

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440021

研究課題名(和文)天然変性タンパク質NPM1による新規の細胞増殖制御機構

研究課題名(英文) A novel mechanism of cell growth regulation by the intrinsically disordered protein, NPM1

研究代表者

奥脇 暢 (OKUWAKI, Mitsuru)

筑波大学・グローバル教育院・准教授

研究者番号：50322699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞増殖制御機構を明らかにすることを目的として、核小体天然変性タンパク質NPM1の機能解明に取り組んだ。NPM1は主に核小体に局在し、リボソーム生合成の制御にかかわることが明らかになっているが、その分子機構は明らかになっていない。また、核質においてもNPM1は重要な役割を担っていることが示唆されているが、標的となる遺伝子やその機能は明らかになっていない。本研究では、NPM1が核小体構造を形成する分子機構と、核質において転写因子と協調的に炎症、免疫、がん化にかかわる遺伝子発現調節にかかわることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the function of the intrinsically disordered protein, NPM1. NPM1 is mainly localized to the nucleoli and regulates the ribosome biogenesis, although its detailed function and the mechanism underlying this function was unclear. In addition, NPM1 has been suggested to play a crucial role in the gene expression program in growing cells. However, it has been currently not known how NPM1 is involved in the regulation of the gene expression. In this study, we clarified the molecular mechanism by which NPM1 maintains the nucleolar structure. Furthermore, we demonstrated that NPM1 regulates the expression of the genes critical for immune response, inflammatory response, and oncogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：核小体 転写 遺伝子発現 リボソーム 炎症応答

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、遺伝子発現制御機構を解明することを目的として研究を進めている。そのモデル材料としてアデノウイルスを用い、アデノウイルスの増殖にかかわる宿主因子 NPM1 を同定し、その非感染細胞における役割を明らかにすべく研究を進めてきた。NPM1 はヒストンシャペロン活性、RNA/DNA 結合活性を有し、主に核小体に局在するタンパク質である。我々は、NPM1 の N 末端の多量体形成ドメインと C 末端の RNA 結合ドメインに挟まれた中央の領域は天然変性領域であり、この領域がその機能制御に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。NPM1 の発現は増殖細胞で非常に高く、胃がん、大腸がん、前立腺がん、卵巣がんなど、多くの固形がんでの発現上昇が認められる。膀胱がんや乳がんにおいては、NPM1 の発現量がんの悪性度と相関することが報告されている。また、幹細胞において NPM1 は高発現しており、幹細胞の未分化性の維持にも重要な役割を担っていることが示唆されている。さらに、NPM1 の変異は造血器腫瘍で多く見出されており、中でも NPM1 の RNA/DNA 結合領域の変異が、急性骨髄性白血病の約 35% の患者に見つかっている。これらの背景から、NPM1 は細胞増殖を正に制御することが示唆されるが、NPM1 のどのような機能が細胞増殖を促進するのかはほとんど明らかになっていない。

NPM1 は核小体においてリボソーム生合成にかかわる機能を有するが、その分子機構の詳細は明らかになっていない。また、核質において様々な転写因子と直接相互作用し、その活性を制御することが報告されている。p53、c-myc、NF kappa B (NF kappa B)、YY1 など、細胞のがん化と直接関係する転写因子との相互作用も見出

されている。以上の背景から、NPM1 は核小体と核質において、特定の遺伝子発現を制御することで細胞増殖を正に制御することが想定される。これらの背景から NPM1 の機能を理解することは、細胞増殖制御機構を理解することにつながる。また、NPM1 の機能抑制は細胞の増殖抑制につながることを期待され、分子標的薬開発の良いターゲットとなる可能性がある。

## 2. 研究の目的

上述の背景より、本研究では細胞増殖促進・がん化の分子機構の解明を目的として、天然変性タンパク質 NPM1 による遺伝子発現制御機構解明をめざし研究を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、NPM1 の細胞増殖制御における機能を明らかにすることを目的として、NPM1 の核小体における機能、核質における機能の二つに着目して研究を進めた。細胞は HeLa 細胞、U2OS 細胞、293T 細胞、乳がん細胞株、NPM1 ノックアウト MEF 細胞などを用いた。試験管内実験系では、タンパク質を大腸菌で発現し、His タグあるいは GST タグを用いて高純度に精製した。また、大腸菌で発現が難しいタンパク質については、293T 細胞で発現し Flag タグを用いたアフィニティー精製を行い、実験に利用した。転写因子 NFkB の標的遺伝子への結合解析は ChIP アッセイを利用し、遺伝子発現解析には RT-PCR を用いた。また、網羅的なトランスクリプトーム解析はマイクロアレイを用いた。

## 4. 研究成果

(1) NPM1 による核小体構造制御機構の解明  
NPM1 は核小体に局在する。核小体はリボソーム生合成の場で、これまでの我々の解析から、NPM1 はヒストンシャペロンとしてリボソーム RNA 遺伝子領域のクロマチン構造を変化させその発現調節にかかわることを明らかに

