

2020年6月24日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
公益財団法人がん研究会

分裂期染色体の均等な分配を保證する核小体タンパク質複合体を発見 ～細胞分裂における核小体の働きの解明～

研究成果のポイント

1. 新規核小体タンパク質複合体 NWC が、分裂期染色体の均等な分配を保證することを明らかにしました。
2. 細胞分裂における核小体の働きを分子レベルで解明しました。
3. 分裂期での染色体の分配機構の破綻は、がんの悪性化で観察される染色体不安定性を増大させることから、核小体を介したがんの進展メカニズムの理解にもつながります。

国立大学法人筑波大学 生命環境系 木村圭志准教授、藤村亜紀子特別研究員(研究当時、現:東京大学薬学部 博士研究員)、林優樹特別研究員(研究当時、現:欧州分子生物学研究所 博士研究員)、生命環境科学研究科 博士課程2年 加藤かざしらの研究グループは、公益財団法人がん研究会がん研究所 実験病理部 広田亨部長との共同研究により、新規な核小体タンパク質複合体を同定し、その複合体が細胞分裂期(M期)^{註1}における均等な染色体の分配を担保することをつきとめました。

核小体は、真核生物の細胞核に存在する最も大きな核内ボディ^{註2}で、リボソームRNAの転写とリボソーム構築の場としての古典的な役割に加え、細胞周期の制御や種々のストレス応答などの多様な細胞機能に関与することも報告されています(参考文献1)。特に、M期では核小体が解体され、核小体タンパク質や核小体RNAの一部が、染色体の表面の領域(PR; perichromosomal region)^{註3}(図1)に濃縮されることから、核小体と細胞分裂の関連が注目されています。しかしながら、その実態の解明は進んでいません。

本研究グループはこれまでに、約600種類の核小体タンパク質のsiRNAを用いたスクリーニングを行い、M期に関与する因子としてNOL11 (nucleolar protein 11)を同定しました(参考文献2)。本研究では、NOL11が、他の2つの核小体タンパク質WDR43およびCirhinと、新規なタンパク質複合体NWC (NOL11-WDR43-Cirhin)複合体を形成することを発見しました。このNWC複合体は、分裂間期(間期)^{註4}には核小体に、M期には染色体のPRに局在します。また、siRNA^{註5}を用いたノックダウンの実験から、このNWC複合体が、姉妹染色体分体間の接着や、M期中期における染色体の細胞赤道面での整列に、重要な役割を担っていることを見出しました。さらに、この染色体動態の制御は、細胞分裂の多くのイベントを制御する鍵分子であるAurora Bキナーゼ^{註6}(参考文献3)の染色体上での適切な局在、すなわちM期染色体のセントロメア^{註7}領域への濃縮によることを明らかにしました。

姉妹染色体分体間の接着や染色体の細胞赤道面での整列は、細胞分裂における娘細胞への均等な分配に必須で、これらの過程に破綻が生じると、がんの悪性化で観察される「染色体不安定性^{註8}」の増大を引き起こします。本研究成果は、核小体と細胞分裂とのリンクの分子レベルでの理解につながるとともに、がんの進展のメカニズムに関する手掛かりになると期待されます。

本研究の成果は、2020年6月1日付*Nucleic Acids Research*誌で先行公開されました。

* 本研究は、科学研究費補助金基盤研究(B)(木村)、科学研究費補助金基盤研究(A)、科学研究費補助金新学術領域研究(A)(広田)、武田科学振興財団研究助成(木村)、ノバルティス研究奨学金(木村)などによって実施されました。

研究の背景

核小体は、真核生物の核内に存在する、膜を持たない構造体「核内ボディ」の一つで、さまざまなタンパク質とRNAから構成されています。核小体は、第一義的にはタンパク質合成工場であるリボソームの構築の場として知られてきましたが、それ以外にも、細胞周期制御をはじめとした種々の細胞機能に関与することが明らかになってきました。また近年、核小体が恒常性を持った構造体ではなく、「液-液相分離^{注9}」と呼ばれる過程で形成され、流動的な性状を持つことが分かってきています。特に細胞分裂の過程での核小体構造の変化は顕著であり、M期の前期から核小体の解体が始まり、M期後期から次のG1期にかけて徐々に再構築されていきます。さらに、核小体タンパク質やRNAの一部が、M期染色体の表面領域(PR)に濃縮されることが報告されています。

