

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23770200

研究課題名（和文） RNA 結合タンパク質を介した転写制御機構の解析

研究課題名（英文） Mechanistic analyses of transcriptional regulation via RNA-binding proteins

研究代表者

福田 綾（FUKUDA AYA）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50436276

研究成果の概要（和文）：新規コアクチベーターhnRNP R (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) はメディエーターと協調して c-fos プロモーターからの転写リイニシエーションを促進する。メディエーターの CDK8 モジュール(CDK8, Cyclin C, MED12, MED13)は、hnRNP R とメディエーターとの協調作用に抑制的に働くことがわかった。また、hnRNP R は Scaffold の構成因子や TFIIB のほか、転写産物と直接結合することも明らかにした。hnRNP R をノックダウンした細胞では、c-fos を含む複数の前初期遺伝子の誘導が顕著に低下した。これらの結果より、前初期遺伝子の強力な発現誘導に hnRNP R が重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A novel coactivator hnRNP R (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R) facilitates transcription reinitiation from the c-fos promoter in vitro in cooperation with Mediator. The cooperative action of hnRNP R and Mediator is diminished by the CDK8 module, which is comprised of CDK8, Cyclin C, MED12, and MED13 of the Mediator subunits. Consistently, hnRNP R interacts with the Scaffold components (Mediator, TBP, and TFIIB) as well as TFIIB, which recruits Pol II and TFIIF to Scaffold. The RNA transcript produced from the G-free cassette interacts with hnRNP R through its RNA recognition motifs (RRMs) and arginine-glycine-glycine (RGG) domain. Knockdown of hnRNP R in mouse cells compromised rapid induction of several immediate-early genes. These results suggest an important role for hnRNP R in regulating robust response of immediate-early genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

当研究では細胞内により近い条件下で真核生物の転写調節機構を解析するため、GAL4 融合タンパク質のような人為的に作

製した因子ではなく、c-fos 遺伝子プロモーターとその発現誘導に重要な 4 つのアクチベーター (SRF, Elk-1, CREB, ATF1) を全長のタンパク質として調製し、in vitro 転写システムを構築した。このシステムを用いた解析により、ヒト培養細胞 (HeLa) の核抽出液より RNA 結合

タンパク質 hnRNP R (heterogeneous ribonuclear protein R) を新規コアクチベーター分子の一つとして同定した。hnRNP R は3つの RNA Recognition Motifs (RRMs) と1つの RGG ドメインをもつ 633 アミノ酸のタンパク質である。hnRNP R の組換え体を転写反応に加えた結果、添加量依存的に転写を促進し、メディエーターと協調的に転写を促進することも明らかにした。(Fukuda A. et al., J. Biol. Chem. 2009, 23472-23480)

(2)着想に至った経緯

メディエーター存在下での hnRNP R による転写活性化を注意深く観察した結果、1 回目の転写のみならず2回目以降の転写も顕著に促進されることが明らかとなった。当転写システムの鋳型 DNA は c-fos 遺伝子プロモーターの下流に G-less cassette (G のない約 400bp の配列)を繋げてあり、GTP 非存在下で反応を行うと RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が G-less cassette 下流の最初の G で停止する。そのため2回目の転写を行う Pol II は G-less cassette 末端の少し手前で停止し、1回目より短い転写産物ができる。2回目以降の転写は1回目の転写反応の単なる繰り返しと考えられがちだが、実際には巧妙に制御される重要なステップであることが示唆されている。しかし、2回目以降の転写を制御する因子やその調節メカニズムについてはあまり解析されておらず、不明な点が多い。当研究では、hnRNP R が転写産物 RNA と結合することを見出し、RNA を介して1回目の転写の進行を感知した hnRNP R がメディエーターと協調し、2回目以降の転写反応を促進しているのではないかと考えた。以上より、転写産物 RNA、hnRNP R およびメディエーターによる新しい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の研究が行われ、転写因子のリクルートメント、転写開始、伸長などさまざまな段階で制御されることが示されている。一度転写を行

った Pol II は再利用されると考えられており、Pol II CTD (C-terminal domain) 脱リン酸化酵素等の関与が示唆されているが (Ansari A. et al., Gene Dev. 2005, 2969-2978)、2回目以降の転写調節に関する知見は少なく、はっきりとした制御機構は不明である。一方、hnRNP R は1998年に自己抗原の一つとして同定され、脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子がコードするタンパク質 SMN と結合することが報告されている (Rossoll W. et al., Hum. Mol. Genet. 2002, 93-105)。線虫のホモログを用いた解析では、hnRNP R が選択的スプライシングに関与することが示唆されているが (Kabat JL et al., J. Biol. Chem. 2009, 28490-28497)、転写調節因子としての機能は報告されていない。本研究で転写産物 RNA、hnRNP R およびメディエーターを介した新しい転写制御メカニズムを解明することができれば、先駆的な知見になる。

2. 研究の目的

真核生物の遺伝子発現はあらゆる場面で巧妙に制御され、多数の因子が関与する。当研究で同定した新規転写コアクチベーター hnRNP R は転写産物 RNA と結合し、普遍的コアクチベーターとして知られるメディエーターと協調して転写を活性化する。hnRNP R とメディエーターは1回目の転写のみならず2回目以降の転写も促進し、RNA と転写コアクチベーターを介した新しい転写活性化機構が示唆されることから、当申請課題ではこの転写活性化メカニズムの解明を目的として研究を行う。

