

筑波大学

博士（医学）学位論文

核小体クロマチン構成因子による
核小体構造・機能制御の分子機構

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

上 島 州 平

目次

序章	1
本研究の目的.....	1
核小体研究の歴史.....	2
核小体の構造と機能	3
1. <i>Fibrillar Center</i>	3
1-1. Nucleolar organizer region	4
1-2. rRNA 転写	5
1-2-1. 転写開始複合体	5
1-2-2. 転写活性の調節	6
1-2-3. rRNA 転写とがん化.....	7
2. <i>Dense Fibrillar Component</i>	8
2-1. rRNA プロセッシング	8
2-2. rRNA 転写と rRNA プロセッシングをリンクする因子	8
3. <i>Granular Component</i>	9
細胞周期を通じた核小体の構造変化	10
1. 間期.....	10
2. 分裂期前期	11
3. 分裂期後期	11
4. 分裂期終期	11
5. G_1 期初期.....	12
本研究の進め方	12
第一章	15
1-1. 緒言	15
1-2. 材料と方法.....	17
1-2-1. 細胞培養、遺伝子または siRNA の導入、安定発現細胞株の確立、細胞同調	17
1-2-2. 抗体.....	17
1-2-3. 免疫沈降	18
1-2-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	18
1-2-5. Western blotting	19
1-2-6. クロマチン免疫沈降.....	19
1-2-7. 間接蛍光抗体法、蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	21
1-2-8. プラスミド DNA の構築.....	22
1-3. 結果	23
1-3-1. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合は、間期で検出され、分裂期で解消される。	23
1-3-2. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合には、 G_1 期初期における rRNA 転写の再開が必要ではない。	24
1-3-3. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合における、転写因子 UBF の役割	26
1-3-4. UBF は、rRNA プロセッシング因子が r-chromatin に結合するためには十分ではない。	27
1-3-5. rRNA 前駆体は、rRNA プロセッシング因子が NOR へ集合するための UBF に次ぐ	

因子となる可能性がある。	28
1-3-6. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合の脱着には、分裂期における rRNA プロセッシング因子のリン酸化修飾が重要である可能性がある。	29
1-4. 考察	30
1-4-1. rRNA プロセッシング因子が r-chromatin に結合することの生物学的意義	30
1-4-2. rRNA プロセッシング因子が分裂期に r-chromatin から解離し、G ₁ 期初期に再集合 する分子機構	30
1-4-3. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合における UBF の機能	32
1-4-4. G ₁ 期初期における 2 段階の核小体形成機構	33
第二章	35
2-1. 緒言	35
2-2. 材料と方法	37
2-2-1. 細胞培養、siRNA の導入、安定発現細胞株の確立	37
2-2-2. 核小体の単離	37
2-2-3. 塩酸抽出	37
2-2-4. 抗体	38
2-2-5. CBB 染色、銀染色	38
2-2-6. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS)	38
2-2-7. 透過型電子顕微鏡	40
2-2-8. 免疫沈降	40
2-2-9. 細胞増殖測定	40
2-2-10. 5-fluorouracil incorporation	40
2-2-11. プラスミド DNA の構築	40
2-3. 結果	42
2-3-1. 核小体構造を制御する新たな候補因子として Nopp140 に着目した。	42
2-3-2. Nopp140 は、核小体の構造維持には必須ではない。	42
2-3-3. Nopp140 は、Pol I および snoRNPs と核小体において三者複合体を形成する。	43
2-3-4. Nopp140 は、細胞増殖に重要である。	44
2-3-5. Nopp140 は、Cajal ボディの形成に必要である可能性がある。	44
2-4. 考察	46
2-4-1. 核小体構造における Nopp140 の機能	46
2-4-2. snoRNPs の分子シャペロンとしての Nopp140 の機能	46
2-4-3. Nopp140 依存的な細胞増殖能の低下	46
2-4-4. Cajal ボディ構造における Nopp140 の機能	47
総括と展望	48
謝辞	51
参考文献	52

序章

本研究の目的

本研究は、核小体構造・機能制御の分子基盤を解明することを目的とする。核小体はリボソーム生合成を担う真核生物特有の核内構造体である。核小体の内部には rRNA の鋳型となる rRNA 遺伝子が密集しており、そこから rRNA の転写、rRNA 前駆体のプロセッシング、最終的にはリボソームタンパク質のアセンブリーが行われ、成熟したリボソームサブユニットが核外へ運ばれ、機能的なリボソームが形成される。細胞の増殖はリボソーム生合成の活性と密接に関連しており、過剰な活性化は細胞のがん化に繋がると考えられる。また、核小体は外界のさまざまな刺激に応答して、その機能が抑制されること (Boulon et al., 2010) が明らかとなっており、細胞が外界の環境変化に応じてエネルギー浪費を抑えていると見られる。また、細胞内で起きているすべての転写のうち、約 50% を rRNA の転写が占めており (Moss and Stefanovsky, 2002)、核小体の機能抑制はエネルギーを節約する上で効率の良い仕組みであると考えられる。

リボソーム生合成の分子機構については、rRNA 転写、rRNA プロセッシングなど、個々の過程の研究は非常に良く進んでいる。その一方で、rRNA 転写からプロセッシング、プロセッシングからリボソームアセンブリーというように、各過程の関わり合い、つまり 3 つの過程がどのような分子機構で協調的に行われているかは不明な点が多い。その中で、rRNA プロセッシングに関わる因子が rRNA 転写の亢進に寄与しているという報告 (Fath et al., 2000) があるが、その分子機構は不明である。リボソーム生合成を包括的に理解する上で、核小体の構造制御機構を知ることは重要である。なぜなら、リボソーム生合成の活性は、核小体構造の成熟度を反映しているからである。つまり、リボソーム生合成が停止する分裂期では核小体構造は崩壊し、リボソーム生合成の活性が回復する G₁ 期初期に、核小体構造は再形成する。従って、リボソーム生合成の活性は、核小体構造によって制御されている可能性がある。

G₁ 期初期には、rRNA プロセッシング因子などの RNA-タンパク質複合体 (ribonucleoprotein, RNP) が核質中の複数の焦点 prenucleolar body (PNB) に集合する。そして、RNP が PNB から rRNA 遺伝子を含む特定の染色体領域 nucleolar organizer region (NOR) に集合することで、成熟した核小体構造が形成される。しかしながら、RNP が NOR に集合する分子機構は明らかになっていない。また、分裂期において核小体構造が崩壊する分

子機構も明らかになっていない。本研究の最終目標は、核小体構造を制御する因子を同定し、それによる核小体構造制御の分子基盤を明らかにすることである。核小体構造制御の分子基盤が明らかになれば、リボソーム生合成の制御が可能となり、がんなどの疾病治療技術の開発に貢献できるだろう。

核小体研究の歴史

核小体は 1830 年代に初めてその存在が確認された。細胞周期を通じた核小体の構造変化の様子が初めて報告されたのは 1898 年の Montgomery によるもので、核小体が分裂期で崩壊し、間期に再形成されることが報告された (Montgomery, 1898)。その後、Heitz および McClintock によって、核小体が特定の染色体領域に形成されることが明らかにされた (Heitz, 1931; McClintock, 1934)。1960 年代になって、核小体の単離方法が確立されると (Vincent, 1953; Maggio et al., 1963; Busch et al., 1963)、核小体研究は単離核小体を用いた rRNA 転写や rRNA プロセッシングの解析が主流となった。一例を挙げると、rRNA に相補的な配列を持つ U3 snoRNA が同定され (Calvet and Pederson, 1981)、さらにその機能が 45S rRNA 前駆体の最初の切断に関与することが明らかとなった (Kass et al., 1990)。また、ヒト培養細胞から高純度な核小体が単離されたこと (Soeiro and Basile, 1973) で、核小体に含まれるタンパク質も明らかとなってきた (Mamrack et al., 1979; Ochs et al., 1985)。1990 年代になると、核小体研究は nucleophosmin/B23、nucleolin/C23、そして fibrillarin などの個々の核小体タンパク質に焦点が当てられ、それらの細胞周期を通じた挙動を蛍光免疫染色法や、GFP などの蛍光タンパク質を融合した融合タンパク質を発現させた生細胞を用いたりアルタイムイメージ解析で追跡する研究が主流となった。特に、2000 年から 2002 年にかけては、FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching: 蛍光退色後回復測定) 解析や FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching: 光退色による蛍光消失) 解析を用いた論文が多数報告された。

核小体が初めて単離されて半世紀あまり、核小体研究はヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞から単離した核小体のプロテオミクスにより、核小体構成因子の全容解明に迫った (Andersen et al., 2002; Scherl et al., 2002; Andersen et al., 2005)。現在までに同定されている核小体タンパク質の数は 4700 種以上にのぼる (Nucleolar Proteome Database [<http://www.lamondlab.com/NOPdb3.0/>]; Ahmad et al., 2009)。同定された核小体タンパク質

を見てみると、リボソーム構成因子、RNA 結合因子、rRNA プロセッシング因子、そしてシャペロン因子などのリボソーム生合成に関わる因子が含まれるほか、細胞周期関連因子、DNA 修復因子、そして mRNA スプライシング因子といったリボソーム生合成以外の機構に関わる因子も同定された。また、機能未知な因子も多く同定され、核小体の多機能性が示唆されている (Andersen et al., 2005)。

核小体の構造と機能

核小体は間期で観察できる核内構造体である (図 1)。ヒトの核小体を電子顕微鏡で観察すると、その構造は電子密度の違いにより 3つの領域に分けられる。中心には最も電子密度の低い fibrillar center (FC) が存在し、その周辺には電子密度が最も高い dense fibrillar component (DFC) が存在する。そして、電子密度が 2番目に高い granular component (GC) が FC や DFC を取り囲むように存在している。核小体の主な機能は、リボソーム生合成である。リボソーム生合成の反応段階は以下の通りである (図 2)。まず、リボソームの中核となる rRNA を合成するため、rRNA 遺伝子から rRNA 前駆体が転写され (rRNA 転写)、次に成熟した rRNA を生成するため、rRNA 前駆体の化学修飾と切断が行われる (rRNA プロセッシング)。最後に、成熟した rRNA にリボソームタンパク質が結合し、40S リボソームサブユニットと 60S リボソームサブユニットが形成される (リボソームアセンブリー)。最終的には、2つのリボソームサブユニットが細胞質へと運ばれ、成熟したリボソームが形成される。

1. Fibrillar Center

FC 領域には rRNA 遺伝子がタンデムに連なっている染色体領域 NOR が位置している (図 3)。ヒトの rRNA 遺伝子は、43 kbp を 1 ユニットとし、13 kbp の転写領域と 30 kbp の遺伝子間領域からなり、NOR 上に約 80 回のリピート配列を構成している。NOR はヒトでは 5本の染色体に分かれており、第 13 染色体、第 14 染色体、第 15 染色体、第 21 染色体、そして第 22 染色体の短腕型染色体の短腕部に存在する。NOR にコードされている rRNA 遺伝子はすべての rRNA 遺伝子が常に転写されている訳ではなく、その大半は不活化されている (Santoro and Grummt, 2001)。

1-1. Nucleolar organizer region

NOR は 1931 年に Heitz によってその存在が報告され、1934 年に McClintock によって提唱された (Heiz, 1931; McClintock, 1934)。Heitz は、カタツムリの眼のような形をしている付随体とよばれる染色体領域にある二次狭窄 (secondary constriction) 上に核小体が形成されると報告したが、その後、McClintock によって、二次狭窄近くの酢酸カーミン染色で染色される染色体領域こそが核小体形成に必要な領域であることを示し、その領域を nucleolar organizing body と定義した。これが、今日の NOR (nucleolar organizer region) に相当する。1980 年代になり、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (fluorescence *in situ* hybridization 法、FISH 法) が開発されると、核小体タンパク質と NOR を同時に検出し、それらの細胞周期を通じた挙動や rRNA 転写の活性化と核小体タンパク質の局在変化が研究された。その中で Roussel らは、蛍光抗体法と組み合わせた FISH 法 (Immuno-FISH 法) を用いて、分裂期において、RNA polymerase I (Pol I)、Upstream binding factor (UBF)、TATA-box binding protein (TBP) などの selectivity factor 1 (SL1) 複合体といった rRNA 転写に関わる因子群が NOR 上で共局在していることを報告した (Roussel et al., 1996)。さらに、分裂期においても UBF や Pol I が局在する NOR は、間期になると rRNA 転写活性を有する一方で、それらが局在していない NOR は、間期になっても rRNA 転写活性を示さないことも明らかとなった。このことは、UBF などの Pol I 転写装置の NOR への結合量が、rRNA 遺伝子の転写活性を規定していることを示唆した (Roussel et al., 1996)。事実、UBF の発現量の低下が、rRNA 遺伝子のクロマチン ribosomal gene chromatin (r-chromatin) へのヒストン H1 の集合を促し、転写抑制を誘導することが報告されている (Sanij et al., 2008)。一方で、マウス細胞に導入したヒト NOR がマウス核小体に取り込まれ、かつマウス UBF はヒト NOR 上に局在することも報告されている (Sullivan et al., 2001)。つまり、転写が不活性化されている rRNA 遺伝子 (この場合、マウス細胞に導入されたヒト rRNA 遺伝子のことを指す。) 上にも UBF は存在することを示唆しており、少なくとも UBF の結合量だけでは rRNA 遺伝子の転写活性は説明できないことを示唆している。同様の表現型は、低濃度の actinomycin D を用いて rRNA 転写を特異的に阻害した際にも認められ、UBF などの Pol I 転写装置は、転写が抑制されている rRNA 遺伝子上にも局在することが明らかとなっている (Jordan et al., 1996)。

分裂期における NOR の細胞内での立体構造については、Heliot らや Hernandez-Verdun らのグループによって報告されている。それらによると、分裂期の NOR は、染色体の二次

狭窄を三日月状に取り囲むようにして配置しており、UBFなどの Pol I 転写装置の一部はヌクレオソーム構造が解けてループアウトしている領域に結合している (Heliot et al., 1997; Gebrane-Younes et al., 1997)。一方、間期における NOR の立体構造については core-helix モデルが提唱されている (Denissov et al., 2011)。その報告によると、1 ユニットの rRNA 遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域が一つの SL1 複合体によって繋ぎ止められており、これが core となって転写領域がらせん状に取り囲むように配置されている。

1-2. rRNA 転写

Pol I、SL1 複合体、RRN3、そして UBF を含む Pol I 転写装置の細胞内局在は主に FC 領域であるが、rRNA 転写が行われる場所については、FC 領域であるという説 (Cheutin et al., 2002; Malinsky et al., 2002) と DFC 領域であるという説 (Biggiogera et al., 2001; Cmarko et al., 2000; Koberna et al., 2002)、あるいは FC 領域と DFC 領域の境界であるという説 (Raska et al., 1995) があり、決着はついていない。これらの結論の違いは、試料の処理方法やタンパク質や RNA の検出方法によって生じることが要因の一つと考えられており、より intact な rRNA 転写を検出するためには今後の技術改良が求められる (Raska, 2003)。

1-2-1. 転写開始複合体 (図 4A)

rRNA 転写の分子機構については、酵母から哺乳動物まで大まかな転写装置は類似している。rRNA 転写の第一段階は転写開始複合体 (pre-initiation complex [PIC]) の形成である。Pol I は PIC の中で最も大きな複合体で、10 個のサブユニットと 4 つの関連因子から構成されている。UBF や SL1 複合体は rRNA 遺伝子プロモーター領域に結合し (Bell et al., 1988)、Pol I は RRN3 (TIF-IA) を介してプロモーター領域に結合する (Miller et al., 2001)。UBF は 2 量体を形成する転写因子で、HMG ボックスと呼ばれる DNA 結合領域を有しており、N 末端側 3 つの HMG box が DNA と結合し、enhanceosome と呼ばれる転写活性化に必要な DNA のループ構造を形成する (Stefanovsky et al., 2001)。UBF は C 末端側には酸性領域を有し、この領域を介して SL1 複合体と結合する (Kwon and Green, 1994; Beckmann et al., 1995; Lin et al., 2006)。また、UBF は Pol I 結合因子 PAF53 (Pol I 関連因子) を介して、Pol I にも結合する (Hanada et al., 1996)。UBF は、enhanceosome の形成のほか、Pol I のプロモーター領域からの離脱や転写伸長を促す (Panov et al., 2006; Stefanovsky et al., 2006a)。そ

して、UBF の発現量が転写活性の高い rRNA 遺伝子の数を決めていることが報告されている (Sanij et al., 2008)。生物種間のプロモーターの特異性を決めているのが SL1 複合体である。SL1 複合体は、TBP のほか、5 つの TBP-associated factors (TAF_{IS}) から構成されている (Comai et al., 1992; Zomerdijk et al., 1994; Heix et al., 1997; Denissov et al., 2007; Gorski et al., 2007)。RRN3 は、Pol I を SL1 複合体に繋ぎとめている因子で、リン酸化などの修飾を受けて転写活性を調節している (Moorefield et al., 2000; Bodem et al., 2000)。

1-2-2. 転写活性の調節

rRNA 転写の活性は、増殖刺激、細胞周期、栄養状態、そしてストレスによって調節されている。細胞が増殖刺激を受けると、extracellular signal-regulated kinase (ERK) や ribosomal S6 kinase (RSK) などが UBF、SL1 複合体、そして RRN3 をリン酸化し、転写活性を増加させる (Stefanovsky et al., 2001; Stefanovsky et al., 2006a; Stefanovsky et al., 2006b; Zhao et al., 2003)。

rRNA 転写は分裂期で抑制されており、G₁ 期に次第に活性を上昇させ、S 期や G₂ 期で最大活性を持つ (Weisenberger and Scheer, 1995; Kuhn et al., 1998; Klein and Grummt, 1999)。分裂期になると、SL1 複合体の TAF₁₁₀ は Cyclin B/Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) によってリン酸化され、UBF との結合が解除され Pol I は解離する (Heix et al., 1998; Kuhn et al., 1998)。また、分裂期では TAF₁₁₀ 以外に UBF や rRNA プロセッシング因子などもリン酸化修飾を受けることが報告されており、これらが rRNA 転写の抑制に寄与していると考えられる (Dephoure et al., 2008; Olsen et al., 2010)。G₁ 期では、TAF₁₁₀ の脱リン酸化、そして Cyclin D1/CDK4 や Cyclin E or A/CDK2 による UBF のリン酸化によって転写活性が上昇する (Voit et al., 1999; Voit and Grummt, 2001)。FRAP 解析によって、Pol I や RRN3 といった転写装置の移動速度は G₁ 期や G₀ 期よりも S 期の方が小さかったことから、PIC は転写活性に依存して rRNA 遺伝子プロモーター領域に形成されることが示唆されている (Gorski et al., 2008)。一方、UBF は S 期においても移動速度の変化がなかったことから、UBF は常にプロモーター領域に結合していると考えられる (Gorski et al., 2008)。また、G₀ 期では、Rb や p130 が UBF に結合することで UBF の rRNA 遺伝子プロモーター領域への結合を阻害している (Ciarmatori et al., 2001)。

rRNA 転写は栄養状態によっても影響を受ける。低栄養状態下では、細胞内の ATP 濃度が低下し AMP 濃度が上昇する。すると、AMP-activated protein kinase (AMPK) が活性化し、

RRN3 がリン酸化 (Ser635) されることで Pol I の解離を誘導し、転写活性は低下する (Hoppe et al., 2009)。一方、栄養状態が改善されると、RRN3 は ERK や RSK によって Ser649 と Ser633 のリン酸化修飾を受け、さらに mTOR リン酸化経路によって Ser199 の低リン酸化状態を維持することで転写活性を回復させる (Zhao et al., 2003; Mayer et al., 2004)。

rRNA 転写は外界のストレスにも敏感に反応し、抑制される。これは、c-jun N-terminal protein kinase 2 (JNK2) を介したシグナル経路によって制御されている。ストレスによって活性化した JNK2 は RRN3 の Ser200 をリン酸化する。このことで、Pol I や SL1 複合体の結合が解除され、さらに RRN3 の局在が核小体から核質へ移動し、結果的に PIC の形成が抑制される (Mayer et al., 2005)。核小体のストレス応答で、特に重要なのが p53 による制御である。定常状態では、p53 は mouse double minute 2 (MDM2) によって分解経路に回されているが、ストレス下では、核小体構造が崩壊し、リボソーム生合成が抑制される。すると、翻訳されたリボソームタンパク質が蓄積し、リボソームタンパク質 RPL5 や RPL11 が MDM2 に結合することで MDM2 を抑制し、結果として p53 の蓄積を促進する (Fumagalli et al., 2012)。このことが、p53 によるアポトーシスを誘導すると考えられている。また、p53 は SL1 複合体に結合し、PIC の形成を抑制することも報告されている (Zhai and Comai, 2000)。

1-2-3. rRNA 転写とがん化

rRNA 転写活性の亢進は、がん化の一因である。がん原遺伝子産物やがん抑制遺伝子産物が Pol I 転写装置に直接働きかけ、rRNA 転写の調節を行っている。たとえば、がん原遺伝子産物 c-Myc は、少なくとも以下の 3 つの機構で rRNA 転写を亢進している。すなわち、1) rRNA 遺伝子に結合し、ヒストンタンパク質のアセチル化を誘導し、クロマチン構造を緩ませる (Arabi et al, 2005; Grandori et al., 2005)、2) SL1 複合体に結合し、PIC の形成を促す (Grandori et al., 2005)、そして 3) UBF、RRN3、そして Pol I サブユニット遺伝子の転写を促し、転写装置の材料を増加させる (Poortinga et al., 2004; Poortinga et al., 2011)。また、先ほど紹介した、Rb や p130 による UBF の不活化、あるいは p53 による rRNA 転写抑制・アポトーシス誘導も、これらが破綻することががん化の一因なると考えられている。

2. Dense Fibrillar Component

DFC 領域は FC 領域の周辺に形成され、電子密度の最も高い領域である。ここでは、主に、small nucleolar RNP (snoRNP) による rRNA 前駆体の化学修飾と切断 (rRNA プロセッシング) が行われている。

2-1. rRNA プロセッシング (図 4B)

rRNA 前駆体の化学修飾には、box C/D snoRNP による 2'-O-メチル化と box H/ACA snoRNP による偽ウリジン化があり、その修飾場所は、ヒト rRNA 前駆体では約 200 ヶ所存在する。これらの化学修飾によって、RNA 同士の結合性が変化し、rRNA 前駆体の立体構造の形成に寄与していると考えられている。また、リボソームの mRNA との結合部位付近が化学修飾されることから、リボソームのタンパク質合成活性にも寄与していると考えられている (Decatur and Fournier, 2002)。Box C/D snoRNP は、box C/D snoRNA とそれに結合する 4 つの RNA 結合タンパク質 15.5K、NOP56、NOP58、そしてメチル基転移酵素 fibrillarin (FBL) から構成されている。Box H/ACA snoRNP は、box H/ACA snoRNA とそれに結合する 4 つの RNA 結合タンパク質 GAR1、NHP2、NOP10、そして偽ウリジン合成酵素 dyskerin (DKC1/NAP57) から構成されている (Reichow et al., 2007)。一方、rRNA 前駆体の切断には、box C/D snoRNPs では 4 つ (U3、U8、U14、そして U22)、そして box H/ACA snoRNPs では 3 つ (E1 と E2、そして E3) が関わっていることが明らかとなっている (Li et al., 1990; Beltrame and Tollervey, 1992; Peculis and Steitz, 1993; Tycowski et al., 1994; Mishra and Eliceiri, 1997)。中でも、U3 snoRNP は rRNA 前駆体の切断の中心的な役割を果たし、5'-ETS 領域や 18S rRNA の 5'側と 3'側の 3 ヶ所を切断するために必要である (Dutca et al., 2011)。さらに、出芽酵母において、U3 snoRNA はさまざまなプロセッシング因子を rRNA 前駆体に集合させるにも重要であり、small ribosomal subunit (SSU) processome と呼ばれる 2.2 MDa にもなる巨大な複合体を形成する (Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002)。

2-2. rRNA 転写と rRNA プロセッシングをリンクする因子

「緒言」でも述べたが、リボソーム生合成の各過程がどのような分子機構で協調的に行われているかはよくわかっていない。Pol I 転写装置の一つ UBF は、rRNA 遺伝子プロモーター領域だけでなく、転写領域や遺伝子間領域にも結合すること (O'Sullivan et al., 2002; Mais et al., 2005)、転写伸長反応を促進すること (Stefanovsky et al., 2006a) が明らかとなっ

ている。また、iFRAP (inverse FRAP) 解析により、rRNA 転写に従事している Pol I の割合は 7-10% で、90% 以上の Pol I は転写に従事せず、流動性が高い状態であることが報告されている (Dundr et al., 2002)。さらに、TAF_I110 (SL1 複合体)、RRN3、そして RPA43 (Pol I 関連因子) は、転写非依存的に UBF と結合することが示唆されている (Mais et al., 2005)。これらの報告から、Pol I 転写装置は UBF に依存して rRNA 遺伝子上に存在しており、転写に従事していない Pol I 転写装置は、rRNA 遺伝子の遺伝子間領域に一時保管されている可能性が示唆されている。出芽酵母において、U3 snoRNP などから形成される複合体 SSU processome には、多数の U Three Protein (UTP) と呼ばれる U3 snoRNA 結合因子が含まれている。それらの中で、rRNA 転写活性を正に制御している UTP (Transcriptional or t-UTP) がいくつか同定されている (Gallagher et al., 2004)。このことから、t-UTPs は、rRNA プロセッシングだけでなく、rRNA 転写も制御すること示唆された。そして、ヒトにおいて、t-UTPs は Pol I 転写装置と同じように、転写非依存的に UBF と結合することが示唆されている (Prieto and McStay, 2007)。rRNA 転写と rRNA プロセッシングの両方に関与している因子は他にもある。TCOF1 と Nopp140 は、構造が非常に良く似ているタンパク質で、TCOF1 は、rRNA 転写と 2-O'-メチル化を正に制御していること (Valdez et al., 2004; Gonzales et al., 2005)、Nopp140 は Pol I、box C/D snoRNP、そして box H/ACA snoRNP のいずれとも結合する分子シャペロンであること (Meier and Blobel, 1990; Meier and Blobel, 1994; Bellini and Gall, 1999; Chen, et al., 1999; Yang et al., 2000) が明らかとなっており、いずれのタンパク質も t-UTPs と同様に、rRNA 転写と rRNA プロセッシングをリンクする因子であることが示唆されている。

3. Granular Component

GC 領域は、核小体構造の最も外側に位置している。ここでは、主にリボソームタンパク質のアセンブリーが行われる。GC 領域には、FBL が局在していないことから、rRNA プロセッシングは GC 領域では行われないことが示唆されている。一方で、nucleophosmin (B23) や nucleolin (NCL) は、GC 領域に豊富に存在している (Spector et al., 1984)。

B23 は当研究室で同定されたタンパク質の一つである。アデノウイルスのクロマチンを使った DNA 複製の系を利用し、リン酸化タンパク質 B23 が同定された (Okuwaki et al., 2001)。B23 は C 末端を介して RNA に結合するタンパク質で、rRNA 前駆体の ITS2 領域の切断活性があることが知られている (Dumbar et al., 1989; Chang and Olson, 1990; Savkur

and Olson, 1998)。NCLはB23と同様にRNA結合領域を有するリン酸化タンパク質で、FBLと同様に、rRNA前駆体の5'-ETS領域に結合し、最初のプロセッシングに関与する(Ginisty et al., 1998)。また、NCLは多くのリボソームタンパク質と結合すること(Bouvet et al., 1998)や、リボソームタンパク質とrRNAを繋ぎとめるアダプターとしても機能すること(Borer et al., 1989)から、リボソームタンパク質のシャペロンとしても機能すると考えられている。

GC領域では、リボソームを構成する40Sと60Sリボソームサブユニットがそれぞれ別々に形成される。18S rRNAは40Sリボソームサブユニットに、5.8S、28S、そして核ゲノム由来の5S rRNAが60Sリボソームサブユニットにそれぞれ含まれる。出芽酵母において、リボソームタンパク質のアセンブリーには、シャペロンタンパク質、ヘリカーゼ、ATP分解酵素、GTP分解酵素などが必要で、2つのサブユニットは輸送因子CRM1によって細胞質へと運ばれ、成熟したリボソームが形成される(Johnson et al., 2002)。

細胞周期を通じた核小体の構造変化(図6)

1. 間期

核小体は間期に明瞭に観察され分裂期では消失するように、細胞周期を通じてダイナミックな構造変化をする(図5)。核小体の大きさは細胞の種類によって異なる。成熟したリンパ球では0.5 μm以下であったり、分化した細胞やがん細胞では3-9 μmであったりする。核小体は核内に1-6個存在しているが、細胞が間期に進入して1-2時間後には核小体同士が融合するのでその数は規定されていない。間期において、核小体構造を維持できる原因はいくつか報告されている。一つはrRNA転写であり、rRNA転写阻害剤actinomycin DでrRNA転写を阻害すると、DFC領域やGC領域が核小体周辺にキャップ様構造を形成する核小体分離(nucleolar segregation)が生じる(Scheer et al., 1975)。また、カゼインキナーゼ(CK2)阻害剤5,6-dichloro-1-ribo-furanosylbenzimidazole (DRB)やCDK阻害剤roscovitineによってCK2あるいはCDKによるタンパク質のリン酸化が阻害されると、核小体がネックレス状に崩壊する(Sirri et al., 2002; Louvet et al., 2006)。このことから、核小体の構造はCK2やCDKによるタンパク質のリン酸化によっても維持されていると考えられている。

2. 分裂期前期

核小体構造は分裂期に進むと崩壊する。分裂期前期では Cyclin B/CDK1 の発現量が急速に増加し、Pol I 転写装置や B23 や NCL を含む rRNA プロセッシング因子はリン酸化修飾を受ける (Belenguer et al., 1990; Peter et al., 1990a; Heix et al., 1998; Dephoure et al., 2008; Olsen et al., 2010)。核膜構成因子 Lamin の Cyclin B/CDK1 によるリン酸化が、核膜崩壊の原因であること (Peter et al., 1990b)、B23 の Cyclin B/CDK1 によるリン酸化が、B23 の核小体からの解離の一因であること (Okuwaki et al., 2002) から、分裂期における核小体タンパク質のリン酸化が、核小体構造の崩壊の一因であることが示唆される。生細胞の経時的観察によって、核小体が崩壊する順序は、RPA39 (Pol I サブユニット) が核小体から解離し、次いで核膜が崩壊する。その後、FBL、B23 の順番で核小体から解離していくことが明らかになっている (Leung et al., 2004)。また、UBF (Chan et al., 1990; Roussel et al., 1993; Zatschina et al., 1993; Roussel et al., 1996)、SL1 複合体 (TAF_I110 と TBP) (Jordan et al., 1996; Roussel et al., 1996; Heix et al., 1998)、そして Pol I サブユニット (Scheer and Rose, 1984; Roussel et al., 1996; Leung et al., 2004) は、分裂期中も NOR に局在していることが報告されている。一方、FBL、B23、そして NCL といった RNP は、分裂期では細胞質中に拡散している (Dundr et al., 2000) が、一部は染色体上に残っている。染色体上に RNP が残っている意義については明らかになっていないが、凝縮した染色体を維持するため、RNP が2つの娘細胞へ等しく分配されるためであることが推測されている (Hernandez-Verdun and Roussel, 2003)。

3. 分裂期後期

分裂期後期では、FBL や B23 などの RNP は、細胞質中に nucleolar-driven foci (NDF) と呼ばれる焦点を形成する。NDF には rRNA 前駆体や U3 snoRNA などが含まれている (Dundr et al., 1997; Dundr and Olson, 1998)。

4. 分裂期終期

後期から終期にかけて、Cyclin B/CDK1 の発現量は低下し、タンパク質の脱リン酸化が進む。Pol I 転写装置は再び活性を回復させ、rRNA 転写が再開する。核膜が形成され始めると、NDF から RNP が解離し、核内の染色体上に prenucleolar body (PNB) と呼ばれる焦点が形成される (Savino et al., 2001)。PNB は染色体が脱凝縮すると同時に、染色体と共に

移動し、PNB が互いにあるいは NOR に近接すると、RNP を橋渡ししている様子が観察されている (Dundr et al., 2000; Savino et al., 2001)。

5. G₁ 期初期

G₁ 期初期になると、rRNA プロセッシング因子が PNB から NOR に移動し始める。励起波長の異なる蛍光タンパク質を組み合わせることで複数の PNB 構成因子の経時的な挙動が観察されている。それによると、終期の開始から 1、2 分で FBL と B23 が共局在している PNB が観察され、それらが PNB から NOR へ移動するタイミングは、FBL の方が B23 より早かった。また、B23 と同じく後期 rRNA プロセッシング因子である Nop52 は B23 と同じような挙動を示したことから、後期 rRNA プロセッシング因子は複合体として PNB から NOR へと移動することが示唆された (Angelier et al., 2005)。PNB から RNP が解離する機構については、PNB における rRNA 前駆体のプロセッシングと協調している。つまり、PNB に含まれている rRNA 前駆体をプロセッシングし終わった RNP から段階的に NOR へと移動することが示唆されている (Carron et al., 2012)。

