

研 究 報 告 書(公開)

「RNA-タンパク質複合体による細胞核の構造・機能制御」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：奥脇 暢

1. 研究のねらい

細胞核の中には RNA の転写・修飾・切断等を協調的に、効率よく行うための機能的な領域が形成される。核小体はリボソームの生成を行うための機能領域である。本研究では、核小体に局在する RNA-タンパク質複合体の機能解析を通して、RNA 分子の新規機能の解明と、核小体構造形成機構の解明を目指した。本研究の成果から、さらに、細胞核の構造形成にかかわる基本原理を見出すべく研究を進めた。

2. 研究成果

モデルクロマチンを鋳型とした試験管内クロマチン構造変換活性を有する RNA-タンパク質複合体を同定した。核小体タンパク質 NPM1/Nucleophosmin/B23 は、単独でヒストンと相互作用してクロマチン構造形成機能を有しているが、細胞内における機能は不明であった。この因子の最大の特徴は、単独でヒストンシャペロン活性を有するものの、精製画分には RNA を含み、試験管内のモデルクロマチン構造変換活性は、RNA によって著しく促進される点である。また、B23 の細胞内局在の解析から、核小体の構造がダイナミックに変化することに着目して、研究を進めた。本研究では、以下の二つの研究課題に取り組んだ。

- ① B23-RNA 複合体の機能解析
- ② 核小体構造形成の分子基盤の解析

① B23-RNA 複合体の機能解析

B23 の核小体クロマチン制御

B23 は細胞内において核小体に局在することから、ヒストンシャペロンとしてリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子領域のクロマチン構造制御にかかわることが想定された。そこで、最初に B23 の rRNA 遺伝子領域への相互作用を検討した結果、B23 は rRNA 遺伝子の全領域に比較的一様に相互作用することを見出した。また、B23 をノックダウンすると、rRNA 遺伝子領域のヒストン量が増加し、rRNA の転写が抑制された。したがって、B23 は核小体クロマチンの構造を制御することによって、rRNA 遺伝子の転写調節に関与することが示唆された。

B23 の核小体クロマチンへの特異的な相互作用メカニズム

B23 の相互作用のターゲットはヒストンであるにも関わらず、核小体クロマチンにのみ相互作用していた。したがって、何らかのメカニズムによって、B23 は rRNA 遺伝子領域に特異的にリクルートされることが示唆された。研究開始当初より、B23 は細胞内で多くの RNA 分子と相互作用することが明らかになっていた。そこで、B23 の RNA 結合と、クロマチン結合との関連を調べた。その結果、B23 を免疫沈降するとクロマチン由来のヒストンとの相互作用が検出される。一方、RNase 処理した細胞抽出液を用いて B23 の免疫沈降実験を行うと、B23 とクロマチンとの相互作用は検出されなかった。したがって、B23 は RNA との相互作用に依存してクロマチンに相互作用することが想定された。

また、B23 は分裂期に高度にリン酸化され、RNA 結合活性が抑制されることが分かっている。そこで、B23 の分裂期における rRNA 遺伝子との相互作用を検討した結果、B23 は分裂期にクロマチンから離れることが明らかになった。また、分裂期のリン酸化を模倣した B23 変異体は、間期にクロマチンに結合しないことから、B23 は RNA 依存的に rRNA 遺伝子領域へ相互作用することが確かめられた。

分裂期にリン酸化されないタイプの B23 変異体では、分裂期に RNA 結合活性は維持されるものの、rRNA 遺伝子領域への相互作用は減少する傾向がみられた。したがって、RNA 結合活性のみでは、B23 が rRNA 遺伝子領域に特異的にリクルートされる点を説明できない。そこで、rRNA 遺伝子の特異的な転写因子である Upstream Binding Factor (UBF) に着目した。UBF は核小体クロマチンを規定する重要な因子であると考えられている。細胞内の UBF 量を、siRNA を用いて抑制すると、B23 の rRNA 遺伝子領域への相互作用が減少した。また、rRNA 遺伝子領域のヒストン量を調べると、UBF の減少によって、ヒストン量の上昇がみられた。したがって、B23 と RNA の複合体は、UBF を介して rRNA 遺伝子領域にリクルートされ、その領域のヒストン濃度の調節を行っていることが示唆された。

