

ヒト培養細胞遺伝子ノックアウト系による
細胞核高次構造の機能解析と分子進化論的考察

研究代表者： 柴原慶一

1. 共同研究者

[統計数理研究所 モデリング研究系] 足立淳

[総合研究大学院大学 先導科学研究科] 田辺秀之

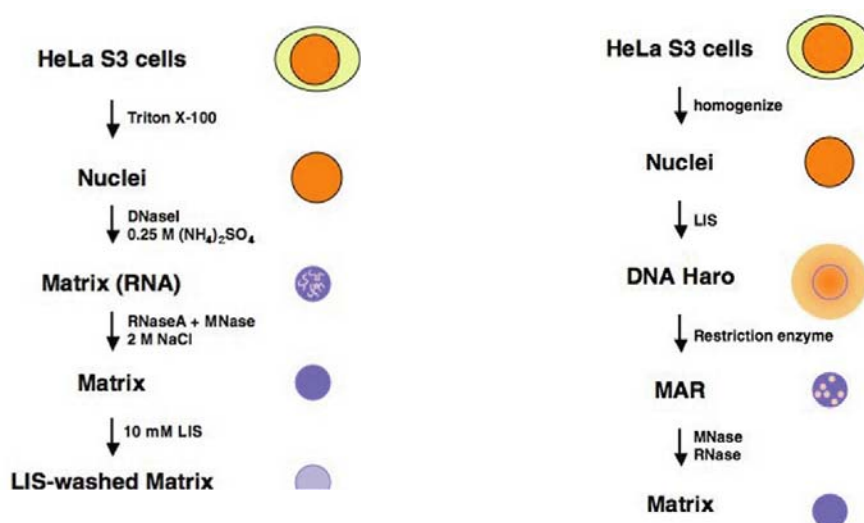
2. 研究目標

染色体テリトリー概念（種々の染色体由来のDNAが互いに入り混じった状態ではなく、個々の染色体ごとに高度に区画化されたテリトリー構造をもつ）が提案されるなど、間期の核は高度に組織化された構造体であるという認識が広がりつつある。また間期核には、染色体以外にも、核内マトリクス（存在が推定される核内足場構造体）、染色体間領域、核膜、および数々の核内小器官や転写ファクトリーといった多様な構造体が存在している。しかし間期核において、染色体や上記核内構造体がどのように、どういったメカニズムにより配置、組織化されるのかは未解明のままである。また、間期核の染色体領域が一定の配置を維持しているならば、それはゲノム内の遺伝子配置などのゲノム構造に何らかの影響を及ぼしてきたことも考えられる。それならば、間期核の組織化とゲノム構造の進化は、互いにどのような影響を与えてきたのであろうか興味深い。私たちは本プロジェクトを通じて、上記の疑問に対して一定の理解をもたらしたいと考えている。

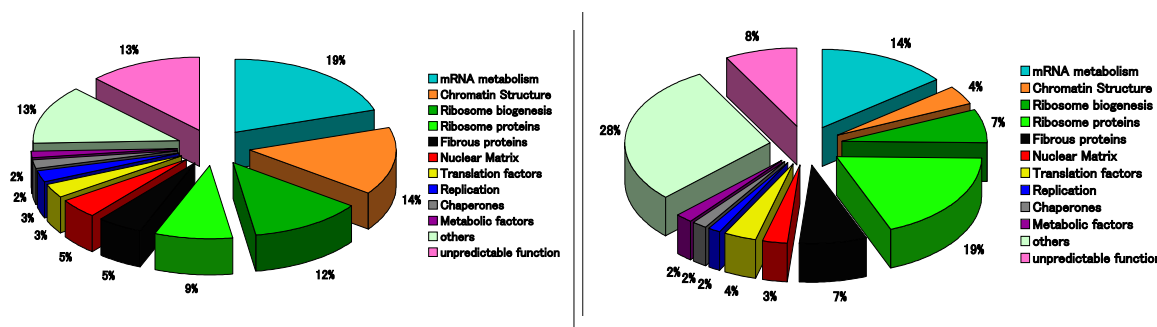
3. 平成19年度までの研究進捗及び主要成果物

〔研究進捗〕

間期核から DNA と可溶性タンパク質を除去した後の難溶性残存物を電頭解析すると、フィラメント状の構造体が観察されることから、この難溶性画分は古くより“核マトリクス”と命名されている。フィラメント形成の有無はさておき、間期核の組織化に関与する因子群の一部が、この難溶性画分に存在するであろうという推定の元に、ヒト培養細胞の難溶性画分のプロテオミクス解析を行なった。二種類の異なる方法（下図）で調整した難溶性画分より、それぞれ201個（左側）と423個（右側）の因子群を同定した。



現在、同定した難溶性タンパク質群のプロファイリングを行なっていて、下図は解析の一例であり、計画通りに研究は進展している。



〔主要成果物〕

PCT 出願 JP2007/070665: 柴原慶一、小野達也、西嶋仁「テトラサイクリン誘導型遺伝子発現細胞株および条件的遺伝子ノックアウト細胞株の製造方法ならびにその用途」2007年10月23日