このように、PNB が形成されると、そこから RNP が NOR 上へと集合し核小体が形成される。しかし、RNP は何をターゲットにして NOR へと集合できるのか、RNP と NOR にはどのような相互作用があるのか、その分子機構は全く不明である。

本研究の進め方

本研究は、核小体構造・機能制御の分子基盤を解明することを目的とする。第一章では、リボソーム生合成に関わる代表的な 7 つの因子 (以下、核小体タンパク質) と、核小体形成の基点となる NOR に焦点を当て、核小体構造制御の分子プロセスの解明を試みた。用いた核小体タンパク質は、rRNA 転写を担う RPA194 (Pol I サブユニット) と転写因子 UBF、rRNA プロセッシングを担う DKC1、FBL、および Nopp140、そしてリボソームアセンブリーのほかりボソーム生合成に広く関与する B23 と NCL の計 7 種類を選んだ。最初に、細胞周期を通じた核小体構造の変化を、タンパク質間相互作用で追跡できるかを検討するために、B23 とヒストン H3 の相互作用を免疫沈降法にて検討した。その結果、B23 とヒストン H3 の結合は間期で増加し、分裂期で著しく減少することが明らかとなった。そこで、

B23 を含む 7 つの核小体タンパク質と NOR の結合をクロマチン免疫沈降法にて検討した。その結果、用いたすべての核小体タンパク質は間期において NOR と結合し、分裂期では NOR から解離することが明らかとなった。このことから、細胞周期を通じた核小体の構造変化が B23 などの核小体タンパク質と NOR の結合によって制御されていることが示唆された。さらに、DKC1、FBL、そして Nopp140 といった rRNA プロセッシングに参与する因子が、間期において、特に rRNA 遺伝子の転写領域に多く結合したことから、rRNA の転写とそれに続くプロセッシングが協調的であることが示唆された。次に、分裂期から間期にかけて再開する rRNA 転写と核小体の再形成の関係性を検討するために、rRNA 転写の再開を阻害した状態で核小体タンパク質と NOR の結合をクロマチン免疫沈降により検討した。その結果、7 つの核小体タンパク質と NOR の結合は、rRNA 転写の再開には依存しないことが明らかとなった。一方で、rRNA 転写の再開を阻害すると、成熟した核小体構造は形成されなかったことから、核小体構造の再形成は、rRNA 転写の再開前と再開後の 2 段階で行われることが示唆された。つまり、rRNA 転写の再開前 (第 1 段階) に核小体タンパク質と NOR の結合が完了し、その後の rRNA 転写の再開 (第 2 段階) によって成熟した核小体構造が形成されることが示唆された。次に、核小体タンパク質と NOR の結合を制御している因子を明らかにするために、候補として挙げられた転写因子 UBF に着目した。UBF をノックダウンし、7 つの核小体タンパク質と NOR の結合をクロマチン免疫沈降により検討した。その結果、NCL 以外の用いたすべての核小体タンパク質は、UBF 依存的に NOR に結合することが明らかとなった。一方、NOR 以外の染色体領域に UBF を局在させ、6 つの核小体タンパク質の局在を間接蛍光抗体法により検討したところ、RPA194 以外の核小体タンパク質は異所性の UBF とは共局在しなかった。このことから、DKC1、FBL、そして B23 といった RNP が NOR と結合するには UBF だけでは十分ではなく、UBF に次ぐ第二の因子も必要であることが示唆された。最後に、核小体構造の崩壊の分子機構を明らかにするために、核小体崩壊の一因と考えられている核小体タンパク質の分裂期特異的なリン酸化修飾の有無を検討した。その結果、UBF は分裂期特異的なリン酸化体を有することが明らかとなった。

第二章では、核小体構造を制御する因子を新たに探索し、候補として挙げられた Nopp140 について、その機能解析を行った。HeLa 細胞から核小体を単離し、塩酸抽出によって溶出された画分から、液体クロマトグラフィー質量分析により、r-chromatin に結合する UBF や B23 などを含むタンパク質を複数同定した。その中から、r-chromatin および snoRNP と結

合することが報告されていた Nopp140 に着目した。Nopp140 が核小体の構造と機能に与える影響を検討するために、Nopp140 をノックダウンし、間接蛍光抗体法および透過型電子顕微鏡による核小体構造の変化を検討した。その結果、Nopp140 がノックダウンされた細胞の中で核小体構造が変化した細胞が認められた。さらに、rRNA 転写活性および細胞増殖への影響を検討した。その結果、Nopp140 は rRNA 転写活性および細胞増殖活性を正に制御する可能性が示唆された。

第一章

転写因子 UBF による核小体構造制御機構

1-1. 緒言

本研究の目的は、核小体構造・機能制御の分子基盤を明らかにすることである。核小体の構造は、間期では明瞭に観察されるが分裂期では確認できない。このことから、核小体の構造は細胞周期を通じて制御されていることが示唆されるが、その実態は明らかではない。また、核小体の構造を維持するために、どのような相互作用が必要かも明らかではない。本章では、まず、間期において B23 とヒストン H3 の結合が検出されたことから、B23 などの rRNA プロセッシングに関わる RNP (以下、rRNA プロセッシング因子) と NOR を構成する r-chromatin の結合の有無を検討した。その上で、分裂期から間期にかけて起こる核小体の再形成に焦点を当てた。細胞分裂後に再開する rRNA 転写を阻害すると成熟した核小体構造が形成されないことから、核小体の再形成には rRNA 転写の再開が必要であることが示唆されている。しかし、rRNA 転写の再開を阻害しても一部の FBL や NCL は NOR に集合したことから、rRNA の再開に依存しない rRNA プロセッシング因子の集合も示唆された (Ochs et al., 1985; Dousset et al., 2000)。一方、核小体の構造制御に重要な候補因子として転写因子 UBF がある。UBF は rRNA 遺伝子の転写領域だけでなく遺伝子間領域の r-chromatin にも結合しており (O'Sullivan et al., 2002; Mais et al., 2005)、Pol I 転写装置や、t-UTPs などの rRNA 転写と rRNA プロセッシングをリンクする因子を NOR に集合させるのに重要であることが明らかとなっている (Prieto and McStay, 2007)。しかしながら、rRNA 転写の再開や UBF が、核小体の再形成にどのような分子機構で寄与しているかは不明である。また、核小体の崩壊については、B23 のように、Cyclin B/CDK1 による rRNA プロセッシング因子のリン酸化修飾が関わっている可能性が示唆されているが (Okuwaki et al., 2002)、その全容は明らかにされていない。

本章では、rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合は、核小体が観察されている間期でのみ認められ、核小体が消失する分裂期では、その結合は解消されていることが明らかとなった。つまり、核小体の構造が、rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合によって制御されていることが示唆された。さらに、この結合は rRNA 転写の再開に依存しないことが明らかとなり、rRNA プロセッシング因子は、rRNA 転写が再開する前に NOR に集合し r-chromatin と結合することが示唆された。一方、rRNA プロセッシング因子と r-

chromatin の結合に、UBF が必要だが十分ではないことが明らかとなり、UBF に加えて別の因子が重要であることが示唆された。また、UBF と rRNA プロセッシング因子が分裂期特異的なリン酸化修飾を受けており、このリン酸化修飾は、rRNA 転写の再開を阻害しても解除されることが明らかとなった。このことから、rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合に、分裂期特異的なリン酸化修飾が重要である可能性が示唆された。

1-2. 材料と方法

販売元の記載のない試薬は Nacalai Tesque 製のものを使用した。試薬を溶解するための超純水は、Milli-Q SP 純水製造装置 (Millipore) で、18.0 M Ω 以上のものを用いた。

1-2-1. 細胞培養、遺伝子または siRNA の導入、安定発現細胞株の確立、細胞同調

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞およびヒト骨肉腫細胞 U-2 OS 細胞は 10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) で培養した。U2OS 2-6-3 細胞は同じ培地に 50 μ g/mL hygromycin B (Invivogen) を加えたものを使用した。細胞がコンフルエントの 80-90% になったら継代操作を行った。古い培地を除去したのち、適当量 (100 mm dish の場合は 2 mL) の phosphate-buffered saline buffer (PBS) で細胞を洗浄した。PBS を除去し、適当量の 0.05% (w/v) trypsin/0.53 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を細胞全体に行き渡らせた。37°C の 5% CO₂ インキュベーター内に 5 分間処理した。Trypsin が効いていること (細胞が丸くなる) を確認したら、ディッシュに軽い衝撃を与えて細胞をディッシュの底から剥がした。適当量の血清入り培地を加え (trypsin の失活)、実験目的に合わせて適当量の細胞を継代した。

プラスミド DNA の遺伝子導入には GeneJuice (Novagen) を、small interfering RNA (siRNA) の導入には Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) を、それぞれ取扱説明書の方法に従って使用した。Negative control としての si RNA には Stealth RNAi siRNA Negative Control Med GC Stealth RNAi negative-control duplex を、UBF siRNA には UBTF-HSS111143 を、そして RRN3 siRNA には RRN3-HSS123162 (いずれも Invitrogen) をそれぞれ使用した。

GFP が融合した UBF1 を安定発現する HeLa 細胞を作成するため、pEGFP-N1-UBF1 ベクターを HeLa 細胞に導入し、G418 で選択培養し確立した。

細胞を G₂/M 期に同調する方法は以下の通りに行った。細胞を 2 mM thymidine (Sigma) を含む培地で 24 時間培養し、thymidine を含まない培地で 3 時間培養した後に、0.5 μ g/mL nocodazole (Sigma) を含む培地で 12 時間培養した。G₂/M 期で停止している細胞をディッシュに物理的衝撃を与えて回収した。

1-2-2. 抗体

本章で使用した抗体は以下の通りである。

マウスモノクローナル抗体: β -actin (C4, Santa Cruz Biotechnology), cyclin B1 (GNS1, Santa Cruz Biotechnology), digoxigenin (1.71.256, Roche), GFP (GF200, Nacalai Tesque), nucleolin (NCL) (D-6, Santa Cruz Biotechnology), nucleophosmin (B23) (FC-61991, Invitrogen; SPM207, Santa Cruz Biotechnology), RPA194 (C-1, Santa Cruz Biotechnology), FLAG (M2, Sigma)

ウサギポリクローナル抗体: dyskerin (DKC1) (H-300, Santa Cruz Biotechnology), fibrillarlin (FBL) (H-140, Santa Cruz Biotechnology), histone H3 (ab1791, Abcam), Nopp140 (H-80, Santa Cruz Biotechnology), phospho-histone H3 (Ser10) (Millipore), RRN3 (ab112052, Abcam), UBF (H-300, Santa Cruz Biotechnology)

1-2-3. 免疫沈降

細胞を Lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.9], 0.2 mM EDTA, 100 mM NaCl, and 0.1% [v/v] Triton X-100) に懸濁し、超音波処理し細胞溶解液を調製した。この溶解液に anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) を加え、4°C で 3 時間攪拌した。ビーズを Lysis buffer で洗浄し、SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10% [v/v] glycerol, 145 mM β -mercaptoethanol, and 2.5% [w/v] sodium dodecyl sulfate [SDS]) を加え、95°C で 5 分間処理した。なお、G₂/M 期に同調した細胞を用いる場合は、脱リン酸化酵素阻害剤 (10 mM β -glycerophosphate, 1 mM NaF, and 1 mM Na₃VO₄) を Lysis buffer に加えた。

1-2-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

泳動装置は Bio-Rad 製もしくは日本エイドー製のものを使用した。Resolving gel (X% T/3.3% C* acrylamide/bis, 375 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0.1% [v/v] SDS, 0.05% [v/v] ammonium persulfate [APS], and 0.08% [v/v] tetramethylethylenediamine [TEMED]) を固めた後に、Stacking gel (5% T/3.3% C* acrylamide/bis, 125 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.1% [v/v] SDS, 0.05% [v/v] APS, and 0.08% [v/v] TEMED) を上層しゲルを調製した。泳動バッファー (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, and 0.1% [v/v] SDS) を満たしたゲルに SDS sample buffer で処理したサンプルをロードし、120-150 V (定電圧) で泳動した。Acrylamide/bis 溶液は 30% T/3.3% C をストック溶液とし、目的に応じて総モノマー濃度を調節した。

Phos-tag SDS-PAGE は "Phos-tag PAGE ガイドブック第 3 版" (Wako) に従って行った。Resolving gel (6% T/3.3% C* acrylamide/bis, 375 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0.1% [v/v] SDS, 25

μM Phos-tag solution [Wako], 50 μM MnCl_2 , 0.05% [v/v] APS, and 0.08% [v/v] TEMED) を固めた後に、Stacking gel を上層しゲルを調製した。泳動条件は通常の SDS-PAGE と同様とした。

*%T: 総モノマー濃度 (総液量に対するアクリルアミドとビスの総重量の和の割合)

%C: 架橋度 (アクリルアミドとビスの総重量の和に対するビスの総重量の割合)

1-2-5. Western blotting

転写装置は Bio-Rad 製のものを用いた。SDS-PAGE 後のゲルを転写バッファー (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, and 15% [v/v] methanol) で室温で数分間洗浄した。洗浄したゲルを PVDF メンブレン (Immobilon, Millipore) の上に置き、濾紙、スポンジの順で挟みカセットにセットした。45 V で 30 分間、続けて 90 V で 60 分間電圧をかけ、タンパク質をメンブレンに転写した。転写後のメンブレンを 5% (w/v) fat-free milk (森永) と 0.1% (v/v) Tween-20 を含む Tris-buffered saline buffer (TBST) で室温で数分間振盪した (Blocking)。次に目的の一次抗体を 5% (w/v) fat-free milk/TBST に希釈した溶液でメンブレンを処理し (4°C で一晚)、TBST で振盪洗浄した。次に horseradish peroxidase (HRP) 標識された 2 次抗体 (GE Healthcare) を TBST で希釈した溶液でメンブレンを処理し (室温で 30 分間)、TBST で振盪洗浄した。以上の方法で処理したメンブレンを Chemi-Lumi One L で発光させ、撮影装置 Light Capture II (Atto) を使用して撮影した。Phos-tag SDS-PAGE で展開したゲルの場合は、ゲルに含まれている Mn^{2+} が転写効率を低下させるため、転写前に 10 mM EDTA を含む転写バッファーにゲルを浸し、室温での 10 分間振盪処理を 2 回行ってから転写を行った (Mn^{2+} の除去)。

1-2-6. クロマチン免疫沈降

$2-4 \times 10^6$ 個の HeLa 細胞を 1% (v/v) formaldehyde を含む培地に懸濁し、37°C で 10 分間処理した (固定)。1.5 M glycine を加え (終濃度 150 mM)、4°C で 5 分間攪拌した (架橋反応の停止)。固定した細胞を PBS で洗浄したのち、300 μL の SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.9], 10 mM EDTA, and 1% [v/v] SDS) に懸濁し、氷上で 5 分間静置した。懸濁液を超音波処理し、染色体 DNA を 200-500 bp に断片化した。この溶解液を 10 倍に希釈するため、2.7 mL の ChIP dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl [pH 7.9], 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 1.1% [v/v] Triton X-100, and 0.01% [v/v] SDS) を加え、1 サンプルに使用する溶解液

の 10% (v/v) 分を Input とした。目的の抗体を加え (終濃度 6 ng/μL)、4°C で一晩攪拌した。Negative control は、normal mouse IgG と normal rabbit IgG (いずれも Sigma) (それぞれ終濃度 3 ng/μL) を加えたサンプルとした。15 μL の 25% (v/v) slurry Protein A Sepharose (GE Healthcare) を加え、4°C で 30 分間攪拌した。上清を捨て、Low salt wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% [v/v] Triton X-100, and 0.1% [v/v] SDS)、High salt wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% [v/v] Triton X-100, and 0.1% [v/v] SDS)、LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.9], 1 mM EDTA, 0.25 M LiCl, 1% (v/v) deoxycholic acid sodium salt, and 1% [v/v] Nonidet P-40) の順にそれぞれ 4°C で 5 分間攪拌し洗浄した。最後に Tris-EDTA buffer (TE) で 2 回洗浄を行った。ビーズを 400 μL の Elution buffer (100 mM NaHCO₃, 1% [v/v] SDS, and 10 mM dithiothreitol [DTT]) に懸濁し、室温で 15 分間振盪した。上清を回収し、16 μL の 5 M NaCl を加え (終濃度 200 mM)、65°C で 5 時間処理した (脱架橋)。この際、Input (ChIP dilution buffer で 400 μL にメスアップしたもの) にも 16 μL の 5 M NaCl を加え同様に処理した。25 μL の Proteinase K 溶液 (640 mM Tris-HCl [pH 6.5], 160 mM EDTA, and 0.8 mg/mL proteinase K) を加え、42°C で 1 時間処理した。Phenol/Chloroform 抽出後、1 μL の 20 mg/mL glycogen を加えて Ethanol 沈殿を行い、沈降した DNA を 50 μL の 10 mM Tris-HCl (pH 7.9) に溶解した。

得られた DNA 溶液を用いて、ヒト rRNA 遺伝子 (GenBank accession U13369) の特異的な領域を定量 PCR にて定量した。定量 PCR には FastStart Universal Master (ROX) (Roche) を使用し、Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム (Life Technologies) にて定量した。使用したプライマーセットは表 1 に記載した。

表 1 PCR プライマーセット

領域 (nucleotide positions)	Forward primer	Reverse primer
1 (42960-11)	5'-tttcgctccgagtcggc-3'	5'-agcgtgcagcatataacccg-3'
2 (6626-6676)	5'-ctcttagcgggtgatcactcg-3'	5'-gctagctcgttcttcacga-3'
3 (12412-12442)	5'-agcgttgattgtcaccca-3'	5'-cggctaaaccagctcagc-3'
4 (15816-15923)	5'-acacacacaccccgtagt-3'	5'-gaaatggggcttcgatacat-3'
5 (21673-21773)	5'-cagtggtcactcgtctcat-3'	5'-cgcctgactccatttcgtat-3'
6 (30857-30907)	5'-ggcctaagcctgctgagaact-3'	5'-aagcatggtcccaggatc-3'
7 (36109-36160)	5'-atctctctctacgcggg-3'	5'-acgtgtgtcccagctcc-3'
8 (41087-41136)	5'-acgtttctgtacgcttatatgcaaa-3'	5'-aatgcagatacacgttctcg-3'

1-2-7. 間接蛍光抗体法、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

間接蛍光抗体法は以下の通りに行った。直径 15 mm のカバースリップ (Matsunami) 上に接着させた細胞を 1 または 3% (w/v) paraformaldehyde/PBS に浸し室温で 5-10 分間処理し (固定)、0.5% (v/v) Triton X-100/cytoskeleton buffer (10 mM PIPES-KOH [pH 7.0], 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, and 300 mM sucrose) に浸し室温で 10 分間処理した (透過)。次に目的の一次抗体を 0.1% (w/v) fat-free milk と 0.1% (v/v) Tween-20 を含む PBS (PBST) で希釈し全体積を 20 μ L とし、細胞が接着している面を上にしたカバースリップ上にスポットし、ラップで覆い、室温で 1 時間振盪した。次に蛍光色素標識された 2 次抗体 (Alexa Fluor 488 or 568 goat anti-mouse IgG antibody, Alexa Fluor 488 or 568 goat anti-rabbit IgG antibody, Invitrogen) を 0.1% (w/v) fat-free milk/PBST で希釈し全体積を 20 μ L とし、室温で 30 分間振盪した。TO-PRO-3 iodide (Invitrogen) を PBST で希釈し終濃度 5 μ M としたものをを用いて、室温で 10 分間振盪して DNA を染色した。

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) は "DIG Application Manual" (Roche) に従って行った。DNA を検出するための FISH 法は以下の通りに行った。カバースリップに接着させた細胞を 75% (v/v) methanol/25% (v/v) acetic acid に浸し-30°C で 15 分間処理した (固定・透過)。カバースリップを 0.5 μ g/mL proteinase K と 2 mM CaCl₂ を含む TBS に浸し室温で 5 分間処理した。75、90、そして 100% ethanol の順にそれぞれ室温で 5 分間処理した (脱水)。2 μ g の COT human DNA (Roche)、2 μ g の yeast tRNA (Roche)、そして 20 ng の digoxigenin でラベルされたヒト rRNA 遺伝子 DNA プローブを含む 10 μ L の probe solution (50% [v/v] formamide, 2 \times saline-sodium citrate buffer [SSC], and 10% [v/v] dextran sulfate) をスポットし、細胞が接着している面を下にしたカバースリップを被せ、水浴器にて 80°C で 5 分間処理した (熱変性)。その後、37°C で一晩処理した。digoxigenin で標識されたヒト rRNA 遺伝子 DNA プローブは BAC clone library (RP11-164K15) を鋳型とし、digoxigenin-11-dUTP (Roche) を用いて nick translation 法にて調製した。カバースリップを 0.1% (v/v) Tween-20 を含む 2 \times SSC (SSCT) で 42°C で 5 分間振盪し洗浄した。この操作を 3 回行った。抗 digoxigenin 抗体 (1.71.256, Roche) を希釈した 0.1% (w/v) fat-free milk/4 \times SSCT をスポットし、室温で 1 時間振盪した。次に蛍光色素標識された 2 次抗体 (Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG antibody, Invitrogen) を希釈した 0.1% (w/v) fat-free milk/4 \times SSCT をスポットし、室温で 30 分間振盪した。DNA は TO-PRO-3 iodide で染色した。RNA を検出するための FISH 法は以下の通りに行った。カバースリップ上に接着させた細胞を 3% (w/v)

paraformaldehyde/PBS に浸し室温で 10 分間処理し、0.5% (v/v) Triton X-100/cytoskeleton buffer に浸し室温で 10 分間処理した。75、90、そして 100% ethanol の順にそれぞれ室温で 5 分間処理した。5 μ g の yeast tRNA、そして 100 ng の biotin でラベルされたヒト rRNA 遺伝子 5'-ETS、ITS1、ITS2、そして 28S rRNA あるいはヒト U3 snoRNA 遺伝子配列をから成る RNA プローブを含む 10 μ L の probe solution をスポットし、細胞が接着している面を下にしたカバースリップを被せ 37°C で一晩処理した。biotin で標識されたヒト rRNA 遺伝子 RNA プローブは以下の通りに調製した。T3 または T7 RNA polymerase プロモーターを結合させた 5'-ETS (GenBank accession U13369; nucleotide positions 929 to 1445)、ITS1 (nucleotide positions 6450 to 6500)、ITS2 (nucleotide positions 6879 to 7027)、28S rRNA (nucleotide positions 9984 to 10246)、そして U3 snoRNA (GenBank accession X14945; nucleotide positions 1 to 217) を PCR 法にて増幅した。それらを鋳型に biotin-16-UTP (Roche) と T3 (Roche) または T7 RNA polymerase (Toyobo) を用いて biotin で標識されたヒト rRNA 遺伝子 RNA プローブを調製した。カバースリップを 2 \times SSCT で洗浄後、蛍光色素標識された streptavidin (Alexa Fluor 568-conjugated streptavidin, Invitrogen) を希釈した 0.1% (w/v) fat-free milk/4 \times SSCT をスポットし、室温で 30 分間振盪した。DNA は TO-PRO-3 iodide で染色した。

すべての画像は共焦点レーザスキャン顕微鏡 (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss) を用いて撮影した。画像処理にはソフトウェア ZEN 2009 (Carl Zeiss) を使用した。

1-2-8. プラスミド DNA の構築

pEGFP-C1-LacI-UBF1 ベクターを構築するために、pET-Duet ベクター (Novagen) から lac repressor (LacI) を PCR 法にて増幅し、pEGFP-C1 ベクター (Clontech) の BglII/SalI サイトに連結させた。human UBF1 cDNA は pEGFP-C1 ベクターの KpnI/XbaI サイトに連結させた。組み込んだ遺伝子の塩基配列は、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を使用し、Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザ (Life Technologies) にて変異がないことを確認した。

1-3. 結果

1-3-1. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合は、間期で検出され、分裂期で解消される。

核小体構造が間期で維持され、分裂期で崩壊する分子機構を解明するために、核小体タンパク質と NOR の相互作用に着目した。核小体の中心核である NOR と相互作用できる核小体タンパク質として候補となるのが、リボソーム生合成に関わる因子である。そこで、rRNA 転写、rRNA プロセッシング、そしてリボソームアセンブリーに関わる代表的な 7 つの核小体タンパク質に焦点を当てた。rRNA 転写そして r-chromatin の構造制御に関わる因子 (UBF と Pol I サブユニット RPA194)、rRNA 転写と rRNA プロセッシングをリンクする因子 (Nopp140)、rRNA 修飾因子 (DKC1 と FBL)、そしてリボソームアセンブリーのほか、rRNA 転写や rRNA プロセッシングにも関わる因子 (B23 と NCL) である。これまでの研究から、FBL、B23、そして NCL がヒストン H3 と結合することが明らかとなっており、間期で検出された B23 とヒストン H3 の結合が G₂/M 期に同調した細胞では減少し、同調を解除すると分裂期の細胞が減少するとともにその結合が回復することが明らかとなった (図 7; 上島州平, 2007)。この結果から、B23 をはじめとする核小体タンパク質と r-chromatin の結合は、分裂期では減少し間期にかけて回復することが示唆された。非同調の HeLa 細胞および G₂/M 期に同調した HeLa 細胞を用いてクロマチン免疫沈降を行った。細胞を G₂/M 期に同調すると (図 8A)、リン酸化型 B23 が検出されたことから、細胞が G₂/M 期に同調されたことを確認した (図 8B)。クロマチン免疫沈降は上述の 7 つのタンパク質に対する抗体を用いて行った (図 8C)。非同調細胞において、UBF は rRNA 遺伝子のプロモーター領域に多く結合していたが、転写領域および遺伝子間領域にも結合した。この結果は、これまでの報告と一致する (O'Sullivan et al., 2002; Zentner et al., 2011)。RPA194 はプロモーター領域や転写領域に多く結合したことから、非同調の細胞では rRNA 転写活性が高いことが示唆された。Nopp140、DKC1、そして FBL は転写領域に多く結合した。一方、B23 や NCL は、これまでの報告と同様に rRNA 遺伝子の全域に結合した (Murano et al., 2008; Cong et al., 2012)。G₂/M 期同調細胞において、UBF は r-chromatin との結合が検出されたが、その結合量は非同調細胞と比較して約半分減少した。対照的に、RPA194 は r-chromatin との結合が解消された。この結果は、これまでの報告と同様に、一部の Pol I サブユニットが前中期に NOR から解離することと一致する (Chen et al., 2004; Leung et al., 2004)。Nopp140、DKC1、そして FBL と r-chromatin の結合もまた減少した。B23 や NCL と r-chromatin の結

合も減少し、B23の結果はこれまでの報告と一致した (Hisaoka et al., 2010)。以上の結果より、Pol I や rRNA プロセッシング因子は、分裂期では r-chromatin から解離することが明らかとなった。さらに、Nopp140、DKC1、そして FBL が rRNA 転写活性の高い転写領域に多く結合したことから、rRNA プロセッシングに関連する因子が、rRNA 転写に依存して r-chromatin に結合することが示唆された。

1-3-2. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合には、G₁ 期初期における rRNA 転写の再開が必要ではない。

rRNA プロセッシング因子である FBL や Nop52 が、分裂期から間期にかけて NOR (と思われる場所) に集合する様子が生細胞で観察されており (Dundr et al., 2000; Savino et al., 2001)、そして rRNA 転写は分裂期の終期に再開すること (Roussel et al., 1996) が明らかとなっている。先の結果から、rRNA プロセッシングに特に関連する因子 (Nopp140、DKC1、そして FBL) は rRNA 遺伝子の転写領域に多く結合した (図 8D)。従って、分裂期から間期にかけて rRNA プロセッシング因子が NOR へ再集合するには、分裂後の rRNA 転写の再開が必要であることが示唆された。rRNA 転写の再開を阻害させた際の間接蛍光抗体法による解析はこれまでも報告されている。それによると、rRNA 転写の再開を阻害すると、成熟した核小体構造は形成されないものの、FBL や NCL は、UBF が局在している場所に局在することが明らかとなっている (Dousset et al., 2000)。この時、UBF が局在している場所には、GC 領域と DFC 領域が分離したような小さな核小体 (segregated mini-nucleoli; ミニ核小体) が形成されることが電子顕微鏡撮影により観察されている。さらに、NCL はミニ核小体以外の焦点にも局在し、PNB を形成していることが示唆された。そこで次に、rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合における rRNA 転写の再開の必要性について検討した。分裂後の rRNA 転写の再開を阻害するために、以下の方法で細胞を処理した。図 8A と同様に細胞を G₂/M 期に同調した。G₂/M 期同調を解除する 1 時間前から 0.05 µg/mL actinomycin D (Act D) 存在下で培養し、解除後も同濃度の Act D 存在下で 3 時間培養した。この処理によって、同調されたすべての細胞は rRNA 転写の再開が阻害され、G₁ 期初期で停止する (Dousset et al., 2000)。Act D は低濃度下では Pol I による転写のみを阻害する低分子阻害剤である。そして、Act D 存在下で G₂/M 期同調を解除して 3 時間後の NOR および核小体タンパク質の細胞内局在を FISH 法および間接蛍光抗体法にて検出した (図 9A)。UBF は NOR (rRNA 遺伝子) と共局在し、RPA194 は UBF と共局在した。このことから、

分裂期に r-chromatin から解離していた Pol I は、rRNA 転写の再開を阻害しても NOR に再集合し、r-chromatin と再結合することが示唆された。Nopp140、DKC1、そして FBL は Act D 存在下でもミニ核小体に集合し、UBF と部分的に共局在した。一方、B23 と NCL はミニ核小体だけでなく、PNB にも局在したが、UBF とは共局在しなかった。そして、ミニ核小体や PNB には、5'-ETS、ITS1、ITS2、そして 28S rRNA の配列を含む rRNA 前駆体 (rRNA も存在するかもしれない) と U3 snoRNA も局在した (図 9B と C)。ただし、rRNA 前駆体は UBF とは共局在せず、B23 と大部分が共局在したことから、rRNA プロセッシング因子とは共局在しないことが示唆された。一方で、U3 snoRNA もミニ核小体に局在したが、B23 よりも rRNA プロセッシング因子が存在する領域に局在することが示唆された。以上の結果より、rRNA 転写の再開を阻害しても、核小体の FC、DFC、そして GC 領域の構造は形成されることが示唆された。また、rRNA 転写の再開を阻害しても、B23 や NCL は rRNA 前駆体と、rRNA プロセッシング因子 (FBL) は U3 snoRNA とそれぞれ RNP を形成し、GC や DFC 領域をそれぞれ形成することが示唆された。また、Act D 存在下では rRNA の新規合成は行われないため、rRNA 転写の再開を阻害した G₁ 期初期の細胞に見られる rRNA 前駆体は、前の細胞周期の間期に合成されたものが分裂期中も残っているものと考えられた。

次に、rRNA 転写の再開を阻害した際に細胞内局在で観察されたミニ核小体が、核小体タンパク質と r-chromatin の結合の回復を反映しているかと検討するために、クロマチン免疫沈降を行った (図 9D)。UBF と r-chromatin の結合は Act D 非存在下と比較して変化が認められなかった。一方、RPA194 と r-chromatin の結合は Act D 非存在下ではプロモーター領域や転写領域で回復したが、Act D 存在下ではプロモーター領域に蓄積が認められ、転写領域では減少した。Nopp140、DKC1、そして FBL と r-chromatin の結合は、UBF と同様に、Act D 存在下でも r-chromatin との結合は回復した。さらに、B23 と NCL は、Act D 存在下でその一部が PNB に局在したことから r-chromatin との結合の減少が予想されたが、予想に反し、Act D 非存在下と比較して変化が認められなかった。以上の結果より、UBF や rRNA プロセッシング因子は、分裂後の rRNA 転写の再開より前に NOR に集合し、r-chromatin と結合することが示唆された。一方で、成熟した核小体構造を形成するためには rRNA 転写の再開は必要であることも明らかとなった。

