

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570083

研究課題名(和文) アポトーシスにおける核の凝縮因子のゲノムワイドな探索：ヒト半数体細胞を用いて

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of nuclear condensation factors during apoptosis

## 研究代表者

刀禰 重信 (Tone, Shigenobu)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70211399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシスの最終実行過程である核の凝縮に関して生化学的、遺伝学的な解析を行った。もし核が正常に凝縮できなければ貪食されず種々の疾患の引き金になると考えられる。これまでに無細胞アポトーシス法と微速度映画を駆使して、核凝縮が、リング、ネックレス、核崩壊の3ステップを忠実に辿ることを発見した。更にそれぞれのステップを進行させる因子の同定を行い、ネックレスと核崩壊には、DNaseとカスパーゼ6がそれぞれ必要十分であること、核崩壊には核内アクチンの重合が重要であることを見出した。半数体細胞を用いたリング因子の遺伝学的探索は不成功に終わったが、ヒストン2Bのリン酸化が重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In apoptotic execution, cells perform final processes, such as DNA cleavage and nuclear condensation before engulfment by other cells. The molecular mechanisms for nuclear condensation are still unclear, while upstream cytoplasmic pathways are well characterized. Earnshaw et al. have developed a cell-free system which allows isolated nuclei could undergo apoptosis in vitro as intact cells did. We have previously proposed that nuclear condensation could be classified into three distinct steps, stage 1 ring, stage 2 necklace and stage 3 nuclear collapse. Time-lapse imaging of individual nuclei showed all nuclei could follow a reproducible program of condensation, suggesting the existence of an ordered biochemical pathway. We found the necessity of caspase-6 activity for stage 3 nuclear collapse. In conclusion, kinase activity in stage 1, DNase activity in stage 2, and caspase-6 activity in stage 3, are essential for each condensation stages.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：アポトーシス 核 キナーゼ アクチン DNase

## 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスにおける核の凝縮は、核内の構造が無秩序に破壊されていく過程ではない。有糸分裂“マイトーシス”に匹敵する、極めて精巧にプログラムされた生物現象である。近年アポトーシスを多くの研究者が研究し、そのシグナル伝達機構などがかなり明らかにされてきた。しかしアポトーシスにおいて形態的に最も明瞭な出来事である核の凝縮のメカニズムは、最後の砦としてこれまでその解明を拒んできたのである。

アポトーシスにおける核凝縮の機構に関しては、大阪大学の辻本らによる Acinus 蛋白が有名である (Sahara et al., Nature 1999)。この蛋白質は核凝縮をさせる因子として単離精製された。しかしその後の研究でこの蛋白質の遺伝子をノックアウトしたマウスの多くの細胞で核凝縮が正常に起こり、また RNAi 法によってノックダウンしても核凝縮がおきる (Joselin et al., J. Biol. Chem., 2006) ので少なくともメジャーな凝縮因子ではないと考えられている。

我々は、アポトーシスの最終実行過程としての核凝縮を解析する手段として、cell-free のアポトーシス法を採用し、改良してきた。この方法は、細胞から核を取り出し、これをアポトーシスさせた細胞の抽出物 S/M extract などと試験管内でインキュベートするもので、1時間以内に99%以上の核を同調的に凝縮させることができる。この手法と生化学的精製法、リアルタイムムービー技術を用いて個々の核の凝縮を追跡することによって、ほぼすべての核が同じ挙動をとることが判明した。そして1) 核凝縮の過程が リング ネックレス 最終 の3ステップで進行する。2) 最初のステップのリングには DNase は必要ない。3) 2番目のステップのネックレスになるには、CAD などの DNase が必要である。4) 最終ステップは激しく核が収縮するステップで、ATP がこのス

