

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03257

研究課題名（和文）核小体ダイナミクスによる細胞分裂の新規制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of a novel regulatory system of mitosis through nucleolar dynamics

研究代表者

木村 圭志 (Kimura, Keiji)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：50332268

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,200,000円

研究成果の概要（和文）：「核小体タンパク質のM期での機能の解明」に関して、NOL11がWDR43、Cirhinと、NWC複合体を形成し、NWC複合体がAurora Bのセントロメアへの局在を促進することにより、セントロメア機能を制御することを見出した。また、128種類のrRNAプロセシング因子をノックダウン（KD）し、複数の因子のKDがM期に影響を及ぼすことを見出した。「核小体RNAのM期での役割」に関して、RNA除去がコンデンシンIなどのM期染色体骨格タンパク質の局在にも影響を与えることを見出した。さらに、染色体に局在するRNAとコンデンシンIの液-液相分離が、コンデンシンIの染色体局在に寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核小体は、多種類のRNAとタンパク質から構成される核内の最大の構造体で、古典的なリボソーム生合成の場としての役割以外に多岐な細胞機能に関与することが提唱されている。本研究では、核小体に存在する新規のタンパク質複合体が分裂期染色体の表面に局在し、細胞分裂の鍵分子であるAurora Bのセントロメアへの濃縮を介して、正確な分裂期染色体の分配を保證することを明らかにした。これらの過程に破綻が生じると、がんの悪性化で観察される染色体不安定性の増大を引き起す。従って本研究は、核小体と細胞分裂とのリンクの分子レベルでの理解につながるとともに、がんの進展のメカニズムに関する手掛かりにもなり得る。

研究成果の概要（英文）：Regarding “Elucidation of the functions of nucleolar proteins during mitosis”, we found that nucleolar protein NOL11 formed an NWC complex with WDR43 and Cirhin, and the NWC complex promoted the localization of Aurora B to the centromeres of mitotic chromosomes, thereby controlling the centromeric functions. We knocked down (KD) 128 kinds of rRNA processing factors in 13 classes, and found that the KD of multiple factors affected progression of mitosis. Regarding “Elucidation of the role of nucleolar RNA in the M phase”, we found that RNA depletion affected the localization of some of the chromosomal scaffold proteins on the mitotic chromosomes. Among them, the localization of condensin I was most affected; therefore, we analyzed the molecular mechanism. We found that liquid-liquid phase separation of chromosome-associated RNA and condensin I contributed to the chromosomal localization of condensin I.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核小体 染色体 細胞分裂期 RNA 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核小体は、核内に存在する最大の膜を持たない構造体(核内ボディ)である。核小体は、多種類の RNA (核小体 RNA と総称する)とタンパク質(核小体構成分子)から構成される。核小体は、リボソーム生合成の場として古くから知られている。一方で、核小体タンパク質の機能は多岐にわたり、核小体が多岐の細胞機能に寄与することが提唱されている。特に、核小体とストレス応答、細胞周期制御、がん等の疾患、寿命制御との関連が注目を集めてきている。

核小体を構成する分子は流動的な性質を持ち、核小体構造は細胞ストレスや細胞周期でダイナミック変化する。高等真核生物では、細胞分裂期(M期)に核小体は崩壊して、核小体構成分子の大部分が細胞内に拡散し、一部がM期染色体の周辺領域(PR: Perichromosomal Region)に濃縮される。最近、細胞増殖マーカーとして知られる核小体タンパク質 Ki67 が染色体の PR に局在し、染色体の個別化や構造の維持に寄与することが報告された。しかし、このM期における核小体のダイナミックな挙動の分子機構や、M期進行、及びM期染色体の構造や動態に対する影響に関して、多くは知られていなかった。

2. 研究の目的

先行研究において研究代表者は、細胞が癌化ストレス等の種々のストレスを受けた際に、間期細胞の核小体内のRNA量が変化し、それに伴ってその構造を変化することを見出した。さらに、核小体の構造変化に伴って局在を変化させた特定の核小体構成分子(タンパク質とRNA)が、細胞死・細胞老化・細胞分化・オートファジーの誘導に関わることを突きとめた。これらの研究結果から代表者は、間期細胞において種々のストレスにより喚起された核小体の構造変化とその構成分子の局在変化(=核小体ダイナミクス)が多様な生命現象に関与するとのアイデアを得た。

