

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290064

研究課題名(和文) M期染色体動態を制御する核小体RNA-タンパク質ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of nucleolar RNA-protein network that regulates mitotic chromosome 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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：M期進行に関与する因子として同定した核小体因子NOL11の機能解析を行った。NOL11は核小体因子WDR43, Cirhinと複合体を形成しRNA依存的にM期染色体周辺に局在した。NOL11をKDしたところ、M期染色体の赤道面上での整列異常などのM期染色体の形態や動態異常、cdc2キナーゼ活性の抑制によるM期進行の遅延が観察された。一方、NOL11 KDは間期細胞において、rRNA転写の抑制と核小体崩壊を引き起こした。他の方法でrRNA転写を阻害し核小体崩壊を誘導した際にも、Cdc2活性抑制によるM期開始の遅延が観察され、間期における核小体構造の維持とM期の進行との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of NOL11 that were identified as the factor that were involved in mitosis from large scale siRNA screening. NOL11 formed complex with WDR43 and Cirhin, and associated with periphery of mitotic chromosomes. We found that NOL11 KD caused mitotic defects such as aberrant mitotic chromosome alignment and a delay in mitotic progression. Delay in mitotic progression was induced by inhibition of cdc2 kinase due to increased inhibitory phosphorylation of cdc2 kinase at Tyr15. In addition to the mitotic phenotype, NOL11 KD reduced rRNA transcription and caused nucleolar disruption during interphase. Interestingly, delay in mitotic progression was also observed when nucleolar disruption during interphase was induced by other methods. Furthermore, the defects was ameliorated when nucleolar disruption during interphase was suppressed. Thus, nucleolar integrity during interphase is required for proper mitotic progression.

研究分野：生化学

キーワード：分裂期 染色体 核小体 RNA Aurora B NOL11 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂期 (M 期) は、複製された染色体 DNA を娘細胞に均等に分配する過程で、M 期の正常な進行は、親細胞から娘細胞への遺伝情報の維持に必須である。種々の M 期キナーゼや、M 期染色体の骨格を形成するタンパク質の機能解析が進み、M 期進行の分子メカニズムは急速にわかりつつある。一方、核内構造体の一つである核小体が M 期染色体動態制御に関与することが注目を集めている。

核小体は、数百コピー反復したリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子 (rDNA) 領域を含み、従来は rRNA の転写とリボソーム合成の場として考えられてきた。しかし、近年の研究から、核小体がリボソームの生合成の場として機能するだけでなく、細胞周期の制御、ストレス応答、分化、老化、ウイルス感染の制御など多くの重要な生命現象に関与することが知られつつある。

研究代表者らは、核小体がストレスセンサーとして機能することを見出した (Kuroda et al., EMBO J., 2011)。細胞が DNA 傷害等のストレスを受けると、rRNA の転写が抑制され、核小体内の rRNA 量が減少する。すると核小体は崩壊して、rRNA を足場に核小体に局在していたいくつかの核小体因子は核質に移行する。研究代表者らはそれらの核小体因子の一つである MYBBP1A が、癌抑制因子 p53 に結合し、その転写活性を促進することにより、細胞周期停止やアポトーシスを誘導することを見出した。この結果は、rRNA が核小体において MYBBP1A の「足場」として機能し、その局在と活性を制御する働きがあることを示している。

一方で、高等真核生物ではストレス条件以外でも、細胞周期が M 期に進行すると cdc2 キナーゼなどのリン酸化により rRNA の転写が急激に抑制され、核小体も崩壊、消失する。その際に核小体因子は細胞全体に拡散するが、凝縮を始めた M 期染色体の周囲 (PR) には一部の核小体因子や rRNA が結合していることが報告されている。この挙動から、これらの核小体因子が M 期進行や M 期染色体動態制御に関与することが示唆される。しかしながら、それらの核小体因子が PR にどのようにして集積し、M 期においてどのような役割を担っているか、詳細は明らかではない。

研究代表者らは、ツメガエル卵抽出液を用いた解析から、RNA が正常な染色体動態に重要な役割を担っていることを見出した。また、申請者は、約 700 種類の核小体タンパク質に対する siRNA ライブラリーを作製して、M 期進行に必須なタンパク質をスクリーニングした。その結果、機能未知な因子

Nucleolar protein 11 (NOL11) を同定した。NOL11 の M 期における挙動を解析し、NOL11 が M 期染色体周辺に局在すること、さらにその局在が RNA に依存することを見出した。NOL11 の機能を解析するために、NOL11 をノックダウン (KD) したところ、細胞が M 期で停止し、それらの細胞では姉妹染色分体間の接着がそこなわれた。さらに、NOL11 以外にも約 60 種類の核小体タンパク質が M 期に関与することを見出した。

