

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26650062

研究課題名(和文)分葉核形成誘導化合物2057による好中球様細胞へのダイレクトリプログラミング

研究課題名(英文)Direct reprogramming to neutrophil-like cells by the compound 2057 that induces lobulated nuclei

研究代表者

谷 時雄 (Tani, Tokio)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：80197516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、HeLa細胞の核を、好中球細胞に特徴的な分葉核状に変化させる化合物2057を同定した。本研究では、「HeLa細胞から好中球細胞への直接変換」が化合物2057処理により生じている可能性を検証した。2057処理により、HeLa細胞の顕著な遊走性上昇が観察されたが、好中球特異的表面抗原の発現や貪食活性の誘導は検出されなかった。また、2057による核分葉化機構を解析し、2057処理によるProtein Kinase Cの活性化により細胞骨格Tubulinの分布変化が誘導され、核膜裏打ちタンパク質ラミンA/Cの分布変化との協働作用によって、核の分葉化が生じている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We identified the compound 2057 that induced the formation of the lobulated nuclei, a typical morphology of neutrophil nuclei, in HeLa cells. In this study, we tested the possibility that the compound 2057 triggers the direct reprogramming of HeLa cells to neutrophil-like cells. After the treatment with 2057, we could not detect the expression of the surface antigens specific to the neutrophil cells, although enhanced cell motility was observed in HeLa cells. Our results suggest that 2057 activates Protein Kinase C, leading to the aberrant polymerization of the tubulin and delocalization of Lamin A/C, and induces the lobulation of the nuclei in HeLa cells.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：分葉核 好中球 化合物 チューブリン ラミン

## 1. 研究開始当初の背景

動物細胞において、遺伝情報をコードするゲノム DNA は、脂質二重膜である核膜に包まれて核構造を形成している。ほとんどの細胞では、核は円形もしくは楕円形の袋状を呈している。細胞周期の間期において、細胞内で核が球形や楕円袋状の形態を保つしくみは明らかになっていない。

また、真核細胞の核内は、クロマチンが均一に広がる空間ではなく、多数の核内構造体によって高度に区画化されている。遺伝子の転写、スプライシング、mRNA 核外輸送などの反応は、核スペckル、Cajal ボディ、PML ボディ、PcG ボディといった様々な核内構造体によって形成される核内微小空間場において、お互いの反応を密接に連携させながら進行していると考えられている。我々は、PcG ボディを始めとするこれら核内構造体の構築に影響を与える天然化合物を、放線菌培養上清ライブラリーのスクリーニングにより分離し、それらを用いて、核内構造体の形成機構とその機能について研究を進めている。約 5,000 種類の放線菌培養上清サンプルをスクリーニングする過程で、一種類の培養上清サンプル 2057-9a が、HeLa 細胞の楕円形の核を 1 時間という短時間の処理で、分葉状に大きく形態変化させることを見いだした (図 1)。分葉状の核は、造血幹細胞から分化成熟した好中球細胞に特異的に見られる核形態である。スクリーニングに用いたヒト HeLa 細胞は上皮性の子宮頸部癌由来の細胞なので、分葉核形成は通常の培養では全く観察されない。

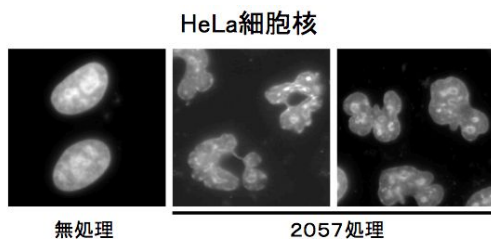


図1 2057処理により分葉核が形成される (DAPIによる核染色を示す)

我々は、放線菌培養上清サンプル 2057-9a から HeLa 細胞における分葉核形成を指標として、活性化化合物を分離精製し、その構造を決定した (2057、環状ジペプチド構造)。驚いたことに、化合物 2057 は、HeLa 細胞の核を極めて短時間に好中球様の分葉核に変化させるだけでなく、細胞の遊走性を好中球様に顕著に高めることが判明した。これらの知見から、化合物 2057 処理により、上皮性癌

