

[研究課題名] 核小体の構築メカニズムと再構築

[研究課題名 (英文)] Reconstitution of nucleolus based on the molecular mechanism of nucleolar assembly and disassembly

[研究担当者 (分担者も含む)] 永田恭介、奥脇暢

[研究室] 筑波大学・大学院人間総合科学研究科

1. 研究目的

複製、転写、修復、組換えなどのゲノム機能の発現と調節機構の解析は、はだかの DNA を用いた酵素機構の研究を土台に始まった。ところが、ゲノム機能を発現する場所は細胞核内であり、それぞれのゲノム領域は、その機能特性を維持し発現できる状態のクロマチン構造を形成している。従って、この研究領域はクロマチン状態での解析へと発展してきた。さらに、クロマチンは核内で均質な状態で存在するのではなく、束ねられて各種の機能構造（核内ドメイン）を形成して収納されている。この認識に基づき、機構解析を核内構造を意識したものへと進化させる必要がある。本研究では、光学顕微鏡を用いて観察することができる核内ドメインの一つであり、リボソーム合成の場である核小体を研究対象とする。核小体は、細胞が分裂する過程で崩壊し、分裂後再集合する。また、受精直後の初期発生過程において、核小体は存在せず、発生が進み遺伝子の転写が始まるにつれて形成されることが知られている。しかし、このような細胞の分裂や初期発生過程における核小体形成の分子メカニズムの詳細は全く不明である。本研究の最終目的は、核小体の崩壊と形成プロセスを明らかにし、得られた構築原理を基盤に核小体の構造と機能を試験管内で再構成することである。

2. 平成 18 年度の研究計画 (500 字程度)

培養細胞及びゼブラフィッシュ初期胚を用いて、核小体の形成機構を解明する。核小体は、リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子を含む染色体領域 (nucleolar organizer region, NOR) の周辺に rRNA の合成と成熟に関わる因子が集合することで形成される。分裂細胞においては、核小体の構造は細胞分裂とともに崩壊し、G1 期初期に再形成される。G1 期初期に rRNA の成熟に関わる因子群は NOR に集合する前に PNB (prenucleolar body) と呼ばれる構造体に集合する。本研究では、PNB を構成する因子が NOR と相互作用するメカニズムを明らかにする。特に、核小体が崩壊する G2 期から M 期、および再構築される M 期から G1 期にかけての相互作用に焦点をあてる。また、受精直後の初期胚にお

いては核小体の構造は形成されておらず、発生が進むにつれて核小体の構造が形成される。発生過程における核小体形成のメカニズムを、ゼブラフィッシュの初期胚をモデル材料として検討する。培養細胞と同様に PNB 構成因子と NOR との相互作用の機構に関して研究を進める。さらに、培養細胞や個体を用いた解析では、核小体形成の分子機構を解明するには不十分であるとの認識から、上述の研究から得られた成果をもとに、試験管内における核小体再構成を目指す。

3. 平成 18 年度の研究成果（1000-2000 字程度）

PNB 構成因子と NOR との相互作用を生化学的手法を用いて検討した。はじめに PNB 構成因子である fibrillarin、nucleolin、B23、および幾つかのリボソームタンパク質を、エピトープタグを付加した形で細胞に導入し、抗タグ抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、いずれのタンパク質も NOR の構成因子である UBF やヒストンと相互作用することが明らかになった。クロマチン免疫沈降法を用いて、PNB 構成因子が相互作用する NOR の領域を検討した結果、PNB 構成因子は rRNA 遺伝子のほぼ全体に分散して相互作用していた。PNB 構成因子と NOR との相互作用には rRNA 遺伝子の転写は必要ではないが、PNB 構成因子の RNA-タンパク質複合体形成が必須であった。核小体構造が崩壊する分裂期には、RNA-タンパク質複合体が崩壊し、NOR との相互作用も著しく低下することが観察された。したがって、核小体の構造を維持するためには、PNB 構成因子が RNA-タンパク質複合体を形成し、NOR と相互作用することが重要であると考えられる。NOR と相互作用する RNA-タンパク質複合体には 28S rRNA や 5.8S rRNA といった成熟した rRNA やリボソームタンパク質が含まれることから、非リボソームタンパク質を含むリボソーム前駆体が核小体形成に重要な役割を担っている可能性がある。

