

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590203

研究課題名(和文) アポトーシスにおける核凝縮の分子形態学的解析

研究課題名(英文) Molecular Cell Biological Analysis of Nuclear Condensation in Apoptosis

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

研究成果の概要(和文)：

アポトーシスの実行過程のうち、最も未解明な点の多い核の凝縮に焦点を当てた。単離核を用いた方法によって、リング凝縮の機構について解析した。分子量30K～50Kの分画に強いリング凝縮活性があること、それはカスパーゼ、DNase、JNK キナーゼとは異なる可能性が高いことを明らかにした。またリング凝縮の過程を詳細に解析する方法を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study characterized the condensation factor(s) which induced the ring condensation in nuclei during apoptosis using cell-free apoptosis system. Neither DNase, caspases nor JNK kinase would be involved in ring condensation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究代表者の専門分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：分子形態学 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

胚発生をはじめとして組織がダイナミックに変動するとき、あるいは成体における恒常的な細胞の代謝回転において、プログラムされた細胞死がおきることが知られている。この細胞死は、多くの場合、アポトーシスと呼ばれるタイプの細胞死となる。そして、この20年間でアポトーシスの様々なステップの詳細が明らかにされ、またアポトーシスが進行するために不可欠な分子が同定

されてきた。死のプログラムの実体として、細胞死遺伝子が明らかにされ、死の引き金、シグナル伝達、そして死の実行に至るまで、細胞に組み込まれた、まさにプログラムされた死であることを示す研究が爆発的に進んできた。

そのアポトーシスの最後のステップである実行過程では、ゲノムDNAの切断、多くの細胞蛋白の限定分解がおきるが、最も分

子形態学的にも顕著なイベントであり、アポトーシスの定義でもある核の凝縮は、はたしてプログラムされているのだろうか？培養細胞にアポトーシスを起こさせると、最後は核が凝縮するが、そのタイミングはバラバラであり、またその凝縮像は細胞間で異なっているように見える。実は、アポトーシスにおける核の凝縮は、研究者によって統一的な見解が得られていなかった。それは、核の凝縮の同調性が悪く、また同一の核を追跡してその形態学的変化を捉えた研究が皆無であったからである。

このような状況下では、核の凝縮と言っても研究者ごとに定義が異なり、当然のことながら議論がかみ合わない訳である。例えば「核凝縮に ATP が必要か否か」という問題では、「どこまでいけば核凝縮しているといえるのか」が、研究者間で異なっていたのが混乱の元凶であった。

我々は、2007年に cell-free アポトーシスの手法と微速度映画を用いて、アポトーシスにおける核の凝縮過程がリング形成、ネットワーク、最終の3ステップをたどることを報告し、そのうち2~3分で生じるリング構造を引き起こす因子（リング形成因子）が、アポトーシス細胞の抽出物からヘパリンアガロースによるアフィニティーカラムによって高濃度に精製できることを見出した。

2. 研究の目的

アポトーシスにおける核の凝縮の分子形態学的観察を更に進め、かつそれらを動かす分子の実体に迫りたい。

3. 研究の方法

アポトーシスにおける核の凝縮を試験管内で再現させる方法として cell-free アポトーシスの手法がある。これは HeLa S3 細胞などを低張処理によって細胞膜を破たん

させ、単離核にしたものに様々な因子を含むエクストラクトをかけて凝縮をおこさせるものである。通常は 37°Cで行う。阻害剤で核を前処理したり、遺伝子導入した細胞からの核を用いることで、メカニズムを探ることが可能となる。またこの過程を微速度映画で撮影して、同一の核の変化を追跡することもできる。

4. 研究成果

1) リング凝縮因子の解析

ヒト白血病細胞 Jurkat 並びにニワトリヘパトーマ細胞 CHEP をそれぞれ約 10 リットル大量培養し、そこからヘパリンアガロースによるアフィニティーカラムによって部分精製した。この部分精製物は、cell-free のアポトーシスの系で、単離核を強力にリング状に凝縮させた。同調性は高く、99%以上の核が数分以内にリング状に凝縮した。このリングは、精製前の抽出物を単離核に欠けた数分以内におきるリングと全く変わらないものであった。ヘパリンアガロースは、DNase などの DNA 結合蛋白を選択的に結合させることが知られており、実際に、このカラムを通すことで、完全に DNase 活性を除去できる。こうして全く DNase を含まない部分精製物が、リング凝縮を強力におこすことは、リング形成には DNase 活性は必要がないことを示唆している。またリング凝縮をした核の DNA は切断されていないことを確認してある。

またこのリング形成因子を高濃度に含んだエクストラクトはカスパーゼ活性が高いことが分かっていたので、リング形成にはカスパーゼが働いていることが考えられた。そこでカスパーゼ阻害剤 DEVD などをあらかじめ核に作用させたあと、リング形成させたが、全く正常にリングになった。このことはリング形成にはカスパーゼ活性は必要な

いことを示唆している。

リング形成因子を豊富に含む分画を分子量の違いによって分画したところ、分子量 30K~50K の分画に強い活性があることが判明した。もちろん、この方法で厳密に分子量を決定できるわけではないが、少なくともリング形成がイオンや低分子によるアーティファクトであることを完全に否定する結果である。