この核小体の挙動から、本研究グループは、核小体タンパク質がM期を制御するとの仮説をたて、これまでに約600種類もの核小体タンパク質のsiRNAを用いたM期に関わる因子のスクリーニングを行い、そこで得られた約60種類の候補タンパク質から、NOL11(nucleolar protein 11)に焦点を絞り、解析を進めました。その結果、NOL11をノックダウン(KD)した際に、間期での核小体崩壊が引き起こされ、その結果M期の開始が遅延することを明らかにしています(参考文献2)。さらにその後の研究で、NOL11のKDが、間期での核小体崩壊とは非依存的に、M期の進行にも影響を与えることを見出しました。そこで本研究では、そのメカニズムを明らかにすることを目的としました。

研究内容と成果

本研究グループは、ヒト由来の最初の細胞株であるHeLa細胞からNOL11を精製し、質量分析によりNOL11に結合するタンパク質の同定を試みました。その結果、NOL11がWDR43とCirhinという二つの核小体タンパク質と複合体を形成していることを発見し、この新規な核小体タンパク質複合体をNWC (NOL11-WDR43-Cirhin)複合体と名付けました。NWC複合体は、分裂間期には核小体に局在し、M期には染色体のPRIに局在を移動しました。

次に、siRNAを用いたKD実験により、NWC複合体のM期の進行における役割を調べました。親細胞から娘細胞へ染色体を正確に分配するためには、1)複製された染色体のコヒーシ^{注10}というタンパク質での糊付け(姉妹染色分体間の接着)と、コンデンシ^{注11}などによるコンパクトなM期染色体への変換(M期染色体凝縮)、2)細胞の両極から伸びた紡錘体^{注12}による染色体動原体の補足による、染色体の細胞赤道面上での整列、3)コヒーシの分解による染色体の均等な分配、というプロセスが必須です(図2)。そこで、NWC複合体をKDしたところ、1)の姉妹染色分体間の接着、及び2)の細胞赤道面上の染色体整列が著しく損なわれることを見出しました(図3)。その結果として、紡錘体集合チェックポイントが活性化され、M期進行に影響を及ぼしたと考えられます。

では、染色体の構造や動態の異常はどのようなメカニズムで引き起こされるのでしょうか。本研究グループは、細胞分裂過程の多くのイベントに実用不可欠な役割を果たしている鍵キナーゼであるAurora B(参考文献3)に着目しました。興味深いことに、NWC複合体のKDは、Aurora Bの染色体全体への結合量や活性にはほとんど影響を与えませんが、M期中期でのセントロメア領域への局在を著しく阻害しました(図4)。また、Aurora Bの結合の足場となっているヒストンH3-T3(3番目のスレオニン残基)のリン酸化も、Aurora Bと同様の挙動を示しました。これらの結果は、PRIに局在するNWC複合体が、ヒストンH3-T3リン酸化のセントロメアから染色体腕部への分離を抑制し、Aurora Bのセントロメア領域への濃縮に寄与することを強く示唆します(図5)。

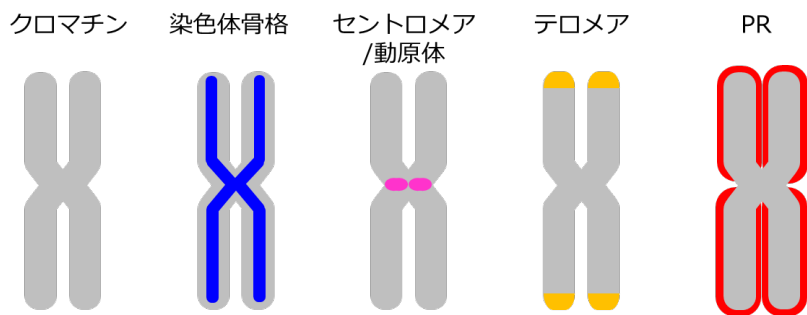
今後の展開

本研究では、新規な核小体タンパク質複合体 NWC 複合体を発見し、この複合体が Aurora B の M 期中期でのセントロメア濃縮を介して、M 期染色体のセントロメア機能(姉妹染色分体間の接着、細胞赤道面上の染色体整列)に重要な役割を果たしていることを見出しました。セントロメア機能の破綻は不均等な染色体分配に直結し、染色体不安定性の原因ともなります。染色体不安定性は、がん細胞の不均一性を促進し、ひいてはがんの悪性化にもつながります。従って本研究結果は、がんの悪性度を示す指標としても使われてきた核小体の構成因子が、がんの進

