

# Nucleoporin translocated promoter region (Tpr) associates with Dynein complex, preventing chromosome lagging formation during mitosis

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/30256">http://hdl.handle.net/2297/30256</a>             |

## 【総説】

## 第9回 高安賞優秀賞受賞論文

論文 「Nucleoporin translocated promoter region (Tpr) associates with Dynein complex, preventing chromosome lagging formation during mitosis」  
 The Journal of Biological Chemistry  
 Vol. 285, No. 14, Page 10841-10849 2010年4月掲載  
 Hiroshi Nakano, Tatsuyoshi Funasaka, Chieko Hashizume,  
 and Richard W. Wong

ヌクレオポリン translocated promoter region (Tpr) はダイニン複合体と相互作用し、有糸分裂時の染色体ラギング形成を防いでいる

中野 博 (なかの ひろし)

## 背 景

核表面には、約30種類の異なる因子(ヌクレオポリン)によって構成されている核膜孔複合体が多数存在し、核質と細胞質間の物質(タンパク質, RNA)の通路として分子輸送に機能している(Nakano Hら<sup>1)</sup>). 近年、ヌクレオポリンは細胞質-核質間の分子輸送に関係しているだけでなく、有糸分裂時に重要な機能を果たしていることが明らかにされてきた。それは、ヌクレオポリンが有糸分裂時に起る変化に協調的に働き、正常な染色体分離に重要な役割を担っている(Wong RWら<sup>2)</sup>, Hashizume Cら<sup>3)</sup>). 例えば、ヌクレオポリンRae1が紡錘系の二極性の維持に重要な役割を担っていることが報告されている(Wong RWら<sup>2)</sup>). 本論文では、ヌクレオポリンTpr (Translocated Promoter Region)の有糸分裂時のMetaphase-Anaphase transitionにおける役割について検討を行い、TprとDynein, Mad1, Mad2の相互作用し形成されるTpr/Dynein/Mad1/Mad2の複合体の重要性について明らかにした。

Tprは分子量265kDa, コイルド-コイル構造を持ち拡張ロッド状をしており、細胞周期の間期においてホモダイマーを形成し、核膜孔複合体の核側に存在するヌクレオポリンである。

## 結 果

最初に、ヌクレオポリンTprと分子モーターDynein複合体との相互作用と、Tprと紡錘系形成チェックポイントのタンパク質Mad1/Mad2との相互作用を検討した。ヒト子宮頸癌有来のHeLa細胞株の有糸分裂期の細胞を回収し、Tpr抗体を用い免疫沈降実験を行った結果、TprとDynein, Dynactin, Dynein Light Chain (DLC), Mad1, Mad2との相互作用を確認した (figure 1A)。逆に、Dynein抗体を用い免疫沈降実験の結果、DyneinとTpr, DLC, Mad1, Mad2の相互作用を確認した (figure 1A)。さらに、Tpr, DLC, Mad1の相互作用部位を検討するために、Tpr-N (1-774aa), Tpr-M (775-1700aa), Tpr-C (1701-2351aa)の三つの領域 (figure 1B)をcell free reticulocyte translation systemを用いてタンパク質合成

を行った後、大腸菌で発現させ精製したGST-DLC, GST-Mad1と反応させGST-pulldownを行った。結果、Mad1とはTpr-N (1-774aa)と相互作用し、DyneinとはTpr-M (775-1700aa)と相互作用していることを明らかにした (figure 1C)。また、蛍光免疫染色により、Tprが紡錘体上に局在し、Dynein, p150 (Dynactin)と共局在していることを明らかにした (figure 2A)。これらの結果は、TprがMetaphase-Anaphase transitionにおいて紡錘体上でDynein複合体と共局在し、相互作用していることを示唆していた。

そこで、DyneinがTprの機能と局在に影響していることを確かめるために、Tpr全長の過剰発現 (figure 2B)とDyneinのノックダウン (figure 2C)を行った。Tprの過剰発現では、Dyneinは細胞質で強く染色され、紡錘体では弱く染色された。Dyneinのノックダウンでは、p150

