

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18412

研究課題名(和文)新規ヒストンシャペロンGRWD1のp53抑制と発がんへの関与

研究課題名(英文)Novel histone chaperone GRWD1 inhibits p53 and promotes tumorigenesis

研究代表者

杉本 のぞみ (Sugimoto, Nozomi)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：00633108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GRWD1はDNA複製だけでなく、細胞周期を統合的に制御していると考えられる新規ヒストンシャペロンである。このGRWD1の結合候補因子として、核小体因子RPL11を同定した。RPL11は、低用量アクチノマイシンD処理や低栄養状態時に核小体が崩壊すると核へ放出され、ユビキチンリガーゼMDM2の酸性ドメイン近傍に結合することでその機能を抑制し、腫瘍抑制因子p53の安定化を誘導することが知られている。解析の結果、GRWD1はRPL11とMDM2の結合を競合的に阻害し、核小体ストレス時のp53誘導に抑制的に働き、その結果、発がんに関与することを発見した。

研究成果の概要(英文)：GRWD1 is a novel histone chaperone that promotes MCM loading and may integrate regulations of cell cycle progression. We identified ribosomal protein RPL11 as a putative GRWD1 binding factor. Under nucleolar stress induced by treatment with low levels of actinomycin D or nutrient deprivation, RPL11 binds to and inhibits the MDM2 ubiquitin ligase, thereby promoting p53 stability. We found that GRWD1 inhibits RPL11-MDM2 interaction, abrogates RPL11-mediated p53 stabilization, and promotes tumorigenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：GRWD1 p53 発がん MDM2 RPL11

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 複製は生命現象の根幹であり、母細胞から娘細胞へ染色体 DNA が過不足なく受け継がれるために、一回の細胞周期に完全かつ一度だけ染色体が複製されるように厳密に制御されている。複製開始の際、複製開始因子 ORC がまず DNA に結合し、その後、CDC6 と Cdt1 と共同して、DNA ヘリカーゼ MCM2-7 複合体を DNA に呼び込む。この結果生じた DNA-タンパク質複合体を複製前複合体 (pre-replication complex: pre-RC) と呼び、この pre-RC が細胞周期に一度だけ形成されることが DNA 複製開始制御に必須のステップである。その破綻は、異常な DNA 複製を経て遺伝子変異の蓄積、そして発がんにつながる。これまでに申請者は、Cdt1 制御機構の多くを解明し、それらが複製開始制御において中心的な役割を担うことを突き止めた。

この Cdt1 の新規結合蛋白質として申請者が同定した因子が GRWD1 (glutamate-rich WD40 repeat containing 1) である。GRWD1 は酵母からヒトまで保存されている。GRWD1 の機能は、リボソーム生成に関与していることが知られている以外、解析は進んでおらず、詳細な機能は不明であった。

最近の申請者らによる検討の結果、以下のことが明らかとなった。GRWD1 はクロマチン結合性タンパク質である。GRWD1 は Cdt1 依存性、細胞周期特異的に複製開始領域に結合する。また、クロマチン免疫沈降と次世代シーケンシングを組み合わせた ChIP-seq 解析から、ゲノムワイドに GRWD1 は pre-RC と共局在することも示された。GRWD1 は複製開始領域での MCM ローディングを促進する。GRWD1 はヒストン結合能を持ち、ヒストンシャペロン活性を示す。さらに、FAIRE (formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements)-seq 解析により、GRWD1 は複製開始領域のクロマチン構造の openness を実際に制御していることが示された。以上から、GRWD1 は Cdt1 依存性に複製開始点に結合し、ヌクレオソーム構造を制御することにより効率の良い MCM ローディングを促進しているとのモデルが考えられる。これらと一致して、GRWD1 はがん細胞株で過剰発現している。

### 2. 研究の目的

GRWD1 はヒストンシャペロンであることから、pre-RC 形成だけでなく、転写制御に関与する可能性が高いと考えられる。実際に、ChIP-seq および FAIRE-seq 解析の結果、GRWD1 は複製開始領域だけでなくゲノムワイドにクロマチン構造を制御していることが示唆された。そこで、GRWD1 の機能と制御の包括的な理解を目的とし、その結合タンパク質を網羅的に同定し、特に重要性が示唆されるものについてその意義を深く解析す