展の制御にも関与する可能性を示しています。しかしながら、PR に存在する NWC 複合体が、いかにヒストン H3-T3 リン酸化のセントロメアからの拡散を抑制するかに関しては、未だ仮説の段階にとどまっており、その解明が今後の課題です。

また、NOL11, WDR43, Cirhin が、さらにタンパク質 UTP10, hUTP15, hUTP17 と複合体を形成し、リボソームの小サブユニットのプロセッシングに寄与することが報告されています(参考文献 4)、今回発見した NWC 複合体は、細胞周期を通じて、他の3つのタンパク質を含んではいません。一方で、WDR43 が単独でいくつかの遺伝子から転写される RNA に結合し、細胞の多分化能に関わっていることが最近報告されています(参考文献 5)。従って、核小体タンパク質が、パートナーを入れ替えることにより別々の複合体を形成し、それらが多様な細胞機能を制御するというモデルが考えられます。今後は、それら複合体同士の関係や制御メカニズムの解明も進めていきます。

参考図



Booth DG. and Earnshaw WC. *Trends Cell Biol.* (2017) 27: 906-916. Figure 1を改変

図1. M 期染色体の5つの構造要素

M 期染色体は、クロマチン領域(灰色)、染色体骨格(青)、セントロメア/動原体(ピンク)、テロメア(オレンジ)、に加えて、PR (perichromosomal region、赤)から成る。PR は、核小体由来のタンパク質と RNA のネットワークにより構成される。

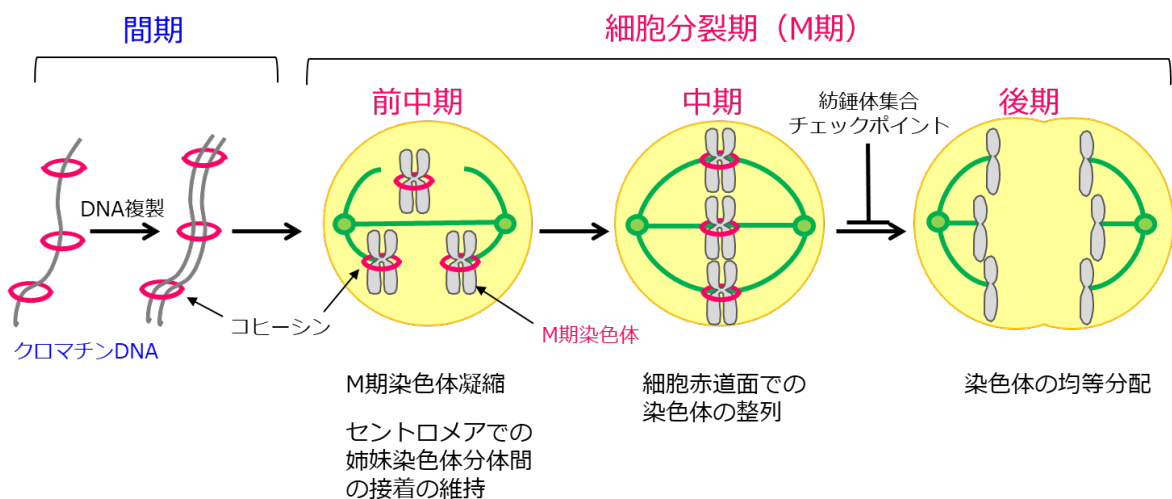


図2. M 期での染色体の挙動

複製された間期クロマチンは、バラバラにならないようにコヒーシンにより糊付けされる。M 期になると、クロマチンはコンデンシン等のタンパク質によりコンパクトな構造体(M 期染色体)に変換される。この際に、大部分のコヒーシンは染色体から解離するが、セントロメア領域のコヒーシンのみがタンパク質シュゴシンの働きにより離脱を免れ、姉妹染色体分体同士の対合が保たれる(前中期)。染色体の動原体が、両極の中心体から伸びた紡錘体により捉えられ、

両極からの張力が釣り合い、細胞の赤道面上に並ぶ。全ての染色体が細胞赤道面上に並ぶと(中期)、コヒーシ
ンが分解され、全ての染色体が一對ずつ細胞の両極に移動する(後期)。

