

核小体ダイナミクスと分裂期進行および
分裂期染色体構造との関係についての研究

2018年1月

林 優樹

核小体ダイナミクスと分裂期進行および
分裂期染色体構造との関係についての研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（生物工学）学位論文

林 優樹

目次

第一章 序論	1
第二章 核小体ダイナミクスと分裂期進行の関係についての研究	
2.1 要旨	7
2.2 序	8
2.3 結果	9
2.4 考察	18
2.5 実験材料および方法	23
2.6 参考文献	28
2.7 図表	31
第三章 核小体に由来する PR 構造の解析	
3.1 要旨	61
3.2 序	62
3.4 結果	64
3.5 考察	68
3.6 実験材料および方法	70
3.7 参考文献	74
3.8 図表	76
第四章 総括	94
謝辞	98

第一章

序論

1.1 核小体はリボソーム合成の場として機能する

核小体は真核生物の核内における最大の構造体であり、head-to-tail にタンデムに並んだりボソーム DNA (rDNA) 領域の周囲に形成される。核小体の基本的な機能はリボソーム生合成の場であり、リボソーム生合成は核小体内における 3 つのステップを経て合成される。第一段階は、rDNA を鋳型とした RNA ポリメラーゼ I (Pol I) による rRNA 前駆体 (pre-rRNA) の転写である。第二段階は pre-rRNA の転写後修飾や不要な部分の切断によって、成熟した rRNA (18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA) に変換するプロセシングである。第 3 段階は、これらの成熟した rRNA とリボソームタンパク質や Pol III 由来の 5S rRNA と組み合わせてリボソームを構築するアッセンブリーである(1)。

このようにリボソームは核小体における複雑なプロセスを経て合成されており、これらのプロセスは核小体内領域の形成に関係している。核小体には 3 つの核小体内領域が存在しており、内側から Fibrillar center (FC)、Dense fibrillary component (DFC)、Granular component (GC) と呼ばれる。これらの領域は電子顕微鏡や核小体タンパクを蛍光免疫染色により観察することで区別でき、それぞれの領域がリボソーム合成の異なる段階に関与していると考えられている。Pol I 転写は FC 領域と DFC 領域の境界で行われており、Pol I 転写に関与する因子は FC 領域に豊富に存在する。また、pre-rRNA のプロセシングの大部分は DFC 領域で行われており、GC 領域においてリボソームの構築が行われる。つまり、リボソーム生合成を核小体の内側から外側に向かって段階的に進行させていき、核小体内のそれぞれの領域が重要な役割を持つ(2)。

核小体は内部構造を持つ巨大な核内構造体であるが、生体膜を有していない。核小体の構築・維持には、核小体内における rRNA が重要な役割を果たす。rRNA、特に核小体内における pre-rRNA には二つの大きな特徴がある。第一に、pre-rRNA の転写量は細

胞全体の 50~80%の転写量を占めており、核小体内には絶えず大量の rRNA が存在すること。第二に、pre-rRNA から成熟 rRNA へのプロセッシングには 200 種類以上のタンパク質が関与しているということ。つまり、転写された大量の pre-rRNA は常に多数のプロセッシングタンパク質などと相互作用しており、その結果として巨大な RNA-タンパク質複合体を形成する。この複合体こそが核小体である。すなわち、rRNA は核小体タンパク質の足場となることで核小体の構築・維持に関与している(2)。このことは、核小体内における rRNA 量に応じて、核小体がダイナミックに変化することを示している。実際に、rRNA 転写を抑制すると、核小体タンパク質は核小体周辺部においてキャップ構造を形成したり、核質全体へ拡散したりすることが知られており、この大規模な核小体の構造変化を核小体崩壊と呼ぶ(3, 4)。一方、rRNA プロセッシング機能の欠損は、核小体内に pre-rRNA や rRNA 中間体を蓄積させ、核小体を肥大化させることが報告されている(5, 6)。

1.2 核小体はストレス応答のハブとして機能する

細胞に対する様々なストレスは核小体構造や組成を変化させることが多数報告されている。例えば、細胞が DNA ダメージを受けると、Pol I 転写が抑制され、核小体における rRNA 量が低下する。その結果、核小体タンパク質が核小体領域にキャップ構造を形成したり、核質へ拡散したりする(7)。我々の先行研究および他の研究グループが、核質に局在変化した複数の核小体タンパク質が異なる経路を用いて、がん抑制タンパク質 p53 の活性化を引き起こすことを明らかにした(4, 8-13)。また、p53 の活性化に加えて、核質移行した核小体タンパク質がオートファジー(14, 15)や細胞分化(16, 17)を誘導することも示唆されている。このような核小体の動態変化に伴う多様な細胞プロセスの誘導

は、リボソーム生合成の変化に直接依存してないことから、核小体はその動態を変化させることでストレス応答のハブとして機能することが明らかになりつつある。

1.3 細胞周期と核小体構造の関係について

核小体は間期において非常にスタティックな構造体であるが、分裂期（M期）においてはその構造をダイナミックに変化させる(1)。M期前期（prophase）において、cyclin依存性キナーゼである Cdk1 が rRNA 転写に関与する SL1 複合体や TTF-1 というタンパク質をリン酸化する。その結果、これらの因子は rDNA 上より解離し、Pol I 転写機構が解体され、Pol I 転写が抑制される。上述した通り、Pol I 転写の抑制に伴い、多くの核小体タンパク質は細胞質全体へと拡散するが、一部の核小体タンパク質ならびに一部の rRNA は M 期染色体表層に蓄積し、perichromosomal region (PR) という構造を構築する。M 期が進行し、M 期後期（anaphase）になると、nucleolar-derived foci (NDF) という凝集体が細胞質において形成される。さらに M 期終期（telophase）において、NDF に含まれる因子が染色体上へ徐々に移行し、pre-nucleolar body (PNB) という構造を構築する。その後、M 期染色体の脱凝縮に伴い PR 構造に局在する因子が PNB に集まり、核小体が再構成される。このように核小体は M 期においてダイナミックにその構造を変化させることが知られているが、M 期開始時における構造変化やそれに伴って構築される PR 構造の機能ならびに生物学意義については理解が進んでいない。本論文では、核小体と M 期の関係を調べるにあたり、1)核小体ダイナミクスと M 期進行の関係、2)M 期染色体表層構造についての 2 つの研究を行い、その内容について記載する。

参考文献

1. F.-M. Boisvert, S. van Koningsbruggen, J. Navascués, A. I. Lamond, The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574–585 (2007).
2. B. McStay, Nucleolar organizer regions: genomic “dark matter” requiring illumination. *Genes Dev.* **30**, 1598–1610 (2016).
3. X. Yuan *et al.*, Genetic Inactivation of the Transcription Factor TIF-IA Leads to Nucleolar Disruption, Cell Cycle Arrest, and p53-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell.* **19**, 77–87 (2005).
4. T. Kuroda *et al.*, RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A. *EMBO J.* **30**, 1054–1066 (2011).
5. T. Kumazawa *et al.*, Gradual reduction in rRNA transcription triggers p53 acetylation and apoptosis via MYBBP1A. *Sci. Rep.* **5**, 10854 (2015).
6. K. Nishimura *et al.*, Perturbation of Ribosome Biogenesis Drives Cells into Senescence through 5S RNP-Mediated p53 Activation. *Cell Rep.* **10**, 1310–1323 (2015).
7. S. Boulon, B. J. Westman, S. Hutten, F.-M. Boisvert, A. I. Lamond, The Nucleolus under Stress. *Mol. Cell.* **40**, 216–227 (2010).
8. V. Marechal, B. Elenbaas, J. Piette, J. C. Nicolas, A. J. Levine, The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7414–7420 (1994).
9. J. D. Weber, L. J. Taylor, M. F. Roussel, C. J. Sherr, D. Bar-Sagi, Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* **1**, 20–26 (1999).
10. R. Y. L. Tsai, R. D. G. McKay, A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev.* **16**, 2991–3003 (2002).
11. M.-S. Dai, H. Lu, Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J. Biol. Chem.* **279**, 44475–44482 (2004).

12. S. Fumagalli *et al.*, Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* **11**, 501–508 (2009).
13. S. Bursać *et al.*, Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 20467–20472 (2012).
14. G. Kreiner *et al.*, A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death Differ.* **20**, 1455–1464 (2013).
15. N. Katagiri *et al.*, The nucleolar protein nucleophosmin is essential for autophagy induced by inhibiting Pol I transcription. *Sci. Rep.* **5**, 8903 (2015).
16. Y. Hayashi *et al.*, Downregulation of rRNA transcription triggers cell differentiation. *PLoS ONE.* **9**, e98586 (2014).
17. Q. Zhang, N. A. Shalaby, M. Buszczak, Changes in rRNA Transcription Influence Proliferation and Cell Fate Within a Stem Cell Lineage. *Science.* **343**, 298–301 (2014).

第二章

核小体ダイナミクスと分裂期進行の 関係についての研究

2.1 要旨

核小体はリボソーム生合成の場であり、その構造はリボソーム RNA (rRNA) の転写量と密接に関係している。分裂期 (M 期) では、M 期開始と同時に rRNA 転写が抑制されることで核小体が消失する。しかしながら、このような M 期におけるダイナミックな核小体の構造変化と M 期進行の関係についてはよく分かっていない。

我々は M 期進行と核小体の関係を解析するために、595 種類の核小体タンパク質に対する siRNA スクリーニングを行い、M 期の異常を誘導する因子を探索した。その結果、Nucleolar protein 11(NOL11)という核小体タンパク質に注目した。NOL11 をノックダウン (KD) すると、間期における rRNA 転写量の低下および核小体の崩壊、また、M 期細胞の増加ならびに M 期の開始が顕著に遅延することを明らかにした。M 期の開始に必須である Cdk1 の活性化機構を調べたところ、興味深いことに Cdk1 の抑制的リン酸化が増加し、同調解除後もそのリン酸化は維持されたままであった。さらに我々はこれらの原因が Wee1 の異常な蓄積であることを突き止めた。研究室内外のこれまでの研究より、間期における核小体崩壊は様々な細胞プロセスに関与することから、NOL11 の KD 時における間期核小体崩壊が Cdk1 の活性化を抑制していると考えた。そこで、rRNA 転写に関与する TIF-IA や UBF を KD し、間期核小体崩壊を誘導した。これらの因子の KD 時すると、NOL11 の KD 時と同様に M 期開始が顕著に遅延し、Cdk1 の抑制的リン酸化が増加や Wee1 の異常な蓄積が生じることを明らかにした。

以上の結果から、間期において核小体構造を維持することが、Wee1 量の制御を介して、適時に Cdk1 活性化に重要であることが示された。つまり、細胞周期の進行と核小体ダイナミクスとの間には密接な関連があると考えられる。

2.2 序

序論でも述べた通り、核小体は非常にダイナミックな構造であり、細胞周期の進行とともにその動態を変化させる。間期においては、ユビキチン化や SUMO 化、リン酸化などの翻訳後修飾に関与する酵素が核小体に局在している。このような酵素は細胞周期に応じた核小体構造変化によって局在が変化し、細胞周期の進行に寄与すると考えられている。その例として、Cdc14B (1)および PP1 γ (2)がよく知られている。いずれのタンパク質もホスファターゼ活性をもち、G2/M 期チェックポイントや M 期染色体の分離に関与している。つまり、M 期開始時において、核小体が解体され、核小体に局在していたタンパク質が異なる場所で機能し、細胞周期を正常に進行させると考えられる。これまでの研究から、核小体には 700 種類以上のタンパク質が局在しており、それらの中には細胞周期の制御や DNA 複製、DNA 修復に関与するものが多数含まれている (3)。したがって、M 期において核小体の解体を通して、タンパク質がその局在を変化させて細胞周期の進行を制御する可能性が考えられる。

本研究では、核小体タンパク質に対する RNAi スクリーニングを行い、nucleolar protein 11 (NOL11)に着目した。NOL11 を KD すると間期において rRNA 転写量が低下し、核小体崩壊が生じた。また、M 期の開始が顕著に遅延することも明らかとなった。特筆すべきことに、M 期開始の遅延は核小体崩壊を引き起こす他の rRNA 転写因子を KD しても生じることを見出した。我々の結果は、細胞周期と核小体構造との間の時間的な整合性が、適切なタイミングでの M 期開始に重要であることを示している。

2.3 結果

NOL11 の KD は間期における核小体崩壊および M 期開始の遅延を引き起こす

近年の研究から、核小体は細胞周期を含む多様な機能に関与することが示唆されている(4-6)。はじめに、我々は定量的プロテオミクスより同定された核小体タンパク質のうち(3)、595 種類の核小体タンパク質に対する siRNA を HeLa 細胞にトランスフェクションし、スクリーニングを行った。その結果、NOL11 を見出した。NOL11 はこれまでに rRNA 転写やプロセッシングに関与することが報告されており(7, 8)、実際に、NOL11 を KD することで rRNA 転写量が低下した (Figure 1)。加えて、NOL11 を KD した細胞では、核小体マーカーである Nucleolin (NCL)が核小体から核質全体に拡散していることを明らかにした (Figure 2)。つまり、NOL11 は間期において rRNA 転写に関与しており、KD することにより核小体崩壊を誘導することが示された。

これまでに NOL11 と細胞周期との関係については報告がなされていなかったため、我々は NOL11 を KD し、さらにチミジン処理することで細胞を G1/S 期に同調させた。NOL11 を KD した細胞においても、同調解除後における 0~9 時間目までの細胞周期の進行にはほとんど変化が見られなかったことから、DNA 量が 2N (G1 期)から 4N (G2/M 期)への進行は NOL11 の KD よってほとんど影響されないことが示唆された (Figure 3)。しかし、同調解除後 9~12 時間目において、control 細胞は再び G1 期へ戻っているのに対して、NOL11 を KD すると G2/M 期に細胞が蓄積したままであった (Figure 3)。そこで、我々はより詳細に細胞周期の進行における NOL11 の KD の影響を調べるために、核酸染色試薬である Plopidium Iodide (PI)と anti-cyclin B1 抗体あるいは anti-MPM2 抗体、anti-H3-pS10 抗体とを用いた二重染色を行い、フローサイトメーターを用いて細胞周期の進行を 2 次元的に解析した (Figure 4)。Control 細胞は G1/S 期からの同調

解除後 9 時間目において M 期の代表的なマーカーであるヒストン H3ser10 のリン酸化 (H3-pS10)陽性細胞が急激に増加した (Figure 4 青色)。一方、NOL11 を KD すると 9 時間目における H3-pS10 陽性細胞はほとんど増加せず、10.5 時間以降に増加していた。これらの結果は、NOL11 の KD により、M 期の開始が遅延していることを示している。さらに、M 期のマスターキナーゼである Cdk1 によってリン酸化されたタンパク質を示す MPM2 エピトープの陽性細胞の増加パターンは control 細胞および NOL11-KD 細胞のいずれにおいても H3-pS10 の増加パターンと非常に類似していた (Figure 4 灰色)。注目すべきこととして、同調解除後 0~9 時間における Cdk1 の活性化に必要な cyclin B1 の増加パターンは、control 細胞と NOL11-KD 細胞との間にほとんど差がみられなかった (Figure 4 橙色)。

さらに、我々は Cdk1 の特異的な阻害剤である RO-3306(9)を用いることで細胞を M 期の直前に同調し、G2-M 期移行段階過程における DNA 量と MPM2 エピトープ量の 2 次元解析を行なった (Figure 5)。同調解除前においては、control 細胞および NOL11-KD 細胞のいずれにもおいても MPM2 陽性細胞の割合は低いままであった。Control 細胞において同調を解除すると、急激に MPM2 エピトープ陽性細胞が増加し、1 時間で 50%の細胞が MPM2 陽性細胞となった。その後、徐々に MPM2 陽性細胞の割合が低下した (Figure 5)。一方、NOL11-KD 細胞においては、同調解除後、MPM2 陽性細胞の割合は 6 時間に渡ってゆっくりと増加した。以上の結果から、我々は NOL11 の KD は cyclin B1 の発現量には影響を及ぼさないが、Cdk1 の活性化を抑制し、M 期開始を遅延させていると考えた。

NOL11-KD 細胞では Cdk1 の抑制的リン酸化が増加し、cyclin B の核移行が遅延する

Cdk1 の活性化には、cyclin B と Cdk1 とが複合体を形成することに加えて、Cdk1 の抑制的リン酸化を除去する必要がある。Figure 4 の結果から、NOL11 の KD 時には cyclin B1 の発現量にほとんど差がないことが示唆された。そこで、我々は Cdk1 の抑制的リン酸化状態を調べるために、細胞を M 期直前に同調し、イムノブロッティングを用いて Cdk1 のリン酸化について解析した。Control 細胞および NOL11-KD 細胞のいずれにおいても、同調時に cyclin B1 の発現量にほとんど差が見られないことから、Figure 4 と同様に NOL11 の KD は cyclin B1 の発現にはほとんど影響がないことが明らかとなった。また、同調時における Cdk1 の抑制的リン酸化を示す 15 番目のチロシンのリン酸化 (Cdk1-pY15) は control において非常に低く、ほとんど検出できなかった (Figure 6)。同調を解除すると、Control 細胞において cyclin B1 が時間依存的に減少していることは、cyclin B1 が M 期後半で分解されていることを示しており、細胞が正常に M 期へ進行していることを意味している。一方、NOL11 を KD すると、時間依存的な cyclin B1 量の低下が見られないことに加え、同調解除前の時点において Cdk1-pY15 レベルが顕著に増加していた。さらに、Cdk1-pY15 レベルは同調解除後も高いレベルが維持されたままであった。つまり、NOL を KD すると Cdk1 の抑制的リン酸化が増大し、Cdk1 の活性化を抑制していると考えられる。

cyclin B の核移行は Cdk1 の急激な活性化に必要であり、M 期の開始時の核膜崩壊 (Nuclear envelop breakdown; NEBD) や染色体凝縮に不可欠である(10)。そこで、我々は G2 期-M 期移行過程における cyclin B1 の局在について解析を行った。RO-3306 を用いて細胞を M 期直前に同調した際には、control 細胞および NOL11-KD 細胞のいずれにおいても、核内に cyclin B1 はほとんど局在していなかった。同調を解除すると、control 細胞では急速に cyclin B1 の核移行が生じ、10 分後において約 70% の細胞が核内に cyclin

B1を有しており、60分後には80%以上の細胞で cyclin B1 の核局在が観察された (Figure 7 および Figure 8)。一方、NOL11 を KD すると cyclin B1 の核移行が著しく遅延しており、同調解除後 60 分においても 40%程度の細胞でのみ cyclin B1 の核局在が観察された。cyclin B1 の核移行と同様に NEBD が生じた細胞の割合も NOL11-KD 細胞において低下していることから (Figure 7 および Figure 8)、cyclin B1 の核移行およびそれに続く核内における M 期のイベントは NOL11 を KD することで著しく遅延することが示された。

以上をまとめると、NOL11 の KD による M 期開始の遅延は、Cdk1 抑制的リン酸化の増加および cyclin B1 の核移行の遅延が原因であることが明らかとなった。

核小体崩壊が M 期遅延を引き起こす

先に述べたように NOL11 の KD は M 期開始を遅延させるだけでなく、間期において pre-rRNA 量を低下させ、核小体崩壊を引き起こした。我々の先行研究および他の研究グループから、間期における核小体崩壊は p53 依存的な細胞周期の停止やアポトーシス、オートファジー、細胞分化といった様々な細胞イベントを誘導することが報告されている(11-13)。このように核小体構造の変化が様々な細胞イベントに関与することから、NOL11-KD 時にみられる間期核小体崩壊が M 期開始を遅延させるのではないかと考えた。この可能性を検証するために、我々は rRNA 転写の転写因子である transcription initiation factor IA (TIF-IA)および upstream binding factor (UBF)に対する siRNA を用いて核小体崩壊を誘導した(Figure 9)。そして、TIF-IA や UBF の KD 時における M 期開始に及ぼす影響を調べた。はじめに、TIF-IA および UBF を KD 時における G1/S 期同調からの細胞周期の進行を PI および anti-H3-pS10 抗体を用いて解析した。同調解除後 9 時間

目において、control 細胞では約 40%の細胞が M 期細胞であったが、TIF-IA や UBF を KD した細胞では 10%ほどが M 期細胞であった (Figure 10)。同調解除後 10.5 時間においては、いずれの細胞群においても同程度の M 期細胞が検出されたことから、TIF-IA や UBF の KD においても M 期開始が遅延することが示された。さらに TIF-IA や UBF の KD は NOL11-KD 時と同様に、Cdk1 の抑制的リン酸化のを増加させ(Figure 11)、cyclin B1 の核移行の遅延させた(Figure 12)ことから、間期における核小体崩壊は M 期開始を遅延させる原因となることが示唆された。

核小体崩壊は M 期開始の遅延を引き起こす主要原因である

しかし、NOL11 や TIF-IA、UBF を KD した細胞における M 期開始の遅延が、タンパク質合成量の低下によって引き起こされる可能性が考えられた。なぜなら、rRNA 転写や rRNA プロセッシングはリボソーム生合成に関与しており、rRNA の転写やプロセッシングが抑制されるとタンパク質合成量が低下する可能性があるためである。そこで、我々は核小体崩壊あるいはタンパク質合成量の低下のどちらが M 期開始の遅延を引き起こす原因となるかを調べるために、核小体崩壊が生じる条件および生じない条件におけるタンパク質合成量の測定を試みた。これまでに、rRNA プロセッシング因子の KD は核小体崩壊が生じないことが報告されている(14)ので、我々は rRNA プロセッシング因子を KD することで核小体崩壊を生じさせずに、タンパク質合成量が低下すると考えた。実際に、rRNA プロセッシング因子である PES1、DKC1、RRP5 の KD 時 (Figure 13)において、核小体マーカーである NCL の局在は control 細胞とほとんど変化しなかった (Figure 14)。続いて Cdk1 の抑制的リン酸化を調べたところ、TIF-IA の KD で増加する抑制的リン酸化は、rRNA プロセッシング因子の KD 時に増加は見られなかった(Figure 15)。また、G1/S

期同調解除後の M 期開始を解析したところプロセッシング因子を KD 時しても M 期開始の遅延しなかった (Figure 16)。次に、我々はアミノ酸のアナログである L-Homopropargylglycine (HPG)を細胞に取り込ませ、新規タンパク質合成量を解析した。その結果、核小体崩壊を引き起こす NOL11、TIF-IA、UBF の KD 時および核小体崩壊を引き越さない PES1 および DKC1 の KD 時において、同程度のタンパク質合成量の低下が見られた (Figure 17)。これらの結果から、タンパク質合成量の低下と M 期開始の遅延との間には関連がないと考えられる。

しかし、rRNA 転写の抑制自体が M 期開始の遅延を引き起こす可能性が考えられたため、我々は核小体崩壊を生じさせずに、rRNA 転写を抑制することを試みた。これまでに、ヒト細胞および酵母において Ribosomal protein L11 (RPL11)を KD することで核小体内に rRNA が蓄積することが報告されている(11, 15)。そこで、我々は NOL11 あるいは TIF-IA の KD と同時に、RPL11 を KD することで、rRNA 転写が阻害されても rRNA 輸送を抑制することで核小体構造を維持されるかどうかを調べた。NOL11 や TIF-IA を KD すると、核小体マーカーである NCL が核小体から核質へ広がっていた (Figure 18)。一方、NOL11 あるいは TIF-IA と RPL11 を同時に KD した際には、NCL の核質への拡散が抑制された。続いて、我々は核小体崩壊が抑制された際の Cdk1 の抑制的リン酸化状態について調べた。その結果、核小体崩壊を引き起こす NOL11 や TIF-IA を KD 時には Cdk1-pY15 が増加していたが、RPL11 を同時に KD することで Cdk1-pY15 の増加が抑制された (Figure 19)。したがって、核小体崩壊時における M 期開始の遅延は、タンパク質合成や rRNA 転写量の低下によるものではなく、核小体崩壊そのものが原因であることが示された。

核小体崩壊時における M 期開始の遅延は G2/M チェックポイントによるものではない

M 期開始の遅延には 2 つの理由が考えられる。1 つ目は M 期開始に必要な因子の活性化が抑制されること、2 つ目は DNA ダメージなどによって、G2/M チェックポイントが活性化することである。これらのうち、後者の G2/M チェックポイントは Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) や Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein (ATR) の活性化によって制御されている。ATM や ATR が活性化すると Checkpoint kinase 1 (Chk1) や Checkpoint kinase 2 (Chk2) をリン酸化し、続いてこれらのキナーゼが Cdc25 ホスファターゼをリン酸化することで、その活性を抑制する。その結果、Cdk1 の抑制的リン酸化が脱リン酸化されず、G2 期に細胞周期が停止する(16)。我々は核小体崩壊が G2/M チェックポイントを活性化し、M 期開始を遅延させるのではないかと考えた。そこで、Chk1 の活性化状態および DNA ダメージの有無を調べた。DNA ダメージを誘導する Etoposide を処理すると、活性型 Chk1 を示す Chk1 の 317 番目のセリンのリン酸化 (Chk1-pS317) の量が増加した (Figure 20)。しかし、核小体崩壊を誘導する NOL11、TIF-IA、UBF KD の際には、Chk1-pS317 は検出されなかった。また、蛍光免疫染色を用いて DNA 二本鎖切断を示すヒストン H2AX のリン酸化 (γ H2A.X) を観察したところ、Etoposide 処理によって γ H2A.X シグナルは顕著に増加したが、核小体崩壊時が生じた細胞と control 細胞との間に違いは見られなかった (Figure 21)。以上の結果から、我々は核小体崩壊時に見られる M 期開始の遅延は G2/M チェックポイントとは独立して生じることを明らかにした。

核小体崩壊は Wee1 キナーゼの異常な蓄積させ、M 期開始の遅延を引き起こす。

次に我々は核小体崩壊がどのように Cdk1 の活性化に影響をおよぼすかについて調べ

た。Cdk1-pY15 は Wee1 および Myt1 の 2 つのキナーゼと Cdc25 ホスファターゼファミリーのバランスによって制御される(17)。Myt1 の機能についてはよくわかっていないが、Wee1 の阻害剤、Wee1 に対する siRNA、Wee1-KO マウスに関する報告から、Wee1 機能が損なわれると M 期開始が早熟に生じることが明らかとなっている(18-20)。また、G2-M 期の移行過程において Wee1 はユビキチン化依存的にプロテアソームによって分解され、同時に Cdc25 が Cdk1-pY15 を脱リン酸化することで Cdk1 が活性化する。そこで、我々は RO-3306 を用いて細胞を M 期直前に同調させ、核小体崩壊時における Wee1 量および Cdc25 量について解析した。その結果、NOL11 や TIF-IA、UBF の KD によって核小体崩壊した細胞では、Cdk1-pY15 の増加に加えて、Wee1 が異常に蓄積していることを見出した (Figure 22)。しかし、3 つの Cdc25 ホスファターゼに関しては NOL11 や TIF-IA、UBF の KD によってわずかに変化したが、siRNA ごとの一貫した変化は見られなかった。さらに、核小体崩壊を引き起こさない rRNA プロセッシング因子の KD 時や核小体崩壊を抑制する RPL11 の KD 時のいずれにおいても Wee1 量は増加しなかった (Figure 23)。これらの結果から、核小体崩壊は Wee1 を異常に蓄積させることを明らかにした。Wee1 量は G1/S 期から細胞周期が進むにつれて、ユビキチン依存的にその量が低下することから(21)、次に我々は細胞周期の進行に伴う Wee1 量の変化について解析した。そこで、細胞を G1/S 期に同調したのち、M 期開始を防ぐために RO-3306 を含む培地に取り替えて細胞周期の進行を再開させた。その結果、control 細胞においては、Wee1 量は時間依存的に低下していったが、NOL11 や TIF-IA、UBF を KD すると Wee1 量の低下が見られなかった (Figure 24)。したがって、核小体崩壊は細胞周期の進行時において Wee1 を過剰に安定化させることが示唆された。

