

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22570132

研究課題名（和文）クロマチン構造変換にかかわる RNA 分子の新規機能

研究課題名（英文） A novel function of RNA in the regulation of chromatin structure

研究代表者

奥脇 暢（OKUWAKI MITSURU）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50322699

研究成果の概要（和文）：

本研究ではクロマチン構造変換にかかわる RNA 分子の同定を目的として研究を進めた。核小体タンパク質 Nucleophosmin/B23 のヒストンシャペロン活性に影響を及ぼす RNA 分子の機能について検討を行った。B23 は核小体クロマチン制御において、RNA との複合体形成が重要であることを明らかにした。B23 の RNA 結合特異性を決定する分子基盤についても明らかになった。さらに B23 とともに働く RNA 分子の同定を進め、いくつかの候補 RNA が同定された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to identify RNA molecules involved in chromatin regulation by focusing on RNA-binding histone chaperone Nucleophosmin/B23. We found that B23 was recruited to the rRNA gene loci by using its RNA binding activity. In addition, we clarified the molecular mechanism by which B23 binds to specific RNA target. Furthermore, we identified RNA molecules specifically bound by B23 in vivo. This study will contribute to understand the regulation mechanism of chromatin structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：クロマチン、核小体、リボソーム、RNP 複合体、RNA、ヒストンシャペロン

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の担い手であるゲノム DNA はクロマチン構造を形成する事によって、非常にコンパクトに細胞核に収納される。DNA

を鋳型とするあらゆる反応において、クロマチン構造の変換は重要な制御段階である。これまで申請者らはアデノウイルスゲノム

をモデル鋳型とした試験管内反応系を用いて、RNA-タンパク質複合体を同定した。この複合体には核小体ヒストンシャペロン B23 と NPM3 および未知の RNA 分子が含まれることが明らかになっている。これまでにクロマチン構造変換にかかわる様々な因子が同定されているが、クロマチン構造制御にかかわる RNA 分子の機能はまったく明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、クロマチン構造変換にかかわる RNA 分子の実体を明らかにし、その機能を解明することによって、新規のクロマチン構造変換機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、核小体タンパク質 Nucleophosmin/B23 に着目して研究を進めた。HeLa 細胞、U2OS 細胞、293T 細胞など、ヒト由来のがん細胞株を使用し、細胞生物学的な実験を行った。B23 とクロマチンとの相互作用はクロマチン免疫沈降法を用いて検討した。生化学的な解析については、大腸菌で発現した B23 や NPM3 タンパク質を精製して利用した。B23 と協調的に働く RNA 分子を同定するために、B23 をアフィニティー精製し、含まれる RNA の同定を行った。また、B23 が特異的に結合する RNA を同定するため、細胞から調整した全 RNA 分子を B23 と混合し、B23 と相互作用する RNA を同定した。さらに、B23 が特定の RNA に相互作用する分子機構を解析した。

4. 研究成果

(1) B23 の RNA 依存的な rRNA 遺伝子発現調節機構の解明

これまでの解析から、B23 は核小体に局在

し、rRNA 遺伝子の発現を正に制御することが明らかになっていた。しかし、どのように B23 が核小体にリクルートされるのか、その分子機構は分かっていなかった。そこで、B23 が核小体クロマチンにリクルートされる分子機構の解析を行った。B23 には C 末端が異なる二つのスプライシングバリエント B23.1 および B23.2 が知られている。B23.2 は B23.1 に存在する C 末端の RNA 結合領域が欠損しており、試験管内で RNA 結合活性を持たない。B23.1 が核小体に局在するのに対して、B23.2 は核質全体に局在することが分かっている。rRNA 遺伝子への相互作用を調べたところ、B23.2 はほとんど rRNA 遺伝子領域にはリクルートされないことが明らかになった。また、B23.1 の RNA 結合活性は、細胞分裂期のリン酸化によって抑制されることが知られている。リン酸化型の B23.1 は核小体クロマチンにはリクルートされなかった。以上の実験より、B23.1 の核小体クロマチンへのリクルートには、その RNA 結合活性が重要であることが示唆された。RNA 結合活性を持たない B23.1 変異体は、rRNA 遺伝子の転写活性を促進することはできなかった。核小体クロマチンを特徴づける因子として転写因子 UBF が知られている。UBF は転写にかかわる因子のリクルートに関与することから、B23 の核小体クロマチンへのリクルートについて UBF の関連性を調べた。UBF を siRNA によって発現抑制した細胞では、B23.1 が核小体クロマチンへリクルートされなかった。以上の解析から、B23.1 はその RNA 結合活性と転写因子 UBF によって、核小体クロマチンへリクルートされることが明らかになった。

