様式Ｃ－１９

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 5 月 20 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：22570168
研究課題名（和文）　新規コアクチベーターＮＦ複合体の構成因子と制御機構の解析
研究課題名（英文）　Analysis of the components of a novel coactivator. the NF complex, and its regulatory mechanisms

研究代表者
久武　幸司（HISATAKE KOJI）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：70217236

研究成果の概要（和文）： NF複合体は、c-fos遺伝子の上流とコアプロモーターに作用し転写を活性化する。NF45、NF90及びNF110をノックダウンすると、血清によるc-fos遺伝子の転写誘導が低下した。また、クロマチン免疫沈降より、NF複合体はc-fosのエンハンサーとプロモーター上では、遺伝子誘導前後で存在するが、遺伝子の内部では、RNAポリメラーゼIIと同様に転写活性化に伴って存在量が変化することが分かった。これらのことより、NF複合体はc-fos遺伝子の誘導時に転写コアクチベーターとしてのみならず、遺伝子発現の各段階を統括していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The transcriptional activities of the NF complexes (NF45-NF90 and NF45-NF110) are mediated by both the upstream enhancer and core promoter regions of the c-fos gene. Knockdown of the endogenous NF90/NF110 in mouse cells results in a diminished induction of c-fos transcription upon serum stimulation. Chromatin immunoprecipitation assays show that the NF complexes occupy the c-fos enhancer/promoter region before and after serum induction and that their occupancies within the coding region of the c-fos gene increase in parallel to that of RNAPII upon serum induction. Thus, the NF complexes appear to serve as multifunctional coactivators that coordinate different steps of gene expression to facilitate rapid response of inducible genes.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
２０１２年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学
キーワード：転写・コアクチベーター

１．研究開始当初の背景

(1) 研究開始時までの状況

c-fos 遺伝子等の前初期遺伝子群では、増殖因子（例えば PDGF や EGF）がキナーゼ等のカスケードを介して核にシグナルを伝達し、プロモーターの上流に結合する転写因子（c-fos では SRF、Elk-1、ATF1、CREB、STAT）のリン酸化を引き起こし、転写が活性化されることが知られている。しかし、増殖因子のシグナルが核に伝達された後に、いかにして転写が促進するかは依然不明な点が多い。申請者らは、これまでの研究より c-fos 遺伝子を活性化する未知のコアクチベーター活性を検出し、その活性の一つが NF 複合体であることを見出した。

NF 複合体は NF45 と NF90（または NF110）からなる 2 量体で、二本鎖 RNA 結合ドメインをもつ因子で、mRNA に結合して mRNA の核から細胞質への輸送と安定性の制御に関与する。最近の報告では、NF 複合体は、RNA ポリメラーゼ II と共免疫沈降され、転写伸長複合体の一部を形成していることが知られてい。さらに、ヒストン H3 の K4me3（トリメチル化された 4 番目のリシンで、転写と強く相関する修飾）に結合するクロマチン結合因子 CHD1 とも複合体を形成していることなど、転写との関係が強く示唆されている。この様に、これまでの報告から NF 複合体の転写後の作用は比較的良く分かっているが、この複合体の転写開始および伸長反応での役割は不明である。

(2)着想に至った経緯

最近の我々の解析から、HeLa 細胞より単離した NF 複合体には低分子 RNA およびタンパク質からなる複数の因子が含まれることが分かった（Fukuda et al, 2008 年 10 月 ASBMB Special Symposia, Transcriptional Regulation by Chromatin and RNA Polymerase II で発表）。興味深いことに、NF 複合体を HeLa 各抽出液から P11 カラムで分画すると、0.1M KCl 画分（活性型）と 0.3M KCl 画分（非活性型）に分かれて存在する。両者は、比活性と結合因子が異なる上に、細胞増殖状態に応じて量比が変化する。以上より、細胞増殖に応じて NF 複合体の活性が結合因子によって制御されていることを強く示唆された。以上より、NF 複合体の転写制御メカニズムを解析するという着想に至った。

(3) 国内・国外の研究動向及び位置づけ

真核生物の転写については国内外で多く転写研究の分野では、すでに多数のコアクチベーターが報告されてが、まだ多くのコアクチベーター群の存在が予想される。また、当因子のように ncRNA と結合し、多サブユニット構造を持ち、リン酸化その他の修飾で活性が変化するコアクチベーター類は two-hybrid 法などの手法で発見するのには限界がある。この点で、生化学的手法と in vitro 転写アッセイ系を用いる研究は、この分野での新たなコアクチベーター因子の発見や ncRNA 分子の転写への関与の解明を促進すると期待できる。

２．研究の目的

本研究では、転写から翻訳まで過程で作用する NF 複合体の制御機構を明らかにするため、相互作用するタンパク質および低分子 RNA の同定を進め、NF 複合体の活性化機構を明らかにする。また、細胞増殖に伴い、どの転写因子が NF 複合体により制御されているかも明らかにする。

３．研究の方法

(1) NF 複合体と結合するタンパク質因子の同定

NF45、NF90、NF110 各サブユニット遺伝子に FLAG タグをつけた細胞株を作製し、その核抽出液から NF 複合体を精製すると NF45/NF90(110)には幾つかのタンパク質が結合している。この細胞株を大量培養（100 リットル程度）し十分量の NF 複合体を精製した後に、結合タンパク質を質量分析で同定する。

