

各報道機関文教担当記者 殿

世界最速の原子間力顕微鏡を用いて 大腸がん細胞核核膜孔の動きの撮影に 世界で初めて成功！

金沢大学新学術創成研究機構革新的統合バイオ研究コア セルバイオノミクスユニットおよび理工研究域バイオ AFM 先端研究センター分子・細胞部門のリチャード・ウォング教授らの研究グループは、理工研究域バイオ AFM 先端研究センターの安藤敏夫特任教授らが開発した世界最速の原子間力顕微鏡を用いて、大腸がん細胞の核の表面に存在する核膜孔の可視化、さらに抗がん剤として期待される薬剤による核膜孔の変化を世界で初めてビデオ撮影することに成功しました。

核膜孔は細胞の核を覆う膜にある穴で、細胞質と核の間の物質輸送における唯一の通り道です。脊椎動物の核膜孔は核膜孔複合体(NPC)と呼ばれる約120メガダルトン(MDa)の巨大タンパク質複合体であり、直径120ナノメートル(nm)の筒状チャンネル(※1)であると考えられていますが、これまで、この脊椎動物の小さな核膜孔が動いている様子を観察した事例はありませんでした。

今回、本研究グループは、特別な方法でヒト大腸がん細胞から核膜を生きたまま取り出し、本学が開発した分子の動きや構造を精密に撮影できる高速原子間力顕微鏡(High-Speed Atomic Force Microscopy: HS-AFM)で、核膜孔を観察しました。そして、臨床試験にも使用され、将来的な抗がん剤として期待されている薬剤 Alisertib (MLN8237)を作用させると、核膜孔が狭く深くなることを明らかにしました。MLN8237は細胞死やオートファジー(※2)を引き起こすことが知られています。この核膜孔の変化は細胞死における核膜孔の機能低下、そしてがん細胞が不可逆的な死に至るコードであると考えられます。これらの知見は将来、核を標的としたナンドラッグデリバリーシステム(※3)の開発に活用されることが期待されます。

本研究成果は、2017年5月22日にアメリカ化学会誌「ACS Nano」のオンライン版に掲載され、今後発行される同誌冊子体にも掲載される予定です。

【研究の背景】

がん死亡の主な理由の一つとして、積極的な転移を引き起こすがん細胞の高度な侵襲性が挙げられます。転移は、種々の増殖因子およびサイトカインと呼ばれる免疫システムの細胞から分泌されるタンパク質によって媒介され、多数のシグナル伝達経路を介して作用します。注目すべきことに、これらの転移シグナル伝達経路は全て、核の門番である核膜孔を構成する複合体（核膜孔複合体：NPC）を介して核に進入します。NPCは、ヌクレオポリンと呼ばれる約30種の異なるタンパク質の複数のコピーからなる生物学的な「ナノマシン」です。NPCを介する物質輸送では、小分子はNPCを自由に通過することができますが、40キロダルトン（kDa）より大きな分子は、約200のディスオーダーポリペプチド鎖を含むフェニルアラニン - グリシン - ヌクレオポリン（FG-Nups、※4）と相互作用する特殊輸送タンパク質に結合することで、核膜孔を効率的に通過できます。核-細胞間物質輸送にFG-Nupsが機械的にどのように関与しているかについては、これまで、いくつかのモデルが提唱されてきましたが、残念なことに、NPC内におけるFG-Nupsの挙動を視覚化して研究する技術が不足していました。さらに、NPCのナノスケールの構造およびダイナミクス（動き）の可視化については、技術的に実現不可能だと考えられていました。

【研究成果の概要】

本研究では、以下のとおりさまざまな顕微鏡で核膜孔の撮影を行いました。

1. NPCタンパク質に緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合させNPCが光るようにした核膜を、高感受性蛍光顕微鏡にて観察
2. 核膜をヒト大腸がん細胞から単離し、核膜の精製具合をネガティブ染色（※5）電子顕微鏡と、共焦点顕微鏡にて確認
3. 高解像度ライブセルイメージングと電子顕微鏡との組み合わせによる大腸がん細胞におけるネイティブ状態（※6）のNPC構造の空間的および時間的ナノスケール変化の観察
4. HS-AFMシステムによる特別な方法で精製した生きた状態の核膜の観察