ることにより、GRWD1 による増殖制御ネットワークの解明を目指した。FLAG タグ付き GRWD1 発現ベクターを HEK293 細胞に導入し、細胞抽出液を作成して抗 FLAG 抗体による免疫精製標品を得た後にマスペクトロメトリーに (MS) よって解析した。

その結果、結合が既知のものも含め、興味深い因子が複数同定された。それらの中で、当初は転写因子 Pura に焦点を絞って解析を進めていた。Pura (purine-rich element binding protein A) は、PDGF-A 遺伝子の転写活性化因子である (Zhang et al. *Gene* 348, 25, 2005)。その一方で、p53 標的プロモーターにおいて転写抑制的に働くことが知られている (Kim et al. *J. Biol. Chem.* 283, 9113, 2008)。そこで、Pura を中心に他の関連因子も解析し、GRWD1 による p53 制御の可能性を明らかにすることを目的とし、研究を開始した。

### 3. 研究の方法

まず GRWD1 と MS によって同定された GRWD1 結合タンパク質との結合様式を調べたのち、結合の意義の解明を試みた。具体的には下記の方法をとった。

- (1) GRWD1 と各因子との結合様式は、免疫沈降法や組換えタンパク質を用いたプルダウンアッセイによって調べた。また、GRWD1 の欠損変異体を作成し、各因子との結合領域を同定した。
- (2) GRWD1 の過剰発現やサイレンシングによって、細胞増殖や細胞周期進行に関わる因子のタンパク質量などに影響があるかを検討した。

上記の解析を進めたところ、GRWD1 は代表的ながん抑制因子 p53 を抑制し、細胞増殖促進的に働くことが明らかとなってきた。この分子機構を詳細に調べるため、GRWD1 結合因子として同定され、さらに p53 抑制に関与することが知られている RPL11 に着目し、以下の解析を進めた。

- (3) GRWD1 過剰発現時あるいはサイレンシング時に RPL11 タンパク質量が変化するかを調べた。
- (4) RPL11 はユビキチンリガーゼ MDM2 に結合し、その活性を抑制することで、p53 を誘導し、核小体ストレスを引き起こすがん抑制因子だと考えられている。そこで GRWD1 の有無による p53 活性および MDM2 ユビキチンリガーゼ活性への影響を調べるため、p53 活性化を誘導する薬剤の処理を行い、p53 や p53 標的因子のタンパク質量などを調べた。
- (5) GRWD1 のがん遺伝子活性を検討するため、Rb を抑制する HPV E7 および活性型 Ras と共にヒト正常線維芽細胞に発現させた。がん化能は、足場非依存性

増殖能とヌードマウスでの腫瘍形成能を獲得するか否かで検討した。

- (6) GRWD1 過剰発現と予後の関連を調べるため、がん患者登録データの解析を行った。
- (7) p53 転写活性化能への GRWD1 の影響を調べるため、p53 応答性エレメントを持ったレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。
- (8) GRWD1 が p53 応答性プロモーターに結合するかを調べるため、ChIP-qPCR 法を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) GRWD1 は p53 結合依存的に p53 応答性プロモーターにリクルートされ、p53 の転写活性化能を抑制している可能性がある

以下に示すように GRWD1 が p53 と結合し、その結果、p53 の転写活性化能を抑制している可能性を見出した。GRWD1 は p53 と in vivo で結合する。siRNA によって GRWD1 を発現抑制した後、プレオマイシン処理によって DNA に損傷を与えた。その結果、GRWD1 発現抑制細胞では、コントロールと比較して p53 標的因子の一つである p21 の発現量の上昇がタンパク質レベルおよび mRNA レベルで観察された。p21 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにより、GRWD1 が p53 による転写活性化に抑制的に作用することが示唆された。ChIP-qPCR 法により、GRWD1 が p53 応答性プロモーターに結合していること、この結合は p53 依存的であることが示唆された。今後は、GRWD1 と p53 が直接結合するかを調べると共に、GRWD1 が p53 応答性プロモーター上でどのように p53 転写活性化能を抑制しているのかを ChIP-qPCR 法などによって解析していきたい。