1-3-3. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合における、転写因子 UBF の役割

先の結果より、rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合を制御している因子の実態は rRNA 転写ではないことが示唆された (図 9D)。そこで、他の候補因子として rRNA 転写の特異的転写因子である UBF に着目した。Mais らは、pseudo-NORs と呼ばれる *Xenopus* rRNA 遺伝子の一部を内在性の NOR とは異なる染色体領域に組み込んだヒト線維肉腫細胞 HT1080 細胞株を作成し、内在性の UBF が pseudo-NORs に結合することを見出した (Mais et al., 2005)。さらに同研究グループは、Pol I サブユニットや Nopp140、TCOF1、そして t-UTPs が UBF 依存的に pseudo-NOR に集合することを明らかにした (Prieto and McStay, 2007)。加えて、我々の研究グループによって、B23 が UBF 依存的に r-chromatin と結合することが明らかとなった (Hisaoka et al., 2010)。以上の報告より、UBF が rRNA プロセッシング因子の NOR への集合に関与することが示唆された。次の実験では、UBF だけでなく、同じく Pol I 転写装置の一部である RRN3 による rRNA プロセッシング因子の NOR への集合についても検討した。RRN3 は SL1 複合体を介して Pol I を rRNA 遺伝子のプロモーター領域に結合させるのに必要であることが *in vitro* の実験から明らかとなっている (Miller et al., 2001)。HeLa 細胞に UBF あるいは RRN3 siRNA を導入し、クロマチン免疫沈降を行った。先の実験で用いた rRNA プロセッシング因子は、rRNA 遺伝子のプロモーター領域から転写領域にかけて多く結合しているため、r-chromatin との結合はこれらの領域のみ (図 8C、領域 1-3) を検討した。UBF あるいは RRN3 siRNA を導入して 72 時間後の UBF および RRN3 の発現量は、それぞれ減少していることが確認された。一方で、 β -actin や B23 の発現量は、UBF あるいは RRN3 siRNA の影響を受けないことが確認された (図 10A)。また、UBF と r-chromatin の結合は UBF siRNA 導入下では減少したが、RRN3 siRNA 導入下では影響を受けないことも確認された (図 10B)。RPA194 は UBF あるいは RRN3 をノックダウンしたいずれの場合でも r-chromatin との結合が減少した。この結果から、細胞内において、Pol I の rRNA 遺伝子のプロモーター領域への結合は UBF や RRN3 を介して行われることが示唆された。一方、Nopp140、DKC1、そして FBL と r-chromatin の結合は、UBF をノックダウンした細胞では、大きく減少することが明らかとなった。これらの減少は RRN3 をノックダウンした場合でも rRNA 遺伝子のプロモーター領域でわずかに認められたが、その程度は UBF をノックダウンした場合よりも小さかった。B23 と r-chromatin の結合は、これまでの報告と同様に、UBF をノックダウンすると減少したが (Hisaoka et al., 2010)、RRN3 をノックダウンしても変化しなかった。一方、NCL と r-

chromatin の結合は、UBF あるいは RRN3 をノックダウンしたいずれの場合でも変化しなかった。このことは、NCL は他の RNP とは異なる機構で r-chromatin と結合することを示唆している。以上の結果より、UBF は rRNA プロセッシング因子 (Nopp140、DKC1、そして FBL) を NOR に集合させるために必要であり、RRN3 にはその活性はないことが明らかとなった。このことは、UBF が rRNA 転写を活性化させる転写因子としての機能とは別の機能に由来することが示唆された。

1-3-4. UBF は、rRNA プロセッシング因子が r-chromatin に結合するためには十分ではない。

先の結果より、rRNA プロセッシング因子は、rRNA 転写が行われていない NOR に集合するが (図 9)、UBF の存在しない NOR には集合しないことが明らかとなった (図 10)。では rRNA 転写が行われなく、かつ UBF の存在する場所には rRNA プロセッシング因子は集合するかという疑問が残った。つまり、UBF は rRNA プロセッシング因子が NOR へ集合するための十分条件を満たすかという疑問である。先に紹介した Prieto と McStay の報告では、U3 snoRNA や DKC1、U3-55K といった snoRNP は、pseudo-NORs には集合しなかった (Prieto and McStay, 2007)。このことを別の実験系で確かめるために、Lac オペレーター (LacO) 配列が内在性の NOR とは異なる染色体領域 (第 1 番目染色体短腕部) に組み込まれた U-2 OS 細胞株 (U2OS 2-6-3 細胞) (Janicki et al., 2004) を用いて、この細胞に Lac リプレッサー (LacI) が融合した UBF を導入することで、rRNA 転写が行われない染色体領域に UBF を局在させた。GFP と LacI が融合した UBF1 を U2OS 2-6-3 細胞に導入し、42 時間後に間接蛍光抗体法にて GFP-LacI-UBF1 と核小体タンパク質の細胞内局在を検出した (図 11)。GFP-LacI-UBF1 は核小体と LacO サイトに局在した。RPA194 と Nopp140 は LacO サイトに局在した。一方で、DKC1、FBL、B23、そして NCL は LacO サイトには局在しなかった。これらの結果から、これまでの報告と同様に (Prieto and McStay, 2007)、UBF は rRNA プロセッシング因子が NOR へ集合するための十分条件を満たさないことが示唆された。

1-3-5. rRNA 前駆体は、rRNA プロセッシング因子が NOR へ集合するための UBF に次ぐ因子となる可能性がある。

これまでの結果をまとめると、1) rRNA プロセッシング因子は、rRNA 転写が再開する前に NOR に集合するが、2) この集合には UBF が NOR に局在していることが必要であり、3) そのためには UBF だけでは不十分である、ことが示唆された。このことから、rRNA プロセッシング因子が NOR に集合するためには、UBF に加えて別の因子が NOR に局在していることが必要だと推測した。そこで、候補となる因子には以下の 3 点の性質が必要であると考えた。それは、1) rRNA プロセッシング因子と相互作用すること、2) rRNA 転写の再開には依存せず、NOR に局在していること、そして 3) pseudo-NORs などの異所局在性の UBF とは共局在しないこと、である。これらの条件をすべて満たす因子として rRNA 特に rRNA 前駆体を想定した。この理由としては、rRNA 前駆体がミニ核小体に局在していたこと (図 9)、pseudo-NORs には転写活性がないこと (Mais et al., 2005)、そして U2OS 2-6-3 細胞の LacO サイトでは転写誘導はされていない (テトラサイクリンで転写誘導できるコンストラクトである [Janicki et al., 2004]。) こと (図 11) が挙げられた。そこで、次の実験では、分裂期から間期にかけての rRNA 前駆体の細胞内局在を追跡した。GFP が融合した UBF1 を安定発現する HeLa 細胞を用いて、前期および終期における UBF1-GFP および rRNA 前駆体の細胞内局在を FISH 法にて検出した (図 12)。前期において UBF1-GFP は、凝縮した染色体上の蛍光強度の高い焦点で示された NOR だけでなく、染色体周辺部にも局在することが明らかとなった。このことは、図 8 において、一部の UBF は分裂期では NOR から解離していることに一致した。また、rRNA 前駆体は、前期では染色体周辺部の UBF1-GFP と共局在し、NOR での局在は検出されなかったが、終期では、NOR に局在した。ここで検出された rRNA 前駆体は、分裂後に産生された転写産物である可能性がある。しかし、rRNA 転写の再開を阻害した際の G₁ 期初期において、rRNA 前駆体はミニ核小体に局在した (図 9B と C)。これらの結果より、分裂期に持ち越された rRNA 前駆体は、分裂期前期には NOR から解離し、rRNA 転写の再開より前に少なくとも一部が NOR に再集合することが示唆された。

1-3-6. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合の脱着には、分裂期における rRNA プロセッシング因子のリン酸化修飾が重要である可能性がある。

分裂期を特徴付けているものは Cyclin B/CDK1 の活性化である (Fisher et al., 2012)。核小体は分裂期で消失するが、この原因は明らかとなっていない。核小体に豊富に存在するタンパク質の一つである B23 は、分裂期において Cyclin B/CDK1 によってリン酸化され、それにより RNA 結合活性が低下する (Peter et al., 1990a; Okuwaki et al., 2002)。そして、この RNA 結合活性の低下が、B23 を核小体から解離させる (Hisaoka et al., 2010)。これらの報告から、核小体タンパク質の中には、核酸との結合に依存して核小体に局在しているものがあることが示唆された。図 8 と図 12 より、分裂期において一部の UBF は NOR から解離し、染色体周辺部に局在することが示唆された。そこで、細胞周期を通じた UBF のリン酸化状態を検討した。UBF1-GFP を安定発現する HeLa 細胞を図 9 と同様に Act D 非存在下あるいは存在下で G₂/M 期に同調し、同調を解除して 0、3、6、9、そして 12 時間後にそれぞれ細胞を回収した。コントロールとして、Act D 処理をしていない非同調の同細胞を用いた。非同調細胞 (図 13、レーン 1 と 12)、Act D 処理をしなかった細胞 (図 13、レーン 2-6 と 13-17) と Act D 処理をした細胞 (図 13、レーン 7-11 と 18-22) から細胞溶解液を調製した。細胞溶解液を Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE または通常の SDS-PAGE で展開後、UBF および rRNA プロセッシング因子を検出した。Phos-tag SDS-PAGE では、リン酸化型のタンパク質は非リン酸化型に比べ移動度が小さくなる。Cyclin B1 の発現量は分裂期で高いことから、G₂/M 期同調細胞は Act D 処理の有無に関わらず、同調を解除して 3 時間後以降は間期であることが確認された。UBF および UBF1-GFP は分裂期特異的なリン酸化型が存在することが明らかとなった (図 13、レーン 2 と 7、黒矢印)。さらに、G₁ 期特異的なリン酸化型 UBF も検出され、時間の経過につれて非同調細胞で検出されたバンドに集約していく様子が観察された (図 13、レーン 1、3-6、そして 8-11)。Nopp140 および FBL は分裂期特異的に単一のリン酸化型が検出された (図 13、レーン 2 と 7、黒矢印)。また、B23 および NCL は分裂期特異的に複数のリン酸化型が検出された (図 13、レーン 13 と 18、黒矢印)。一方、DKC1 では分裂期特異的なリン酸化型は検出されなかった。以上の結果より、UBF や、DKC1 を除く rRNA プロセッシング因子は分裂期特異的なリン酸化修飾を受けることが明らかとなり、この修飾が分裂期における r-chromatin からの解離に関与している可能性が示唆された。

1-4. 考察

1-4-1. rRNA プロセッシング因子が r-chromatin に結合することの生物学的意義

本研究の1つ目の発見は、rRNA プロセッシング因子 (Nopp140、DKC1、そして FBL) が転写活性のある転写領域の r-chromatin に結合したことである (図 8)。box H/ACA snoRNP と box C/D snoRNP の両方が、初期転写産物に空間的にアクセスしやすい r-chromatin に結合することは、機能の点から合理的である。データとして示したのは DKC1 と FBL のみだが、他の snoRNP についても r-chromatin と結合することが示唆されている (データ示さず)。また、snoRNP が転写活性のある転写領域に多く結合したことは、rRNA 前駆体のプロセッシングが転写と協調的であることを強く示唆している。このことは、出芽酵母において、U3 snoRNP や t-UTPs を含む SSU processome が rRNA 転写と rRNA プロセッシングをリンクしていることから信憑性がある (Gallagher et al., 2004)。一方、Nopp140 も snoRNP (DKC1 と FBL) と同じように r-chromatin と結合したことも興味深い。なぜなら、Nopp140 は box H/ACA snoRNP と box C/D snoRNP の両方の分子シャペロンであること (Meier and Blobel, 1994; Yang et al., 2000)、Pol I と結合すること (Chen et al., 1999)、そして U3 snoRNP の成熟に関与すること (Watkins et al., 2004) が示唆されているからである。それゆえ、Nopp140 は rRNA 転写と rRNA プロセッシングの足場 (scaffold) として機能することが示唆される。また、B23 や NCL が r-chromatin と結合したが、これはリボソームアセンブリ一因子としてよりは、r-chromatin の構造制御因子として機能している可能性がある (Hisaoka et al., 2010; Cong et al., 2012)。

1-4-2. rRNA プロセッシング因子が分裂期に r-chromatin から解離し、G₁ 期初期に再集合する分子機構

本研究の2つ目の発見は、間期で r-chromatin に結合していた rRNA プロセッシング因子が、分裂期で r-chromatin から解離したことである (図 8)。このことは、分裂期での核小体構造の崩壊を引き起こす原因と考えられる。さらに、FBL、Nopp140、B23、そして NCL が分裂期特異的にリン酸化されたことが明らかとなった (図 13)。このことは、B23 の場合 (結果 1-3-6) と同様に、分裂期特異的なリン酸化が r-chromatin からの解離の原因の一つである可能性がある。NCL については、B23 と同様に Cyclin B/CDK1 によってリン酸化されることが報告されており、NCL に含まれる RNA 結合領域が NCL の核小体局在に必要なことも明らかとなっている (Belenguer et al., 1990; Peter et al., 1990a; Creancier et al., 1993)。

しかし、NCL の Cyclin B/CDK1 によるリン酸化部位に変異を導入し、リン酸化されない変異体を細胞に発現させても、その細胞内局在は野生型と変化がなかったという報告 (Dimario, 2004) があるように、Cyclin B/CDK1 によるリン酸化が NCL の核小体からの解離に寄与するかは不明である。また、Nopp140 も分裂期特異的なリン酸化修飾を受けることが報告されているが、その機能についてはまったく明らかではない (Pai et al., 1995)。同様に、分裂期同調細胞を用いた網羅的な質量分析により、DKC1 や FBL も分裂期にリン酸化されることが示唆されているが、その実態は明らかではない (Dephoure et al., 2008; Olsen et al., 2010)。分裂期における rRNA プロセッシング因子のリン酸化と核小体構造の崩壊との因果関係については、今後の課題とする。

一方、rRNA プロセッシング因子 (Nopp140、DKC1、そして FBL) が分裂期に r-chromatin から解離することは、分裂期において rRNA 転写や rRNA プロセッシングが停止することからも合理的である。さらに、それらの因子が rRNA 転写の再開を阻害しても G₁ 期初期に r-chromatin と再び結合したこと (図 9) から、rRNA プロセッシング因子が r-chromatin と結合するための駆動力は、rRNA 転写による rRNA 前駆体の新規合成ではないことが示唆される。また、出芽酵母において、精製した Pol I に細胞溶解液から分画した rRNA プロセッシング活性を有する画分を加えると、rRNA 転写活性が上昇することが *in vitro* の実験から明らかとなっていること (Fath et al., 2000) から、rRNA 転写の再開より前に rRNA プロセッシング因子が r-chromatin に結合することがその後の rRNA 転写の再開や rRNA プロセッシングの開始に重要である可能性を示唆している。

本研究の 3 つ目の発見は、rRNA プロセッシング因子が r-chromatin と結合するには UBF が必要であることである (図 10)。このことが、単純に rRNA 転写に依存しているからであるという可能性は、RRN3 をノックダウンした結果により否定された。つまり、UBF または RRN3 のいずれをノックダウンした場合でも、RPA194 と r-chromatin の結合は減少したからである。UBF が rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合を正に制御しているという結果は、UBF が転写因子としてだけでなく、核小体構造の制御をも担っていることを示唆している (後述)。さらに、LacO-LacI システムを利用して UBF を NOR 以外の染色体領域に局在させても、rRNA プロセッシング因子と異所性 UBF の共局在は認められなかったこと (図 11) から、rRNA プロセッシング因子を NOR に呼び込むには、UBF に加えて第 2 の因子が必要であることも示唆された。この第 2 の因子が、Nopp140 などの rRNA 転写と rRNA プロセッシングをリンクする因子であるという可能性は否定された (図 11)。

一方、分裂期に持ち越された rRNA 前駆体は、前期には NOR に局在しなかったが、染色体周辺部において UBF と共局在し (図 12)、rRNA 転写の再開を阻害しても、ミニ核小体に局在した (図 9B と C)。分裂期前期では、r-chromatin から解離した UBF と分裂期に持ち越された rRNA 前駆体は、染色体周辺部に局在し、rRNA 転写が再開する前に NOR に集合する可能性が示唆される。このことから、分裂期に持ち越された rRNA 前駆体が UBF に次ぐ第 2 の因子と推測される。つまり、UBF と rRNA 前駆体の両方が r-chromatin に存在することが、rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合に必要であると推測される。この推測は、5'-ETS 領域を含む rRNA 遺伝子配列を組み込んだプラスミド DNA を HeLa 細胞に顕微注入すると、外因性の rRNA 前駆体依存的に FBL や U3 snoRNA がプラスミド DNA 上に集合したことから支持される (Kopp et al., 2007)。

1-4-3. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合における UBF の機能

本研究の 4 つ目の発見は、NCL を除く rRNA プロセッシング因子は、UBF 依存的に r-chromatin と結合したこと (図 10) である。その一方で、異所性の UBF には rRNA プロセッシング因子を集合させる機能はなかった (図 11)。このことは、rRNA プロセッシング因子が UBF とのタンパク質間相互作用によって NOR に集合するわけではないということを示唆している。UBF は、rRNA 遺伝子のプロモーター領域付近が最も結合量が多いが、遺伝子の全域に渡っても分布している (O'Sullivan et al., 2002; Mais et al., 2005)。プロモーター領域付近の UBF は転写開始複合体の形成には寄与していると考えられるが、UBF には他の機能があることが示唆されている。つまり、enhanceosome と呼ばれる転写活性に必要な DNA のループ構造を形成する機能 (Bazett-Jones et al., 1994) や染色体を脱凝縮させる機能 (Chen et al., 2004)、そしてヘテロクロマチン構造を誘導するヒストン H1 をクロマチンから解離させる機能 (Kermekchiev et al., 1997) が報告されている。さらに、UBF の発現量が転写活性のある r-chromatin の量を規定していることも明らかとなっている (Sanij et al., 2008)。これらの報告から、UBF は r-chromatin に結合することで r-chromatin をオープンな状態に保ち、rRNA プロセッシング因子が r-chromatin にアクセスしやすくしていると考えられる。分裂期においても、UBF は NOR に残っていることから、転写が行われていない分裂期においても UBF の結合している r-chromatin はオープンな構造を保っていると考えられる。しかしながら、UBF によるオープンなクロマチン構造だけでは rRNA プロセッ

シング因子を呼び込むには不十分であり (図 11; Chen et al., 2004)、UBF に次ぐ第 2 の因子が必要であることは明らかである。

また、本研究により、UBF が分裂期特異的なリン酸化修飾を受けることが明らかとなった。この意義については、まだ解析を始めていないが、分裂期に一部の UBF が r-chromatin から解離したことに関係があるかもしれない。UBF のリン酸化修飾については、Cyclin D/CDK4 (G₁ 期) や Cyclin E or A/CDK2 (G₁/S 期あるいは S 期) によるリン酸化の機能は、転写開始複合体の形成や Pol I の活性化に寄与していることが報告されている (Voit et al., 1999; Voit and Grummt, 2001) が、Cyclin B/CDK1 (分裂期) によるリン酸化の機能はまったく報告されていない。分裂期における UBF のリン酸化と rRNA プロセッシング因子の r-chromatin からの解離との因果関係については、これから明らかにする予定である。

1-4-4. G₁ 期初期における 2 段階の核小体形成機構 (図 14)

本研究の 5 つ目の発見は、rRNA 転写の再開を阻害すると成熟した核小体構造は形成されないにもかかわらず、この時の rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合量は、rRNA 転写の再開を阻害しなかった場合と変化がなかったことである。このことから、G₁ 期初期における核小体形成機構は、2 段階に分けて行われることが示唆された。Dousset らは、Act D で処理した分裂期の細胞は、ミニ核小体と PNB が存在する状態で G₁ 期初期に停止することを見出し、rRNA プロセッシング因子は rRNA 転写の再開には依存せずに NOR に集合することを提唱した (Dousset et al., 2000)。彼らが検討した核小体 RNP は FBL と NCL のみだったが、本研究ではそれらに加えて、DKC1、Nopp140、そして B23 も検討し、DKC1 と Nopp140 は FBL と同様にミニ核小体のみ、B23 は NCL と同様にミニ核小体と PNB に局在することが明らかとなった。これが、核小体形成の第一段階と言える。つまり、核小体形成の第一段階は、rRNA 転写の再開より前に完了することが示唆された。一方、rRNA プロセッシング因子の分裂期特異的なリン酸化が示唆され、かつこれらのリン酸化修飾は rRNA 転写の開始を阻害しても解除されたこと (図 13) から、分裂期において rRNA プロセッシング因子が r-chromatin から解離する原因の一つとして、rRNA プロセッシング因子のリン酸化修飾が挙げられた。一方、Sirri らは、分裂期細胞を CDK 阻害剤 roscovitine で処理することで、rRNA 転写は回復するが、rRNA プロセッシングは回復せず、核小体構造は再形成されないことを見出した (Sirri et al., 2000)。さらに、分裂期同調した細胞を roscovitine 存在下で同調を解除したところ、細胞は G₁ 期初期で停止し、成熟した

核小体構造は形成されなかった (Sirri et al., 2002)。このことから、核小体構造が再形成されるためには、G₁期における CDK の活性化も必要であることが示唆される。

B23 や NCL はミニ核小体と PNB の両方に局在し、rRNA 前駆体はミニ核小体と PNB の両方の B23 と共局在した (図 9A-C)。そして、r-chromatin と結合する B23 や NCL の量はミニ核小体と成熟した核小体とではほとんど差がなかった (図 9D)。これらの結果から、B23 や NCL には r-chromatin に結合するものと、そうでないものの少なくとも 2 種類が存在することが示唆される。これは、クロマチン構造を制御するもの (Hisaoaka et al., 2010; Cong et al., 2012) が前者で、リボソームアセンブリーや後期 rRNA プロセッシングに関わるものが後者であるという可能性が考えられる。また、PNB に残っている rRNA 前駆体は、その後プロセッシングを受けると思われる (Carron et al., 2012)。そして rRNA 転写が再開し、大量の rRNA 前駆体が新規に合成されると、PNB に残っていた B23 や NCL も NOR に集合し、GC 領域を形成すると考えられる。これが、核小体形成の第二段階と言える。このようにして、分裂期から間期にかけて起こる核小体の再形成は、rRNA 転写の再開前の第一段階と、再開後の第二段階に分けて行われることが強く示唆される。

第二章

核小体クロマチン構成因子 Nopp140 の機能解析

2-1. 緒言

現在までに、核小体には 4700 種以上のタンパク質が含まれていることがプロテオーム解析により明らかとなっている (Ahmad et al., 2009)。しかし、その大半は核小体での機能が解析されていない。第一章では、核小体構造が、rRNA プロセッシング因子と転写因子 UBF によって制御されることを議論した。本章では、核小体構造を制御する因子を新たに同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。核小体構造を制御する因子を定義するにあたり、以下の 2 点を設定した。すなわち、1) NOR を特異的に認識し、r-chromatin と相互作用すること、そして 2) rRNA プロセッシング因子を NOR に集合させるため rRNA プロセッシング因子と相互作用すること、である。そこで、r-chromatin と結合する核小体タンパク質を同定するため、HeLa 細胞から単離した核小体を塩酸抽出し、抽出されたタンパク質を、液体クロマトグラフィー質量分析を用いて同定した。そして、比較的高い塩酸濃度で抽出された核小体タンパク質を複数同定した。その中から分子シャペロンとして知られる Nopp140 が同定された。

Nopp140 は、出芽酵母からヒトに至るまで進化的に広く保存されたタンパク質である (図 17A)。最初に発見されたのはアフリカツメガエル Nopp140 (xNopp140) で、核小体に豊富に存在するタンパク質として同定された (Schmidt-Zachmann, et al., 1984)。その後、細胞質と核を往復する因子としてラット Nopp140 が同定され (Meier and Blobel, 1990)、その塩基配列に類似している遺伝子としてヒト Nopp140 は同定された (Nomura et al., 1994)。Nopp140 の機能に関する研究は、出芽酵母における Nopp140 のオルソログ Srp40 の欠損体を用いたことに始まる。Srp40 に関する主な報告は、Srp40 欠損体は野生型に比べ細胞増殖速度は遅くはなるが、致命的ではないこと (Meier, 1996)、box C/D snoRNA の安定性には影響ないが、box H/ACA snoRNA の安定性を減少させること (Yang et al., 2000) がある。一方、ヒト Nopp140 については、核小体のほかに、核内構造体 Cajal ボディにも局在することが明らかになっており (図 17B; Isaac et al., 1998)、例えば U3 snoRNP の核質 (おそらく Cajal ボディ) から核小体へのアセンブリーに関与していることが示唆された (Watkins et al., 2004) など、Cajal ボディと核小体を往復することで snoRNP の成熟に関わることが示

唆されている。しかしながら、Nopp140 に関しては相互作用解析が中心で、その機能の実態はよくわかっていない。

本章において同定された Nopp140 を、上述の核小体構造を制御する因子を定義に当てはめてみたところ、Nopp140 は、*in vivo* かつ *in vitro* において r-chromatin と結合すること (Tsai et al., 2008)、Pol I と結合すること (Chen, et al., 1999)、そして box H/ACA snoRNP や box C/D snoRNP と結合すること (Meier and Blobel, 1994; Yang et al., 2000) が報告されている。さらに、Tsai らの報告によると、Nopp140 は自身の中心領域を介して self-interaction することに加え、N 末端側と C 末端側の領域に α -satellite DNA と rRNA gene DNA がそれぞれ結合することが *in vitro* の実験から明らかになった (Tsai et al., 2008)。 α -satellite DNA は NOR の近傍に位置していることから、Nopp140 は核小体と核を繋ぎとめる ”かすがい” のような機能を担っているではと予想された。従って、Nopp140 は核小体構造を制御する因子である可能性が生じた。

本章では、Nopp140 の核小体における機能の解明に取り組んだ。Nopp140 をノックダウンすると、約 25% の細胞の核小体構造が変化したものの、残りの細胞の核小体構造に明瞭な変化は見られなかった。また、Nopp140 における snoRNP との結合領域を特定し、核小体において Nopp140-Pol I-snoRNP の三者複合体が形成されることを見出した。さらに、Nopp140 をノックダウンした細胞は細胞増殖能が低下し、rRNA 転写活性が低下した。また、Cajal ボディのマーカートンパク質 coilin の焦点が顕著に減少した。

2-2. 材料と方法

第一章と重複する材料と方法は省略した。

2-2-1. 細胞培養、siRNA の導入、安定発現細胞株の確立

ヒト胎児腎臓細胞 293T 細胞は 10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) で培養した。

siRNA の導入について、Nopp140 siRNA には Stealth RNA NOLC1-HSS113666 または NOLC1-HSS190057 (Invitrogen) をそれぞれ使用した。

GFP あるいは FLAG が融合した Nopp140 を安定発現する HeLa 細胞を作成するため、pEGFP-C1-FLAG-Nopp140 ベクターあるいは pcDNA3.1-FLAG-Nopp140 ベクターをそれぞれ HeLa 細胞に導入し、G418 で選択培養し確立した。

2-2-2. 核小体の単離

核小体の単離方法は、Lamond 研究室のプロトコール (<http://www.lamondlab.com/>) を参考にした。0.5-1 × 10⁸ 個の HeLa 細胞を PBS で洗浄後、1 mL の低張溶液 (10 mM HEPES-NaOH [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 0.5 mM DTT) に懸濁し、氷上で 15 分間静置した。遠心し上清を除き、400 μL の低張溶液に懸濁し、Dounce tissue grinder (Wheaton) を用いて 10 回ホモジナイズした (細胞膜の破碎)。遠心後の上清を回収し、これを細胞質画分とした。沈降物を 3 mL の S1 solution (0.25 M sucrose and 10 mM MgCl₂) に懸濁し、それを 3 mL の S2 solution (0.35 M sucrose and 0.5 mM MgCl₂) に重層した。4°C で 5 分間遠心 (1430 × g) し上清を除き、沈降物 (核画分) を 1 mL の S2 solution に懸濁した。これを超音波処理し、核小体を露出させた。超音波処理後の懸濁液を 1 mL の S3 solution (0.88 M sucrose and 0.5 mM MgCl₂) に重層し、4°C で 20 分間遠心 (3000 × g) した。遠心後の上清を回収し、これを核質画分とした。得られた沈降物を核小体画分とした。

2-2-3. 塩酸抽出

HeLa 細胞から単離した核小体を、0、0.25、0.5、そして 1 N HCl を含む S2 solution に懸濁し、4°C で一晩攪拌した。4°C で 20 分間遠心 (21500 × g) し、上清を回収した。0.25、0.5、そして 1 N HCl を加えて抽出した上清には、中和するためにそれぞれ 300、600、そして 1000 mM Tris-HCl (pH 9.6) を上清の体積の等量を加え、pH を 7-8 にした。塩酸を加え

ていないサンプル (0 N HCl) には 300 mM Tris-HCl (pH 7.9) を上清の体積の等量を加えた。中和したサンプルに SDS sample buffer を加え、95°C で 5 分間処理した。

2-2-4. 抗体

本章で新たに使用した抗体は以下の通りである。

マウスモノクローナル抗体: BrdU (BU-33, Sigma), Coilin (COIL) (Pdelta, Abcam), NAP1L1 (2609C3a, Santa Cruz Biotechnology),

2-2-5. CBB 染色、銀染色

CBB 染色は以下の通りに行った。SDS-PAGE 後のゲルを CBB solution (0.25% [w/v] coomassie brilliant blue [CBB], 40% [v/v] methanol, and 7% [v/v] acetic acid) に浸し、室温で 30 分間振盪した (CBB 染色)。ゲルを超純粋で数回洗浄した後に、脱染溶液 (30% [v/v] methanol and 10% [v/v] acetic acid) に浸し、染色像が得られるまで室温で振盪した (脱染)。

銀染色は以下の通りに行った。SDS-PAGE 後のゲルを 50% (v/v) methanol に浸し、室温で 5 分間振盪した (固定)。この操作を 2 回行った。ゲルを 5% (v/v) methanol に浸し、室温で 5 分間振盪した後、32 μ M DTT に浸し、室温で 15 分間振盪した (還元)。ゲルを 6 mM AgNO₃ に浸し、室温で 15 分間振盪した (銀染色)。ゲルを超純水で数回洗浄した後に、還元溶液 (0.3 M Na₂CO₃ and 0.02% [v/v] formaldehyde) に浸し、染色像が得られるまで室温で振盪した (還元)。約 1 g のクエン酸一水和物を加えて、室温で 30 分以上振盪した (現像の停止)。

2-2-6. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS)

解析するタンパク質をトリプシン消化するために以下の操作を行った。サンプルを SDS-PAGE で展開後、銀染色を行った。得られた染色像から解析対象のバンドを切り出した。切り出したゲルをチューブに回収し、100 μ L の 30 mM K₃[Fe(CN)₆]を加えた後に、100 μ L の 100 mM Na₂S₂O₃を加え、銀染色の色が消えるまで室温で攪拌した。ゲルを超純粋で洗浄後、10 mM DTT を含んだ 100 μ L の 100 mM NH₄HCO₃に懸濁し 56°C で 1 時間処理した。上清を除き、55 mM iodoacetoamide を含んだ 100 μ L の 100 mM NH₄HCO₃に懸濁し、遮光して室温で 45 分間処理した。上清を除き、200 μ L の 50% (v/v) methanol/10% (v/v) acetic acid に懸濁し上清を除いた。200 μ L の 100 mM NH₄HCO₃に懸濁し上清を除いた。200 μ L

の CH₃CN に懸濁し上清を除いた。遠心濃縮器でゲルが白く乾燥するまで処理した。約 10 μL の 20 ng/μL Sequencing grade modified trypsin (Promega) を加え、氷上で 30 分間静置した。20 μL の 50 mM NH₄HCO₃ を加え、37°C で一晩処理した。150 μL の 50% (v/v) CH₃CN/0.1% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) を加え、Bioruptor (コスモ・バイオ) にて 15 分間超音波処理した。上清を回収し、150 μL の 75% (v/v) CH₃CN/0.1% (v/v) TCA を加え、15 分間超音波処理した。先ほど回収した上清と合わせ、体積が約 30 μL になるまで遠心濃縮器で乾燥させた。

次に、サンプルを精製するために以下の操作を行った。C チップ T300 (AMR) を 1.5 mL チューブの蓋に差し込み、10 μL の 80% (v/v) CH₃CN/0.1% (v/v) tetrahydrofuran (TFA) を C チップにロードした。遠心した後に、10 μL の 4% (v/v) CH₃CN/0.1% (v/v) TFA を C チップにロードした。遠心した後に、サンプルを C チップにロードした。遠心した後に、10 μL の 4% (v/v) CH₃CN/0.1% (v/v) TFA を C チップにロードした。この C チップを TPX 製 1.5 mL チューブ (ハイテック) にセットし、10 μL の 80% (v/v) CH₃CN/0.1% (v/v) TFA を C チップにロードし遠心した。この操作を 2 回行った。遠心濃縮器で完全に乾燥させた後に、サンプルを 20 μL の 2% (v/v) CH₃CN/0.1% (v/v) TFA に溶解した。

LC-MS/MS 解析は、以下の 3 台の装置オートサンプラー-PAL (CTC Analysis)、液体クロマトグラフ Paradigm MS4 (Michrom)、そして質量分析計 Finnigan LXQ (ThermoFisher Scientific) を用いて行った。液体クロマトグラフに用いたカラムは、Magic C18AQ 3μ 200Å Columns 100μ 150 mm (Michrom) を用いた。解析には Mascot Server (Matrix Science) の MS/MS Ion Search を使用した。検索条件は表 2 に示した。

