

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440089

研究課題名(和文)核小体の形成メカニズムと栄養飢餓応答における役割

研究課題名(英文)Mechanism of nucleolar formation and its nutritional stress response

研究代表者

斉藤 典子(Saitoh, Noriko)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：40398235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の細胞核は、遺伝情報の本体であるゲノムDNAを制御する空間で、様々な構造体が存在する。核小体は核内最大の構造体で、リボソーム生合成の場であるとともに、細胞のエネルギー恒常性の維持や、栄養飢餓応答、細胞増殖制御などに密接に関わる。本研究では、核小体の形成・維持に関わる因子群をハイコンテンツスクリーニングを用いて同定し、核小体形成の分子メカニズムや細胞機能を解析し、核小体の機能と構造の研究を行った。

研究成果の概要(英文)：The eukaryotic cell nucleus provides a three dimensional space for regulation of genomic DNA, and thus contains various nuclear architectures. The nucleolus, one of the largest nuclear domains is a site of ribosome biogenesis. It also plays roles in cellular energy homeostasis, response to cell stresses including nutritional deprivation, and cell proliferation regulation. In this study, my research group performed high content screening to identify factors involved in nucleolar formation and maintenance, and further analyzed their molecular functions to elucidate the nucleolar structure and function.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：核小体 細胞核構造 画像解析 ハイコンテンツスクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

細胞核内は、遺伝子の転写や複製が精密な制御を受けながら起きていることを反映して、高度に組織化され、様々な構造体が存在する。核内構造体には、協調的に機能するタンパク質や RNA 分子が局所的に密度高く存在しており、それによりその場で核内の素反応が共役される。核機能が効率的に起きるための微少環境が形成されていると推察される。核小体は核内最大の構造体で、リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子座 (rDNA) を中心に形成され、リボソーム合成の場であり、核内にありながら、細胞質で行われるタンパク質の産生に関わる。核小体は楕円球状をしており、中心から順に FC (fibrillar center)、DFC (dense fibrillar components)、GC (granular components) とよばれるサブ構造体から成っており、それぞれにおいて rRNA の転写、プロセッシング、リボソームアセンブリーがおこなわれる (図 1)。また、核小体は rDNA 遺伝子の反復配列領域のみならず、NAD (nucleolus-associated chromatin domain) と呼ばれる特定のゲノム部位に結合し、高次染色体構造の形成の“ハブ”としても機能していると考えられる。

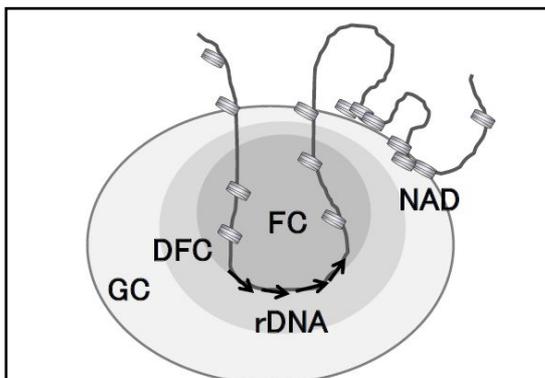


図 1: 核小体の構造

rDNA 遺伝子クラスターを中心に FC、DFC、GC の 3 層構造をしている。rDNA 以外で核小体に特異的に相互作用する遺伝子群は、NAD (nucleolus-associated chromatin domain) とよばれ、その多くは転写が抑制されている。

一方核小体は、種々の細胞ストレス応答、細胞周期やアポトーシスなどにも関わる。リボソーム合成が大量の ATP を消費する過程であることを反映して、細胞増殖、がん、エネ

ルギー代謝と密接な関係があるが、詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、核小体の形成・維持に関わる因子を検索、同定し、作用機序を解明することを目的とした。さらに、核小体の形成異常を示す変異細胞を用いながら、核小体の形成が栄養飢餓ストレスへの細胞応答にどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。これらの研究を通して、核小体の本態を理解することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 核小体の形成に関わる因子の同定

96 ウェルプレート上に HeLa 細胞を培養し、745 の因子をターゲットとする siRNA ライブラリーをそれぞれ導入した後、核小体マーカーのひとつであるヌクレオフォスミン (NPM) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、ノックダウン細胞における核小体の形態を可視化し、多量の画像を取得し、画像データベースを構築した。欠損により核小体の面積やシグナルの強度が顕著に変化したものを検索し、ハイコンテンツスクリーニングを行った。用いた全ての 96 ウェルプレート内に、ラミンに対する siRNA で処理した細胞群を含むウェルを設け、ノックダウン効率の確認に用いた。また、コントロール siRNA で処理した細胞群を含むウェルも同様に設定し、これは、画像定量の際に生じるプレート間の差を補正するために用いた。

#### (2) 核小体の形成分子機序の解明

機械学習を用いた画像解析技術 wndchrm

(weighted neighbor distance using a computed hierarchy of algorithms representing morphology) を核小体が形成不全な細胞群に適用し、形態のプロファイリングを行った。また同様の解析をそれぞれのノックダウン細胞のクロマチン形態 (DAPI 画像) に関しても