してきた。NPM1 のノックダウン細胞を光学顕微鏡で観察すると、コントロール細胞に比べて明らかに核小体の構造が変化することが明らかとなった。本研究では、NPM1 のどのような機能が核小体の構造形成にかかわるかを明らかにすることを目的として研究を進めた。NPM1 をノックダウンすることによって、リボソームサブユニット前駆体の一部が核質全体に拡散し、リボソーム前駆体の局在変化が核小体の構造変化につながっていることを見出した。NPM1 は一部のリボソーム前駆体と直接相互作用し、それらを核小体に係留する機能を持つことが明らかになった。核小体の構造形成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、NPM1 はリボソーム前駆体を核小体にとどめることによって、リボソーム生合成の効率を制御していることが示唆される。

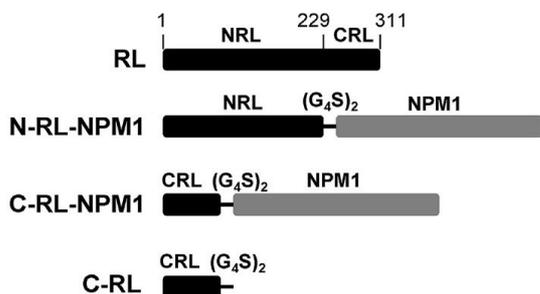
(2) NPM1 による NFκB 依存的な転写制御機構  
NPM1 はこれまでに様々な転写因子と相互作用することが報告されているが、遺伝子発現における NPM1 の役割は明らかになっていない。そこで、NPM1 が NFκB と相互作用することに着目して研究を進めた。NFκB は炎症や免疫応答にかかわる重要な転写因子である。NPM1 が NFκB と直接結合することを、精製タンパク質を用いて明らかにした。NPM1 は NFκB の Rel タンパク質すべてと、p50 サブユニットとの結合することを明らかにした。NFκB の NPM1 結合領域を検討した結果、NPM1 は DNA 結合領域と結合することが明らかになった。そこで、NFκB の DNA 結合活性に NPM1 が与える影響を検討した結果、NPM1 は NFκB のシャペロンとして機能し、NFκB の DNA 結合活性を促進することが明らかになった。NPM1 をノックダウンした細胞においては、NFκB の標的遺伝子への結合が減少し、その発現が減少することを見出した。NFκB の標的遺伝子発現における NPM1 の影響を網羅的に解析するため、

マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、TNFαによって発現が上昇する NFκB 標的遺伝子の多くが NPM1 の制御下にあることを見出した。しかしながらすべての NFκB 標的遺伝子を制御するわけではなく、NFκB が結合する配列によって、NPM1 の影響が変わることが明らかになった。NFκB は炎症応答、がん細胞の浸潤において重要な役割を担っていることから、炎症応答、がん化への NPM1 の役割を解析した。その結果、NPM1 が炎症応答や細胞の浸潤にかかわる遺伝子の発現を調節していることが明らかになった。NPM1 の制御する遺伝子の網羅的な解析から、免疫応答にかかわることも示唆されており、NPM1 の核質における機能解明に向け、これらの遺伝子発現における NPM1 の役割についても検討を進めている。

### (3) NPM1 の細胞内活性化状態検出法の構築

NPM1 は上述の通り、リボソーム生合成、核小体構造形成、炎症や細胞がん化に重要な役割を担うことが明らかになってきた。NPM1 の機能抑制が細胞のがん化や過剰な炎症応答抑制につながることから、NPM1 は抗炎症剤、抗がん剤の標的となる。そこで、NPM1 の活性化状態を簡便に測定する手法の開発を試みた。NPM1 は多量体として機能し、多量体形成は細胞内で制御されることが示唆されていた。そこで、NPM1 の多量体形成を簡便に検出する手法を開発することとした。検出法として Split Synthetic Renilla Luciferase protein fragment-assisted complementation bioluminescence activity (SRL-PFAC)を利用した。Renilla Luciferase (RL) を N 末端 (N-RL) と C 末端 (C-RL) で独立に発現させ、二つのペプチドが近接したときのみ Luciferase の発光が検出できるシステムで、単独で二つを発現しただけでは発光は検出できない。Luciferase N 末端、C 末端を NPM1 に融合し、二種類の融合タンパ

ク質の発現ベクターを作成した。



N-RL と C-RL を融合タンパク質なしで発現した場合には、発光はほとんど検出されず、NPM1 が N-RL と C-RL に融合したものを同時に発現したときにのみ明らかな発光が検出された。したがって、NPM1 が多量体を形成することによって、N-RL と C-RL が近接したものと考えられる。この系は、細胞周期や細胞の栄養状態における NPM1 の多量体形成状態を検出することができ、薬剤スクリーニング系に利用できるのではないかと考えている。

#### 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 8 件)

Lin J., M. Kato, K. Nagata, and \*Okuwaki M. Efficient DNA binding of NF- $\kappa$ B requires the chaperone-like function of NPM1. *Nucl. Acids Res.* In press (2016) (査読有)

Minakuchi M., Sugiyama K., Kato Y., Naito T., Okuwaki M., Kawaguchi A., and Nagata K. Pre-mRNA processing factor Prp18 is a stimulatory factor of influenza virus RNA synthesis and possesses the NP chaperone activity. *J. Virol.* In press (2016) (査読有)