高等真核生物では、M期の前後でドラスティックな核小体のリモデリング(核小体崩壊と再構築)がおこり、M期には大部分の核小体構成分子が細胞質やM期染色体のPRに移行する。この現象は以前から観察されてきているが、その細胞生物学的意義に関しては、未だ知見が乏しい。M期はDNA合成期(S期)に複製された染色体DNAを娘細胞に均等に分配する時期で、M期の正常な進行は遺伝情報を次世代へ継承するために必須である。M期では約1時間の短い時間で、染色体DNAは凝縮、整列、分離というオーガナイズされた構造変換を受ける。本研究では、核内構造体である核小体のダイナミクスがこの過程をいかに制御するか、その新規メカニズムを解明することを目的とする。

同目的の解明のため、核小体が生理的な条件下で崩壊するM期で、M期進行に関与する核小体構成分子を特定し、これらがM期細胞のどの部位に局在し、どのようなメカニズムでM期の諸過程を制御するかを解明する。さらに、間期細胞において人為的に核小体の構造を変化させて、核小体の構造変化とM期との関連を解明し、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

計画1) 核小体タンパク質のM期での機能の解明

M期に機能する核小体タンパク質を同定し、M期の進行やM期染色体の構造・動態への影響と、その分子メカニズムを明らかにする。

1. M期に関与する核小体タンパク質の同定

代表者らは、M期進行に関与する候補として、59種類の核小体タンパク質を得た。オフターゲット効果の影響を排除するために、さらにもう一種類のsiRNAを作製する。二種類のsiRNAでKDした際に同様にM期への影響が生じる因子を、FACS解析で同定する。

さらに候補因子をsiRNAでノックダウン(KD)して、細胞周期への影響をFACS解析で、M期染色体構造への影響をDAPI染色、蛍光抗体法により観察する。また、M期染色体動態への影響をタイムラプス観察により解析する。

2. 同定したタンパク質へのAID-tagとEGFP-tagの導入と機能解析

候補タンパク質のM期での機能を解析するために、鐘巻将人博士(遺伝研・教授)が開発したオーキシニドロン(AID)法を行う。この方法の利点は、内在性のタンパク質にAID-tagを導入し、オーキシニドロンを加えることにより目的のタンパク質を瞬時に分解することが容易である点である。CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、候補タンパク質の遺伝子のN末端あるいはC末端にAID-tagとEGFPをタンデムに導入する。EGFPはタンパク質の局在の解析、及びGFP抗体によるアフィニティー精製(GFPトラップ法)での相互作用分子の探索を行うために導入する。

3. rRNA プロセシングタンパク質のM期での機能の解明

いくつかのrRNAプロセシング因子のKDがM期の進行やM期染色体構造に影響を与えるという報告がある。現在286種類のrRNAプロセシング因子が報告されており、KDによるrRNAのプロセシングへの影響から13のクラスに分類されている(Tafforeau et al., Mol. Cell 2013, 51: 539-551)。本研究では、rRNAのプロセシングのクラスとM期の表現型の関連を解析するた

め、13 クラスを網羅する 128 種類の rRNA プロセシング因子に対する siRNA を作製し、HeLa 細胞を用いて KD 実験を行い、M 期の進行、M 期染色体の形態や動態への影響を解析する。

計画 2) 核小体 RNA の M 期での役割

M 期染色体の表面に局在する RNA の大部分は核小体由来である。本研究では、M 期染色体に局在する RNA が M 期染色体の形態や結合タンパク質の局在の制御にいかに関与するかを解析する。さらに、M 期に機能する核小体 RNA の種類を特定し、その役割を調べる。

1 . RNA による M 期染色体の形態や染色体結合タンパク質の局在の制御

M 期染色体をカバーガラス上に展開し、RNaseA 処理により RNA を除去した際の M 期染色体の形態の変化を共焦点顕微鏡、超解像度顕微鏡により解析する。また、機械学習により形態の変化を数値化する。M 期染色体に結合しているタンパク質の局在変化に関して蛍光抗体法により詳細に解析する。

2 . M 期制御に関与する核小体 RNA の同定、及び機能解析

M 期染色体の形態、染色体結合タンパク質の局在制御に関与する RNA を同定し、その機能を解析する。M 期に機能する核小体タンパク質と相互作用する核小体 RNA、2 - 1 . で局在変化したタンパク質と相互作用する RNA を RNA 免疫沈降 (RIP) により同定する。それらの候補 RNA をアンチセンス核酸や siRNA により細胞から除去し、M 期進行、M 期染色体構造、染色体タンパク質局在、遺伝子発現へ及ぼす影響を解析する。