行い、核小体の形態変化との相関を調べた。

### (3) 栄養飢餓ストレス応答における核小体の機能解析

本来、細胞に栄養ストレス（低グルコース）を与えると、それに応答して rDNA 転写やリボソーム合成などを抑制して細胞増殖を抑える、というしくみがある。核小体の変異細胞でこれらの栄養飢餓に対する応答過程がどのような影響を受けているかを調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 核小体の形成に関わる因子の同定

核小体の形態形成・維持に関わる因子を同定するために、siRNA ライブラリーを HeLa 細胞に作用させ、画像ハイコンテントスクリーニングを行った。

まず、ヒトの核小体のプロテオーム解析から同定された因子（文献 1）、核内構造体因子、エピジェネティクス因子、代謝経路、ストレス応答に関わるシグナル経路などを含む 745 因子を標的とする siRNA ライブラリーを構築した。そして 96 ウェルプレート上に培養した HeLa 細胞を各々の siRNA でトランスフェクション処理をし、48 時間後に固定し、細胞をヌクレオフォスミン（NPM1）抗体で免疫染色し、核小体を可視化した。

次に、CellInsight 装置（サーモフィッシュャー社）を用いて、核小体とクロマチン（DAPI）染色サンプルについて、16 視野ずつ無作為に自動撮影し、画像データベースを構築した。これらを使って、核小体や核の領域を自動認識させ、染色された面積と蛍光強度を計測した。その結果、ノックダウンにより有意に核小体が構造変化に至る 15 因子の同定に至った。

### (2) 核小体の形成分子機序の解明

ハイコンテント siRNA スクリーニングにより同定された 15 の因子について、それぞれ

のノックダウンを原因とする異常な核小体の形態について精査した。画像データベースに wndchrm 画像解析アルゴリズムを適用し、形態のプロファイリングを行った。その結果、形態変化の様子がおよそ 3 群に分類できること、同じ群に分類された原因因子の機能は共通する傾向があることを見いだした。同様の解析を核小体の 3 つのサブ構造（FC、DFC、GC）についてそれぞれ UBF2、Fibrillarin、NPM に対する抗体を用いた免疫染色画像にて行った。その結果、GC（NPM 抗体）で定義された 3 群は FC、DFC にも共通していた。さらに、クロマチン形態（DAPI）もまた、GC で定義された 3 群と同様に分類された。共通した分子機能を持つ各因子のノックダウンが、共通した核小体サブ構造の異常に至ることが示され、核小体の形成には一定の経路が存在していることが示唆された。特徴的なそれぞれの形態変化は、各段階に特定の因子群が協調的に機能することを反映していると考察した。さらに、核小体とクロマチンが相互作用している可能性も示唆しており、これは、核小体に特定のクロマチン（NADs）（文献 2, 3）が相互作用し、それにより核内全体のクロマチン配置を規定している（図 1）という可能性を支持した。

### (3) 栄養飢餓ストレス応答における核小体の機能解析

ARP6 (actin related protein 6) は、核内に局在するアクチン関連タンパク質ファミリーのひとつで、クロマチンリモデリング複合体（SRCAP; Snf-2-related CREB-binding protein activator protein）の構成因子である。多くは核質でクロマチンと相互作用しているが、一部、核小体の中心部で rRNA の転写を担う RNA ポリエラーゼ I と共局在している。ARP6 が核小体の構造と機能に関わるかを調べるために、HeLa 細胞で ARP6 をノックダウンし、wndchrm を用いて核小体形態変化の定

量解析を行った。その結果、ARP6 が一部局在する FC と DFC のみならず、GC を含む全ての領域の形態に影響があったことがわかった (図 2)。

核小体は細胞のエネルギー状態の恒常性にも関わる。核小体構造が異常な ARP6 ノックダウン細胞においては、通常の栄養状態において rRNA の転写と増殖不全を示す。また正常細胞では、グルコース飢餓条件では rRNA の転写が抑制され、増殖も低下し、エネルギーの節約がされる。しかし、ARP6 のノックダウンでは、rRNA の転写抑制が不全となり、その結果、死細胞が増えている (文献 4)。これらのことから、ARP6 が核小体の構造と機能に関わる因子で、エネルギー恒常性の維持に重要な役割をしていることが示唆された (文献 4)。

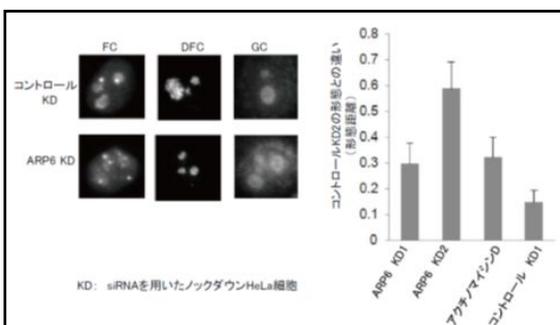


図 2: ARP6 による核小体の構造における役割 (左) siRNA により ARP6 をノックダウン (KD) した HeLa 細胞の核小体。(右) wndchrm による核小体形態変化の定量化。アクチノマイシン処理は、核小体異常を起こすことが既に知られているが、ARP6 のノックダウンは同等かそれ以上の変化に至った。Kitamura H et al BBRC (2015) (文献 4) を一部改変