Wee1 キナーゼの活性阻害剤は核小体崩壊による M 期開始の遅延を回復させる

次に、我々は Wee1 の異常な蓄積が Cdk1 の抑制的リン酸化を増加させ、M 期開始の遅延を引き起こすかどうかを調べた。そのために、我々は Wee1 のキナーゼ活性阻害剤である MK1775 を用いた(22)。はじめに、MK1775 の最適濃度を調べるために、非同調時の細胞に対して、異なる濃度の MK1775 を 2 時間あるいは 9 時間処理した。その結果、いずれの時間においても 1 μ M の MK1775 を処理すると M 期細胞の割合が増加していたが、10 nM および 100 nM の MK1775 処理では M 期細胞の割合に変化は見られなかった (Figure 25)。次に 100 nM の MK1775 を用いて核小体崩壊時における Cdk1 の抑制的リン酸化について解析した。核小体崩壊を引き起こす NOL11 や TIF-IA、UBF を KD した際には Cdk1-pY15 レベルが増加したが、MK1775 を処理すると control と同程度にまで低下した(Figure 26)。さらに核小体崩壊時に生じる cyclin B1 の核移行の遅延が MK1775 を処理することで control と同程度にまで回復した (Figure 27)。加えて、G1/S 期同調解除後、9 時間目における M 期細胞の割合は NOL11 や TIF-IA、UBF を KD により低下したが、MK1775 処理することで control と同程度にまで増加することを明らかにした(Figure 28)。

これまでの結果から、間期における核小体崩壊は Wee1 を過剰に安定化し、その結果、Cdk1 活性化が抑制され、M 期開始を遅延させることが明らかとなった。

2.4 考察

間期での核小体崩壊は、Cdk1の抑制的リン酸化を増加させ、M期開始を遅延させる

我々はNOL11やTIF-IA、UBFをKDした際に生じる核小体崩壊がM期の開始を遅延させることを示した。M期開始はCdk1の活性化によって誘導され、Cdk1の活性化にはcyclin B1の発現増加およびCdc25ホスファターゼによるCdk1の抑制的リン酸化の除去が必要である(23)。

我々は間期の核小体崩壊はタンパク質合成量を低下させるが、細胞周期に伴うcyclin B1の蓄積には影響を及ぼさないことを示した。核小体崩壊時には、中程度のタンパク質合成量の低下が生じており、これは細胞内のリボソーム量が低下したためだと考えられる。rRNA転写が抑制されているのにも関わらず、タンパク質合成量が大きく低下しないのは、生理学的な条件においてリボソームの半減期が5~10日であるためと考えられる(24)。本研究では、siRNAのトランスフェクションから48~72時間の間に実験を行なっていることから、rRNA転写に関係する因子をKDしても大きくタンパク質合成量に変化しないと考えられる。さらに、RO-3306を用いてM期直前に細胞を同調させた実験において、核小体崩壊を引き起こしてもcyclin B1量に変化は見られなかった。しかし、核小体崩壊はCdk1-pY15量を増加させ、cyclin B1の核移行の遅延を引き起こすことを明らかにした。したがって、間期における核小体崩壊はcyclin B1量の発現量にはほとんど影響を及ぼさないが、Cdk1の抑制的リン酸化を増加させることでCdk1の活性化を抑制していると考えられる。

Cdk1-cyclin B複合体はXenopus卵抽出液(25)やヒト培養細胞(26)の研究からスイッチのようなプロセスを経て活性化する。Cdk1-cyclin B複合体が活性化に必要な閾値を超えると、細胞は急激にG2期からM期へと進行すると考えられている。これまでの報告

から Cdk1-pY15 の脱リン酸化がもっとも初期の閾値となることが示唆されており、cyclin B1 の核移行よりも前の段階で生じると考えられている(27)。仮に Cdk1 の抑制的リン酸化が G2 期において増加すると、M 期に進行するための閾値がより高いレベルへ移行し、より高い量の Cdk1-cyclin B1 を必要とすることが予想される。我々は核小体崩壊が Cdk1 の抑制的リン酸化を増加させ、RO-3306 を除去してもそのリン酸化レベルが維持されることを明らかにした。これらの結果は、核小体崩壊により M 期開始における Cdk1-cyclin B 活性化に必要な閾値が上昇し、M 期開始が遅延することを示唆している。

核小体崩壊によって引き起こされる Wee1 キナーゼの異常な蓄積が Cdk1-pY15 の増加の原因である

Cdk1 の抑制的リン酸化は Wee1 および Myt1 キナーゼと Cdc25 ホスファターゼのバランスによって制御されている(16, 28)。Wee1 と Myt1 のどちらも Cdk1 の抑制的リン酸化を担うキナーゼであるが、Wee1 は脊椎動物において優位に働くことが報告されている(29)。我々は以下の結果から、間期における核小体崩壊が Wee1 の蓄積を引き起こし、Cdk1 の抑制的リン酸化を増加させる原因となることを明らかにした。第一に、G2 期において NOL11 や TIF-IA、UBF を KD することで核小体崩壊を誘導した際に、Cdk1-pY15 の増加と同様のパターンで Wee1 量が増加すること。この際に 3 つの Cdc25 アイソフォーム量の変化は Cdk1-pY15 の変化とは一致しない、あるいはほとんど変化していなかったこと。第二に、NOL11 や TIF-IA の KD による Wee1 量と Cdk1-pY15 量の増加は、核小体崩壊を抑制する RPL11 との同時 KD によって元に戻る。第三に、Wee1 のキナーゼ活性阻害剤である MK1775 を処理することで核小体崩壊時の Cdk1-pY15 の増加

は抑制され、さらに M 期開始の遅延が回復すること。

間期核小体崩壊時における Wee1 の異常な蓄積がどのような分子メカニズムによるものかは今後の課題である。我々は本研究において、核小体崩壊時に Wee1 タンパク質が正しく分解されず、異常に安定化することを示した。Wee1 タンパク質が安定化する可能性として、核小体タンパク質が核小体から核質へ局在を変化させることで Wee1 の安定性に影響を及ぼす可能性が考えられる。なぜなら、先行研究において、様々なストレスによって核小体タンパク質が核質へ局在を変化させることで、p53 の活性化などを誘導することが報告されているためである。通常、Wee1 は G2-M 期移行過程において、Cdk1 をはじめとするいくつかのキナーゼによってリン酸化され、これらのリン酸化依存的にユビキチン E3 リガーゼである SCF- β TrCP によるユビキチン化を受け、プロテアソーム依存的に分解される(30)。したがって、核小体に局在するユビキチン化酵素、脱ユビキチン化酵素、キナーゼ、ホスファターゼが核小体崩壊によって局在が変化し、Wee1 量を制御して Cdk1 の活性化に関与している可能性がある。

核小体崩壊は M 期開始を遅延させる主な原因である

我々は間期核小体崩壊を引き起こした際に、M 期開始が遅延することを見出した。しかし、我々は M 期開始の遅延の主原因が核小体崩壊ではなく、核小体崩壊に伴う他の現象が原因である可能性を検討した。本研究ではその可能性として、G2/M チェックポイントの活性化、タンパク質合成の低下、rRNA 転写の阻害を考えた。

細胞が DNA ダメージを受けると、G2/M チェックポイントが活性化し、Cdk1 の活性化を抑制する(31)。また、DNA ダメージは rRNA 転写を低下させ、核小体崩壊をも引き起こす(32)。そのため、rRNA 転写の抑制が DNA ダメージを誘導し、G2/M チェックポ

イントを介して Cdk1 の活性化を抑制することが考えられた。しかし、NOL11 や TIF-IA、UBF の KD 時に G2/M チェックポイントのマーカとなる Chk1 のリン酸化や DNA 二本鎖切断のマーカである γ H2A.X の増加は見られなかった。したがって、核小体崩壊による Cdk1 の抑制的リン酸化の増加や M 期開始の遅延は、G2/M チェックポイントとは独立して生じることを明らかにした。

rRNA 転写の低下によって生じる核小体崩壊は、リボソーム生合成やそれに続くタンパク質合成に影響を及ぼすことが考えられる。つまり、タンパク質合成量の低下が M 期開始を遅延させる原因であることが予想された。実際に、上記で我々が述べた通り、rRNA 転写因子を KD するとタンパク質合成量は低下した。さらに PES1 や DKC1 といった rRNA プロセッシング因子を KD した際にも rRNA 転写因子の KD と同程度にタンパク質合成量が低下した。しかし、rRNA プロセッシング因子である PES1、DKC1、RRP5 を KD しても M 期開始の遅延は見られなかった。したがって、タンパク質合成量の低下は M 期進行の遅延の直接の原因にはなり得ないことを明らかにした。

NOL11 や TIF-IA を KD すると同時に RPL11 を KD すると、rRNA 転写量が低下するにも関わらず、核小体内における rRNA 量が減少しないため、核小体崩壊が抑制される。我々は NOL11 や TIF-IA と RPL11 を同時に KD することで、核小体崩壊による Cdk1-pY15 の増加が抑制されることを見出した。つまり、単に rRNA 転写量の低下ではなく、核小体崩壊そのものが Cdk1 の抑制的リン酸化を増加させる原因になることを明らかにした。以上の結果から、我々は核小体崩壊そのものが M 期開始を遅延させる主要原因であることを突き止めた。

本研究をまとめると、核小体構造の異常により、Wee1 タンパク質が過剰に安定化し、細胞周期チェックポイントを活性化せずに Cdk1 活性化を抑制する。その結果として M

期開始が遅延することを明らかにした。したがって、適切なタイミングで M 期開始するためには、核小体構造の維持が重要な要素の一つであることを我々は見出した。

2.5 実験材料および方法

細胞培養

ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (penicillin 100 unit/mL、streptomycin 100 unit/mL) を含む Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) を用いて、5% CO₂、37°C の条件下で培養した。

細胞周期の同調

細胞を G1/S 期に同調するために、シングルチミジンブロック法およびダブルチミジンブロック法を用いた。シングルチミジンブロック法では、2 mM のチミジンを 24 時間細胞に処理し、細胞を G1/S 期に同調した。ダブルチミジンブロック法では、シングルチミジンブロック法により細胞を一旦 G1/S 期に同調した後、新しい培地に取り替え、細胞周期を再開させた。そして、8 時間後に 2 mM のチミジンを添加し、16 時間培養しすることで、より正確に細胞を G1/S 期に同調した。細胞を M 期の直前に同調するために、細胞をシングルチミジンブロック法により G1/S 期に同調し、同調解除後 4~6 時間後に 10 μM の RO-3306 を処理し、12 時間培養した。

siRNA スクリーニングによる候補因子の探索

595 種類の核小体タンパク質に対する siRNA を設計し、Invitrogen 社より購入した。96 ウェルプレートに 3000 細胞の HeLa 細胞を播種し、それぞれの siRNA をトランスフェクションした。72 時間後、顕微鏡を用いて細胞の形態を観察した。一つ目のスクリーニングとして、206 の siRNA により M 期細胞の指標である球状の細胞が増加した。続いて、これらの siRNA を再度トランスフェクション、72 時間に RIPA バッファ

ー (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.8% NP-40, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, and 2 mM EDTA) を用いて細胞を溶解した。M 期の指標であるヒストン H3 のリン酸化を anti-H3-pS10 抗体を用いてイムのブロッキングにより調べた。そして、M 期の機能が報告されていないタンパク質に着目し、NOL11 について解析した。

抗体

本章では以下の抗体を用いた。

ウサギポリクローナル抗体：NOL11 (HPA022010, Sigma), Cdc25B (#9525, Cell Signaling Technologies), Cdc25C (#4688, Cell Signaling Technologies), Cdk1p-Y15 (#9111, Cell Signaling Technologies), Chk1-pS317 (#12302, Cell Signaling Technologies), および γ H2A.X (ab2893, Abcam)。マウスモノクローナル抗: β -actin (sc47778, Santa Cruz Biotechnolog), cyclin B1 (sc245, Santa Cruz Biotechnolog), UBF (sc13125 Santa Cruz Biotechnolog), Cdk1 (sc45, Santa Cruz Biotechnolog), Wee1 (sc5285, Santa Cruz Biotechnolog), tubulin (DM1A, Millipore), NCL (M019-3, MBL), H3-pS10, (MABI0312, MBL), MPM2 (05-368, Millipore) および RPL11 (3A4A7, Invitrogen)。ヤギポリクローナル抗体：TIF-IA (sc11805, Santa Cruz Biotechnolog)。

siRNA およびトランスフェクション

siRNA は適切な Stealth RNAi (Thermo Fisher Scientific) を購入し、Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) の製品プロトコルに従ってトランスフェクションした。また、Stealth RNAi siRNA Luciferase Reporter Control (Thermo Fisher Scientific) をネガティブコントロールとして用いた。以下に用いた siRNA の配列を記載する。

NOL11-#1, 5'-CCAAACGCAUGUGCUUUCUUACAGU-3';
NOL11-#2, 5'-GUCUACUUCUGGAUGCGAAUU-3';
TIF-IA#1, 5'-CGACACCGUGGUUUCUCAUGCCAAU-3';
TIF-IA#2, 5'-GGGAUCACACCAAGCUCCUUUGACA-3';
TIF-IA#3, 5'-AGGAUGUCUGCUAUGUAGAUGGUAA-3';
UBF#1, 5'-UUCGGCUGCCUUCUAAAUCCACAUC-3';
UBF#2, 5'-AUCUCACUCAGCUCUCUCUCAUAUC-3';
UBF#3, 5'-UCUCCCUGGAAUUUCAUCUUCUUGG-3';
PES1, 5'-CCAUUGUCAACAAGUUCGUGAAUA-3';
DKC1, 5'-GGCCAAGAUUAUGCUUCCAGGUGUU-3';
RRP5, 5'-GAACCAGGAGUGACUGGCCUUCUUU-3';
RPL11, 5'-GCUAGAUACACUGUCAGAUCUUUG -3'.

イムノブロッティング

細胞の抽出物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、PVDFメンブレンに転移した。5% skim milkを含むTBS-T buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.05% Tween20]でメンブレンを30分間ブロッキングした後、メンブレンを一次抗体と共に4°Cで一晩培養した。TBS-T bufferで3回洗浄した後、horseradish peroxidase結合二次抗体と1時間反応させた。検出にはChemi-Lumi One (Nacalai tesque) およびChemi-Lumi One Super (Nacalai tesque)を用いた。

蛍光免疫染色法

蛍光免疫染色を行う際には、poly-L-lysine でコートしたカバーガラスに細胞を播種して行なった。細胞を 4% paraformaldehyde (PFA)/phosphate-buffered saline (PBS; PBS; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, and 8.1 mM Na₂HPO₄) で 15 分間固定し、0.2% Triton X-100/PBS で 3 分間の透過処理を行なった。その後、3% bovine serum albumin (BSA)/PBS を用いて室温で 1 時間のブロッキング処理を行なった。次に、一次抗体を 3% BSA/PBS に希釈したものをを用いて 1 時間、室温で反応させた。反応後、一次抗体液を除去し、0.01% Triton X-100/PBS (PBS-T)により洗浄作業を 3 回行なった。続いて、Alexa Fluor® -488 あるいは-594 の蛍光標識試薬が結合した二次抗体を PBS に希釈し、遮光条件下において 1 時間室温で反応させた。その後、PBS による洗浄作業を 2 回行い、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)溶液により DNA を染色し、VECTASHIELD (Vector Laboratories)を用いて封入した。蛍光免疫染色画像は、Bioevo 顕微鏡(Keyence)により所得した。また、ImageJ ソフトウェア (National Institute of Health) を用いて得られた画像の処理を行なった。

Real-time qPCR

細胞内の全 RNA を ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega)を用いて抽出した。抽出した RNA をランダムプライマーおよび RevtraAce reverse transcriptase (東洋紡)を用いて逆転写し、cDNA を合成した。cDNA に対してそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーおよび SYBRgreen Realtime PCR reagent (タカラバイオ)を混合し、Thermal Cycler Dice™ TP800 (タカラバイオ)を用いて、real-time qPCR を行なった。以下に示すのが本章で用いたプライマーである (Fw: Forward primer、Re: Reverse primer)。

pre-rRNA Fw: 5'-GAACGGTGGTGTGTCGTTTC-3', pre-rRNA Re: 5'-

GCGTCTCGTCTCGTCTCACT-3'

フローサイトメトリー

細胞 70%エタノールを用いて固定した。細胞内のタンパク質を染色するために、0.1% Triton X-100/PBS を処理後、3% BSA/PBS に希釈した一次抗体を 1 時間反応させた。PBS を用いて細胞を洗浄後、3% BSA/PBS に希釈した二次抗体を 1 時間反応させた。その後、PI and RNase A solution (BD Biosciences)により核酸を染色した。DNA 量および細胞内タンパク質の蛍光強度について FACS Aria II (BD Bioscience)を用いて測定した。

新規合成 RNA およびタンパク質の標識・染色

細胞培養中において、培養上清に 0.5 mM となるように 5-ethynyl uridine (EU)を添加し、30 分間培養した。EU 処理した細胞は、4% PFA/PBS を用いて 15 分間固定し、0.2% Triton X- 100/PBS を用いて 3 分間の透過処理を行なった。その後、Click-it™ Cell Reaction Buffer Kit (Thermo Fisher Scientific)および Alexa Fluor™ 488 azide (Thermo Fisher Scientific)を製品プロトコルに従って使用し、RNA に取り込まれた EU の蛍光染色を行なった。EU の蛍光シグナルは顕微鏡を用いて観察した。

新規合成タンパク質量を調べるために、細胞を Methionine および Cycteine free の培地で 1 時間培養後、25 μM の L-Homopargylglycine (HPG)を 2 時間処理した。その後、細胞を回収し、-20°C の 70%エタノールを用いて細胞を固定した。Click-it™ Cell Reaction Buffer Kit (Thermo Fisher Scientific)および Alexa Fluor™ 488 azide (Thermo Fisher Scientific)を製品プロトコルに応じて使用し、フローサイトメーターにより解析した。

2.6 参考文献

1. F. Bassermann *et al.*, The Cdc14B-Cdh1-Plk1 Axis Controls the G2 DNA-Damage-Response Checkpoint. *Cell*. **134**, 256–267 (2008).
2. P. R. Andreassen, F. B. Lacroix, E. Villa-Moruzzi, R. L. Margolis, Differential Subcellular Localization of Protein Phosphatase-1 α , γ 1, and δ Isoforms during Both Interphase and Mitosis in Mammalian Cells. *J. Cell Biol.* **141**, 1207–1215 (1998).
3. J. S. Andersen *et al.*, Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. **433**, 77–83 (2005).
4. A. Killian *et al.*, Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene*. **23**, 8597–8602 (2004).
5. N. Ma *et al.*, Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J. Cell Sci.* **120**, 2091–2105 (2007).
6. F. Alawi, P. Lin, Dyskerin Localizes to the Mitotic Apparatus and Is Required for Orderly Mitosis in Human Cells. *PLoS ONE*. **8**, e80805–9 (2013).
7. E. F. Freed, J.-L. Prieto, K. L. McCann, B. McStay, S. J. Baserga, NOL11, implicated in the pathogenesis of North American Indian childhood cirrhosis, is required for pre-rRNA transcription and processing. *PLoS Genet.* **8**, e1002892 (2012).
8. J. N. Griffin, S. B. Sondalle, F. del Viso, S. J. Baserga, M. K. Khokha, The Ribosome Biogenesis Factor Noll1 Is Required for Optimal rDNA Transcription and Craniofacial Development in *Xenopus*. *PLoS Genet.* **11**, e1005018 (2015).
9. L. T. Vassilev *et al.*, Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 10660–10665 (2006).
10. O. Gavet, J. Pines, Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis. *Dev. Cell*. **18**, 533–543 (2010).
11. T. Kuroda *et al.*, RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A. *EMBO J.* **30**, 1054–1066 (2011).

12. Y. Hayashi *et al.*, Downregulation of rRNA transcription triggers cell differentiation. *PLoS ONE*. **9**, e98586 (2014).
13. N. Katagiri *et al.*, The nucleolar protein nucleophosmin is essential for autophagy induced by inhibiting Pol I transcription. *Sci. Rep.* **5**, 8903 (2015).
14. T. Kumazawa *et al.*, Gradual reduction in rRNA transcription triggers p53 acetylation and apoptosis via MYBBP1A. *Sci. Rep.* **5**, 10854 (2015).
15. J. Zhang *et al.*, Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev.* **21**, 2580–2592 (2007).
16. M. Donzelli, G. F. Draetta, Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO rep.* **4**, 671–677 (2003).
17. R. Boutros, V. Lobjois, B. Ducommun, CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 495–507 (2007).
18. Y. Tominaga, C. Li, R.-H. Wang, C.-X. Deng, Murine Wee1 Plays a Critical Role in Cell Cycle Regulation and Pre-Implantation Stages of Embryonic Development. *Int. J. Biol. Sci.* **2**, 161–170 (2006).
19. B. Neumann *et al.*, Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature.* **464**, 721–727 (2010).
20. T. A. Potapova, S. Sivakumar, J. N. Flynn, R. Li, G. J. Gorbsky, Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 1191–1206 (2011).
21. M. Papi, E. Berdugo, C. L. Randall, S. Ganguly, P. V. Jallepalli, Multiple roles for separase auto-cleavage during the G2/M transition. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1029–1035 (2005).
22. H. Hirai *et al.*, Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2992–3000 (2009).

23. N. Hégarat, S. Rata, H. Hochegger, Bistability of mitotic entry and exit switches during open mitosis in mammalian cells. *BioEssays*. **38**, 627–643 (2016).
24. E. N. Nikolov, M. D. Dabeva, T. K. Nikolov, Turnover of ribosomes in regenerating rat liver. *International Journal of Biochemistry*. **15**, 1255–1260 (1983).
25. J. R. Pomerening, E. D. Sontag, J. E. Ferrell, Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat. Cell Biol.* **5**, 346–351 (2003).
26. J. R. Pomerening, J. A. Ubersax, J. E. Ferrell, Rapid cycling and precocious termination of G1 phase in cells expressing CDK1AF. *Mol Biol. Cell.* **19**, 3426–3441 (2008).
27. A. Lindqvist, W. van Zon, C. Karlsson Rosenthal, R. M. F. Wolthuis, Cyclin B1–Cdk1 Activation Continues after Centrosome Separation to Control Mitotic Progression. *PLoS Biol.* **5**, e123–11 (2007).
28. S. Sur, D. K. Agrawal, Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. *Mol. Cell. Biochem.* **416**, 33–46 (2016).
29. C. H. McGowan, P. Russell, Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* **14**, 2166–2175 (1995).
30. N. Watanabe *et al.*, Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 11663–11668 (2005).
31. M. Löbrich, P. A. Jeggo, The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 861–869 (2007).
32. C. P. Rubbi, J. Milner, Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* **22**, 6068–6077 (2003).