(2) B23 の相互作用因子 NPM3 による B23 の機能制御機構の解明

これまでの解析から B23.1 の RNA 結合活性は RNA 結合活性を持たない B23.2 との複合体

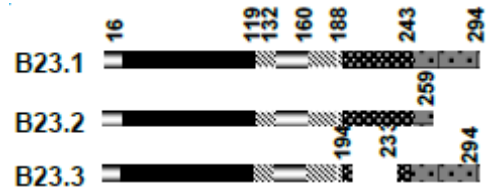
形成によって、抑制されることが明らかになっている。他グループの報告から、B23 のファミリー分子である NPM3 が B23 と相互作用することが報告されていた。そこで、NPM3 の B23 の機能制御による役割を検討した。試験管内における多量体形成の介せ解析を行った結果、B23.1:NPM3 は 4:1 の複合体を形成することが示唆された。B23.1-NPM3 複合体の RNA 結合活性は、B23.1 単独の複合体に比べ著しく抑制されることから、NPM3 は B23.1 の負の制御因子として機能する可能性が示唆された。B23.1 はヒストンシャペロンとしての機能が重要であることが分かっているが、NPM3 は B23.1 のヒストンシャペロン活性にはほとんど影響を与えなかった。B23.1 の RNA 結合活性は (1) の実験の通り、核小体クロマチンへのターゲティングに重要である。FRAP アッセイの結果、NPM3 によって RNA 結合活性が抑制されると、B23.1 の核小体滞在時間が有意に短くなった。NPM3 の発現は増殖の活発ながん細胞で多くなる傾向がみられることから、NPM3 の主な機能は B23.1 の局在を制御することで、増殖関連遺伝子の発現調節にかかわるものと考えられる。また、B23 と NPM3 は受精直後にみられる精子核の構造変換に重要な役割を担っていることが示唆されていた。しかしながら哺乳類における精子核構造制御におけるこれらの因子の役割は明らかではなかった。本研究では、NPM1-NPM3 複合体がマウス精子核の脱凝縮にかかわることを、試験管内実験系を利用して明らかにした。

(3) B23 の RNA 結合特異性の分子レベルでの解析

B23 がどのように RNA を認識し、その機能を発現するのかはほとんど明らかになっていなかった。そこで、B23 の RNA 認識機構を検討した。B23 には B23.1、B23.2 のほかに、

機能未知の領域を欠損したスプライシングバリエーションが報告されている。このバリエーションを B23.3 としてその RNA 結合活性を検討した(図 1)。

図1 B23 スプライシングヴァリエーションの構造



その結果、B23.1 が RNA と結合するのに対して、B23.2 および B23.3 ではその活性が著しく弱いことが明らかになった。B23.2 は RNA 結合領域として知られている領域を欠失しているため、その活性が弱い。一方で B23.3 は C 末端 (243-294 アミノ酸領域) の RNA 結合領域を有しており、その RNA 結合活性が弱い理由は不明であった。B23.3 で欠失した領域 (194-232 アミノ酸領域) は塩基性アミノ酸に富んでおり (塩基性領域)、この領域は単独で非特異的な RNA 結合活性を有していた。B23 は RNA のどのような構造を認識するのかは不明であるが、28S rRNA および 5.8S rRNA に親和性が強く、18S rRNA とはほとんど相互作用しない。一方で、塩基性領域の RNA 結合活性は、非特異的でありこの活性は、分子内の酸性アミノ酸領域 (119-188 アミノ酸領域) との相互作用によって調節されることが明らかになった。以上の解析から、B23 タンパク質の RNA 結合活性は、B23 分子に存在する天然変性領域によって、調節されることが明らかになった。B23 の RNA 結合活性は、リボソーム生合成の調節に重要な役割を果たしており、本研究の成果は細胞増殖制御機構の一端の解明に貢献する研究である。

