因となっている可能性が考えられている。事実、多くの急性及び慢性骨髄性白血病において染色体転座によって形成された核膜孔タンパク質 (Nup214, Nup98, Tpr) と他のタンパク質とのキメラタンパク質が発がんに関与していることが知られている (2)。一方最近我々は、乳癌において高発現が報告されている核膜孔タンパク質の一つRae1が、細胞分裂における紡錘体極の維持に重要な役割を果たしていることを新たに解明してきた (3-5)。これらの知見から核膜孔タンパク質の機能が、がんの発生メカニズム、がんの悪性化において重要な役割をしていると考えられているが、核膜孔タンパク質とがん発生の詳細なメカニズムは未だほとんど分かっていない。

そこで我々は本研究を通して、細胞生物学における核膜孔の機能的重要性及び医学における、がん形成と核膜孔の関係を解明するとともに、がん形成の分子機構との関わりを明らかにし、最終的にがん治療への発展に繋がることを期待した。

**2. 方法**

以下の3つの方法を用いたNup88の分子機能と発がんメカニズムの解析を行った。

**1) 遺伝学的解析:** Nup88のトランスジェニック(Tg)マウスでの発がんメカニズムの解析。

GFP融合Nup88発現ベクターをゲノムに挿入したTgマウスを樹立した。F1 Tgマウスの主要な臓器でのNup88の影響を解明するため、野生型マウスとNup88 Tgマウスの主な臓器の凍結切片を作製し、HE染色及び免疫染色により細胞レベルでの異常を検討した。Nup88の生体内での役割、及び、癌化との関与を解析した。

**2) 細胞生物学的解析:** 培養細胞を用い細胞周期を通したNup88の細胞内での正確な局在を知る。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光免疫染色法により子宮頸癌HeLa細胞内のNup88とその結合因子Nup214の細胞周期を通した局在変化を観察した。さらにsiRNAによりNup88をノックダウンさせた、又は、GFP融合Nup88発現プラスミドによりNup88を過剰発現させた癌細胞内での核膜孔複合体タンパク質の局在変化、及び細胞の形態変化を蛍光免疫染色法により解析した。

**3) 生化学的解析:** 免疫沈降法を用いて、Nup88の結合因子を同定する。

免疫沈降法を用いて、癌細胞中のNup88との結合因子の同定を試みた。

これらの方法を通し、Nup88の過剰発現がいかに癌化に関与するかを分子生物学的に解明することを試みた。

### 3. 結果

#### 1) 遺伝学的解析

GFP融合Nup88発現ベクターをゲノムに挿入したTgマウス4株を樹立した。野生型マウスとNup88Tgマウスの主な臓器の凍結切片を、HE染色及び免疫染色により観察したところ、Nup88Tgマウスでのみ、脳及び肺に腫瘍が発生した個体がみられ、腫瘍部位ではGFPの蛍光が検出できたことから、腫瘍の発生とNup88の過剰発現の相関性が示唆された。これらの結果をまとめ、現在投稿準備中である(6)。

#### 2) 細胞生物学的及び生化学的解析

最初に、細胞周期の有糸分裂期(M期)におけるNup88の結合因子を同定するため、M期に同調させたHeLaの細胞抽出液、及び抗Nup88抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、間期においてNup88との結合が知られているNup214が共沈してきた。蛍光免疫染色法を用いた細胞内でのNup88及びNup214の局在の観察を行ったところ、M期においても共局在がみられた(図1中段)。従って、Nup88とNup214は細胞周期を通して相互作用していることが明らかになった。さらに、M期での紡錘体マーカー  $\alpha$ -TubulinとNup88の局在を比較したところ、両者は共局在した(図1下段)ことから、M期においてNup88とNup214は紡錘体上に局在することが示唆された。