2. 研究の目的

上記の研究当初の背景と申請者の実験結果から、研究代表者は rRNA が、核小体タンパク質を M 期染色体に結合させる足場としての機能を持つことを予測した。この仮説に基づき、核小体の RNA 及びタンパク質の M 期における機能を解析し、M 期染色体動態制御における核小体 RNA-タンパク質ネットワークを明らかにすることを本研究の目的とする。

具体的には、以下の四項目を明らかにすることを目的とした。

(1) 核小体 RNA の役割の解析

rRNA をはじめとする核小体 RNA がどのようなメカニズムで M 期染色体に結合するかを明らかにする。また、M 期染色体上の RNA が、M 期染色体の構造や動態の制御にどのような役割を持つかを解明する。

(2) NOL11 による M 期染色体動態制御

核小体タンパク質 NOL11 が M 期の進行や M 期染色体構造・動態をどのように制御するかを明らかにする。また、その分子メカニズムを解明する。また、NOL11 が RNA を介して M 期染色体へ局在する分子機構を明らかにする。

(3) M 期染色体動態に関わる核小体因子の同定と機能解析

M 期染色体動態に関わる核小体因子を網羅的に同定・機能解析し、M 期染色体動態制御に関与する核小体 RNA-タンパク質ネットワークを解明する。

(4) 核小体 RNA-タンパク質ネットワークの制御

ストレス等に応答した rRNA の転写量の変化に応じて、核小体 RNA-タンパク質ネットワークがどのように制御され、M 期染色体動態にどのような影響が生じるかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 核小体 RNA の役割の解析

核小体 RNA が M 期染色体の構造や動態制御にどのような役割を担っているか、以下の二つのシステムで解析する。

ツメガエル卵抽出の系を用いた解析

ツメガエル卵抽出液に RNase A を添加し RNA を分解し、染色体動態のどの過程に変化が生じるかを解析する。

ヒト培養細胞を用いた解析

M 期染色体を調製し、RNase A により RNA を除去し、M 期染色体の構造や染色体結合タンパク質に変化が生じるかを観察する。rRNA を特異的に除去した際の影響を調べるために、RNA Pol I 阻害剤存在下で培養した HeLa 細胞から M 期染色体を調製し染色体構造や結合タンパク質を解析する。また、生理的な条件で実験を行うためにヒト培養から RNA を除去し、染色体動態や構造を解析する。

(2) NOL11 による M 期染色体動態制御

siRNA を用いて NOL11 を KD したところ M 期に細胞が蓄積することを見出している。そこで、細胞同調と FACS 解析を組み合わせることにより、NOL11 KD が細胞周期にどのような影響を与えるかを精査する。

NOL11 KD の M 期染色体構造や動態に与える影響を精査する。また、Aurora B の動原体への局在異常が観察された。しかし、NOL11 と Aurora B の直接的な相互作用は確認できなかった。そこで、Aurora B の局在に影響を与える、Haspin キナーゼ、Bub1 キナーゼ、PP1 ホスファターゼ、Cohesin に着目し、それらが NOL11 と相互作用するか、NOL11 KD によって活性や局在に変化が生じるかを解析し、Aurora B 局在異常の原因を明らかにする。

(3) M 期染色体動態に関わる核小体因子の同定と機能解析

NOL11 と複合体を形成しているタンパク質の同定を行う。NOL11 複合体の構成因子は、FLAG-HA タグ付き NOL11 安定発現細胞株を M 期に同調して細胞抽出液を調製し、NOL11 複合体をタンデムアフィニティー精製し、質量分析することにより決定する。さらに、それらの機能を解析する。

約 700 種類の核小体タンパク質の siRNA ライブラリーを用いた網羅的解析から、M 期進行に関与する候補として、約 60 種類のタンパク質を同定した。これらの因子を精査、再評価する。また、これらの因子と核小体 RNA との関連を解析する。

(4) 核小体 RNA-タンパク質ネットワークの制御

申請者の研究室の先行研究から、間期核内において、細胞のエネルギー状態や DNA 傷害等の細胞内外の環境が、rRNA の転写量の制御を介して核小体結合タンパク質の局在と機能を規定することが見出されている。M 期においても同様の制御が起こる可能性が考えられる。そこで、エネルギー状態の変化や DNA 傷害などの細胞内外の環境変化やストレスにより、M 期進行や M 期染色体の動態・構造に影響が出るかを解明する。