4 . 研究成果

計画 1) 核小体タンパク質の M 期での機能の解明

「核小体タンパク質の M 期での機能の解明」に関しては、研究代表者等は、M 期進行に関与する候補として、59 種類の核小体タンパク質を得ている。そのうちで最も顕著な M 期での表現型を示した NOL11 に関して解析を進めた。研究代表者等は、NOL11 が他の 2 つの核小体タンパク質 WDR43、Cirhin と新規タンパク質複合体、NWC 複合体を形成しすることを見出した。この NWC 複合体は、rRNA 前駆体 (pre-rRNA) を足場に M 期染色体の表面 (PR) に局在した。さらに、NWC 複合体が、ヒストン H3 スレオニン-3 リン酸化の制御を介して M 期の鍵キナーゼである Aurora B のセントロメア局在を促進することにより、M 期染色体整列や姉妹染色体接着の維持などのセントロメア機能に重要な役割を果たしていることを見出した (Fujimura et al., *Nucleic Acids Res.* 2020, 48:6583-6596)。

また、同定した 59 種類のタンパク質以外に核小体タンパク質 MYBBP1A が M 期に染色体の PR に局在すること、後期促進複合体 (APC/C) に結合することが、研究室の先行研究で示されている。そこで、MYBBP1A の M 期機能を解明するために siRNA によって KD したところ、M 期の進行が遅延し、M 期染色体の細胞赤道面上での整列が損なわれた。また、MYBBP1A が APC/C の制御因子である Cdc20 と結合し、ユビキチン化されることを見出した。これらの研究結果から MYBBP1A が M 期進行に重要な役割を担っていることが示されたが、KD 実験では標的のタンパク質の減少には時間がかかるので、MYBBP1A の KD による M 期の表現型が MYBBP1A の M 期の機能を反映したものか二次的な効果によるものかを区別できない。そこで、キシングロン法により MYBBP1A を迅速に分解できる細胞株を樹立した。

また、複数の rRNA プロセシング因子の KD が M 期の進行や M 期染色体構造に影響を与えるという報告がある。そこで、13 クラス、128 種類の rRNA プロセシング因子を KD し、M 期進行への影響を解析した。rRNA プロセシング因子のクラスと M 期進行への影響に関する相関は得られなかったが、SNRNP200、SF3B14、PLRG1 などの複数の因子の KD が M 期に影響を及ぼすことを見出した。これらの因子のうち、SNRNP200 の KD によって sororin の pre-mRNA のスプライシングが阻害され、M 期染色体の姉妹分体間の接着に異常が生じることを見出した。また、SNRNP200 の KD により DONSON の pre-mRNA のスプライシングが阻害されて、ATM/ATR の活性化を介して多極紡錘体が誘導されることを見出した。(投稿準備中)。SF3B14 の KD に関しては、SNRNP200 の KD の場合とは逆に単極紡錘体が誘導された。さらに、その表現型が TUBGCP6 の pre-mRNA によることを明らかにした (Kato et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022, 588: 133-139)。

計画 2) 核小体 RNA の M 期での役割

「核小体 RNA の M 期での役割」に関して、研究代表者等は、M 期染色体から RNA を除去することにより、脆弱な形態に変換されることを見出した。また、その形態変化は機械学習で数値化された。さらに、RNA の除去により、以前から報告されている M 期染色体の PR に局在しているタンパク質が染色体から解離するだけでなく、M 期染色体骨格タンパク質の一部が染色体結合量が減少した。

研究代表者らは局在の変化した M 期染色体骨格タンパク質のうちで最も染色体からの解離が顕著であったコンデンシン I に関して解析を進めた。コンデンシン I の non-SMC サブユニットには、決まった立体構造を取らない天然変性領域 (IDR) が複数箇所存在する。IDR を持つタンパク質の一部は、液液相分離 (LLPS) という物理化学的な現象により周囲と別の相に濃縮される。また、LLPS はポリマー (DNA や RNA) によって促進されるという報告がある。そこで、研究代表者らは、M 期染色体に局在する RNA が LLPS を促進することによりコンデンシン I の M 期染