2.7 図表

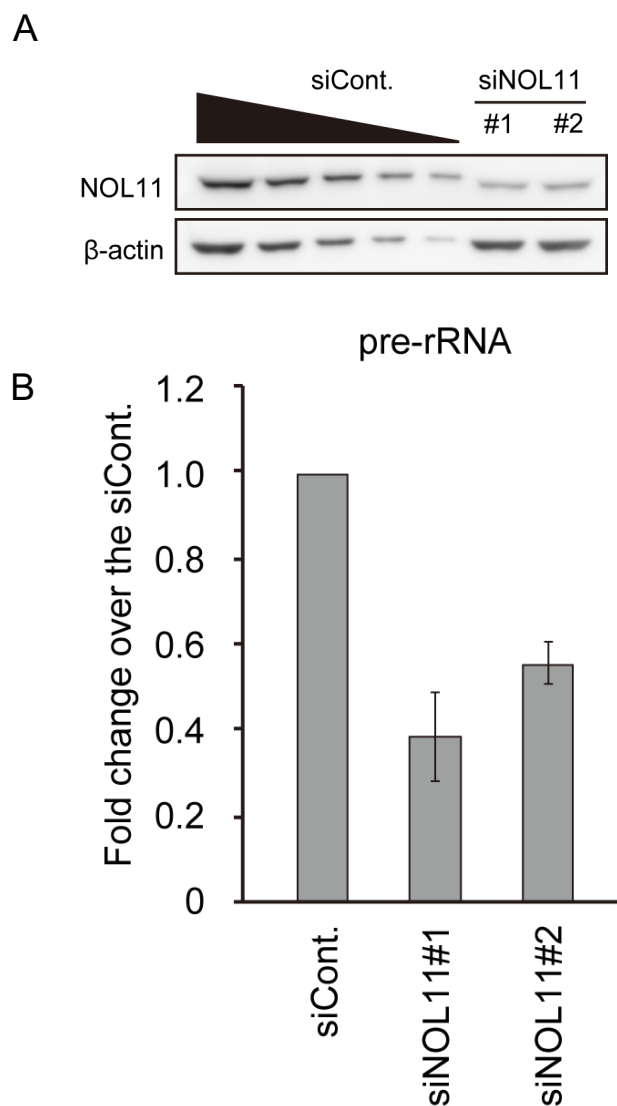


Figure 1 siRNA による NOL11 の KD および pre-rRNA 量への影響

(A) ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞に対して、NOL11 に対する異なる 2 つの siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、免疫プロテッィングにより KD 効率を調べた (siCont.; lanes 1–5; 100%, 50%, 25%, 12.5%, and 6.3%)。

(B) NOL11 に対する siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、それぞれのサンプルの細胞数を揃え、トータル RNA を抽出し、逆転写反応を行なった。cDNA 産物を用いて、real-time qPCR を行なった。数値は siCont. の相対値であり、独立した 3 回の実験の平均値 \pm 標準偏差で示した。

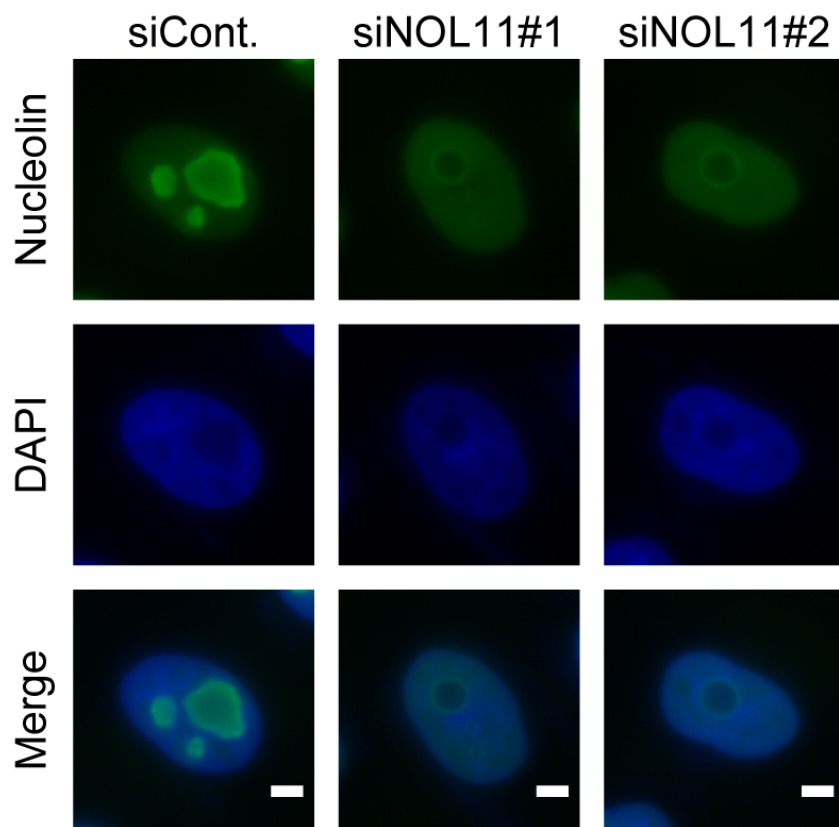


Figure 2 NOL11 KD による核小体構造に対する影響

HeLa 細胞に NOL11 の siRNA をトランスフェクション後、NCL 抗体（緑）を用いて蛍光免疫染色を行なった。また、DNA は DAPI（青）を用いて染色した。スケールバーは 5 μm を示す。

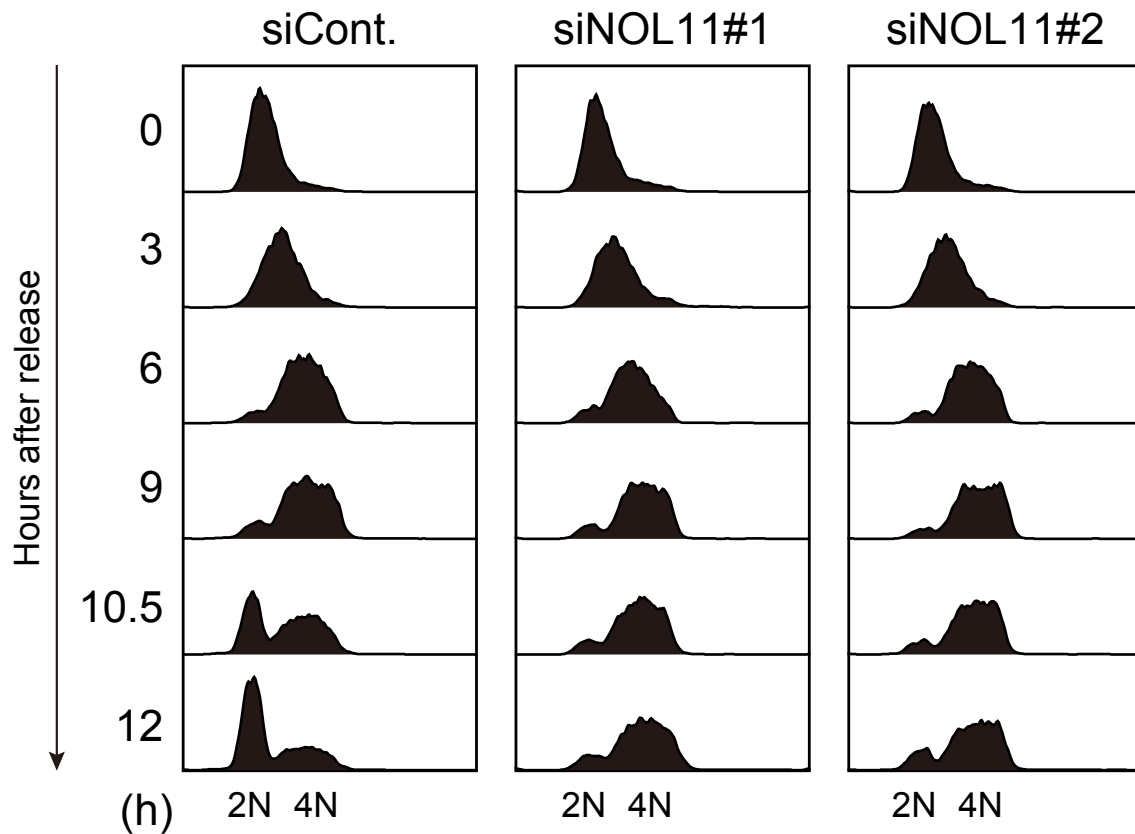


Figure 3 NOL11 KD による細胞周期への影響

HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、シングルチミジンブロックを用いて、細胞を G1/S 期に同調させた。同調解除後、図示された時間に細胞を回収し、DNA を PI で染色し、フローサイトメーターにより DNA 量を測定した。

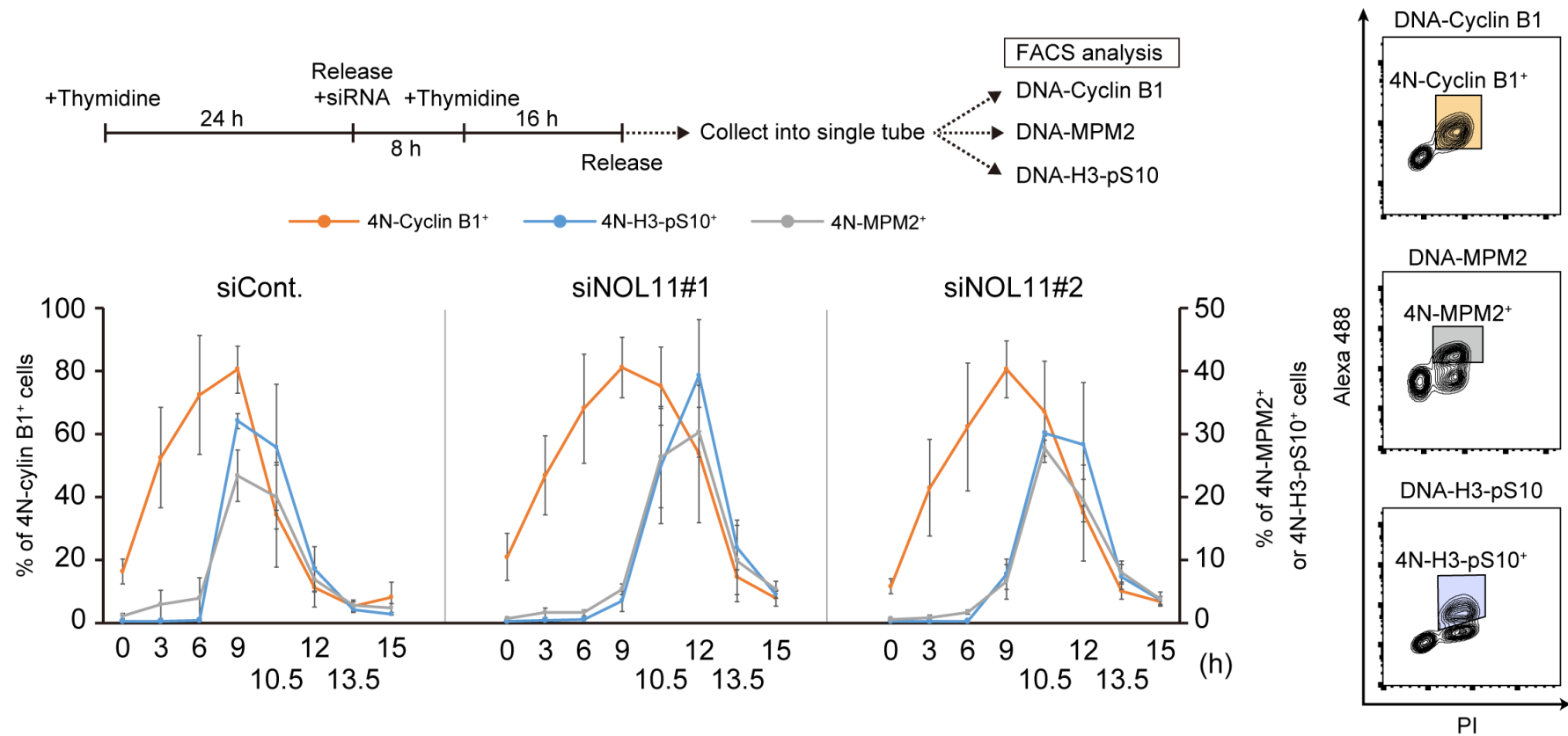


Figure 4 NOL11 KD による M 期開始の遅延

HeLa 細胞を上図にあるようにダブルチミジンブロックを用いて G1/S 期に同調した。同調解除後、図示された時間に細胞を回収し、それぞれを PI-cyclin B1、Pi-MPM2、PI-H3-pS10 の二重染色用のサンプルとした。右図は、代表的な解析結果を示しており、それぞれの色で示された四角形が 4N-cyclin B1⁺、4N-MPM2⁺、4N-H3-pS10⁺細胞を示している。下図の結果は、独立した 3 回の実験結果の平均値±標準偏差で示した。

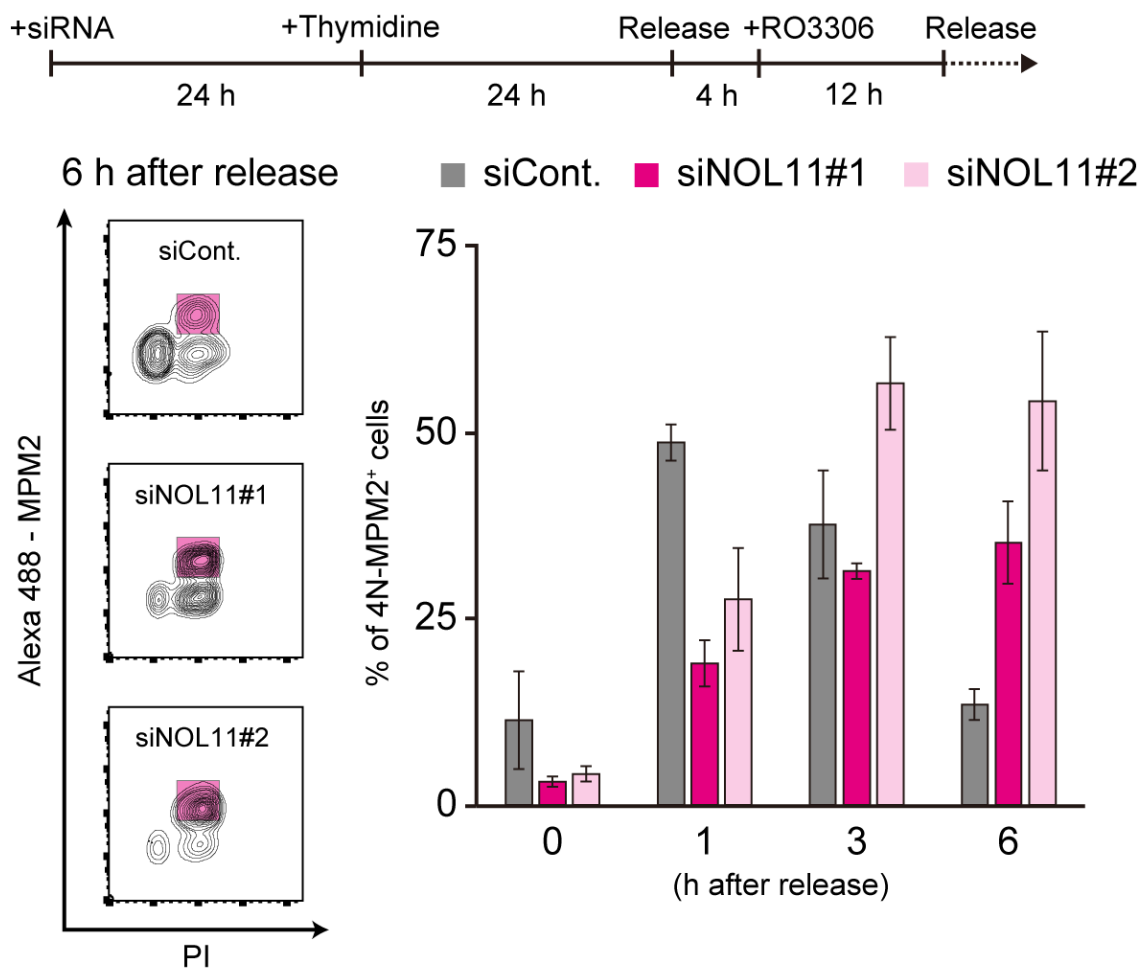


Figure 5 NOL11 KD による G2-M 期移行過程における Cdk1 基質のリン酸化に対する影響

上図にあるように細胞を M 期の直前に同調させた。同調解除後の図示された時間に細胞を回収し、左図の色付きの四角形で示されるように 4N-MPM2⁺細胞の割合を定量した。右図は、定量の結果を示しており、3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した。

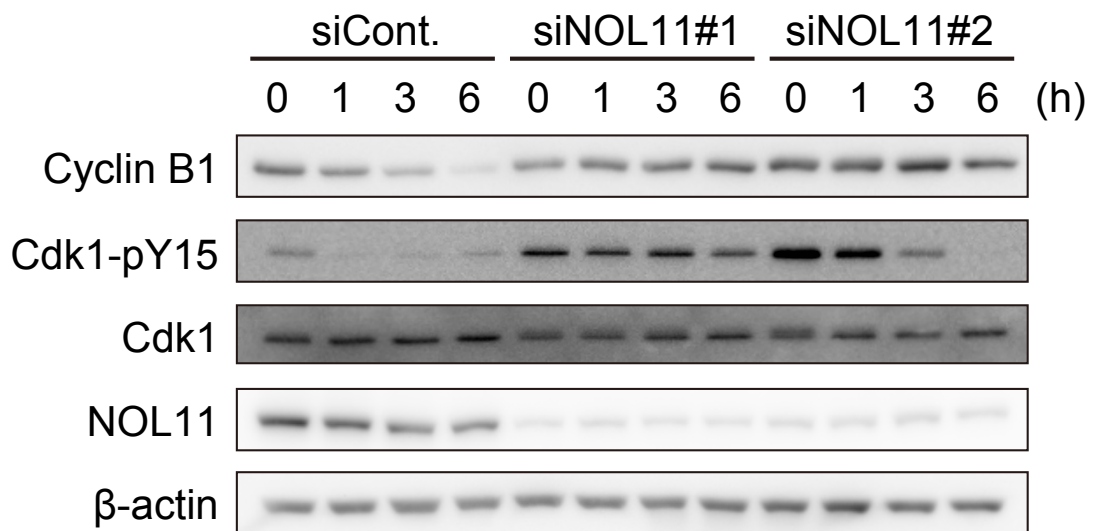


Figure 6 NOL11 KD による Cdk1 の阻害的リン酸化への影響

Figure 5 と同様に細胞を同調し、同調後の図示された時間に細胞を回収した。その後、イムノブロッティングにより示されたタンパク質量およびリン酸化量を調べた。

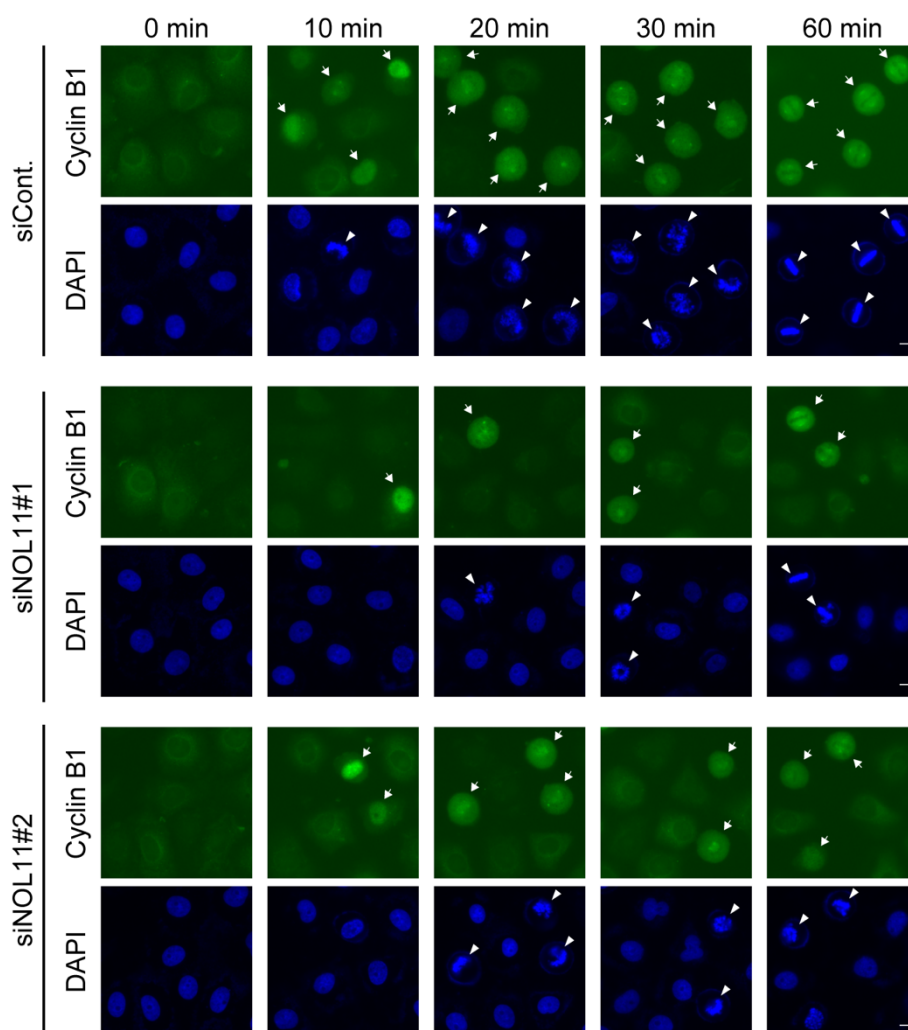


Figure 7 NOL11 KD による cyclin B1 の核移行および核膜崩壊に対する影響

Figure 5 と同様に細胞を同調し、同調後の図示された時間に細胞を 4% PFA/PBS を用いて固定した。その後、cyclin B1 抗体を用いて、蛍光免疫染色を行い、cyclin B1 の核移行について調べた。さらに DAPI による DNA の染色と cyclin B1 の局在を組み合わせることで、核膜崩壊についても調べた。矢印は核移行した cyclin B1 を示し、アローヘッドは核膜崩壊した細胞を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

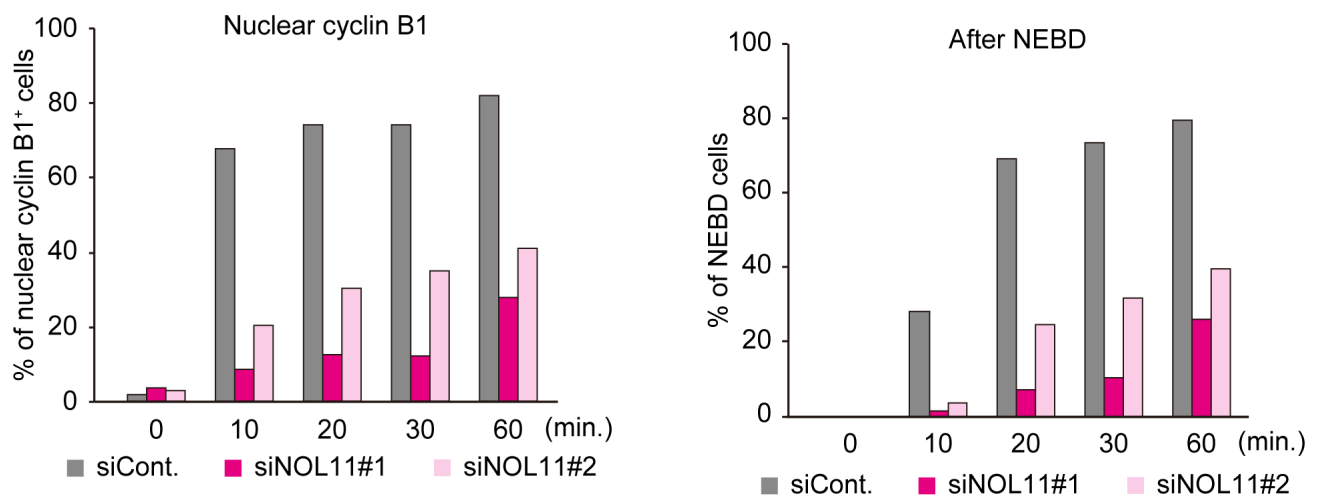


Figure 8 NOL11 KD による cyclin B1 の核移行および核膜崩壊に対する影響

Figure 7 について定量した結果を示した。各条件について 200 細胞以上を計測した。

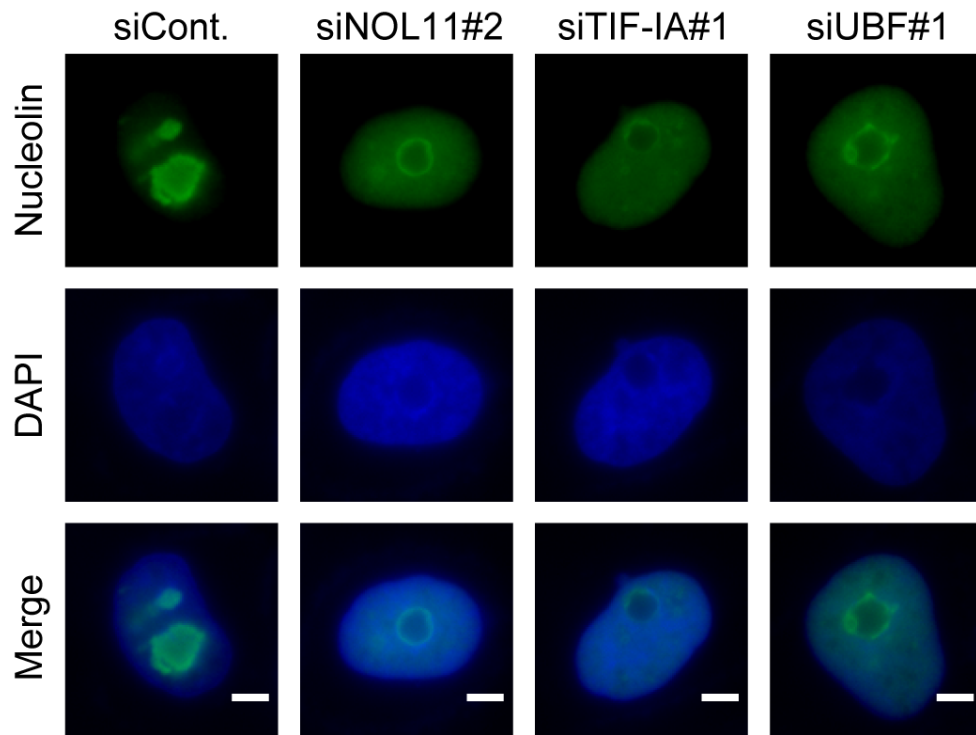


Figure 9 TIF-IA KD や UBF KD による核小体構造への影響

HeLa 細胞に対して図示された siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、NCL 抗体を用いて免疫蛍光染色を行なった。スケールバーは 5 μm を示す。

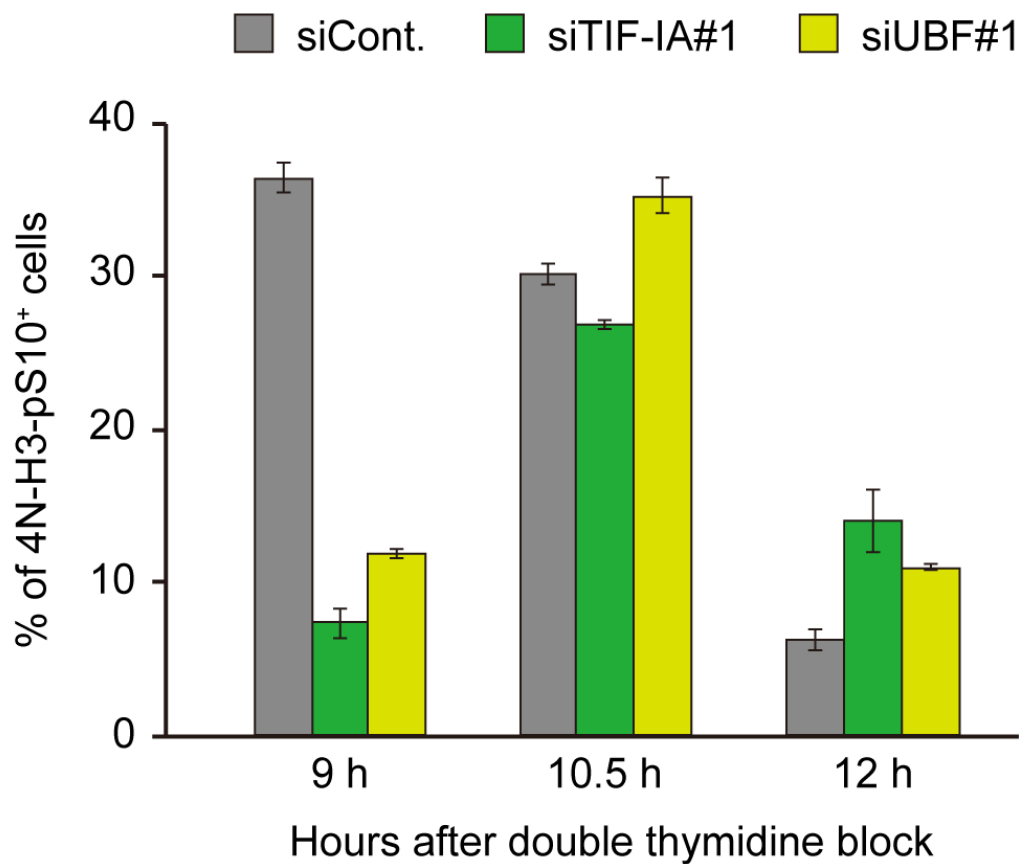


Figure 10 TIF-IA および UBF KD による M 期開始に対する影響

HeLa 細胞は Figure 4 と同様に G1/S 期に同調させた。同調解除後の 9、10.5、12 時間において細胞を回収し、PI および H3-pS10 抗体を用いた二重染色を行い、フローサイトメーターを用いて M 期細胞の割合を解析した。数値は独立した三回の実験の平均値±標準偏差で示した。

