

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25116009

研究課題名(和文)核内構造体とのインタープレイによるクロマチン動構造の制御

研究課題名(英文)Regulation of chromatin structure and dynamics by interplay between nuclear sub-structures and chromatin

研究代表者

斉藤 典子(Saitoh, Noriko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・部長

研究者番号：40398235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 95,000,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチンは細胞核内で、様々な構造体に囲まれて存在する。核内構造体はRNA-タンパク質複合体で、核内事象に関わる因子群を含む。本研究では、構造体がクロマチン制御にどのように機能するかを明らかにすることを目的として、構造体とクロマチンをつなげる因子群の解析を行った。その結果、乳がんに関わる核内ノンコーディングRNAを同定し、これが新規の核内構造体を形成して転写制御にかかわることなどを見いだした。また、核小体の構造と機能に寄与する因子を複数同定し、これらや核内アクチン関連タンパク質の解析を行った。クロマチン動構造の制御に、核内構造体とのインタープレイが重要な役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the nucleus, chromatin is surrounded by several kinds of sub-structures. The nuclear sub-structures are supramolecular complexes composed of RNA and proteins. Factors involved in nuclear events are locally concentrated in the sub-structures. The goal of this study was to elucidate the mechanisms of how chromatin is regulated in the context of the three-dimensional nuclear space. We analyzed factors linking chromatin and sub-structures. As a result, we found novel nuclear non-coding RNAs that are involved in acquisition of endocrine therapy-resistance of breast cancer cells. The ncRNAs form RNA cloud, and they are involved in gene expression regulation essential for breast cancer cells. We also identified and analyzed proteins involved in structure and function of the nucleolus. We found that interplay between nuclear sub-structures and chromatin is important for regulation of chromatin structure and dynamics.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：クロマチン動構造 核内構造 核骨格 画像解析 非コードRNA

### 1. 研究開始当初の背景

細胞核内は高度に組織化されており、クロマチンの周辺には、種々の超分子複合体である核内構造体が存在する。核内構造体は、遺伝子の転写、複製、修復などに共通に関わる因子群を蓄積し、近傍遺伝子の機能を制御し、クロマチンの微小環境として働いている。核内構造体は、臨床で確定診断の指標として用いられるように、疾患や発生・分化の過程で顕著に変動し、また、その構成因子は神経変性疾患や早老症などの一連の疾患に関わる。しかしその背景にある分子機序はほとんど不明である。

研究代表者の齊藤は、核内構造体の核スペックルやPMLボディーのダイナミクス、構造、遺伝子発現調節や細胞機能における意義について研究解明を行っていた (Saitoh et al, Mol cell Biol 2012, Exp cell Biol 2006, Mol Biol Cell 2004, Aoto et al. J. Biol Chem 2008, Dev Biol 2006 など)。研究分担者の原田は、核内アクチンファミリー (アクチンおよびアクチン関連タンパク質; Arp) が、様々な核内構造体の形成や機能に関与すると共に、クロマチンリモデリング複合体やヒストン修飾複合体中で DNA・ヒストン結合因子として機能していることを見出していた (Oma and Harata, Nucleus 2011 など)。

これらの研究結果より、クロマチンと核内構造体とがお互いに情報を交換していること、この情報交換を介在する因子がクロマチン動態と機能の制御に重要で、細胞機能や個体発生や疾患にも密接に関連しているものと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、核内構造体とクロマチンをつなぐ因子に着目し、研究当初便宜的に I/F 因子あるいは核内構造体関連因子と名付けた (図1)。そして、I/F 因子がクロマチン制御において果たす役割や分子メカニズムの解析を行うことを目的とした。核内構造体を軸とする高次元でのクロマチン制御を理解するとともに、がんなどでみられる核の異型や、発生・分化過程におけるダイナミックな核構造の変性の機序を明らかにすること、さらに核内構造に関連する疾患を標的とした創薬の基盤づくりへと展開することを目的とした (図1)。具体的には下記の研究目的項目を設置した。

