

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15166

研究課題名(和文)核小体の数と大きさを制御する新しい機構

研究課題名(英文)Mechanisms to control the number and size of the nucleolus

研究代表者

斎藤 哲一郎 (Saito, Tetsuichiro)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00202078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：核小体はrRNAの合成などリボソーム形成に重要な場であり、細胞分裂の度に崩壊と再形成を繰り返すが、核小体の数や大きさがいかに制御されるのかには不明な点が多い。本研究では、研究代表者らが発見しマウス初期胚で核小体の数と大きさに関わる核小体タンパク質Neproの機能を明らかにすべく機能ドメインと結合因子の解析を行った。その結果、研究代表者らが見出したQVEQCと疎水性、核移行シグナル、DDIDDIFの4つのドメインが互いに協調的に働くことがNeproの機能に必須であることが明らかになった。また、NeproとNucleophosminは核小体内で特定部位に局在することが示された。

研究成果の概要(英文)：The nucleolus, in which rRNA is transcribed and processed, and ribosomal subunits are formed in eukaryotic cells, disassembles and reassembles every cell division. The number and size of the nucleolus are typical of cell types, but the mechanism to control them is largely unknown. We found that Nepro, which is necessary for the maintenance of early neural stem cells in the neocortex, is also crucial for the size and number of the nucleolus in preimplantation embryos. We have also found that Nepro is localized in a specific part of the nucleolus, and its QVEQC, hydrophobic and DDIDDIF domains, and nuclear localization signal are necessary for the function of Nepro.

研究分野：神経科学

キーワード：遺伝子 ゲノム 細胞・組織 発現制御 発生・分化 電気穿孔法 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

核小体は、ゲノム上に約 20kb のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子と転写制御領域のセットがあれば、作られることが明らかとなった (Grob et al., *Genes Dev* (2014))。しかし、このセットがゲノムには多数あるにもかかわらず、多くの場合、核小体は1つの核に数個のみである。また、がん細胞などの増殖が盛んな細胞では一般に核小体の領域が広いが、核小体の数と大きさを制御する仕組みは全く不明である。さらに、最近、核小体のタンパク質は、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患にも関与することが示唆されており (*Trends Cell Biol* 23, 168-174 (2013))、本研究により核小体内でのタンパク質間相互作用が明らかとなれば、がんやリボソーム病のみならず多くの疾患解明にも道を開き、医学全般へ大きな貢献となることが期待される。

受精卵では多数の核小体前駆体が形成された後、分裂とともに崩壊・再形成を繰り返しながら数が減り、桑実胚で成熟型の核小体になる。

研究代表者らは、神経幹細胞の維持に必須な遺伝子として *Nepro* を発見した (Muroyama & Saito, *Development* 136, 3889-3893 (2009))。Nepro タンパク質は既知のモチーフを持たないユニークなタンパク質であり、核小体に局在していた。また、研究代表者らが作製したノックアウトマウスの解析により、*Nepro*^{-/-}胚は胚盤胞になる直前でリボソーム形成に異常を来し致死になることが明らかになった (Hashimoto et al., *Development Growth Differentiation* 57, 529-538 (2015))。さらに詳細な解析により、*Nepro*^{-/-}マウスの発生過程の4細胞期から桑実胚の細胞においては、核小体前駆体や核小体の大きさが小さく数も増大し、これまでに知られていない現象が観察された。

2. 研究の目的

核小体は rRNA の合成などリボソーム形成に重要な場であり、細胞分裂の度に崩壊と再形成を繰り返す。さらに、p53 経路を活性化するストレス応答に関与することも明らかになってきた。しかし、核小体の数や大きさがいかに制御され、どの様に機能と結びつくのかには不明な点が多い。研究代表者らは、自身で発見したユニークなタンパク質の *Nepro* が核小体に局在し、*Nepro* をノックアウトしたマウス胚では、核小体の数と大きさが異常になり、アポトーシスを起こすことを見出した。そこで、研究代表者らの独自のリソースと実験系を活用し、数十年來の謎である核小体の形成を新たな視点で解析し細胞微細形態の研究に新境地を拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者らが開発した微小マウス胚へ

の電気穿孔法 (Saito, *Nature Protocols* 3, 1552-1558 (2006))と遺伝子発現誘導系 (Sato et al., *J. Neuroscience Methods* 214, 170-176 (2013))を用い、研究代表者らが発見した核小体の数と大きさに影響を与える *Nepro* を軸に、核小体の数と大きさを制御する分子機構を細胞と個体のレベルで解析する。具体的には、ユニークな因子の *Nepro* の機能ドメインの解析とともに、*Nepro* と相互作用する核小体の因子を同定する。具体的には、主に下記の研究を中心に実施する。

(1) 発生過程で核小体の数と大きさを制御する *Nepro* の機能ドメインの解析

特定の領域を欠損した *Nepro* 変異体の cDNA を研究代表者らが開発した微小マウス胚への *in vivo* 電気穿孔法で遺伝子導入し、*Nepro* の機能に必要な部位を明らかにする。

(2) *Nepro* と相互作用する候補因子の同定

HA タグを付けた *Nepro* をマウス胚へ研究代表者らの方法で導入・発現後、細胞抽出液から HA タグに対する特異抗体を用い、*Nepro* と結合する候補因子を生化学的手法で同定する。さらに、得られた候補因子と *Nepro* タンパク質の局在を共焦点顕微鏡を用いて詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) 発生過程で核小体の数と大きさを制御する *Nepro* の機能ドメインの解析