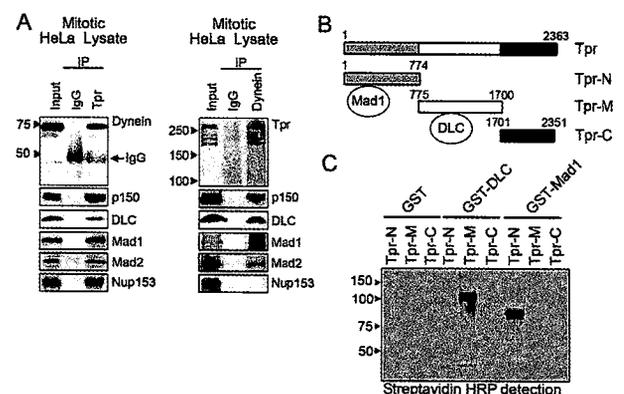


Figure 1. 有糸分裂時TprとDyneinは相互作用している。HeLa細胞株の有糸分裂中の抽出液を用い、Tpr抗体を用い免疫沈降 (IP)を行い、Dynein, p150, Dynein Light Chain (DLC), Mad1, Mad2, Nup150の免疫プロットを行った (左)。反対に、Dynein抗体を用いIPを行い、p150, Dynein Light Chain (DLC), Mad1, Mad2, Nup150の免疫プロットを行った (右)。Tprの全長とTpr-N (1-774aa), Tpr-M (775-1700aa), Tpr-C (1701-2351aa)の三つの領域の模式図 (B)。Tpr-N, Tpr-M, Tpr-CとGST, GST-DLC, GST-Mad1それぞれのGST-pulldown実験 (C)。GST-DLCに対してはTpr-Mが沈降してきた、またGST-Mad1に対してはTpr-Nが沈降してきた。

(Dynactin) の発現量は減少したが, Tpr, Mad1, Mad2 の発現量に影響はなかった. しかし, 紡錘体でのTprの局在は弱くなり細胞質での局在が増えた. 更に, Dyneinノックダウンにおいて, 染色体ラギングと多極紡錘体が増加した (figure 2D). これらのことからDyneinの減少がTprの紡錘体での局在を減衰させ, 染色体ラギングを増加させることが明らかとなった.

次に, Tprの減少がDyneinの発現と局在に及ぼす影響を調べるために, Tprのノックダウンを行い, Dynein, Dynactin, DLCと Mad1/Mad2の発現量, 局在の観察を行った. その結果, ウェスタンブロット解析ではMad1の発現量が減少していたが, Dynein, Dynactin, Mad2の発現量に変化はなかった (figure 3A). Mad1の発現の減少は蛍光免疫染色解析においても確認できた. 更に,

染色体ラギングが多数観察された (figure 3B). これらの結果から, Tpr発現量減少が, 紡錘体形成チェックポイントタンパク質の減少, 局在の変化を引き起こし, 染色体ラギングと多極化を起こすことが明らかになった.

最後に, HeLa細胞において表現型回復実験を行った (figure 3C). Tprノックダウンではコントロールに比べ4倍染色体ラギングが増加し, 3倍多極紡錘体形成が増加していた. TprノックダウンとTprの強過剰発現を同時に行ったとき, 多極紡錘体形成, 染色体ラギングがTprノックダウンだけに比べて減少した. これら表現型回復実験から, 正常なmetaphase-anaphase transitionにはTprとMad1とDyneinの発現量のバランスとそれぞれの相互作用が重要であることが明らかとなった.

### まとめ

近年盛んに細胞分裂周期の制御に関する研究がなされており, 正しく染色体が分離される分子機構が明らかにされている. その中で新たにヌクレオポリンの1つTprが染色体分離時にDyneinとMad1/Mad2と相互作用し, DyneinとMad1/Mad2の空間的安定性をコントロールするという重要な機能を明らかにした. つまり, Tpr/Dynein/Mad1/Mad2の複合体の安定性が正常な染色体分離に必要であり, Tpr/Dynein/Mad1/Mad2複合体の安定性が崩れると染色体ラギング (染色体分離異常) が起こることを明らかにした. この現象は, 腫瘍細胞の有糸分裂時においてしばしば観測され, 染色体分離異常は染色体の機能の欠失を起こす原因の一つと考えられている. 本研究であるTprの異常が起こす染色体分離異常と腫瘍の悪性化との関係を明らかにするために, 今後, *in vivo*と*in vitro*での詳細な解析が必要であると考えられる. また, 悪性腫瘍細胞においてヌクレオポリンが過剰発現していることから, ヌクレオポリンが腫瘍の悪性化, 浸潤の細胞内情報伝達に影響していることが考えられており (Funasaka Tら<sup>4)</sup>), 腫瘍の悪性化とヌクレオポリンとの関係を明らかにしたいと考えている.