細胞から免疫担当細胞の一種である好中球細胞へのダイレクトリプログラミング (直接変換) が引き起こされた可能性を考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、「子宮頸部由来癌細胞から好中球細胞への直接変換」が化合物 2057 処理により生じていることをいくつかの観点から検証するとともに、化合物 2057 の作用機構を解明する。

## 3. 研究の方法

HeLa 細胞 (上皮性癌細胞) を化合物 2057 で処理して誘導される分葉核細胞が、HeLa 細胞から好中球細胞へとダイレクトリプログラミングされた細胞であることを検証するため、(1) CD11b などの好中球特異的表面抗原が分葉核細胞で発現しているか検証する、(2) HeLa 細胞の遺伝子発現パターンから好中球細胞特異的な遺伝子発現パターンに変化しているか検証する、(3) 好中球に特徴的な大腸菌等に対する強い貪食活性が誘導されているか、(4) 細胞の遊走性が亢進しているか、について検証する。また、(5) 化合物 2057 の核形態に与える作用機構を解明するため、PKC 阻害アッセイを行うと共に、処理した細胞の核膜ラミンやチューブリンの分布変化を免疫染色によって解析する。

## 4. 研究成果

(1) 好中球特異的表面抗原 CD11b、CD43、CD63 が発現してくるか、2057 で HeLa 細胞を処理し 24 時間後に、western blot と抗体染色によって解析したが、コントロールの HL60 分化誘導細胞と比較してこれら表面抗原の有意な発現は検出されず、少なくとも 24 時間処理では好中球特異的表面抗原の発現は誘導されないと結論した。HL60 細胞の好中球への分化誘導には、4 日~6 日かかるので、2057 処理を同様に長時間行って発現状態を解析する必要がある。

(2) HeLa 細胞を 2057 で処理し、24 時間後に好中球細胞への分化マーカーとなるいくつかの遺伝子について、その発現を RT-PCR によって解析した。C-Jun と HMOX2 (Heme oxygenase) 遺伝子については、HL60 細胞から好中球細胞への分化誘導時と類似した遺伝子発現の上昇が見られたが、誘導時に発現が低下する C/EBP $\gamma$  では類似した変化は検出されなかった。発現解析については、次世代シーケンサー等を利用したゲノムスケール

での発現解析が今後必要である。

(3) 2057 で処理した HeLa 細胞における貪食作用の誘導を、GFP を発現する大腸菌を用いてアッセイした。処理後 2 時間から 24 時間の細胞では、特に顕著な貪食作用の亢進は検出されなかった。誘導時間が不足している可能性があるため、表面抗原と同様、より長期間 (4 日~6 日) 処理後の細胞で今後解析する予定である。

(4) 2057 で処理した HeLa 細胞の遊走性変化の定量化は、8  $\mu\text{m}$  の孔が開いたメンブレンを通過して 0.1% FBS / DMEM 培地から 10% FBS / DMEM 培地へと移動した細胞数を計測する事で行った。遊走性アッセイの結果、無処理細胞と比較し、2057 処理細胞では 3.18 倍もの遊走性上昇が再現性良く観察された。2057 で HeLa 細胞を処理すると、遊走性が大幅に上昇することが結論された。

興味深いことに、タイムラプス解析を行ったところ、2057 処理細胞では、処理後 30 分程度から核の分葉化が誘導された。処理後約 10 時後からは、浸潤突起に類似した突起状の構造体を形成するなど、細胞形態の顕著な変化が生じ、それと同時に、細胞の遊走性が誘発されることが示された (図 2)。

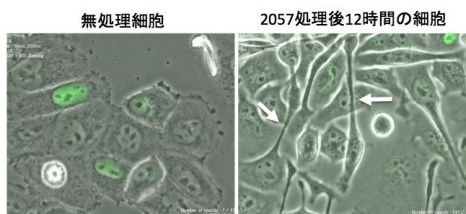


図2 化合物2057によるHeLa細胞の形態変化 (矢印は突起状構造体を示す)