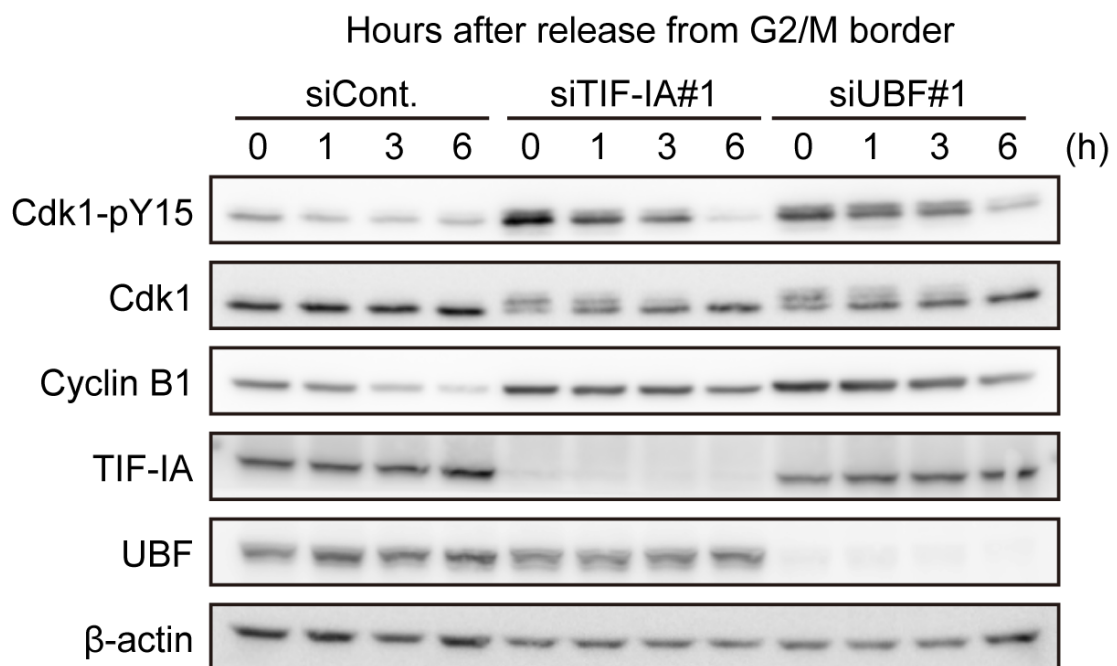


Figure 11 TIF-IA および UBF KD による Cdk1 の阻害的リン酸化に対する影響

細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。同調解除後、図示された時間に細胞を回収し、イムノブロッティングにより示されたタンパク質量およびリン酸化量について調べた。

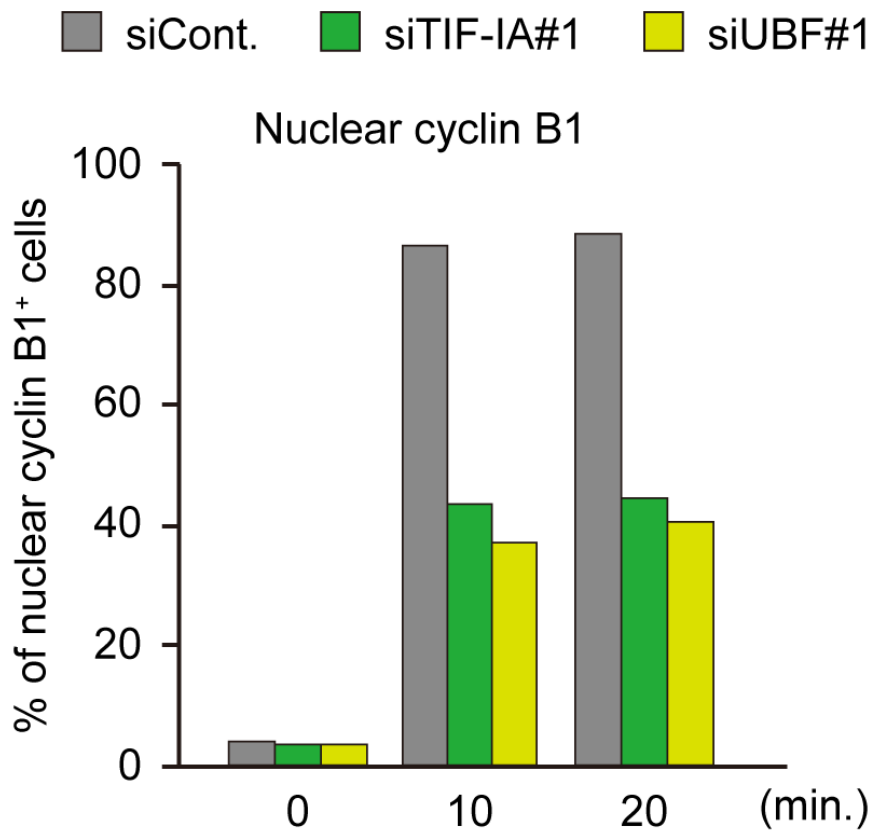


Figure 12 TIF-IA および UBF KD による cyclin B1 の核移行に対する影響

細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。その後、Figure 7 および 8 と同様に cyclin B1 の核移行について定量した。各条件について 200 細胞以上を計測した。

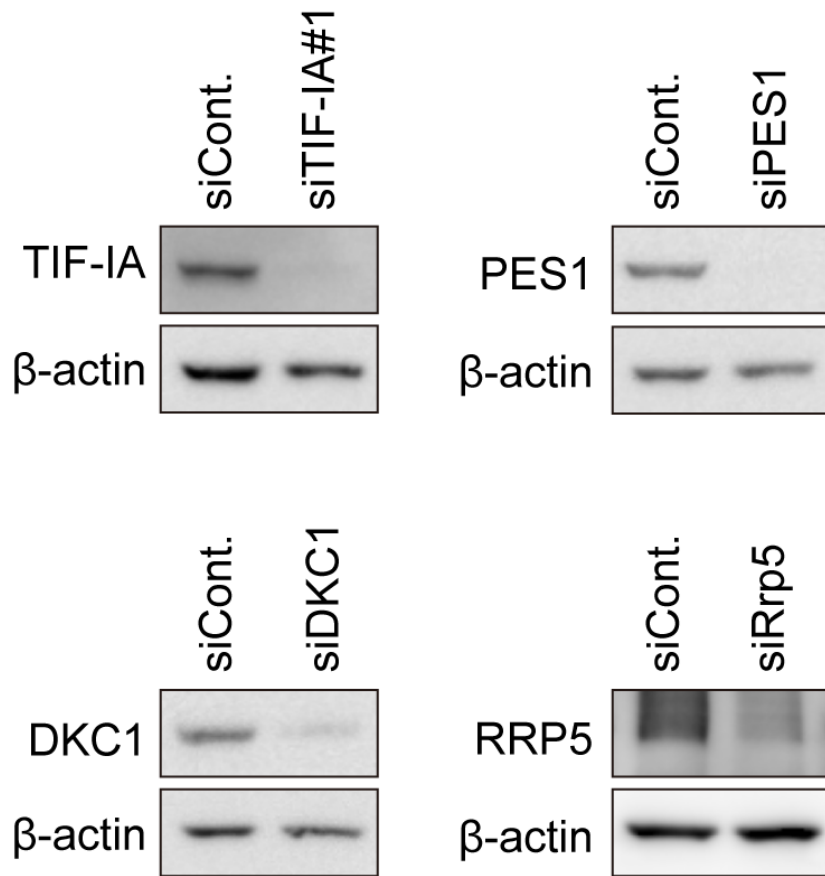


Figure 13 rRNA プロセッシング因子の KD 効率について

HeLa 細胞は、TIF-IA、PES1、DKC1、Rrp5 の siRNA をそれぞれトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、KD 効率をイムノブロットングにより解析した。

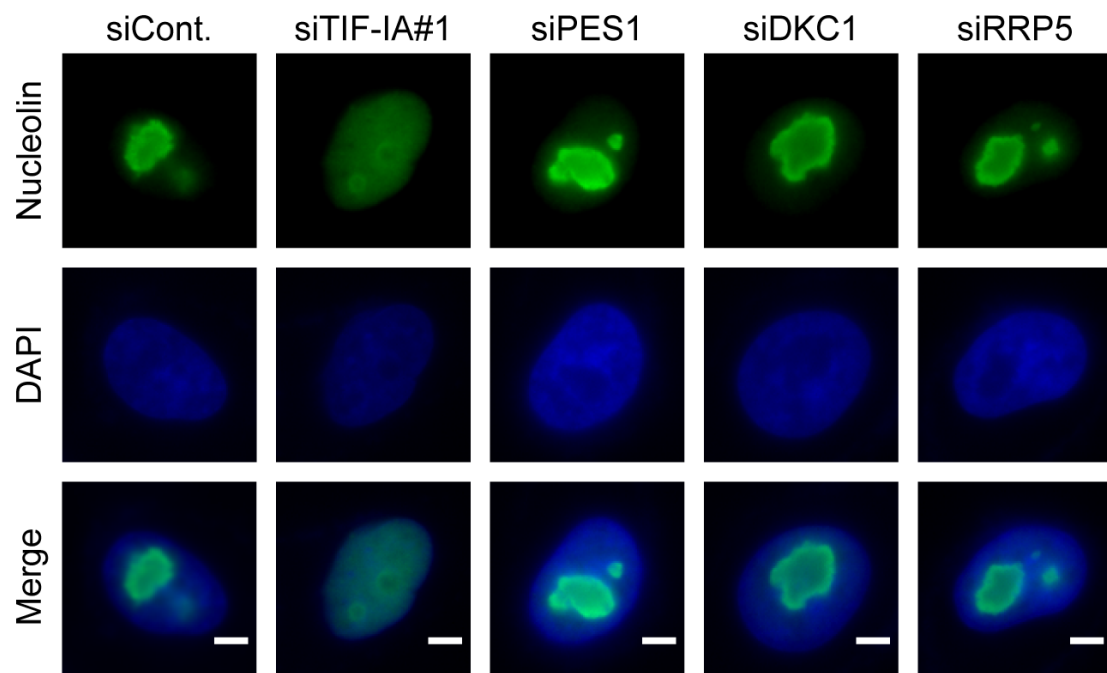


Figure 14 rRNA プロセッシング因子を KD した際の核小体構造について

HeLa 細胞は、TIF-IA、PES1、DKC1、Rrp5 の siRNA をそれぞれトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、NCL 抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。スケールバーは 5 μm を示す。

Synchronized at G2/M Border

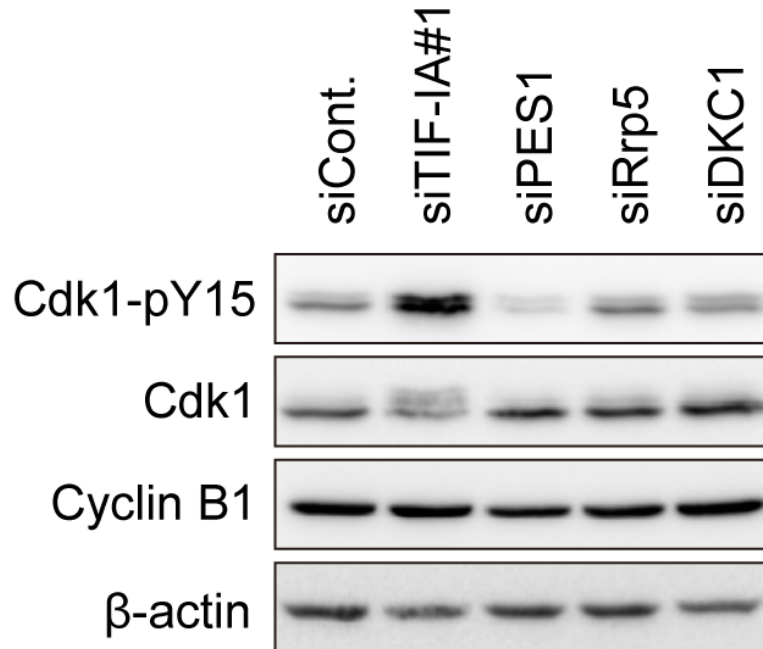


Figure 15 rRNA プロセッシング因子の KD による Cdk1 の阻害的リン酸化への影響
細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。その後、免疫ブロッティングにより示されたタンパク質量およびリン酸化量について調べた。

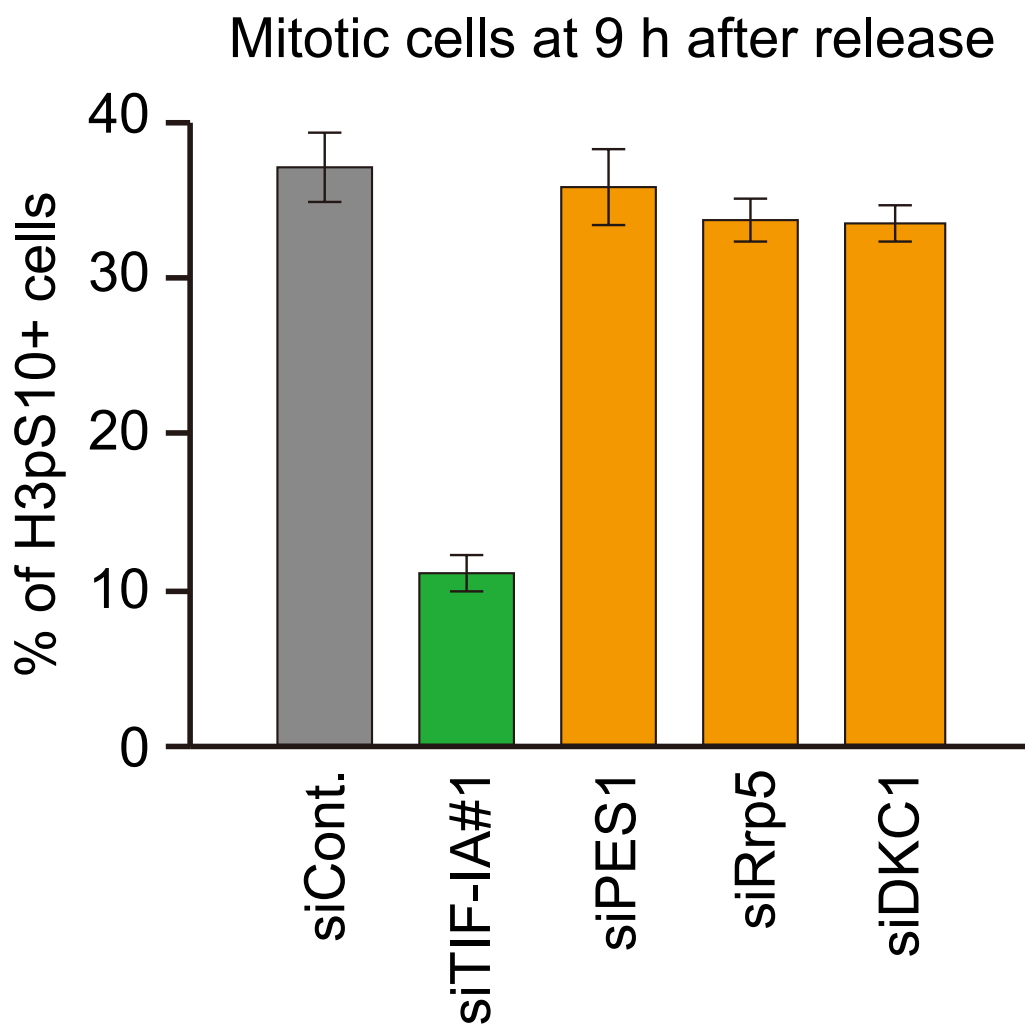


Figure 16 rRNA プロセッシング因子の KD による M 期開始への影響

細胞を Figure 4 と同様に G1/S 期に同調した。同調解除後、9 時間において細胞を回収し、PI および H3-pS10 抗体による二重染色を行い、フローサイトメーターにより解析した。数値は独立した三回の実験の平均値±標準偏差で示す。

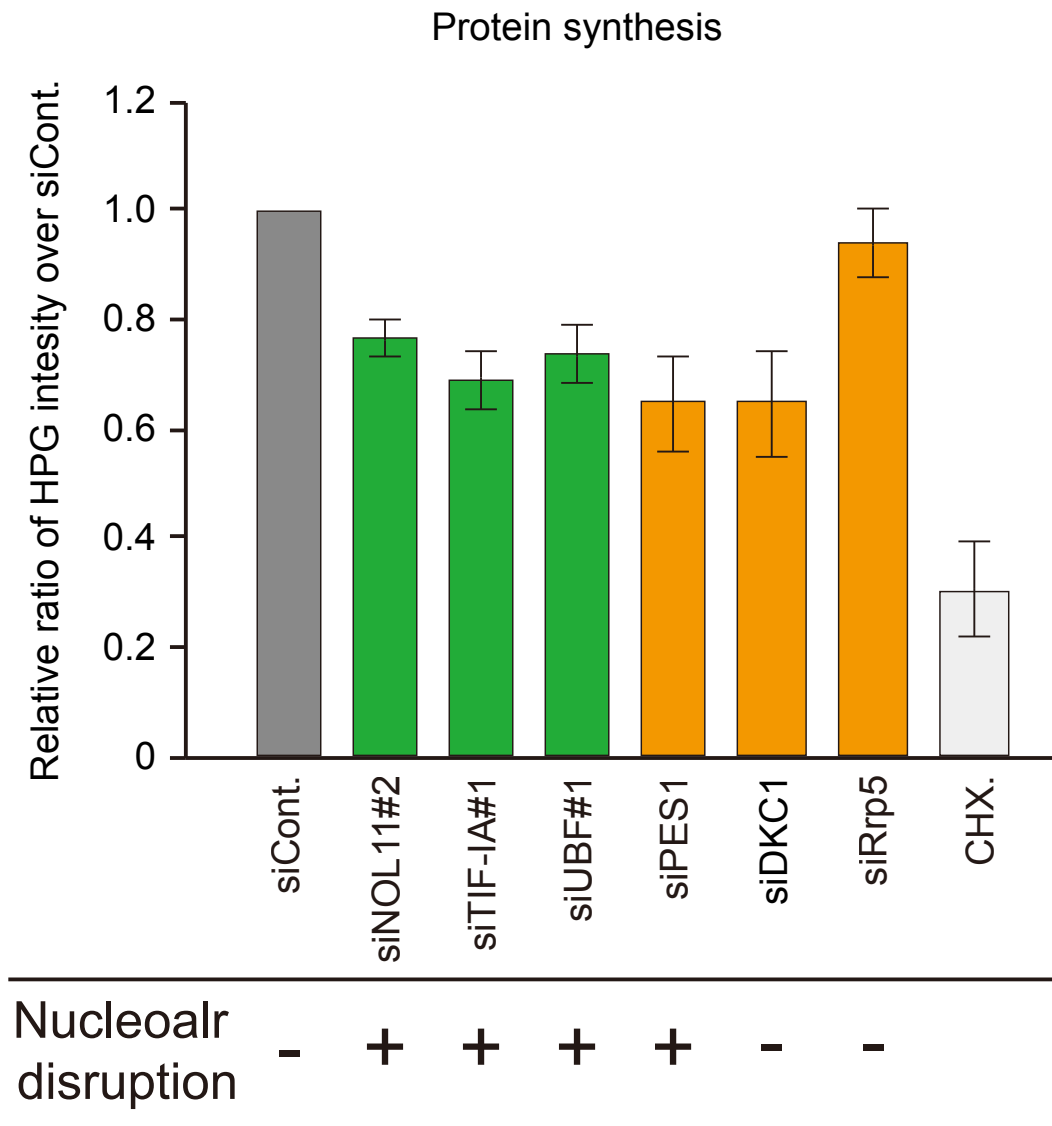


Figure 17 rRNA 転写因子およびプロセッシング因子の KD 時におけるタンパク質合成量への影響

細胞に siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、HPG を培養液中へ加え、さらに 2 時間培養した。HPG の取り込まれたタンパク質を、Click it 反応により蛍光標識し、フローサイトメーターにより解析した。数値は独立した三回の実験の平均値±標準偏差で示した。下部の核小体崩壊の有無については、Figure 9 および 14 を参考にした。

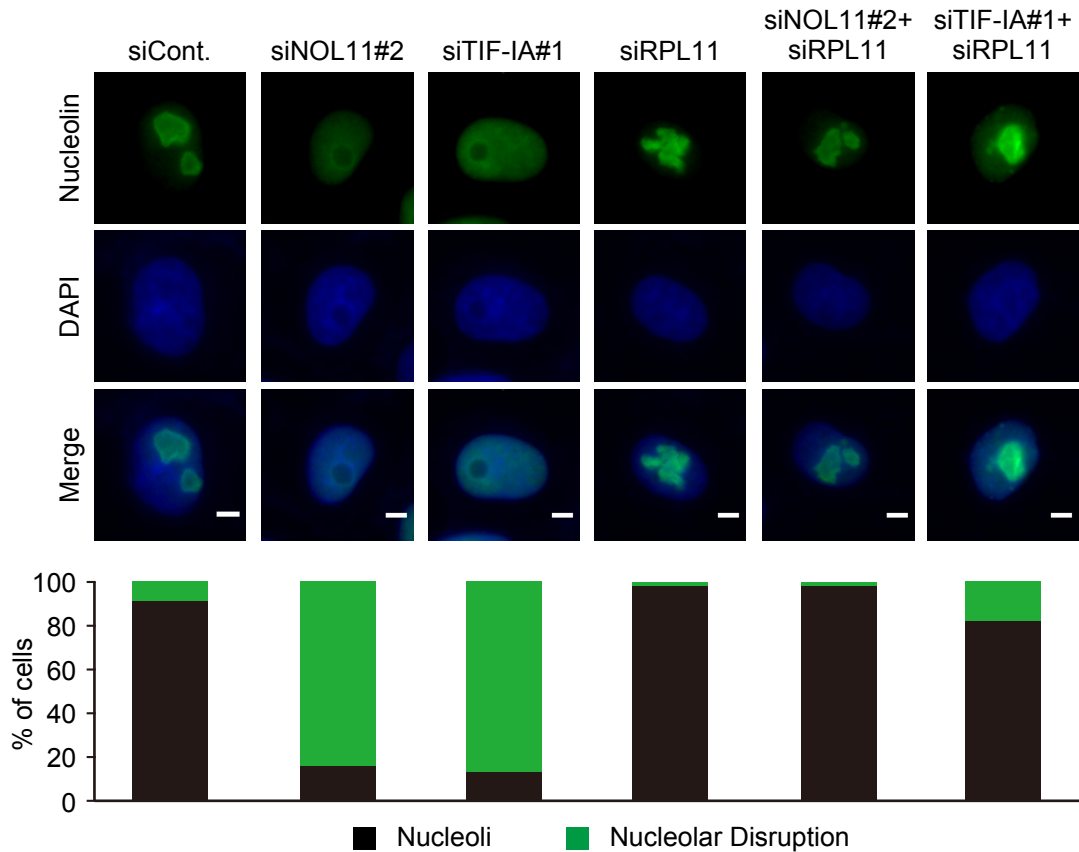


Figure 18 RPL11 との同時 KD による核小体構造への影響

細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調させた。その後、NCL 抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。スケールバーは 5 μ m を示す。下図は、核小体構造を定量したものであり、核小体崩壊を緑、構造を保った核小体を黒で示した。各条件において 400 細胞以上を計測した。

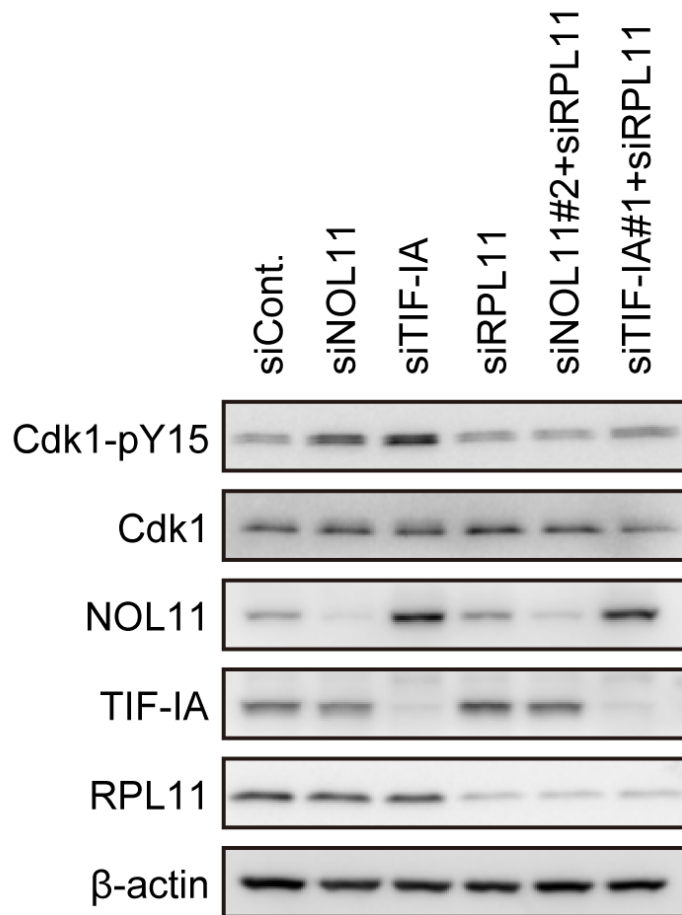


Figure 19 RPL11 との同時 KD による Cdk1 の阻害的リン酸化への影響

細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。その後、免疫ブロッティングにより示されたタンパク質量およびリン酸化量について調べた。

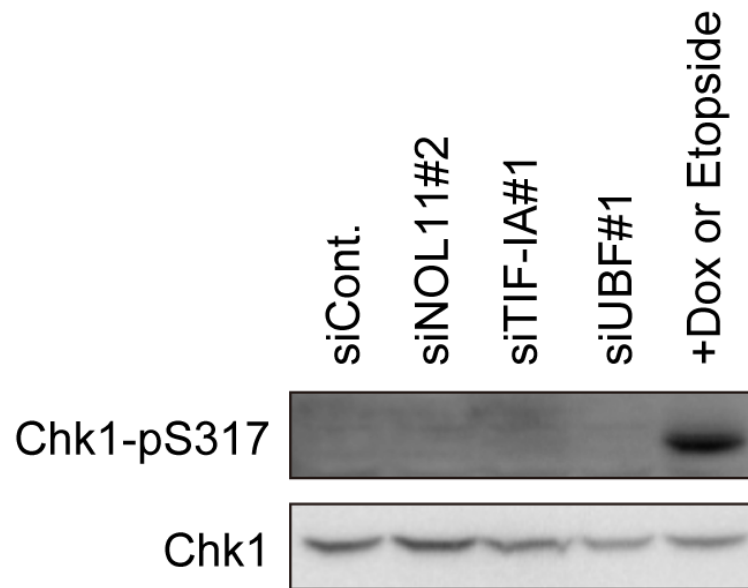


Figure 20 核小体崩壊時における Chk1 のリン酸化に対する影響

細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。その後、免疫ブロッティングにより示されたタンパク質量およびリン酸化量について調べた。また、ポジティブコントロールとして、10 μ M の Etoposide を 2 時間処理した。