(同定した因子群の変異細胞株の作製に必要な実験の確立に関する特許出願であり、研究の進展には欠かせない成果であると考えている)

4. 平成20年度以降の展開

柴原は足立と田辺の協力を得て、間期核の組織化に関与する可能性のある因子群の選定と解析を次のような流れで進めていく予定である。

(1) データベースツールによる因子群のプロファイリング作業 (柴原、足立)

(2) (1) で絞り込んだ因子群を発現抑制させた際に (RNA 干渉法) 細胞核で起こる異常の観察 (柴原、田辺) : 核の変形、核内構造体や核内ファクトリーの形成異常、染色体テリトリーの破壊などに注目する

(3) (1) で絞り込んだ因子群を GFP-融合タンパク質の形で発現させた場合の核内動態観察 (柴原、田辺)

(4) (2)、(3) で絞り込んだ因子群の変異ヒト Na1m-6 細胞株の作製と解析

一方で足立は、柴原と田辺の知見を元に、ヒト近縁種などの核内の染色体や構造体などの配置を明らかにしていく。また、ゲノム内の遺伝子配置が染色体の核内配置とどのような相関関係があるかを調べるためのシステムをコンピュータ上で構築する。ゲノム構造と核内の染色体配置や構造体配置の相関性を分子進化の視点で考察する研究は他に類がなく、将来に繋がるあらたな知見を蓄積していく。

5. 研究経費

平成19年度見込 : 7,700 千円

6. 平成19年度の研究成果

(1) 知見・成果物・知的財産権等

1. PCT 出願 JP2007/070665: 柴原慶一、小野達也、西嶋仁「テトラサイクリン誘導型遺伝子発現細胞株および条件的遺伝子ノックアウト細胞株の製造方法ならびにその用途」
2007年10月23日
2. 特願 2007-119791: 柴原慶一、西嶋仁、国田嘉元「標的組換え細胞とランダム組換え細胞とを判別する方法及びその用途」、平成19年4月27日

(2) 成果発表等

<論文発表>

【学術論文】

1. Chromatin assembly factor-1 is required for rapid nucleosome formation during DNA replication and efficient Chk1 activation in vertebrate chicken DT40 cells. Takami, Y., Ono, T., Fukagawa, T., K-i. Shibahara and T. Nakayama. *Mol. Biol. Cell.*, 18 (1), 129-141. (2007).
2. NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs. Narita, T., Yung, T. M. C., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y., Handa, H. *Molecular Cell* 26: 349-365 (2007).

3. Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. Nishida, C., Ishijima, J., Kosaka, A., **Tanabe, H.**, Habermann, F. A., Griffin, D. K., Matsuda, Y. *Chromosome Research* 16: 171-181 (2008).

【解説・総説】

田辺秀之 (監). 実践編 1章 (2) 「FISH法」 In: 三輪佳宏 編: 実験がうまくいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方 pp55-65 羊土社 東京 (2007).

<会議発表等>

【招待講演】

1. **田辺秀之**: 染色体のミクロからマクロの構造とダイナミクス, 第58回染色体学会 第17回染色体コロキウム 2007年合同年会, ワークショップ2, 葉山, 神奈川, 2007年11月26-28日
2. **Hideyuki Tanabe**: Radial positioning of chromosome territories: Development of peripheral and interior pooled DNA probes for detecting the disordered nuclear architecture and environment. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations, Awaji Island, Hyogo, Japan, October 5, 2007. Invited speaker
3. **柴原慶一**, ヒト遺伝子改変細胞株樹立システムとその創薬開発への活用、2007年7月7日、医学生物学研究所
1. **Jun Adachi**, New software for phylogenetic analyses using maximum likelihood., Evolution 2007 Conference (Christchurch, New Zealand), 17 June 2007 MolPhy:.
2. **柴原慶一**, ヒト NaIm-6 細胞を用いた誘導型遺伝子発現ノックアウト細胞株樹立法の開発および展望、2007年4月26日、静岡県がんセンター研究所

【一般講演】

1. 小野達也、**柴原慶一**、ヒト細胞における条件的ノックアウト細胞株の樹立とヒト細胞における条件的ノックアウト細胞株の樹立とこれを用いたヒト DDM1 の解析、2007年10月25日、クロマチン研究会、国立遺伝学研究所
2. **田辺秀之**: 核内染色体テリトリーの3次元配置を指標にした新しい染色体構築学, 日本人類遺伝学会第52回大会, 東京 (京王プラザホテル), 2007年9月13-15日
3. **Hideyuki Tanabe**, et al., Simultaneous visualization of chromosome territories, genes, and proteins in the same nucleus. EMBO meeting "Nuclear Structure & Dynamics", Montpellier, France, September 1-5, 2007.
4. **Hideyuki Tanabe**, et al., Evolutionary dynamics of nuclear 3D-positioning of human 2p and 2q homologous chromosome territories in primate lymphocytes. The 16th International Chromosome Conference, Amsterdam, Netherland, August 25-29, 2007.