Nepro の様々な領域を欠損した変異体の cDNA を研究代表者らの *in vivo* 電気穿孔法を用い微小マウス胚へ遺伝子導入後、本来の *Nepro* と同じレベルで神経細胞への分化を抑制するかどうかで機能解析を実施した。その結果、*Nepro* の配列中に研究代表者らが見出した QVEQC ドメインと疎水性ドメイン、核移行シグナル、DDIDDIF ドメインの4つのドメインの1つでも欠損すると、*Nepro* 本来の機能が低減することが示され、これらの4つのドメインが協調的に働くことが *Nepro* の機能に重要であることが明らかとなった。

さらに、*Nepro* は、胚盤胞形成直前のマウス初期胚の細胞では p53 経路を抑制するが、大脳皮質形成期の初期神経幹細胞では p53 経路を抑制しないことが示され、*Nepro* の分子機能が初期胚と大脳皮質形成期の初期神経幹細胞で異なることが明らかとなった。

(2) *Nepro* と相互作用する候補因子の同定

研究代表者らが腸菌で発現させた *Nepro* タンパク質を抗原としてウサギで作製した抗 *Nepro* ポリクローナル抗体を用い共焦点顕微鏡で詳細に解析した結果、*Nepro* タンパク質は、核小体全体に散在するのではなく核小体の特定の部位に明瞭に局在することが明らかとなった。

さらに HA タグを付けた *Nepro* を、研究代表者らの遺伝子導入・発現法でマウス胚で強

制発現させると、本来の Nepro と同様に、核小体の特定部位に局在するとともに、神経細胞への分化を強力に抑制することが示され、HA タグを付けた Nepro が有用な実験材料であることが示された。そこで、HA タグを付けた Nepro をマウス胚で強制発現させた後、細胞の抽出液から HA タグに対する特異抗体を用い精製すると、HA タグを付けた Nepro を発現させた時に特異的に複数のタンパク質が得られた。

さらに、Nepro と結合する候補タンパク質の Nucleophosmin (B23) の局在を共焦点顕微鏡を用い詳細に解析した結果、Nucleophosmin は、核小体内で Nepro の近接領域に局在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Kentaro Ishida, Tetsuichiro Saito and Toshiyuki Mitsui (2018) In vitro formation of the Merkel cell-neurite complex in embryonic mouse whiskers using organotypic co-cultures. *Development Growth Differentiation* in press 査読有 DOI: 10.1111/dgd.12535

Tatsuya Sato, Takako Kikkawa, Tetsuichiro Saito, Keiichi Itoi and Noriko Osumi (2017) Organizing activity of Fgf8 on the anterior telencephalon. *Development Growth Differentiation* 59, 701-712 査読有 DOI: 10.1111/dgd.12411

Yuko Muroyama, Atsushi Baba, Motoo Kitagawa and Tetsuichiro Saito (2016) Olfactory sensory neurons control dendritic complexity of mitral cells via Notch signaling. *PLoS Genetics* 12, e1006514 査読有 DOI: 10.1371/journal.pgen.1006514

Aya Murai, Ryo Iwata, Satoshi Fujimoto, Shuhei Aihara, Akio Tsuboi, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito, Kazunori Nishizaki and Takeshi Imai (2016) Distorted coarse axon targeting and reduced dendrite connectivity underlie dysosmia after olfactory axon injury. *eNeuro* e0242-16 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0242-16.2016>

[学会発表](計7件)

Tatsuya Sato, Takako Kikkawa, Tetsuichiro Saito, Keiichi Itoi and Noriko Osumi: The role of Fgf8 for development of

the frontal cortex subdivisions. 第60回神経化学学会大会(2017年9月7日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市))

Takeshi Imai, Satoshi Fujimoto, Marcus Leiwe, Yuko Muroyama and Tetsuichiro Saito: Formation of discrete olfactory circuits by spontaneous activity. 第40回日本神経科学大会(2017年7月22日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市))

Atsushi Baba, Yuko Muroyama, Motoo Kitagawa and Tetsuichiro Saito: Mouse homing behavior and dendritic complexity of mitral cells are controlled by Notch signaling. 第40回日本神経科学大会(2017年7月21日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市))

Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Tetsuichiro Saito and Takeshi Imai: Spontaneous activity and formation of discrete connectivity in the olfactory bulb. 第50回発生生物学会年会(2017年5月12日, タワーホール船堀(東京都・江川区))

Yuko Muroyama, Atsushi Baba, Motoo Kitagawa and Tetsuichiro Saito: Notch signaling controls dendritic complexity of mitral cells. 第39回日本分子生物学会年会(2016年12月1日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市))

Marcus N. Leiwe, Satoshi Fujimoto, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito and Takeshi Imai: Intrinsic Spontaneous Network Activity in the Neonatal Mouse Olfactory Bulb is Required for Dendrite Pruning of Mitral Cells. The Annual Meeting of Society for Neuroscience 2016(2016年11月16日, Convention Center (San Diego, U.S.A.))

Satoshi Fujimoto, Marcus N. Leiwe, Yuko Muroyama, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Tetsuichiro Saito and Takeshi Imai: Developmentally-regulated spontaneous network activity governs dendrite pruning of mitral cells to establish discrete connectivity. Cold Spring Harbor Laboratory 2016 Meeting "Axon Guidance, Synapse Formation and Regeneration"(2016年9月20日, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, U.S.A.))

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/dev/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

斎藤 哲一郎 (SAITO, Tetsuichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：00202078

(2)連携研究者

室山 優子 (MUROYAMA, Yuko)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号：20422248

馬場 敦 (BABA, Atsushi)
千葉大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号：70405215