このうち、HS-AFMを用いた観察の際に、これまで観察することができなかった、核膜孔を構成するNPCタンパク質のダイナミクス撮影に世界で初めて成功しました（図1）。特に、現在再発癌臨床試験で使用されているアポトーシス（※7）およびオートファジー誘導物質であるMLN8237を使用した際に、がん細胞の核膜孔がどのように変化するのかをHS-AFMで観察したところ、ヌクレオポリンの機能低下が起これ、FG-Nupsの核膜孔ゲートが変形、喪失し、がん細胞が死んでいくことを見いだしました（図2）。本研究グループは、このFG-Nups核膜孔ゲートの変形と喪失が、がん細胞が死に至るコードの一つであると結論付けました。

【今後の展開】

本研究により、核膜孔のナノスケールの構造およびダイナミクスの可視化に成功し、核膜孔ゲートの変形と喪失ががん細胞の死に至るコードの一つであることが明らかになりました。これらの知見により、がんに限らず、さまざまな疾患および老化などの生命現象の理解が深まることで、より巨視的な生理現象の異常を原子・分子レベルで制御するナノ治療技術への応用が期待されます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業、金沢大学新学術創成研究機構ユニット研究推進経費、金沢大学超然プロジェクト、金沢大学がん進展制御研究所共同研究費、上原記念生命科学財団、鈴木謙三記念医科学応用研究財団、旭硝子財団、興和生命科学振興財団、住友財団、持田記念医学薬学振興財団、金原一郎記念医学医療振興財団、武田科学振興財団の支援を受けて実施されました。

【掲載論文】

雑誌名：ACS Nano

論文名：High-speed atomic force microscopy reveals loss of nuclear pore resilience as a dying code in colorectal cancer cells

(高速原子間力顕微鏡法は、大腸がん細胞における死に至るコードとしての核膜孔の弾力性の喪失を明らかにする)

著者名：Mahmoud Shaaban Mohamed, Akiko Kobayashi, Azuma Taoka, Takahiro Watanabe-Nakayama, Yosuke Kikuchi, Masaharu Hazawa, Toshinari Minamoto, Yoshihiro Fukumori, Noriyuki Kodera, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Richard W. Wong

(Mahmoud Shaaban Mohamed, 小林亜紀子, 田岡東, 中山隆宏, 菊池洋輔, 羽澤勝治, 源利成, 福森義宏, 古寺哲幸, 内橋貴之, 安藤敏夫, Richard W. Wong)

