

【論文の要約】

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

【論文の要約】

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

第一章 序論

核小体は真核生物の核内における生体膜を持たない最大の構造体である。核小体はリボソーム RNA (rRNA) や rRNA プロセッシング、リボソームの組み立てを行うリボソームの合成工場として機能している。さらに近年、我々の研究室ならびに他のグループから核小体は細胞内外のストレスに応答して、その構造を変化させることで p53 の活性化やオートファジー、細胞分化を誘導することが明らかになりつつある。また、核小体は分裂期 (M 期) においてもその構造をダイナミックに変化させる。M 期前期 (prophase) において核小体は解体され、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) および終期 (telophase) になると核小体が再構成される。このよう M 期におけるダイナミックな核小体構造の変化はよく知られているが、時空間的な構造変化やそれに伴って構築される構造についての理解はほとんど進んでいない。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 つの研究を行った。

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

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 転写量が低下し、さらに核小体タンパク質である nucleolin が核小体から核質全体に拡散した。つまり、NOL11 を KD すると間期に核小体崩壊を誘導することを明らかにした。また、NOL11 を KD すると M 期細胞の増加し、細胞周期を同調した際には M 期の開始が顕著に遅延することが明らかとなった。M 期開始はマスターキナーゼである cyclin 依存性キナーゼの Cdk1 活性が必要である。そこで、我々は Cdk1 の活性化に必要である cyclin B1 の発現量および Cdk1 の抑制的リン酸化、そして Cdk1 基質のリン酸化について調べた。その結果、NOL11 の KD は cyclin B1 の発現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、Cdk1 基質のリン酸化が M 期開始の遅延と同様に遅延することを突き止めた。つまり、NOL11 を KD すると Cdk1 の活性化が抑制され、M 期開始が遅延したと考えられる。

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多様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 M 期の異常に関与しているのではないかと考えた。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。その結果、NOL11 の KD と同様にこれらの因子の KD 時にも M 期開始が顕著に遅延することを明らかにした。また、間期における核小体崩壊時には Cdk1 の抑制的リン酸化を増加させていたことから、NOL11 の KD で見られる M 期開始の遅延は、核小体崩壊そのものが原因であることが示された。Cdk1 の抑制的リン酸化は Wee1 キナーゼによってリン酸化されや Cdc25 ホスファターゼによって脱リン

酸化されることから、これらの発現量を調べたところ、核小体崩壊時には Wee1 が異常に蓄積することを突き止めた。

以上の結果をまとめると間期における核小体崩壊は Wee1 の異常な蓄積を引き起こし、Cdk1 の活性化を抑制することで M 期開始を遅延させることが明らかとなった。

第三章 核小体に由来する PR 構造の解析

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、我々は核小体タンパク質の PR 局在に RNA がどうか調べるために、M 期染色体に RNase A を処理し、M 期特異的に RNA を除去した。その結果、核小体タンパク質である NPM や MYBBP1A が PR から解離し、細胞全体に拡散することを明らかにした。続いて、rRNA 転写の阻害剤を用いてそれぞれの RNA polymerase を阻害時における RNA の PR 局在を調べたところ、RNA polymerase I (Pol I) を阻害した時においてのみ、RNA の PR 局在が低下した。つまり、Pol I 由来の rRNA が PR に局在することが示された。さらに、核小体タンパク質の PR 局在も Pol I 阻害時においてのみ低下することが明らかとなった。また、Pol I の転写因子である TIF-IA を KD した際にも同様の結果が得られた。したがって、rRNA は間期において核小体の足場として機能するだけでなく、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明らかとなった。興味深いことに、RNase A 処理や Pol I 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。そこで我々は Ki67 を KD した際における核小体タンパク質や RNA の PR 局在を調べた。Ki67 を KD すると、これまでの報告と同様に NPM や MYBBP1A の核小体タンパク質の局在が低下していた。さらに M 期における RNA の局在を調べた結果、Ki67 の

KDによりRNAはPR上に局在することができなくなり、RNAの凝集体を形成することを見出した。この結果はKi67がM期において、PR上にrRNAを正しく展開するのに必要であることを示唆している。

以上の結果をまとめると、M期染色体表層のPRではrRNAが核小体タンパク質の局在を制御していることを示した。さらに、rRNA自身もKi67によってPR局在が制御されていることを明らかにした。我々はこれらの結果から、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。

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 2 つの研究を行なった。我々は 2 つの研究を通して、①間期における核小体崩壊が Cdk1 活性化を抑制し、M 期開始を遅延させること。②PR 構造において Ki67 が構造基盤となり、rRNA および核小体タンパク質の局在を制御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 M 期における核小体の解体は、細胞周期にてプログラムされたものであり、間期における核小体崩壊が急性の応答反応であることが示唆された。つまり、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り、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。