(1) クロマチン動構造に関する核内構造体関連因子を同定し、それらが疾患における核構造変化に寄与する可能性を検証し、疾患における役割を明らかにする。

(2) 画像解析技術と画像ハイコンテントスクリーニング技術を用いて、核内構造体の構造と機能に関する因子を同定し、その作動機序を明らかにする。

(3) 核内構造体関連因子を機能阻害する化合物やペプチドを作製して、創薬への応用展開の基礎とする。

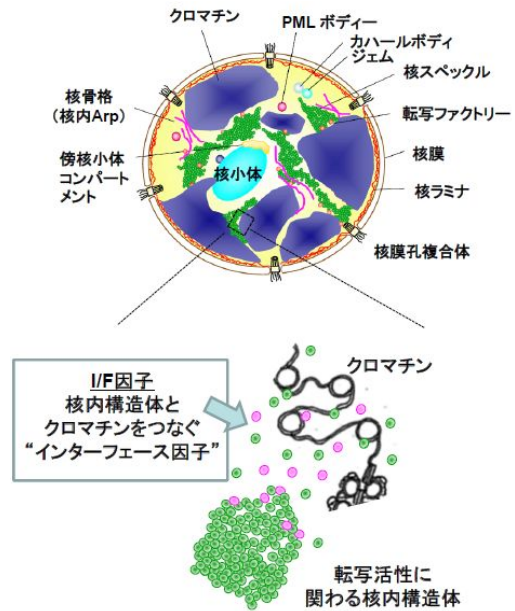


図1: クロマチンは核内で種々の構造体群に囲まれており (上)、両者はインターフェース (I/F) 因子の介在により機能的に相互作用すると考えられた (下)。

### 3. 研究の方法

クロマチンと核内構造体との機能的相互作用を担う因子について、下記のように本研究課題をすすめた。

(1) 疾患における核内構造体関連因子の役割解析と阻害剤の検索と作成: 乳がんの治療抵抗性に関わる核内ノンコーディング RNA を同定し、RNA FISH やトランスクリプトーム解析を行った。さらに、小分子化合物やペプチド化合物の検索とがん細胞の増殖などへの阻害効果の評価を行った。

(2) ハイコンテント画像解析による新規核内構造体因子の検索: siRNA スクリーニングを用いることにより、発現量が減弱することで核内構造体とクロマチン構造に異常を誘起する因子群について、その網羅的な検索・同定を行う。核形態変化の評価には、研究代表者らが確立してきたハイコンテント画像解析法と機械学習パターン認識法を用いる。

(3) 核内構造体関連因子の分子機能の解析: 核小体形成に関連する因子について、クロマチン機能における役割を調べる。ノックダウン・ノックアウト・変異細胞におけるクロマチンの構造・空間配置・遺伝子発現の変化を解析する。核内構造体関連因子の作動原理を解明する。

### 4. 研究成果

(1) 乳がんに関わる核内ノンコーディング RNA の同定と解析: 内分泌療法抵抗性乳がんを再現する細胞モデル (LTED: long-term estrogen

deprivation) において、がん細胞の増殖に必要な転写を活性化し、新規核内非コード RNA、エレノアを同定した(図2)。エレノアは安定にクロマチンに相互作用し、LTED 細胞および、疾患組織の核内で RNA クラウドと呼ばれる新規の核内構造体を形成することを見いだした。クロマチン内のゲノム DNA 上で転写が起きることで、局所的に非コード RNA が蓄積し、それが、核内構造体の形成の種となる可能性を提唱した(図2)(Tomita et al, Nature Commun, 2015, Tomita et al, WIREs RNA, 2016)。