Lin J., Hisaoka M., Nagata K., and \*Okuwaki M. Functional characterization and efficient detection of Nucleophosmin/NPM1 oligomers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 480, 702-708 (2016) (査読有)

\*Okuwaki M., Abe M., Hisaoka M., and Nagata K., Regulation of cellular dynamics and chromosomal binding site preference of linker histones H1.0 and H1.X. *Mol. Cell. Biol.*, 36, 2681-2696 (2016) (査読有)

Komatsu T, Robinson DR, Hisaoka M, Ueshima S, Okuwaki M., Nagata K, Wodrich H. Tracking adenovirus genomes identifies morphologically distinct late DNA replication compartments. *Traffic*, 17, 1168-1180 (2016) (査読有)

Saito S., Cigdem S., Okuwaki M., and Nagata K. Leukemia-associated Nup214-fusion proteins disturb XPO1-mediated nuclear-cytoplasmic transport pathway and thereby NF- $\kappa$ B signaling pathway, *Mol. Cell. Biol.*, 36, 1820-35 (2016) (査読有)

Ohtomo H, Akashi S, Moriwaki Y, Okuwaki M., Osakabe A, Nagata K, Kurumizaka H, Nishimura Y. C-terminal acidic domain of histone chaperone human NAP1 is an efficient binding assistant for histone H2A-H2B, but not H3-H4, *Genes Cells*, 21, 252-263 (2016) (査読有)

Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M., Nagata K. pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA, *eLife*, e08939 (2015) (査読有)

Murano K., Okuwaki M., Momose F., Kumakura M., Ueshima S., Newbold R., Nagata K., Reconstitution of human rRNA gene transcription in mouse cells by complete SL1 complex, *J. Cell Sci.*, 127: 3309-3319 (2014) (査読有)

[学会発表](計 10 件)

久岡美晴、永田恭介、奥脇暢 ヒストンシャペロン nucleophosmin/NPM1/B23 の RNA 結合制御機構 平成 26 年度日本生化学会関東支部例会 茨城大学(茨城県(水戸市)) 2014.6.14

阿部真弓、久岡美晴、永田恭介、奥脇暢 リンカーヒストン H1 バリエーションの機能制御機構の解明 平成 26 年度日本生化学会関東支部例会 茨城大学(茨城県(水戸市)) 2014.6.14

Jian-Huang Lin, Mitsuru Okuwaki, Mitsuyasu Kato, Kyosuke Nagata, NPM1 functions as a subunit of enhanceosome for NF- $\kappa$ B-mediated transcription, Tsukuba Global Science Week 2014 University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 2014.9.29 奥脇暢 Nucleophosmin/B23 による核小

体構造制御機構 第3回リボソームミ  
ーティング ANAホリデーインリゾート  
宮崎(宮崎県(宮崎市))、2015.3.17-18  
Mitsuru Okuwaki, The RNA binding  
activity of nucleophosmin/B23  
contributes to maintain the nucleolar  
structure and functions. EMBO  
Conference, Ribosome Synthesis,  
Brussels, Belgium, 2015.8.19-23  
Miharu Hisaoka, Jianhuang Lin,  
Kyosuke Nagata, and Mitsuru Okuwaki  
International Symposium Chromatin  
Structure, Dynamics, and Functions,  
2015, 8.23-26, Awaji Island, Japan  
Jianhuang Lin, Mitsuru Okuwaki,  
Mitsuyasu Kato, Kyosuke Nagata NPM1  
enhances inflammatory genes mediated  
by NF- $\kappa$ B 第38回日本分子生物学会、  
第88回日本生化学会 合同大会 神戸  
国際会議場(兵庫県(神戸市))、2015.  
12.1-4

奥脇暢、阿部真弓、久岡美晴、永田恭介  
Molecular mechanisms of cellular  
mobility and binding site preference  
of linker histone variants in the  
nucleus. 第38回日本分子生物学会、第  
88回日本生化学会 合同大会 神戸  
国際会議場(兵庫県(神戸市))、2015.  
12.1-4

久岡美晴、Jianhuang Lin、永田恭介、  
奥脇暢 HP1BP3 とヒストンシャペロン  
による遺伝子発現調節 第38回日本分  
子生物学会、第88回日本生化学会 合  
同大会 神戸国際会議場(兵庫県(神戸  
市))、2015. 12.1-4

奥脇暢 リンカーヒストンバリエント  
の機能制御機構、第3回ヒストンバリエ  
ント研究会、早稲田大学(東京都)、  
2016.2.28

〔図書〕(計 1 件)

奥脇暢 核小体の構造と機能を制御  
する lncRNA 実験医学増刊「ノンコー  
ディング RNA テキストブック」2015;  
98-99

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥脇暢 (OKUWAKI、Mitsuru)

筑波大学・グローバル教育院・准教授

(4)研究協力者

久岡美晴 (Hisaoka, Miharu)

上島州平 (Ueshima, Shuhei)

Jianhuang Lin

阿部真弓 (Abe, Mayumi)

研究者番号 : 50322699