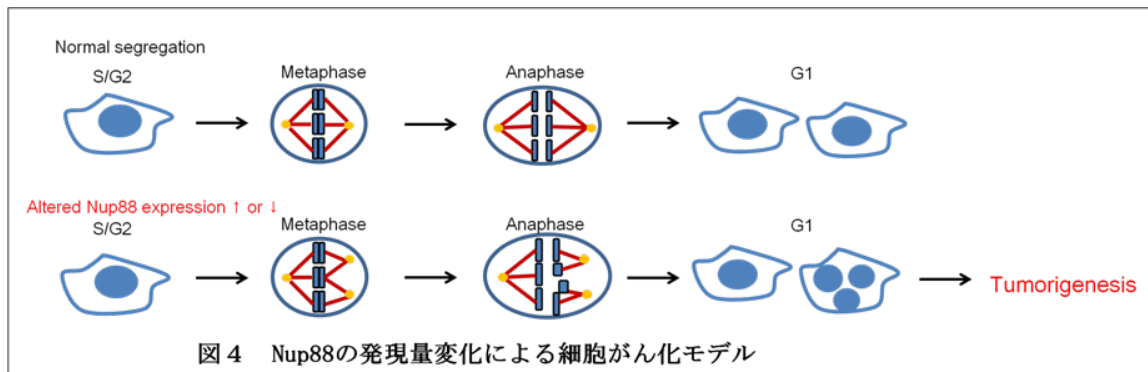
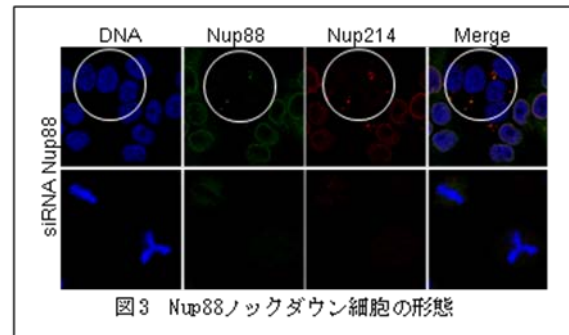
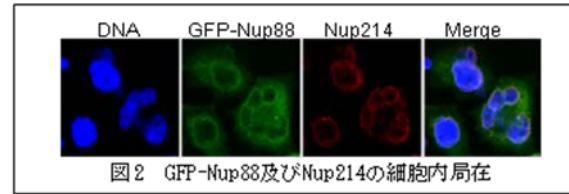
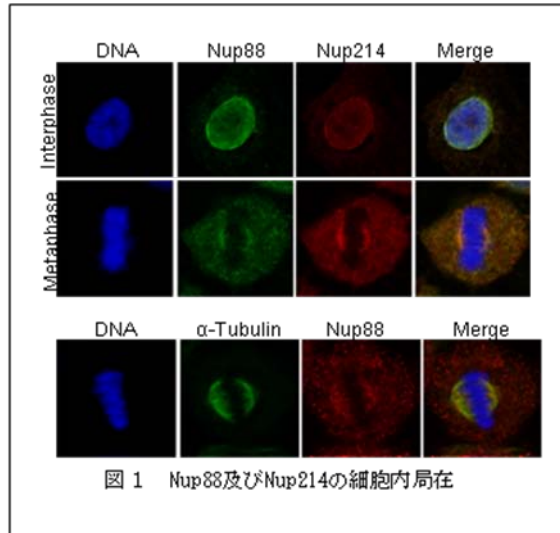
続いて、GFP-Nup88発現プラスミドをHeLa細胞に導入し、過剰発現したNup88の細胞内局在及び、細胞の形態変化を48時間後に観察した。するとGFP-Nup88は細胞質及び核膜に局在し、Nup214は依然としてNup88と共に核膜に局在していた(図2)。GFP-Nup88発現細胞では23%に多核化がみられたが、コントロールベクターGFP導入細胞では5%であった。Nup88の過剰発現が高効率で多核化を引き起こすことが明らかになった。

次に、siRNAによりNup88をノックダウンさせ72時間後に観察したところ、Nup88が消失した間期の細胞ではNup214も核膜から消失していたが、核の形態に変化は見られなかった(図3上段)。一方、M期の細胞ではコントロールsiRNA導入細胞(3%)と比較して、Nup88が消失した細胞では紡錘体の形態に高効率(21%)で異常がみられ、分裂中の染色体の形態にも異常がみられた(図3下段)。以上より、細胞内のNup88量の変化が紡錘体形成の異常を引き起こし、多核化を引き起こすことが示唆された。これらの結果をまとめ、現在論文を投稿中である(7)。

### 4. まとめ

染色体の付加や欠損は癌患者の細胞内で観察されるが、これは有糸分裂期の異常な染色体分離によって引き起こされると考えられている。染色体分離の失敗による異数体化は、癌化進行の促進力である。我々は、RNAi及び過剰発現方法によって、細胞内のNup88発現量を変化させたとき、多核化、即ち染色体の異数体化を起こし遺伝子の不安定化を促進する紡錘体形成異常が起こることを明らかにした。本来ならば、キネトコア-紡錘体微小管の相互作用が染色体と結合することで正確な染色体分離が制御されているが、Nup88の発現量の変化による紡錘体形成異常が正確な染色体分離を失敗させ、最終的に分散した染色体の周りに核膜が形成されることで、多核化が起こると考えられる。Nup88Tgマウスでのみ、脳及び肺に腫瘍が

発生したことから、生体内においてもNup88発現量の変化により多核化が起こり、染色体不安定性が引き起こされた結果、癌化が促進されたことが示唆された(図4)。



## 5. 発表論文、参考文献

\*=corresponding author

- (1) Gould VE, Martinez N, Orucevic A, Schneider J, Alonso A. A novel, nuclear pore-associated, widely distributed molecule overexpressed in oncogenesis and development. *Am J Pathol.* 2000, 157: 1605-13.
- (2) Xu S and Powers MA. Nuclear pore proteins and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2009, 20: 620-30.
- (3) Wong R\* Interaction between Rae1 and Cohesin subunit SMC1 is required for proper spindle formation. *Cell Cycle.* 2010, 9: 198-200.
- (4) Wong R\*, Blobel. Cohesin subunit SMC1 associates with mitotic microtubules at the spindle pole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008, 105:15441-15445.
- (5) Wong RW, Blobel G, Coutavas E. Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103:19783-7.
- (6) Nakano H, Wong R\*. Overexpression Nup88 induced tumorigenesis in transgenic mouse model. (in preparation)
- (7) Hashizume C, Nakano H, Wong R\*. Characterization of the role of the tumor marker Nup88 in mitosis. (submitted)