

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

共同提案者

〔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. これまでの研究成果及び今年度の提案内容

2-1. これまでの研究成果

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)が対峙している。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、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)を行なった。そして、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)。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残念ながら同定されなかった。しかし興味深いことに、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。

2-2. 今年度の提案内容

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-laminB1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コンパートメントの形成に及ぼす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。

3. 新領域融合プロジェクトへの発展の可能性

ゲノム構造が、染色体の核内配置や核内構造に与える影響を考察する試みはこれまでに例がなく、今後の分子進化学の領域に大きな潮流をもたらす可能性はある。

4. 期待される効果等

本申請課題は、「様々な核内コンパートメントがいったいどのように形成されるのか」、
「染色体は無秩序に入り混じった状態ではなく、高度に区画化された‘テリトリー’構造として規則的に配置されているが、この仕組みはどうなっているのか」といった素朴な疑問を解き明かそうとする試みである。対象が高度な構造体であるため従来の生化学的アプローチも困難であり、表現型の予想もつきにくく、間期核の構造も生物種間で微妙に異なるため遺伝学的アプローチも適応しにくい。それで考え悩んだ結果、最も原始的なアプローチを選択した。また、いくつかの推測のもとに開始した試験的プロジェクトであったが、ここに来て推測の正しさを示す成果があがりつつある。未開拓な領域であるだけに、一定の成果があれば領域の突破口になる可能性もある。

5. 予算金額及びその内訳

費 目	金額	主な用途
人件費	2,500 千円	研究補助員 1 名（細胞培養と分子生物学的実験の補助業務）
物件費		
消耗品費	4,500 千円	一般試薬、酵素など： 1,000 千円 細胞培養用試薬： 1,000 千円 抗体、色素： 1,000 千円 解析プログラム開発用機材： 1,000 千円 その他： 500 千円
旅 費	250 千円	柴原（三島）、足立（東京）、田辺（葉山）が相互に行き来するための国内交通費など
その他	500 千円	論文投稿費、英文校正費用、
		計 7750 千円

6. 本課題の他の経費への応募状況

該当なし。

7. その他