

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 5月 6日現在

機関番号：34310
研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2012～2013
課題番号：24770178
研究課題名 (和文) 血球系細胞分化における核小体の役割とその分子機構の解明
研究課題名 (英文) The nucleolus regulates hematopoietic cell differentiation
研究代表者
黒田 貴雄 (KURODA, Takao)
同志社大学・高等研究教育機構・助教
研究者番号：30620637
交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要 (和文)：本研究は、細胞分化における核小体の役割を明らかにすることが目的である。ヒト血球系培養細胞およびマウス造血幹細胞において、細胞分化を誘導した結果、rRNA 転写が抑制され、核小体タンパク質 MYBBP1A が核小体から核質へと移行し、血球系細胞分化のマスターレギュレーターである c-Myc と相互作用し、その転写活性を阻害することが明らかとなった。さらに、人為的に rRNA 転写のみを阻害した結果、上記機構が作動し、細胞分化が誘導されることが明らかとなった。以上の結果から、血球系細胞分化において、細胞分化に伴う rRNA 転写の抑制は、細胞分化促進に働くことが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：In this study, I have tried to address the role of the nucleolus in cellular differentiation. I found that rRNA transcription was downregulated during hematopoietic differentiation in both human leukemia cell line and mouse hematopoietic stem cells. In response to the inhibition of rRNA transcription, nucleolar protein MYBBP1A was translocated from the nucleolus to the nucleoplasm and interacted with c-Myc, which is one of the master regulator of hematopoietic differentiation. MYBBP1A attenuated transcriptional activity of c-Myc and promoted megakaryocytic differentiation. I also found that hematopoietic differentiation was sufficiently induced by specific suppression of rRNA transcription using actinomycin D or siRNA for TIF-IA. These results suggest that the downregulation of rRNA transcription accelerates cellular differentiation at least in hematopoietic cells.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核小体、リボソームRNA、血球系細胞分化

1. 研究開始当初の背景

核小体は、核内構造体の一つであり、リボソーム RNA (rRNA) の転写と、rRNA を骨格としたリボソーム分子の構築が行われる場として知られている。長い間、核小体の役割は、リボソームの生合成のみであると考えられ

てきた。しかし近年、申請者は、核小体が細胞のストレスセンサーとして機能していることを新たに見出した (Kuroda T, et al., EMBO J., 2011)。その分子機構は以下の通りである。

細胞が DNA 損傷等のストレスを受けると、

rRNA の転写が抑制され、核小体内の RNA 量が減少する。核小体に局在するタンパク質（核小体タンパク質）の一つである Myb-binding protein 1a (MYBBP1A) は RNA 依存的に核小体に局在しているため、核小体内 RNA 量の減少により、核小体から核質へと移行する。核質に移行した MYBBP1A は、癌抑制因子である p53 に結合し、p53 の転写活性を促進することで、最終的に細胞周期停止とアポトーシスを誘導する。この結果によって、核小体がストレス応答に直接関与していることが示された。

我々が p53 の転写活性を制御する因子として同定した核小体タンパク質 MYBBP1A は、最初、転写因子 c-Myb に結合する因子として同定され、c-Myb の転写活性を負に制御することが報告されている (Tavner FJ, et al., Mol. Cell. Biol., 1998)。c-Myb は血球系細胞の分化を制御する重要な転写因子であることが数多く報告されており、c-Myb ノックアウトマウス、突然変異マウスの解析から、c-Myb の転写抑制が巨核球分化促進に必要であることが報告されている (Greig KT, et al., Semin. Immunol., 2008)。そこで申請者は、MYBBP1A と c-Myb との関係をマウス個体レベルで確かめるために、マウス各組織における MYBBP1A の発現パターンを詳細に解析した。その結果、c-Myb と同様、血球系細胞分化が盛んに行われている胎児肝臓と脾臓、さらに骨髄においては未分化な造血幹細胞や前駆細胞で発現が高いことが明らかとなった。以上の結果から、MYBBP1A が c-Myb の転写制御を介して、血球系細胞分化に関わっている可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

核小体に局在する MYBBP1A が、核質に局在する c-Myb をどう制御し得るのか不明であった。申請者のこれまでの実験結果は、rRNA 転写が抑制されると核小体内の RNA 量が減少し、MYBBP1A が核小体から核質に移行することを示している。また、これまでの報告から、細

胞分化の過程で rRNA 転写は抑制され、核小体の大きさも小さくなることが分かっている (Ali SA, et al., PNAS, 2008)。以上のことを合わせて考えると、① 分化の過程で rRNA 転写が抑制され、核小体内の RNA 量が減ることによって MYBBP1A が核小体から核質に移行する。② 核質に移行した MYBBP1A は c-Myb に結合し、その転写活性を制御することで血球系細胞の分化に影響を与えることが考えられる。