また、細胞分裂後、核小体が形成される過程を同様の方法で検討した。核小体の構造が崩壊する細胞分裂初期から約 1 時間の間に、染色体の分配と核膜形成、PNB 構成因子と NOR との相互作用の回復が見られた。免疫染色法を用いて解析すると、PNB 構成因子と NOR との相互作用が回復する時間においても、核小体に集合していない PNB が見られた。このことは、PNB 構成因子の核小体への集合過程が多段階であることを示唆している。分裂期に同調した細胞を、rRNA 合成阻害剤存在下で細胞周期を再開させると、PNB 構成因子と NOR との相互作用は rRNA 合成に依存せずに回復したが、PNB は細胞周期が進行しても完全に核小体に集合することはなかった。これらの結果より、細胞分裂後の

核小体形成過程は、①PNBにおいてPNB構成因子がRNP複合体を形成すること、②形成されたRNP複合体がrRNAの合成非依存的にNORと直接相互作用すること、③rRNAの合成再開に依存してNORに集合すること、といった少なくとも3段階に分けられる。今後はPNB構成因子が相互作用するRNAの実体、NORと相互作用するPNB構成因子の実体、NOR側でPNB構成因子をリクルートする因子の実体を明らかにしていく。

ゼブラフィッシュの初期胚を用いて、初期発生過程における核小体構造形成過程を解析している。PNB構成因子をGFPタグ付きで発現できるようなmRNAとしてマイクロインジェクションし、核小体形成のタイミングを解析している。受精直後の受精卵にmRNAをインジェクションすると、約2時間後にGFP融合タンパク質の発現が観察された。今後、GFP融合タンパク質を用いたタイムラプス解析と同時に、受精卵の免疫染色を行うことによって、核小体が形成されるタイミングを明らかにする予定である。また、上述の培養細胞を用いた解析と同様に生化学的な手法を取り入れて、初期発生過程の核小体形成機構の解明を目指す。

4. 目的と成果の要約（100-200字程度、年報原稿用）

本研究の目的は、核内ドメインの一つである核小体の崩壊と形成プロセスを明らかにすることである。核小体形成過程は、PNB構成因子がRNP複合体を形成し、形成されたRNP複合体がrRNAの合成非依存的にNORと直接相互作用し、ついでrRNAの合成に依存してNORに集合する、といった少なくとも3段階に分けることのできることを示した。

5. 研究成果の概要（英文）「4.の目的と成果の要約」の1/8程度の分量を目安に作成して下さい。大変短い文章となるかと思いますが、何卒御協力お願いいたします。

The aim of this study is to clarify the molecular mechanism of assembly and disassembly of the nucleolus. We have found that the formation of the nucleolus is a stepwise process including the association of PNB components with RNAs, the rRNA synthesis-independent interaction of PNB-RNA complexes with NOR, and the rRNA synthesis-dependent formation of PNB-RNA-NOR complexes.

6. 平成18年度誌上発表（英文のみ）

(1) 原著論文

Takizawa, N., Watanabe, K., Nouno, K., Kobayashi, N., AND Nagata, K. (2006) Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes and Infection* 8: 823-833.

Numajiri, A., Mibayashi, M., and Nagata, K. (2006) Stimulus- and domain-dependent cell death acceleration by an IFN-inducible protein, human MxA. *J. Interf. Cytok. Res.* 26: 214-219.

Haruki, H., Okuwaki, M., Miyagishi, M., Taira, K., and Nagata, K. (2006) Involvement of TAF-I/SET in transcription of adenovirus early genes as a positively acting factor. *J. Virol.* 80: 794-801.