(5) 化合物 2057 は、その化学構造から、Protein Kinase C (PKC)の活性促進活性がある可能性が考えられた。2057 の核形態に与える作用機構を解明するため、PKC の特異的阻害剤である Staurosporine で細胞を 2057 と同時に処理したところ、核分葉化活性が強く阻害され、PKC の下流に 2057 による核分葉化機構があることが示唆された。

次に、PKC 活性化による特異的遺伝子の転写が 2057 による核分葉化誘導に必要であるか検証するため、DRB、 $\alpha$ -amanitin などの転写阻害剤で細胞を二重処理したが、核分葉化活性に影響はなかった。また、タンパク質への新規翻訳が核分葉化活性に必要であるか調べるため、翻訳阻害剤シクロヘキシミドで処理したが、同様に核分葉化活性に影響は観察されなかった。これらの結果から、2057 による核分葉化誘導には、処理後の新規な遺伝子発現は必要でないことが結論された。即

ち、2057 が PKC を介して何らかの基質タンパク質の過剰リン酸化を引き起こし、核の分葉化を誘導していることが推測された。

そこで、核形態変化への関連が予測される細胞骨格 Actin と Tubulin に対する阻害剤との同時処理による影響を解析した。 $\beta$ -actin の重合阻害剤としては Cytochalasin B (10  $\mu\text{M}$ ) を、Tubulin の重合阻害剤としては Nocodazole (30  $\mu\text{M}$ ) を用いた。HeLa 細胞をそれらの細胞骨格重合阻害剤で 1 時間処理した後に、2057 との二重処理を 2 時間行ったところ、Cytochalasin B では活性に影響は出なかったが、Nocodazole で二重処理すると核分葉化が強く阻害された。この結果から、2057 による核分葉化には、Tubulin が関わることを示唆された。また、抗体染色による解析を行ったところ、2057 処理細胞では 2057 処理によって、Tubulin が分葉化核の「くびれ」部分に集積することが示された (図 3)。-Tubulin は PKC

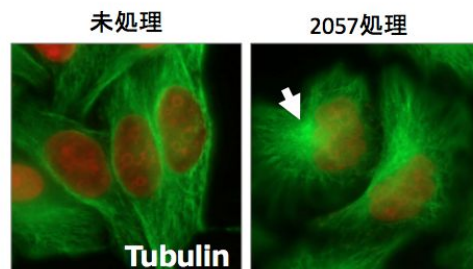


図3 2057処理細胞では、核分葉化部位 tubulinが異常蓄積する。

によってリン酸化され MCF 細胞の遊走性を上昇させることが知られている (Abeyweera et al., 2009)。以上の結果から、2057 処理で活性化された PKC によって Tubulin が過剰にリン酸化された結果、核分葉化につながる Tubulin 細胞骨格の変化を誘導している可能性が考えられた。

真核細胞の核内において、転写が抑制されているヘテロクロマチン状態のクロマチンは核膜周辺部に分布している。一方、転写が行われているユークロマチン状態のクロマチンは核膜孔周辺と核の中心付近に分布する。2057 処理による核分葉化誘導に伴い、ヘテロクロマチンの核内分布が変化している可能性が考えられた。そこで、ヘテロクロマチン (H3K9me2, H3K27me3) とユークロマチン (H3K4me3, H3K36me3, H3K9 / K27ac) に特徴的なヒストン修飾を蛍光免疫染色により可視化し、それらの局在変化を観察した。

未処理細胞 において免疫染色を行うと、ユークロマチンに特徴的なヒストン修飾は核の内側に、ヘテロクロマチンに特徴的なヒ

ストン修飾は核膜周辺部で観察された。化合物処理により形態が変化した核では、ユークロマチンに特徴的なヒストン修飾の核内分布に顕著な変化は観察されなかった。一方、ヘテロクロマチンに特徴的な H3K9me2 や H3K27me3 は、核のくびれ部位において染色シグナルが減弱していた。即ち、2057 による核形態変化はヘテロクロマチン領域の分布を変化させる事が明らかになった。