以上の結果から、クロマチン制御因子が特定の遺伝子領域にリクルートされる分子メカニズムとして、RNA と転写因子を必要とするという、新しいメカニズムを提唱した。

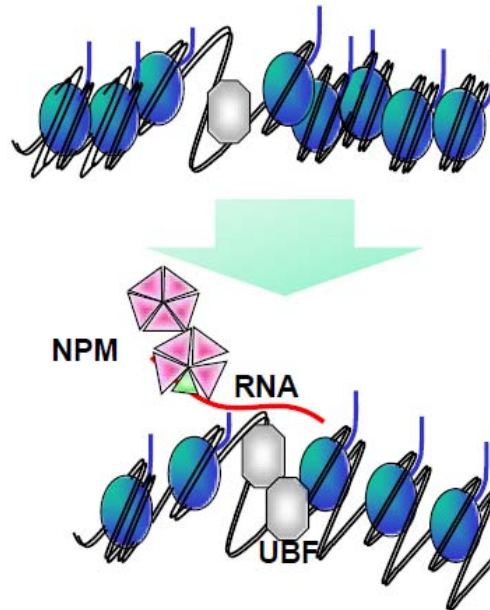


図1. RNAと転写因子UBFに依存したNPMの核小体クロマチンへのターゲティング
NPMはRNAと複合体を形成し、UBFが局在する核小体クロマチンへリクルートされる。NPMは核小体クロマチン上のヒストン量を抑制し、結果として転写の活性化に寄与する。細胞分裂期には、NPMのRNA結合活性が抑制され、NPMは核小体クロマチンから離れる。

② 核小体構造形成の分子基盤に関する研究

核小体は光学顕微鏡でも観察できる非常に大きな細胞核内構造体である。核小体の構造は細胞の分裂とともに消失し、G1 期の初期に再形成される。しかし、核小体の構造がどのように形成され、また維持されるのか、ほとんど明らかになっていない。そこで、初めにどのような分子基盤で、核小体の構造が維持されるのかを検討した。その結果、rRNA の修飾にかかわる Fibrillarin や DKC1、切断にかかわる Nucleolin や B23、リボソームタンパク質 L4 など、多くの核小体 RNP 形成因子が核小体クロマチンに物理的に相互作用していることを見出した。また、クロマチンを形成するヒストン H3 を用いた免疫沈降から、多くの RNP 形成因子がクロマチンと相互作用することが示唆された。同様の実験を RNase 処理した抽出液を用いて行くと、ヒストンと RNP 構成因子との相互作用がみられなくなった。したがって、多くの核小体 RNP 複合体は RNA との相互作用を介して、核小体クロマチンに相互作用し、核小体構造が維持されていることが示唆された。

さらに上述の①の実験と同様に、rRNA 遺伝子の転写因子 UBF を、siRNA を用いて減少させると、多くの RNP 構成因子のクロマチン結合が抑制された。UBF を過剰発現によって核小体以外の場所に局在させると、核小体に局在するはずの DKC1 や Fibrillarin が、過剰発現した UBF と共局在することが明らかになった。したがって、転写因子 UBF は核小体クロマチンの構造を規定し、RNP 複合体をつなぎとめることによって、核小体の構造維持にかかわることが示

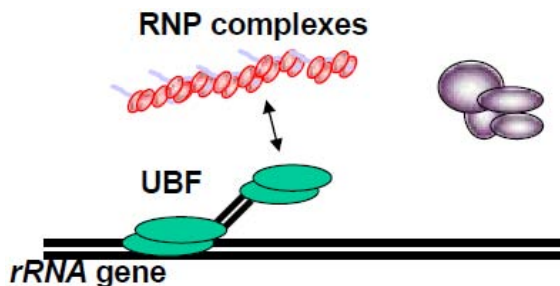


図2. UBFを介した核小体構造形成の分子機構
核小体においてRNP複合体を形成する因子は、UBFが局在する核小体クロマチンへリクルートされる。UBFのHMGドメインがDNAおよびRNAに相互作用することによって、RNP複合体と核小体クロマチンをつなぎとめている。

唆された。UBF は High Mobility Group (HMG)ドメインと呼ばれる核酸結合領域を6個持つことが知られている。試験管内における結合実験より、UBF は DNA と RNA に相互作用する活性がみられ、また GST 融合型の UBF を細胞核抽出液と混合すると、核抽出液中の核小体 RNP 複合体と相互作用することが明らかになった。これらの結果より、UBF は HMG ドメインを介して、DNA に結合しながら、一部の HMG ドメインによって RNP 複合体をリクルートする機能を持つことが示唆された。

これらの結果は、これまでにほとんど明らかにされていなかった、核小体の構造形成の分子基盤を解明する一つの情報を提供するとともに、細胞核の構造形成に対しても手掛かりになる研究成果である。

3. 今後の展開

研究項目① B23-RNA 複合体の機能解析

本研究を進める中で、B23 が RNA との複合体形成を介して核小体クロマチンに相互作用することが明らかになった。しかしながら、B23 と協調的に機能する RNA 分子の実体に関してはいまだに明らかにできていない。現在 B23 と相互作用する候補 RNA 分子を同定し、B23 の RNA 結合特異性に関する実験を進めている。これまでの研究より、B23 のクロマチン構造変換機能において、RNA 分子には二つの機能があるものと想定されている。一つは B23 を核小体クロマチンへリクルートする機能であり、もうひとつは B23 と協調的にクロマチン構造を変換させる機能である。