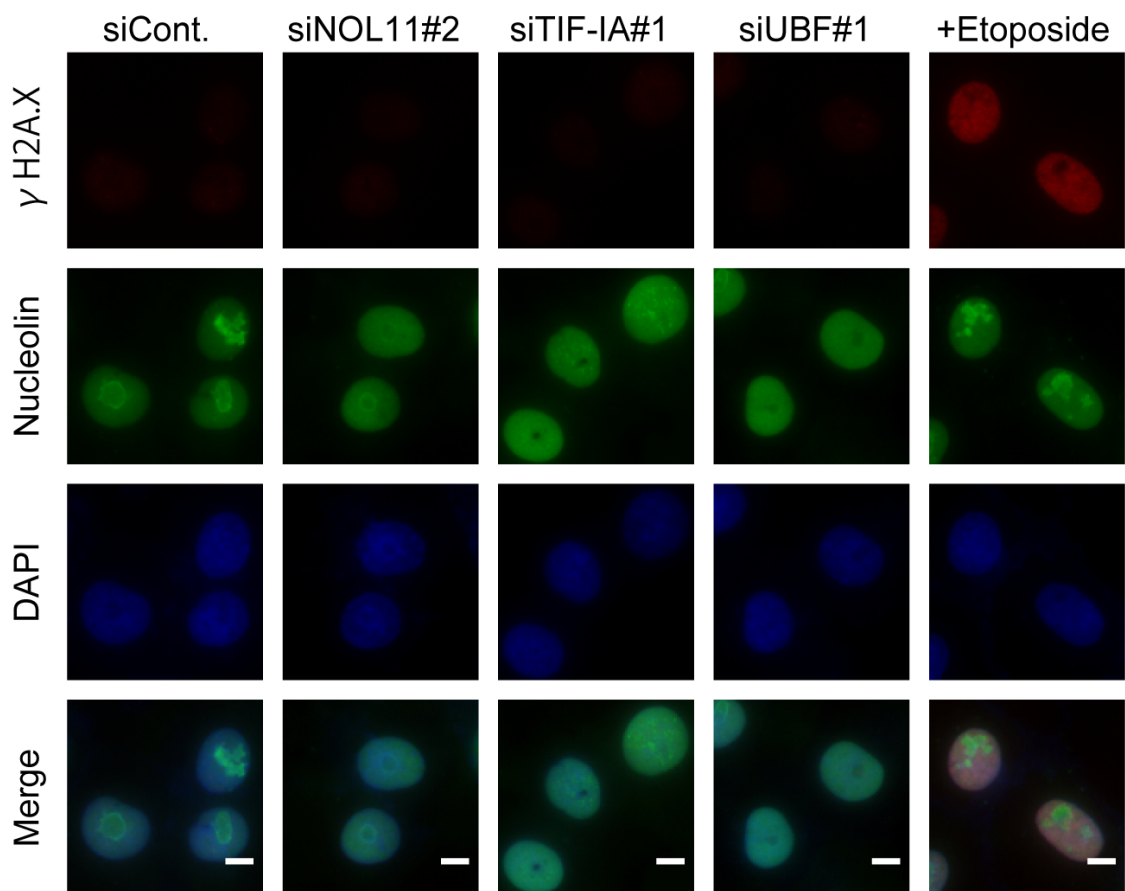


Figure 21 核小体崩壊時における γ H2A.X に対する影響

細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。その後、 γ H2A.X 抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。また、ポジティブコントロールとして、10 μ M の Etoposide を 2 時間処理した。

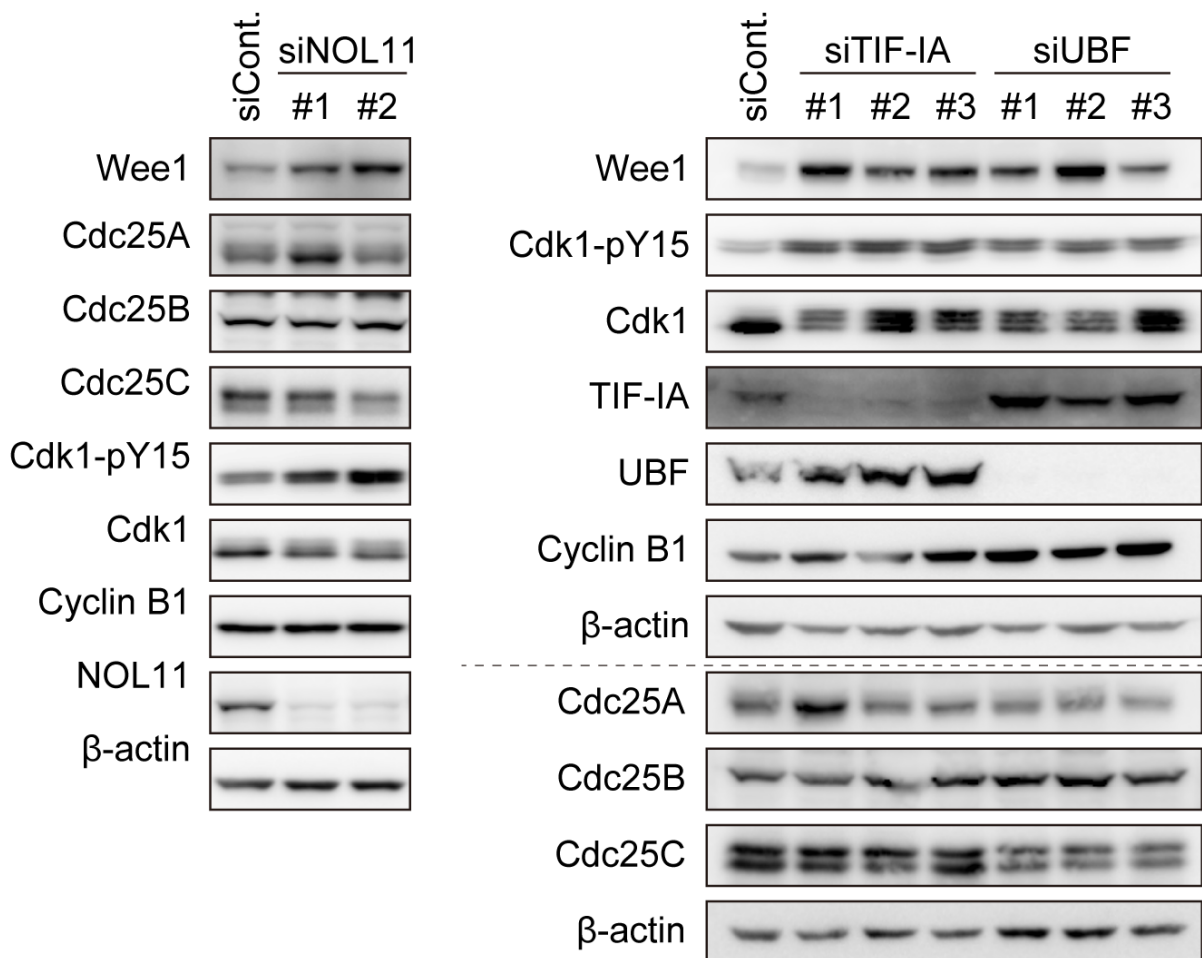


Figure 22 核小体崩壊時における Wee1 および Cdc25 に対する影響

細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。免疫ブロッティングにより示されたタンパク質量およびリン酸化量について調べた。

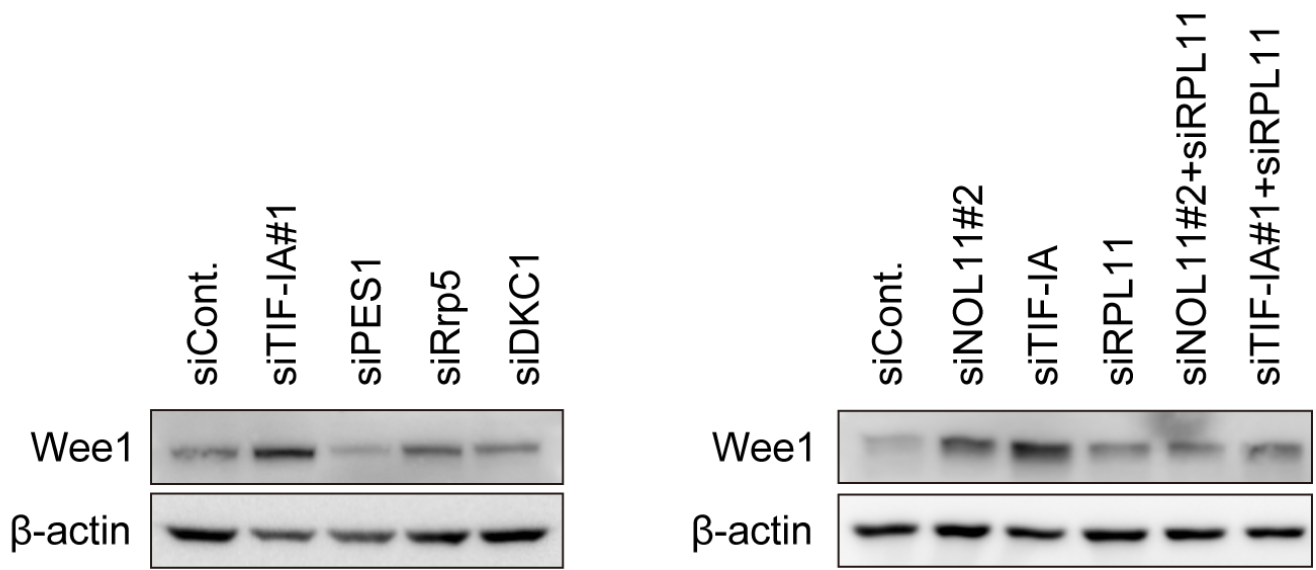


Figure 23 rRNA プロセッシング因子および RPL11 の同時 KD 時の Wee1 について解析
 細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。イムノブロッティングにより示されたタンパク質量およびリン酸化量について調べた。

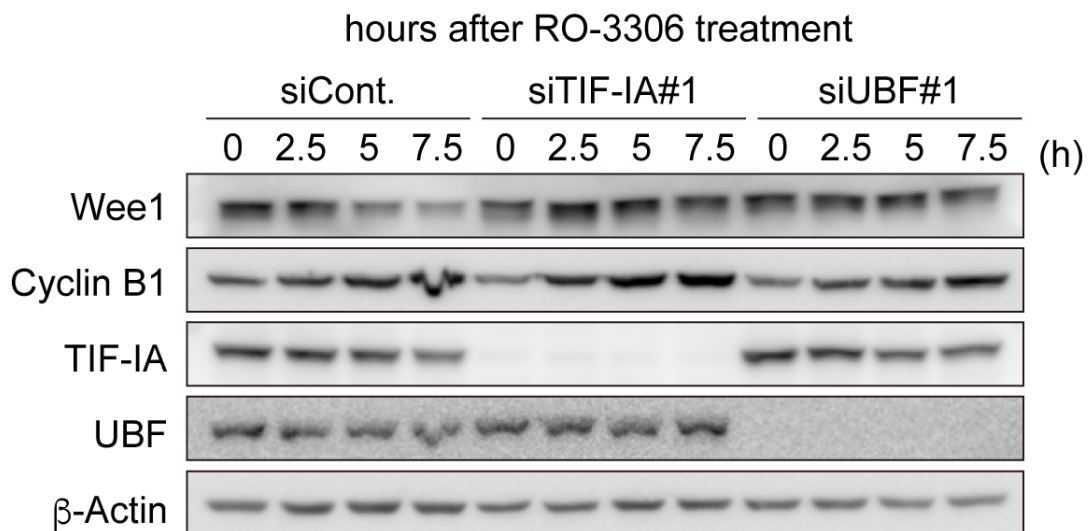
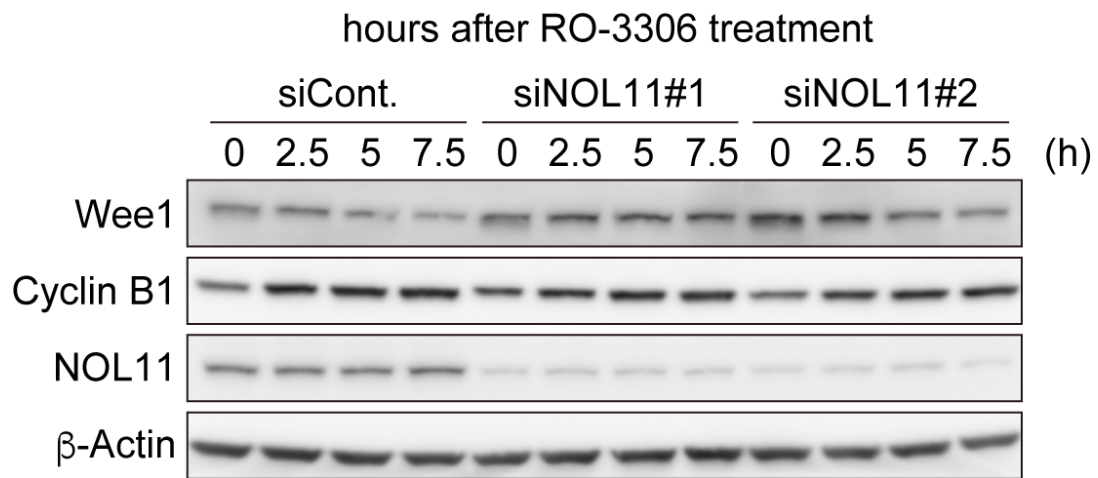


Figure 24 核小体崩壊時における Wee1 量の変化についての解析

細胞を Figure 4 と同様に G1/S 期に同調した。同調解除後 6 時間において、RO-3306 を添加した。RO-3306 を加えて時間を 0 時間とし、示された時間に細胞を回収し、免疫ブロッティングにより示されたタンパク質量を調べた。

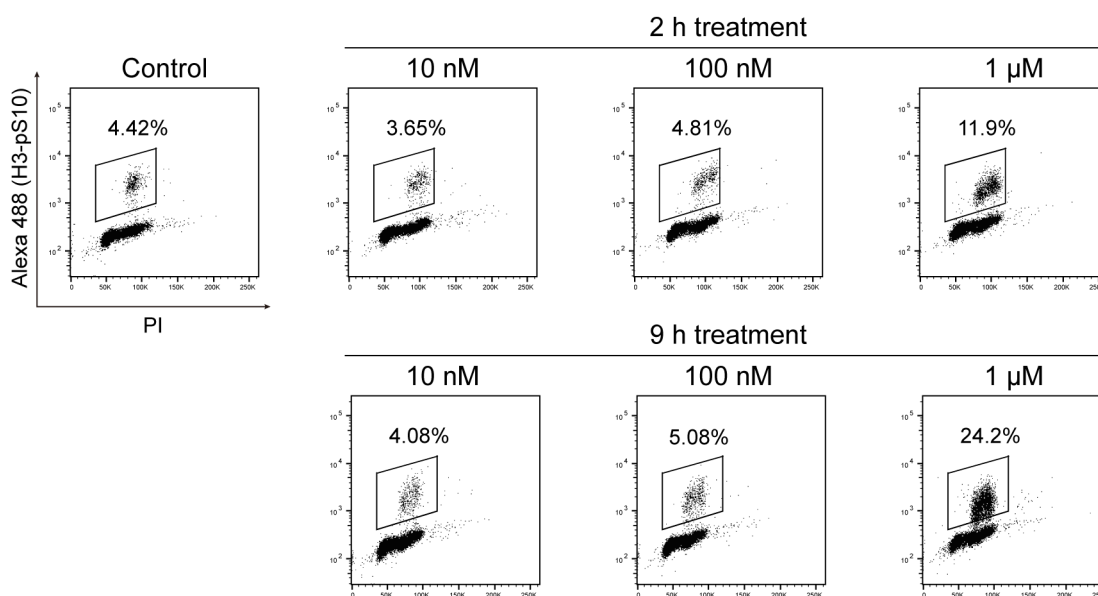


Figure 25 Wee1 阻害剤 MK1775 による細胞周期への影響

細胞を異なる濃度の MK1775 で処理し、2 時間あるいは 9 時間後に回収した。回収した細胞を PI および H3-pS10 抗体により二重染色し、フローサイトメーターで解析した。四角形で囲まれた部分は 4N-H3-pS10⁺ 細胞であり、M 期細胞を示す。

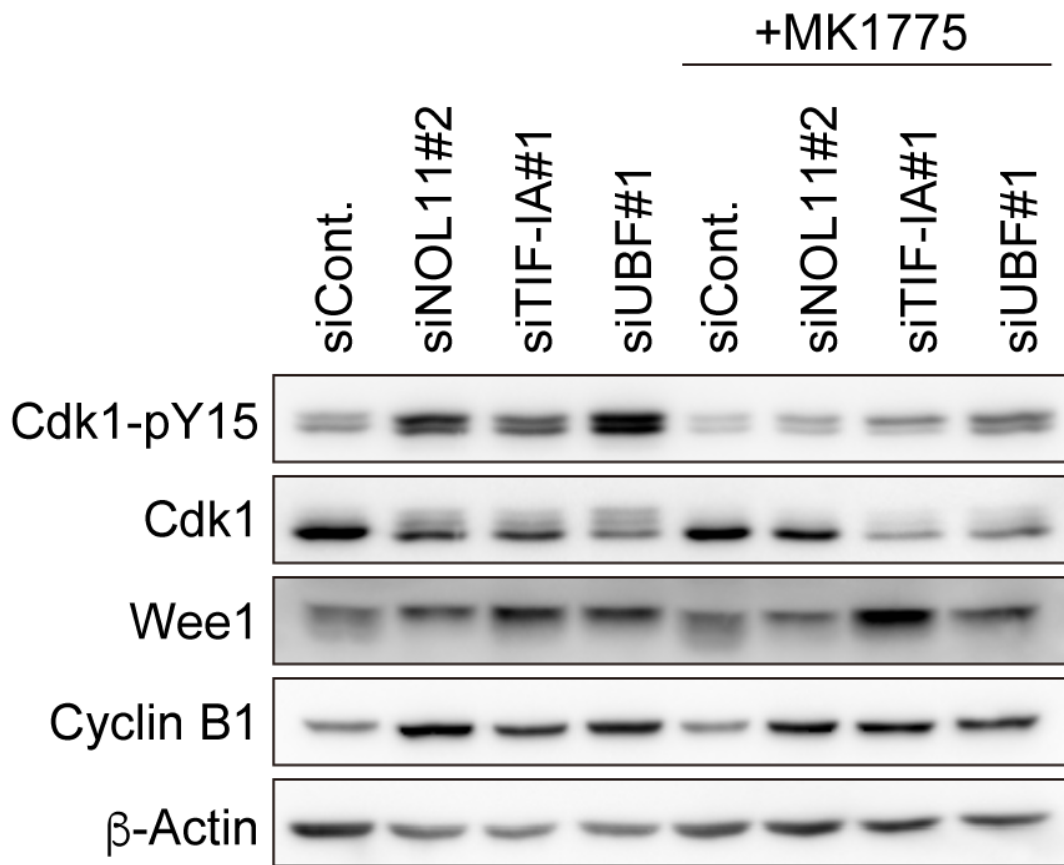


Figure 26 核小体崩壊時における MK1775 処理による Cdk1 の阻害的リン酸化への影響
 細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。また、回収 3 時間前に 100 nM の MK1775
 を添加した。細胞を回収後、イムノブロッティングにより示されたタンパク質量および
 リン酸化量について調べた。

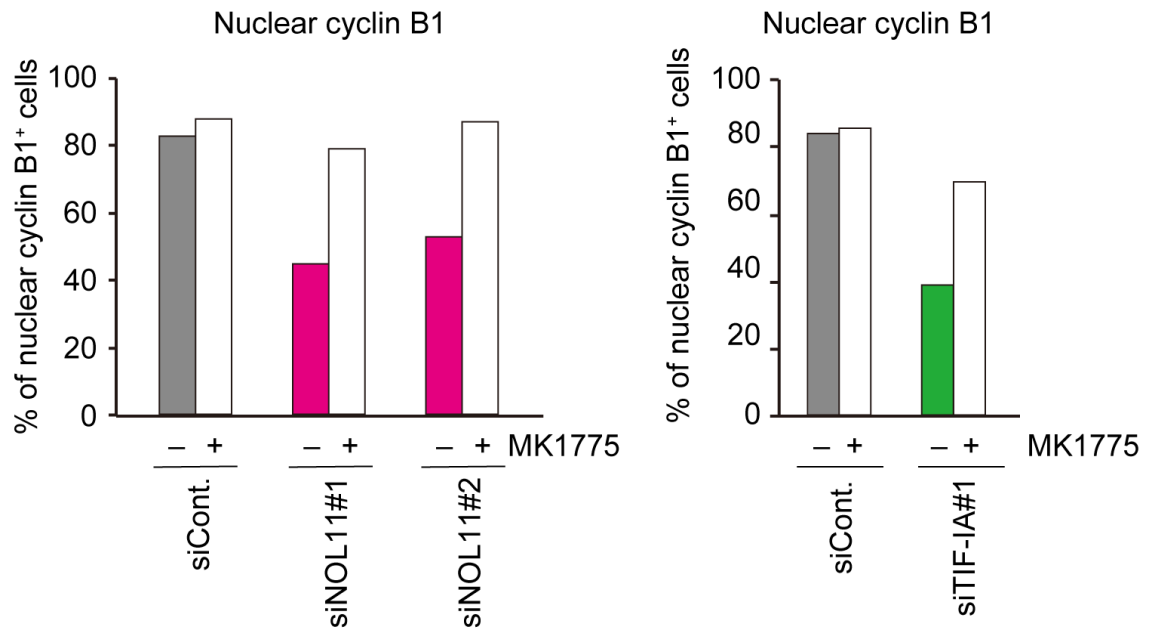


Figure 27 核小体崩壊時における MK1775 処理による Cdk1 の阻害的リン酸化への影響
 細胞を Figure 5 と同様に M 期直前に同調した。また、同調解除 12 時間前に 100 nM の
 MK1775 を添加した。同調解除後 20 分にて、細胞を固定し、cyclin B1 抗体を用いて蛍
 光免疫染色を行なった。cyclin B1 の核移行した細胞について定量した。各条件において
 350 細胞以上を定量した。

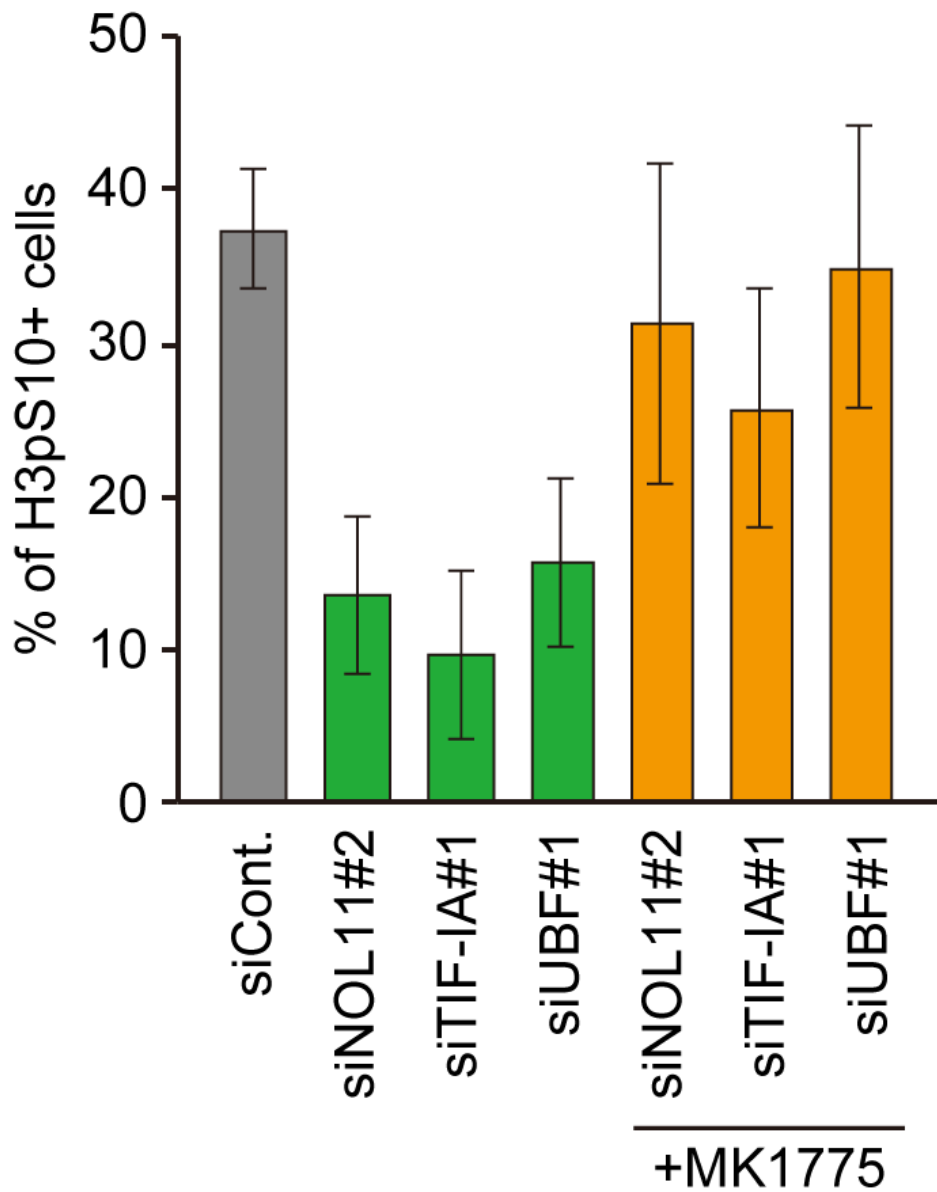


Figure 28 核小体崩壊時における MK1775 処理による M 期開始への影響

細胞を Figure4 と同様に G1/S 期に同調した。また、同調解除後 6 時間にて、100 nM の MK1775 を添加した。同調解除後 9 時間において細胞を回収し、PI および H3-pS10 抗体により二重染色し、フローサイトメーターで解析した。4N-H3-pS10⁺細胞 (M 期細胞) を定量した。数値は独立した三回の実験の平均値±標準偏差で示した。