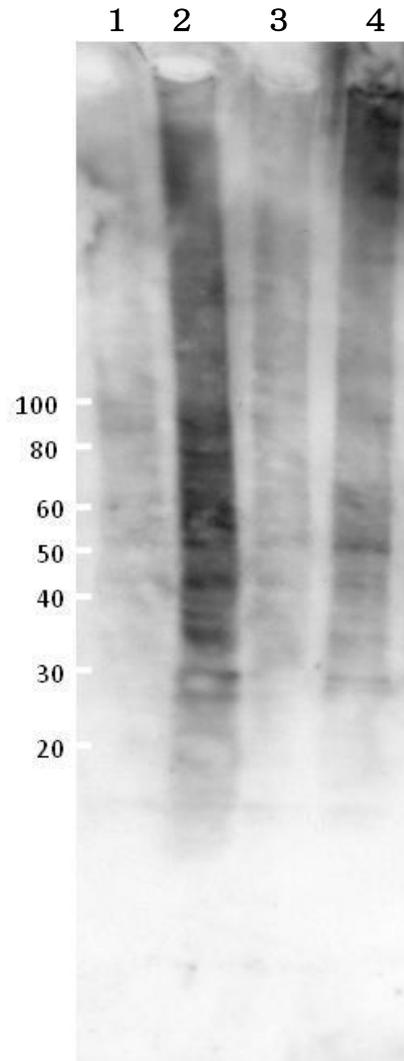
また硫安沈殿によって分画を試みたところ、硫安 30~50%分画に強いリング誘導活性があることを見出したが、同定には至っていない。

2) 核凝縮におけるリン酸化の役割

核凝縮に果たしているキナーゼの役割を知るために p38 並びに JNK キナーゼに対する阻害剤 SB 203580, SP 600125 をあらかじめ処理したのちに単離核に作用させた。特に JNK キナーゼは核凝縮に働いているという報告がある。ところが、両阻害剤とも cell-free の核凝縮はまったく阻害できなかった。

次に単離核の蛋白質にエクストラクト中の何らかのキナーゼが働いてリング凝縮をはじめとするクロマチンの変化を誘発するならば、新たにリン酸化された蛋白質を標識することで同定できると考えた。最近報告された、新規にリン酸化された蛋白質を標識する方法を用いて、cell-free アポトーシスの反応中に ATP- γ S を入れて、蛋白質をチオリン酸化した。そのあと、PNBM でエステル化してから核蛋白を抽出し、ウェスタンブロット解析を行った (図 1)。抗体は チオリン酸化エステルを特異的に認識する抗体を用いた。エクストラクト、ATP- γ S、PNBM 処理したサンプル(レーン 2)のみに検出されたバンドは、cell-free アポトーシスの反応中に新たにリン酸化された核蛋白であると考えられる。

図 1



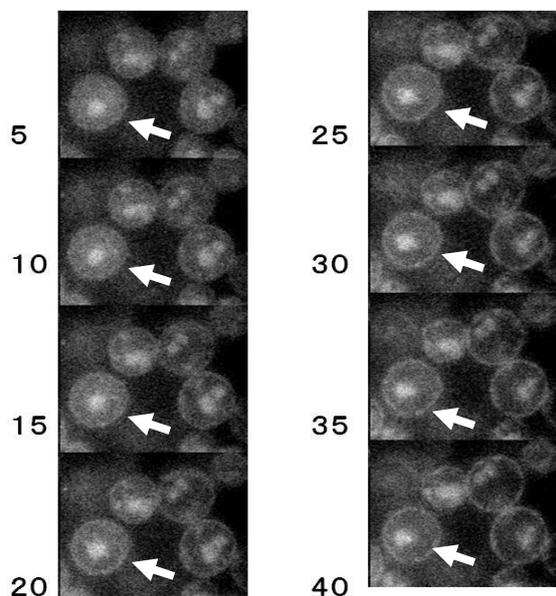
| | | | | |
|---------|------------|------------|-----|------------|
| extract | + | + | + | - |
| ATP | γ S | γ S | ATP | γ S |
| PNBM | - | + | + | + |

3) リング形成の詳細な解析

あまりにリング凝縮が迅速な過程である(数分)ため、これまで映画で撮影することができなかった。本研究において、種々の温度で反応させることで、その速度を制御できることが判明した。温度を25℃または30℃に下げることによって進行速度を落とし、初めてリング凝縮に至る過程の撮影に成功することができた。その解析結果からリングの空洞部分が徐々に拡大していくのではなく、核全体が同調的に薄くなっていくことが分かった。

(図2)

図2



数字は 反応開始後の分 温度30℃
同じ核(矢印)を比較すれば リングに徐々に
なっていくことが分かる

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4件)

1 Jrad-Lamine A et al.

Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. **Journal of Biological Chemistry** 286 · 8030-8042 (2011) 査読有

2 Machida K et al.

Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and interleukins

Gastroenterology 137 · 285-96 (2009)

査読有

3 Sugimoto K and Tone S

Imaging of mitotic cell division and apoptotic intra-nuclear processes in multicolor. **Methods in Molecular Biology** 591 · 135-146 (2009) 査読無

4 Eguchi R, Tone S, et al.

Possible involvement of caspase-6 and -7 but not caspase-3 in the regulation of hypoxia-induced apoptosis in tube-forming endothelial cells. **Exp. Cell Res** 315 · 327-35.(2009) 査読有

[学会発表] (計3件)

1 Proapoptotic Role of DNA-PK System in DT40 Apoptosis Induced by X-ray, UV or Hydrogen Peroxide American Society for Cell Biology Annual Meeting 2010.12 Philadelphia, USA
Tone S, Kuribayashi F, Takata M, Ishiai M.

2 Ku70 and DNA-PKcs are essential in DT40 apoptosis induced by X-ray, UV or H2O2 Keystone Symposia Conference "Cell Death Pathways" 2009.3 Whistler, Canada Tone S, Tanda K Takata M Ishiai M

3 Dynamic aspects of nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. EMBO Conference Series on Nuclear Structure & Dynamics. 2007.9 Montpellier, France
Tone S, Tanda K Sugimoto K Suda T Uehira K, Kanouchi H Samejima K Minatogawa Y, Earnshaw W C

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)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20398431