表 2 Mascot Server MS/MS Ion Search の検索条件

Database	SwissProt	MS/MS tolerance	1 Da
Taxonomy	Homo sapiens	Peptide charge	1+, 2+, and 3+
Enzyme	Trypsin	Monoisotopic/Average	Monoisotopic
Allowed up to	2	Instrument	ESI-TRAP
Fixed modifications	Carbamidomethyl	Error tolerant	off
Variable modifications	Oxidation	Decoy	off
Quantitation	None	Report top	AUTO
Peptide tolerance	2 Da		

2-2-7. 透過型電子顕微鏡

U-2 OS 細胞を PBS で洗浄後、2.5% (v/v) glutaraldehyde および 1% (w/v) osmium tetroxide で二重固定後、洗浄してエタノール系列にて脱水し、methyl oxirane に置換後、エポキシ樹脂で重合包埋した。得られた樹脂ブロックからウルトラマイクロトーム Ultracut E (Reichert-Jung) を使用して超薄切片を採取し、それに酢酸ウラン・クエン酸鉛 (Reynolds 法) の二重染色を施し透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子) で観察した。

2-2-8. 免疫沈降

第一章 1-2-3.と同じ方法で免疫沈降し洗浄したビーズを、0.3 mg/mL FLAG peptide (Sigma) を含む Lysis buffer に懸濁し、氷上で 30 分間静置した後に上清を回収した。SDS sample buffer を加え、95°C で 5 分間処理した。再度、免疫沈降を行う場合は、溶出したサンプルに抗体を加えて、同様に処理した。

2-2-9. 細胞増殖測定

35 mm dish から 0.05% (w/v) Trypsin/0.53 mM EDTA を用いて細胞を回収した。細胞を 500 μ L の培地に懸濁し、そのうち 10 μ L を 10 μ L の 2 \times trypan blue solution (Sigma) と混合し、Countess cell counting chamber slides (Invitrogen) にロードし、Countess automated cell counter (Invitrogen) を用いて細胞数を計測した。

2-2-10. 5-fluorouracil incorporation

HeLa 細胞をカバースリップ上に接着させた。培地を交換し、3 mM 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma) 存在下で 30 分間培養した。カバースリップを回収し、1% (w/v) paraformaldehyde/PBS で固定し、一次抗体に抗 BrdU 抗体を用いた。他の手順は 1-2-7. 間接蛍光抗体法に従った。

2-2-11. プラスミド DNA の構築

pcDNA3.1-FLAG-Nopp140 ベクターを構築するために、human Nopp140 cDNA を pcDNA3.1-FLAG ベクター (筑波大学医学医療系 竹内薫 准教授からの分与) の BamHI/EcoRI サイトに連結させた。pEGFP-C1-FLAG-Nopp140 ベクターを構築するために、pcDNA3.1-FLAG-Nopp140 ベクターを鋳型に、表 3 に示したプライマーセットを用いて

PCR にて増幅し、pEGFP-C1 (Clontech) ベクターの BglII/EcoRI サイトに連結させた。Nopp140 欠損変異体を組み込んだプラスミド DNA (表 3) は、pcDNA3.1-FLAG-Nopp140 ベクターを鋳型に、表 3 に示したプライマーセットを用いて PCR にて増幅し、pcDNA3.1-FLAG ベクターの BamHI サイト (Nopp140N203) または BamHI/EcoRI サイト (Nopp140M204-382、Nopp140M383-587、そして Nopp140C383) に連結させた。Nopp140N203 は 1 番目から 203 番目までのアミノ酸、Nopp140M204-382 は、204 番目から 382 番目までのアミノ酸、Nopp140M383-587 は、383 番目から 587 番目までのアミノ酸、そして Nopp140C383 は 383 番目から 699 番目までのアミノ酸からそれぞれ構成されている。

表 3 FLAG-Nopp140 および Nopp140 欠損変異体 (下線部は Nopp140 の塩基配列)

名称	Forward primer	Reverse primer
FLAG-Nopp140	5'-agcagatctgccccaccatggactacaaggacgatga-3'	5'-aggggaattc <u>actcgctg</u> tcaaaacttaa-3'
Nopp140N203	5'-aggggatccatg <u>cgccgacccggcattcg</u> -3'	5'-aaaagatctctaagctggttgggaggggctt-3'
Nopp140M204-382	5'-aggggatccc <u>gagcagcacctaaaatagc</u> -3'	5'-aggggaattctaaccagctggcttagaaggag-3'
Nopp140M383-587	5'-aaggatcc <u>accaccaagaattcttcaaa</u> -3'	5'-aggggaattctacttccgcttcttaataagaac-3'
Nopp140C383		5'-aggggaattc <u>actcgctg</u> tcaaaacttaa-3'

2-3. 結果

2-3-1. 核小体構造を制御する新たな候補因子として Nopp140 に着目した。

核内において、核小体が形成される場所は NOR である。従って、NOR を特異的に認識することのできる核小体タンパク質は、核小体形成のための中核を担っている可能性がある。NOR を特異的に認識する、つまり rRNA 遺伝子を構成する DNA もしくは r-chromatin と結合するタンパク質は、ヒストンタンパク質のように極性アミノ酸領域を有していたり、DNA 結合モチーフを有していたりすると推測した。そこで、核小体に含まれる極性の高いタンパク質を抽出するために、核小体タンパク質の塩酸抽出を行った。まず、HeLa 細胞から核および核小体を単離し(図 15)、得られた核小体を、0、0.25、0.5、そして 1 N HCl で処理し、上清画分に溶出されるタンパク質を SDS-PAGE で展開後、銀染色にて検出した(図 16A)。塩酸濃度に依存して、溶出されるタンパク質は3本のバンドに収束した(図 16A、レーン 1、3、5、7 およびレーン 2、4、6、8)。そして、1N HCl で抽出した核小体のサンプルで検出された3つのバンド(図 16A、バンド 1、2、そして 3)に含まれるタンパク質を、液体クロマトグラフィー質量分析を用いて同定した。各バンドから同定されたタンパク質のうち、スコアが最も高いものから上位5つを図 16B に示した。同定されたタンパク質のいくつかを、Western blotting にて検出した(図 16C)。Western blotting にて検出されたタンパク質のうち、塩酸濃度依存的に抽出されたタンパク質は Nopp140 のみであった。一方、NCL は 0.25 N HCl で抽出した時が最も溶出効率が良いことが明らかとなった。一方、UBF や B23 は塩酸濃度に依存せず溶出したことが明らかとなった。ヒストン H3 はコントロールとして検出した。以上の結果より、Nopp140 は NCL、UBF、そして B23 と同様に、rRNA 遺伝子 DNA または r-chromatin と結合するタンパク質であることが示唆された。また、Nopp140 が r-chromatin と結合することはクロマチン免疫沈降の結果からも明らかとなった(図 8)。

2-3-2. Nopp140 は、核小体の構造維持には必須ではない。

核小体構造における Nopp140 の機能を明らかにするために、Nopp140 をノックダウンし、核小体タンパク質の細胞内局在および核小体構造の変化を検討した。U-2 OS 細胞に Nopp140 siRNA を導入し、間接蛍光抗体法および透過型電子顕微鏡撮影を行った。Nopp140 をノックダウンすると、核小体 FC 領域や DFC 領域に局在する DKC1 や RPA194 が、核小体内でドット状に局在する細胞が確認された(図 18A)。一方で、核小体 GC 領域に局在す

る B23 の核小体内局在は変化した細胞はほとんど確認されなかった (図 18B)。また、核の形態が崩れた細胞がいくつか認められた。DKC1 の局在が核小体内でドット状の局在を示した細胞を、nucleolar-disrupted cells と定義し、その個数を計測した。その結果、HeLa 細胞および U-2 OS 細胞において、いずれも Nopp140 をノックダウンすると、約 25% の細胞の核小体構造が変化することが明らかとなった。その一方で、残りの約 75% の細胞には、DKC1 の局在変化はほとんど認められなかった (図 18C)。また、その時の Nopp140 siRNA を導入した細胞の Nopp140 の発現量は減少していた (図 18D)。Nopp140 をノックダウンした際の核小体の FC 構造や DFC 構造を透過型電子顕微鏡にて観察した (図 18E)。Control siRNA を導入した細胞では、FC 構造や DFC 構造が明瞭に確認された (図 18E、パネル 1-4)。一方、Nopp140 siRNA を導入した細胞では、FC 構造や DFC 構造がはっきりしないものが複数確認された (図 18E、パネル 5-8)。さらに、核膜が核内部に入り組んだような核の形態異常がここでも認められた。以上の結果より、Nopp140 は必須ではないものの、核小体、あるいは核の構造形成・維持に何らかの役割を担っていることが示唆された。

2-3-3. Nopp140 は、Pol I および snoRNPs と核小体において三者複合体を形成する。

Nopp140 は Pol I と snoRNPs (DKC1 や FBL) と結合することが報告されている (Meier and Blobel, 1994; Yang et al., 2000; Chen, et al., 1999)。このことから、Nopp140 が核小体において、rRNA 転写と rRNA プロセッシングの足場として機能していることが推定された。つまり、Nopp140 は、rRNA 転写後に rRNA プロセッシングが効率良く続くために、それぞれの因子を空間的に近傍に繋ぎ留めていると推測した。そこでまず、Nopp140 における snoRNP との結合領域を特定し、核小体において、Nopp140-Pol I-snoRNP の三者複合体が存在するかを検討した (図 19)。FLAG が融合した Nopp140 野性型および Nopp140 欠損変異体 (Nopp140N203、Nopp140M204-382、Nopp140M383-587、そして Nopp140C383) を 293T 細胞に導入し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った (図 19A)。沈降された FLAG-Nopp140 タンパク質は、ほぼ等量であることが CBB 染色によって確認された。その結果、RPA194 は Nopp140M204-382 と結合した (Chen, et al., 1999)。また、DKC1 と FBL は、Nopp140M383-587 ではなく Nopp140C383 と強く結合した。この結果から、Nopp140 は C 末端領域を介して DKC1 や FBL と結合することが示唆された (図 19B)。以上の結果から、Nopp140 は、1 分子内で Pol I と snoRNP それぞれと異なる領域で結合する可能性が示唆された。つまり、Nopp140 は Pol I と snoRNP から成る三者複合体を形成することが推定された。そこで、

FLAG が融合した Nopp140 を安定発現する HeLa 細胞から核小体を単離し、抗 FLAG 抗体で FLAG-Nopp140 を免疫沈降後、抗 RPA194 抗体で FLAG-Nopp140 複合体に含まれる RPA194 を免疫沈降した (図 19C)。その結果、沈降した複合体から DKC1 および FBL が検出された。以上の結果より、Nopp140 は、核小体において、Pol I および snoRNP と三者複合体を形成することが明らかとなった。つまり、Nopp140 は rRNA 転写と rRNA プロセッシングの足場として機能する可能性が示唆された。

2-3-4. Nopp140 は、細胞増殖に重要である。

先の結果より、Nopp140 は rRNA 転写と rRNA プロセッシングの両方に重要である可能性が示唆された。このことから、Nopp140 は細胞増殖に重要であることが推測された。そこで次に、Nopp140 の細胞増殖への影響を検討した。出芽酵母において、Srp40 欠損株は細胞増殖能が低下したことが明らかとなっている (Meier, 1996)。HeLa 細胞、および U-2 OS 細胞に Nopp140 siRNA を導入し、24 時間後に細胞を回収し、 2×10^4 個 (HeLa 細胞) または 1.5×10^4 個 (U-2 OS 細胞) の細胞をディッシュに撒いた。そして、導入 72 および 96 時間後の細胞数を計測した (図 20A)。Nopp140 をノックダウンした細胞は、コントロールに比べ、約 50% 以下に増殖率が低下することが明らかとなった。Nopp140 mRNA の異なる配列を認識する siRNA (Nopp140 siRNA #1 と #2) および異なる組織由来の細胞株 (HeLa 細胞と U-2 OS 細胞) で同様の結果が得られたことから、Nopp140 が細胞増殖を正に制御するのは siRNA の配列非特異的な効果および組織特異的な効果ではないことが示唆された。次に、Nopp140 の rRNA 転写活性に対する影響を見るために、5-fluorouracil incorporation 法を検討した。U-2 OS 細胞に Nopp140 siRNA を導入し、72 時間後に 5-fluorouracil (5-FU) で新規合成された RNA を標識した。Control siRNA を導入した細胞では 5-FU の取り込みが検出されたが、Nopp140 siRNA を導入した細胞では 5-FU の取り込みが減少した (図 20B)。このことから、Nopp140 をノックダウンすると rRNA 転写活性が低下することが示唆された。

2-3-5. Nopp140 は、Cajal ボディの形成に必要である可能性がある。

Nopp140 は、核小体だけでなく Cajal ボディにも局在する (図 17B)。また、Nopp140 は Cajal ボディのマーカータンパク質である coilin と結合することが明らかとなっている (Isaac et al., 1998)。Cajal ボディでは snRNA や snoRNA の成熟化が行われていると考えら

れている (Nizami et al., 2010)。iFRAP (inverse FRAP) 解析により、Nopp140 の Cajal ボディからの解離速度は、GAR1 (box H/ACA snoRNP) や FBL (box C/D snoRNP) のそれとほぼ同じだったことから、Nopp140 は snoRNPs が Cajal ボディから核小体へ移動する際にシャペロンとして機能していることが示唆されている (Dundr et al., 2004)。そこで、Nopp140 をロックダウンした際の Cajal ボディへの影響についても検討した。U-2 OS 細胞に Nopp140 siRNA を導入し、間接蛍光抗体法を用いて Cajal ボディの観察を行った (図 21A と B)。Control siRNA を導入した細胞では、coilin の焦点 (Cajal ボディ) が認められたが、Nopp140 siRNA を導入した細胞では、coilin の焦点は著しく減少した。さらに、DKC1 は control siRNA を導入した細胞では核小体と Cajal ボディに局在したが、Nopp140 siRNA を導入した細胞では Cajal ボディへの局在はほとんど見られなかった。1 細胞あたりの coilin の焦点の数を計測した結果、Nopp140 siRNA を導入した細胞ではその数がコントロールに比べて約 20% に減少することが明らかとなった (図 21C)。以上の結果より、Nopp140 は Cajal ボディの形成に必要であることが示唆された。

2-4. 考察

2-4-1. 核小体構造における Nopp140 の機能

Nopp140 をノックダウンすると、siRNA 導入 72 時間後では DKC1 の局在が変化した細胞が約 25% に認められ、核小体 FC 構造や DFC 構造がはっきりしない細胞が複数認められた (図 18)。核小体は、DNA 損傷や温度変化などの外界のストレスに反応し、収縮したりキャップ様の構造を形成する (Boulon et al., 2010)。Nopp140 をノックダウンした際に認められた核小体の構造変化も、細胞に何らかのストレスが加わったことによる結果かもしれない。核小体構造への影響が見られた細胞と見られなかった細胞があった点については、Nopp140 の発現量の差によるものかもしれない。そこで今後は、shRNA の安定発現細胞株を樹立し、Nopp140 の発現量を一定に調節した細胞集団を用いて解析する。それらの中で、核小体構造に変化がある細胞集団を用いて解析を進める。

2-4-2. snoRNPs の分子シャペロンとしての Nopp140 の機能

Nopp140 と DKC1 や FBL といった snoRNPs は、核小体のほかに Cajal ボディにも局在した。Nopp140 をノックダウンすると、coilin の焦点が顕著に減少し、Cajal ボディに局在する DKC1 がほとんど見られなかった (図 21)。核小体-Cajal ボディ間の box H/ACA snoRNP の移動が抑制されると、box H/ACA snoRNP の成熟に影響が出ると推測される。それゆえ、box H/ACA snoRNP の機能である rRNA 前駆体の偽ウリジン化に影響が出る可能性が示唆される。偽ウリジン化の機能については、未だ不明な点は多く、rRNA の安定な立体構造の維持に重要であるという説 (Ofengand, 2002) や、リボソームにおいて mRNA に対する tRNA の結合に重要であるという報告 (Jack et al., 2011) がある。従って、偽ウリジン化活性の低下による表現型は、タンパク質合成活性の低下として表れる可能性があるため、今後の検討課題である。

2-4-3. Nopp140 依存的な細胞増殖能の低下

Nopp140 をノックダウンしたことによる細胞増殖能の低下は、rRNA 転写活性の低下によることが示唆される。ショウジョウバエでは、Nopp140 のノックダウンによる発生異常が報告されている (Cui and DiMario, 2007)。一方、ヒトでは Nopp140 と構造が似ている TCOF1 (図 17A) が、UBF と結合し rRNA 転写活性を活性化させること (Valdez et al., 2004)、そして box C/D snoRNP と結合し rRNA 前駆体のメチル化を活性化させること (Gonzales et

al., 2005) が報告されている。また、TCOF1 は顎顔面形態異常を引き起こすトリーチャー・コリンズ症候群の原因遺伝子であり、頭蓋顎顔面の発生に関わっていると考えられている (Trainor et al., 2009)。ショウジョウバエでは TCOF1 のオルソログは見つかっていないことから、Nopp140 と TCOF1 の機能は生物種間で一部重複していると考えられる。この2つの因子を同時にノックダウンすることで、より顕著な細胞増殖能の低下が見られるかもしれない。また、Nopp140 は UBF との相互作用は小さいことが免疫沈降法によって示唆されており (データ示さず)、TCOF1 とは異なる分子機構で rRNA 転写活性を正に制御している可能性がある。今後は、Nopp140 が Pol I と snoRNPs の三者複合体を形成することに着目して、rRNA 転写活性の低下について検討する。Pol I に結合するが snoRNPs には結合しない Nopp140 欠損変異体、あるいはその逆の変異体を用いて、rRNA 転写と rRNA プロセッシングの関係性について検討する。この実験から、Nopp140 による rRNA 転写の活性化には snoRNP による rRNA プロセッシング活性が重要かどうかは明らかになるだろう。

2-4-4. Cajal ボディ構造における Nopp140 の機能

Nopp140 をノックダウンすると Coilin の焦点が減少したこと (図 21) は、Cajal ボディ構造が崩壊している可能性を示唆している。Cajal ボディでは、snoRNP の成熟化が行われることが示唆されているため、この構造体が崩壊することで snoRNP の機能に影響が及ぶ可能性がある。従って、今後は、snoRNP の成熟化を追跡し、snoRNP の機能すなわち 2'-O-メチル化や偽ウリジン化への影響を中心に解析する。また、Nopp140 が核小体と Cajal ボディを往復するシャペロンであると予想された。しかし、Nopp140 が核小体と Cajal ボディを往復できる分子機構は不明である。そこで、着目しているのが CK2 による Nopp140 のリン酸化である (Li et al., 1997)。奇しくも、snoRNPs、rRNA 遺伝子 DNA、そして coilin と Nopp140 が結合する領域はすべて C 末端領域に集約されている (図 20B; Isaac et al., 1998; Tsai et al., 2008)。この領域が CK2 によってリン酸化されるかは明らかにされていないため、まずはこの点を明らかにした上で、Nopp140 の核小体と Cajal ボディを移動する分子機構を明らかにする。

総括と展望

本研究の主な結果は以下の5点である。

1. 間期において、rRNA プロセッシング因子は r-chromatin と結合し、分裂期ではこの結合が解消される。
2. 間期において、rRNA プロセッシング因子は rRNA 遺伝子の転写領域に特に多く結合する。
3. 核小体構造の再形成は、rRNA 転写の再開前の第一段階と、その後の第二段階に分かれる。第一段階で rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合が完了し、第二段階では成熟した核小体構造が形成されると考えられる。
4. rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合は UBF 依存的だが、UBF だけでは不十分である。
5. Nopp140 は、核小体の構造維持には必須ではないが、rRNA 転写および細胞増殖には必要であること、そして Cajal ボディの形成にも必要である可能性がある。

本研究により、細胞周期を通じて崩壊と再形成を繰り返す核小体の構造が、rRNA プロセッシング因子と r-chromatin との結合の脱着で説明できる可能性が示唆された。核小体構造に関するこれまでの研究は、核小体タンパク質の細胞内局在の変化で追跡することが一般的で、タンパク質間の相互作用という観点で核小体構造制御の解明に挑んだ報告はほとんどない。また、rRNA プロセッシングに関連する因子が r-chromatin に結合したこと、加えて転写活性の高い rRNA 遺伝子の転写領域に特に多く結合したことは、rRNA 転写と rRNA プロセッシングが協調して反応することを支持する強力な証拠である。そして、分裂後に再開する rRNA 転写が核小体構造の再形成に必須であるという過去の観察によって得られた知見 (Douset et al., 2000) は、本研究によって生化学的に裏付けられた。その一方で、rRNA 転写の再開より前に rRNA プロセッシング因子と r-chromatin の結合は回復していたという結果は、核小体形成機構に新たな知見を加えたことになる。つまり、顕微鏡下では不完全に見られる核小体構造だが、核小体構造の中心部 (r-chromatin) でのタンパク質間の相互作用は元に戻っていた。しかし、ここで新たに浮上した疑問は、rRNA の再開前

に rRNA プロセッシング因子はどのような分子機構で r-chromatin と結合するかということだ。

UBF に次ぐ第 2 の因子を明らかにするため、今後は *in vitro* と細胞を使った解析の両面からアプローチする。*In vitro* の解析では、rRNA プロセッシング因子が rRNA 遺伝子 DNA に結合することを再現し、それが rRNA 転写の有無で変化するか検討する。現時点までの結果から、rRNA 転写が起きない条件下では、rRNA プロセッシング因子は rRNA 遺伝子 DNA に結合しないことが示唆されている。また、細胞を使った解析では、U2OS 2-6-3 細胞 (Janicki et al., 2004) に倣って、転写誘導できる rRNA 遺伝子のコンストラクトを細胞に組み込み、転写の有無で rRNA プロセッシング因子が集合するか検討する。

rRNA プロセッシング因子が r-chromatin に結合するためには、UBF が必要であることが明らかとなった。今後は、分裂期特異的な UBF のリン酸化の機能を解析する予定である。分裂期において、r-chromatin から解離する UBF とそうでない UBF が存在したが、それが分裂期特異的なリン酸化修飾によるものなのか検討する。予想としては、分裂期特異的なリン酸化修飾によって、UBF と r-chromatin の結合力が減少すると考えられる。この点について、予想されるリン酸化部位の点変異体を用いて解析する。

Nopp140 については、これまでの結果からは具体的な機能が不明である。今後は、Nopp140 が rRNA プロセッシングに与える影響を検討するとともに、rRNA 転写における Nopp140 の作用点を明らかにする予定である。また、Cajal body の形成に Nopp140 が重要な役割を持つことが示唆された。今後は、Nopp140 が Cajal body の形成と機能に与える影響を検討する予定である。

細胞核には、核小体や Cajal ボディのほかにも、核スペックル、パラスペックル、そして PML ボディなどの核内構造体が知られている (Dundr and Misteli, 2010)。これらの構造体もその構造制御機構が不明なものがあるものの、「特定のタンパク質から成る集合体」という意味では、核小体と同じ機構でそれらの構造が制御されているのかもしれない。核小体の構造制御機構が明らかになれば、こうした他の核内構造体の構造制御機構の解明にも役立つと考える。核内構造体が特定のタンパク質の集合体を形成するのは、より効率よく機能するため (たとえばリボソーム生合成) だと考えられる。従って、構造制御機構を解明することは、その構造体の機能を解明することに繋がり、その機能を制御できることに繋がるだろう。核小体構造・機能制御の分子基盤の解明により、核小体だけでなく、他の核

内構造体の機能を制御できるようになり、がんなどの疾病治療技術の開発に貢献できることを将来の展望とする。

謝辞

本研究を行うにあたり、U2OS 2-6-3 細胞を提供して頂いた、Cold Spring Harbor Laboratories David L. Spector 教授に感謝を申し上げます。液体クロマトグラフィー質量分析装置を使用させて頂いた、独立行政法人 物質・材料研究機構 箕輪 貴司 博士に感謝を申し上げます。そして、透過型電子顕微鏡撮影のための試料調製をして頂いた、筑波大学 医学技術職員 坂本 順子 様に感謝を申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大な御指導と御援助を賜った筑波大学 永田 恭介 教授、そして医学医療系 奥脇 暢 准教授に感謝を申し上げます。

日頃から様々な面で御援助を頂いた分子ウイルス学・寄生虫分子生物学研究室の皆様に感謝を申し上げます。

最後に、精神的にも経済的にも支えて頂いた家族に感謝を申し上げます。

参考文献

本論文では全体を通じて、以下7点の文献を参考にした。

- 上島州平, RNP 複合体による核小体構造制御の分子機構 (修士学位論文). 筑波大学大学院医科学研究科, 2007.
 - 竹安邦夫, 米田悦啓 編, 細胞核のダイナミクス. シュプリンガー・フェアラーク東京, 2004. 206 p.
 - Boisvert, F.M., et al., The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(7): p. 574-85.
 - Dimario, P.J., Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int Rev Cytol*, 2004. 239: p. 99-178.
 - Okuwaki, M., [Structure and function of the nucleolus]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2006. 51(14 Suppl): p. 1950-6.
 - Olson, M.O.J., The nucleolus. *Protein reviews*. 2011, New York: Springer. xxv, 414 p.
 - Pederson, T., The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. 3(3).
1. Ahmad, Y., et al., NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Database issue): p. D181-4.
 2. Andersen, J.S., et al., Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, 2005. 433(7021): p. 77-83.
 3. Andersen, J.S., et al., Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, 2002. 12(1): p. 1-11.
 4. Angelier, N., et al., Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(6): p. 2862-71.
 5. Arabi, A., et al., c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol*, 2005. 7(3): p. 303-10.
 6. Bazett-Jones, D.P., et al., Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science*, 1994. 264(5162): p. 1134-7.
 7. Beckmann, H., et al., Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. *Science*, 1995. 270(5241): p. 1506-9.
 8. Belenguer, P., et al., Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. *Mol Cell Biol*, 1990. 10(7): p. 3607-18.
 9. Bell, S.P., et al., Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science*, 1988. 241(4870): p. 1192-7.
 10. Bellini, M. and J.G. Gall, Coilin shuttles between the nucleus and cytoplasm in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(10): p. 3425-34.
 11. Beltrame, M. and D. Tollervey, Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. *EMBO J*, 1992. 11(4): p. 1531-42.
 12. Biggiogera, M., et al., Revealing the unseen: the organizer region of the nucleolus. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 17): p. 3199-205.
 13. Bodem, J., et al., TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep*, 2000. 1(2): p. 171-5.
 14. Borer, R.A., et al., Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 1989. 56(3): p. 379-90.
 15. Boulon, S., et al., The nucleolus under stress. *Mol Cell*, 2010. 40(2): p. 216-27.
 16. Bouvet, P., et al., Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem*, 1998. 273(30): p. 19025-9.
 17. Busch, H., et al., ISOLATION OF NUCLEOLI. *Exp Cell Res*, 1963. 24: p. SUPPL9:150-63.
 18. Cairns, C. and B. McStay, Identification and cDNA cloning of a *Xenopus* nucleolar phosphoprotein,

- xNopp180, that is the homolog of the rat nucleolar protein Nopp140. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 10): p. 3339-47.
19. Calvet, J.P. and T. Pederson, Base-pairing interactions between small nuclear RNAs and nuclear RNA precursors as revealed by psoralen cross-linking in vivo. *Cell*, 1981. 26(3 Pt 1): p. 363-70.
 20. Carron, C., et al., Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 19): p. 4532-42.
 21. Chang, J.H. and M.O. Olson, Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem*, 1990. 265(30): p. 18227-33.
 22. Chen, D., A.S. Belmont, and S. Huang, Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(42): p. 15106-11.
 23. Chen, H.K., et al., Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(12): p. 8536-46.
 24. Cheutin, T., et al., Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 16): p. 3297-307.
 25. Ciarmatori, S., et al., Overlapping functions of the pRb family in the regulation of rRNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(17): p. 5806-14.
 26. Cmarko, D., et al., Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol*, 2000. 113(3): p. 181-7.
 27. Comai, L., N. Tanese, and R. Tjian, The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*, 1992. 68(5): p. 965-76.
 28. Cong, R., et al., Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(19): p. 9441-54.
 29. Creancier, L., et al., Determination of the functional domains involved in nucleolar targeting of nucleolin. *Mol Biol Cell*, 1993. 4(12): p. 1239-50.
 30. Cui, Z. and P.J. DiMario, RNAi knockdown of Nopp140 induces Minute-like phenotypes in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(6): p. 2179-91.
 31. Decatur, W.A. and M.J. Fournier, rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(7): p. 344-51.
 32. Denissov, S., et al., A model for the topology of active ribosomal RNA genes. *EMBO Rep*, 2011. 12(3): p. 231-7.
 33. Denissov, S., et al., Identification of novel functional TBP-binding sites and general factor repertoires. *EMBO J*, 2007. 26(4): p. 944-54.
 34. Dephoure, N., et al., A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(31): p. 10762-7.
 35. Dousset, T., et al., Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell*, 2000. 11(8): p. 2705-17.
 36. Dragon, F., et al., A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 2002. 417(6892): p. 967-70.
 37. Dumbar, T.S., G.A. Gentry, and M.O. Olson, Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry*, 1989. 28(24): p. 9495-501.
 38. Dundr, M., et al., In vivo kinetics of Cajal body components. *J Cell Biol*, 2004. 164(6): p. 831-42.
 39. Dundr, M., et al., A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science*, 2002. 298(5598): p. 1623-6.
 40. Dundr, M., et al., A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromosoma*, 1997. 105(7-8): p. 407-17.
 41. Dundr, M. and T. Misteli, Biogenesis of nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2(12): p.

a000711.