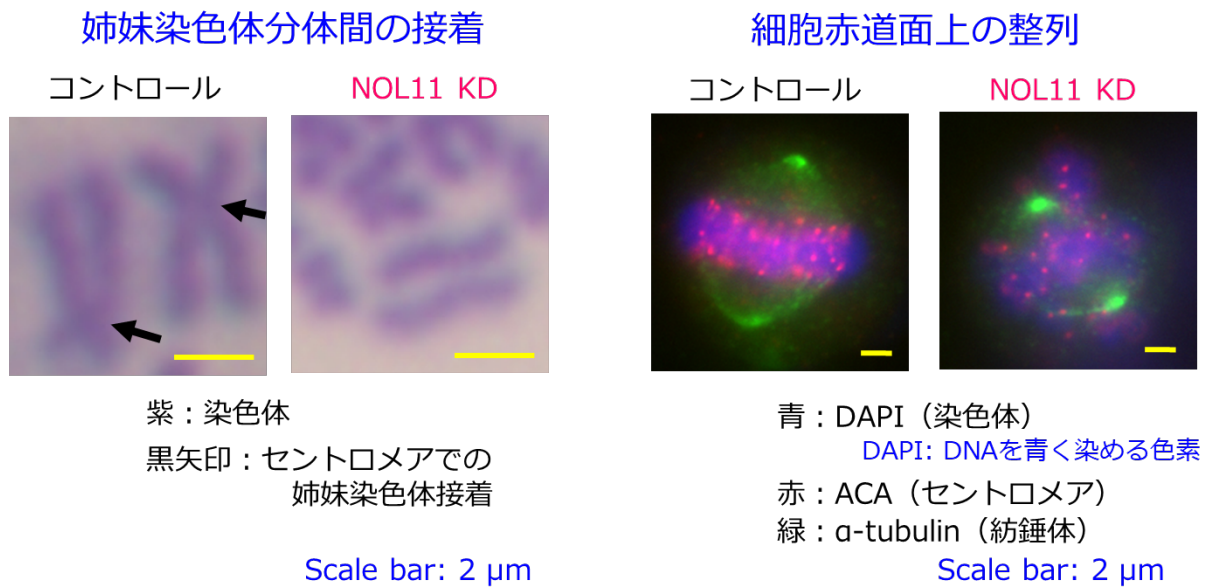


図3. NWC 複合体によるセントロメア機能の維持

siRNA を用いて、HeLa 細胞から NOL11 を除去すると、姉妹染色体分体間の接着(左)、および M 期中期における染色体の細胞赤道面の整列(右)が著しく損なわれた。他の NWC 複合体のサブユニット、WDR43 と Cirhin を除去した際にも同様の表現型が観察された。この結果から、NWC 複合体はセントロメア機能の維持に重要な役割を担っていると考えられる。