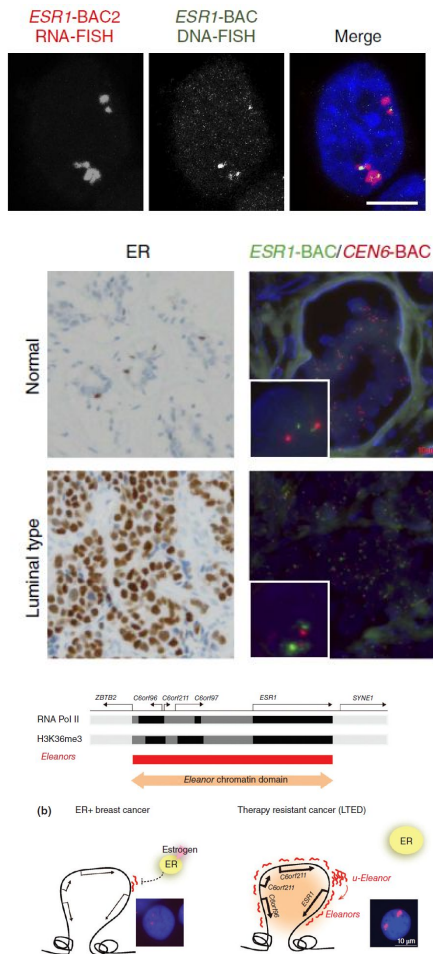


図2: LTED 細胞内(上)と乳がん患者由来組織(中)のエレノアノンコーディング RNA の FISH 画像。(Tomita et al, Nature Commun 2015 より引用)。エレノアがクロマチンの転写を活性化するモデル(下)(Tomita et al, WIREs RNA, 2017 より引用)。

(2) 機械学習を用いた画像解析ウィンチャーム法の確立:

核小体やクロマチンの画像データベースを構築し、これを、機械学習パターン認識法であるウィンチャーム(wndchrm)解析に適用した。ウィンチャームは、最大 4024 の形態特徴解析アルゴリズムを搭載したプログラムで、マシンビジョンとトレーニングのステップを経て、ユーザーが定義したクラス内に共通しかつクラス間を分類するのに最適な形態特徴関数

を自動計算、抽出し、高い精度で異なるクラスを分類する。ウィンチャーム解析の結果、核小体やクロマチンの形態変化の定量的評価を可能にした(Tokunaga et al, Sci Rep, 2014, Kitamura et al, BBRC, 2015, Matsumoto et al, Nucleus, 2016, Ono et al, Mol Biol Cell, 2017, Takagi et al, 2018)。

(3) エレノアの阻害化合物の検索:

エレノアクラウドの形成、あるいは、*ESR1* (エストロゲン受容体をコードする遺伝子) の mRNA 転写を阻害する因子を検索した。その結果、エストロゲンの構造類似体で、ポリフェノール的一种であるレスベラトロールが効果を持つことを明らかにした。さらにレスベラトロールは、LTED 細胞の増殖を阻害することから、この小分子化合物が、内分泌療法抵抗性乳がんの治療候補となりうることを提唱した (Tomita et al, Nature Commun, 2015)。ただし、効果のために高濃度のレスベラトロールが必要なことから、さらなる検証が必要である。

(4) 核小体の構造と形成に関する因子の同定と解析:

核内最大の構造体である核小体の形成に関わる因子を同定するために、画像解析と siRNA ライブラリーを用いたハイコンテンツスクリーニングを行い、15 の候補因子を同定した。機械学習を用いた画像解析により、これらの因子の減弱が引き起こす核小体の形態について定量的分類を行い、3 種類に分類した。各クラスに属する因子群は共通した機能を持つ可能性を見出した。

(5) 核内アクチンファミリータンパク質の機能解析:

ARP6 は、クロマチンリモデリング複合体 SRCAP の構成因子であり、その一部が核小体に存在することを示した。さらに、ARP6 をノックダウンすると核小体の形態が変化し、これをウィンチャーム画像解析法で定量化した。核小体は、リボソーム RNA (rRNA) の転写の場であり、核小体の形成は rRNA 転写に依存する。また、核小体は環境ストレスへの細胞応答に関わることが知られていた。そこで、ARP6 のノックダウン細胞を解析したところ、ARP6 は、通常状態の細胞におけるリボソーム RNA の転写活性に必要であること、また、グルコース枯渇下での rRNA の転写抑制に必要で、これは今まで知られていた SRCAP 構成因子としての ARP6 の機能と一線を画す新しいものであることを示した (Kitamura et al, BBRC, 2015)。

(6) 核内アクチンファミリータンパク質の阻害剤の作成:

アクチンファミリータンパク質に特異的に結合阻害する、二重環状ペプチドをファージ

ディスプレイ法を用いて単離し、機能解析実験系の確立と詳細解析を行った。

#### 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 42件)

1. Takagi, M., Ono, Y., Natsume, T., Sakamoto, C., Nakao, M., Saitoh, N., Kanemaki, M.T., Hirano, T. and Imamoto, N. \* Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms. *J. Cell Sci*, 131(6), 2018. doi: 10.1242/jcs.212092.
2. Dobrucki J and Saitoh N. The 4D Nucleome in Kraków-prospects for an emerging field. *Nucleus*, 8:447-448, 2017. doi: 10.1080/19491034.2017.1347243
3. Ono, T., Sakamoto, C., Nakao, N., Saitoh, N. and Hirano, T.\* Condensin II plays an essential role in reversible assembly of mitotic chromosomes in situ. *Mol. Biol. Cell*, 28:2875-2886, 2017. doi: 10.1091/mbc.E17-04-0252.
4. Wang, X., Liang, S., Sun, Y., Li, H., Endo, F., Nakao, M., Saitoh, N. \* and Lijie Wu. \* Analysis of estrogen receptor beta gene methylation in autistic males in a Chinese Han population. *Metab Brain Dis* 32, 1033-1042, 2017. doi: 10.1007/s11011-017-9990-7
5. Tanaka H, Takebayashi SI, Sakamoto A, Igata T, Nakatsu Y, Saitoh N., Hino S and Nakao, M. \* The SETD8/PR-Set7 Methyltransferase Functions as a Barrier to Prevent Senescence-Associated Metabolic Remodeling. *Cell Rep*, 18:2148-2161, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.021.
6. Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Yamamoto, T., Iwase, H., Nakao, M. \* and Saitoh, N.\* Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. *Wiley Interdisciplinary Review RNA*, 2016. doi: 10.1002/wrna.1384.
7. Nakayama, T., Saitoh, N., Morotomi-Yano, K., Yano, K.I., Nakao, M, Saitoh, H. \* Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like cell death in cultured human leukemia cells. *Cell Biol Int*, 40(5):597-602, 2016. doi: 10.1002/cbin.10594.
8. Matsumoto, A., Sakamoto, C., Matsumori, H., Katahira, J., Yasuda, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., Goldberg, I. G., Matsuura, N., Nakao, M., Saitoh, N.\*, Hieda, M.\* Loss of the integral nuclear

envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli, *Nucleus*, 7: 68-83, 2016. doi: 10.1080/19491034.2016.1149664.

9. Kitamura, H., Matsumori, H., Kalendova, A., Hozak, P., Goldberg, I.G., Nakao, M., Saitoh, N., and Harata, M. \* The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464(2):554-560, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.005.
10. Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Matsumori, H., Maehara, K., Ohkawa, Y., Iwase, H., Saitoh, N.\* and Nakao, M.\* A cluster of noncoding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation. *Nat. Commun* 6: Article No. 6966, 2015. doi: 10.1038/ncomms7966.
11. Tokunaga, K., Saitoh, N.\*, Goldberg, I. G., Sakamoto, C., Yasuda, Y., Yoshida, Y., Yamanaka, S. and Nakao, M.\* Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.*, 4:6996, 2014. doi: 10.1038/srep06996.
12. Sasai, N., Saitoh, N., Saitoh, H. and M. Nakao.\* The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. *PLoS ONE* 8 (7): e68478, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0068478

[学会発表](計 202件)

1. Saitoh, N. A cluster of nuclear long non-coding RNAs defines an active chromatin domain in recurrent breast cancer cells. (Wellcome Trust Centre for Cell Biology, Institute of Cell Biology Seminar, September 7, 2017. University of Edinburgh, Waddington Building, Edinburgh, UK) (招待講演)
2. Yamamoto, T., Abdalla, M.O., Fujiwara, S., Tomita, S., Nakao, M., and Saitoh, N. Non-coding RNAs involved in active chromatin domain in breast cancer. (HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, September 5, 2017. Helmholtz Zentrum München, Großhadern, Germany)
3. Saitoh, N. Eleanor non-coding RNA defines the active ESR1 chromatin domain in breast cancer recurrence. (43rd Naito Conference on "Noncoding RNA: Biology, Disease, & Chemistry") June 29, 2017, CHÂTERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO, Hokkaido, Japan (招待講演)
4. Yamamoto, T., Abdalla, MO., Nakao, M., and Saitoh, N. Active topologically associating domain is formed with non-coding RNA Eleanors in the breast cancer nucleus (Second international



meeting on SMC proteins: Chromosomal organizers from bacteria to human, June 15, 2017. Nanyo city cultural hall, Nanyo, Yamagata)