42. Dundr, M., T. Misteli, and M.O. Olson, The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol*, 2000. 150(3): p. 433-46.
43. Dundr, M. and M.O. Olson, Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell*, 1998. 9(9): p. 2407-22.
44. Dutca, L.M., J.E. Gallagher, and S.J. Baserga, The initial U3 snoRNA:pre-rRNA base pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by in vivo chemical probing. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(12): p. 5164-80.
45. Fath, S., et al., Association of yeast RNA polymerase I with a nucleolar substructure active in rRNA synthesis and processing. *J Cell Biol*, 2000. 149(3): p. 575-90.
46. Fisher, D., et al., Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 20): p. 4703-11.
47. Fumagalli, S., et al., Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev*, 2012. 26(10): p. 1028-40.
48. Gallagher, J.E., et al., RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev*, 2004. 18(20): p. 2506-17.
49. Gebrane-Younes, J., N. Fomproix, and D. Hernandez-Verdun, When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J Cell Sci*, 1997. 110 (Pt 19): p. 2429-40.
50. Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet, Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J*, 1998. 17(5): p. 1476-86.
51. Gonzales, B., et al., The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in pre-rRNA methylation. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(14): p. 2035-43.
52. Gorski, J.J., et al., A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *EMBO J*, 2007. 26(6): p. 1560-8.
53. Gorski, S.A., et al., Modulation of RNA polymerase assembly dynamics in transcriptional regulation. *Mol Cell*, 2008. 30(4): p. 486-97.
54. Grandi, P., et al., 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell*, 2002. 10(1): p. 105-15.
55. Grandori, C., et al., c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol*, 2005. 7(3): p. 311-8.
56. Hanada, K., et al., RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *EMBO J*, 1996. 15(9): p. 2217-26.
57. Heitz, E., Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Grösse pflanzlicher Nucleolen. *Planta*, 1931. 12(4): p. 775-844.
58. Heix, J., et al., Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J*, 1998. 17(24): p. 7373-81.
59. Heix, J., et al., Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation factor TIF-IB/SL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(5): p. 1733-8.
60. Heliot, L., et al., Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol Biol Cell*, 1997. 8(11): p. 2199-216.
61. Hernandez-Verdun, D. and P. Roussel, Regulators of nucleolar functions. *Prog Cell Cycle Res*, 2003. 5: p. 301-8.
62. Hisaoka, M., et al., Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(20): p. 4952-64.
63. Hoppe, S., et al., AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A, 2009. 106(42): p. 17781-6.
64. Isaac, C., Y. Yang, and U.T. Meier, Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J Cell Biol*, 1998. 142(2): p. 319-29.
 65. Jack, K., et al., rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Mol Cell*, 2011. 44(4): p. 660-6.
 66. Janicki, S.M., et al., From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*, 2004. 116(5): p. 683-98.
 67. Johnson, A.W., E. Lund, and J. Dahlberg, Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(11): p. 580-5.
 68. Jordan, P., et al., In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J Cell Biol*, 1996. 133(2): p. 225-34.
 69. Kass, S., et al., The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell*, 1990. 60(6): p. 897-908.
 70. Kermekchiev, M., J.L. Workman, and C.S. Pikaard, Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(10): p. 5833-42.
 71. Kimura, T., et al., Mouse germ cell-less as an essential component for nuclear integrity. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(4): p. 1304-15.
 72. Klein, J. and I. Grummt, Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(11): p. 6096-101.
 73. Koberna, K., et al., Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ. *J Cell Biol*, 2002. 157(5): p. 743-8.
 74. Kopp, K., et al., Pol I transcription and pre-rRNA processing are coordinated in a transcription-dependent manner in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(2): p. 394-403.
 75. Kuhn, A., et al., Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *J Mol Biol*, 1998. 284(1): p. 1-5.
 76. Kwon, H. and M.R. Green, The RNA polymerase I transcription factor, upstream binding factor, interacts directly with the TATA box-binding protein. *J Biol Chem*, 1994. 269(48): p. 30140-6.
 77. Leung, A.K., et al., Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol*, 2004. 166(6): p. 787-800.
 78. Li, D., et al., Specific interaction between casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140. *J Biol Chem*, 1997. 272(6): p. 3773-9.
 79. Li, H.D., J. Zagorski, and M.J. Fournier, Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1990. 10(3): p. 1145-52.
 80. Lin, C.Y., et al., CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(17): p. 4752-66.
 81. Louvet, E., et al., Compartmentation of the nucleolar processing proteins in the granular component is a CK2-driven process. *Mol Biol Cell*, 2006. 17(6): p. 2537-46.
 82. Maggio, R., P. Siekevitz, and G.E. Palade, STUDIES ON ISOLATED NUCLEI. I. ISOLATION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF A NUCLEAR FRACTION FROM GUINEA PIG LIVER. *J Cell Biol*, 1963. 18: p. 267-91.
 83. Mais, C., et al., UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev*, 2005. 19(1): p. 50-64.
 84. Malinsky, J., et al., Searching for active ribosomal genes in situ: light microscopy in light of the electron beam. *J Struct Biol*, 2002. 140(1-3): p. 227-31.
 85. Mamrack, M.D., M.O. Olson, and H. Busch, Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly

- acidic region of nucleolar nonhistone protein C23. *Biochemistry*, 1979. 18(15): p. 3381-6.
86. Mayer, C., H. Bierhoff, and I. Grummt, The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev*, 2005. 19(8): p. 933-41.
 87. Mayer, C., et al., mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*, 2004. 18(4): p. 423-34.
 88. McClintock, B., The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1934. 21(2): p. 294-326.
 89. Meier, U.T., Comparison of the rat nucleolar protein nopp140 with its yeast homolog SRP40. Differential phosphorylation in vertebrates and yeast. *J Biol Chem*, 1996. 271(32): p. 19376-84.
 90. Meier, U.T. and G. Blobel, A nuclear localization signal binding protein in the nucleolus. *J Cell Biol*, 1990. 111(6 Pt 1): p. 2235-45.
 91. Meier, U.T. and G. Blobel, Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell*, 1992. 70(1): p. 127-38.
 92. Meier, U.T. and G. Blobel, NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol*, 1994. 127(6 Pt 1): p. 1505-14.
 93. Miller, G., et al., hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *EMBO J*, 2001. 20(6): p. 1373-82.
 94. Mishra, R.K. and G.L. Eliceiri, Three small nucleolar RNAs that are involved in ribosomal RNA precursor processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(10): p. 4972-7.
 95. Montgomery, T.H., Comparative cytological studies with especial regard to the morphology of the nucleolus. Added t.-p., Publications of the University of Pennsylvania. Contributions from the Zoölogical Laboratory for the year 1899 ... 1898, Boston,: Ginn & Company. 2 p. l., 256 -582 p.
 96. Moorefield, B., E.A. Greene, and R.H. Reeder, RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(9): p. 4724-9.
 97. Moss, T. and V.Y. Stefanovsky, At the center of eukaryotic life. *Cell*, 2002. 109(5): p. 545-8.
 98. Murano, K., et al., Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(10): p. 3114-26.
 99. Nizami, Z., S. Deryusheva, and J.G. Gall, The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2(7): p. a000653.
 100. Nomura, N., et al., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res*, 1994. 1(1): p. 27-35.
 101. Ochs, R.L., et al., Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*, 1985. 92(5): p. 330-6.
 102. Ofengand, J., Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett*, 2002. 514(1): p. 17-25.
 103. Okuwaki, M., et al., Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J Mol Biol*, 2001. 311(1): p. 41-55.
 104. Okuwaki, M., M. Tsujimoto, and K. Nagata, The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(6): p. 2016-30.
 105. Olsen, J.V., et al., Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*, 2010. 3(104): p. ra3.
 106. O'Sullivan, A.C., G.J. Sullivan, and B. McStay, UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(2): p. 657-68.

107. Pai, C.Y., et al., Cell-cycle-dependent alterations of a highly phosphorylated nucleolar protein p130 are associated with nucleologenesis. *J Cell Sci*, 1995. 108 (Pt 5): p. 1911-20.
108. Panov, K.I., et al., UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J*, 2006. 25(14): p. 3310-22.
109. Peculis, B.A. and J.A. Steitz, Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell*, 1993. 73(6): p. 1233-45.
110. Peter, M., et al., Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell*, 1990. 60(5): p. 791-801.
111. Peter, M., et al., In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, 1990. 61(4): p. 591-602.
112. Poortinga, G., et al., MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *EMBO J*, 2004. 23(16): p. 3325-35.
113. Poortinga, G., et al., c-MYC coordinately regulates ribosomal gene chromatin remodeling and Pol I availability during granulocyte differentiation. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(8): p. 3267-81.
114. Prieto, J.L. and B. McStay, Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes Dev*, 2007. 21(16): p. 2041-54.
115. Raska, I., Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(10): p. 517-25.
116. Raska, I., et al., Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. *J Struct Biol*, 1995. 114(1): p. 1-22.
117. Reichow, S.L., et al., The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(5): p. 1452-64.
118. Renvoise, B., et al., The loss of the snoRNP chaperone Nopp140 from Cajal bodies of patient fibroblasts correlates with the severity of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(7): p. 1181-9.
119. Roussel, P., et al., The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol*, 1996. 133(2): p. 235-46.
120. Roussel, P., et al., Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci*, 1993. 104 (Pt 2): p. 327-37.
121. Sanij, E., et al., UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol*, 2008. 183(7): p. 1259-74.
122. Santoro, R. and I. Grummt, Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol Cell*, 2001. 8(3): p. 719-25.
123. Savino, T.M., et al., Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol*, 2001. 153(5): p. 1097-110.
124. Savkur, R.S. and M.O. Olson, Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*, 1998. 26(19): p. 4508-15.
125. Scheer, U. and K.M. Rose, Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(5): p. 1431-5.
126. Scheer, U., F. Trendelenburg, and W.W. Franke, Effects of actinomycin D on the association of newly formed ribonucleoproteins with the cistrons of ribosomal RNA in *Triturus* oocytes. *J Cell Biol*, 1975. 65(1): p. 163-79.
127. Scherl, A., et al., Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(11): p. 4100-9.
128. Schmidt-Zachmann, M.S., et al., Identification and localization of a novel nucleolar protein of high molecular weight by a monoclonal antibody. *Exp Cell Res*, 1984. 153(2): p. 327-46.
129. Sirri, V., D. Hernandez-Verdun, and P. Roussel, Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance

- of the nucleolus. *J Cell Biol*, 2002. 156(6): p. 969-81.
130. Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun, In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol*, 2000. 148(2): p. 259-70.
 131. So, R.B., et al., Another face of the Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene: identification of additional exons. *Gene*, 2004. 328: p. 49-57.
 132. Soeiro, R. and C. Basile, Non-ribosomal nucleolar proteins in HeLa cells. *J Mol Biol*, 1973. 79(3): p. 507-19.
 133. Spector, D.L., R.L. Ochs, and H. Busch, Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma*, 1984. 90(2): p. 139-48.
 134. Srivastava, M., et al., Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett*, 1989. 250(1): p. 99-105.
 135. Stefanovsky, V., et al., Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell*, 2006. 21(5): p. 629-39.
 136. Stefanovsky, V.Y., et al., ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry*, 2006. 45(11): p. 3626-34.
 137. Stefanovsky, V.Y., et al., An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell*, 2001. 8(5): p. 1063-73.
 138. Sullivan, G.J., et al., Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *EMBO J*, 2001. 20(11): p. 2867-74.
 139. Tollervy, D., et al., Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillar in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 1993. 72(3): p. 443-57.
 140. Trainor, P.A., J. Dixon, and M.J. Dixon, Treacher Collins syndrome: etiology, pathogenesis and prevention. *Eur J Hum Genet*, 2009. 17(3): p. 275-83.
 141. Tsai, Y.T., et al., Chromatin tethering effects of hNopp140 are involved in the spatial organization of nucleolus and the rRNA gene transcription. *J Biomed Sci*, 2008. 15(4): p. 471-86.
 142. Tycowski, K.T., M.D. Shu, and J.A. Steitz, Requirement for intron-encoded U22 small nucleolar RNA in 18S ribosomal RNA maturation. *Science*, 1994. 266(5190): p. 1558-61.
 143. Valdez, B.C., et al., The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(29): p. 10709-14.
 144. Vincent, W.S., The Isolation and Chemical Properties of the Nucleoli of Starfish Oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1952. 38(2): p. 139-45.
 145. Voit, R. and I. Grummt, Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(24): p. 13631-6.
 146. Voit, R., M. Hoffmann, and I. Grummt, Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J*, 1999. 18(7): p. 1891-9.
 147. Waggener, J.M. and P.J. DiMario, Two splice variants of Nopp140 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(1): p. 362-81.
 148. Watkins, N.J., et al., Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell*, 2004. 16(5): p. 789-98.
 149. Weisenberger, D. and U. Scheer, A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J Cell Biol*, 1995. 129(3): p. 561-75.
 150. Yang, Y., et al., Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140. *Mol Biol Cell*, 2000. 11(2): p. 567-77.
 151. Zatssepina, O.V., et al., The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with

- transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma*, 1993. 102(9): p. 599-611.
152. Zentner, G.E., et al., Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(12): p. 4949-60.
153. Zhai, W. and L. Comai, Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(16): p. 5930-8.
154. Zhao, J., et al., ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell*, 2003. 11(2): p. 405-13.
155. Zomerdiik, J.C., et al., Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science*, 1994. 266(5193): p. 2015-8.

Nucleolar Structure

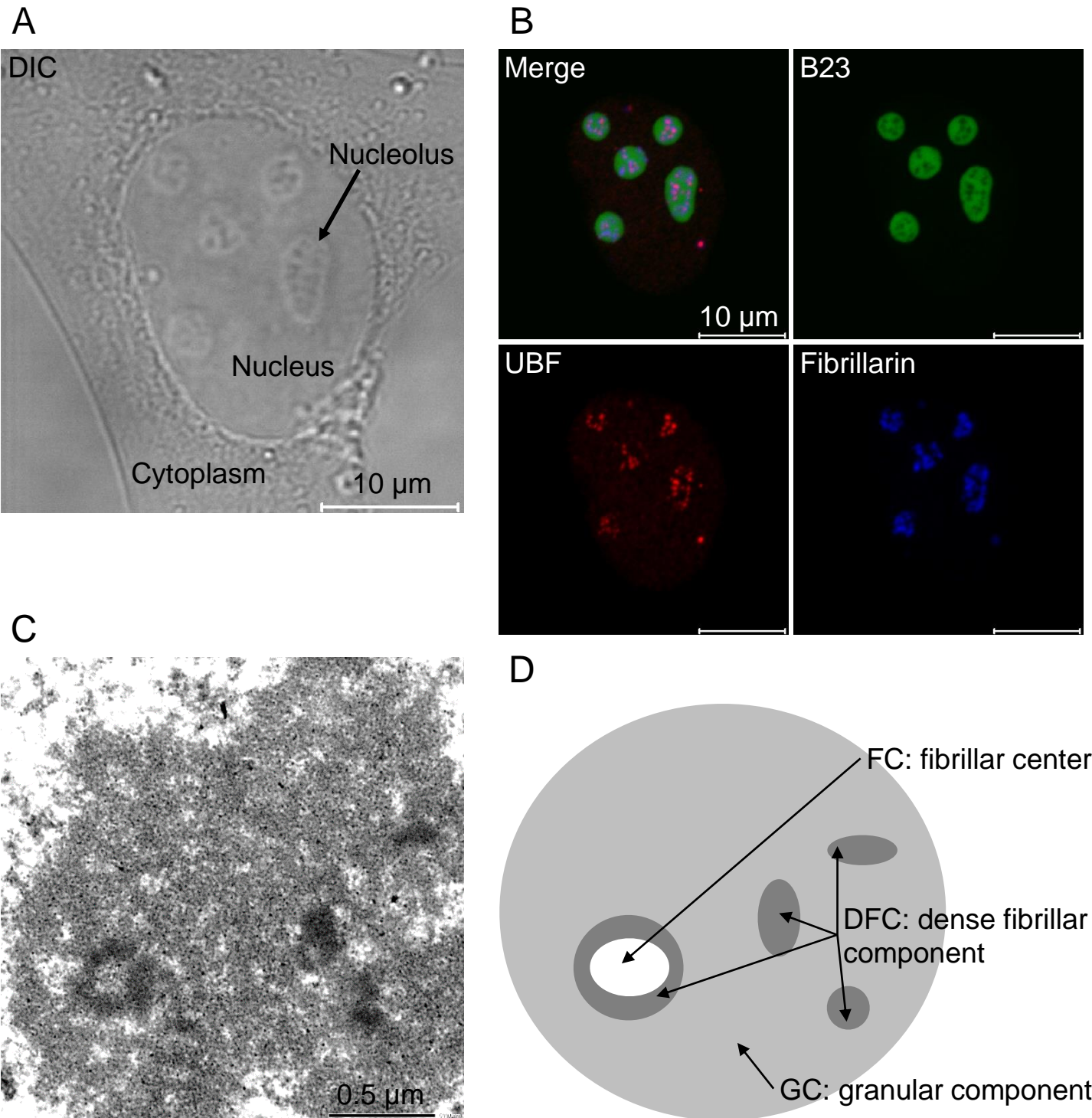


図1 核小体の構造

(A) ヒト骨肉腫細胞U-2 OS細胞の微分干渉像。(B-D) パネルBは、パネルAにおける核小体タンパク質の細胞内局在を表している。核小体の構造は、電子顕微鏡下では電子密度の違いから、最も内側に存在しUBFなどの転写装置が局在するfibrillar center (FC)、FCの外側に位置しfibrillarinなどのrRNAプロセッシング因子が局在するdense fibrillar component (DFC)、そして最も外側に位置しB23などのリボソームタンパク質のアセンブリーに関わる因子が局在するgranular component (GC) の3領域に分けられる。パネルCはU-2 OS細胞の核小体を透過型電子顕微鏡で撮影した写真。パネルDは、パネルCを表した模式図。

Ribosome Biogenesis

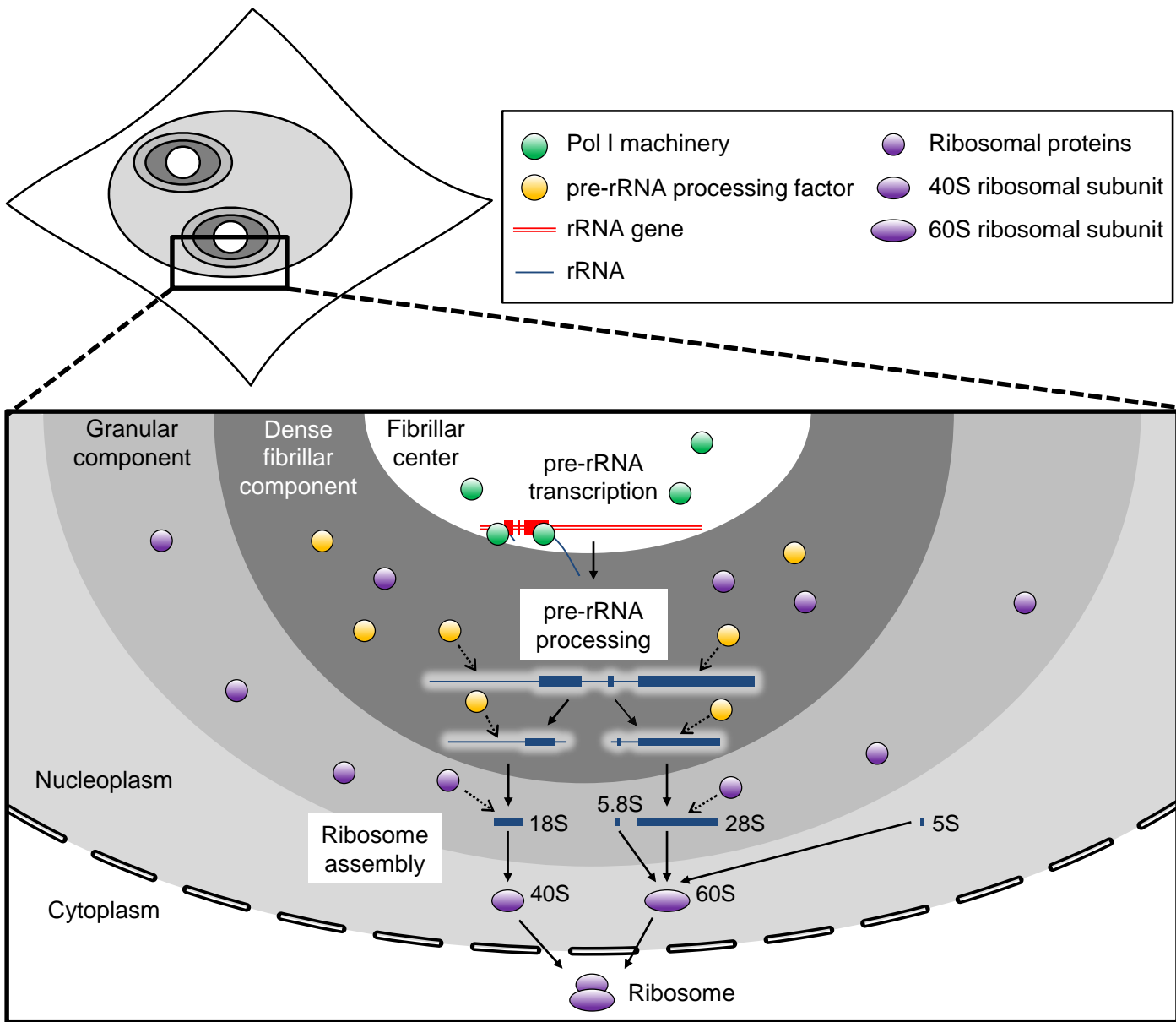


図2 リボソーム生合成

核小体の主機能であるリボソーム生合成の過程を表した模式図。rRNA転写はFCで行われ（諸説あり）、47S rRNA前駆体が産生される（rRNA転写）。その後、DFCにおいて47S rRNA前駆体はsnoRNPsなどによって修飾・切断を受けて、18S、5.8S、そして28S rRNAとなる（rRNAプロセッシング）。そして、rRNAはリボソームタンパク質と結合し、18S rRNAは40Sリボソームサブユニットに、5.8S、28S、そして核質で産生された5S rRNAは60Sリボソームサブユニットに取り込まれる（リボソームアセンブリー）。最後に、40Sと60Sリボソームサブユニットは細胞質に輸送され、リボソームが完成する。

Nucleolar organizer region

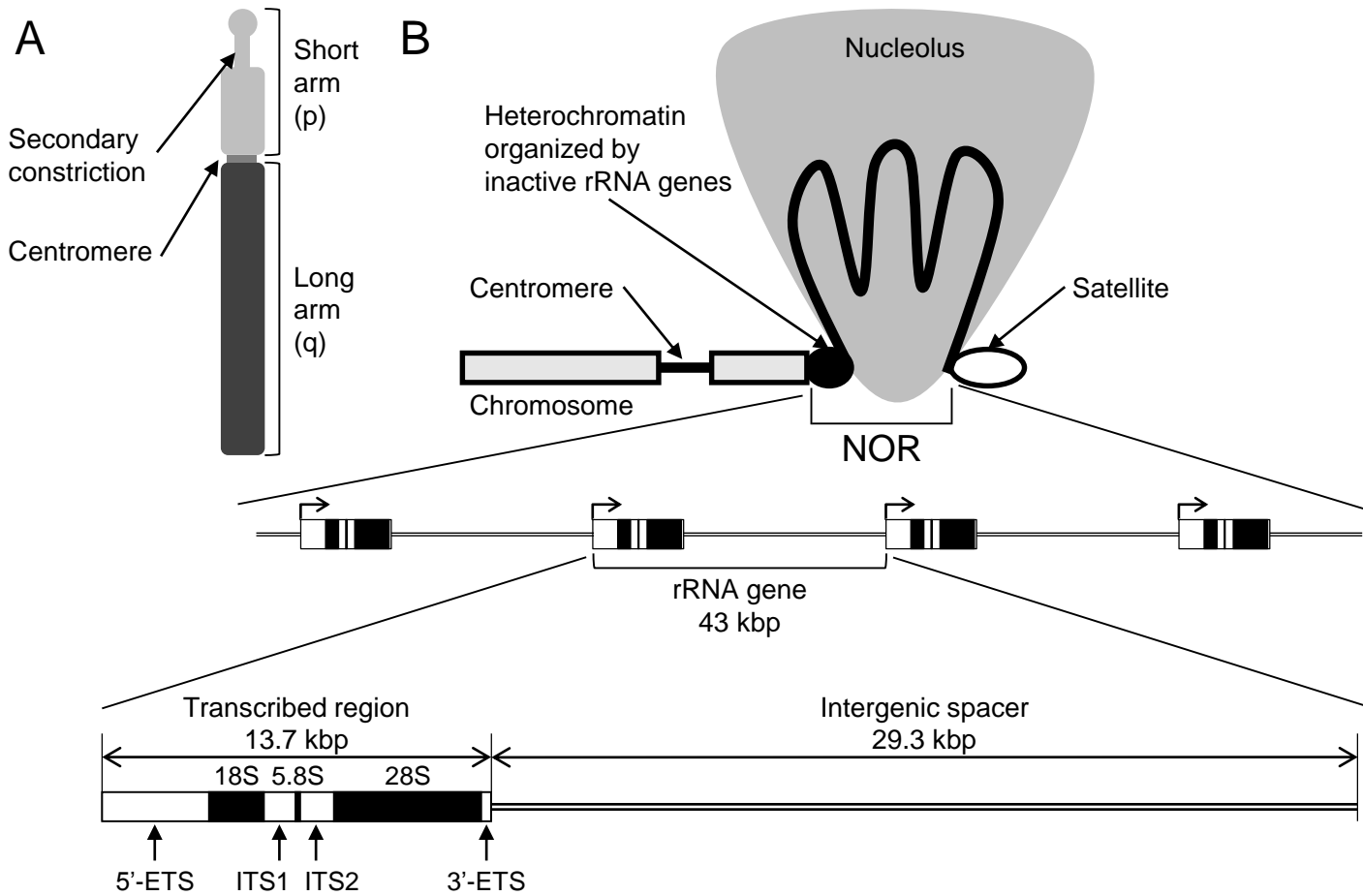


図3 Nucleolar organizer region

(A)中期染色体を表した模式図。ヒトでは、5つの染色体(第13、14、15、21、そして22番目染色体)の短腕部(p)のsecondary constrictionにnucleolar organizer region(NOR)が存在する。(B)ヒトrRNA遺伝子は43 kbpを1ユニットとし、転写領域と遺伝子間領域(intergenic spacer, IGS)から構成されている。転写領域は、最終産物である3つのrRNA(18S、5.8S、そして28S)とrRNAプロセッシングで取り除かれる4つの配列(5'-ETS [external transcribed sequence]、ITS1 [internal transcribed sequence]、ITS2、そして3'-ETS)から構成されている。NORは、約80コピーの縦列に連続しているrRNA遺伝子から構成されている。転写が行われているrRNA遺伝子はループアウトし核小体内部に局在している。一方、転写が行われていないrRNA遺伝子はヘテロクロマチン構造をとっている。核小体のDNAを染色すると核小体周辺が濃く染色されるのは、ヘテロクロマチン構造をとったrRNA遺伝子群が局在しているからと考えられている。

PIC formation and rRNA processing

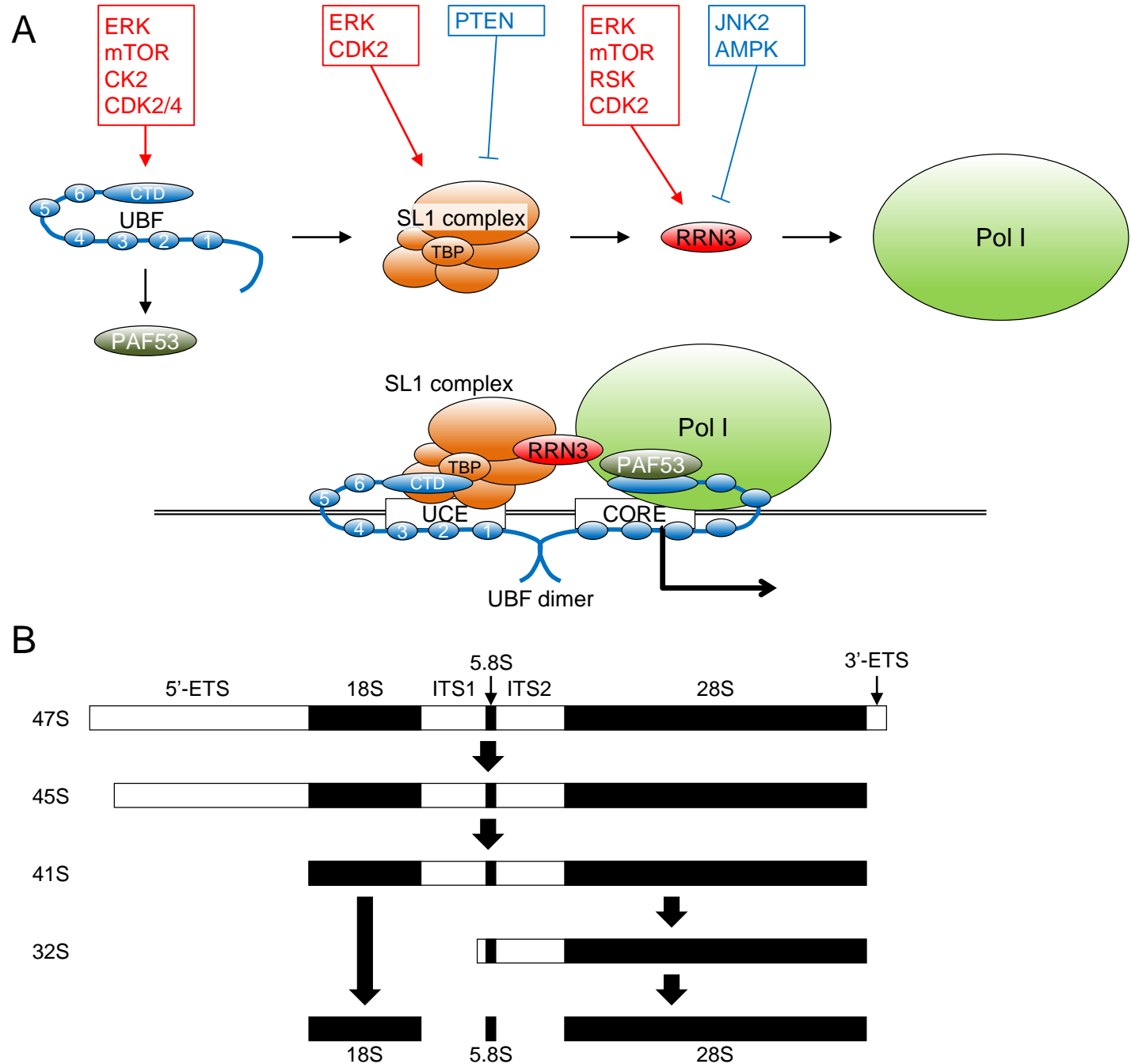


図4 転写開始複合体の形成とrRNAプロセッシングの過程

(A) 転写開始複合体を表したモデル図。転写開始複合体は、rRNA遺伝子のupstream control element (UCE) 領域から core promoter (CORE) 領域にかけて形成される。転写開始複合体の主な構成因子は、UBF、SL1複合体、RRN3、そしてPol Iである。細い黒い矢印は結合関係を表している。赤で示したものはrRNA転写を活性化するシグナル、そして青で示したものはrRNA転写を抑制するシグナルを示している。ERK, extracellular signal-regulated kinase; mTOR, mammalian target rapamycin; CK2, casein kinase 2; CDK, cyclin-dependent kinase; PTEN, phosphatase and tensin homolog; RSK, ribosomal S6 kinase; JNK, c-JUN N-terminal kinase; AMPK, AMP-activated protein kinase; RNA polymerase I-associated factors: PAF53, RRN3。 (B) rRNAプロセッシングの過程。ヒトrRNA遺伝子から転写された47S rRNA前駆体は、small nucleolar RNP (snoRNP) による2'-O-メチル化や偽ウリジン化といった化学修飾を受けて、U3 snoRNPなどによって切断され、成熟した18S、5.8S、そして28S rRNAが完成する。

Nucleolar Dynamics (1)

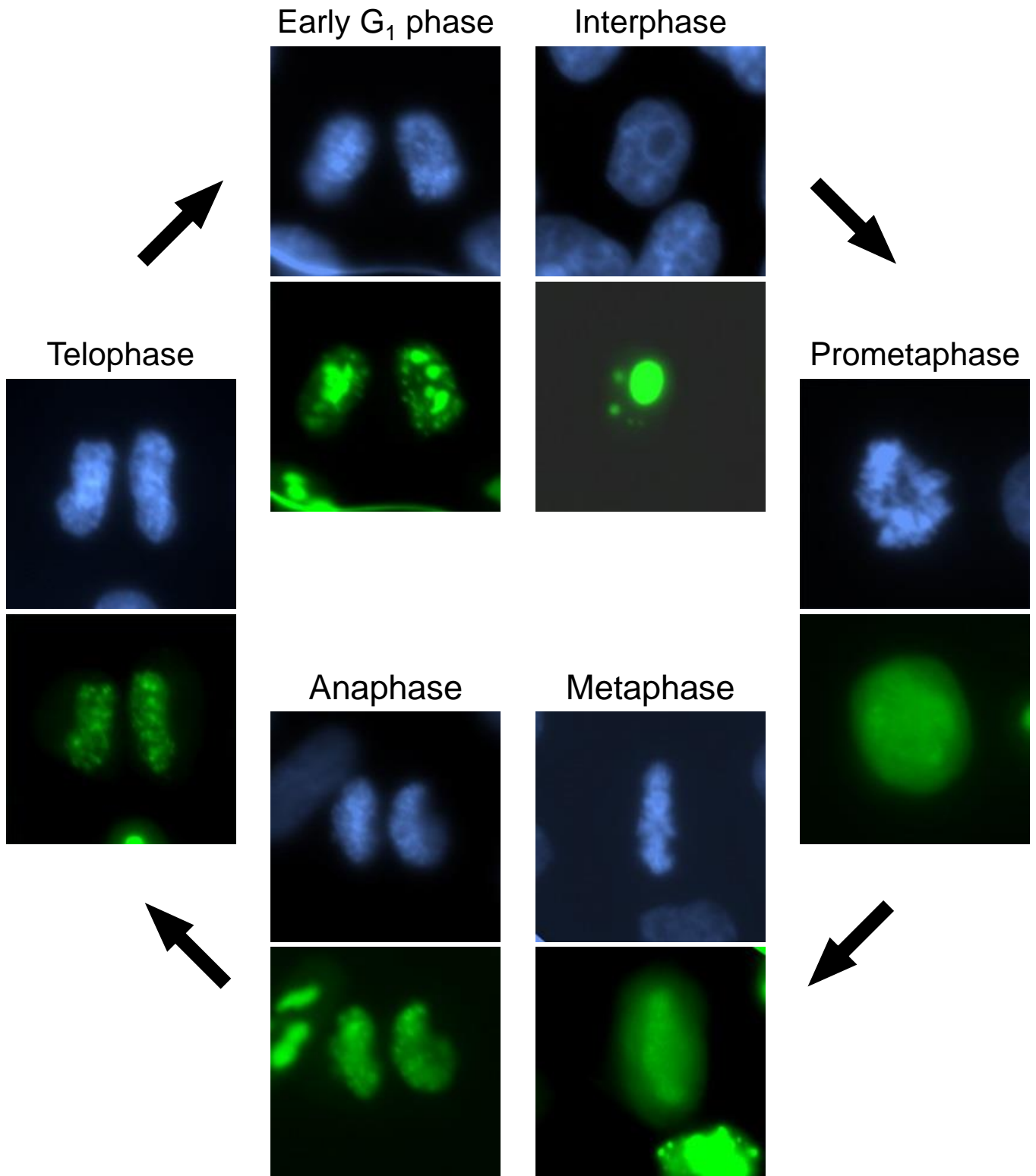
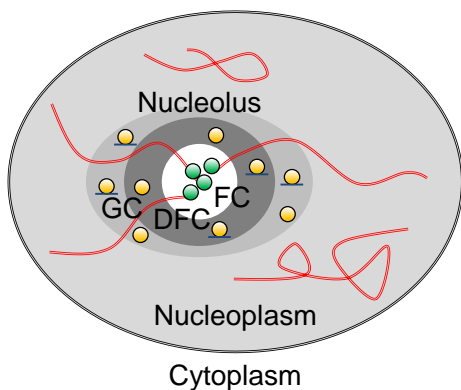


