

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07300

研究課題名(和文) ヒストンシャペロンによる遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of gene expression by histone chaperones

研究代表者

奥脇 暢 (Mitsuru, Okuwaki)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：50322699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒストンシャペロンによる遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的として研究を進めた。ヒストンシャペロンNPM1は主に核小体に局在するが、本研究の結果NF- κ BやSTAT1、IRF1といった転写因子と直接結合して、転写因子の標的遺伝子の制御に関わることを明らかにした。また、NPM1はリンカーヒストン様因子であるHP1BP3と相互作用し、そのDNA結合の制御にも関わる可能性が示唆された。これまで、ヒストンシャペロンによる遺伝子発現の制御機構は不明であった。本研究から、ヒストンシャペロンが転写因子やリンカーヒストンのDNA結合制御を介して、遺伝子の発現制御に関わることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NPM1は様々な固形がんで発現亢進がみられ、細胞のがん化、がんの悪性化に関わることを示唆されてきた。しかし、NPM1のどのような機能が、がん化やがんの悪性化に関わるのかは不明である。本研究より、NPM1は炎症応答性の転写因子の制御を介してがんの浸潤や転移能を促進することを見出した。本研究の成果は、がんの悪性化機構の解明につながる点で、学術的な意義、社会的な意義は大きい。本研究の成果をもとに、NPM1を標的とする分子標的薬の開発につながるよう研究を進展させていきたい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand the molecular mechanism by which histone chaperones regulate gene expression program in mammalian cells. A histone chaperon NPM1 mainly localizes to the nucleoli but a fraction of NPM1 also localizes to the nucleoplasm. In this study, we found that NPM1 directly interacts with transcription factors NF- κ B, STAT1, and IRF1 and regulates their target genes. In parallel, we found that NPM1 directly interacts with a linker histone-like protein HP1BP3 and regulates its chromatin binding. In this study, we demonstrated for the first time that histone chaperons directly interact with DNA binding proteins and regulate their DNA binding activity. This function of histone chaperones is suggested to contribute the regulation of gene expression program.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：クロマチン 遺伝子発現 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膨大な遺伝情報を直径 10 ミクロン程度の細胞核に収納するためには、クロマチン構造を形成し DNA を凝縮する必要がある。長大な DNA はランダムに凝縮されるわけではなく、遺伝子発現の必要性に応じて適切に凝縮される。ヒストンは DNA を凝縮し核に収納するために必須な因子で、4 種類のコアヒストンによってヌクレオソームを形成し、ヌクレオソームが連なったクロマチンはリンカーヒストンの結合によって、より高次に折りたたまれる。転写因子はクロマチン構造を形成した DNA を認識・結合し、その領域のクロマチン構造の変換、RNA ポリメラーゼのリクルートなどを介して、遺伝子の発現を制御する。我々は、アデノウイルスクロマチンをモデル材料として、クロマチン構造を変換しウイルスゲノム DNA の複製を促進する宿主因子を同定し解析を進めてきた。これまでの解析から、宿主因子 NPM1 はヒストンシャペロン活性を持ち、非感染細胞においてクロマチンの構造制御に関わることを明らかにした。NPM1 は試験管内、細胞内においてリンカーヒストンと相互作用することが明らかになっているが、細胞内における NPM1 のヒストンシャペロンとしての機能の実体は明らかになっていない。

NPM1 は急性骨髄性白血病の患者の約 3 割において変異が見出され、変異型の NPM1 は細胞質に局在し、核での機能が抑制される。また、乳がんや前立腺がん、大腸がんなどの固形がんにおいて、NPM1 の発現亢進がみられ、これらのがんのバイオマーカーとしての役割も果たしている。NPM1 の発現亢進、機能異常がどのように細胞のがん化に関わるのかは不明であり、NPM1 の細胞内機能を解明することは、がんをはじめとする疾患の原因解明と治療法開発に貢献するものと考えられる。

このような背景から、我々は NPM1 が制御する遺伝子を同定することを目的として、トランスクリプトーム解析を行った。NPM1 のノックダウンによって 290 の遺伝子の発現が上昇し、360 の遺伝子の発現が減少した。NPM1 のノックダウンによって発現が抑制される遺伝子群の Gene Ontology 解析から、NPM1 は炎症や免疫応答に関わる遺伝子の発現を制御することが明らかになった。これらの遺伝子群には NFκB 標的遺伝子が多数含まれていたため、NFκB 依存的な転写における NPM1 の役割を解析した。その結果、NPM1 は NFκB のシャペロンとして機能することが示唆された。一方、NPM1 のノックダウンによって発現が上昇する遺伝子群は、リンカーヒストン様遺伝子 HP1BP3 のノックダウンによって発現上昇する遺伝子群と一部重なることが明らかになった。これらのことから、NPM1 は転写因子に加えリンカーヒストンのシャペロンとしての機能を介して遺伝子の発現制御に関わることが想定される。