URL：<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsnano.7b00906>

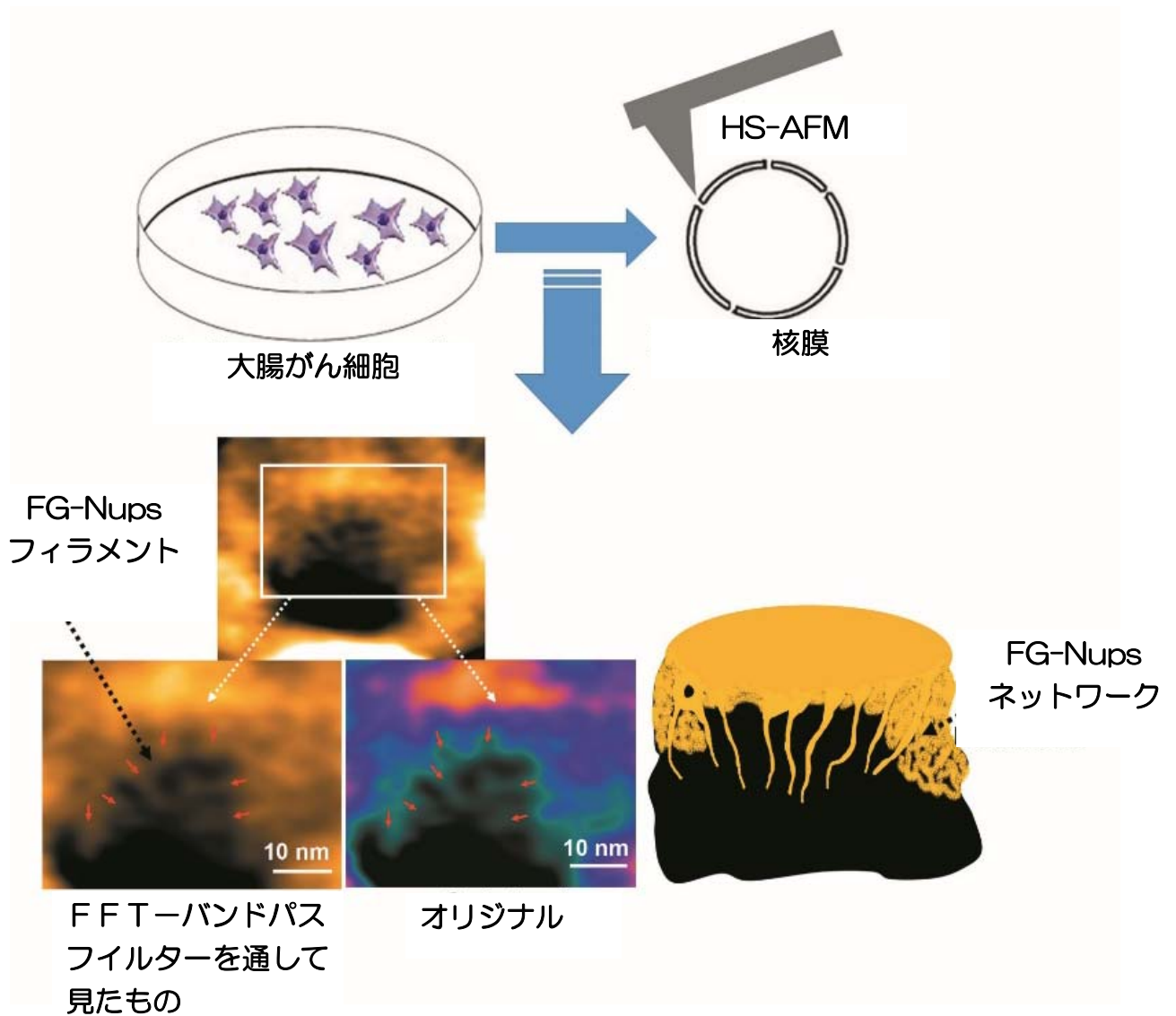


図1 大腸がん細胞から核膜を生きのまま取り出し、HS-AFMにて観察する

核膜孔を HS-AFM によって観察することで、糸状になったタンパク質の複合体である FG-Nups フィラメントの動きを撮影することに成功した。図は、FG-Nups フィラメントを高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform : FFT) - バンドパスフィルター (特定の波長の光だけを効率よく透過するフィルター) を通して見たものとそのまま見たもの (オリジナル)。