テップに必須である。などそれぞれのステップが異なる因子によって担われていることを見出してきた。

とりわけ興味深いのは、リングステップで、アポトーシスの凝縮の早期において、わずか2~3分でリング構造をとる。これを電子顕微鏡で観察すると驚いたことに DNA だけではなく、核の構造自体が著しく変化し、クロマチンや多くの核内構造が核ラミナ直下にリング状に凝集していることが明らかになった (Toné et al., Exp. Cell Res., 2007)。この構造はアポトーシスに特徴的な、いわゆる peripheral condensation に相当すると考えられる。

そしてアポトーシスをしている細胞のエクストラクトから DNase を完全に除去した分画を単離核にかけると、リング状の構造が誘導されることがわかった。またカスパーゼ阻害剤存在下においても正常にリングが形成されるので、この因子はカスパーゼではないと考えられる。更に分子量 5000 以下には活性は全くなく、分子量 20,000 から 30,000 の分画に最も強いリング誘導活性があった。このことはリングが単純にイオンや pH の変化によって起きたものではなく、高分子蛋白質が引き起こしている可能性が高い。

## 2. 研究の目的

アポトーシスの最後の過程である核の凝縮は、厳密にプログラムされた3つのステップからなる。もし核の凝縮がうまくいかないと、他の細胞に貪食されず、種々の疾患の原因となる。しかしこの核の凝縮メカニズムはほとんど謎に包まれている。本研究は、ゲノムワイドな遺伝学的手法と生化学的手法の両面からこの謎を攻略する。前者は、ヒト半数体細胞を用いて網羅的に凝縮因子の遺伝子を探索する新しい技術である。アポトーシスの核凝縮の仕組みが解明されれば、それ自体、生物学的に重要であるばかりでなく、

“ 2 m に及ぶ DNA をどのようにして直径数ミクロンの核に収納しているのか？ ” という核の構築原理を明らかにする糸口になる。

### 3. 研究の方法

核凝縮を解析する手段として、cell-freeのアポトーシス法を用いる。この手法をメインにして、生化学的精製法、リアルタイムムービー技術、半数体細胞への遺伝子導入法を併用する。また軟 X 線顕微鏡や赤外分光法など、新しい解析システムの適用も行う。

### 4. 研究成果

#### 1) それぞれのステップを進行させる因子の同定

リングからネックレスに進行させる因子は、DNase であることが確定した。以前からリングにリコンビナント DNase をかけるとネックレスがおきることを我々は報告していたが、逆に EDTA を入れておくと S/M extract (天然の凝縮因子をすべて含む抽出物) を加えても、リングで停止してしまうことが分かった。これは EDTA が Mg イオンをキレートして、S/M extract 中の DNase 活性を抑制したためと考えられる。ちなみに Ca イオン特異的なキレート剤の EGTA はまったく抑制効果を持たなかった。次にネックレスから最終核崩壊に進行させる因子はカスパーゼ 6 であることを明らかにした。ネックレスに活性のあるリコンビナント casp-6 をかけると、核崩壊が起きたからである。リコンビナント casp-3 では効果はなかった。逆にあらかじめカスパーゼ阻害剤 z-VAD を処理しておくと S/M extract を加えてもネックレスで留まった。また、我々は以前に、この過程は ATP 要求性であることを報告している。

(図 1 参照)

