

プロジェクト名： 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

1. プロジェクト体制

研究代表者

〔国立遺伝学研究所〕 柴原慶一

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

高等生物の間期核は、高度に組織化・区画化されたダイナミックな構造体である。この間期核の構造特性を説明するモデルとして、核内に整然とした骨格基盤構造が存在するとする説(deterministic model)と、骨格基盤構造の存在は必要なく、必要に応じ自己集合できる核内因子群の特質が重要であるとする説(self organization model)がある。我々は、仮に自己集合能が重要であるとしても、足場的役割を果たす因子の存在なしには、染色体テリトリーをはじめとする高度な間期核の組織化・区画化の仕組みは説明できないと推測し、その足場的因子群の実体を解明することを目標に研究プロジェクトを推進している。

3. 平成21年度の研究進捗

上記の研究目標を達成するために、核内難容性画分因子群の質量分析による網羅的な同定(約500個)を行ない、その同定因子群のデータベースによるプロファイリングを完了した(Mol Biol Cell 投稿中1)。残念ながら、deterministic modelを指示する根拠のひとつでもあった核内フィラメントの形成に寄与する新規因子は同定されなかったが、興味深いことに、核内構造体のひとつである核スペckルの形状維持に不可欠な役割を果たす因子(SON)が発見された(Mol Biol Cell 投稿中2)。この結果は、我々が解析を進めた核内難容性タンパク質群に、間期核の組織化・区画化に寄与する“足場的因子”の一部が含まれるであろうという推測が間違いでなかったことを示している。

4. 次年度以降の研究展開

プロテオミクスにより同定した核内難容性画分の主要因子群(約120個)を、RNA干渉法により発現抑制させる。その結果誘導される様々な核内構造の異常を観察し、間期核の組織化・核内ドメインの形成に関与する因子群を同定する。具体的には、染色体プローブを用いた3D-FISHを行なうことで間期核の染色体テリトリーを可視化し、染色体テリトリーへの影響を調べる。核スペckル、Cajal体、PML体、核小体といった核内ボディーの構成因子に特異的な抗体を用いた免疫染色によりこれらの構造体を可視化し影響を調べる。また、GFP-LBRやGFP-HP1などを細胞内で発現させることにより、RNA干渉による発現抑制が、核全体の形状変化や染色体の区画化の形成に及ぶ影響をリアルタイムで観察し、影響を調べる。

これらのスクリーニングを通じて間期核のコンパートメント形成に寄与することが明らかになった因子については、さらに詳細な解析を進める（抗体作製，FRAP解析による動態解析，KO細胞株作製など）。こういった地道な解析が、間期核の組織化のメカニズムを理解するための発端となることを期待する。

生物種、或いは、細胞の形質の違いにより間期核の組織化に微妙な違いがあることが、この領域の研究を複雑なものにしてきた。しかし足立、田辺、柴原はこの点に着目し、間期核の組織化とゲノム構造について研究を進める。足立は、分子進化学的な系統関係について、哺乳類、鳥類など脊椎動物を幅広く対象とした解析を行ない、田辺はその系統関係のデータに基づいて、特にニワトリのマクロ染色体とマイクロ染色体の高度に区画された放射状核内配置に着目し、ヒト細胞におけるゲノム構造の進化的な特性を探る。足立は、柴原らが同定する因子群の生物種間での保存性と間期核の組織化の相関にも注目する。

## 5. 研究経費

平成19年度実績： 7,810 千円

平成20年度実績： 9,900 千円

## 6. 平成20年度の研究成果

(1) 主要成果物（知見、成果物、知的財産権等）

(2) 成果発表

<論文発表>

[学術論文]

1. Sharma, A., Takata, H., **Shibahara, K-i.**, Bubulya, A., and Bubulya, P.A. Son is essential for nuclear speckle organization and cell cycle progression. Submitted to *Mol. Biol. Cell*
2. Takata, H., Nishijima, H., Ogura, S-i., Sakaguchi, T., Bubulya, P.A., Mochiduki, T., and **Shibahara, K-i.** Proteome Analysis of Human Nuclear Insoluble Fractions. Submitted to *Mol. Biol. Cell*,
3. Nishijima, H., Adachi, N., Takami, Y., Nakayama, T., and **Shibahara, K-i.** Improved applications of the tetracycline-regulated gene depletion. Submitted to *BioScience Trends*
4. Amano, T., Sagai, T., **Tanabe, H.**, Mizushina, Y., Nakazawa, H., Shiroishi, T. (2009): Chromosomal dynamics at the *Shh* locus: Lim bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev Cell* 16 : 47-57.
5. Ono, T., Nishijima, H., Adachi, N., Iizumi, S., Koyama, H., **Shibahara, K-i.** (2009) Generation of tetracycline-inducible conditional gene knockout cells in a human Nalm-6 cell line. *J. of Biotechnology*, in press.
6. Adachi, N., Nishijima, H., and **Shibahara, K-i.** (2008). Gene Targeting Using the Human Nalm-6 Pre-B Cell Line. *BioScience Trends*, 2, 169-180.