2. 研究の目的

ヒストンシャペロンは、ヒストンと直接結合することでヒストンの構造と機能を維持し、最終的にクロマチン構造形成を促進する因子である。これまで我々は、ウイルスクロマチンを用いた独自の実験系により、ヒストンシャペロンを同定し、その機能解析を進めてきた。中でもヒストンシャペロン NPM1 は、最近の研究よりリンカーヒストンに加えて転写因子のシャペロンとして機能する可能性が示唆された。本研究では、リンカーヒストンシャペロン、転写因子のシャペロンとしての NPM1 の機能を解明し、その生物学的意義を明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

NPM1 の発現量を siRNA によって抑制し、RT-PCR によって標的遺伝子の発現を検討した。同時に CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウト細胞の樹立を試みた。トランスクリプトーム解析より、NPM1 がいくつかの転写因子との機能を制御する可能性が示唆された。IRF1 や STAT1 などインターフェロン誘導性の遺伝子発現調節に関わる転写因子について、その cDNA をクローニングし、NPM1 との相互作用を検討した。また、インターフェロン 処理によって発現変動する遺伝子のうち、NPM1 ノッ

クダウンによって影響を受ける遺伝子を同定した。

また、HP1BP3 と NPM1 との相互作用を GST-pull down 法、および免疫沈降法によって確認した。HP1BP3 の抗体を作成し、ChIP-Seq 解析を行った。

4 . 研究成果

1) NPM1 の転写因子シャペロンとしての機能解明

NPM1 のノックダウン細胞を用いた解析より、インターフェロン 応答性遺伝子の発現が、NPM1 のノックダウン細胞で減弱していることを見出した。インターフェロン のシグナルは主に STAT1 二量体のリン酸化によって制御される。IRF1 は STAT1 によって活性化される、インターフェロン シグナルにおいて重要な転写因子の一つである。NPM1 は試験管内、細胞内において IRF1 と STAT1 と相互作用することを見出した。また、*IRF1* 遺伝子発現やクラス I およびクラス II MHC 遺伝子の発現も、NPM1 のノックダウンによって抑制されることが明らかになった。HeLa 細胞においては、通常 MHC II はほとんど発現していないが、インターフェロン によって発現が上昇する。MHC-II の発現において必須の転写調節因子である CIITA も NPM1 の制御下にあることを見出した。CIITA プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーター遺伝子を用いた解析から、NPM1 は CIITA 遺伝子上流への IRF1 結合を促進する可能性が示唆された。以上の結果より NPM1 は IRF1 あるいは STAT1 の標的遺伝子への結合を制御することによって、インターフェロン応答性遺伝子の制御に関わることが示唆される。さらに、NPM1 ノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析の結果より、新たに薬剤耐性に関わる遺伝子群が NPM1 の制御下にあることを見出した。RT-PCR を用いて検証した結果、NPM1 のノックダウンによって、グルタチオン合成酵素、ABC トランスポーターの一部が NPM1 のノックダウンによって抑制された。現在、これらの遺伝子を制御する転写因子と NPM1 との相互作用を検討している。

また、CRISPR-CAS9 法を持ちいて、NPM1 のノックアウト細胞の樹立を目指した。NPM1 のノックアウト細胞は入手できなかったものの、NPM1 遺伝子のうち一つのアレルのみノックアウトされた細胞を入手することができた。NPM1 の発現量が、1/2 程度に減少しており、siRNA を用いた実験を検証することが可能となった。インターフェロン応答性の遺伝子発現については、siRNA を用いた実験を再現することができており、この細胞を用いて NPM1 による細胞がん化、がんの悪性化機構の解明を進めていく予定である。