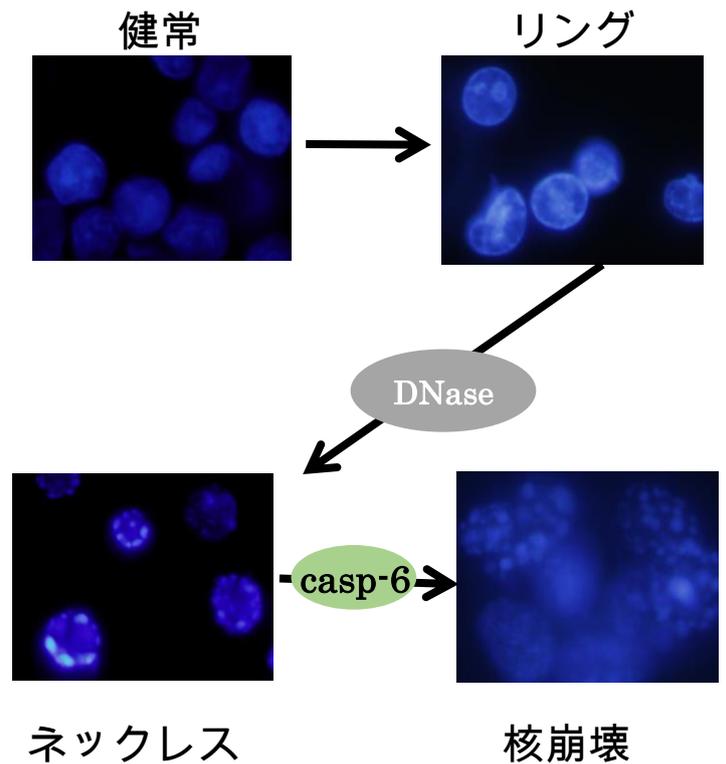


図 1

#### 2) リング因子の解析

他の 2 つの過程を動かす因子の解析は明確な結果が得られたが、一番始めのリングにする因子は、まったく分かっていない。この健康な核からリングへの過程は極めて迅速で数分でおきる。このリングになると見た目、同じタイミングで生じるのが、ヒストン H2B の 14 番目のセリンのリン酸化である。そしてこのリン酸化を引き起こしているのが Mst-1 というリン酸化酵素であるという報告がある。

そこで健康核にこのリコンビナント Mst-1 をかけてみたが、リングにならなかった。また、この酵素はカスパーゼ 3 によって活性化されるので、あらかじめカスパーゼ 3 で処理したが結果は同様であった。次にこの Mst-1 遺伝子のノックダウン RNA を発現する細胞を作製した。ウェスタンで解析したところ、Mst-1 蛋白量が、野生型の 20% 程度のクローンが得られたが、それらのヒストン H2B のリン酸化はまったく抑えられていなかった。ノックダウンのため、完全には Mst-1 を除け

ていないためにヒストン H2B のリン酸化が抑制できなかった可能性も考えられる。

また他のリン酸化酵素が関与している可能性があるため、JNK など種々のリン酸化酵素に対する特異的阻害剤を作用させた後に S/M extract または DNase を除去した extract をかけたが、リングは正常におきた。したがってこのリング因子については同定できなかった。

### 3) 核内アクチン重合の必要性

以前の我々の研究でネックレスから3番目の核崩壊に至るためには、ATP が必要であることを明らかにしていた。ATP がないとネックレス状に並んだ断片化されたクロマチンが、核の中に落ち込んでいかないのである。このことは、この過程が何らかのエネルギーを必要とすることを示唆している。そこでこの過程に核内の細胞骨格蛋白が働いているかどうかを調べるために、ATP 存在下でネックレスから核崩壊に至るときにアクチンの重合阻害剤サイトカラシン D を加えた。核の最大径を測定したところ、完全ではないが明らかに核崩壊になる頻度を低下させた (図 2)。このことは、ネックレスから最後に核の中心部分に急激な核内移動が起きるのは、ATP を動力源とした核内アクチンの働きによるものであると考えられる。核内アクチンがアポトーシスにおける核凝縮において重要な役割を果たしていることを初めて示したものである。