(4) B23 と協調的に働く RNA の同定

B23 と協調的に働く RNA 分子を同定するた

めに、B23 のアフィニティー精製を行った。その結果、多くが成熟した rRNA 分子であったことから、B23 は核小体において rRNA 分子と相互作用することが推察された。しかしながら、クロマチン制御の活性に rRNA が関与するかは不明である。さらに B23 の RNA 結合特異性を解析するために、細胞内の比較的短い RNA を調整し、B23 と結合実験を行った結果、多くの RNA ポリメラーゼ III で合成される RNA が同定された。これらの RNA に共通する構造として、二本鎖 RNA を形成する領域が見出された。現在、B23 が二本鎖 RNA に特異的に相互作用するのか、詳細な検討を行っている。

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)

1. Samad MA, Komatsu T, Okuwaki M, Nagata K. B23/nucleophosmin is involved in regulation of adenovirus chromatin structure at late infection stages, but not in virus replication and transcription. *J Gen Virol.* 2012; 93(Pt 6):1328-38. doi: 10.1099/vir.0.036665-0. (査読有)
2. Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, Saotome-Nakamura A, Akashi S, Nishimura Y, Nagata K. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasm/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling *Nucleic Acids Res.* 2012 ;40(11):4861-78. doi: 10.1093/nar/gks162 (査読有)
3. Kato K, Okuwaki M, Nagata K. Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J Cell Sci.* 2011 124(Pt 19):3254-65. doi: 10.1242/jcs.083139. (査読有)
4. Hisaoka M, Ueshima S, Murano K, Nagata K, Okuwaki M. Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. *Mol Cell Biol.* 2010 ;30(20):4952-64. doi: 10.1128/MCB.00299-10 (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

1. 久岡美晴、永田恭介、奥脇暢 核小体タンパク質 Nucleophosmin/B23 の RNA 結合特性の解析 第 2 回リボソームミーティング 2013. 3. 29 東京農工大学、東京
2. 上島州平、永田恭介、奥脇暢 核小体形成における RNP 複合体の核小体クロマチンへの集合機構 第 2 回リボソームミーティング 2013. 3. 29 東京農工大学、東京
3. Mitsuru Okuwaki Formation and maintenance of the nucleolus by RNA and RNA binding proteins The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-ASIA Study レオパレスホテル、福岡市 2013. 1. 9
4. 奥脇暢 核小体形成における RNA と RNA 結合タンパク質の協調的な働き 第 30 回染色体ワークショップ・第 11 回核ダイナミクス研究会 2012. 12. 19 淡路夢舞台国際会議場、兵庫
5. Mitsuru Okuwaki Maintenance of the nucleolar structure by acidic RNA binding proteins 第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11 福岡国際会議場、福岡
6. Moriwaki Yoshihito, Mitsuru Okuwaki, Kyosuke Nagata, Yasuto Todokoro, Masahiko Sato, Aritaka Nagadoi, Yoshifumi Nishimura Interaction between H2A/H2B heterodimer and the acidic domain of histone chaperone hNap1 第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11 福岡国際会議場、福岡
7. Mitsuru Okuwaki Assembly and maintenance of the nucleolar structure by RNA and RNA binding proteins Human Biology Symposium-Biology and Regenerative Medicine 2012. 10. 31 つくば国際会議場、茨城
8. 早乙女愛、久岡美晴、永田恭介、奥脇暢 ヒストンシャペロンによる核小体クロマチンの制御 2012. 3. 16 広島大学、広島
9. 早乙女愛、奥脇暢 天然変性タンパク質 Nucleolin による核小体クロマチン制御機構 第 2 回新学術領域「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」公開シンポジウム 2012. 1. 24 千里ライフサイエンスセンター 大阪
10. 奥脇暢 分子間・分子内相互作用による核小体ヒストンシャペロン NPM1 の RNA 結合活性の制御 第 2 回新学術領域「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」公開シンポジウム 2012. 1. 24 千