第三章

核小体に由来する PR 構造の解析

3.1 要旨

M 期染色体の表層は、perichromosomal region (PR)と呼ばれ、間期核小体に由来する多数のタンパク質が蓄積すること、細胞増殖マーカーである Ki67 がその構造基盤になることが報告されている。加えて、いくつかの rRNA も PR に蓄積するが、PR における rRNA の機能はほとんど明らかとなっていない。本研究では、rRNA が間期において核小体タンパク質の局在を担う“足場”として働くことに着目し、PR 構造における rRNA の役割について研究を行なった。

はじめに、M 期染色体に RNase A を処理し、M 期特異的に RNA を除去したところ、核小体タンパク質が PR から解離することを明らかにした。さらに、rRNA 転写の阻害剤や siRNA を用いた rRNA 転写因子を KD した際にも同様の結果が得られた。したがって、rRNA は核小体だけでなく PR においても核小体タンパク質の足場として機能していることが示された。興味深いことに、RNase A 処理や rRNA の転写阻害時においても、PR の構造基盤として報告されている Ki67 の PR 局在に変化は見られなかった。そこで、Ki67 の KD 時における pre-rRNA の局在を調べた結果、Ki67 の KD により、M 期において rRNA は PR 上に局在せず、rRNA の凝集体を形成することを見出した。したがって、Ki67 は M 期において、rRNA を PR 上に正しく展開する機能をもつことが示唆された。

以上の結果から、M 期染色体上の PR は Ki67、rRNA、核小体タンパク質の三層から構成されるモデルを提唱する。本モデルでは、Ki67 が構造基盤として働き、続いて rRNA が中間層において接着剤として機能することで、外層に小体タンパク質をつなぎとめていると考えられる。

3.2 序

遺伝情報が保存されている染色体は、母細胞から二つの娘細胞へその情報を正確に伝達するためにダイナミックな構造変化を起こす。間期における絡み合った染色体は、M期への進行と同時に軸構造を持つM期染色体に、その構造を変化させる。形成する。M期染色体上には、腕部クロマチン領域、軸構造、セントロメア／キネトコア領域、テロメア領域、染色体表層領域の五つの特徴的な領域が存在する(1)。これらのうち五番目の領域である染色体表層領域には、染色体全体の33%の質量が存在すると報告されている(2)。しかし、その組成および機能についてはほとんど明らかとなっていない。この染色体表層領域は、perichromosomal region (PR)と呼ばれており、M期の前期から後期にわたって、様々な動物・植物細胞で観察することができる(3)。正確なPRの機能は未だ明らかになっていないが、これまでの研究から、(1) M期染色体と細胞質を隔てる、(2) M期染色体にタンパク質の結合領域を与える、(3) リボソーム合成に関わる因子を娘細胞へ均等に分配するといった役割が提唱されている(4)。

PRには、核小体に由来する様々なタンパク質やRNAが局在している(5)。核小体はM期の開始と同時に、Cdk1キナーゼによりrRNA転写が抑制されることで解体され(6-8)、そのうち一部の核小体タンパク質とRNAはM期染色体表面に局在を変化させPRを構築するとされている。近年、pre-rRNAやrRNA中間体がPR上に局在し、いくつかのrRNAプロセッシングタンパク質の足場となることが報告されている(9)。また、siRNAを用いて細胞増殖マーカーであるKi67をKDすると、核小体タンパク質のPR局在が低下することが報告されている(10, 11)。さらに、Ki67を除去した細胞では、M期中期においてM期染色体の厚さが通常の約半分に低下する(2)。このように核小体タンパク質のPR局在はKi67あるいはrRNAに依存しているが、PRにおけるKi67と

rRNA の関係についてはよくわかっていない。

本研究では、PR 上における Ki67 と pre-rRNA、核小体タンパク質のそれぞれの関係について解析を行った。我々は PR 上における rRNA を除去した際に、Ki67 の局在には影響しなかったが、他の核小体タンパク質が PR に局在できなくなることを見出した。さらに、Ki67 を KD すると、核小体タンパク質だけでなく、rRNA も PR に正しく局在できないことを突き止めた。以上の結果をまとめると、PR においては Ki67 が構造基盤として働き、rRNA を PR に局在させる。続いて、中間層にて rRNA が核小体タンパク質をつなぎとめ、核小体タンパク質を PR に局在させていると考えられる。これらの結果から、我々は PR が三層構造から成る新規モデルを提唱する。

3.3 結果

M 期において、RNA は PR 上に核小体タンパクを局在させるのに必要である

はじめに、RNA が核小体タンパク質の PR 局在に必要なかどうか調べるために、我々は M 期中の HeLa 細胞に対して、1 mg/mL のウシ血清アルブミン (control) および RNase A を処理し、蛍光免疫染色を行なった。Control 細胞において、核小体タンパク質である nucleophosmin (NPM) および Myb binding protein 1A (MBBP1A) は PR に局在していたが、RNase A 処理により、いずれの核小体タンパク質も PR から細胞質全体へと拡散していた (Figure 1)。興味深いことに、RNase A によって Ki67 の PR 局在はほとんど変化しなかった (Figure 2)。そこで、PR における NPM、MYBBP1A、Ki67 の蛍光強度を定量したところ、NPM および MYBBP1A の蛍光強度は RNase A 処理により約 80% 低下していたが、Ki67 の蛍光強度はほとんど変化しないことが明らかとなった (Figure 3)。続いて、我々は細胞分画法を用いて M 期染色体画分を単離し、核小体タンパク質の M 期染色体上への局在に対する RNase A 処理による影響を生化学的な方法を用いて調べた。イムノブロテティングの結果、染色体画分における RNase A を処理すると、核小体タンパク質である NCL、NPM、MYBBP1A の量が低下するが、Ki67 の核小体画分の量は変化しなかった (Figure 4)。以上の結果から、RNA は核小体タンパク質を PR 上に局在させるに不可欠である一方、Ki67 は RNA 非依存的に PR に局在することが示された。

pre-rRNA は核小体タンパク質の PR 局在を制御するが、Ki67 の局在には影響しない

これまでの報告から、Pol I 由来のいくつかの rRNA が分裂期において PR に局在し、いくつかの核小体タンパク質の PR 局在に必要なことが報告されている(9)。

我々は、新規合成 RNA 標識と RNA polymerase 阻害剤を用いて、どの RNA ポリメラーゼ由来の RNA が PR へ局在するかを解析した。細胞培養液中に 5-Ethynyl Uridine (EU)を添加し、その後 Click ケミストリーにより EU を取り込んだ RNA を可視化した。はじめに、阻害剤が正しく作用しているかどうかを間期における新規合成 RNA (nsRNA) の局在によって調べた。阻害剤を処理していない細胞 (control) では、nsRNA の濃縮された領域 (核小体) と蛍光強度が均一に広がる領域 (核質) が見られた。Pol II の阻害剤である α -アマニチン (α -Ama) を処理すると、核小体でのみ nsRNA の蛍光シグナルが観察される一方で、Pol I の阻害剤である低濃度の Act D 処理では、nsRNA の蛍光シグナルが核質においてのみ観察された(Figure 5)。Pol I は核小体、Pol II は核質で転写を行なっていることから、それぞれの阻害剤は Pol I、Pol II を特異的に阻害していることが確認された。次に、M 期細胞について解析を行なった。control 細胞においては、nsRNA は細胞全体で観察されたが、特に PR において強いシグナル見られた。 α -Ama を処理しても nsRNA の局在に大きな変化は見られなかったが、Act D 処理時には、PR における nsRNA シグナルが顕著に低下していた (Figure 6)。また、いずれの阻害剤を処理しても Ki67 の局在に変化は見られなかった。さらに、我々は阻害剤処理時における核小体タンパク質の PR 局在について解析を行なった。その結果、Act D を処理した際においてのみ NPM 及び MYBBP1A の PR 局在が低下した (Figure 7A and 7B)。これらの結果について Ki67、NPM、MYBBP1A の PR 上の蛍光シグナルを定量したところ、Ki67 の蛍光強度はどの阻害剤を処理してもほとんど変化しなかった。しかし、NPM と MYBBP1A の蛍光強度は Act D 処理時においてのみ著しく低下することを明らかにした (Figure 8)。次に、それぞれの阻害剤を処理後の M 期染色体画分における核小体タンパク質量を生化学的に調べた。蛍光免疫染色の結

果と同様に、Act D および α -Ama 処理による染色体画分における Ki67 の量はほとんど変化しなかったが、Act D 処理時においてのみ染色体画分の NCL、NPM、MYBBP1A 量が低下した (Figure 9)。

我々はより特異的に Pol I 転写を阻害するために、Pol I 転写因子として働く TIF-IA(12)をノックダウン (KD)し、核小体タンパク質の PR 局在を解析した。蛍光免疫染色において、TIF-IA を KD すると Act D 処理の時と同様に Ki67 の PR 局在には影響しなかったが、NPM および MYBBP1A の蛍光シグナルが低下した (Figure 10 および Figure 11)。

したがって、PR に局在する rRNA が、いくつかの核小体タンパク質局在を制御していることが示された。注目すべきことに、rRNA を含むいずれの RNA も Ki67 の PR 局在には影響を及ぼさなかった。

Ki67 は pre-rRNA と核小体タンパク質の PR 局在を制御する

これまでの報告から、Ki67 を KD すると NCL、NIFK、PES1、cPERPs といった核小体タンパク質が PR に局在できなくなることが報告されている(10)。同様に我々が siRNA を用いて Ki67 を KD した際にも、核小体タンパク質である NPM、MYBBP1A は PR 上に局在しなかった (Figure 12 および Figure 13)。さらに、Ki67 および TIF-IA を KD した際の染色体画分における核小体タンパク質量をイムノブロッティングにより調べたところ、染色体画分における核小体タンパク質 NCL、NPM、MYBBP1A 量は、Ki67 および TIF-IA のいずれの KD によっても低下していることを明らかにした (Figure 14)。

これまでの実験結果より、RNase A 処理や Pol I 阻害は Ki67 の PR 局在に影響しな

ったが、核小体タンパク質である NPM や MYBBP1A の PR 局在を低下させたことから、Ki67 は核小体タンパク質の PR 局在を直接的に制御していない可能性が示唆された。そこで、我々は Ki67 の KD により rRNA の局在が変化し、その結果、核小体タンパク質の PR 局在に影響すると考えた。この仮説を調べるために、我々は Ki67 を KD し、EU 標識によって RNA を可視化した。間期において、nsRNA が濃縮された領域は Ki67 と共局在していたが、Ki67 を KD しても nsRNA シグナルにはほとんど影響しなかった (Figure 15)。つまり、間期において Ki67 は核小体における RNA 合成にはほとんど関与していないことが示唆された。一方、M 期においては、Ki67 を KD した細胞の約 80%において、nsRNA が PR に局在せず、凝集体を形成することが明らかとなった (Figure 16 および 17)。以上の結果から、Ki67 は rRNA の PR 局在に重要な働きを持つことが示され、Ki67 が rRNA を通して、核小体タンパク質を制御する可能性が示唆された。

3.4 考察

本研究において、我々は M 期染色体における PR 形成に関して Ki67 および rRNA の役割について解析を行なった。これまでの報告に加えて今回の結果から、我々は PR が Ki67、rRNA、核小体タンパク質からなる三層モデルを提唱する (Figure 18)。以下にモデルの根拠となった三点を述べる。第一に、M 期細胞より RNA を除去、Act D や TIF-1A の KD による rRNA 量の低下の際に Ki67 を除く、いくつかの核小体タンパク質は PR 上に局在しなくなったこと。つまり、rRNA は PR において核小体タンパク質の足場として機能することが示唆される。第二に、Ki67 を KD するとほとんどの M 期細胞において、nsRNA が PR に局在せず、RNA の凝集体を形成したこと。この結果は、Ki67 を KD すると M 期において核小体タンパク質の凝集体が形成されるというこれまでの報告と非常に類似している(10)。第三に、Ki67 は M 期前期における核膜崩壊より前の段階において PR 上に局在するが(13)、核小体は核膜崩壊と同時あるいはそれより後に解体されること(8)から、Ki67 が rRNA や核小体タンパク質を PR に局在させるに必要であることが示唆される。これらの結果をまとめると、PR は Ki67 が構造基盤として機能し、さらに rRNA が中間層において核小体タンパク質を PR に繋ぎ止めることで形成されると考えられる。しかし、Ki67 は NIFK(14)や Hk1p2(15)、PP1 γ (10)といった核小体に局在するタンパク質と相互作用する事が報告されており、本研究においても Ki67 が直接核小体タンパク質の局在を制御する可能性が存在する。

Ki67 は約 3,000 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であり、いくつかの保存されたドメインを持つ。C 末端においてはロイシンとアルギニンが豊富に存在する LR ドメインがあり、このドメインが M 期染色体表面との結合に必要である(13, 16)。しかしながら、Ki67 には既知の RNA 結合ドメインは存在していないため、Ki67 と rRNA との

相互作用や、M 期における rRNA 局在をどのように制御しているかは今後の研究課題である。また、Ki67 は M 期染色体表面において **biological surfactant** として働くことで、それぞれの M 期染色体が接近しすぎないようにする働きを持つ(13)。しかし、PR に局在する核小体タンパク質と **biological surfactant** との関係については不明であるが、核小体タンパク質が Ki67 と協調的に働くことで、**biological surfactant** の機能に寄与している可能性もある。あるいは、PR に局在する核小体タンパク質は、それぞれ個別の機能を持ち、M 期進行においてなんらかの機能をもっている可能性も存在する。今後、PR に局在するタンパク質の働きを解析していくことで、M 期染色体の構造やダイナミクスに関する新たな知見が得られると考えられる。

3.5 実験材料および方法

細胞培養

ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (penicillin 100 unit/mL、streptomycin 100 unit/mL) を含む Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)を用いて、5% CO₂、37°C の条件下で培養した。

抗体

本章では以下の抗体を用いた。

ウサギポリクローナル抗体：Ki67 (sc15402, Santa Cruz Biotechnolog)、ヤギポリクローナル抗体：TIF-IA(sc11805, Santa Cruz Biotechnolog)、マウスモノクローナル：anti-UBF (sc13125, Santa Cruz Biotechnolog), NPM (FC-61991, Thermo Fisher Scientific), NCL (M019-3, MBL)、ウサギポリクローナル anti-MYBBP1A 抗体は先行研究で用いられたものを使用した(17)。

siRNA およびトランスフェクション

siRNA は適切な Stelth RNAi (Thermo Fisher Scientific)を購入し、Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)の製品プロトコルに従ってトランスフェクションを行い、48 時間培養した細胞を実験に用いた。また、Stealth RNAi siRNA Luciferase Reporter Control (Thermo Fisher Scientific)をネガティブコントロールとして用いた。以下に用いた siRNA の配列を記載する。

TIF-IA, 5'-CGACACCGUGGUUUCUCAUGCCAAU-3'

Ki67, 5'-GCAUUUAAGCAACCUGCAA-3'

蛍光免疫染色法

蛍光免疫染色を行う際には、poly-L-lysine でコートしたカバーガラスに細胞を播種して行なった。細胞を 4% paraformaldehyde (PFA)/phosphate-buffered saline (PBS; PBS; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, and 8.1 mM Na₂HPO₄) で 15 分間固定し、0.1% Triton X-100/PBS で 3 分間の透過処理を行なった。抗 NPM 抗体を使用する際には、0.1% Triton X-100/PBS (PBS-T)による 2 分間の透過処理を行なった後に、固定作業を行なった。

固定した細胞は 3% BSA/PBS を用いて室温で 1 時間のブロッキング処理を行なった。次に、ブロッキング試薬を除去し、一次抗体を 3% BSA/PBS に希釈したでさらに 1 時間、室温で培養を行なった。反応後、一次抗体液を除去し、PBS-T により洗浄作業を 3 回行なった。続いて、Alexa Fluor®-488 あるいは 594 の蛍光標識試薬の結合した二次抗体を PBS に希釈した溶液を用いて遮光条件下 1 時間室温で反応させた。その後、PBS による洗浄作業を 2 回行い、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)溶液により DNA を染色し、VECTASHIELD (Vector Laboratories)を用いて封入した。蛍光免疫染色画像は、Biorevo (Keyence)あるいは Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss)顕微鏡を使用し所得した。また、ImageJ ソフトウェア (National Institute of Health) を用いて得られた画像の処理を行なった。

PR におけるタンパク質の蛍光強度の定量のために、画像取得時の撮影条件を一定にし、得られた画像について ImageJ を用いて解析した。はじめに、M 期染色体領域内における各タンパク質の平均蛍光強度の値を算出した。その後、バックグラウンドとして細胞質における各タンパク質の平均蛍光強度の値を算出し、M 期染色体領域の値からバックグラウンドの値を差し引いた。最終的に、control 細胞に対しての蛍光強度の

相対値を算出した。我々は、それぞれの実験を独立して3回行なった。

新規合成 RNA 標識および染色

細胞培養中において、培養上清に 1 mM となるように 5-ethynyl uridine (EU)を添加し、4 時間培養を行なった。EU 処理した細胞は、4% PFA/PBS を用いて 5 秒間の前固定を行い、0.1% Triton X- 100/PBS を用いて 5 分間の透過処理を行なった。その後、4% PFA/PBS を用いて 15 分間の本固定を行なったのちに、Click-it™ Cell Reaction Buffer Kit (Thermo Fisher Scientific)および Alexa Fluor™ 488 azide (Thermo Fisher Scientific)を製品プロトコルに用いて使用し、RNA に取り込まれた EU の蛍光染色を行なった。

M 期染色体分画法および RNase A 処理

細胞を 75 nM のノコダゾールを 12~16 時間処理することで M 期に同調し、Mitotic shake off を行い、M 期細胞のみを回収した。M 期細胞は 0.5 x Buffer A (15 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0.2 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 2 mM EDTA, 80 mM KCl, protease inhibitor cocktail [Nacalai Tesque], and 1 mM DTT)に懸濁し、室温で 10 分間静置した。遠心後、上清を除き、NP-40 (final 0.1%)を添加した 1 x Buffer A で細胞を溶解し、23 ゲージの注射針を用いて細胞を破碎した。細胞片や間期核を取り除くために、ライセートを 0.25M のスクロースおよび 0.1%の NP-40 を含む 1 x Buffer A に重層し、250 x g で 5 分間遠心した。さらに、その上清を 0.5M のスクロースおよび 0.1%の NP-40 を含む 1 x Buffer A に重層し、2000 x g で 20 分間遠心することで、M 期染色体画分を単離した。その後、M 期染色体を 100 µg/mL の BSA あるいは RNase A を含む 1 x Buffer に懸濁し室温で 10 分間反応させた。1 x Buffer による洗浄作業を行なった後、SDS サンプルバッファーを加

え、99°C で 5 分間反応させたものをイムノブロッティングサンプルとした。

RNA ポリメラーゼ阻害剤および siRNA 処理を行なった細胞は、次の手順で染色体分画を単離した。Mitotic shake off により M 期細胞のみを回収した後に、細胞を fractionation buffer (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose, 10% [v/v] glycerol, 0.25% Triton X-100, 1 mM DTT, phosphatase inhibitor cocktail [Nacalai Tesque], and protease inhibitor cocktail) を用いて溶解し、氷上で 10 分間静置した。次に 1500 x g で 5 分間の遠心を行い、M 期染色体を単離した。M 期染色体画分は fractionation buffer を用いて 3 回の洗浄を行い、SDS サンプルバッファーを加え、99°C で 5 分間反応させたものをイムノブロッティングサンプルとした。

イムノブロッティング

細胞の抽出物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、PVDFメンブレンに転移した。5% skim milkを含むTBS-T buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.05% Tween20]でメンブレンを30分間ブロッキングした後、メンブレンに一次抗体と共に4°Cで一晩培養した。TBS-T bufferで3回洗浄した後、horseradish peroxidase結合二次抗体と1時間反応させた。検出にはChemi-Lumi One (Nacalai tesque) およびChemi-Lumi One Super (Nacalai tesque)を用いた。

3.6 参考文献

1. S. Ohta, L. Wood, J.-C. Bukowski-Wills, J. Rappsilber, W. C. Earnshaw, Building mitotic chromosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 114–121 (2011).
2. D. G. Booth *et al.*, 3D-CLEM Reveals that a Major Portion of Mitotic Chromosomes Is Not Chromatin. *Mol. Cell.* **64**, 790–802 (2016).
3. D. Hernandez-Verdun, T. Gautier, The chromosome periphery during mitosis. *BioEssays.* **16**, 179–185 (1994).
4. A. A. Van Hooser, P. Yuh, R. Heald, The perichromosomal layer. *Chromosoma.* **114**, 377–388 (2005).
5. F.-M. Boisvert, S. van Koningsbruggen, J. Navascués, A. I. Lamond, The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 574–585 (2007).
6. J. Heix *et al.*, Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J.* **17**, 7373–7381 (1998).
7. V. Sirri, P. Roussel, D. Hernandez-Verdun, The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J. Cell Sci.* **112**, 3259–3268 (1999).
8. A. K. L. Leung *et al.*, Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J. Cell Biol.* **166**, 787–800 (2004).
9. V. Sirri, N. Jourdan, D. Hernandez-Verdun, P. Roussel, Sharing of mitotic pre-ribosomal particles between daughter cells. *J. Cell Sci.* **129**, 1592–1604 (2016).
10. D. G. Booth *et al.*, Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *eLife.* **3**, e01641 (2014).
11. M. Sobecki *et al.*, The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *eLife.* **5**, e13722 (2016).

12. X. Yuan *et al.*, Genetic Inactivation of the Transcription Factor TIF-IA Leads to Nucleolar Disruption, Cell Cycle Arrest, and p53-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell.* **19**, 77–87 (2005).
13. S. Cuylen *et al.*, Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature.* **535**, 308–312 (2016).
14. M. Takagi, M. Sueishi, T. Saiwaki, A. Kametaka, Y. Yoneda, A novel nucleolar protein, NIFK, interacts with the forkhead associated domain of Ki-67 antigen in mitosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 25386–25391 (2001).
15. M. Sueishi, M. Takagi, Y. Yoneda, The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2. *J. Biol. Chem.* **275**, 28888–28892 (2000).
16. M. Takagi, Y. Matsuoka, T. Kurihara, Y. Yoneda, Chmadrin: a novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. *J. Cell Sci.* **112**, 2463–2472 (1999).
17. T. Kuroda *et al.*, RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A. *EMBO J.* **30**, 1054–1066 (2011).

3.7 図表

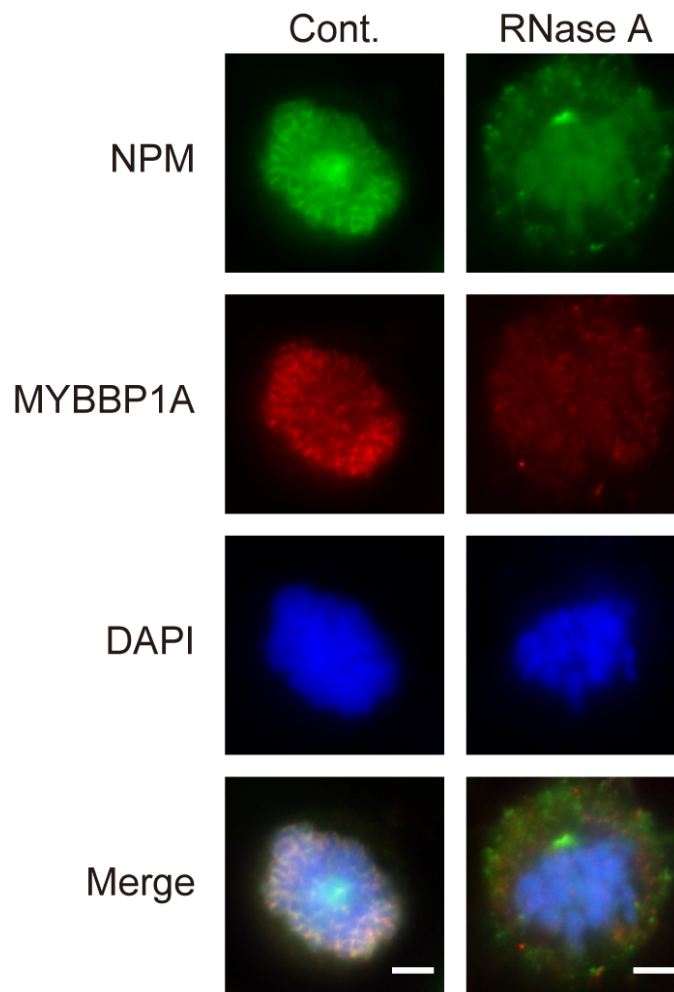


Figure 1 RNase A処理による核小体タンパク質のPR局在への影響

ヒト子宮頸癌由来細胞であるHeLa細胞に対して、1 mg/mLのウシ血清アルブミン (Cont.) およびRNase Aを含むPBSを2分間処理した。その後、NPMおよびMYBBP1A に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行ない、DAPIを用いてDNAを染色した。スケールバーは5 μm を示す。

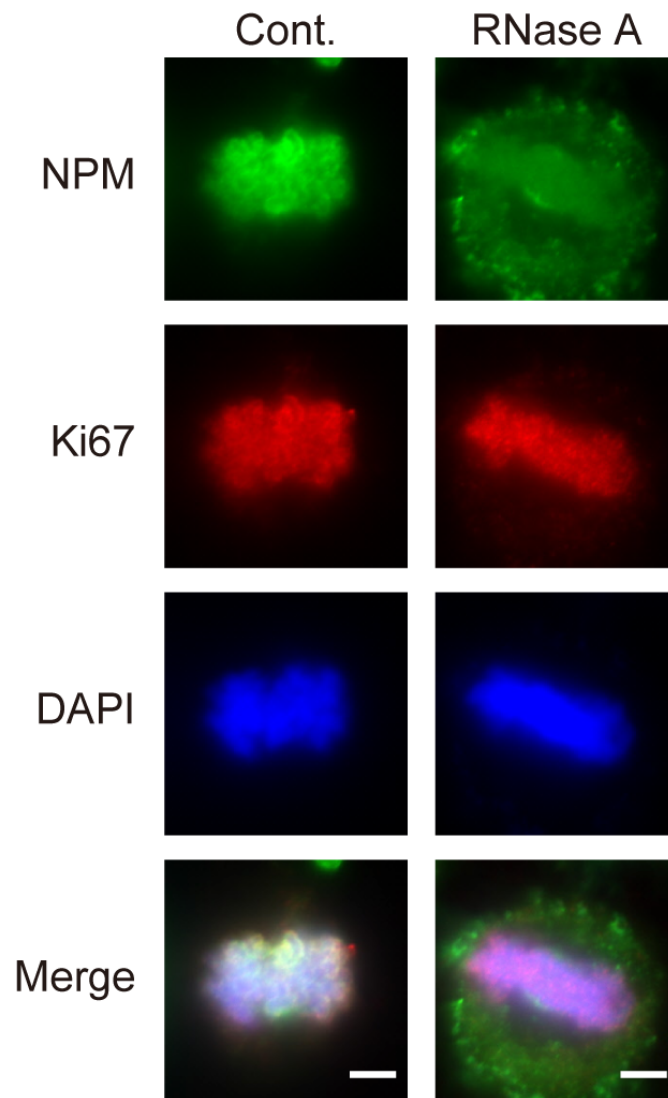


Figure 2 RNase A処理によるKi67のPR局在に対する影響

Figure 1と同様にHeLa細胞にRNase Aを処理した。NPMおよびKi67に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。スケールバーは5 μm を示す。