### 文献

- 1) Nakano H, Wang W, Hashizume C, Funasaka T, Sato H and Wong R. Unexpected role of nucleoporins in coordination of cell cycle progression. *Cell Cycle* 10: 425-433. 2011
- 2) Wong RW, Blobel G, Coutavas E. Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 19783-19787. 2006
- 3) Hashizume C, Nakano H, Yoshida K, Wong RW. *Mol. Cancer* 24: 119-126. 2010
- 4) Funasaka T, Wong RW. The role of nuclear pore complex in tumor microenvironment and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 30 (2): 239-251. 2011

### Profile



2002年: 鳥取大学大学院医学系研究科生命科学専攻 修士課程修了  
2011年: 金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻博士課程修了 細胞機能統御学 フロンティアサイエンス機構 Richard W. Wong 特任准教授  
現在: 名城大学 薬学研究所 ポスドク研究員

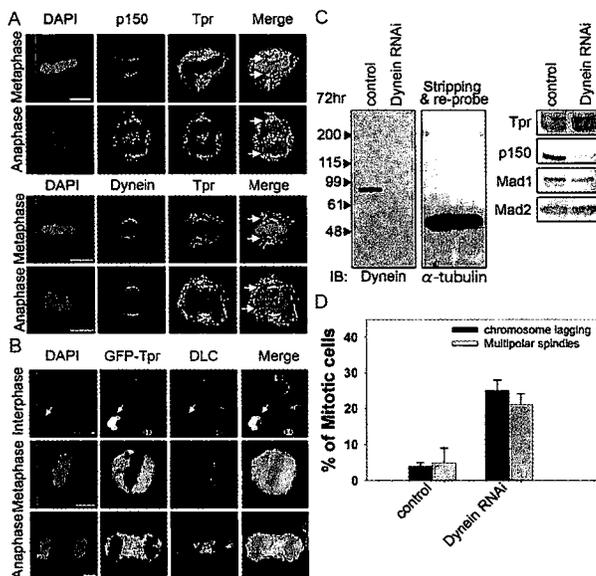


Figure 2. MetaphaseとAnaphaseの紡錘体上においてTprとp150, TprとDyneinは共局在していた (A). GFP-Tpr過剰発現細胞でDynein Light Chain (DLC)の紡錘体上の局在が弱くなり細胞質で強くなった (B). Dyneinノックダウンはp150 (Dynactin) の発現量を減少させ (C), 染色体ラギング, 多極紡錘体を引き起こした (D).

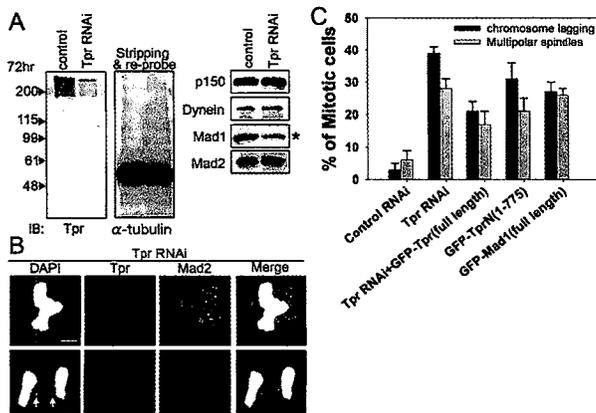


Figure 3. TprノックダウンはMad1の発現量を減少させ (A), 染色体ラギング, 多極紡錘体を引き起こした (B). Tprノックダウンによる表現型回復実験 (C).