Gyurcsik, B., Haruki, H., Takahashi, T., Mihara, H., and Nagata, K. (2006) Binding modes of the precursor of adenovirus major core protein VII to DNA and Template Activating Factor-I: Implication for the mechanism of remodeling of the adenovirus chromatin. *Biochemistry* 45: 303-313.

Jin, C., Kato, K., Chimura, T., Yamasaki, T., Nakade, K., Murata, T., Li, H., Pan, J., Zhao, M., Sun, K., Chiu, R., Ito, T., Nagata, K., Horikoshi, M., and Yokoyama, K. (2006) Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nature Struc. Mole. Biol.* 13: 331-338.

Wagner, S., Weber, S., Kleinschmidt, M. A., Nagata, K., Bauer, U-T. (2006) SET-mediated promoter hypoacetylation is a prerequisite for coactivation of the estrogen-responsive PS2 gene by PRMT1. *J. Biol. Chem.* 281: 27242-27250.

Watanabe, K., Fuse, T., Asano, I., Tsukahara, F., Maru, Y., Nagata, K., Kitazato, K., and Kobayashi, N. (2006) Identification of Hsc70 as an influenza virus matrix protein (M1) binding factor involved in the virus life cycle. *FEBS Lett.* 580: 5785-5790.

Turan, K. and Nagata, K. (2006) Chitosan-DNA nanoparticles: The effect of cell type and hydrolysis of chitosan on in vitro DNA transfection. *Pharm. Develop. Technol.* 11: 503-512.

Kato, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M., and Nagata, K. (2007) Histone acetylation-independent transcription stimulation by a histone chaperone. *Nucleic Acids Res.*, 35: 705-715.

Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A., and Nagata, K. (2007) Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of the influenza virus RNA polymerase subunits. *J. Virol.*,81: 1339-1349.

Nishie, T., Nagata, K., and Takeuchi, K. (2007) The C protein of wild-type measles virus has the ability to shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Microbes and Infection*, in press

(2) その他

Okuwaki, M., Murano, K., Kato, K., and Nagata, K. (2006) Molecular and physiological roles of histone chaperones. In *Recent DNA Structure, Chromatin and Gene Expression*. Ed. by Kiyama R, Shimizu M. Kerala: Transworld Research Network, 121-144.

Nagata, K. and Takeyasu, K. (2006) *Nuclear Dynamics –Molecular Biology and Visualozation of the Nucleus-*. Tokyo: Springer.

7. メンバー（日本語および英語で）（理研以外の方は所属機関の正式呼称を日本語と英語で書いてください）

永田恭介 Kyosuke NAGATA（筑波大学・大学院人間総合科学研究科、Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba）

奥脇 暢 Mitsuru OKUWAKI（筑波大学・大学院人間総合科学研究科、Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba）