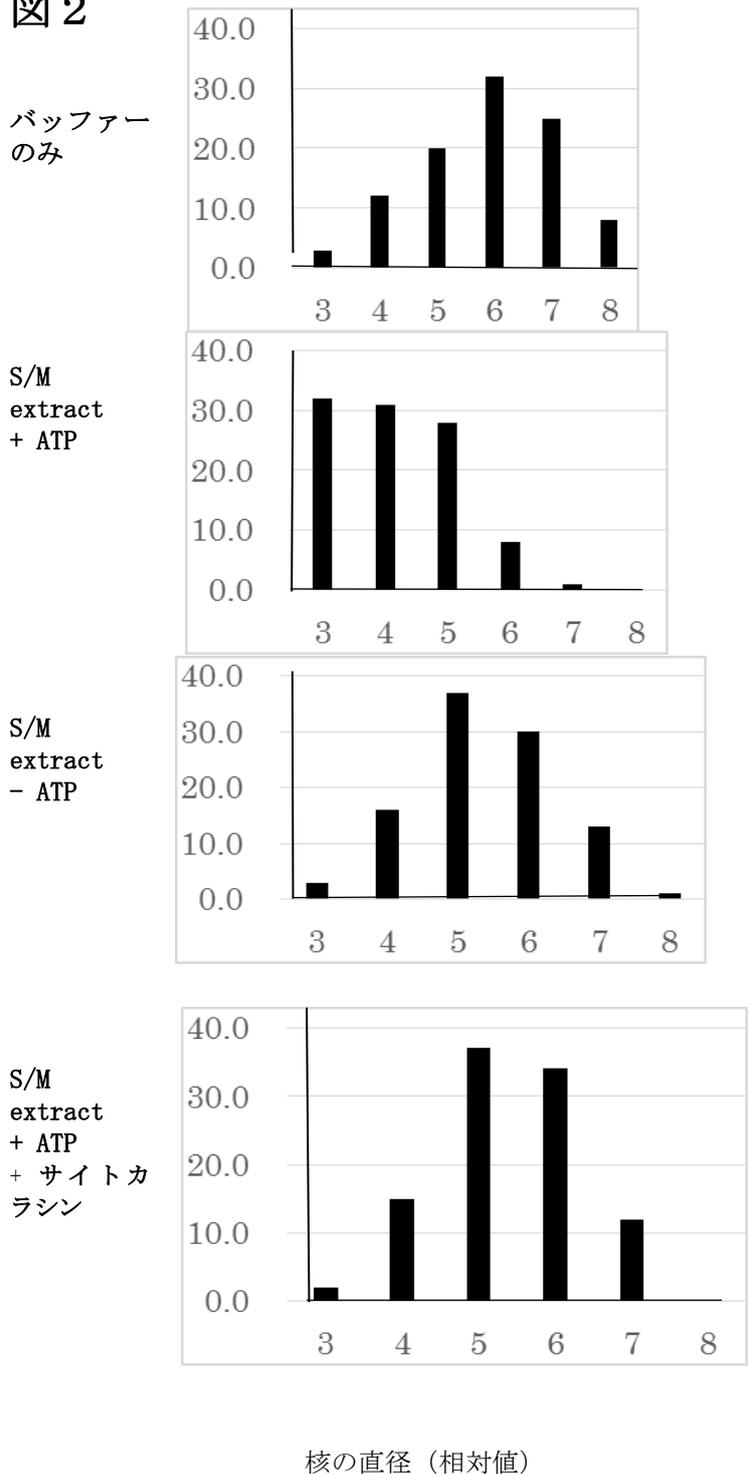
### 4) リング内部の構造について

凝縮の第1段階としてリング構造が生じるが、リングはどのように起きて、その内部はどうなっているのだろうか？電子顕微鏡観察によって、ほとんど構造は見えなかったが、軟X線顕微鏡などによってリング内に何らかの繊維状構造が検出できた。

### 5) 半数体細胞を用いたリング因子のゲノムワイドな探索

さまざまな条件検討を行ったが、ヒト半数体細胞 KBM-7 は極めて脆弱で、DNA を導入するだけでほとんどが死滅し、また得られたクローンは倍加時間3日など、極めて増殖が遅く、この目的に適していないことがわかり、この方向の実験を停止せざるを得なかった。

図 2



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 6 件)

Nagashima F, Suzuki IK, Shitamukai A, Sakaguchi H, Iwashita M, Kobayashi T, Tone S, Toida K, Vanderhaeghen P, Kosodo Y. Novel and Robust Transplantation Reveals the Acquisition of Polarized Processes by Cortical Cells Derived from Mouse and Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 査読有 E-Pub 2014 年 1 月