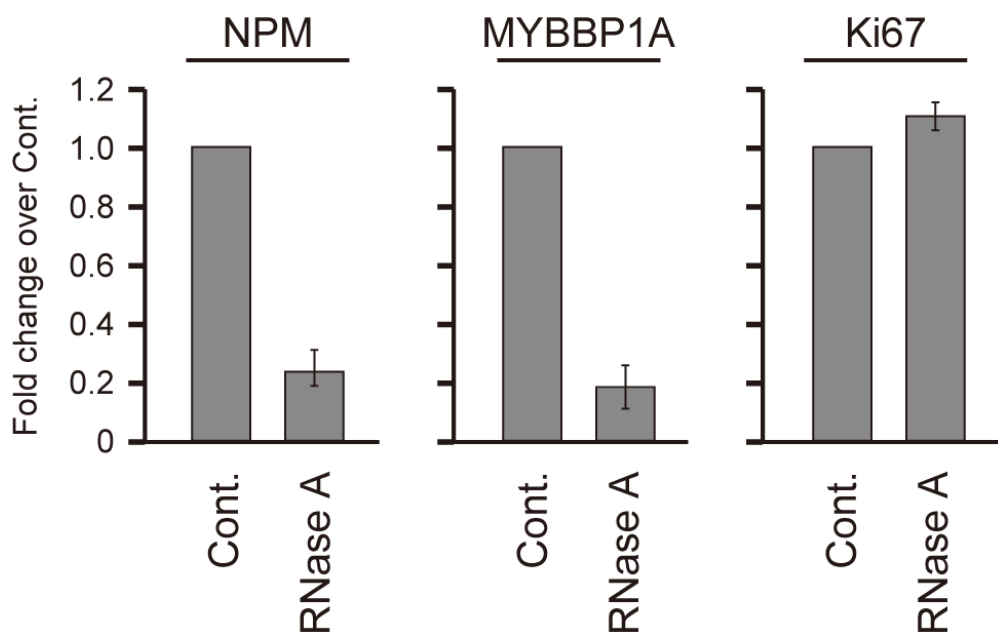


Figure 3 RNase AによるNPMおよびMYBBP1A、Ki67のPR上の蛍光シグナルについての定量

Figure 1およびFigure 2に関して、PR上の蛍光シグナルについて定量を行なった。各条件において独立した3つの実験を行い、20細胞以上を定量した。数値はCont.に対する相対値であり、平均値±標準偏差で示した。

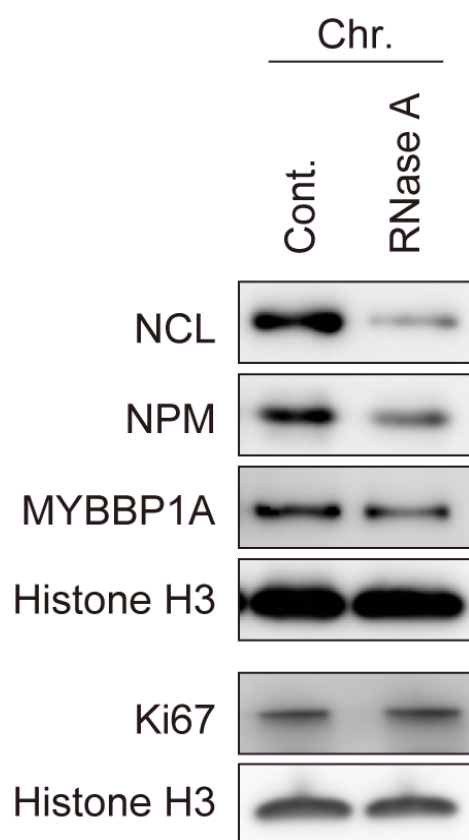


Figure 4 染色体画分における RNase A 処理による核小体タンパク質と Ki67 への影響

HeLa 細胞に対して 75 nM のノコダゾールを 12-16 時間処理し、M 期に同調させた。M 期細胞を Mitotic shake off 法により回収し、染色体画分 (Chr.) のみを単離した。その後、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウシ血清アルブミン (Cont.) および RNase A を染色体画分に加え、10 分間反応させたものをイムノブロットィングにより解析した。

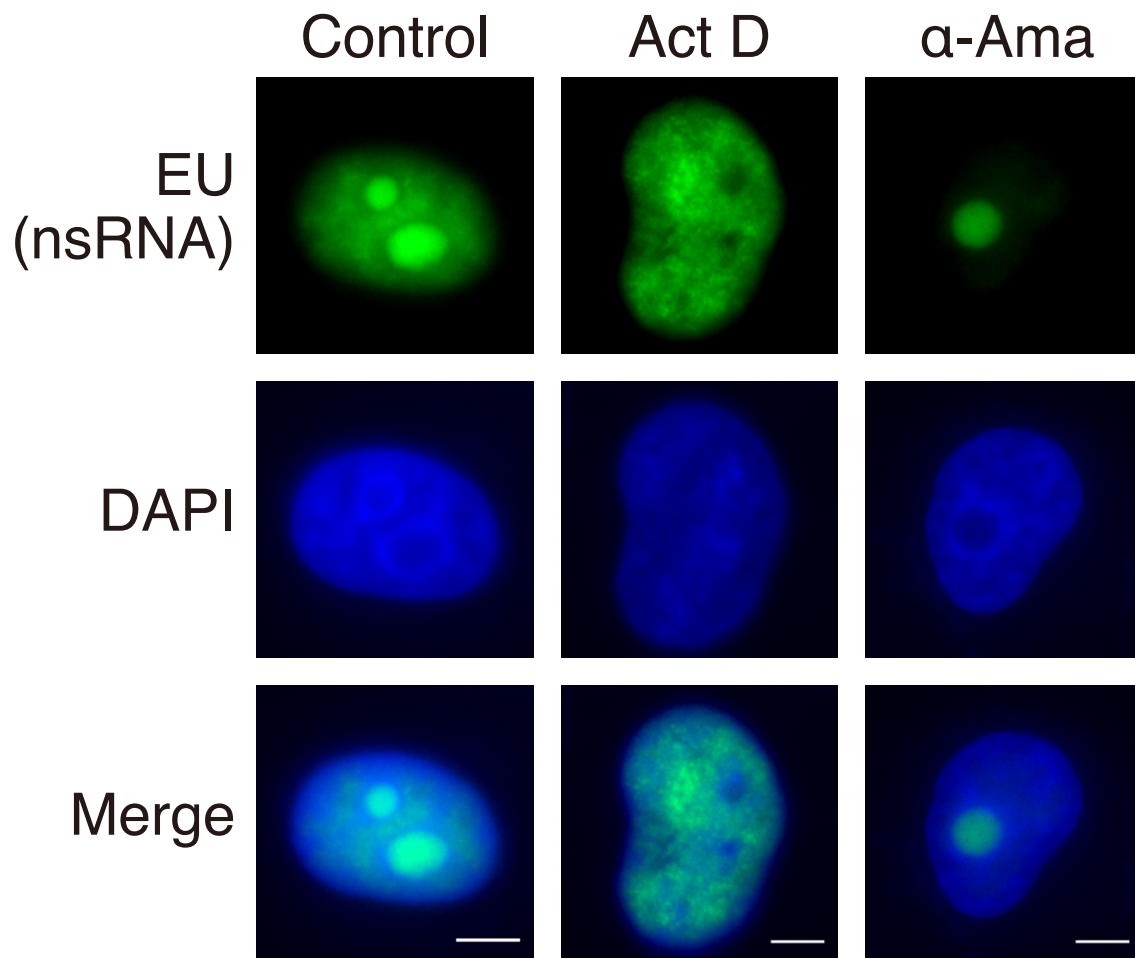


Figure 5 間期における新規合成 RNA の局在と RNA ポリメラーゼ阻害剤による影響

細胞培養中に 1 mM の EU を添加し、また同時に 2 μ g/mL の α -Amanitine (α -Ama)および 5 nM の Actinomycin D (Act D)を添加し、4 時間培養した。その後、Click-it 試薬により新規合成 RNA を可視化し、間期細胞について観察した。スケールバーは 5 μ m を示す。

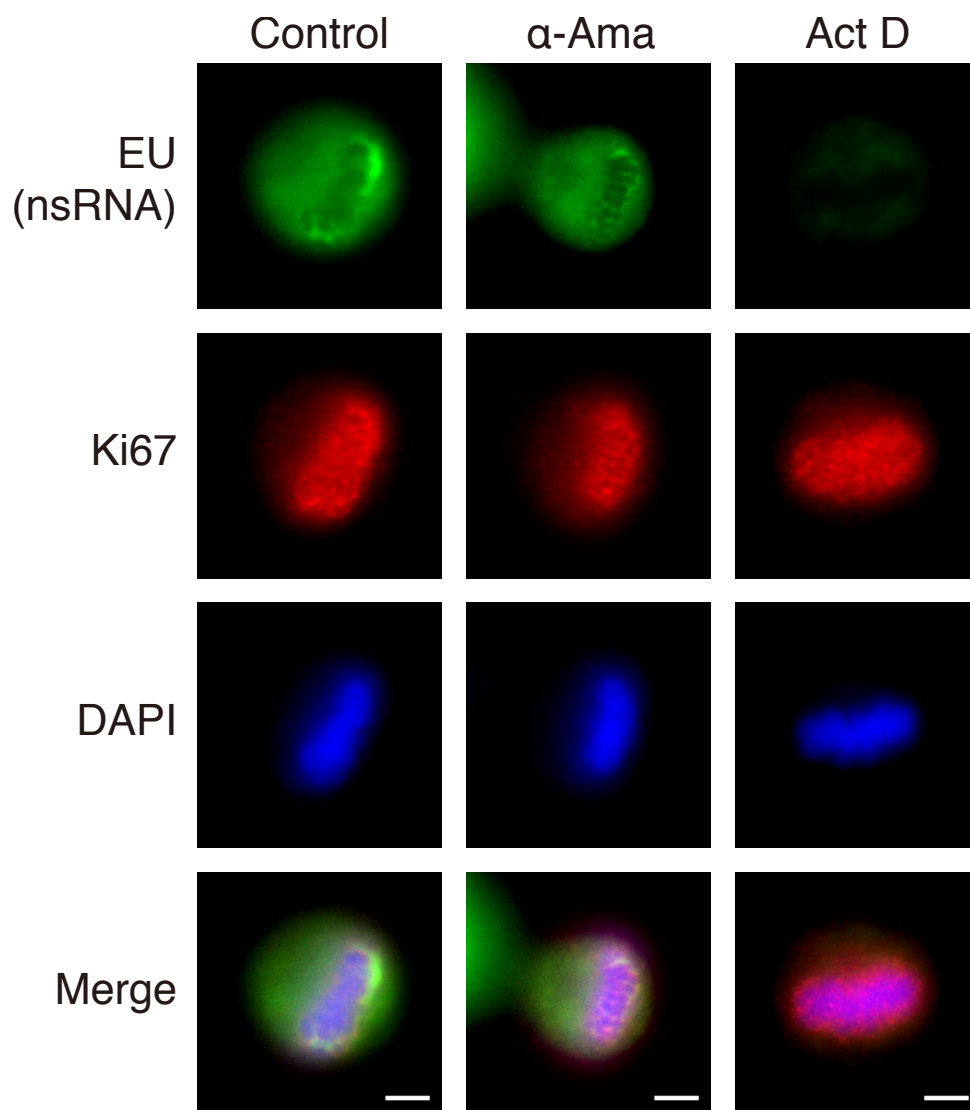


Figure 6 RNA ポリメラーゼ阻害剤による新規合成 RNA および Ki67 の PR 局在に対する影響

細胞培養中に 1 mM の 5-Ethynyl Uridine (EU) を添加し、また同時に 2 μ g/mL の α -Amanitin (α -Ama) および 5 nM の Actinomycine D (Act D) を添加し、4 時間培養した。その後、Click-it 試薬により新規合成 RNA を可視化し、Ki67 抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。スケールバーは 5 μ m を示す。

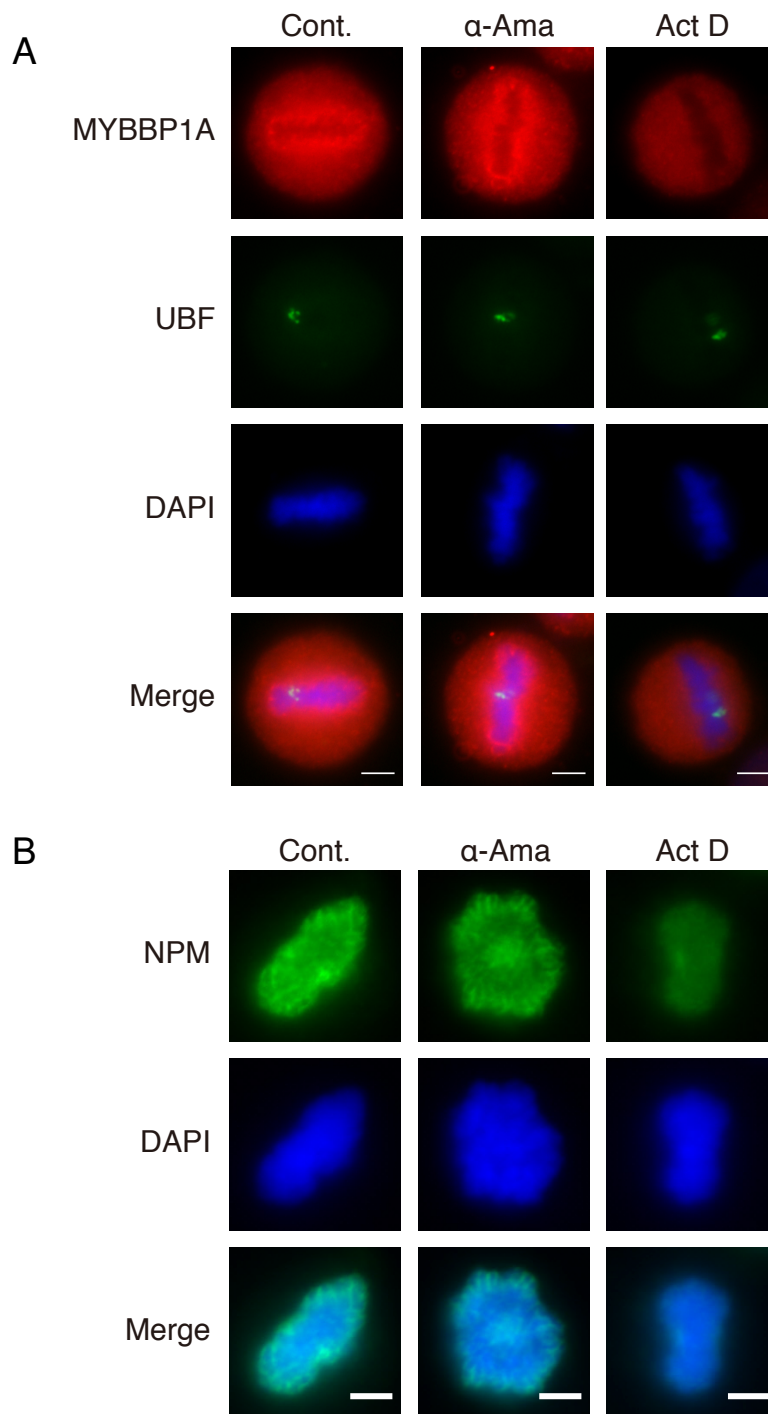


Figure 7 RNA ポリメラーゼ阻害剤による MYBBP1A および NPM の PR 局在に対する影響

細胞培養中に 2 μ g/mL の α -Ama および 5 nM の Act D を添加し、4 時間培養した。その後、(A)MYBBP1A および UBF に対する抗体、(B)NPM に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。スケールバーは 5 μ m を示す。

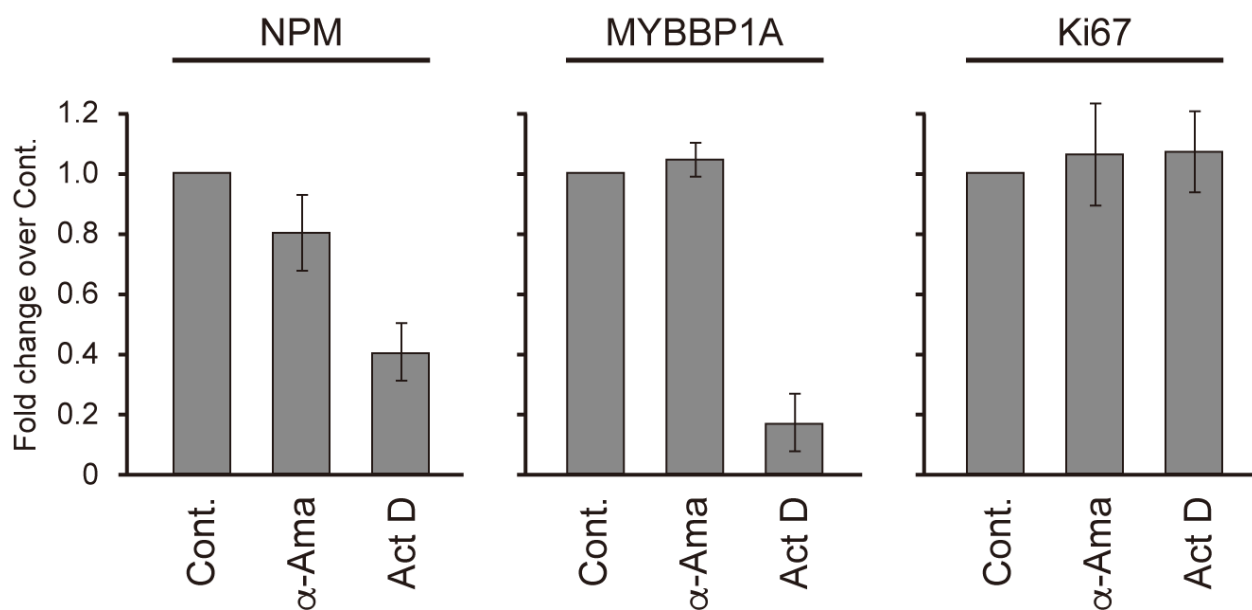


Figure 8 RNAポリメラーゼ阻害剤によるNPMおよびMYBBP1A、Ki67のPR上の蛍光シグナルについての定量

Figure 5およびFigure 6に関して、PR上の蛍光シグナルについて定量を行なった。各条件において独立した3つの実験を行い、20細胞以上を定量した。数値はCont.に対する相対値であり、平均値±標準偏差で示した。

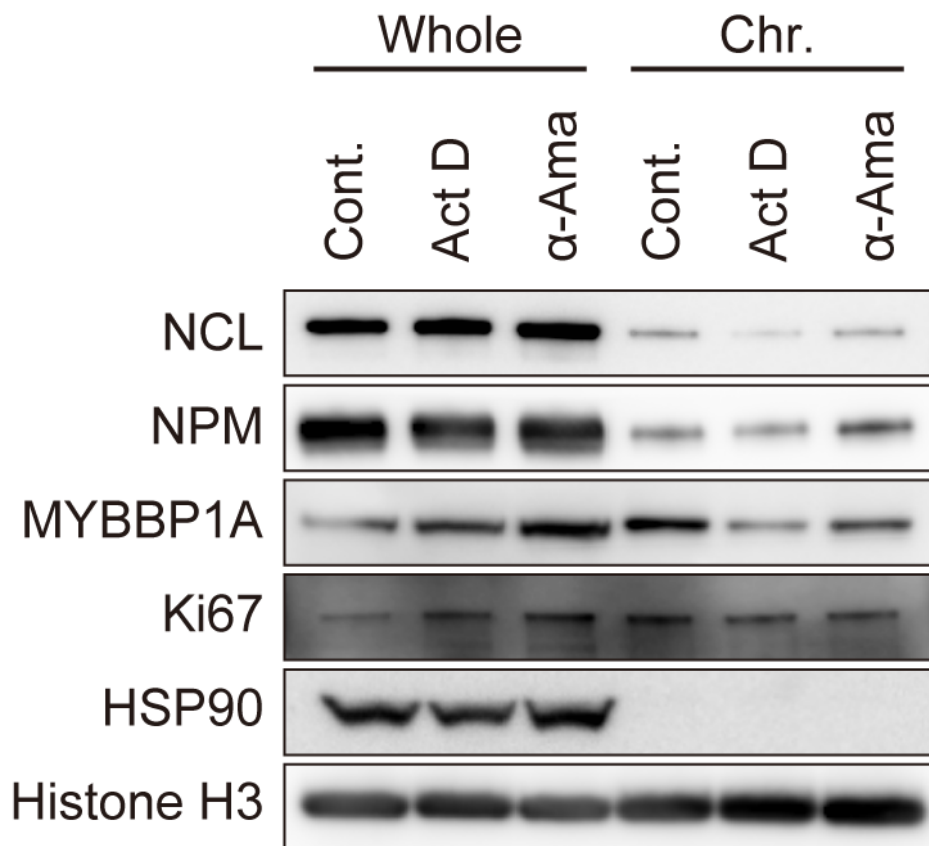


Figure 9 RNA ポリメラーゼ阻害剤による染色体画分における核小体タンパク質と Ki67 への影響

2 μ g/mL の α -Ama および 5 nM の Act D を 12 時間処理し、続いて 75 nM のノコダゾールを 12 時間処理した。Mitotic shake off 法により M 期細胞のみを回収し、染色体画分のみを単離した。その後、イムノブロッティングにより解析した。

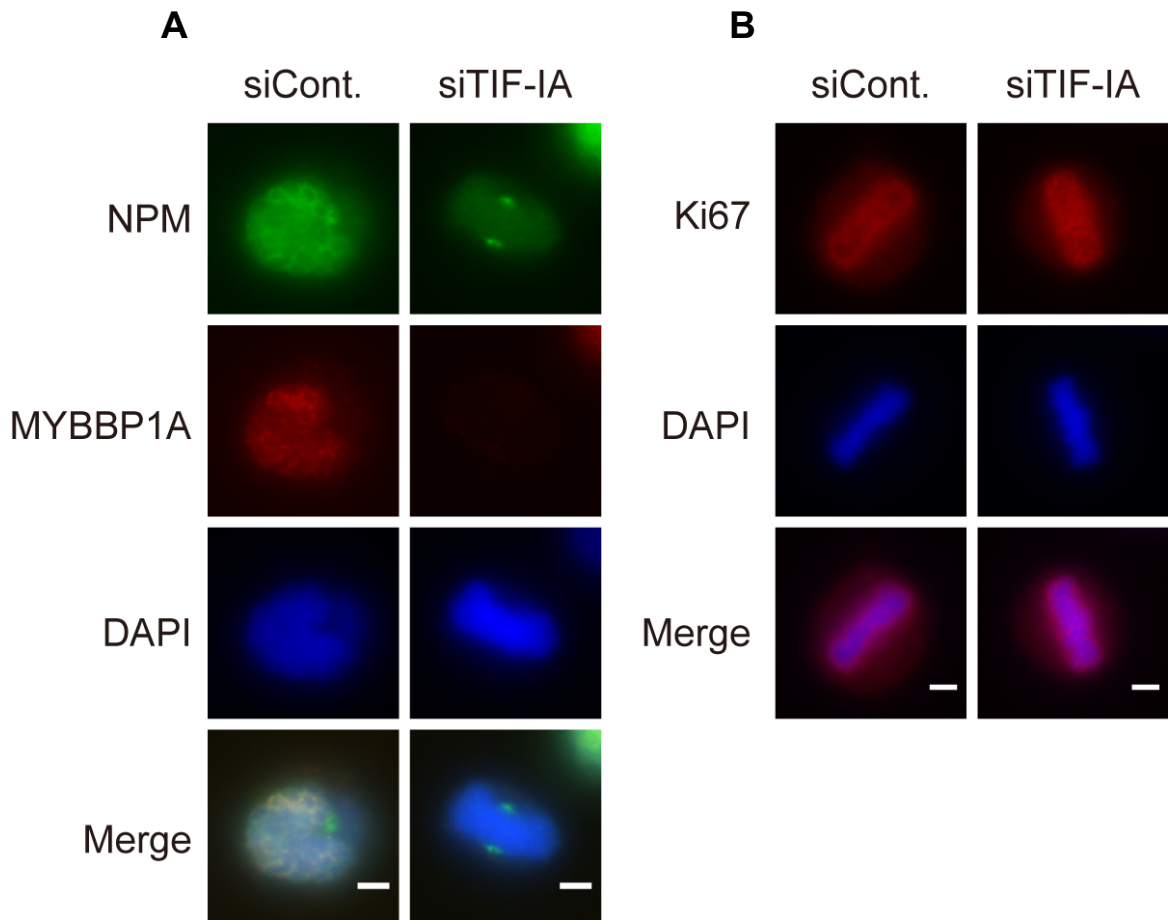


Figure 10 TIF-IA KD による NPM、MYBBP1A、Ki67 の PR 局在への影響

TIF-IA に対する siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、(A) NPM および MYBBP1A に対する抗体、(B) Ki67 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。スケールバーは 5 μm を示す。