#### 引用文献

- Andersen, J.S., Y.W. Lam, A.K. Leung, S.E. Ong, C.E. Lyon, A.I. Lamond, and M. Mann. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. 433:77-83.
- Németh, A., A. Conesa, J. Santoyo-Lopez, I. Medina, D. Montaner, B. Péterfia, I. Solovej, T. Cremer, J. Dopazo, and G. Längst. 2010. Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet*. 6:e1000889

- van Koningsbruggen, S., M. Gierlinski, P. Schofield, D. Martin, G.J. Barton, Y. Ariyurek, J.T. den Dunnen, and A.I. Lamond. 2010. High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Molecular biology of the cell*. 21:3735-3748.

- Kitamura, H., H. Matsumori, A. Kalendova, P. Hozak, I.G. Goldberg, M. Nakao, N. Saitoh, and M. Harata. 2015. The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. *Biochem Bioph Res Co*. 464:554-560.

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 7 件)

- 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*, 40:597-602, 2016 doi: 10.1002/cbin.10594.

- 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.

- Kitamura, H., Matsumori, H., Kalendova, A., Hozak, P., Goldberg, I.G., Nakao, M., Saitoh, N., 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.

- 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.

- 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.

6. 安田洋子、斉藤典子、藤原沙織、Mohamed O. Abdalla、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. クロマチン構造と核異型、文光堂 病理と臨床 132: 789-795, 2014.

〔学会発表〕(計 47 件)

1. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、安田洋子、坂本智代美、Ilya G Goldberg、中尾光善. 機械学習によるヒト iPS 細胞リプログラミングの評価(第 67 回日本生物工学会大会 シンポジウム 動物細胞工学における非侵襲的細胞正常計測法の紹介 2015 年 10 月 27 日 城山観光ホテル、鹿児島県鹿児島市)
2. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、安田洋子、坂本智代美、Ilya G Goldberg、中尾光善. 機械学習を用いた細胞リプログラミングの評価(バイオイメーჯ・インフォマティクスワークショップ 2015 2015 年 6 月 19 日 九州大学病院キャンパス、福岡県福岡市)
3. 斉藤典子. パターン認識・画像解析法を用いた細胞リプログラミングの評価(理研セミナー 2015 年 4 月 30 日 理化学研究所、埼玉県和光市)
4. 斉藤典子「Quantitative image analysis of cell reprogramming」広島大学核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点 招待講演第 12 回 2014 年 10 月 17 日 広島大学、広島県東広島市)
5. 斉藤典子、徳永和明、松森はるか、安田洋子、Ilya G Goldberg、中尾光善. 機械学習を用いた細胞核形態の定量化と細胞状態の評価(第 87 回日本生化学会大会・シンポジウム 蛍光・発光タンパク質を使ったイノベーション 2014 年 10 月 15 日 国立京都国際会館、京都府京都市)
6. 斉藤典子、松森はるか、モハメドオサマ・アブダラ、藤原沙織、安田洋子、中尾光善. 核内構造体の形成機序と機能(第 66 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム S2「細胞核の構造・機能と生命現象」2014 年 6 月 11 日 新公会堂、奈良県奈良市)
7. 斉藤典子、松森はるか、安田洋子、坂本智代美、Ilya G Goldberg、中尾光善. 細胞核形態画像と機械学習を用いた細胞状態の評価(バイオ・インフォマティクス 2014 2014 年 6 月 9 日 岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市)
8. 斉藤典子、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. 核スペックルの形成機序と遺伝子発現制御における機能(第 36 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 3PW11「クロマチンと核構造のインタープレーが織りなす生命現象」2013 年 12 月 5 日 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)
9. 斉藤典子、松森はるか、モハメドオサマ

アブダラ、藤原さおり、中尾光善. 核スペックルと核小体の形成機序と機能(第 86 回日本生化学会大会・シンポジウム 細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

10. 斉藤典子、松森はるか、Ilya G Goldberg、中尾光善. 機械学習を用いた細胞核構造形成の解析(第 65 回日本細胞生物学会 シンポジウム かたちの数理計測生物学 2013 年 6 月 20 日 ウィンク愛あいち、愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 4 件)

1. 山本 達郎、中尾 光善、斉藤典子. クロマチンから核構造へ. 基礎分子生物学 II: 遺伝子発現制御機構(田村隆弘・浦聖恵 編), 東京化学同人, 印刷中
2. 斉藤典子、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. 斉藤典子、松森はるか、モハメド・オサマ・アブダラ、藤原沙織、安田洋子、中尾光善. 核内コンパートメントの生物学的意義、羊土社 イラストで徹底理解する エピジェネティクスキーワード事典 牛島俊和・眞貝洋一 編 p91-p98, 2013
4. 斉藤典子、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)

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  
<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

斉藤 典子 (SAITOH, Noriko)  
熊本大学発生医学研究所・准教授  
研究者番号：40398235

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし