

Nucleolin interacts with telomerase

著者	Khurts Shilagardi
journal or publication title	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院医学研究科
volume	平成17年7月
page range	27-27
year	2005-07-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/15897

学位授与番号	甲第 1660 号
学位授与年月日	平成 16 年 12 月 31 日
氏 名	Khurts Shilagardi
学位論文題目	Nucleolin interacts with telomerase (ヌクレオリンはテロメラーゼと相互作用する)
論文審査委員	主 査 教 授 善 岡 克 次 副 査 教 授 井 上 正 樹 教 授 山 本 博

内容の要旨及び審査の結果の要旨

テロメラーゼは、テロメア反復配列の伸長に関わる逆転写酵素であり、触媒酵素(TERT)と鋳型RNA(TERC)は安定な複合体を形成している。正常細胞では微弱なヒトテロメラーゼ活性が認められ、多くのがん細胞で強いテロメラーゼ活性を示すテロメラーゼは、核質に局在することが報告されている。一方、テロメラーゼは、細胞質、核小体、核質の間をシャトルし、様々な刺激によって細胞内局在を変化することが報告されている。しかし、その制御機構は明らかでない。本研究は、テロメラーゼの細胞内局在の制御を検討する目的でテロメラーゼの結合因子を探索し、RNA シャトル蛋白ヌクレオリンを見出した。

ヒト初代培養細胞 IMR90 及びがん細胞 Huh7 株へのトランスフェクションにより、テロメラーゼとヌクレオリンの相互作用領域を限定し、RNA が介在する効果を RNase 処理によって検討した。また、組換え型欠損ヌクレオリンと精製 hTERT 及び再構成テロメラーゼ系を用いて、テロメラーゼ結合に必要なヌクレオリン領域を限定した。EGFP 標識 hTERT を IMR90 と Huh7 株、更に hTERC を持たない ALT 細胞 VA13 株と hTERC 安定発現 VA13 株にそれぞれ EGFP-hTERT を導入し、hTERT の局在をヌクレオリンとの関連で検討した。得られた結果は、以下の通りである。

1. ヒト初代培養細胞とがん細胞において、hTERT と内在性ヌクレオリンの特異的な相互作用を免疫共沈法で認めた。異なる標識の hTERT と野生型及び欠損型ヌクレオリンを共発現させた系で、ヌクレオリンの RNA 結合ドメイン4(RBD4)と RGG ドメインが hTERT 結合に必須であり、加えて RBD1 の RNA との結合がヌクレオリンとテロメラーゼの結合に寄与していることが、RNase 処理による効果から示唆された。組換え型欠損型ヌクレオリンと組換え型 hTERT 或いは再構成系テロメラーゼを用いた *in vitro* 結合系において、RBD4 と RGG が hTERT 結合に必須であり、RBD1 は hTERC 依存的にテロメラーゼとヌクレオリンの結合に寄与していた。

2. 導入された EGFP-hTERT は、IMR90 細胞では核小体に、Huh7 細胞では核質に局在した。Huh7 細胞に FLAG-ヌクレオリンを導入すると hTERT とテロメラーゼ活性は抗 FLAG 抗体により回収され、核質中のヌクレオリンとテロメラーゼの相互作用が示唆された。ヌクレオリン RBD4+RGG を Huh7 細胞に導入すると EGFP-hTERT が細胞質に再配置された。hTERC を持たない ALT 細胞である VA13 細胞株に EGFP-hTERT を導入すると、hTERT は核小体に優先的に局在し、hTERC 安定発現 VA13 細胞では EGFP-hTERT は核質に局在した。これらの結果から、ヌクレオリンは hTERT との相互作用によりテロメラーゼの細胞内局在に影響を与えると結論された。

本論文はテロメラーゼとヌクレオリンの相互作用をはじめて見出すと共に、この相互作用がテロメラーゼの細胞内局在に影響を与えることを示した細胞生物学上に意義のある学位に価する労作と認められた。