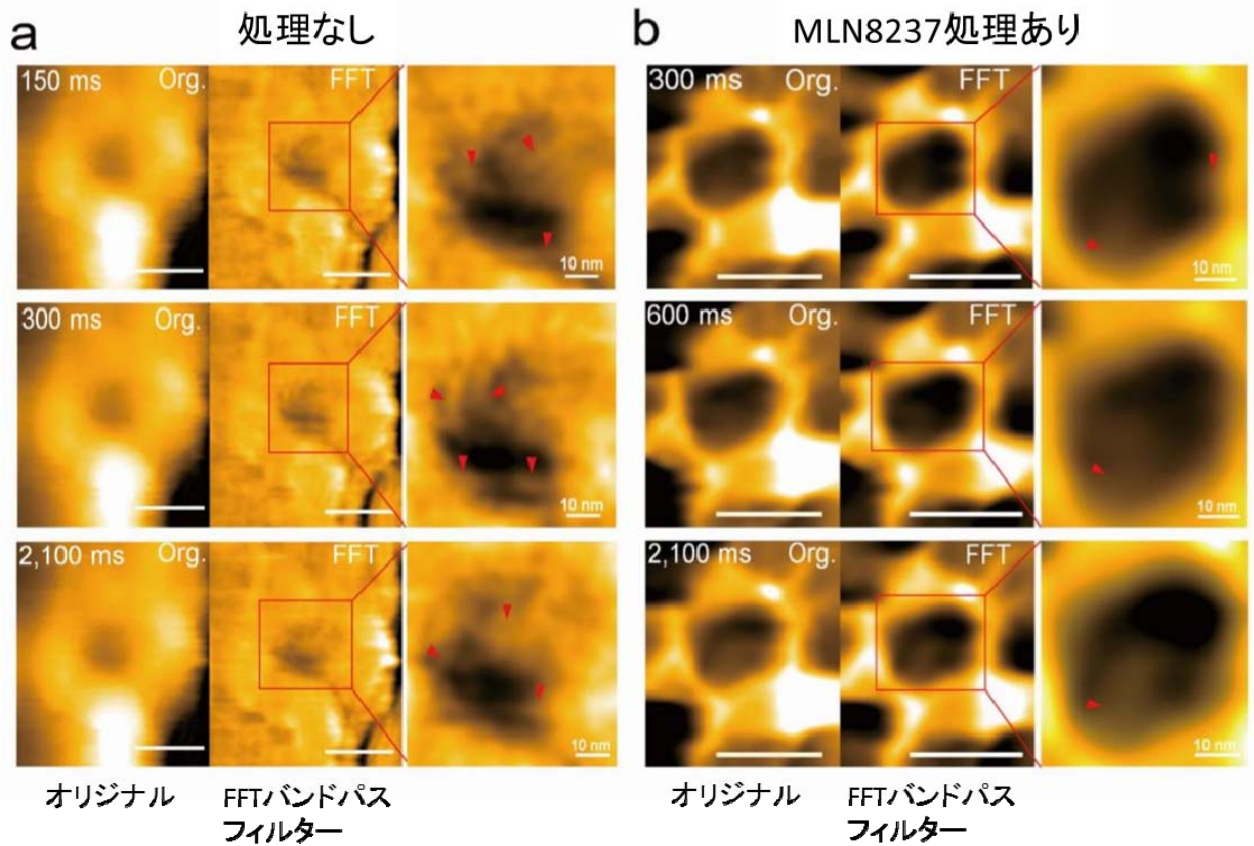


図2 MLN8237 処理した細胞の核膜孔のナノスケールの変化

MLN8237 処理を行うことで、FG-Nups の核膜孔ゲートが変形、喪失する。また、核膜孔の穴の内側の大きさが 86 ± 13 nm から 53 ± 9 nm に、深さが 4 ± 2 nm から 7 ± 1 nm に、すなわち核膜孔が狭く深くなることが明らかになった。

【用語解説】

※1 筒状チャネル

筒状の経路のこと。

※2 オートファジー

細胞が持つ細胞内のタンパク質を分解する仕組みの一つ。

※3 ナノドラッグデリバリーシステム

目標とする患部に薬物を効果的かつ集中的に送り込む投与システム。

※4 フェニルアラニン - グリシン - ヌクレオポリン

アミノ酸の一種であるフェニルアラニンとグリシンの繰り返し配列を持つ核膜孔複合体構成タンパク質（ヌクレオポリン：Nups）。

※5 ネガティブ染色

ウイルス粒子の形、大きさ、表面の様子を観察するときに用いられる染色方法。

※6 ネイティブ状態

細胞環境における一般的なタンパク質構造。

※7 アポトーシス

多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために引き起こされるプログラムされた細胞死。

【本件に関するお問い合わせ先】

■ 研究内容に関すること

金沢大学

新学術創成研究機構 革新的統合バイオ研究コア セルバイオノミクスユニット
/ 理工研究域バイオ AFM 先端研究センター 分子・細胞部門 教授

リチャード・ウォング (Richard Wong)

TEL : 076-264-6250 (直通:簡単な日本語による対応可)

076-264-6253 (助教 羽澤 勝治, 秘書 小林 亜紀子 日本語対応可)

E-mail : rwong@staff.kanazawa-u.ac.jp

■ HS-AFM に関すること

金沢大学理工研究域バイオ AFM 先端研究センター 特任教授

安藤 敏夫 (あんどう としお)

TEL : 076-264-5663 (直通)

E-mail : tando@staff.kanazawa-u.ac.jp

【広報担当】

金沢大学総務部広報室広報係

井村 彩沙 (いむら あやさ)

TEL : 076-264-5024

E-mail : koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学研究推進部研究推進課機構支援係

高田 将史 (たかた まさふみ)

TEL : 076-264-6186

E-mail : rinfi@adm.kanazawa-u.ac.jp