5. Yamamoto, T., Abdalla, M.O., Fujiwara, S., Tomita, S., Nakao, M., and Saitoh, N. A cluster of non-coding RNAs, Eleanor determine the active chromatin domain in breast cancer. (4D Nucleome: The Cell Nucleus in Space and Time, May 15, 2017, Jagiellonian University, Auditorium Maximum Conference Center, Kraków, Poland) (招待講演、オーガナイザー)
6. 齊藤典子、山本達郎、モハメドオサマアブダラ、藤原沙織、富田さおり、前原一満、大川恭行、立和名博昭、中尾光善. 活性染色体ドメインに関する核内長鎖ノンコーディング RNA. (生命科学系学会合同年次大会ワークショップ 2PW16「クロマチンとノンコーディング RNA が織りなすヌクレオーム制御」(オーガナイザー) 2017年12月7日兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
7. 齊藤典子. 核小体の構造維持と物性に関わる 60S リボソームタンパク質 (日本大学文理学部生命科学科セミナー 細胞核機能の発現と制御 2017年6月25日 東京都世田谷区 日本大学文理学部図書館3階オーバルホール)(招待講演)
8. 齊藤典子、山本達郎、モハメドオサマアブダラ、藤原沙織、富田さおり、前原一満、大川恭行、中尾光善. 乳がん細胞でノンコーディング RNA 群により規定される活性染色体ドメイン (第11回日本エピジェネティクス研究会年会 エピゲノムはどこまで操れるようになったか 2017年5月23日 東京都千代田区 学術総合センター一橋講堂)(招待講演)

〔図書〕(計 8 件)

1. 山本達郎、中尾光善、齊藤典子. クロマチンから核構造へ、東京化学同人 「基礎分子生物学 II : 遺伝子発現制御機構」田村隆明・浦聖恵編 編 p231-242, 2017.
2. 齊藤典子、坂本智代美、松森はるか、中尾光善、Ilya G. Goldberg. 機械学習による細胞形態の分類と推定、羊土社 「バイオ画像解析 手とり足とりガイド」 小林徹也・青木一洋 編 p195-p207, 2014.
3. 齊藤典子、徳永和明、松森はるか、中尾光善. 核内ボディーの構造・機能・形成機序、化学同人バイオサイエンスシリーズ 11、染色体と細胞核のダイナミクス-DNA を操る細胞の仕組み- 第 10 章 平岡泰・原口徳子 編 p147-p165, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 2 件)

名称：細胞核を構成する構造体の解析方法  
発明者：中尾光善、齊藤典子、徳永和明、村瀬八重子、小林民代、天川玄太  
権利者：国立大学法人熊本大学、オリンパス株式会社  
種類：特許  
番号：特許第 5482057 号  
取得年月日：2014/02/28  
国内外の別：国内

名称：誘導多能性幹細胞の識別方法  
発明者：中尾光善、徳永和明、齊藤典子、小林民代  
権利者：国立大学法人熊本大学、オリンパス株式会社  
種類：特許  
番号：特許第 5800312 号  
取得年月日：2015/09/04  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ：  
公益財団法人がん研究会がん研究所  
[http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/cancer\\_biology/index.html](http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/cancer_biology/index.html)  
熊本大学発生医学研究所  
<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/>  
東北大学大学院農学研究科・農学部 分子生物学分野  
<http://www.harata-lab.org/http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/>

報道情報：  
熊本日日新聞；2014年11月12日、熊本日日新聞；2015年4月30日、毎日新聞；2015年5月1日、日刊工業新聞；2015年5月5日、産経新聞；2015年5月8日、KAB ニュース；2015年4月29日、NHK ニュース；2015年4月30日、RKK ニュース；2015年4月30日、日経電子版；2015年5月1日ほか

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
齊藤 典子 (SAITOH, Noriko)  
公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・部長  
研究者番号：40398235

(2) 研究分担者  
原田 昌彦 (HARATA, Masahiko)  
東北大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：70218642

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者