細胞分化と核小体との関係については、「細胞が分化すると、核小体が小さくなる」との考えが一般的である。これは、分化した細胞は増殖能が低下するため、新規タンパク質合成が必要なくなり、その結果、rRNA 転写が抑制され、核小体が小さくなると考えられているからである。申請者はその考えとは逆に、「核小体が小さくなることで、核小体タンパク質の局在を変化させ、細胞分化を促進する」と考えている。この新しい概念を打ち立てることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

細胞分化に伴う rRNA 転写抑制が MYBBP1A の核小体から核質への局在変化を促し、c-Myb の転写活性を負に制御することによって巨核球分化を促進するという仮説を証明するために、本研究では、以下の 2 項目について実験を進める。

(1) 血球系培養細胞を用いた、巨核球分化における MYBBP1A の機能解析。

- ① 巨核球分化能を有している血球系培養細胞としてヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を使用し、K562 細胞を巨核球へ分化誘導した際の rRNA 転写、核小体内の RNA 量、MYBBP1A の細胞内局在を解析する。
- ② K562 細胞を巨核球分化誘導する際に、siRNA を用いて MYBBP1A のノックダウンを行い、分化マーカーの発現量および細胞形態を解析することにより、MYBBP1A

が K562 細胞の巨核球分化に与える影響を解析する。

- ③ 巨核球分化誘導時における MYBBP1A と c-Myb との関係性を明らかにするため、免疫染色法と免疫沈降法を用いて両者の相互作用を解析する。さらに、MYBBP1A が c-Myb の転写活性に与える影響を、レポーターアッセイによって、c-Myb 標的遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法を用いて解析する。
- ④ TIF-1A をノックダウンした K562 細胞において、rRNA 転写、核小体内 RNA 量、MYBBP1A の細胞内局在、c-Myb 転写活性、巨核球分化誘導率を解析する。この際、MYBBP1A も同時にノックダウンすることにより、TIF-1A ノックダウンによって見られた影響に対する MYBBP1A の関与を明らかにする。

(2) 造血幹細胞を用いた、巨核球分化における MYBBP1A の機能解析。

- ① 正常なマウス生体から単離した造血幹細胞を巨核球分化誘導かけた際の rRNA 転写、核小体内 RNA 量、MYBBP1A の細胞内局在、c-Myb 転写活性を解析する。
- ② MYBBP1A ノックダウンレンチウイルスを作製、感染させ、MYBBP1A をノックダウンすることで、造血幹細胞において MYBBP1A が巨核球分化に与える影響を解析する。
- ③ TIF-1A ノックダウン用のレンチウイルスを作製、感染させ、造血幹細胞において TIF-1A をノックダウンする。ウイルス感染細胞のみを単離し、K562 細胞と同様の手法を用いて、核小体の挙動と MYBBP1A の機能解析を行う。

4. 研究成果

K562 細胞を分化誘導剤 PMA (Phorbol Myristate Acetate) で処理し巨核球に分化させると、rRNA 転写が抑制されることが明らかとなった。また、分化誘導時における核小体

内の RNA 量を測定した結果、rRNA 転写抑制に伴って、核小体内 RNA 量も減少していることが明らかとなった。分化誘導前後における MYBBP1A の局在を解析した結果、分化誘導前には核小体内に局在していた MYBBP1A が、分化誘導後には、核質に局在を変化させていることが明らかとなった。分化誘導後における、MYBBP1A と c-Myb との結合を解析した結果、両者の結合が確認され、さらに c-Myb の転写活性を測定するレポーター解析から、MYBBP1A が c-Myb の転写活性を抑制していることが明らかとなった。最後に、巨核球分化における MYBBP1A の役割を明らかにするため、分化誘導時に MYBBP1A のノックダウンを行った結果、c-Myb の転写抑制は部分的に解除され、巨核球への分化が抑制された。マウス生体から単離した造血幹細胞においても K562 細胞と同様の結果が得られた。以上の結果から、血球系細胞において、細胞分化に伴う rRNA 転写抑制は、MYBBP1A による c-Myb の転写活性制御を介して、分化促進に働く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 2 件)

- ① Ono W*, Hayashi Y*, Yokoyama W*, **Kuroda T**, Kishimoto H, Ito I, Kimura K, Akaogi K, Waku T, Yanagisawa J. (*: equal contribution)

The nucleolar protein Myb-binding protein 1A (MYBBP1A) enhances p53 tetramerization and acetylation in response to nucleolar disruption.

Journal of Biological Chemistry, 査読有, 289(8):4928-4940 (2014)

- ② Ono W*, Akaogi K*, Waku T, **Kuroda T**, Yokoyama W, Hayashi Y, Kimura K, Kishimoto H, Yanagisawa J. (*: equal contribution)

Nucleolar protein, Myb-binding protein 1A, specifically binds to nonacetylated p53 and efficiently promotes transcriptional activation.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 434(3):659-663 (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 貴雄 (KURODA, Takao)

同志社大学・高等研究教育機構・助教

研究者番号：30620637