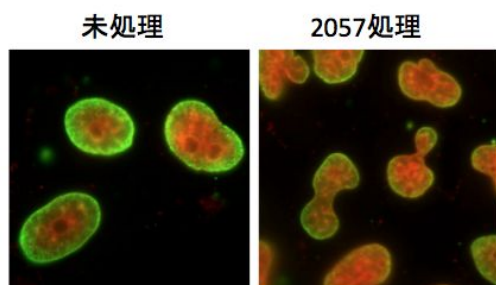


図4 分葉核のくびれ部位ではヒストン修飾(H3K9me2)が減少する。緑: 抗H3K9me2抗体染色、赤: DNA染色。

2057 処理細胞では、申請書にも記載のとおり、核膜裏打ちタンパク質であるラミン A/C の核膜分布が部分的に減少する(図5)。これらの解析結果から、PKC 活性の促進によりリン酸化が亢進した Tubulin 細胞骨格と核膜裏打ちタンパク質ラミン A/C の協働作用によって、核の分葉化が生じるモデルを提唱するに至った。今後、このモデルを検証する解析を進める予定である。

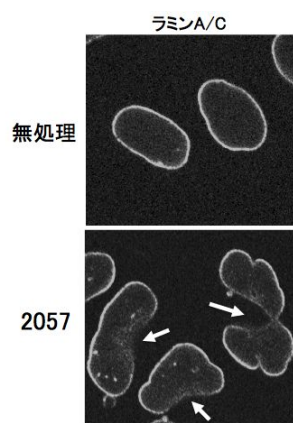


図5 2057処理によるラミンA/Cの核膜分布変化と分葉核化

#### <引用文献>

(1) Abeyweera, T.P., Chen, X., and Rotenberg, S.A. Phosphorylation of  $\alpha$ 6-Tubulin by protein kinase C $\alpha$  activates motility of human breast cells. *J. Biol. Chem.*, 284, 17648-17656, 2009.

#### 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1件)

Takashi Ideue, Yukiko Cho, Kanako

Nishimura and Tokio Tani. Involvement of satellite I non-coding RNA in regulation of chromosome segregation.

*Genes to Cells*, 19, 528-538 (2014), 査読有り, DOI: 10.1111/gtc.12149

〔学会発表〕(計5件)

平田久峰、五十嵐雅之、谷時雄. HeLa 細胞核の分葉化を誘導する化合物 2057 の解析. 第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Hisataka Hirata, Masayuki Igarashi, Tokio Tani. Characterization of compounds that induce formation of lobulated nuclei in HeLa cells. 2<sup>nd</sup> International Symposium for ISMCBC、2014 年 11 月 30 日～12 月 1 日、ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本県南阿蘇村)

Chiaki Tanaka, Kohta Sadoh, Hisataka Hirata, Masayuki Igarashi, Tokio Tani.

Screening of natural compounds that affect the formation of the Polycomb group body in HeLa cells. 2<sup>nd</sup> International Symposium for ISMCBC、2014 年 11 月 30 日～12 月 1 日、ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本県南阿蘇村)

Kohta Sadoh, Hisataka Hirata, Chiaki Tanaka, Aki Fukunaga, Hayato Ishikawa, Masayuki Igarashi, Tokio Tani.

Trichostatin A induces dispersion of the Polycomb group body involved in gene regulation in eukaryotic cells.

2014 年 11 月 30 日～12 月 1 日、ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本県南阿蘇村)

平田久峰、五十嵐雅之、谷時雄.

HeLa 細胞核の分葉化を誘導する化合物の同定と解析.

第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会合同開催. 2014 年 12 月 15 日～17 日、安芸グランドホテル(広島県廿日市市)

〔図書〕(計0件)

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/bio/staff/tani/index.htm>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

谷 時雄 (TANI, Tokio)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80197516

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：