- 里ライフサイエンスセンター 大阪
11. Mitsuru Okuwaki, Ayako Sumi, Kyosuke Nagata Function of homo- and hetero-oligomers of human Nucleophosmin/Nucleoplasmin family proteins, NPM1, NPM2, and NPM3 in sperm chromatin remodeling 第34回日本分子生物学会年会 2011.12.14
 12. Miharuru Hisaoka, Kyosuke Nagata, Mitsuru Okuwaki, Intramolecular regulation of the RNA binding activity of nucleolar protein nucleophosmin/B23. 第34回日本分子生物学会年会 2011.12.14 パシフィコ横浜
 13. Ueshima Shuhei, Kyosuke Nagata, Mitsuru Okuwaki Nop140 regulates rRNA production in both RNA-dependent and -independent manners 第34回日本分子生物学会年会 2011.12.14 パシフィコ横浜
 14. 加藤 大介、奥脇 暢、永田 恭介 ヒストン H1 結合因子によるクロマチン動態制御機構 核ダイナミクス研究会 2011.10.26
 15. Ai Saotome and Mitsuru Okuwaki RNA-mediated chromatin association of a nucleolar histone chaperone NucleolinRNA-mediated chromatin association of a nucleolar histone chaperone Nucleolin EMBO Workshop Nuclear Structure and Dynamics Isle sur la Sorgue, France 2011.9.30
 16. 駒木-安田加奈子、奥脇 暢、永田 恭介、河津 信一郎、狩野 繁之 熱帯熱マラリア原虫 pfl-cys-prx 遺伝子 cis-element に結合する新奇核内因子の同定およびその性状の解析 日本寄生虫学会年会 2011.7.19 東京慈恵会医科大学、東京
 17. 早乙女愛、奥脇 暢 核小体ヒストン シャペロン Nucleolin の RNA による機能制御機構 第33回日本分子生物学会 2010.12.7 神戸国際会議場、神戸
 18. 奥脇 暢、上島 州平、永田 恭介 核小体形成の生化学的解析 第33回日本分子生物学会 2010.12.7 神戸国際会議場、神戸
 19. Kohsuke Kato, Mitsuru Okuwaki, Kyosuke Nagata TAF-I is a linker histone chaperone in the mammalian somatic cell nucleus 第33回日本分子生物学会 2010.12.7 神戸国際会議場、神戸
 20. Miharuru Hisaoka, Mitsuru Okuwaki, Shuhei Ueshima, Kensaku Murano, Kyosuke Nagata, Nucleolar Chromatin Regulation by B23/Nucleophosmin

depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. 9th EMBL conference : Transcription and Chromatin, Heidelberg, Germany 2010.8.29

21. Kohsuke Kato, Mitsuru Okuwaki, Kyosuke Nagata. TAF-I, a novel somatic linker histone chaperone, is involved in chromatin dynamics. 9th EMBL conference : Transcription and Chromatin, Heidelberg, Germany 2010.8.29
22. Mitsuru Okuwaki, Function of Upstream Binding Factor in the Organization of Nucleolus. Wellcome Trust Scientific Conference, Sub-nuclear Structure and Functions 2010.7.28 Cambridge, UK.
23. 早乙女愛、奥脇 暢 RNAによるヒストン シャペロン Nucleolin (NCL) の機能制御 第9回核ダイナミクス研究会 2010.5.28 ラフォーレ修善寺、静岡

〔図書〕(計 1 件)

1. 奥脇 暢 永田 恭介 編集 目的別で選べる「タンパク質発現プロトコール」羊土社 2010 (268 ページ)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/younginit/okuwaki/Oku1/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥脇 暢 (OKUWAKI MITSURU)
筑波大学 医学医療系 准教授
研究者番号 : 50322699