図5 細胞周期を通じた核小体構造の変化

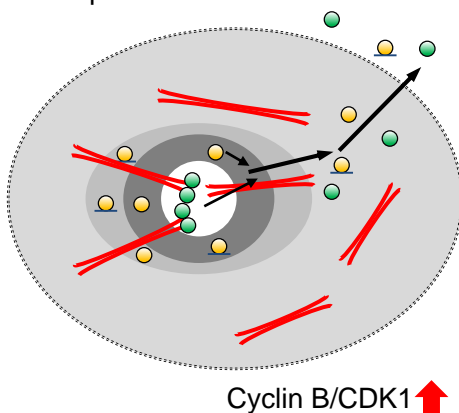
核小体は細胞周期を通じてダイナミックに構造変化する。蛍光タンパク質GFP (green fluorescence protein) が融合した核小体タンパク質B23が発現しているヒト子宮頸がん細胞HeLa細胞を用いて、各細胞周期のB23の局在を示した。核小体は間期において明瞭に観察できるが、分裂期では拡散し確認できない。分裂期後期から終期にかけて、B23などのRNA-タンパク質複合体 (RNP) はprenucleolar body (PNB) と呼ばれる焦点を形成する。その後、RNPがPNBからNORへ移動し、核小体が形成される。DNAは青色で示している。

Nucleolar Dynamics (2)

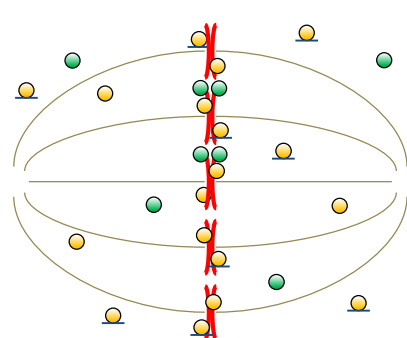
1. Interphase



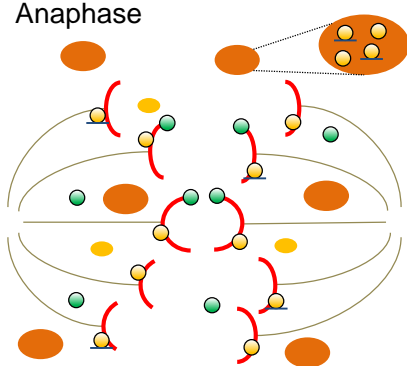
2. Prophase



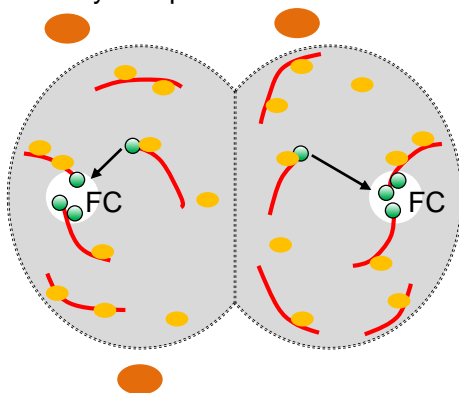
3. Metaphase



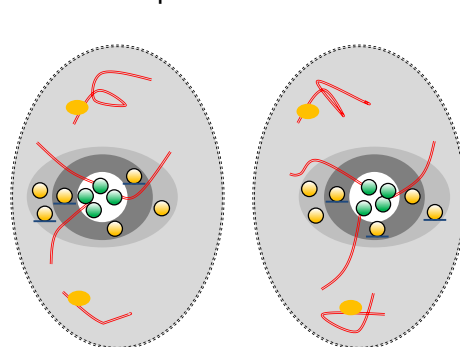
4. Anaphase



5. early Telophase



6. late Telophase



Cyclin B/CDK1 ↓

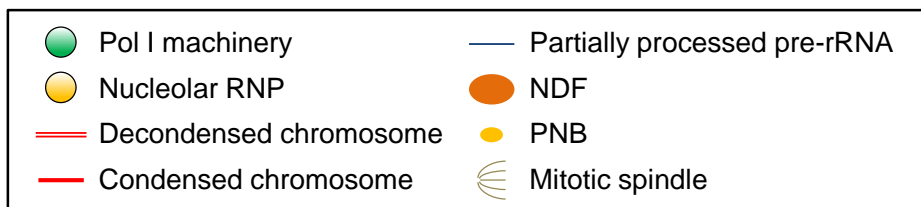


図6 細胞周期を通じた核小体の崩壊と再形成

細胞周期を通じた核小体の崩壊と再形成の様子を表した模式図。(1) 間期ではrRNA遺伝子からrRNA前駆体 (pre-rRNA) が転写され、snoRNPなどによってrRNAプロセッシングが行われ、リボソームアセンブリーが行われる。(2) 前期になると、Cyclin B/CDK1が活性化し、Pol I転写装置をはじめ、多くの核小体RNPがリン酸化修飾を受ける。さらに、多くの核小体タンパク質は、核小体外へ拡散する。この時、プロセッシング途中のrRNA前駆体も核小体RNPと一緒に核小体外へ拡散する。また、染色体の凝縮が起こり、核膜が崩壊する。Pol I転写装置の一部はNOR上に残る。(3) 中期では、核小体RNPは細胞質中に拡散しているものと染色体上に局在しているものが存在する。(4) 後期では、一部の核小体RNPは集合し、nucleolar-derived foci (NDF) が形成される。この頃になると、Cyclin B/CDK1の活性は低下し、核小体タンパク質の脱リン酸化が起こる。(5) 終期初期になるとNDFは消失し、染色体上にはprenucleolar body (PNB) が形成される。NORが集合しFCを形成し、rRNA転写が再開する。(6) 終期後半になると、核膜が再生し、染色体の脱凝縮が起こる。PNBは消失し、初期rRNAプロセッシング因子に続いて後期rRNAプロセッシング因子がNORに集合し、成熟した核小体構造が再形成される。

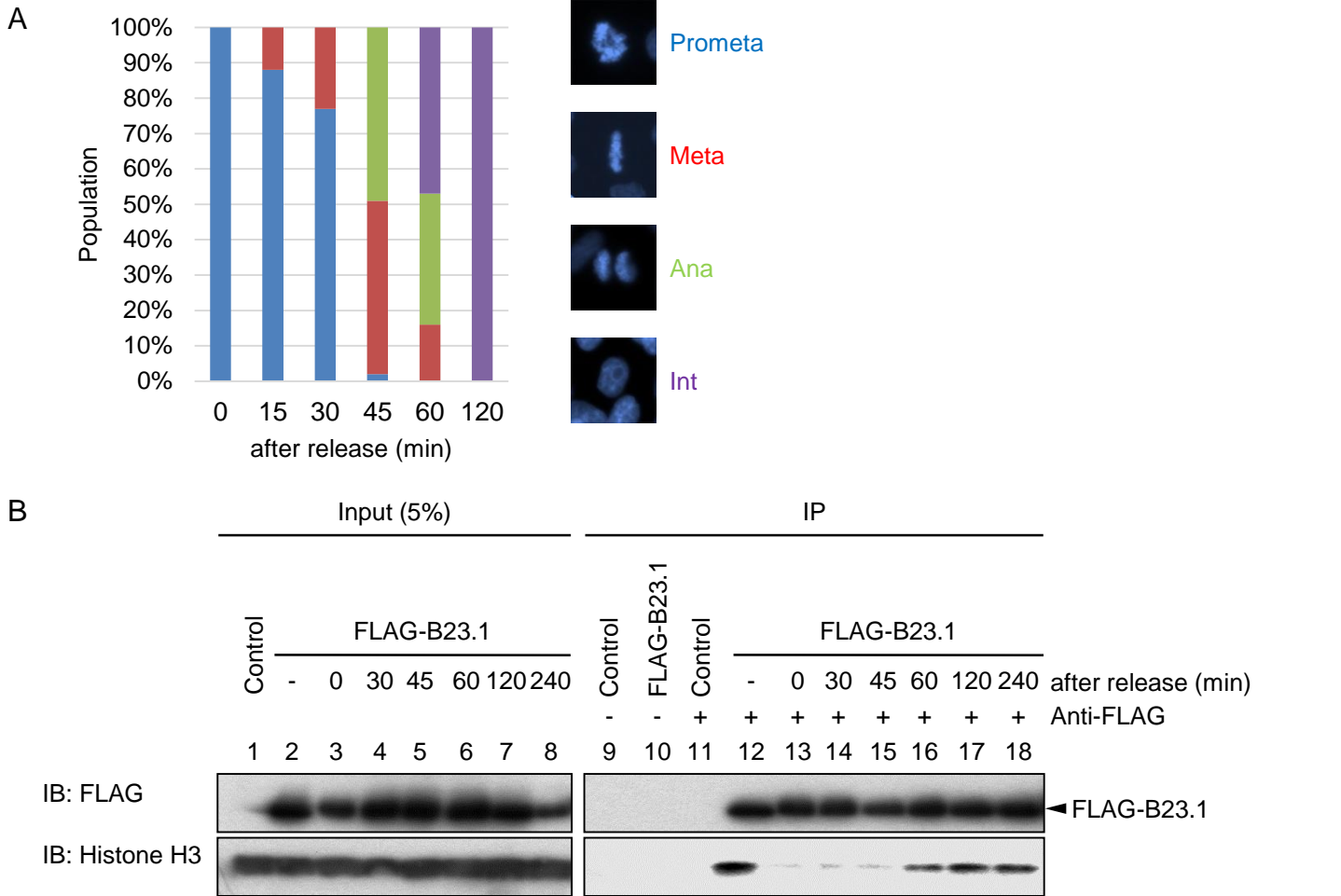


図7 分裂期から間期にかけての核小体RNP B23とHistone H3の結合の経時的変化

(A) 分裂期同調を解除した後の細胞周期の経時的変化。FLAG-B23.1を安定発現しているHeLa細胞をG₂/M期に同調し、分裂期の細胞のみを回収した。回収した細胞をnocodazole非存在下の培地に撒くことで細胞周期を再開させ、0、15、30、45、60、120、そして240分後に細胞を一部回収した。細胞のDNAをDAPIで染色し、その染色体の形態を基に各段階の細胞周期の割合を計測した。(B) 分裂期から間期にかけてのB23とHistone H3の結合。同調を解除して、0 (レーン3と13)、30 (レーン4と14)、45 (レーン5と15)、60 (レーン6と16)、120 (レーン7と17)、そして240 (レーン8と18) 分後に細胞を回収し、細胞溶解液を調製し、抗FLAG抗体で免疫沈降 (IP) を行った。Inputとしての細胞溶解液 (レーン1-8) および沈降産物 (レーン9-18) をSDS-PAGEで展開後、上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。コントロールとして非同調のFLAG-B23.1発現HeLa細胞 (レーン2、10、そして12) およびHeLa細胞 (レーン1、9、そして11) を用いた。

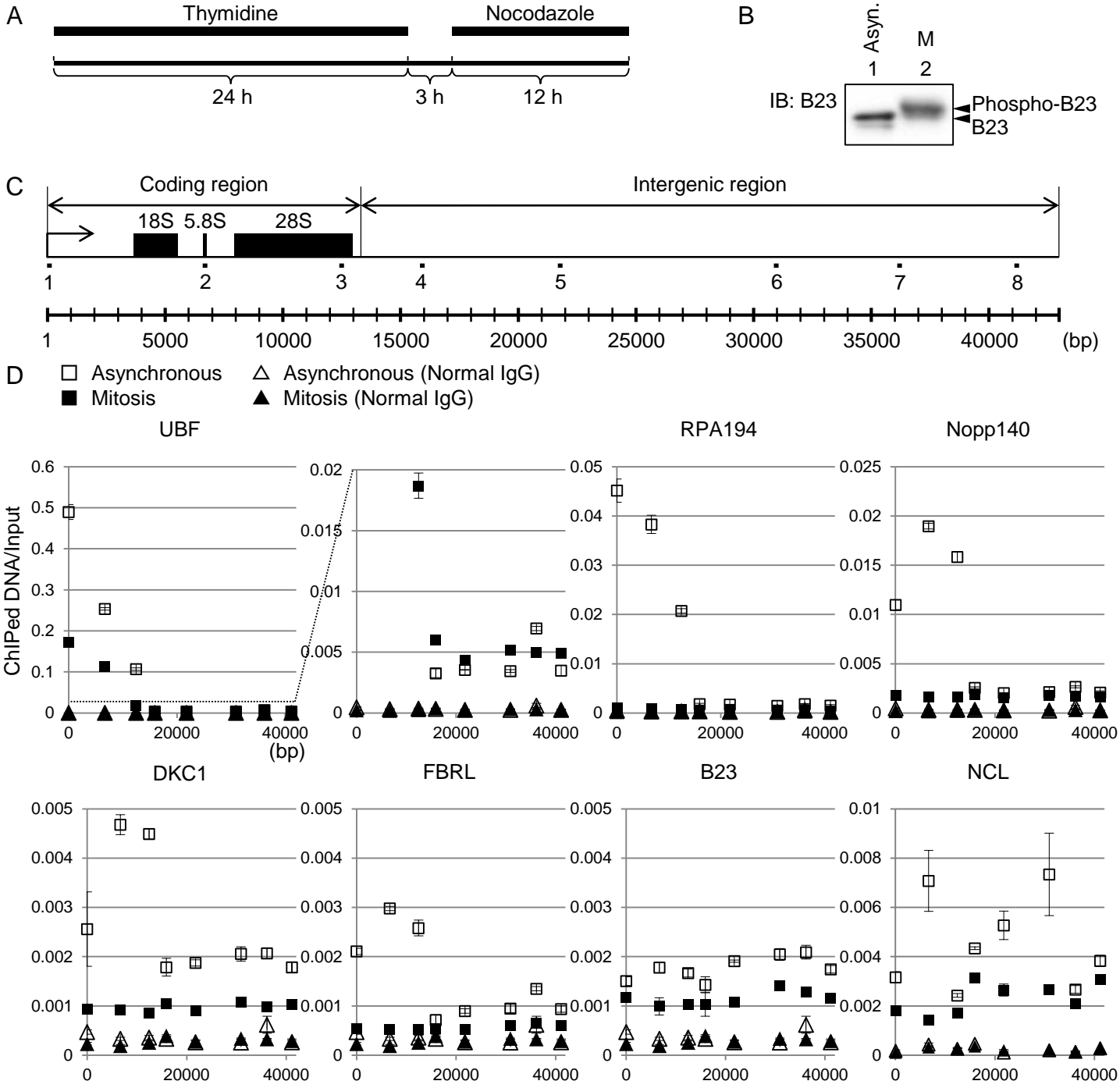
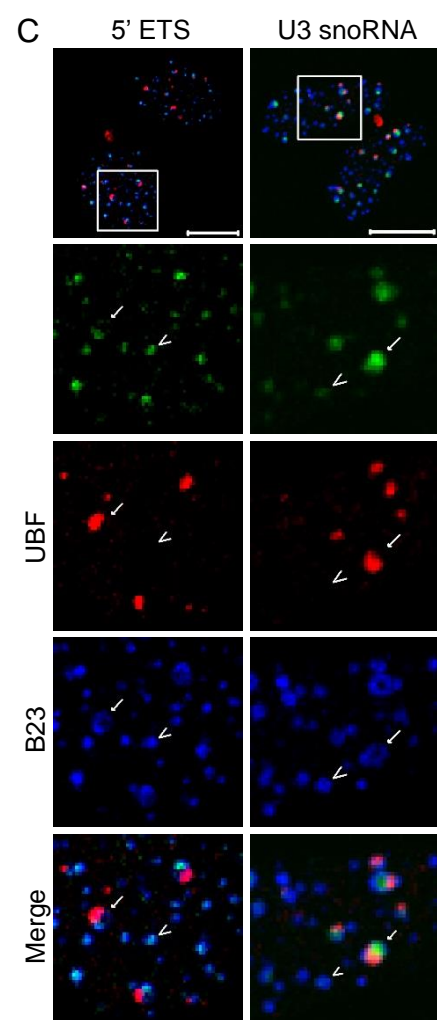
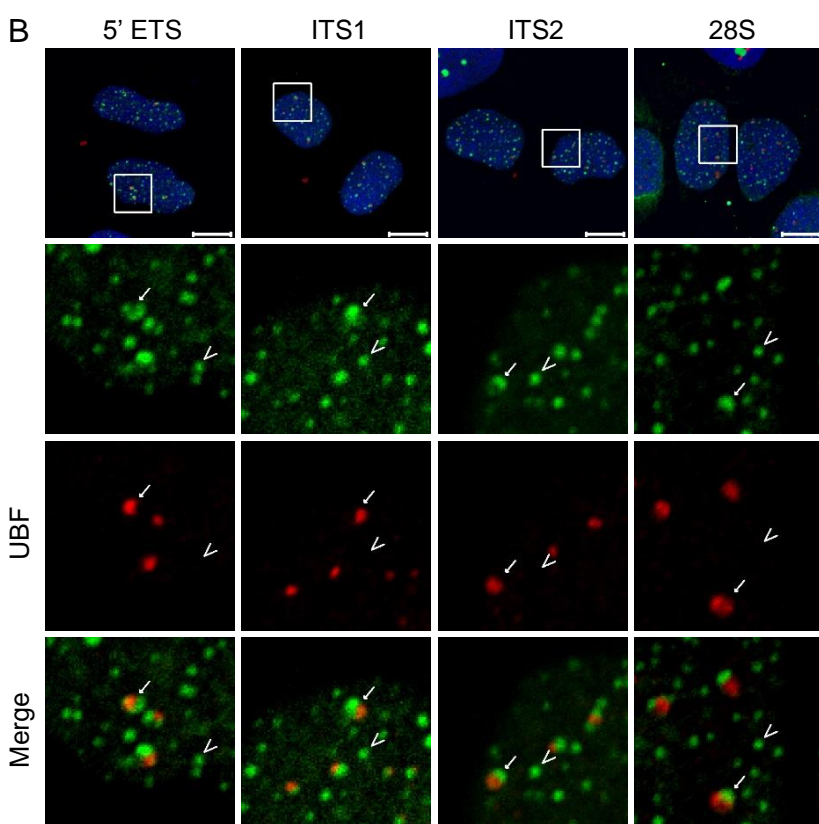
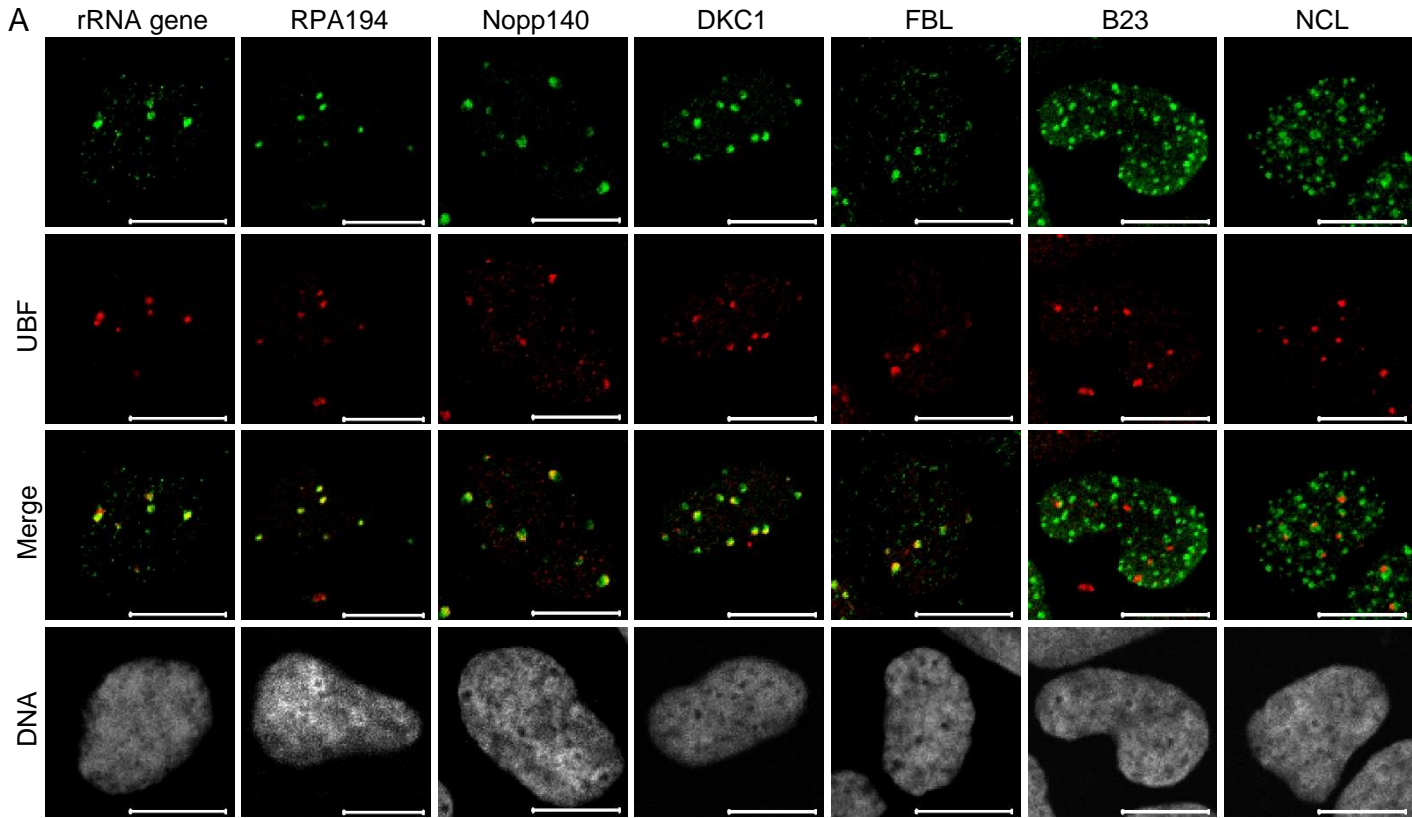


図8 間期および分裂期における核小体タンパク質とr-chromatinの結合

(A) 分裂期同調の方法。HeLa細胞をG₁/S期に同調した。細胞をG₁/S期から解除して3時間後に0.5 μg/mL nocodazole存在下でさらに12時間培養しG₂/M期に同調した。(B) 分裂期特異的なリン酸化型B23の検出。G₂/M期同調後の細胞溶解液を用いてWestern blottingにてB23を検出した。(C) クロマチン免疫沈降後のPCRに用いたプライマーセットの場所。プライマーセットはヒトrRNA遺伝子プロモーター領域(領域1)、転写領域(領域2と3)、そして遺伝子間領域(領域4-8)に対応する。(D) 核小体タンパク質とr-chromatinの結合。非同調あるいはG₂/M期同調したHeLa細胞と、上記の核小体タンパク質に対応する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。コントロールとしてウサギとマウスのnormal IgGを用いた。沈降産物からDNAを抽出後、パネルCに示したプライマーセットを用いて定量PCRを行った。白四角と白三角は非同調細胞を、黒四角と黒三角はG₂/M期同調した細胞をそれぞれ表している。x軸は1ユニットのrRNA遺伝子の場所を、y軸は沈降したDNA量をInput DNA量(10%)で割った値をそれぞれ表している。実験は独立して2回行った。エラーバーはそのうち1回の実験における3サンプルの値から算出した標準偏差値を表している。



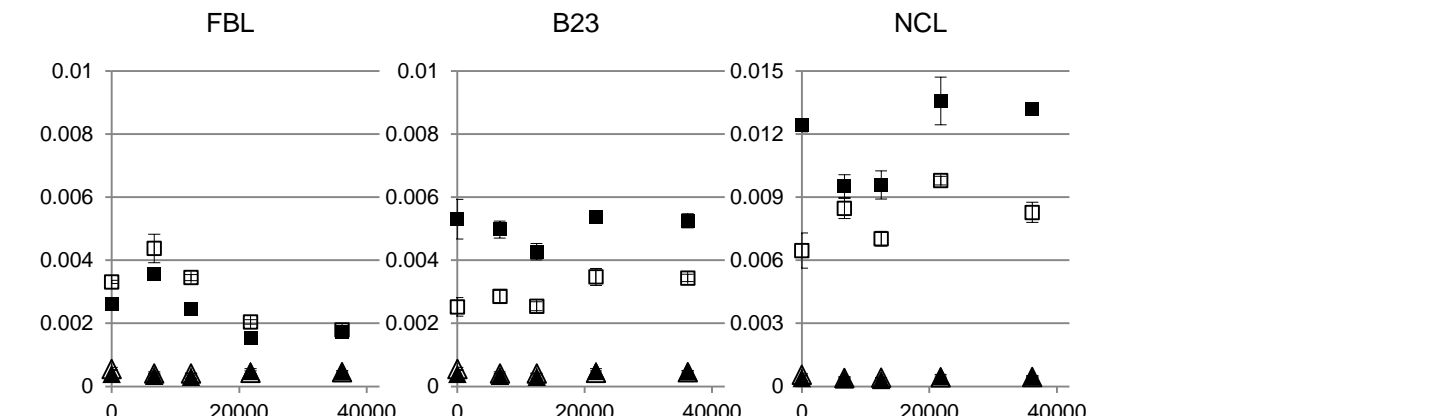
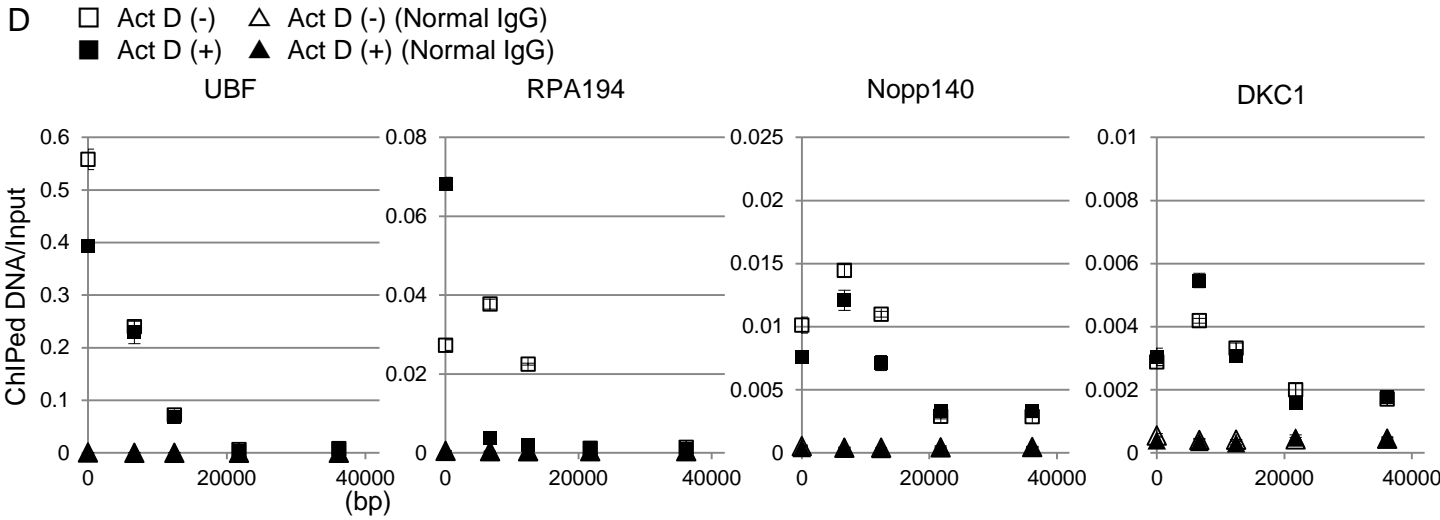


図9 分裂期から間期にかけて起こるrRNA転写の再開を阻害した際の核小体タンパク質とr-chromatinの結合

(A) rRNA転写の再開を阻害した際のrRNA遺伝子および核小体タンパク質の細胞内局在。分裂期後のrRNA転写の再開を阻害するために、以下の方法で細胞を処理した。図6Aと同様にU-2 OS細胞をG₂/M期に同調した。G₂/M期から解除する1時間前に0.05 μg/mL actinomycin D (Act D) 存在下で培養し、解除後も同濃度のAct D存在下で3時間培養した。rRNA遺伝子は蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization、FISH) 法にて検出した。核小体タンパク質は間接蛍光抗体法にて検出した。DNAはTO-PRO-3 iodideで検出した (灰色)。MergeパネルはrRNA遺伝子または核小体タンパク質 (緑色) とUBF (赤色) の局在を表している。スケールは10 μm。(BとC) rRNA転写の再開を阻害した際のrRNA前駆体またはU3 snoRNAの細胞内局在。パネルAと同じ処理を施したU-2 OS細胞を用いて、それぞれのrRNA遺伝子領域またはU3 snoRNA遺伝子領域に対応したプローブを用いてrRNA前駆体またはU3 snoRNA (緑色) をFISH法にて検出した。最上部のパネルの四角で囲った部分を、その下のパネルに拡大した。DNAはTO-PRO-3 iodideで検出した (青色; パネルBのみ)。MergeパネルはrRNA前駆体またはU3 snoRNA (緑色)、UBF (赤色)、そしてB23 (青色; パネルCのみ) の局在を表している。Arrowとarrow-headは、segregated nucleoliとPNBをそれぞれ表している。スケールは10 μm。

(D) rRNA転写の再開を阻害した際の核小体タンパク質とr-chromatinの結合。パネルAと同じ処理を施したHeLa細胞 (Act D 処理をした細胞としなかった細胞) を用いて、上記の核小体タンパク質に対応する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。コントロールとしてウサギとマウスのnormal IgGを用いた。沈降産物からDNAを抽出後、図8Cに示したプライマーセット (領域1、2、3、5、そして7) を用いてPCRを行った。白四角と白三角はAct D処理をしなかった細胞を、黒四角と黒三角はAct D処理をした細胞をそれぞれ表している。x軸は1ユニットのrRNA遺伝子の場所を、y軸は沈降したDNA量をInput DNA量 (10%) で割った値をそれぞれ表している。実験は独立して2回行った。エラーバーはそのうち1回の実験における3サンプルの値から算出した標準偏差値を表している。