2) NPM1 と HP1BP3 による遺伝子発現制御機構の解明

HP1BP3 は中央部分にリンカーヒストンの球状ドメインと類似した領域を 3 個持つことから、リンカーヒストンであると考えられる。我々は NPM1 の相互作用因子として HP1BP3 を同定した。HP1BP3 が実際にリンカーヒストンとして機能するのか、リンカーヒストンとしてどのような遺伝子の発現制御に関わるのかは不明であった。試験管内のクロマチン再構成系を用いて、HP1BP3 が球状領域を介して H1 と同様に結合することが明らかになった。また、試験管内、細胞内において NPM1 と HP1BP3 が相互作用することも明らかにした。さらに、HP1BP3 の相互作用する遺伝子を同定することを目的として、HP1BP3 の ChIP-Seq 解析を行った。この解析においては、コントロール細胞に加えて、NPM1 ノックダウン細胞も用いて、HP1BP3 の DNA 結合における NPM1 の役割の解明も進めた。HP1BP3 は他のリンカーヒストンとは異なり、遺伝子プロモーター領域に集積すること、標的遺伝子の多くは抑制状態の遺伝子であることが明らかになった。また、NPM1 は HP1BP3 の標的遺伝子の一部を変化させることが明らかになり、現在これらの遺伝子の発現における HP1BP3 や NPM1 の役割を明らかにするべく化石を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Genoveso Michelle Jane, Hisaoka Miharuru, Komatsu Tetsuro, Wodrich Harald, Nagata Kyosuke, Okuwaki Mitsuru | 4. 巻 287 |
| 2. 論文標題 Formation of adenovirus DNA replication compartments and viral DNA accumulation sites by host chromatin regulatory proteins including NPM1 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The FEBS Journal | 6. 最初と最後の頁 205 ~ 217 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15027 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Abe Mayumi, Lin Jianhuang, Nagata Kyosuke, Okuwaki Mitsuru | 4. 巻 592 |
| 2. 論文標題 Selective regulation of type II interferon-inducible genes by NPM1/nucleophosmin | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Letters | 6. 最初と最後の頁 244 ~ 255 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12952 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sekiya Takeshi, Hu Yifan, Kato Kohsuke, Okuwaki Mitsuru, Kawaguchi Atsushi, Nagata Kyosuke | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Assembly and remodeling of viral DNA and RNA replicons regulated by cellular molecular chaperones | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biophys. Rev. | 6. 最初と最後の頁 445-452 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-017-0333-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ueshima Shuhei, Nagata Kyosuke, Okuwaki Mitsuru | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Internal Associations of the Acidic Region of Upstream Binding Factor Control Its Nucleolar Localization | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Mol. Cell Biol. | 6. 最初と最後の頁 e0218-17 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00218-17 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Saito Shoko, Yokokawa Takafumi, Iizuka Gemmei, Cigdem Sadik, Okuwaki Mitsuru, Nagata Kyosuke | 4. 巻 487 |
| 2. 論文標題 Function of Nup98 subtypes and their fusion proteins, Nup98-Top11 and Nup98-SETBP1 in nuclear-cytoplasmic transport | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun. | 6. 最初と最後の頁 96 ~ 102 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.04.024 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Lin Jianhuang, Kato Mitsuyasu, Nagata Kyosuke, Okuwaki Mitsuru | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 Efficient DNA binding of NF- B requires the chaperone-like function of NPM1 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Nucl. Acids Res. | 6. 最初と最後の頁 3703-3723 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkw1285 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 海老根修平、茂木浩子、奥脇暢 |
| 2. 発表標題 翻訳開始位置の変化によるNPM1 oligomerの構造と機能の変化 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Michelle Jane Genoveso, Atsushi Kawaguchi, Kyosuke Nagata, Mitsuru Okuwaki |
| 2. 発表標題 Formation of adenovirus DNA replication compartments and viral DNA accumulation sites by host chromatin regulatory proteins including NPM1 |
| 3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴垣芳夫、小山信裕、供田洋、奥脇暢 |
| 2. 発表標題 Cap-snatching 反応をターゲットとした抗インフルエンザ薬スクリーニング |
| 3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 岡本ひとみ、田中庸一、奥脇暢、尾島勝也 |
| 2. 発表標題 NUDT15遺伝子多型による酵素活性への影響 |
| 3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 奥脇暢 |
| 2. 発表標題 転写因子の機能発現における核小体因子NPM1の役割 |
| 3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 岡本ひとみ、奥脇暢、田中庸一 |
| 2. 発表標題 NUDT15遺伝子多型による酵素活性への影響 |
| 3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 奥脇暢 |
| 2. 発表標題 核小体の構造と機能におけるNPM1の役割 |
| 3. 学会等名 第5回リボソームミーティング |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 佐藤大亮、上島州平、永田恭介、奥脇暢 |
| 2. 発表標題 核小体の形成におけるUBF酸性領域の機能 |
| 3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 阿部真弓、永田恭介、奥脇暢 |
| 2. 発表標題 核小体因子NPM1によるMHC遺伝子発現調節の新たな機構 |
| 3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部生化学教室
<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/biochemistry/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|