7. Oikawa, K., Yoshida, K., Takanashi, M., **Tanabe, H.**, Kiyuna, T., Ogura, M., Saito, A., Umezawa, A., Kuroda, M. (2008): Dioxin interferes in chromosomal positioning through the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 374 : 361-364.
8. Barman, HK, Takami, Y., Nishijima, H., **Shibahara, K-i.**, Sanematsu, F., Nakayama, T. (2008), Histone acetyltransferase-1 regulates integrity of cytosolic histone H3-H4 3 containing complex. *Biochem Biophys Res Commun* 73 (4), 624-30.
9. Nishida, C., Ishijima, J., Kosaka, A., **Tanabe, H.**, Habermann, FA., Darren K. Griffin, DK., Matsuda, Y. (2008): Characterization of chromosome structures of *Falconinae* (*Falconidae*, *Falconiformes*, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. *Chromo Res* 16 : 171-181.

[会議録]

1. 柴原慶一、ヒト疾患原因遺伝子のジーンターゲット細胞株の作製とその応用、2009年1月20日、都市エリア事業外部評価会議、静岡がんセンター、静岡
2. 柴原慶一、ヒト疾患原因遺伝子のジーンターゲット細胞株の作製とその応用、2009年12月26日、都市エリア事業内部評価会議、静岡がんセンター、静岡

[解説・総説]

1. **Tanabe, H.** (2008): Dynamics of chromosome territories: Chromosome kissing for gene regulation and genomic evolution. *Chromosome Science* 11 Supplement : 28-29.

[研究ノート]

[その他]

<会議発表等>

[招待講演]

1. **Keiichi Shibahara**, Generation and application of Tet-inducible gene knockout human Nalm-6 cells, 8<sup>th</sup> International Bio-Expo, Tokyo in Japan, July 2-4, 2008
2. **田辺秀之**: 染色体テリトリーの核内配置と遺伝子発現制御に関する最近の知見について、2008年7月16日、ウイルス研究所医科学セミナー、京都大学ウイルス研究所、京都
3. **Tanabe, H.**: Dynamics of chromosome territories: Chromosome kissing for gene regulation and genomic evolution, The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka, Japan. December 1-4, 2008.

[一般講演]

1. Chiba, M., **Tanabe, H.**: RNA molecules in mitotic cells visualized in as “MiCCS” (Mitotic Chromosome Coating Sphere). 第60回日本細胞生物学会大会、パシフィコ横浜、2008年6月

29日～7月1日

2. Hideaki Takata, Hitoshi Nishijima, Shun-ichiro Ogura, Tohru Mochizuki, **Kei-ichi Shibahara**, Proteome analysis of nuclear insoluble fraction, Cold Spring Harbor Meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA, September 14-17, 2008.
3. **田辺秀之**、千葉磨玲: ヒト神経膠芽腫細胞株における染色体テリトリーの3次元放射状核内配置解析、日本人類遺伝学会第53回大会、パシフィコ横浜、2008年9月28日～30日
4. 関澤浩一、高橋あゆみ、岸 邦和、**田辺秀之**: ヒト21トリソミー細胞株における21番染色体テリトリーの3次元相対核内配置解析、日本人類遺伝学会第53回大会、パシフィコ横浜、2008年9月28日～30日
5. Chiba, M., **Tanabe, H.**: Toward global mapping for the functional RNA molecules during the mitosis in mammalian cells. The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka, Japan. December 1-4, 2008.
6. Sekizawa, K., Takahashi, A., Kishi, K., **Tanabe, H.**: Analysis of three-dimensionally relative positioning of chromosome 21 territories by 3D-FISH techniques in cell nuclei of cell lines established from peripheral blood lymphocytes of Down's syndrome patients. The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Osaka, Japan. December 1-4, 2008.

<著書等>

(3) その他の成果発表