

核膜孔複合体を介したエピジェネティクス制御機構

金沢大学 理工研究域 自然システム学系 分子細胞生物学研究室
船坂 龍善

1. はじめに

細胞核膜上に多数ある核膜孔には核膜孔複合体が存在しており、約30種類の核膜孔複合体因子から構成されている。この核膜孔複合体の機能は細胞質-核間の分子輸送の制御であり、これによって、転写因子は核内に移行する一方、mRNA等は核外に移行される。細胞内の物質輸送は物質を正確に分配し輸送するために精密に制御されており、細胞内における各器官へのタンパク質の誤送は数多い疾患、例えば癌、に関わっている。実際に核膜孔複合体因子である Rael が乳癌において重要な役割を担っていることが明らかにされ、Nup88 は種々の癌で高発現が報告されており、また Nup98、Tpr の染色体転座が多くの人腫瘍で観察されている。申請者も今までに、予後が良好でない癌でよく観察される染色体・遺伝子の不安定性や異数化を核膜孔複合体因子が制御しており、白血病発症に深く関与していることを明らかにしてきた (1, 2)。しかし、核膜孔複合体因子と癌悪性化に関する研究は近年始められたばかりであり、その詳細なメカニズムは未だ不明のままである。

近年、白血病を始めとした癌において癌幹細胞の存在が確認されつつあり、種々の癌で少数の自己複製能を持った癌幹細胞を中心とした幹細胞システムが形成されているものと考えられている。なかでも、急性骨髄性白血病 (AML) のような造血系腫瘍は癌幹細胞システムの良いモデルとされている。興味深いことに、多くの AML 患者において核膜孔複合体因子を含む染色体転座が認められ、核膜孔複合体因子のうち Nup98 遺伝子を含む染色体転座が多く観察されている (3)。中でも特に Nup98 とホメオボックス遺伝子 HOX 群やトポイソメラーゼ、JARID1A などとの融合が多く観察される。HOX 遺伝子群の中で HOXA9 と Nup98 の染色体転座産物 Nup98-HOXA9 は骨髄細胞やマウス繊維芽細胞 NIH3T3 の癌性形質転換を誘導し、また幹細胞の増殖を促進することが報告されており、さらに最近申請者も Nup98 の結合パートナーである核膜孔複合体因子 Rael が Nup98-HOXA9 による白血病発症に深く関与していることを明らかにした (2, 4)。最近、ヒストン修飾や DNA メチル化などによるエピジェネティックな遺伝子発現制御の関与が数々の疾患、たとえば癌などで報告されている。エピジェネティクス制御の破綻が癌関連遺伝子の発現制御に関与することが明らかにされ、また癌治療における重要な標的である癌幹細胞の形成にも深く関わっていることが報告されている。そこで本研究では、白血病を中心に癌悪性化過程における癌幹細胞の核膜孔複合体因子を介したエピジェネティクス制御機構を解明することを目的とし、癌幹細胞の自己複製能・多能性を規定するエピジェネティクスの理解を通してがんの微小環境におけるネットワークの統合的理解を目指し、また新規癌治療法への応用開発を検討する。

2. 方法

本研究では核膜孔複合体因子を介したエピジェネティクス機構を解明し、癌幹細胞の自己複製能・多能性を規定するエピジェネティクスの統合的理解を目指す。核膜孔複合体因子は約30種存在するが、まず本研究計画では白血病の形成に重要な役割を果たしていると考えられる Nup98 とその結合パートナー Rael について詳細な検討を進める。本研究計画は、核膜孔複合体因子によるエピジェネティクス制御機構の分子・細胞レベルでの詳細な解析 (Aim 1)、マウスモデルを用いたエピジェネティクス制御機構の解析および臨床応用への可能性の検討 (Aim 2) を目的とする。

1. 核膜孔複合体因子のエピジェネティクスへの関与の検討

ヒト白血病細胞やヒト腫瘍細胞、あるいは腫瘍関連繊維芽細胞を用いて、GFP タグを付加した Nup98、Rael、Nup98 の染色体転座産物 Nup98-HOXA9 や Nup98-JARID1A (Nup98 遺伝子とホメオボックス遺伝子 HOX 群やトポイソメラーゼ、JARID1A などとの染色体転座が AML 患者においてよく観察される; 3, 5) の遺伝子安定発現細胞株を樹立する。これら樹立した細胞株は以降種々の実験に供する。