今後、RNA 分子の実体を解明し、B23 と RNA 分子によるクロマチン構造変換の分子機構を明らかにしていきたい。RNA 分子がクロマチン構造変換の実行因子として機能しているという報告はこれまでになく、新たな RNA 機能としてきわめて重要であると考えている。

研究項目② 核小体構造形成の分子基盤に関する研究

本研究の成果に基づき、UBF が足場となる核小体構造形成機構を提唱した。この研究成果に関しては現在投稿準備中である。ただし、UBF の RNA 結合特異性や、DNA 結合特異性はいまだ不明な点が多く、今後の課題である。さらに細胞分裂期において、核小体の構造は崩壊することが分かっているが、そのメカニズムは不明である。UBF は核小体の構造維持に重要であるという知見をもととして、UBF の分裂期における修飾状態と RNA および DNA 結合活性の関連を調べることで、分裂期における核小体構造崩壊の分子機構に迫りたい。また、UBF は rRNA 遺伝子上のプロモーター領域および rRNA コーディング領域に特に多く局在している。一方で、多くの核小体 RNP は遺伝子間領域にも局在する傾向がみられた。したがって、UBF がすべての RNP 複合体をリクルートするとは考え難く、他の核小体基盤形成因子が想定される。今後は基盤形成因子の実体を明らかにすべく、研究を進めていく。

4. 自己評価

本研究課題では、二つの研究項目に取り組んだ。

- ① B23-RNA 複合体に関しては、当初 B23 と協調的に機能する RNA 分子の機能を解明することが目標であった。RNA の実体解明に至らなかった点は残念であるが、RNA 分子の候補は同定できており、今後できるだけ早くその機能の解明につなげていきたい。また、ヒストンシヤペロンが特定の遺伝子領域を活性化するメカニズムはこれまでにほとんど報告がなく、RNA と転写因子を介した分子機構を提唱できたことはよかったと思う。
- ② 核小体構造形成に関しては、UBF を足場とした RNP 集合機構を提唱することができた。細胞核構造に関する研究は、蛍光タンパク質の利用による分子の動きを基盤とした研究が先行してきた。本研究では、その分子の機能解析を通して、分子レベルのメカニズムの提唱ができた点はよかった。ただし、UBF 機能に関しては未完成な部分が多く、近い将来の課題である。

5. 研究総括の見解

リボソームの生合成が行われる核小体の構造・機能の制御機構を、RNA-蛋白質複合体研究を通して明らかにすることを目標とした。核小体蛋白質 B23 は、RNA と転写因子(UBF)を介し、核小体クロマチンの構造を制御し、rRNA 遺伝子の転写調節に関与するという新しいメカニズムを提唱した。B23 が相互作用する RNA の実体解明は今後の問題である。また、核小体構造形成に、UBF を中心とした非常に多くの RNP 集合機構を示し、これまで、ほとんど明らかにされていなかった、核小体の構造形成の分子基盤解明の一步となった。今後、UBF 分子の構造と機能の相関を明らかにする必要がある。まだ闇の中にある研究分野に挑戦し、今後の研究の手がかりを与えたことは賞賛に値する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Hisaoka M, Ueshima S, Murano K, Nagata K, and Okuwaki M. Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. <i>Mol Cell Biol.</i> 2010 30(20):4952-62
2. Okuwaki M, Kato K, Nagata K. Functional characterization of human nucleosome assembly protein 1-like proteins as histone chaperones. <i>Genes Cells.</i> 2010 Jan 15(1):13-27
3. Komaki-Yasuda K, Okuwaki M, Kano S, Nagata K, Kawazu S. 5' sequence- and chromatin modification-dependent gene expression in <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocytic stage. <i>Mol Biochem Parasitol.</i> 2008 162(1):40-51.
4. Murano K., Okuwaki M., Hisaoka, M., and Nagata, K. Transcription regulation of rRNA gene by a multi-functional nucleolar protein, B23/nucleophosmin through its histone chaperone activity. <i>Mol Cell Biol.</i> 2008 8(10):3114-26
5. Okuwaki M. The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein. <i>J Biochem.</i> 2008 Apr;143(4):441-8.

(2)特許出願

なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. **Function of Upstream Binding Factor in the organization of the nucleolus**
Mitsuru Okuwaki Wellcome Trust Scientific Conference, Subnuclear structure and Diseases (2010.7.29 Cambridge, United Kingdom)
2. **RNA依存的なヒストンシャペロンのクロマチンターゲティング**
奥脇暢 遺伝情報DECODE冬のワークショップ 2009(2009.1.19-21 新潟湯沢)
3. **核小体クロマチンを制御する転写因子 UBF の機能** 奥脇暢 第 82 回日本生化学会大会(2009.10.23 神戸)
4. **核小体構造形成に関わる転写因子の役割**
奥脇暢, 永田恭介
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会(2008.12.9-12 神戸)