(2) NF 複合体と結合する RNA の同定

NF 複合体には 100nt 未満の RNA（miRNA または snRNA と思われる）と 200-500nt 程度の RNA が結合している。これらの RNA を鋳型にして逆転写を行い、結合 RNA を cDNA としてクローニングして塩基配列を決定する。クロー

ン化した RNA の NF45、NF90、NF110 との結合および結合による NF 複合体の機能を in vitro 転写系を用いて明らかにする。また siRNA による RNA のノックダウン、または細胞内での一過性発現にて NF 複合体の機能を、転写・転写後プロセッシング、核からの輸送および翻訳など、多角的に検討する。この際には c-fos mRNA だけでなく、他種類の mRNA について検討を加える。

(3)NF 複合体の遺伝子上での動態

NF 複合体は転写以降の段階にも作用する可能性が高い。NF 複合体の各サブユニットに対する抗血清を作製する。得られた抗血清をアフィニティー精製し、クロマチン免疫沈降法を行い、c-fos 遺伝子上での NF 複合体の動態を明らかにする。

(4)NF 複合体と転写因子群の相互作用

NF 複合体のサブユニットを GST 融合タンパクしつとして発現させ、精製する。これらのタンパク質を用いて、基本転写因子やアクチベーターとの相互作用を解析する。

(5) NF 複合体による前初期遺伝子の発現調節

c-fos 遺伝子は多様な刺激により転写活性化される。特に、EGF などの成長因子と anisomycin などのストレス刺激ではシグナル伝達経路が異なる。細胞を NF タンパク質の siRNA で処理後に、EGF などの成長因子と anisomycin などのストレス刺激で c-fos 遺伝子を活性化して、NF 複合体がどの経路と協調して作用するのかを明らかにする。

４．研究成果

(1)NF 複合体と結合するタンパク質因子の同定

NF 複合体の各サブユニットを発現する HeLa 細胞より抽出液を作製し、M2 アガロースで精製を行った。各フラクションから得られた複合体、各サブユニットから得られた複合体を SDS-PAGE で比較し、十個以上のタンパク質が特異的に結合していることが明らかになった。これらにタンパク質は質量分析で同定中である。

(2)NF 複合体と結合する RNA の同定

NF 複合体中には long-non coding RNA と思われる RNA と miRNA に相当する大きさの RNA が結合していることを見出した。各 RNA についてクローニングを行い、NF 複合体の機能的関連を解析中である。

(3)NF 複合体の遺伝子上での動態

c-fos 遺伝子上の、-3,400 bp、-600 bp、-300 bp、+1、+1,600 bp、+3,000 bp の領域での NF 複合体の結合を経時的に明らかにした。その結果、NF 複合体は転写活性化とは無関係にプロモーター上に存在することが分かった。また、遺伝子の内部では、PolII と同様に転写活性化に伴って 30 分後には存在量が増加し、60 分後には存在量が元に戻ることが分かった。

以上より、NF 複合体は PolII と同様にダイナミックに遺伝子上に存在し、おそらく PolII と結合して遺伝子上を移動することが示唆された。

(4)NF 複合体と転写因子群の相互作用

GST プルダウンの結果、NF 複合体は、CREB、ATF1、Elk-1 と結合することが分かった。また、TDIID、TFIIB とも結合した。TFIID の細部ユニットでは、TAF1、TAF3、TAF8、TBP と結合した。以上のことより、NF 複合体は、アクチベーターや基本転写装置と結合することによって、プロモーター上に局在することが、強く示唆された。一方、NF 複合体は PolII のリン酸化、非リン酸化型のどちらにも結合しなかった。このことより、NF 複合体は、何らなの因子を介して PolII に間接的に結合し、c-fos 遺伝子上を移動することが示唆される。

(5) NF 複合体による前初期遺伝子の発現調節

細胞内での NF 複合体の役割について検討するため、siRNA を用いて NF 複合体をノックダウンし、c-fos 遺伝子の発現誘導における影響を調べた。その結果、NF 複合体をノックダウンした細胞では血清刺激による c-fos 遺伝子の誘導が顕著に低下することが明らかとなった。EGF 刺激についても検討した結果、NF 複合体をノックダウンした細胞において発現誘導の低下が見られた。一方、anisomycin 刺激では、Nf 複合体をノックダウンしてもほとんど変化しなかった。これらの結果より、NF 複合体は c-fos 遺伝子が増殖因子で活性化されるときにのみ作用し、ストレス刺激による c-fos 遺伝子の活性化

には関与しないことが分かった。

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０件）

〔学会発表〕（計３件）

(1)Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Nishimura K, Hisatake K. The RNA-binding protein complexes NF45/90 and NF45/110 activate c-fos transcription in a signal-dependent way
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 12 日
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(2)Fukuda A, Shimada M, Nakadai T, Nishimura K, Hisatake K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R) cooperates with Mediator to enhance transcription reinitiation
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 15 日
パシフィコ横浜

(3)Fukuda A, Takeuchi M, Nakadai T, Shimada M, Nishimura K, Hisatake K. Activation of multiple-round transcriptions by a novel coactivator hnRNP R and Mediator
Cold Spring Harbor Laboratory meeting on "Mechanisms of Eukaryotic Transcription"
2011 年 8 月 31 日
New York, USA

〔その他〕
ホームページ等
筑波大学医学医療系　遺伝子制御学研究室ホームページ
http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/

６．研究組織
(1)研究代表者
久武　幸司（HISATAKE KOJI）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：70217236

(2)研究分担者
福田　綾（FUKUDA AYA）
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：50436276