4 . 研究成果

(1) 核小体 RNA の役割の解析

ツメガエルの M 期卵抽出液に RNase A を加えて RNA を除去し、複製させたあとの M 期染色体形態を観察したところ、赤道面上での染色体の整列に異常を生じた。

また、HeLa 細胞の M 期染色体スプレッドを調整し RNase A 処理により RNA を除去したところ、染色体が脆弱な構造になり、染色体表面から繊維状の構造が伸びるのが観察された。次に、蛍光抗体染色法により染色体上に存在するタンパク質を観察したところ、RNase A 処理により、ヌクレオホスミン、ヌクレオリン、MYBBP1A といった染色体周辺 (PR) に局在するタンパク質、コンデンシン I や KIF4a などの染色体骨格タンパク質が染色体から脱離し、Aurora B などのタンパク質のセントロメア局在も消失した。また、RNA Pol I 阻害剤であるアクチノマイシン D 処理により rRNA 転写を抑制した細胞から M 期染色体スプレッドを調整した際には、PR 結合タンパク質のシグナルは減弱したが、染色体骨格タンパク質の局在には変化は観察されなかった。この結果から、rRNA は PR への核小体因子の局在に寄与することが示され、染色体骨格タンパク質の局在は他の種類の RNA が関与することが示唆された。

(2) NOL11 による M 期染色体動態制御

NOL11 KD をした HeLa 細胞を G1 期に同調し、同調解除後の細胞周期の進行を FACS 解析により調べたところ、G1 期、S 期、G2 期の進行には影響は生じなかったが、M 期の進行が遅延することを見出した。M 期進行の遅延の原因は cdc2 キナーゼの活性抑制であった。また、cyclin B 量には変化は生じず、Wee1 キナーゼの蓄積による cdc2 の抑制的リン酸化の増大が cdc2 キナーゼ活性抑制の原因であった。

また、NOL11 KD をして M 期染色体を観察したところ、M 期染色体の細胞赤道面上への整列や姉妹染色体分体間の接着に異常が生ずることを見出した。また、NOL11 KD によ

り Aurora B のセントロメア局在が阻害され、その原因はヒストン H3 の T4 残基のリン酸化異常によるものであった。

(3) M 期染色体動態に関わる核小体因子の同定と機能解析

FLAG-HA タグ付き NOL11 安定発現細胞株から NOL11 複合体を精製したところ、核小体因子 WDR43, Cirhin が NOL11 と安定な複合体を形成することを見出した。WDR43, Cirhin を KD した際にも NOL11 KD と同様な表現型が観察された。また、Cirhin サブユニットが RNA 結合活性を持つこと、Cirhin サブユニットに変異を導入し RNA 結合活性を低下させると、NOL11 複合体の M 期染色体結合が低下することから、NOL11 複合体が Cirhin サブユニットを介して M 期染色体に結合することが示唆された。

また、核小体因子の siRNA を用いた網羅的な解析から、約 60 種の因子が M 期に影響を与えることを見出しており、そのうち 16 種類がリボソームタンパク質、17 種類がスプライシング因子であった。機能のよくわからない因子を精査したところ、ESF1, DNTTIP2 が核小体に局在して M 期進行に影響を与えることを見出した。

(4) 核小体 RNA-タンパク質ネットワークの制御

近年の報告から、NOL11 が rRNA 転写及びプロセッシングに関与することが報告されている。NOL11 KD により、間期における rRNA 転写が低下して核小体が崩壊することを見出した。また、TIFIA や UBF などの rRNA 転写因子を KD して核小体崩壊が誘導された際にも、Wee1 量が増加し、cdc2 活性低下と M 期の遅延が引き起こされた。また、Act D を用いて rRNA 転写を抑制し核小体ストレスを引き起こした際にも、同様の表現型が観察された。興味深いことに、これらの条件下で RPL11 を KD すると核小体崩壊が抑制され、M 期の表現型も軽減された。以上の結果から、間期における核小体構造の維持と cdc2 キナーゼの活性化及び M 期進行には密接に関連することが示された。

一方で、M 期染色体の細胞赤道面上での整列異常などの一部の NOL11 KD の表現型は、他の転写因子の KD や Pol I 阻害剤添加により間期核小体崩壊を引き起こした際には観察されなかった。この結果から、これらの M 期染色体動態の制御には NOL11 が直接関与することが示唆された。

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 6 件)

1) Kumazawa T, Nishimura K, Katagiri N, Hashimoto S, Hayashi Y, and Kimura K. Gradual reduction in rRNA transcription triggers p53 acetylation and apoptosis via MYBBP1A. *Sci. Rep.* (2015) 5:10854. doi: 10.1038/srep10854. (査読あり)