8. 共同研究者（同上）（理研のデータベース登録に必要なので、誌上発表のみならず、口頭発表でも名前を連ねている人をリストしてください）

竹内薫 Kaoru TAKEUCHI（筑波大学 University of Tsukuba）

齋藤祥子 Shoko SAITO（筑波大学 University of Tsukuba）

春木宏仁 Hirohito HARUKI（筑波大学 University of Tsukuba）

沼尻明子 Akiko NUMAJIRI (筑波大学 University of Tsukuba)
村野健作 Kensaku MURANO (筑波大学 University of Tsukuba)
農野薫 Kaoru NOUNO (筑波大学 University of Tsukuba)
川口敦史 Atsushi KAWAGUCHI (筑波大学 University of Tsukuba)
内藤忠相 Tadasuke NAITO (筑波大学 University of Tsukuba)
加藤広介 Kohsuke KATO (筑波大学 University of Tsukuba)
Samad MD ABDUS (筑波大学 University of Tsukuba)
門田伸一 Shin-ichi KADOTA (筑波大学 University of Tsukuba)
熊倉充子 Michiko KUMAKURA (筑波大学 University of Tsukuba)
浅賀正充 Masamitsu ASAKA (筑波大学 University of Tsukuba)
沼田和志 Kazushi NUMATA (筑波大学 University of Tsukuba)
上島州平 Shuhei UESHIMA (筑波大学 University of Tsukuba)
喜安嘉彦 Yoshihiko KIYASU (筑波大学 University of Tsukuba)
西江友美 Tomomi NISHIE (筑波大学 University of Tsukuba)
岡田宏美 Hiromi OKADA (筑波大学 University of Tsukuba)
三林正樹 Mibayashi MASAKI (日本大学 Nihon University)
木村あゆみ Ayumi KIMURA (日本女子大学 Japan Women's University)
松影昭夫 Akio MATSUKAGE (日本女子大学 Japan Women's University)
森川裕子 Yuko MORIKAWA (北里研究所 The Kitasato Institute)
百瀬文隆 Fumitaka MOMOSE (北里研究所 The Kitasato Institute)
杉山賢司 Kenji SUGIYAMA (東京工業大学 Tokyo Institute of Technology)
高橋剛 Tsuyoshi TAKAHASHI (東京工業大学 Tokyo Institute of Technology)
三原久和 Hisakazu MIHARA (東京工業大学 Tokyo Institute of Technology)
千村崇彦 Takahiko CHIMURA (東京大学分子細胞生物学研究所 University of Tokyo)
堀越正美 Masami HORIKOSHI (東京大学分子細胞生物学研究所 University of Tokyo)
沼崎啓 Kei MUMAZAKI (国立感染症研究所 National Institute of Infectious Diseases)
駒木-安田加奈子 (国立国際医療センター・研究所 Research Institute, International Medical Center of Japan)
狩野繁之 (国立国際医療センター・研究所 Research Institute, International Medical Center of Japan)
河津信一郎 (国立国際医療センター・研究所 Research Institute, International

Medical Center of Japan)

松本健 Ken MATSUMOTO (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

中出浩司 Koji NAKADE (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

村田武英 Takehide MURATA (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

横山和尚 Kazunari YOKOYAMA (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

山崎孝仁 Takahito YAMASAKI (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

Jin Chunyuan (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

Li Hongjie (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

Pan Jianzhi (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

Zhao Mujun (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

Sun Kailai (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

Chiu Robert (理化学研究所 The Institute of Physical and Chemical Research)

岩松明彦 Akihiro IWAMATSU ((有) プロテイン・リサーチ・ネットワーク Protein Research Network)

広瀬進 Susumu HIROSE (国立遺伝学研究所 National Institute of Genetics)

伊藤正恵 Masae ITOH (長浜バイオ大学 Nagahama Institute of Bio-science and Technology)

竹安邦夫 Kunio TAKEYASU (京都大学 Kyoto University)

森川耿右 Kosuke MORIKAWA (大阪大学 Osaka University)

津中康央 Yasuo TSUNAKA (大阪大学 Osaka University)

宮地-山口まり Mary MIYAJI-YAMAGUCHI (岡山大学 Okayama University)

楯真一 Shin-ichi Tate (広島大学 Hiroshima University)

伊藤敬 Takashi Ito (長崎大学 Nagasaki University)

小林信之 Nobuyuki KOBAYASHI (長崎大学 Nagasaki University)

渡辺健 Ken WATANABE (長崎大学 Nagasaki University)

滝沢直己 Naoki TAKIZAWA (長崎大学 Nagasaki University)

北里海雄 Kaio KITAZATO (長崎大学 Nagasaki University)

浅野郁星 Ikusei ASANO (長崎大学 Nagasaki University)

布施隆行 Takayuki FUSE (長崎大学 Nagasaki University)

塚原富士子 Fujiko TSUKAHARA (長崎大学 Nagasaki University)

丸義朗 Yoshiro MARU (長崎大学 Nagasaki University)

Bela GYURCSIK (University of Szeged, Hungary)

Sabine WAGNER (Philipps-University of Marburg)

Susanne WEBER (Philipps-University of Marburg)

Markus A. KLEINSCHMIDT (Philipps-University of Marburg)

Uta-Maria BAUER (Philipps-University of Marburg)

Kadir TURAN (University of Marmara)