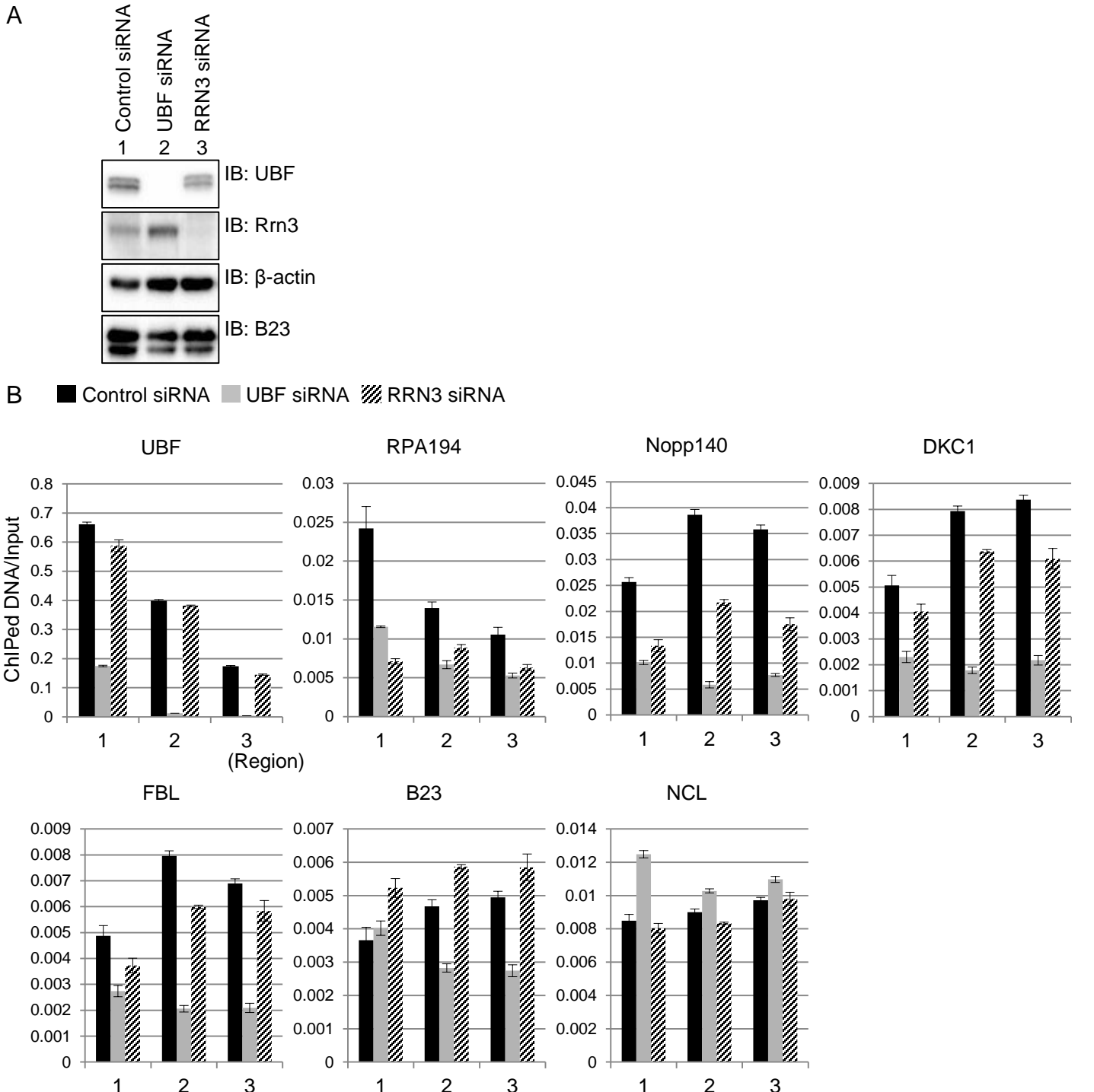


図10 転写因子UBFまたは転写開始因子RRN3をノックダウンした際の核小体タンパク質とr-chromatinの結合

(A) UBFおよびRRN3の発現量。Control (レーン1)、UBF (レーン2)、またはRRN3 siRNA (レーン3) をHeLa細胞に導入し、72時間後に細胞溶解液を調製した。細胞溶解液をSDS-PAGEで展開後、上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。(B) UBFまたはRRN3をノックダウンした際の核小体タンパク質とr-chromatinの結合。Control (黒四角)、UBF (灰色四角)、またはRRN3 siRNA (斜線四角) をHeLa細胞に導入し、72時間後に上記の核小体タンパク質に対応する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。コントロールとしてウサギとマウスのnormal IgGを用いた。沈降産物からDNAを抽出後、図8Cに示したプライマーセット (領域1、2、そして3) を用いてPCRを行った。x軸はPCRで検出したrRNA遺伝子の領域を、y軸は沈降したDNA量をInput DNA量 (10%) で割った値をそれぞれ表している。実験は独立して2回行った。エラーバーはそのうち1回の実験における3サンプルの値から算出した標準偏差値を表している。

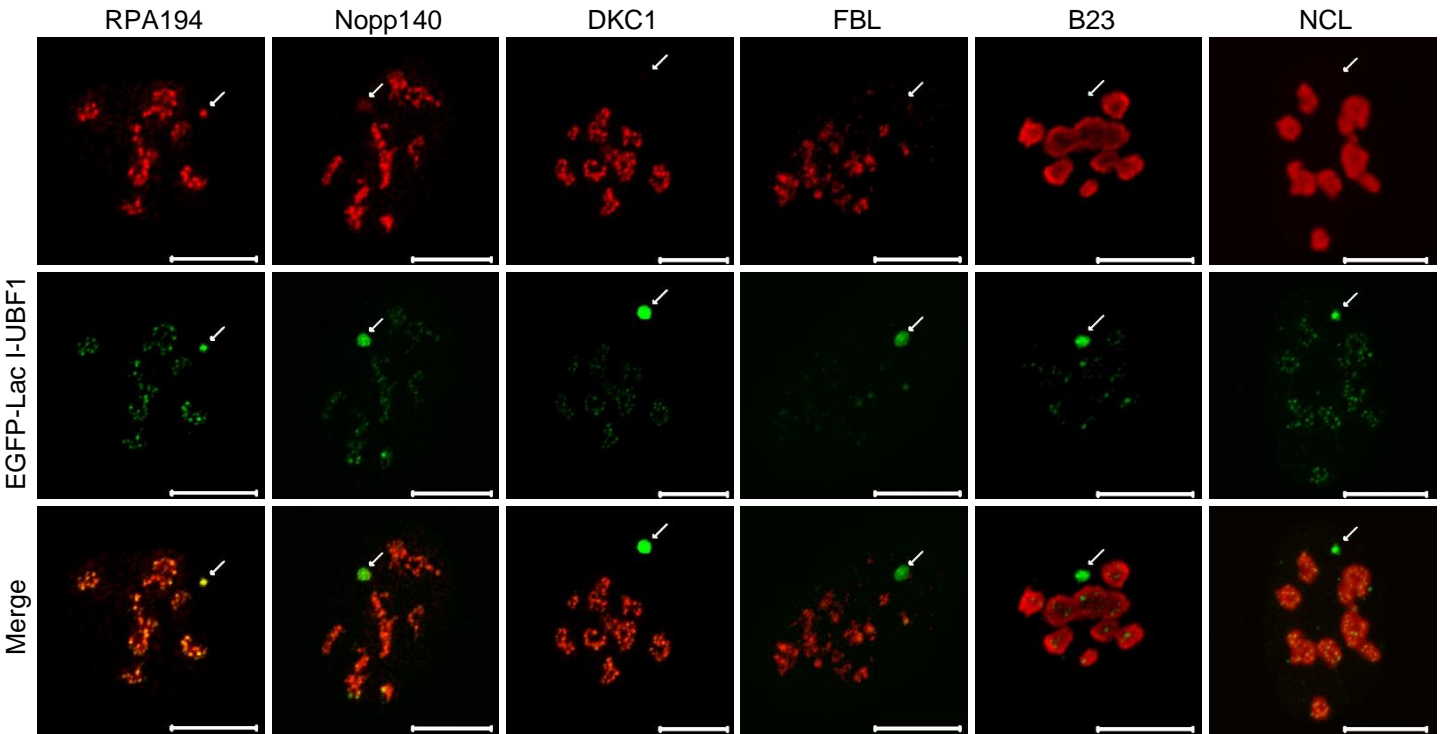


図11 NOR以外の染色体上に強制的に局在させたUBFと核小体タンパク質の細胞内局在

GFPとlac repressor (LacI) が融合したUBF1を、lac operator (LacO) 配列が第1番目染色体に組み込まれたU-2 OS細胞 (U2OS 2-6-3細胞) に導入し、42時間後に核小体タンパク質を間接蛍光抗体法にて検出した。MergeパネルはGFP-LacI-UBF1 (緑色) と核小体タンパク質 (赤色) の局在を表している。ArrowはGFP-LacI-UBF1が局在している場所 (LacO配列の場所) を指している。スケールは10 μ m。

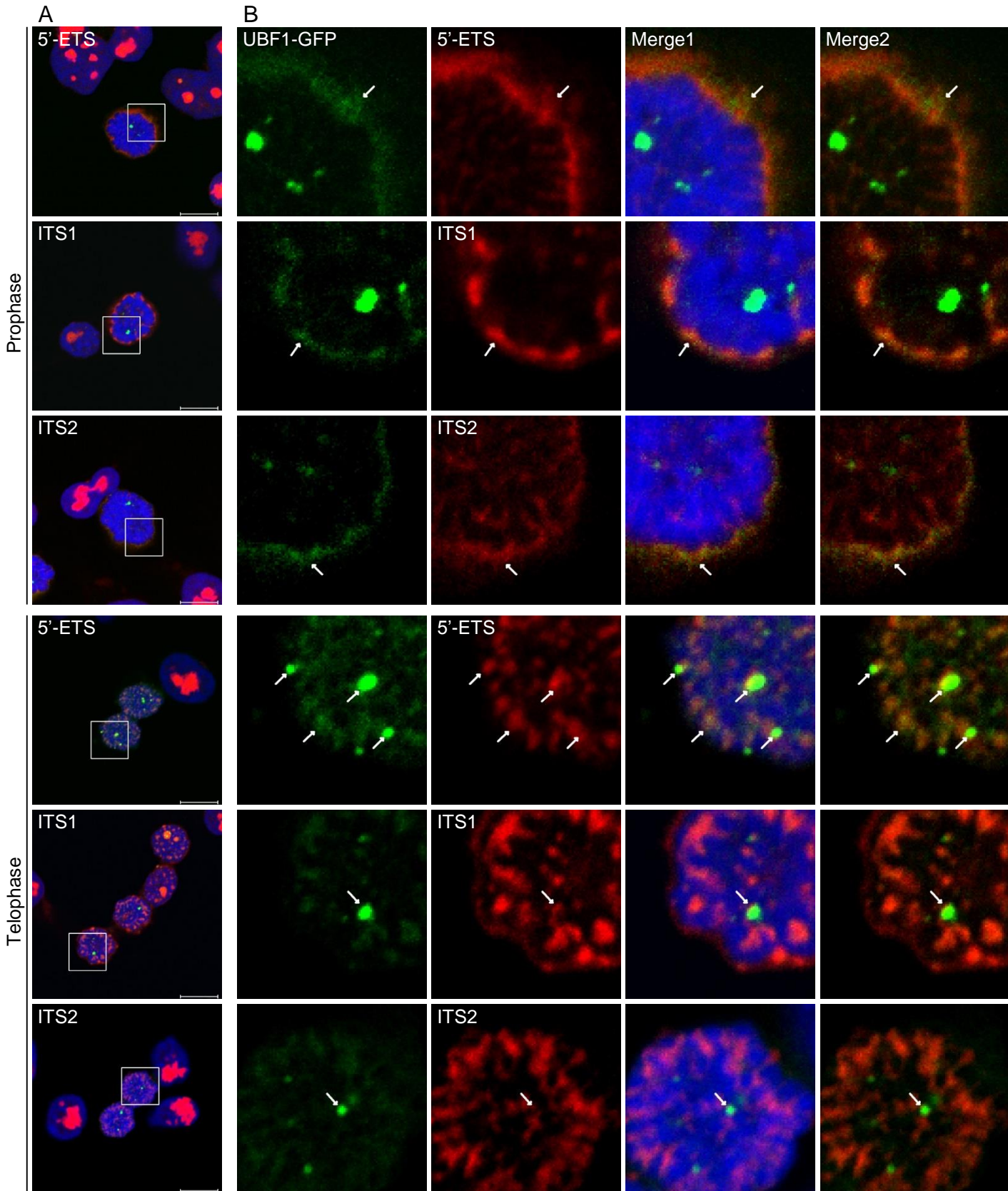


図12 分裂期細胞におけるUBFとrRNA前駆体の細胞内局在

(A) GFPが融合したUBF1を安定発現しているHeLa細胞を用いて、前期または終期におけるUBF1-GFP (緑色) とそれぞれのrRNA遺伝子領域に対応したプローブを用いてrRNA前駆体(赤色) をFISH法にて検出した。DNAはTO-PRO-3 iodideで検出した (青色)。スケールは10 μ m。 (B) パネルAの四角で囲った部分を拡大したもの。Merge1パネルはUBF1-GFP、rRNA前駆体、そしてDNAを、Merge2パネルはUBF1-GFPとrRNA前駆体の局在をそれぞれ表している。ArrowはUBF1-GFPとrRNA前駆体の共局在をそれぞれ指している。

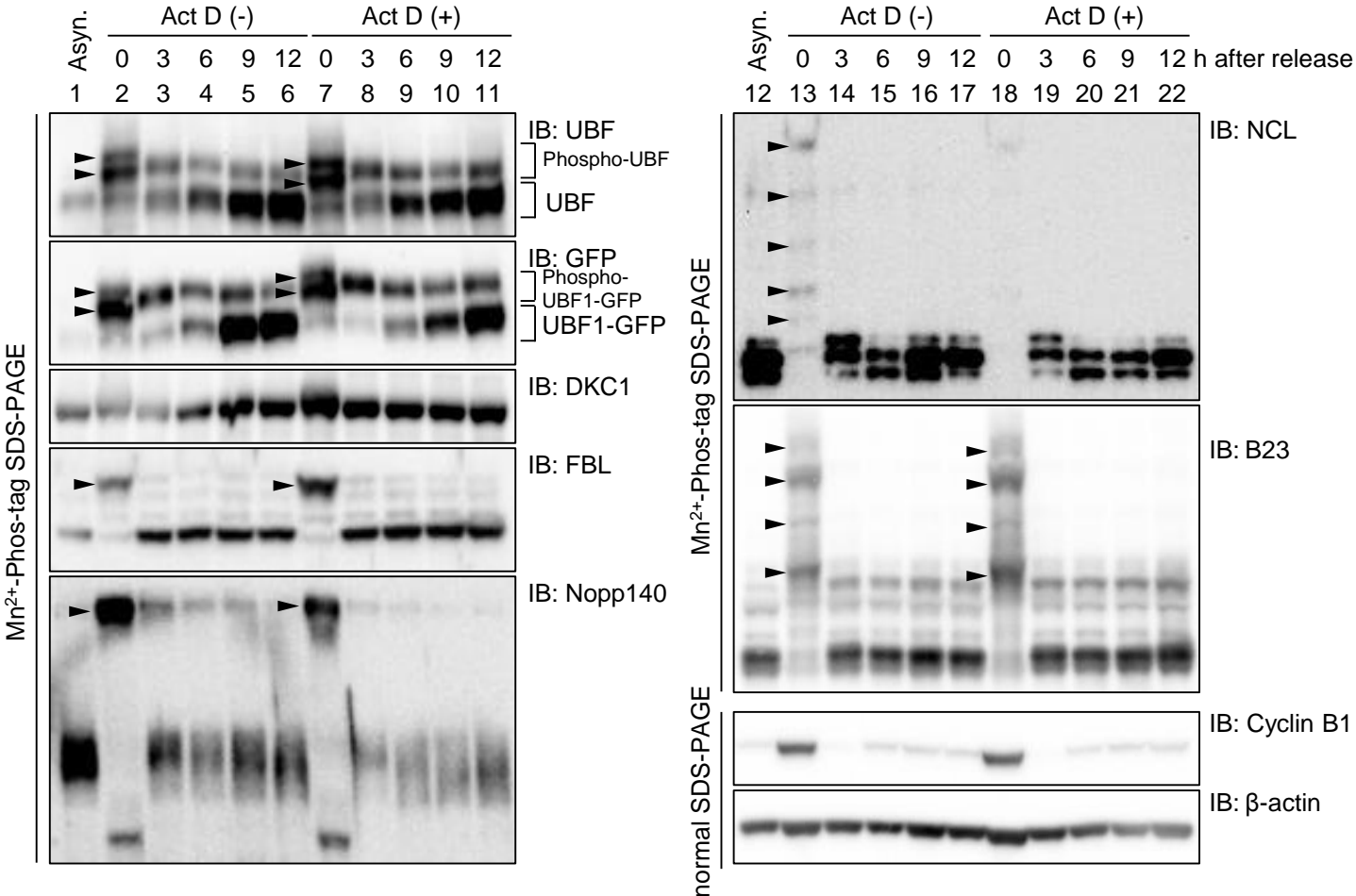


図13 分裂期から間期にかけて起こるrRNA転写の再開を阻害した際の核小体タンパク質のリン酸化修飾

rRNA転写の再開を阻害した際の核小体タンパク質の検出。UBF1-GFPを安定発現しているHeLa細胞を図9と同じ処理を施しG₂/M期に同調し、分裂期の細胞のみを回収した。回収した細胞をnocodazole非存在下の培地に撒くことで細胞周期を再開させ、0、3、6、9、そして12時間後に細胞を回収した。非同調細胞（レーン1と12）、Act D処理をしなかった細胞（レーン2-6と13-17）とAct D処理をした細胞（レーン7-11と18-22）から細胞溶解液を調製した。細胞溶解液をMn²⁺-Phos-tag SDS-PAGEまたはnormal SDS-PAGEで展開後、上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。黒矢印は分裂期特異的なリン酸化型を指している。Act D処理をした細胞の0時間において、NCLが検出されなかったのは手技的な誤差である（レーン18）。各レーンに展開した細胞溶解液の量は2.5 × 10⁴個分の細胞数に相当する。

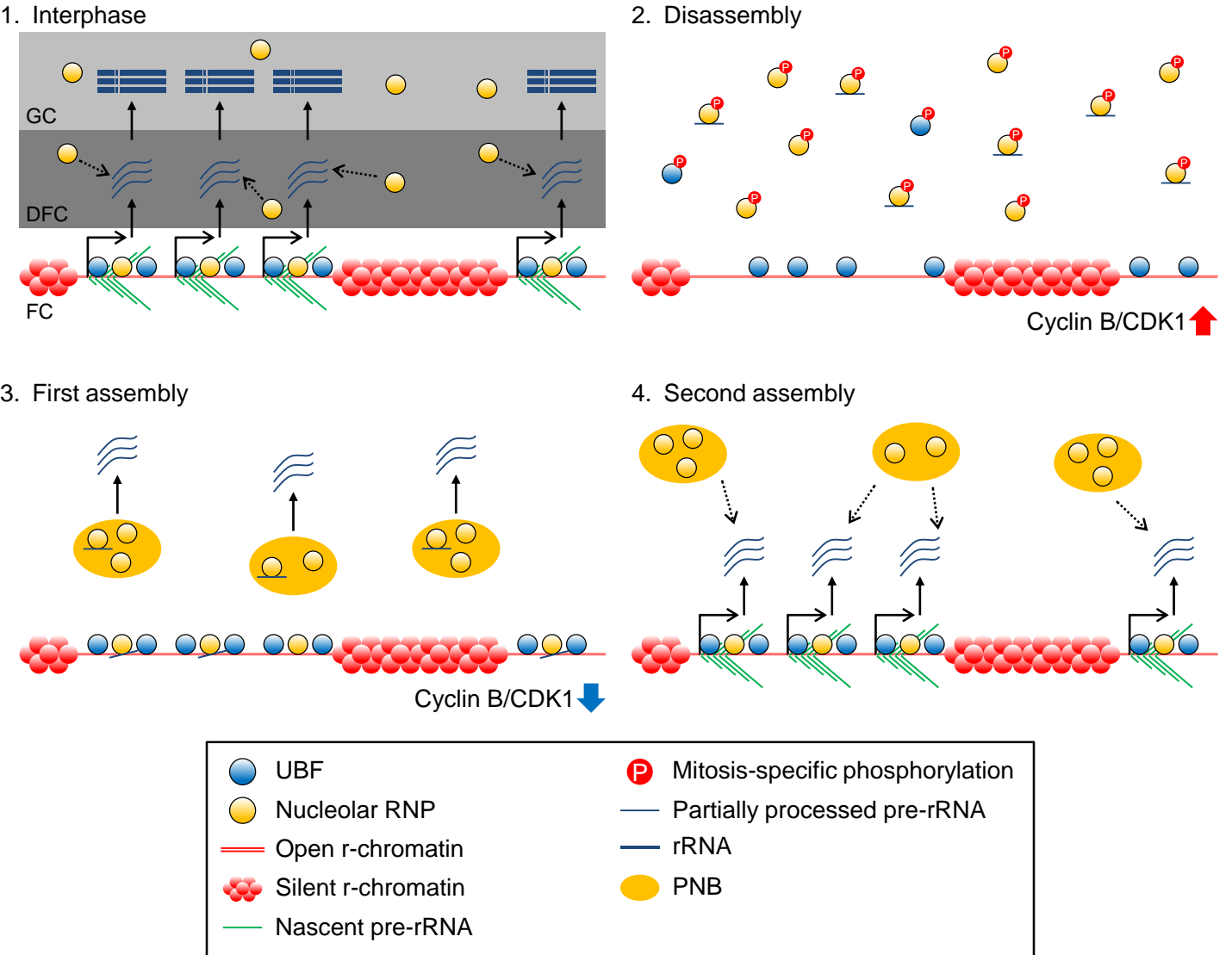


図14 UBFによる核小体の崩壊と再形成の制御（仮説モデル）

核小体の崩壊と再形成の様子を表した仮説モデルの模式図。(1) 間期では活性化されたrRNA遺伝子からrRNA前駆体が転写され、rRNAプロセッシングおよびリボソームアセンブリーが行われる。核小体RNPにはr-chromatinに結合しているものと、DFCやGCに局在しているものが存在する。(2) 分裂期になると、UBFや核小体RNPはCyclin B/CDK1によりリン酸化され、r-chromatinから解離する。一方で、UBFの一部はr-chromatinと結合している。UBFがr-chromatinに結合することで、その領域はopenな構造を維持することができる。(3) 分裂期終期になりUBFや核小体RNPのリン酸化が解除されると、UBFはNORに集合し、核小体RNPの一部はPNBを形成し、一部はUBFによって保たれているopenなr-chromatinと再び結合する（一次集合）。PNBでは分裂期に持ち越したrRNA前駆体のプロセッシングが起こる (Carron et al., 2012)。このとき、rRNA転写はまだ再開していない。(4) rRNA転写が再開しrRNA前駆体が新規合成されると、PNBに残っている核小体RNPがrRNA前駆体に集合し（二次集合）、やがて3層から成る成熟した核小体構造が再形成される。

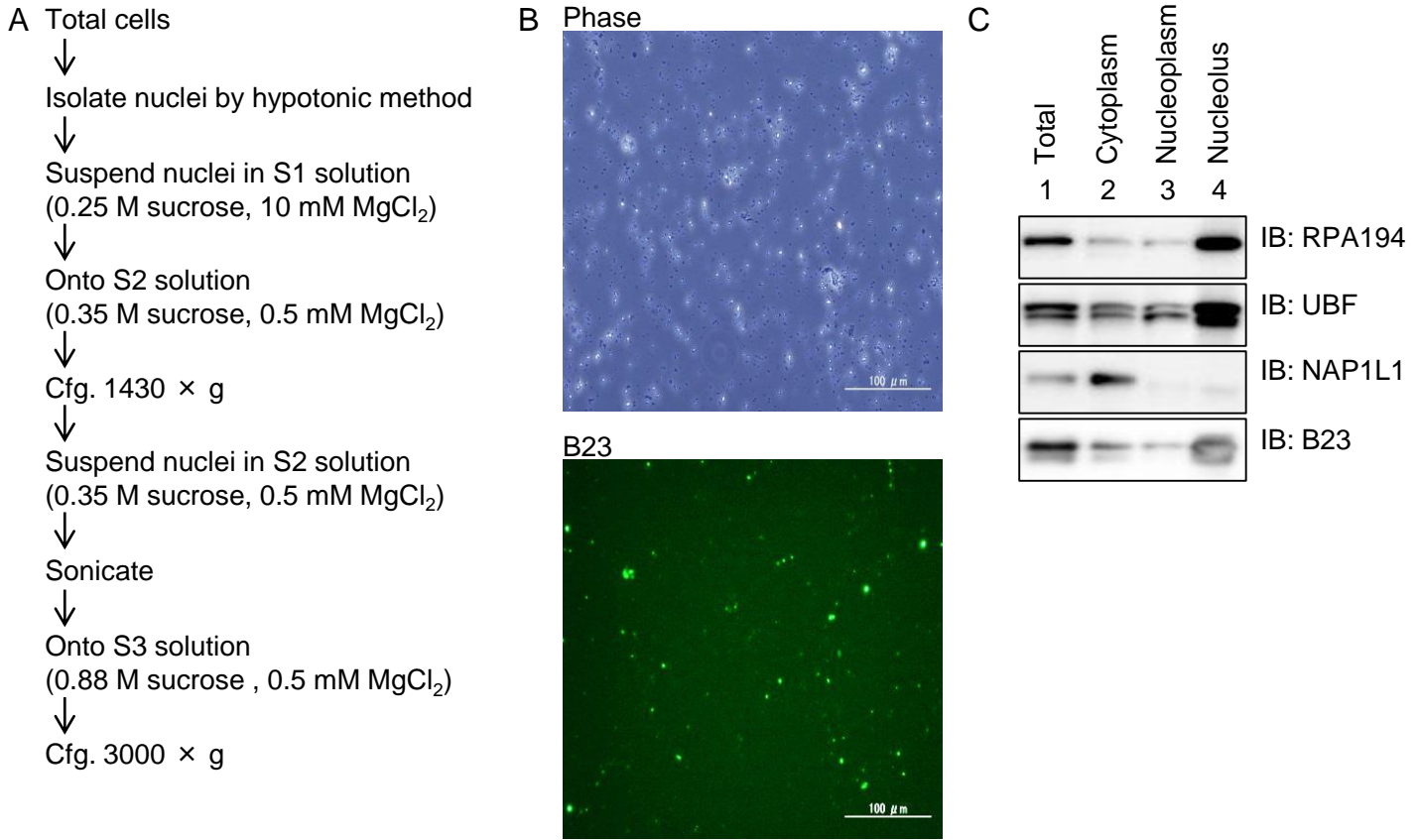
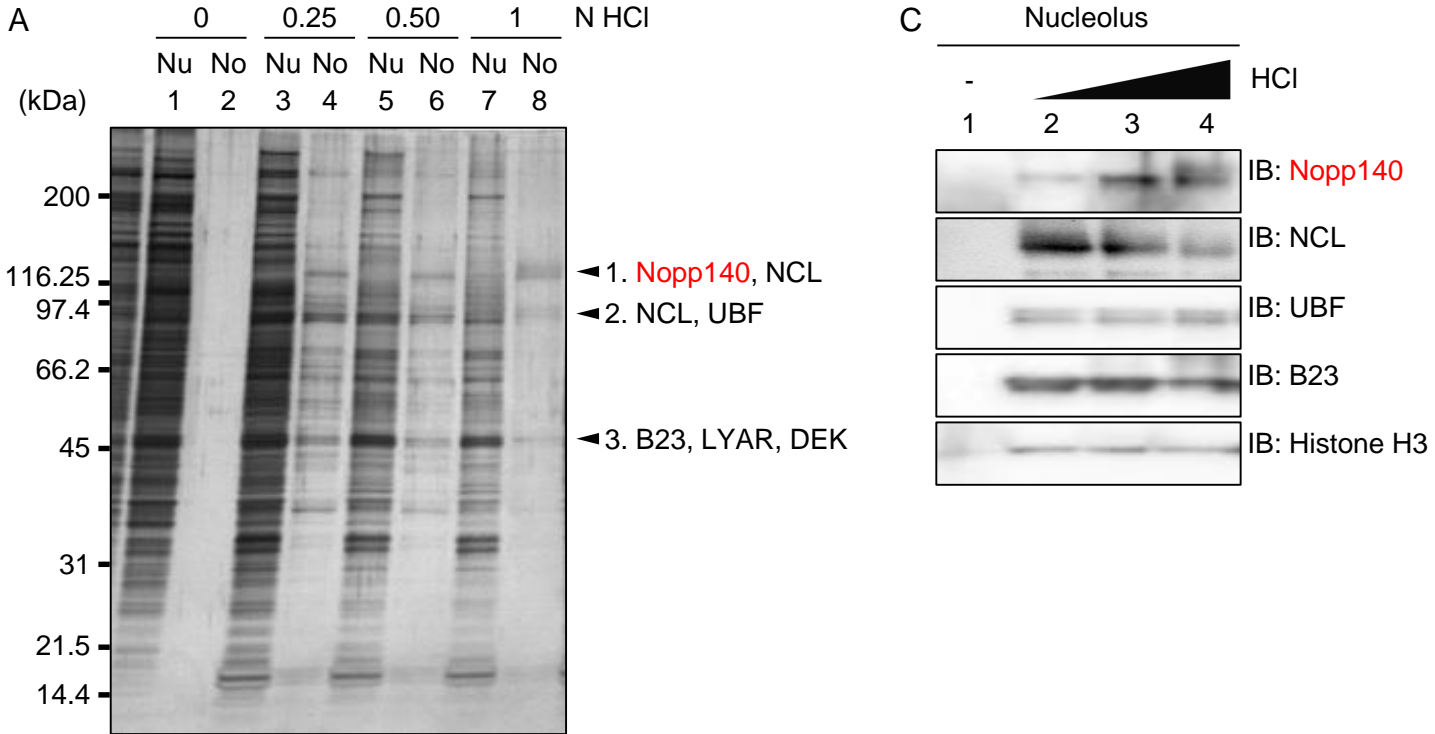


図15 核小体の単離

(A) 核小体の単離手順。まず、HeLa細胞を低調処理しホモジナイズした後に、遠心分離で異なる濃度のシヨ糖溶液を通過させ核を単離した。次に、MgCl₂を含むシヨ糖溶液中で超音波処理し核小体を露出させた。最後に、遠心分離で異なる濃度のシヨ糖溶液を通過させ核小体を単離した。(B) 単離した核小体。GFPが融合したB23.1を安定発現しているHeLa細胞から核小体を単離し、最終産物を蛍光顕微鏡下で観察した。上と下のパネルはそれぞれ、明視野とGFP-B23.1の局在を表している。単離された核小体が緑色に光っている。スケールは100 μm。(C) HeLa細胞から単離した核小体の溶解液をSDS-PAGEで展開後、上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。Total画分(レーン1)は低調処理する前の画分を、cytoplasm画分(レーン2)は核単離後の上清画分を、nucleoplasm画分(レーン3)は核小体単離後の上清画分を、そしてnucleolus画分(レーン4)は最終沈降画分をそれぞれ用いた。各レーンに展開した溶解液の量は5 μgのタンパク質量に相当する。NAP1L1は細胞質画分のマーカータンパク質。



B

	Protein names	Mass (Da)	Score
1	Histone H4	11360	157
	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Nopp140)	73560	118
	Nucleolin (NCL)	76625	49
	60S ribosomal protein L23	14970	44
	Teneurin-3	305093	42
2	Histone H4	11360	87
	Histone H3.1	15509	85
	Nucleophosmin (B23)	32726	66
	Nucleolin (NCL)	76625	62
	UBF1	89692	56
3	Nucleophosmin (B23)	32726	98
	Cell growth-regulating nucleolar protein (LYAR)	44044	77
	DEK	42933	75
	Filaggrin-2	249296	63
	Brain acid soluble protein 1	22680	56

図16 単離した核小体から塩酸抽出された核小体タンパク質の同定

(A) HeLa細胞から単離した核 (レーン1、3、5、そして7) または核小体 (レーン2、4、6、そして8) を、0 (レーン1と2)、0.25 (レーン3と4)、0.5 (レーン5と6)、そして1 N HCl (レーン7と8) で処理し、その上清画分をSDS-PAGEで展開後、銀染色を行った。レーン8において検出された3つのバンドを切り出し、質量分析 (LC-MS/MS) を行い候補となったタンパク質名を右側に示している。左側の数値は分子量マーカ。 (B) パネルAの質量分析の結果。パネルAレーン8で検出された3つのバンドから抽出・同定されたタンパク質のうち、スコアが最も高いものから上位5つを示している。 (C) パネルAの質量分析で同定された核小体タンパク質の検出。HeLa細胞から単離した核小体を、0 (レーン1)、0.25 (レーン2)、0.5 (レーン3)、そして1 N HCl (レーン4) で処理し、その上清画分をSDS-PAGEで展開後、上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。