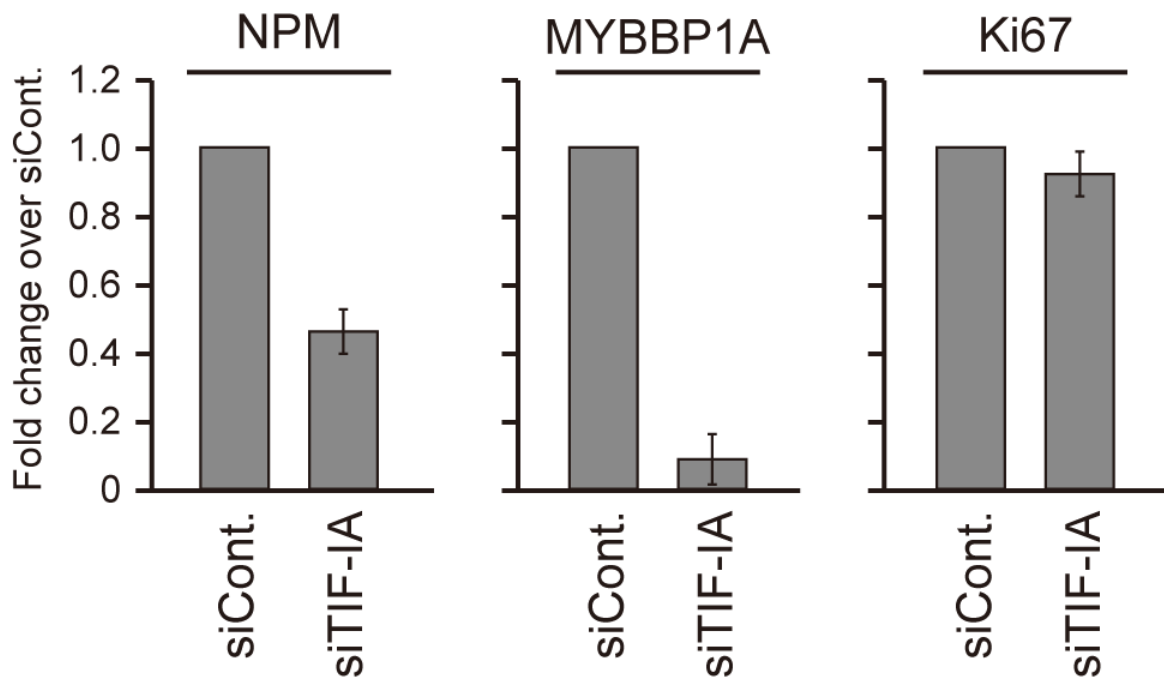


Figure 11 TIF-IA KDによるNPMおよびMYBBP1A、Ki67のPR上の蛍光シグナルについての定量

Figure 9に関して、PR上の蛍光シグナルについて定量を行なった。各条件において独立した3つの実験を行い、15細胞以上を定量した。数値はCont.に対する相対値であり、
 平均値±標準偏差で示した。

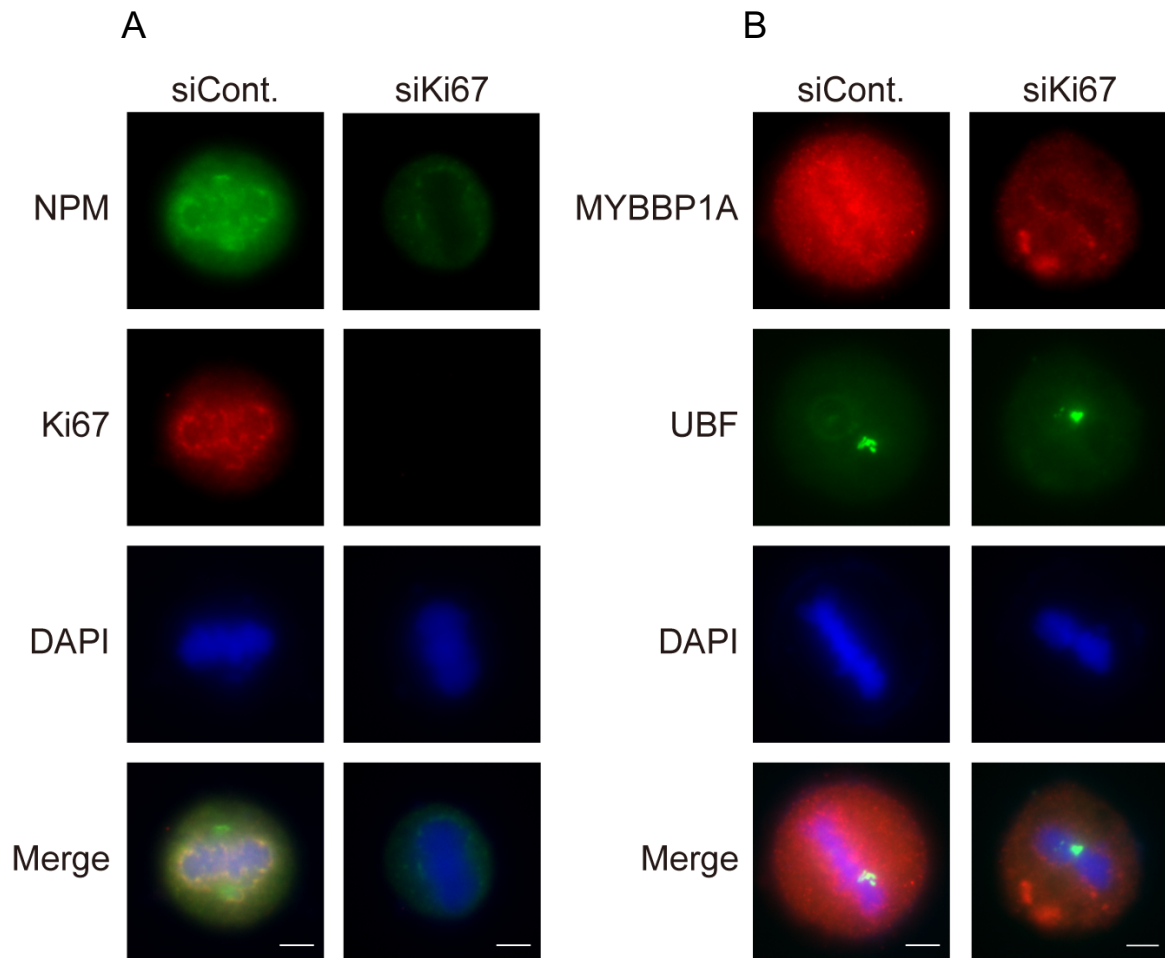


Figure 12 TIF-IA KD による NPM、MYBBP1A、Ki67 の PR 局在への影響

Ki67 に対する siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、(A) NPM、Ki67 に対する抗体、(B) MYBBP1A、UBF に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。スケールバーは 5 μm を示す。

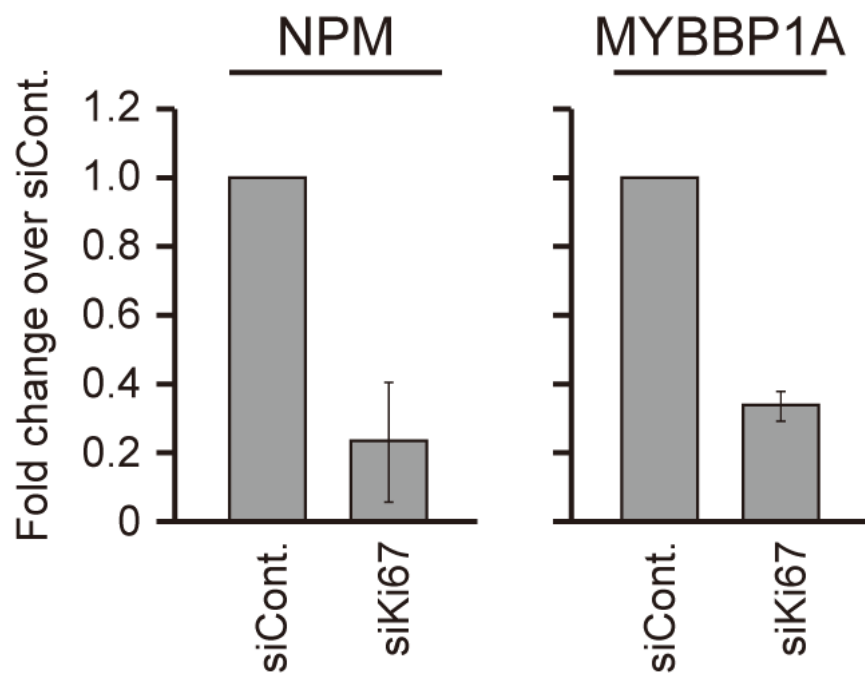


Figure 13 TIF-IA KDによるNPMおよびMYBBP1A、Ki67のPR上の蛍光シグナルについての定量

Figure 11に関して、PR上の蛍光シグナルについて定量を行なった。各条件において独立した3つの実験を行い、20細胞以上を定量した。数値はCont.に対する相対値であり、 $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ で示した。

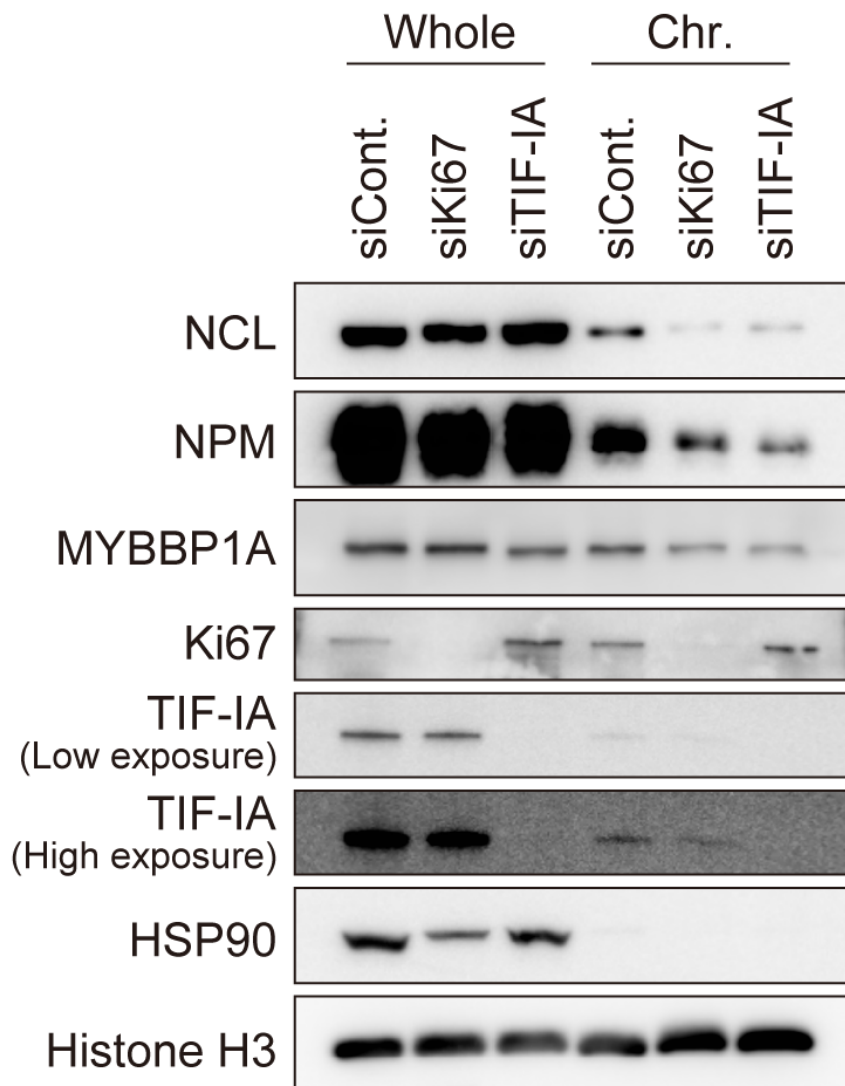


Figure 14 Ki67 および TIF-IA KD による染色体画分における核小体タンパク質と Ki67 への影響

細胞に TIF-IA および Ki67 に対する siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。続いて、75 nM のノコダゾールを 12 時間処理し細胞を M 期に同調した。その後、Mitotic shake off 法により M 期細胞のみを回収し、染色体画分のみを単離し、免疫ブロットティングにより解析した。

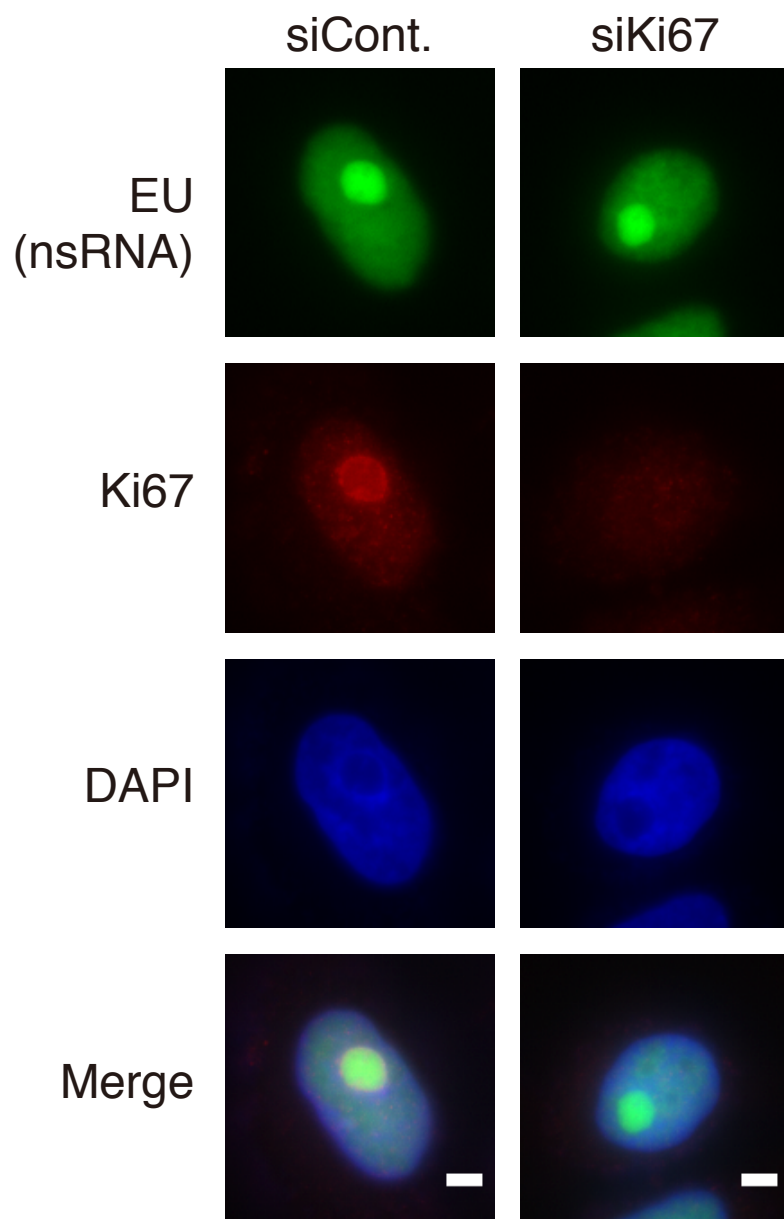


Figure 15 Ki67 KD による間期核小体における RNA 合成に対する影響

細胞に Ki67 に対する siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養した。続いて、細胞培養液中に 1 mM の EU を添加し、4 時間培養した。その後、Click-it 試薬により新規合成 RNA を可視化し、Ki67 抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。スケールバーは 5 μm を示す。

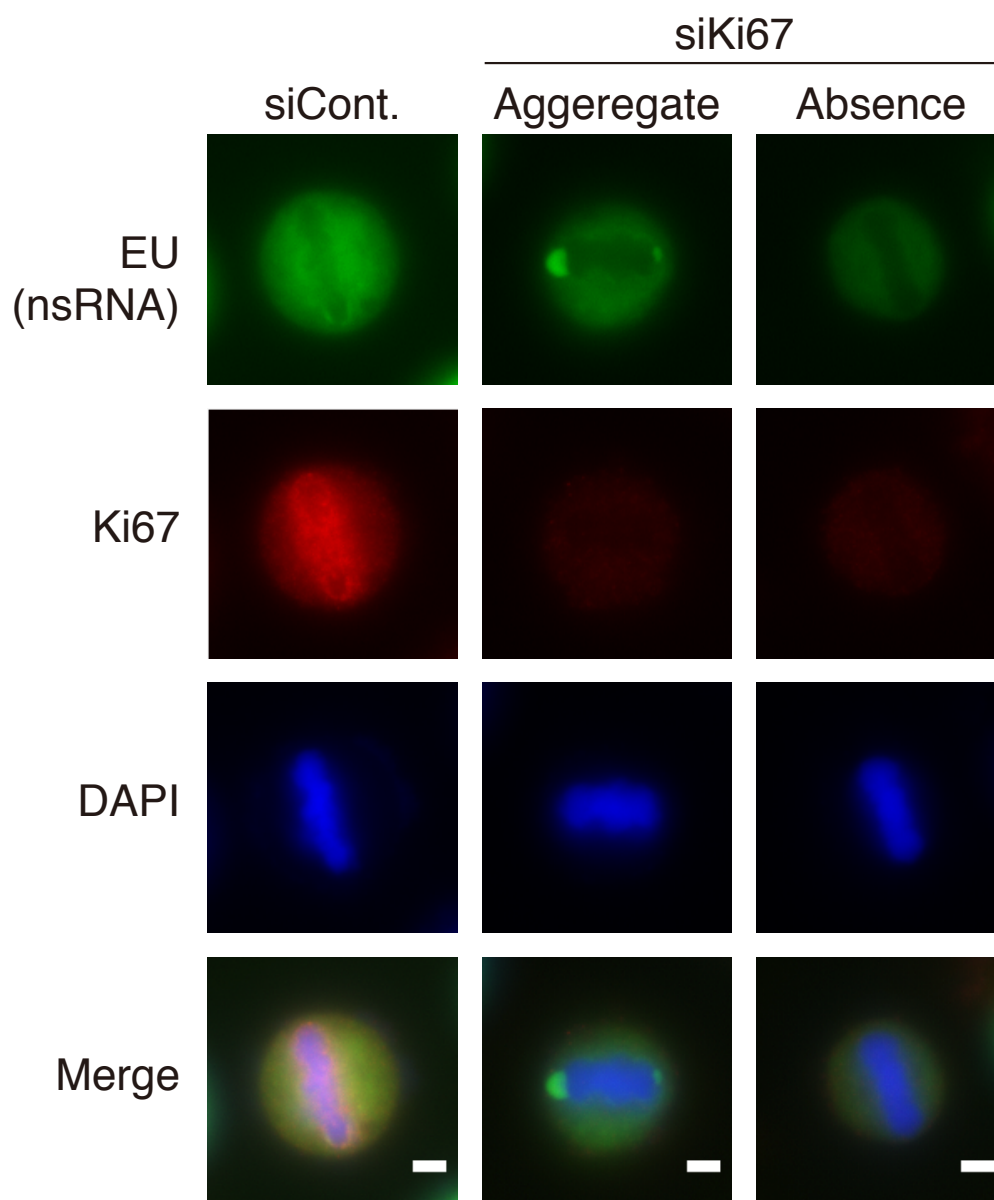


Figure 16 Ki67 KD による M 期における RNA 局在に対する影響

Figure 14 と同様に実験を行い、M 期細胞における新規合成 RNA の局在を調べた。スケールバーは 5 μm を示す。

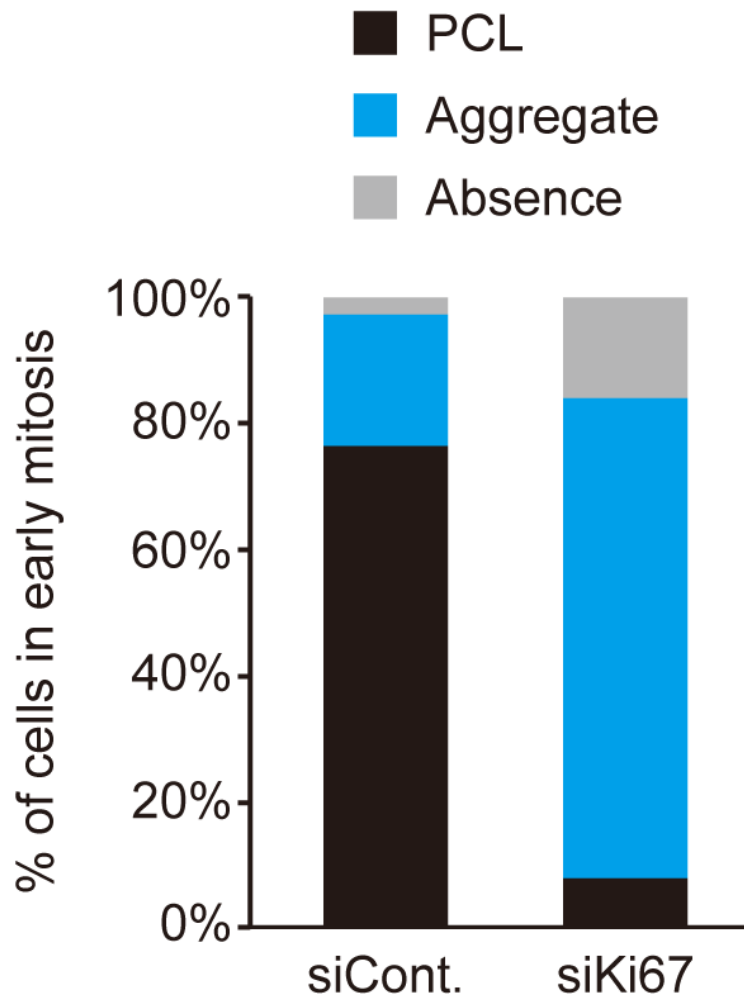


Figure 17 Ki67 KD による M 期における RNA 局在の分類

Figure 15 の RNA 局在について分類した。独立した 3 回の実験を行い、各条件において 100 細胞を定量した。

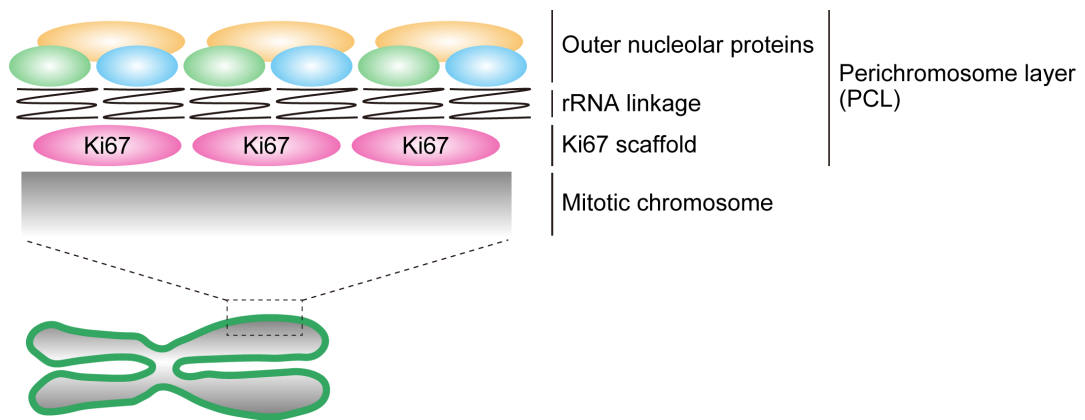


Figure 18 PR 構造のモデル

第四章

総括

本論文では、核小体がダイナミックに変化する M 期におけるその役割について解析を進めた。第一に、M 期進行と核小体タンパク質および核小体構造との関係に関する研究から、間期における核小体崩壊が Cdk1 の活性化を抑制し、M 期開始を遅延させることが明らかにした。第二に、M 期染色体表層の PR 構造において核小体に含まれるタンパク質や RNA がその構造を決定することを明らかにした。これら 2 つの研究から、我々は核小体ダイナミクスが M 期進行ならびに M 染色体構造と密接な関係があることを見出した。さらに、これらの研究を通して間期における核小体の崩壊と M 期における核小体の解体には大きな違いがあると考えられたので、以下で議論する。

間期において rRNA は絶えず転写されており、常に多数の核小体タンパク質と相互作用している。その結果、巨大な RNA-タンパク質複合体が生じ、核小体として観察することができる。M 期が開始時に Cdk1 活性依存的に rRNA の転写因子がリン酸化されることで rRNA 転写が抑制され、核小体が解体されることが考えられる(1)。その後、M 期から間期への移行時において、Cdk1 活性が低下に伴い、rRNA 転写が再び始まり、核小体が再形成される。Cdk1 の活性化は細胞周期の進行に伴う cyclin B1 の発現増加や G2 期での Cdk1 の脱リン酸化によって制御されていることから、Cdk1 活性は細胞周期でプログラムされたものであると考えられる(2)。Cdk1 活性が細胞周期プログラムにおいて厳密に制御されていることから、M 期における核小体の解体や再構築もプログラムされた現象であるといえる。

M 期における核小体の解体に対して、間期において細胞が DNA ダメージや低酸素刺激、栄養飢餓などの様々なストレスをうけると rRNA 転写が抑制される(3)。この際にも核小体構造は縮小したり、崩壊したりすることが知られている。このようなストレス刺激による間期核小体の崩壊は、p53 の活性化やオートファジー、細胞分化に関与すること

が明らかになりつつある。さらに本論文において、我々は間期における核小体崩壊が Wee1 の過剰な蓄積により、Cdk1 の活性化を抑制することを明らかにした。この知見は、間期における核小体崩壊は細胞周期プログラムによって制御されたものではなく、細胞周期プログラムに干渉する急性の応答反応であると考えられる。

興味深いことに、核小体から核質への rRNA 輸送に関与する RPL11 を KD することで、rRNA 転写が停止するのにも関わらず、間期における核小体崩壊が抑制されることがこれまでの報告ならびに本論文においても示された。しかしながら、RPL11 を KD しても細胞が M 期に入ると核小体構造は観察できなかった。また、我々の予備的な実験から M 期開始時における核小体の解体は rRNA の核小体外輸送を阻害しても生じることが我々の予備的な実験から示唆されている。つまり、間期および M 期における核小体の構造変化は核小体の局在変化という点については類似しているが、全くことなるメカニズムで核小体の構造変化を引き起こすと考えられる。時間的なスケールにおいても、rRNA 転写を阻害する Actinomycin D を処理すると、間期においては 2~3 時間後に核小体が崩壊する。一方、M 期開始時の核小体の解体は prophase から prometaphase にかけて生じ、M 期全体が約 1 時間で終了することから、その時間は長くても数十分であると考えられる。さらに、M 期中では核小体タンパク質が PR に蓄積することを考えると、M 期における核小体の解体は間期における核小体崩壊に比べてより能動的な変化であることが予測される。

このような一連の結果ならびに考察から、核小体の統合性と細胞周期プログラムは密接に関係していると考えられる。また、M 期における核小体の解体は PR 構築に重要な役割をもつと考えられ、M 期前後における核小体の構造変化は、非常に秩序立ったダイナミックな現象であると考えらる。

参考文献

1. J. Heix *et al.*, Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J.* **17**, 7373–7381 (1998).
2. N. Hégarat, S. Rata, H. Hochegger, Bistability of mitotic entry and exit switches during open mitosis in mammalian cells. *BioEssays.* **38**, 627–643 (2016).
3. A. James, Y. Wang, H. Raje, R. Rosby, P. DiMario, Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus.* **5**, 402–426 (2014).

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教官として常に有益なご助言をいただきました筑波大学生命環境科学研究科生物機能科学専攻准教授 木村圭志先生に厚くお礼も申し上げます。

また、細胞同調実験、ディスカッションにご協力いただきました公益財団法人がん研究会がん研究所実験病理部 広田亨先生に深く感謝申し上げます。

最後に、研究のみならず様々なことでお世話になりました木村研究室の皆様にご感謝申し上げます。