Rezano A, Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Kitabatake M, Moolthiya P, Phimsen S, Suda T, Tone S, Yamamoto Y, Iwase H, Sakaguchi N. Breast cancers with high DSS1 expression that potentially maintains BRCA2 stability have poor prognosis in the relapse-free survival. *BMC Cancer* 13:562 査読有 2013 年 12 月 doi: 10.1186/1471-2407-13-562

Maruyama EO, Hori T, Tanabe H, Kitamura H, Matsuda R, Tone S, Hozak P, Habermann FA, von Hase J, Cremer C, Fukagawa T, Harata M. The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei. *Journal of Cell Science* 査読有 125(16):3739-44 2012 年 8 月 doi: 10.1242/jcs.103903

Phimsen S, Kuwahara K, Nakaya T, Ohta K, Suda T, Rezano A, Kitabatake M, Vaeteewoottacharn K, Okada S, Tone S, Sakaguchi N. Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. *Apoptosis* 査読有 17(7):679-690 2012 年 7 月 doi: 10.1007/s10495-012-0711-8

Kawai C, Minatogawa Y, Akiyoshi H, Hirose S, Suehiro T, Tone S. A novel mutation of human liver alanine:glyoxylate aminotransferase causes primary hyperoxaluria type 1: immunohistochemical quantification and subcellular distribution. *Acta Histochem Cytochem* 査読有 45(2):121-129 2012 年 4 月 doi: 10.1267/ahc.11042.

Nagahama M, Umezaki M, Oda M, Kobayashi K, Tone S, Suda T, Ishidoh K, Sakurai J. Clostridium perfringens iota-toxin b induces rapid cell necrosis. *Infection and Immunity* 査読有 79(11):4353-43 2011 年 11 月 doi: 10.1128/IAI.05677-11

[学会発表] (計 7 件)

Toné S, Norimoto T, Sugimoto K, Ajiro K, Kuribayashi F. Semi-Complete Reconstitution of Apoptotic Nuclear Machinery. 53rd American Society for Cell Biology (ASCB) 2013 年 12 月 17 日 (New Orleans, USA)

刀祢重信, アポトーシスに見る自己集合現象 ワークショップ 「生命における自己組織化のメカニズム」 第 36 回分子生物学会年会 2013 年 12 月 6 日 (神戸市)

Toné S, Sugimoto K, Ajiro K, Kuribayashi F. Analysis of factors involving three distinct stages during apoptotic nuclear condensation using a cell-free system. 52th American Society for Cell Biology (ASCB) 2012 年 12 月 17 日 (San Francisco, USA)

刀祢重信, 杉本憲治, 網代廣三, 栗林太. アポトーシスにおける核凝縮の 3 つの素過程リング、ネックレス、核崩壊をそれぞれ誘導する因子の解析 - Cell-free 系を用いて 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 (福岡市)

刀祢重信, 杉本憲治, 網代廣三, 栗林太. アポトーシスにおける核凝縮の 3 つの素過程リング、ネックレス、核崩壊をそれぞれ誘導する因子の解析 第 21 回 日本 Cell Death 学会 2012 年 7 月 27 日 (名古屋市)

刀祢重信, 杉本憲治, 網代廣三, 栗林太. アポトーシスにおける核凝縮の 3 つの素過程リング、ネックレス、核崩壊を試験管内で再現する 第 53 回日本生化学会中四国支部例会 2012 年 5 月 18 日 (岡山市)

刀祢重信. アポトーシスにおける核凝縮の分子機構 第 67 回日本顕微鏡学会 シンポジウム 2011 年 5 月 16 日 (福岡市)

[図書] (計 1 件)  
刀祢重信 (編集及び共著)  
細胞死実験プロトコル  
羊土社 2011年7月 223ページ

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

刀祢 重信 ( TONE Shigenobu )  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 70211399

### 2) 研究分担者

岡本 威明 ( OKAMOTO Takeaki )  
愛媛大学・教育学部・講師  
研究者番号 : 20398431

### (3) 連携研究者

なし