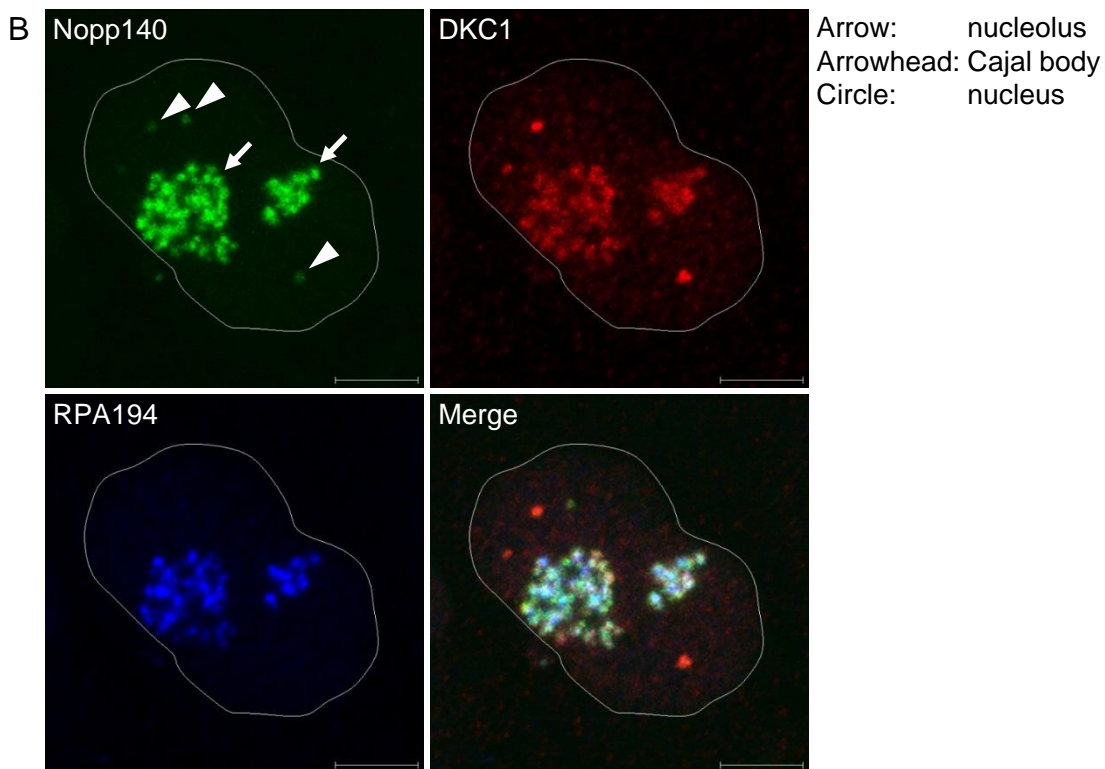
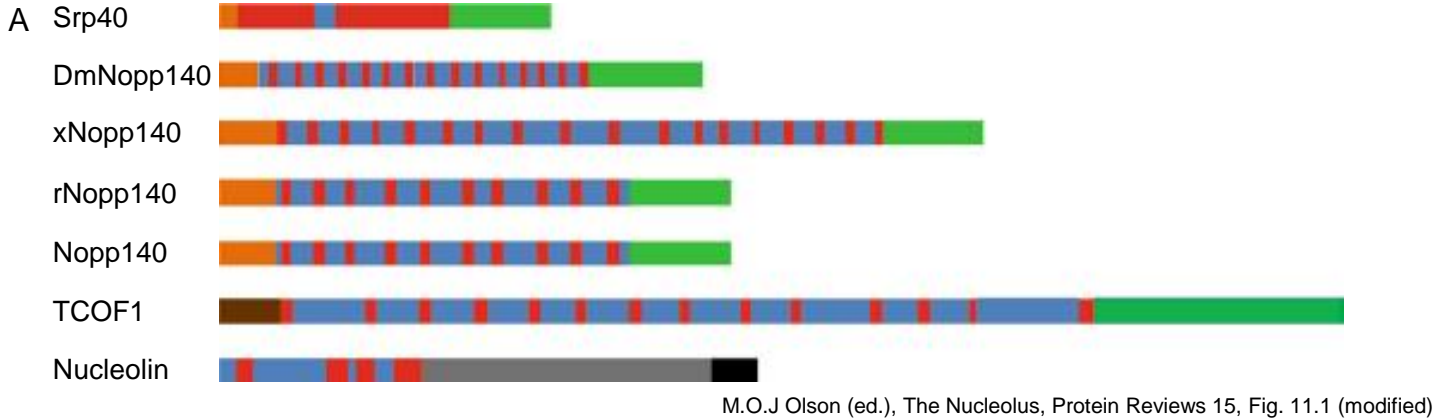


図17 生物間で高度に保存されている分子シャペロンNopp140

(A) Nopp140、TCOF1、そしてNucleolinのドメイン構造を表した模式図。上から順に、酵母Srp40 (Meier, 1996)、シヨウジョウバエDmNopp140-True (Waggener and DiMario, 2002)、アフリカツメガエルxNopp140 (Cairns and McStay, 1995)、ラットrNopp140 (Meier and Blobel, 1992)、ヒトNopp140 (Nomura et al., 1994)、ヒトTCOF1 (So et al., 2004)、そしてヒトNucleolin (Srivastava et al., 1989) をそれぞれ表している。オレンジ色はNopp140タンパク質で保存されているN末端領域を、赤色は酸性領域を、青色は塩基性領域を、緑色はNopp140タンパク質で保存されているC末端領域を、灰色 (ヒトNucleolinのみ) は4つのRNA結合領域を、そして黒色 (ヒトNucleolinのみ) はRGG領域をそれぞれ表している。

(B) ヒトNopp140の細胞内局在。GFPが融合したヒトNopp140を安定発現しているHeLa細胞を用いて、核小体タンパク質を間接蛍光抗体法にて検出した。MergeパネルはGFP-Nopp140 (緑色)、snoRNP DKC1 (赤色)、そしてPol IサブユニットRPA194 (青色) の局在をそれぞれ表している。Arrowは核小体を、arrowheadはCajalボディをそれぞれ指している。円形の白線は核膜を表している。スケールは5 μm 。

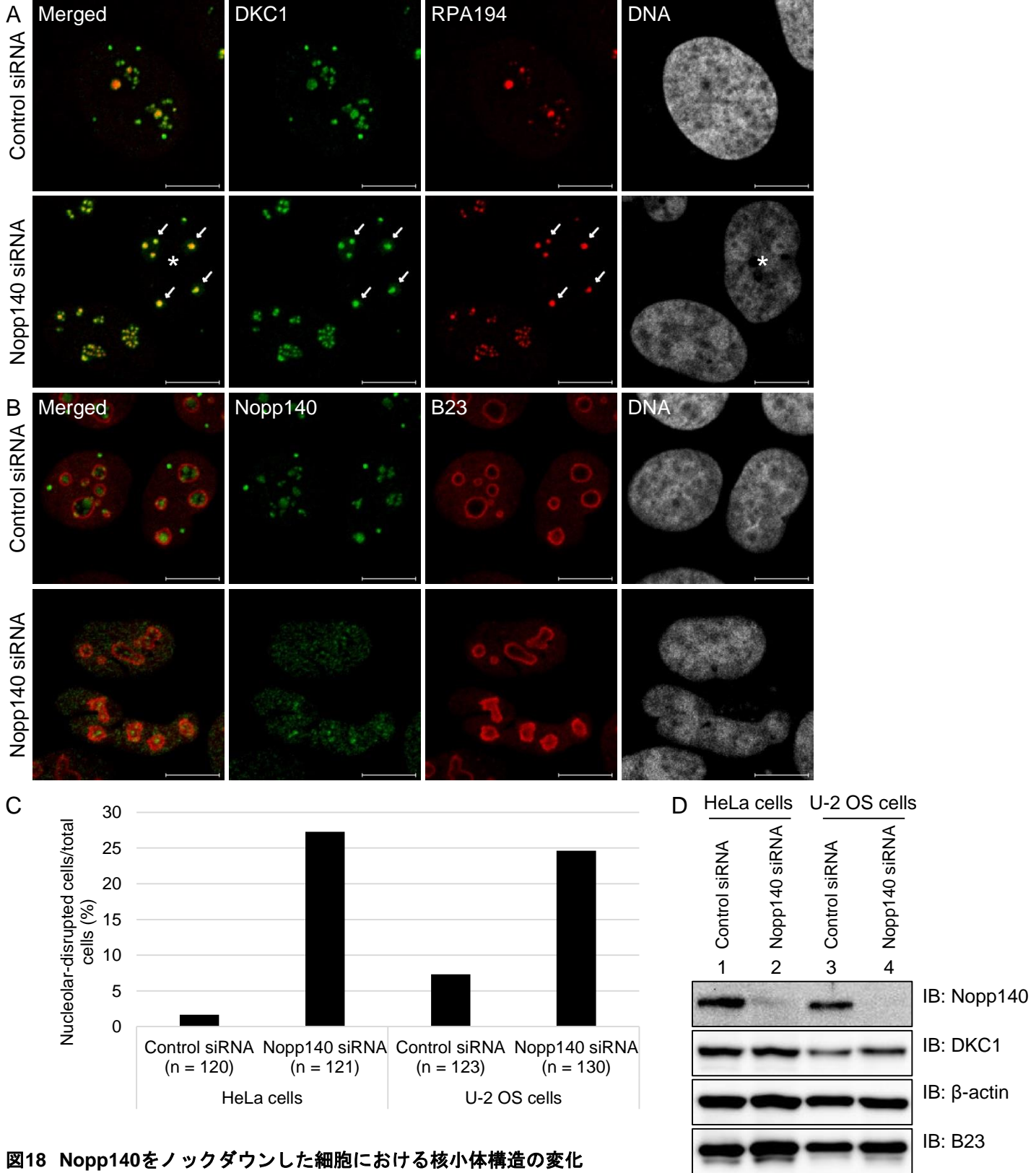
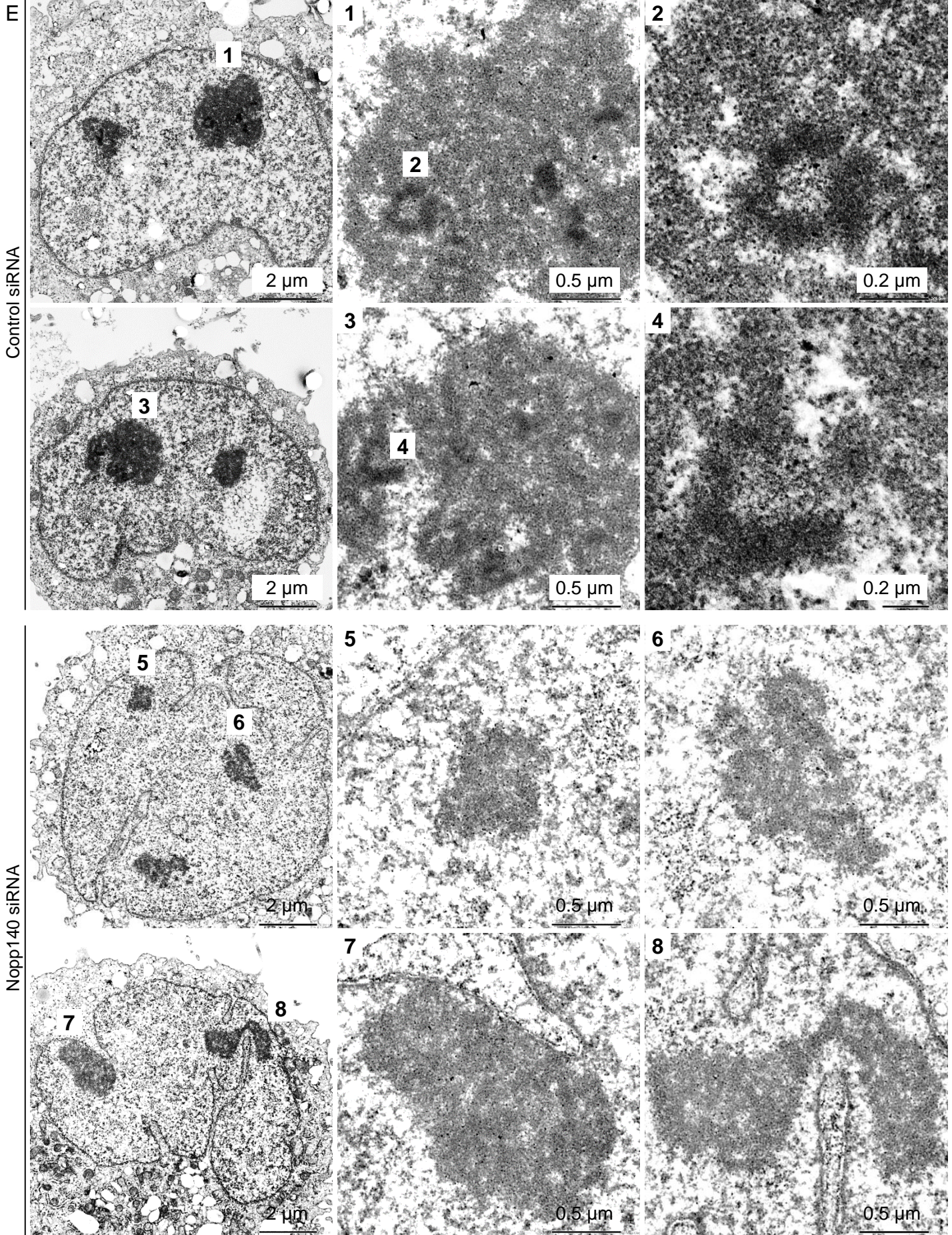


図18 Nopp140をノックダウンした細胞における核小体構造の変化

ControlまたはNopp140 siRNAをHeLa細胞またはU-2 OS細胞に導入67-72時間後に間接蛍光抗体法および透過型電子顕微鏡写真撮影を行った。(A, B) DKC1およびRPA194の細胞内局在。MergeパネルはDKC1 (緑色) およびRPA194 (赤色) の局在をそれぞれ表している。ArrowはDKC1やRPA194の核小体内局在が変化しているものを指している (A) 。Nopp140およびB23の細胞内局在。MergeパネルはNopp140 (緑色) およびB23 (赤色) の局在をそれぞれ表している (B) 。細胞はU-2 OS細胞。DNAはTO-PRO-3 iodideにて検出した (灰色) 。スケールは10 μ m。(C) HeLa細胞およびU-2 OS細胞における、核小体構造が変化した細胞の割合。核小体構造が変化した細胞 (パネルAの*) の数を120-130個計測した。(D) Nopp140をノックダウンした細胞のNopp140の発現量。Control (レーン1と3) 、またはNopp140 siRNA (レーン2と4) を細胞に導入し、67時間後に細胞溶解液を調製した。細胞溶解液をSDS-PAGEで展開後、上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。



(図18 Nopp140をノックダウンした細胞における核小体構造の変化)

(E) Nopp140をノックダウンした細胞の核および核小体の透過型電子顕微鏡写真。Glutaraldehydeおよびosmium tetroxideで固定したサンプルを、酢酸ウラン・クエン酸鉛で二重染色した。パネル内の数値箇所を拡大したものを右側のパネルに示した。各パネルのスケールをそれぞれの下部に示した。

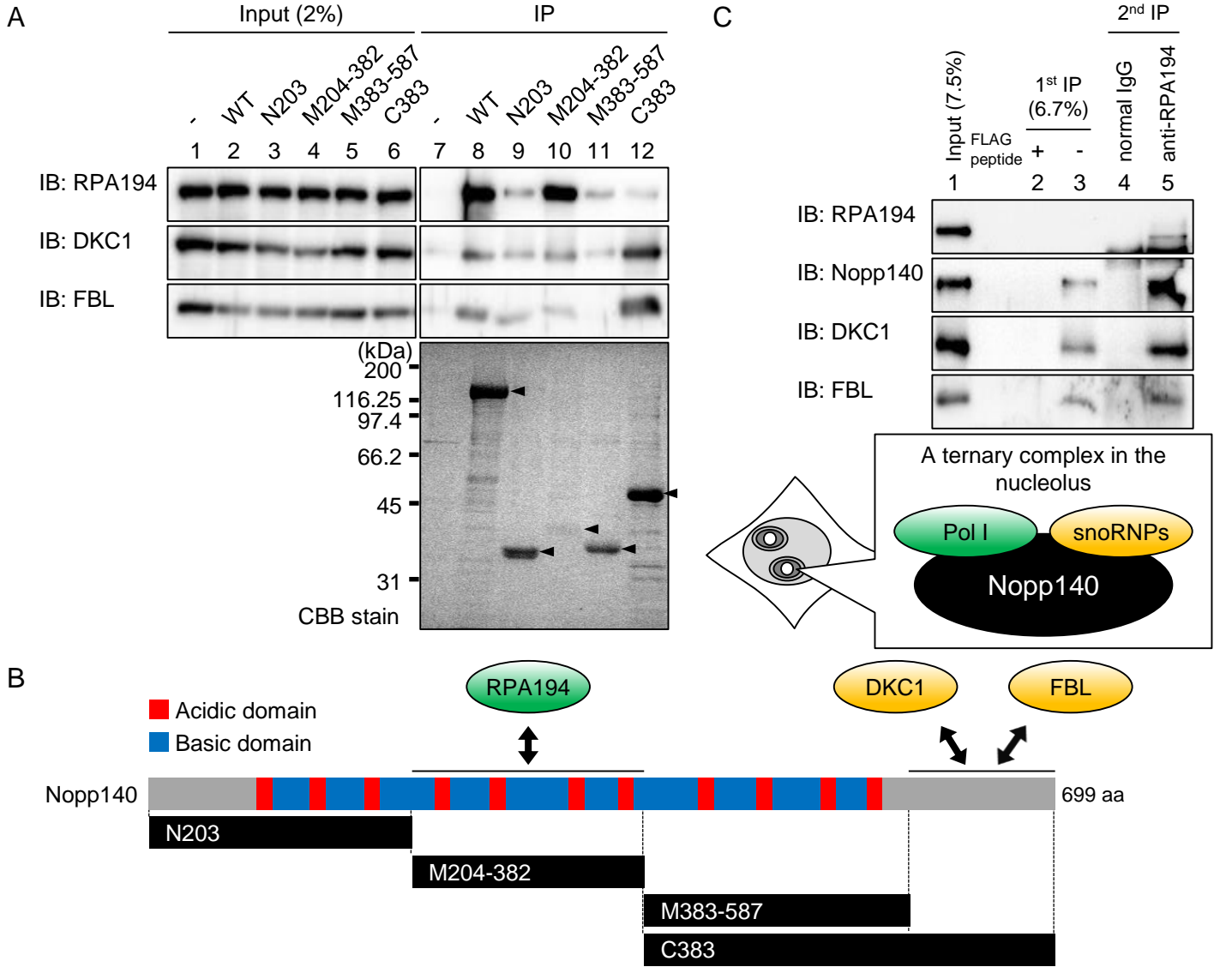


図19 Nopp140とRNA polymerase IおよびsnoRNPの結合解析

(A) Nopp140におけるPol IおよびsnoRNPとの結合領域。FLAG (レーン1と7)、FLAGが融合したNopp140野性型 (レーン2と8) および欠損変異体Nopp140N203 (レーン3と9)、Nopp140M204-382 (レーン4と10)、Nopp140M383-587 (レーン5と11)、そしてNopp140C383 (レーン6と12) を293T細胞に導入し、60時間後に細胞を回収した。細胞溶解液を調製し、抗FLAG抗体で免疫沈降を行った。Inputとしての細胞溶解液 (レーン1-6) および沈降産物 (レーン7-12) をSDS-PAGEで展開後、CBB染色または上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。下のパネルの左側の数値は分子量マーカ。Arrow-headは沈降産物に含まれるFLAG-Nopp140タンパク質を指している。

(B) Nopp140におけるPol IおよびsnoRNPとの結合領域を表した模式図。赤色は酸性領域を、青色は塩基性領域をそれぞれ表している。用いたNopp140欠損変異体を黒い棒で示している。RPA194、DKC1、そしてFBLと結合するNopp140の領域を示している。

(C) 核小体におけるNopp140とPol IおよびsnoRNPの結合様式。FLAGが融合したNopp140を安定発現しているHeLa細胞から単離した核小体から溶解液を調製し、抗FLAG抗体で免疫沈降を行った (レーン2と3)。沈降産物をFLAGペプチドで溶出し、抗RPA194抗体で2回目の免疫沈降を行った (レーン4と5)。Inputとしての細胞溶解液 (レーン1) および沈降産物 (レーン2-5) をSDS-PAGEで展開後、上記のタンパク質に対応する抗体を用いてWestern blottingを行った。コントロールとして、1回目の免疫沈降ではFLAGペプチドを加えたもの (レーン2) を、2回目の免疫沈降ではマウスのnormal IgGを加えたもの (レーン4) をそれぞれ用いた。免疫沈降の結果から、下のパネルでは、Nopp140、Pol I (RPA194)、そしてsnoRNPs (DKC1とFBL) が核小体において三者複合体を形成していることを模式図で表している。

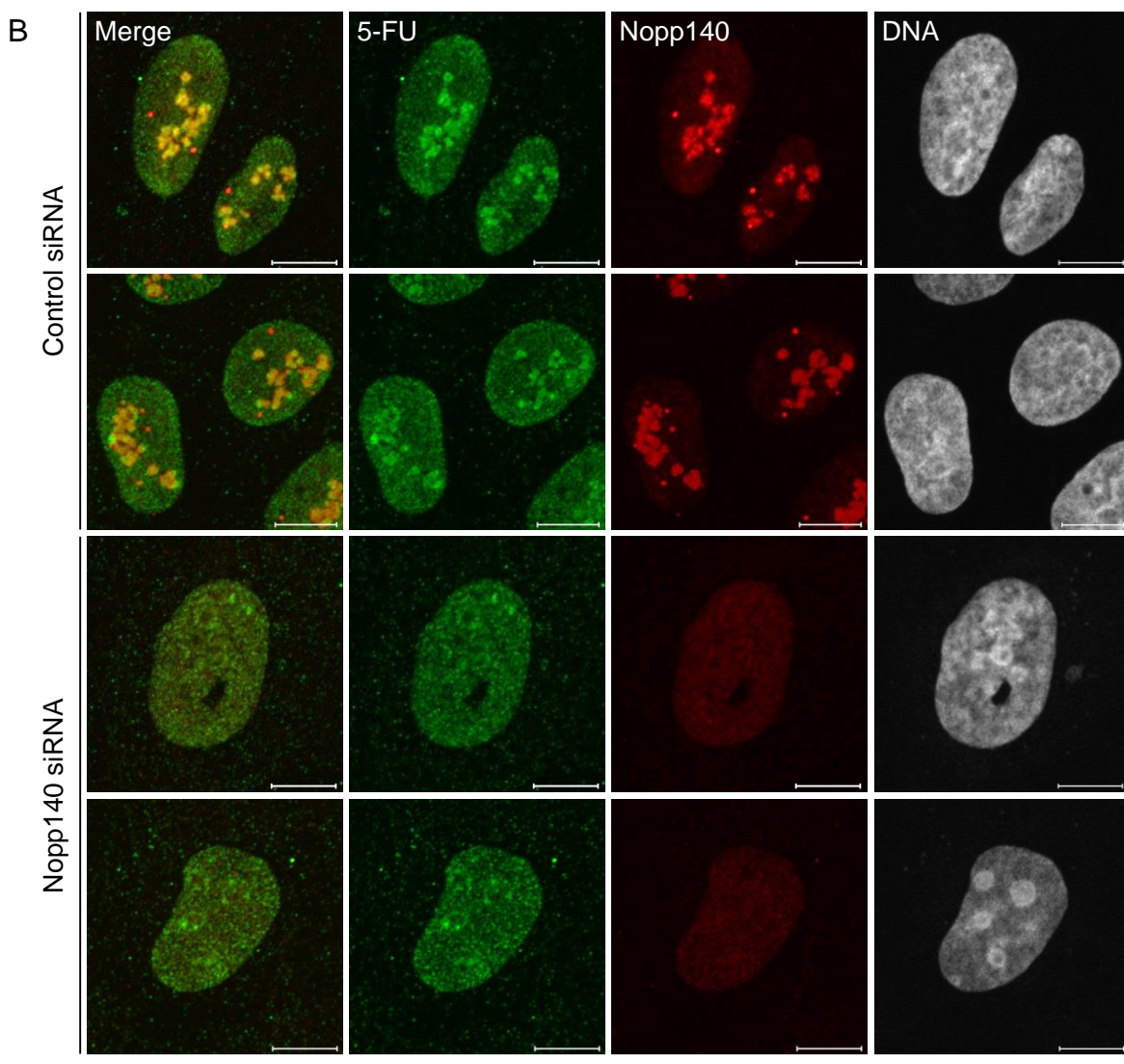
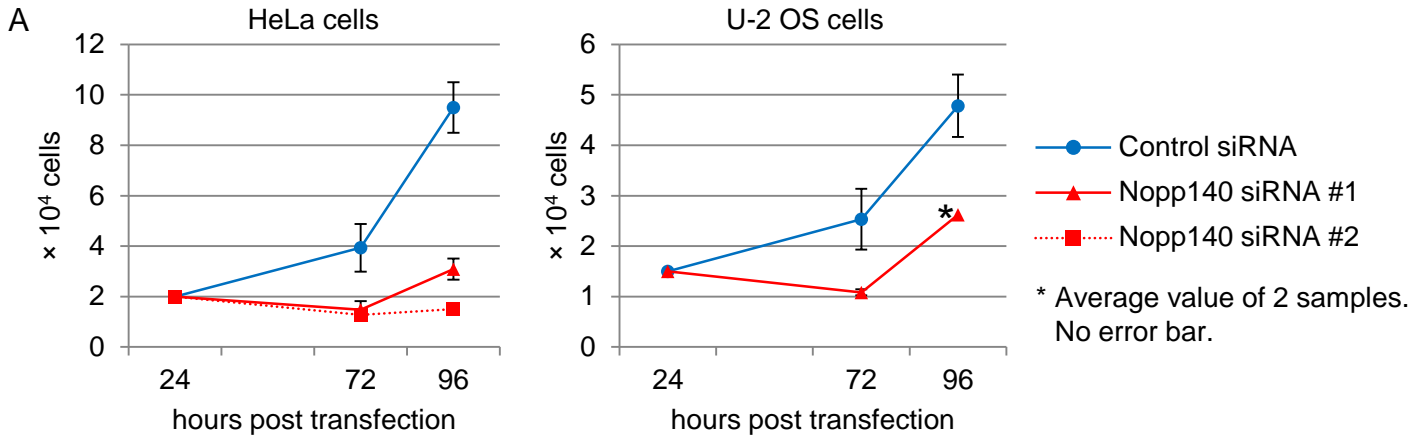


図20 Nopp140をノックダウンした細胞の細胞増殖および5-FUの取り込み活性

(A) Nopp140をノックダウンした細胞の細胞増殖活性。Control (青線) またはNopp140 siRNA (赤線) をHeLa細胞またはU-2 OS細胞に導入し、24時間後に細胞を回収した。そして、 2×10^4 個の細胞をディッシュに撒き直し、導入72時間および96時間後に細胞数を計測した。Nopp140 siRNAは異なる配列の2種類を使用した。#1は、Stealth RNA NOLC1-HSS190057 (実線) を、そして#2は、Stealth RNA NOLC1-HSS113666 (破線) を用いた結果を表している。(B) Nopp140をノックダウンした細胞の5-fluorouracil (5-FU) の取り込み活性。ControlまたはNopp140 siRNAをU-2 OS細胞に導入72時間後に、3 mM 5-FUを含む培地で30分間培養した。その後、5-FUおよびNopp140を、抗BrdU抗体および抗Nopp140抗体をそれぞれ用いて間接蛍光抗体法にて検出した。Mergeパネルは5-FU (緑色) およびNopp140 (赤色) の局在をそれぞれ表している。DNAはTO-PRO-3 iodideにて検出した (灰色)。スケールは10 μ m。

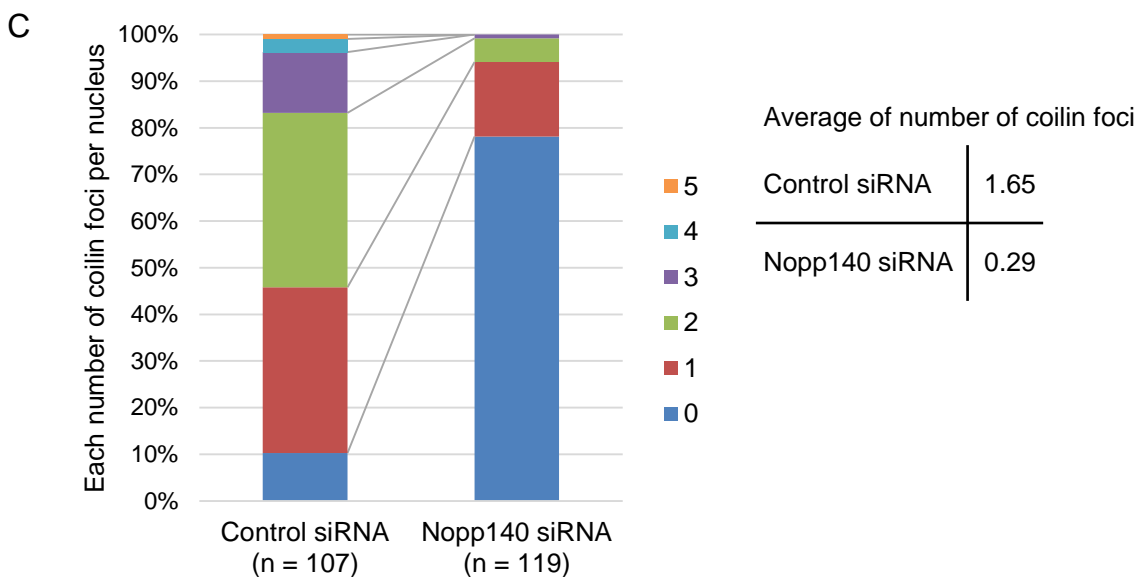
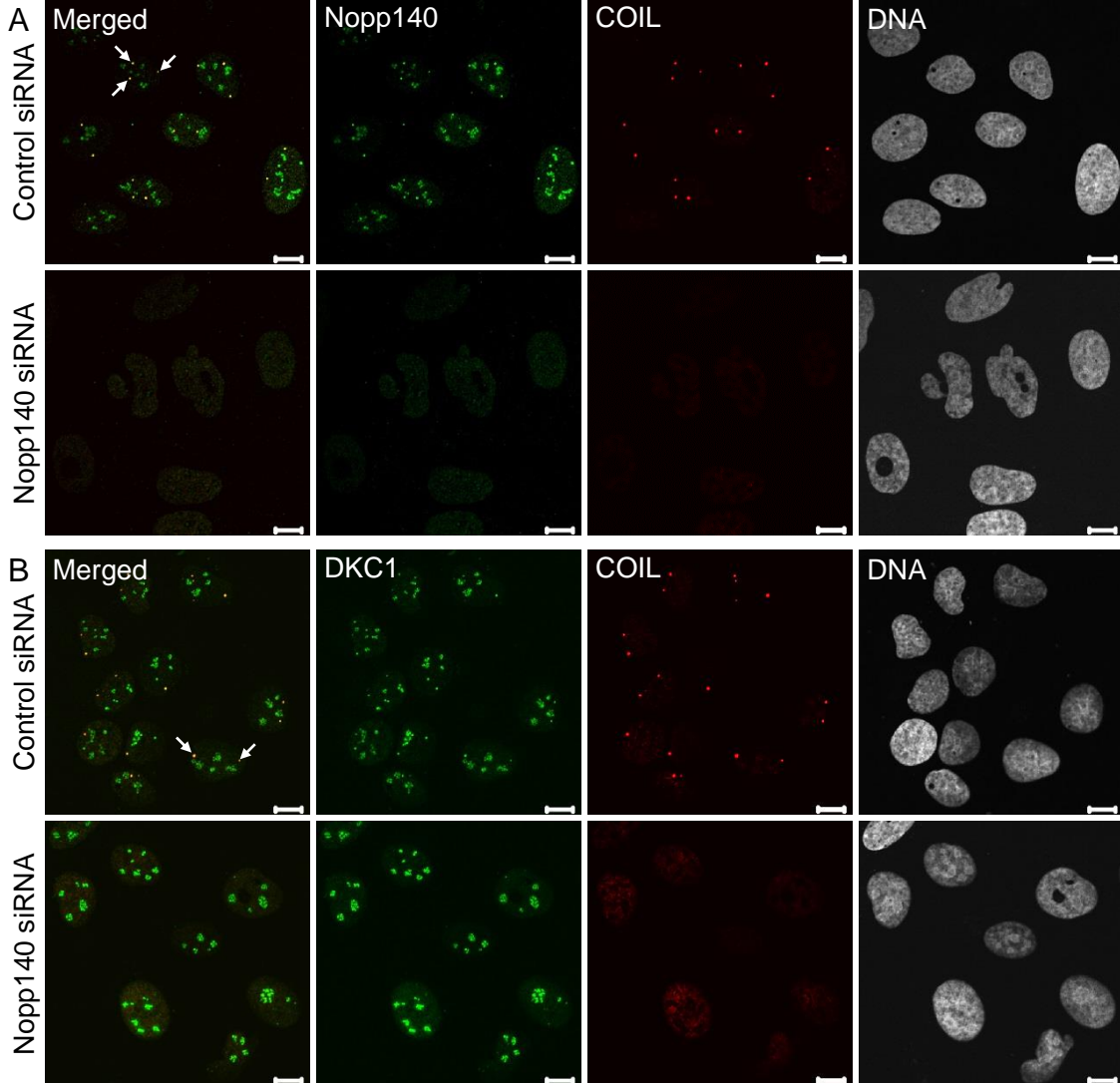


図21 Nopp140をノックダウンした細胞のCajalボディーマーカータンパク質Coilinの局在変化

ControlまたはNopp140 siRNAをU-2 OS細胞に導入69時間後に間接蛍光抗体法を行った。(A, B) Nopp140およびCoilin (COIL) の細胞内局在。MergeパネルはNopp140 (緑色) およびCOIL (赤色) の局在をそれぞれ表している。ArrowはCoilinの焦点 (Cajalボディー) を指している (A)。DKC1およびCOILの細胞内局在。MergeパネルはDKC1 (緑色) およびCOIL (赤色) の局在をそれぞれ表している (B)。DNAはTO-PRO-3 iodideにて検出した (灰色)。スケールは10 μ m。(C) 全細胞 (100-120細胞) における1細胞核あたりのCajalボディーの数の割合。凡例は1細胞核あたりのCajalボディーの数を表している。グラフの右側には、ControlまたはNopp140 siRNAを導入した際の、1細胞核あたりのCajalボディーの数の平均値を表している。