樹立した細胞株を溶解し、タグによってプルダウンしたのち質量分析法にかけることによりそれぞれの新規結合パートナーを解析する。その中でエピジェネティクス関連物質を探索する。その後、タンパク質同士の相互作用を確認し、お互いの結合部位ドメインも決定する。それらについて免疫沈降法や蛍光免疫染色法、さらには FRET 解析や蛍光タグを用いたライブセルイメージングによって

核膜孔複合体因子とその相互作用因子のより詳細な解析を行う。

さらには特異的な siRNA 配列を用いてノックダウンを行い、ヒストン修飾や DNA メチル化への影響をリアルタイム PCR や各種試験により解析し、Nup98-Rae1 がエピジェネティクスにどのように貢献しているかを検討する。またこれらの影響がどのように白血病幹細胞を誘導するのかについて考察する。さらにエピジェネティクス機構における阻害剤である DNA メチル化酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いて癌の悪性化に関する検討を行う。

2. 核膜孔複合体因子トランスジェニックマウスを用いたエピジェネティクスへの関与の検討

Nup98 に関連した染色体転座産物である Nup98-JARID1A 遺伝子、テトラサイクリンオペレーター配列、SV40 ポリアデニル化配列を含む DNA 断片を構築し、その後マウスに導入して Nup98-JARID1A トランスジェニックマウスを得る。なお、申請者のグループは白血病を発症する Nup98-HOXA9 トランスジェニックマウスをすでに所有している。これらのマウスは以降種々の実験に供する。

上記トランスジェニックマウス、および申請者のグループで作出した Rae1 トランスジェニックマウスを用いて、生体レベルでの核膜孔複合体因子のエピジェネティクスにおける役割を検討する。Nup98-HOXA9 マウスでは Rae1 が減少していることを見出しており (2)、このマウスに Rae1 遺伝子レスキュー実験を試み癌治療法への応用開発を検討し、また Rae1、Nup98-HOXA9 (もしくは-JARID1A)、Rae1+Nup98-HOXA9 (-JARID1A) マウス (Rae1 と Nup98-HOXA9 (-JARID1A) マウスを交配) に白血病を誘導してそれらの発症の差異を観察し、病理試験を行うことにより総合的な知見を得る。またエピジェネティクス機構における阻害剤である DNA メチル化酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、あるいは核膜孔複合体因子に対する RNAi 法を用いて、臨床応用への可能性を検討する。

3. 結果 研究成果

1. 核膜孔複合体因子のエピジェネティクスへの関与の検討

Nup98 の遺伝子転座産物 Nup98-JARID1A 及び Nup98-PHF23 遺伝子を発現する GFP タグを付加したプラスミドを構築し、リポフェクション法を用いてヒト白血病細胞 K562 に導入後、G418 選択培地によって選択し、安定発現細胞株を得た。樹立したクローンをウエスタンブロット法および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、Nup98-JARID1A 及び Nup98-PHF23 がタンパクレベルで、核内に発現しているのを確認できた (図 1)。Nup98-HOXA9 については作製済である (2)。今後はこれらの細胞を用いて核膜孔複合体因子のエピジェネティクスへの詳細な関与の検討を行う予定である。

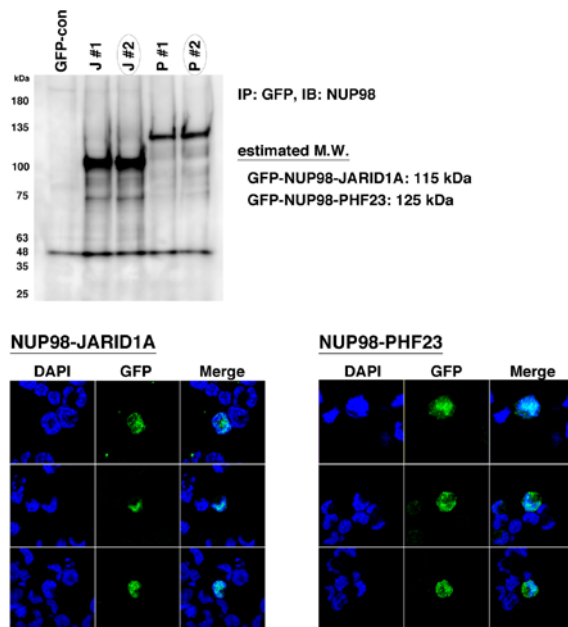


図 1 GFP-Nup98-JARID1A、-PHF23 安定発現ヒト白血病細胞 K562 細胞の樹立
上：GFP 抗体で免疫沈降後のウエスタンブロット、下：共焦点レーザー顕微鏡による観察