染色体へ濃縮に寄与するのではないかと仮説を立て、解析を行った。

まず、LLSP が 1,6-hexanediol (1,6-HD) 処理によって可逆的に阻害されることが報告されているので、M 期に同調した細胞に 1,6-HD 処理をしたところ、1,6-HD の濃度依存的、時間依存的に M 期染色体上のコンデンシン I 局在が低下した。一方、培地から 1,6-HD を除去したところ、60 分後にはコンデンシン I の局在がほぼ回復した。しかし、セミインタクト細胞を 1,6-HD 除去と同時に RNase A 処理したところ、コンデンシン I の染色体局在は回復しなかった。また、精製したコンデンシン I に M 期細胞から精製した RNA を添加したところ *in vitro* で液滴が形成され、1,6-HD 添加により液滴形成が阻害された。以上の結果は、何らかの RNA がコンデンシン I の LLPS を促進することによってコンデンシン I が M 期染色体に濃縮させ、M 期染色体の構築に寄与していることを示唆する。RIP (RNA immunoprecipitation) によりコンデンシン I と相互作用する RNA の同定を試みたが、コンデンシン I と結合する RNA に特異性は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato Kazashi, Udagawa Rina, Hayashi Yuki, Maki Masayoshi, Yanagida Makiko, Higashiura Sae, Yagishita Reina, Shimamoto Haruka, Kimura Keiji	4. 巻 588
2. 論文標題 SF3B14 is involved in the centrosome regulation through splicing of TUBGCP6 pre-mRNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 133 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujimura Akiko, Hayashi Yuki, Kato Kazashi, Kogure Yuichiro, Kameyama Mutsuro, Shimamoto Haruka, Daitoku Hiroaki, Fukamizu Akiyoshi, Hirota Toru, Kimura Keiji	4. 巻 48
2. 論文標題 Identification of a novel nucleolar protein complex required for mitotic chromosome segregation through centromeric accumulation of Aurora B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6583 ~ 6596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 圭志
2. 発表標題 核小体ダイナミクスによる分裂期制御
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 かざし、林 優樹、藤村 亜紀子、広田 亨、木村 圭志
2. 発表標題 The nucleolar protein NOL11 regulates mitosis directly, and indirectly through regulating the nucleolar integrity during interphase.
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳下 玲奈、加藤 かざし、宇田川 里奈、村谷 匡史、金 俊達、木村 圭志
2. 発表標題 細胞分裂におけるSNRNP200の制御メカニズムの解析 -Sororinのスプライシングと中心体制御に機能する
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧 昌慶、加藤 かざし、村田 知弥、木村 圭志
2. 発表標題 SMC5/6複合体の新規相互作用タンパク質の同定と機能解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳田 真貴子、加藤 かざし、宇田川 里奈、牧 昌慶、柳下 玲奈、東浦 冴映、島本 陽花、木村 圭志
2. 発表標題 SF3B14はAurora BとGCP6の適切なスプライシングを介して分裂期進行を制御する
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東浦 冴映、加藤 かざし、木村 圭志
2. 発表標題 プロテインファスファターゼPP2Aとコンデンシンの相互作用の解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤かざし、斉藤典子、酒田祐佳、広田亨、木村圭志
2. 発表標題 コンデンシンIとRNAの液-液相分離は分裂期染色体構築に寄与する
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤かざし、斉藤典子、酒田祐佳、広田亨、木村圭志
2. 発表標題 コンデンシンIとRNAによる液-液相分離は分裂期染色体の構造に寄与する
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤かざし、宇多川里奈、柳下玲奈、林優樹、木村圭志
2. 発表標題 pre-rRNA プロセシング因子SNRNP200はsoroinのpre-mRNAの正常なスプライシングを介して、細胞分裂期に貢献する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島本 陽花、加藤かざし、小暮 祐一朗、木村圭志
2. 発表標題 核小体タンパク質MYBBP1AによるAPC/C-Cdc20を介したM期制御機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤かざし、藤村亜紀子、林優樹、小暮祐一朗、亀山睦朗、島本陽花、広田亨、木村圭志
2. 発表標題 核小体タンパク質複合体によるセントロメア機能の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤かざし、藤村亜紀子、林優樹、小暮祐一朗、亀山睦朗、島本陽花、広田亨、木村圭志
2. 発表標題 核小体タンパク質NOL11-WDR43-Cirhin複合体によるセントロメア制御
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	広田 亨 (Hirota Toru) (50421368)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 実験病理部・部長 (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------