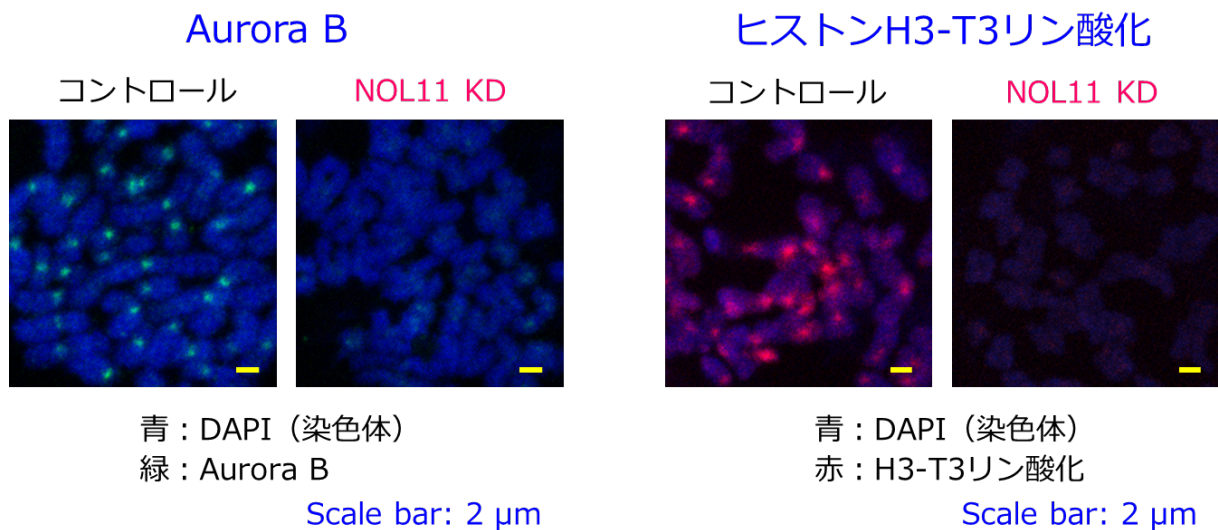


図4. NWC 複合体による Aurora B の局在制御

siRNA を用いて、HeLa 細胞から NOL11 を除去すると、セントロメア領域の Aurora B(左)、ヒストン H3-T3 のリン酸化(右)のセントロメア領域のシグナルが減弱した。WDR43, Cirhin を除去した際にも同様の表現型が観察された。この結果から、NWC 複合体が、ヒストン H3-T3 リン酸化のセントロメア局在を介して、Aurora B のセントロメアへの濃縮に寄与すると考えられる。

NWC複合体によるAurora Bのセントロメア濃縮のモデル

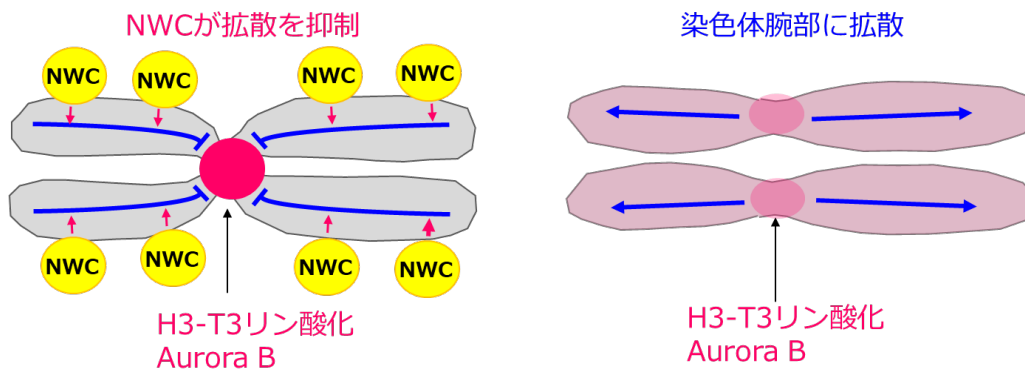


図5. NWC 複合体による Aurora B のセントロメア濃縮のモデル

染色体腕部の表面(PR)に局在するNWC複合体は、何らかのメカニズムでH3-T3リン酸化のセントロメアから染色体腕部への拡散を抑制する(左図)。その結果、セントロメア領域のヒストンH3-T3リン酸化が維持され、Aurora Bがセントロメアに濃縮される。NWC複合体を除去した場合は、セントロメア領域から腕部にヒストンH3-T3リン酸化が拡散する(右図)。その結果、ヒストンH3-T3リン酸化レベルが低下し、Aurora Bのセントロメア局在も失われる。NWC複合体はこのメカニズムを介して、M期染色体のセントロメア機能(姉妹染色体分体間の接着、及びM期中期における染色体の細胞赤道面の整列)の維持に寄与し、M期での正確な染色体分配を保證すると考えられる。

用語解説

注1) 細胞分裂期(M期)

細胞が染色体DNAなどの構成成分を2倍にして、2つの細胞に分配する過程を細胞周期と呼ぶ。細胞分裂期は、細胞周期のうちで細胞が分裂する約1時間の短い時期をさす。

注2) 核内ボディ

特異的なRNAとタンパク質を高濃度に含んだ真核細胞の核内に存在する膜を持たない構造体。液-液相分離のメカニズムで形成される。現在までに10種類以上発見しており、遺伝子機能の効率的な発現に関わると考えられる。

注3) PR (perichromosomal region)

セントロメア領域(注7参照)以外のM期染色体の表面の領域を指す。核小体由来のタンパク質とRNAにより構成されている。

注4) 分裂間期(間期)

M期とM期の間を分裂間期と呼ぶ。大部分の細胞は分裂間期である。

注5) siRNA

1-23の塩基対から成る短い二本鎖RNA。二本鎖RNAを細胞内に導入すると、これと相補的な塩基配列を持つmRNA(メッセンジャーRNA)が特異的に分解される(RNA干渉)。この現象を利用して任意の遺伝子の発現が抑制できる。