2) Nishimura K, Kumazawa T, Kuroda T, Katagiri N, Tsuchiya M, Goto N, Furumai R, Murayama A, Yanagisawa J, and Kimura K. Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation. *Cell Rep.* (2015) 10:1310-1323. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.055. (査読あり)

3) Katagiri N, Kuroda T, Kishimoto H, Hayashi Y, Kumazawa T, and Kimura K. The nucleolar protein nucleophosmin is essential for autophagy induced by inhibiting Pol I transcription. *Sci. Rep.* (2015) 5:8903. doi: 10.1038/srep08903. (査読あり)

4) Hayashi Y, Kuroda T, Kishimoto H, Wang C, Iwama A, and Kimura K. Downregulation of rRNA transcription triggers cell differentiation. *PLoS One* (2014) 9:e98586. doi: 10.1371/journal.pone.0098586. eCollection 2014. (査読あり)

5) Ono W, Hayashi Y, Yokoyama W, Kuroda T, Kishimoto H, Ito I, Kimura K, Akaogi K, Waku T, and Yanagisawa J. The nucleolar protein Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) enhances p53 tetramerization and acetylation in response to nucleolar disruption. *J. Biol. Chem.* (2014) 289:4928-4940. doi: 10.1074/jbc.M113.474049. (査読あり)

6) Ono W, Akaogi K, Waku T, Yokoyama W, Hayashi Y, Kimura K, Kishimoto H and Yanagisawa J. Nucleolar protein, Myb-binding protein 1A, specifically binds to nonacetylated p53 and efficiently promotes transcriptional activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2013) 424:459-463. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.006. (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

1) 間期核小体構造と時空間的な Cdk1 活性制御

林優樹、藤村亜紀子、加藤かざし、宇田川里奈、広田亨、木村圭志

第 34 回染色体ワークショップ 第 15 回核ダイナミクス研究会

かずさアカデミアホール、千葉県、木更津市、2017, 1 月 12 日

2) ホスファターゼによる分裂期染色体結合タンパク質の制御

郡司理紗子、松井亮仁、林優樹、木村圭志

第 39 回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市、2016, 12 月 2 日

3) 核小体タンパク質 NOL11 は cdk1 の活性化を調節する

林優樹、藤村亜紀子、加藤かざし、宇田川里奈、広田亨、木村圭志

第 39 回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市、2016, 12 月 2 日

4) RNA による M 期染色体と構造タンパク質の維持

加藤かざし、小暮祐一郎、林優樹、木村圭志

第 39 回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市、2016, 11 月 30 日

5) rRNA プロセッシング因子 NOL11 による M 期染色体動態の制御

林優樹、加藤かざし、藤村亜紀子、郡司理紗子、松高愛、広田亨、木村圭志

第 33 回染色体ワークショップ 第 14 回核ダイナミクス研究会

松島一の坊、宮城県、仙台市、2016, 1 月 12 日

6) 核小体は各種ストレス時の細胞の運命を決める

熊澤拓也、西村和帆、片桐尚宏、竹田征治、齋藤能彦、木村圭志

第 38 回日本分子生物学会年会

神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市、2015, 12 月 4 日

7) 核小体タンパク質 Nucleophosmin を介した新規オートファジー誘導経路の解析

片桐尚宏、林優樹、熊澤拓也、木村圭志

第 38 回日本分子生物学会年会

神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市、2015, 12 月 1 日

8) 核小体崩壊によって誘導されるオートファジーに、核小体タンパク質 NPM が関与する

片桐尚宏、林優樹、熊澤拓也、木村圭志

第 37 回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市、2014, 11 月 26 日

9) 各種ストレス時における細胞の運命決定メカニズムの解析

西村和帆、熊澤拓也、黒田貴雄、木村圭志

第 37 回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市、2014, 11 月 26 日

10) 核小体因子による Aurora B を介した M 期染色体動態制御

木村圭志

タンパク研セミナー

大阪大学、大阪府、大阪市、2014, 3 月 14 日

11) 核小体因子は Aurora B を介して M 期染色体を制御する

木村圭志

第 36 回日本分子生物学会年会

神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市、2013, 12 月 3 日

12) 核小体因子による Aurora B を介した M 期染色体動態の制御

木村圭志

第 31 回染色体ワークショップ 第 12 回核ダイナミクス研究会

ホテルおかだ、神奈川県、箱根町、2013, 11 月 26 日

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学大学院・生体情報制御学研究室

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~frog/>

6. 研究組織

(1) 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