3. 研究の方法

(1) hnRNP R の機能ドメインの同定および転写活性化における役割の解明

hnRNP R は3つの RNA Recognition Motifs (RRMs)、RGG ドメインといった複数の RNA 結合ドメインの他、酸性アミノ酸領域やグルタミン-アスパラギンに富んだ領域など様々な機能ドメインを有している。RRMs や RGG ドメインは RNA だけでなく、他のタンパク質との結合にも関与する。hnRNP R が RNA やメディエーターを介してどのように転写を活性化しているのかを解明するため、各ドメインを欠失させた変異体を作製し、in vitro 転写反

応や GST プルダウンアッセイにより他因子との機能的・物理的相互作用を解析する。また hnRNP R と転写産物 RNA との結合を調べ、hnRNP R を介した転写活性化における転写産物 RNA の役割について検討する。

(2) メディエーター複合体の主要サブユニットの解析

メディエーターはさまざまな遺伝子の転写制御に重要な役割をもつ普遍的コアクチベーターとして知られているが、30 個以上もサブユニットがあるうえ、組成の異なる部分複合体もいくつか存在し、制御メカニズムは未知の部分が多い。特に、当研究で見出した 2 回目の転写を促進する機能に関してはほとんど解析されていない。サブユニット組成の異なるメディエーター様複合体を単離し、hnRNP R との協調的転写活性化を担うサブユニットの同定と機能解析を行う。

(3) hnRNP R の生理的機能

培養細胞に siRNA を導入し hnRNP R をノックダウンする。ノックダウンの効果は、ウェスタンブロッティングによりタンパク質レベルで検討する。c-fos 遺伝子を血清刺激等で誘導し、hnRNP R の有無が c-fos 発現誘導に与える影響を RT-qPCR により調べる。また、c-fos 以外の遺伝子の発現に与える影響についても検討する。さらに転写活性化に伴う hnRNP R の遺伝子上での局在変化をクロマチン免疫沈降により解析する。当研究では既に抗 hnRNP R 抗体を作製し、免疫沈降に使用可能なことを確認している。また、メディエーターの局在変化についても併せて解析する。

4. 研究成果

(1) hnRNP R とメディエーターによる協調的転写促進

c-fos 遺伝子プロモーターを含むプラスミドを鋳型に用いた in vitro 転写システムにおいて、hnRNP R が既知のコアクチベーターであるメディエーターと協調的に転写を活性化し、1 度目の転写のみならず 2 度目の転写も顕著

に促進することを見出した。In vitro 転写反応で見られたサイズの小さい RNA が 2 度目の転写産物であることは、サルコシルを用いた実験や RNase protection assay によって確認した。また、転写開始後、経時的に転写産物 RNA を解析し、複数回の転写が起こっていることを示唆する結果を得た。

(2) hnRNP R を介した転写活性化の CDK8 モジュールによる調節

メディエーターは 30 個近くのサブユニットからなる巨大な複合体で、CDK8 を含むモジュール (CDK8, Cyclin C, MED12, MED13) がメディエーター活性の調節に関与するといわれている。HeLa 細胞核抽出液から CDK8 モジュールを含むメディエーターと、含まないメディエーターを精製して in vitro 転写反応を行ったところ、CDK8 モジュールを含むメディエーターでは hnRNP R との協調作用が弱く、CDK8 モジュールがメディエーターと hnRNP R による転写促進に抑制的に作用することがわかった。

(3) hnRNP R と転写開始複合体との相互作用
GST プルダウンアッセイの結果、hnRNP R がメディエーターをはじめアクチベーターや基本転写因子のいくつかと結合することが明らかになった。転写活性化の際には、1 度目の転写が開始した後、Pol II および基本転写因子の一部がプロモーターから解離し、残りの因子は 2 度目以降の転写に必要な因子を呼び込む足場 (Scaffold) となる。hnRNP R は、メディエーターや TFIID 等と結合することから 1 度目の転写が開始した後も Scaffold とともにプロモーター上に残り、2 度目の転写に必要な因子群を積極的に呼び込むことで急速かつ膨大な遺伝子発現誘導を可能にしていると考えられる

(4) hnRNP R を介した転写活性化における転写産物 RNA の役割

GST プルダウンおよび免疫沈降の結果、hnRNP R が c-fos 遺伝子の転写産物 RNA と直接結合することがわかった。hnRNP R と転写産物 RNA との結合が 2 度目の転写に及ぼす影響を検討するため、長さの異なる一連の鋳型 DNA を用いて転写反応を行った。その結果、hnRNP R とメディエーターによる 2 度目

の転写促進効率が鋳型 DNA の長さ依存的に変化することが明らかになり、鋳型の長さ、すなわち転写産物 RNA の長さが転写促進に関係していることが示唆された。hnRNP R の欠失変異体を用いた解析で hnRNP R の RNA 結合領域が転写活性化に重要であることも本研究で見出しており、転写の進行に伴って伸長した転写産物 RNA が hnRNP R に結合し、転写促進に関与していることが示唆された。

(5) hnRNP R による前初期遺伝子の発現調節

細胞内での hnRNP R の役割について検討するため、siRNA を用いて hnRNP R 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、hnRNP R 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。また、c-fos 以外の前初期遺伝子(egr-1, fra-1, pip92, junB, c-myc, c-jun)についても検討した結果、hnRNP R 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、恒常的に発現する遺伝子(junD, GAPDH, H2afj, gamma-tubulin)や、Pol I あるいは Pol III によって転写される遺伝子(45S rRNA, 5S rRNA)の発現レベルは、hnRNP R 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、hnRNP R は前初期遺伝子のように外界刺激に応じて一時的に高レベルで誘導される遺伝子の転写調節に重要な役割を担っていることが示唆された。

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)Fukuda A

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

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

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

福田 綾 (FUKUDA AYA)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50436276