2. 核膜孔複合体因子トランスジェニックマウスを用いたエピジェネティクスへの関与の検討

Nup98-JARID1A の全長 cDNA を RT-PCR により増幅し、hCG 遺伝子の転写開始場所でヒトカテプシン G の遺伝子カセットに挿入した (図 2)。これを精製し、マウス (C57BL/6J×DBA/2J) の受精卵 (F2) にマイクロインジェクション法により導入した。現在遺伝子断片導入卵を偽妊娠マウスの子宮に移植後、生まれてきたマウスの尾からゲノム DNA を抽出し、トランスジェニックマウス特異的プライ

マーを用いて PCR を行い（図 2 の矢印はプライマー部位）、トランスジェニックマウス（F0）の作出を確認している。Nup98-JARID1A トランスジェニックマウスの作出を確認しだい、すでに作出済の Nup98-HOXA9 トランスジェニックマウスとあわせて、核膜孔複合体因子のエピジェネティクスへの関与の検討をマウスレベルで行う予定である。

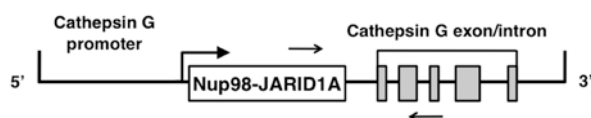


図 2 Nup98-JARID1A トランスジェニックマウスの作製
図中の灰色のボックスは hCG 遺伝子の 5 つのエクソンを示す

4. 考察 まとめ

本研究では、Nup98 の遺伝子転座産物を安定的に発現する白血病細胞を確立でき、またそれらに準じたトランスジェニックマウスも作出中である。今後はこれらを用いてより詳細な検討を行うことにより、核膜孔複合体因子とエピジェネティクスとの関連を解明していく予定である。

本研究は、近年その存在が確認されつつある癌幹細胞の自己複製能・多能性を規定するエピジェネティクスの制御機構を、核内外の物質輸送に関与している核膜孔複合体因子について検討することで、従来の癌研究とは異なる視点から癌の悪性化機構を解析する点に独創性がある。特に、癌幹細胞形成に深く関わるとされるエピジェネティックな制御機構について、現在までに研究されておらず、またその関与も知られていなかった細胞内の物質輸送に関与している核膜孔複合体因子について解明することは、最も独自の発想だといえる。さらに白血病を発症するマウスを用い、癌幹細胞形成における *in vivo* のエピジェネティックな制御機構を詳細に検討する点が先駆的といえる。

エピジェネティックな変化はジェネティックな変化と違い、薬剤によって人為的に改変できる可能性があり、臨床的にはより重要性が高い。本研究結果により核膜孔複合体によるエピジェネティクス制御という新規制御機構を明らかにすることで、新規治療法・医療の確立を推進できると思われる。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

1. Funasaka T, Tsuka E, Wong RW. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Sci Rep.* 2012; 2: 878. (This work was supported by the Astellas Foundation for Research on Metabolic Disorders)

参考文献

1. Nakano H, Funasaka T, Hashizume C, Wong RW. Nucleoporin translocated promoter region (Tpr) associates with dynein complex, preventing chromosome lagging formation during mitosis. *J Biol Chem.* 2010; 285: 10841-9.
2. Funasaka T, Nakano H, Wu Y, Hashizume C, Gu L, Nakamura T, Wang W, Zhou P, Moore MA, Sato H, Wong RW. RNA export factor RAE1 contributes to NUP98-HOXA9-mediated leukemogenesis. *Cell Cycle.* 2011; 10: 1456-67.
3. Iwasaki M, Kuwata T, Yamazaki Y, Jenkins NA, Copeland NG, Osato M, Ito Y, Kroon E, Sauvageau G, Nakamura T. Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood.* 2005; 105: 784-93.
4. Kasper LH, Brindle PK, Schnabel CA, Pritchard CE, Cleary ML, van Deursen JM. CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 764-76.
5. Gough SM, Slape CI, Aplan PD. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood.* 2011; 118: 6247-57.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に感謝申し上げます。