注6) Aurora B キナーゼ

動原体/微管の不適切な結合の修正による染色体の整列、紡錘体集合チェックポイントの活性化、姉妹染色体分体間の接着の制御、ミッドボディ(娘細胞間のくびれた部分)の形成などM期の多くのイベントに関与するセリン/スレオニンキナーゼ。INCENP, Survivin, Borealin/Dasraと4量体を形成する。この複合体はM期において、染色体全体(前期)、セントロメア領域(中期)、セントラルスピンドル(後期)、ミッドボディ(終期)と局在を移行させるので、CPC (chromosomal passenger complex)と呼ばれる。

注7)セントロメア

動原体が形成される染色体領域を指す。種によって特異的な配列を持ち、ヒトでは α サテライト配列と呼ばれる170 bp程度のDNA配列がMbpの領域にわたって存在する。セントロメアには、ヒストンH3がCENP-Aと呼ばれるH3バリエーションを含むヌクレオソームが存在する。

注8)染色体不安定性

がんなどの疾患において、細胞分裂のたびに染色体の数の異常、欠失、転座などが起こる状態を指す。進行がんで顕著に観察され、がん細胞の不均一性と関係があると考えられる。

注9)液-液相分離(LLPS; liquid-liquid phase separation)

溶液が均質に交じり合わず、2相に分離する現象をさす。核小体など細胞内の膜を持たない構造体は、液-液相分離により形成される。タンパク質の天然変性領域と核酸により液-液相分離が促進される。

注10)コヒーシン

複製した姉妹染色体分体同士の接着を担うタンパク質複合体。2つのSMC (structural maintenance chromosomes) ATPaseファミリーに属する、SMC1とSMC3のコアサブユニットと他の2つのnon-SMCサブユニットからなる4量体で、リング状の全体構造をとっている。M期では、大部分が染色体から解離するが、M期中期まではセントロメア領域のコヒーシンはシュゴシンの働きによって保持されており、セントロメアにおける接着が保存される。後期に入るとコヒーシンはセパレーズにより分断され、染色体はいっせいに分配される。

注11)コンデンシン

M期染色体凝縮に中心的な役割を担うタンパク質複合体。SMC2とSMC4のSMC ATPaseヘテロ2量体からなるコアサブユニットと、他の3つのnon-SMCサブユニットからなる5量体である。V字型の全体構造を持っている。大部分の生物にはコンデンシンIとIIが存在し、それらはnon-SMCサブユニットのみが異なっている。2つのタイプのコンデンシンは、独自の機能を持ちながらも協調してM期染色体の凝縮に働いている。

注12)紡錘体

タンパク質 α -チューブリンと β -チューブリンの2量体が重合して形成された微小管(microtubule)の束が、多数集まって構成される細胞内の構造である。細胞分裂の際に形成され、染色体を娘細胞に分離する役割を持つ。

参考文献

- 1) The multifunctional nucleolus. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2007) 8:574–585. (Review)
- 2) Nucleolar integrity during interphase supports faithful Cdk1 activation and mitotic entry. Hayashi Y, Fujimura A, Kato K, Udagawa R, Hirota T, Kimura K. *Science Adv.* (2018) 4:eaap7777
- 3) The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2012) 13:789–803. (Review)
- 4) Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. Prieto JL, McStay B. *Genes Dev.* (2007) 21:2041–2054.
- 5) RNA targets ribogenesis factor WDR43 to chromatin for transcription and pluripotency control. Bi X, et al. *Mol Cell* (2019) 75: 102–116

掲載論文

【題名】 Identification of a novel nucleolar protein complex required for mitotic chromosome segregation through centromeric accumulation of Aurora B

(Aurora Bのセントロメアへの濃縮を介して分裂期染色体分配に寄与する新規核小体タンパク質複合体の同定)

【著者名】 藤村 亜紀子、林 優樹、加藤 かざし、小暮 祐一郎、亀山 睦朗、島本 陽花、大徳 浩照、深水 昭吉、広田 亨、木村 圭志

【掲載誌】 *Nucleic Acids Res.* 2020 Jun 1;gkaa449. (DOI: 10.1093/nar/gkaa449)

問合わせ先

木村 圭志 (きむら けいじ)

筑波大学 生命環境系 准教授

広田 亨(ひろた とおる)

公益財団法人がん研究会 がん研究所 実験病理部 部長