##### (2) GRWD1 は RPL11-MDM2 経路を介して p53 を抑制し、発がんを促進する

加えて、以下のことも明らかとなった。GRWD1 の過剰発現は p53 を不安定化する。逆に、GRWD1 のサイレンシングは、アクチノマイシン D 処理による核小体ストレスやプレオマイシン処理によって生じた二本鎖切断による p53 活性化を促進する。GRWD1 は RPL11 と直接結合する。この結合により、GRWD1 は RPL11 による MDM2 抑制を競合的に阻害し、結果として p53 誘導に対して抑制的に作用する。正常細胞への GRWD1、HPV16 E7 および活性型 Ras の導入により、造腫瘍能を獲得する。この GRWD1 の造腫瘍性は、RPL11 との結合に依存している。以上から、GRWD1 は新たながん促進因子として機能しており、その活性には RPL11 との結合が重要であることが明らかとなった。p53 が野生型のグリオーマ患者において、GRWD1 の過剰発現は予後不良

と強い相関がある。一方、変異 p53 を持つ同患者では、そのような相関は認められない。このことから、GRWD1 高発現は予後不良の診断指標となることも示唆された。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

[1] Kota Kayama, Shinya Watanabe, Takuya Takafuji, Takahiro Tsuji, Kensuke Hironaka, Masaki Matsumoto, Keiichi Nakayama, Masato Enari, Takashi Kohno, Kouya Shiraiishi, Tohru Kiyono, Kazumasa Yoshida, Nozomi Sugimoto, Masatoshi Fujita, GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. *EMBO Report*, 18, 123-137, 2017. (査読あり)  
DOI: 10.15252/embr.201642444

[2] Mitsunori Higa, Tatsunori Kushiya, Seiichiro Kurashige, Daisuke Kohmon, Kouki Enokitani, Satoko Iwahori, Nozomi Sugimoto, Kazumasa Yoshida, Masatoshi Fujita, TRF2 recruits ORC through TRFH domain dimerization. *BBA Mol. Cell Res.*, 1864, 191-201, 2017. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.004

[3] Masahiro Aizawa, Nozomi Sugimoto, Shinya Watanabe, Kazumasa Yoshida, Masatoshi Fujita, Nucleosome assembly and disassembly activity of GRWD1, a novel Cdt1-binding protein that promotes pre-replication complex formation. *BBA Mol. Cell Res.*, 1863, 2739-2748, 2016. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.008

[4] Nozomi Sugimoto, Kazumitsu Maehara, Kazumasa Yoshida, Shuhei Yasukouchi, Satoko Osano, Shinya Watanabe, Masahiro Aizawa, Takashi Yugawa, Tohru Kiyono, Hitoshi Kurumizaka, Yasuyuki Ohkawa, Masatoshi Fujita, Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. *Nucleic Acids Research*, 43, 5898-5911, 2015. (査読あり)  
DOI: 10.1093/nar/gkv509

[5] Makoto Ohira, Yuka Iwasaki, Chika Tanaka, Michitaka Kuroki, Naoki Matsuo, Tatsuhiko Kitamura, Masaki Yukuhiro, Hiroyuki Morimoto, Nisha Pang, Bei Liu, Tohru Kiyono, Masahide Amemiya, Kozo Tanaka, Kazumasa Yoshida, Nozomi

**Sugimoto**, Masatoshi Fujita, A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1850, 1676-1684, 2015. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.04.013

〔学会発表〕(計 20 件)

[1] 藤田雅俊, **杉本のぞみ**, 吉田和真, 複製開始点は厳格に決まっていな方が都合がいい. 岡崎フラグメント 50 周年シンポジウム, 2016 年 12 月 21 日. 名古屋大学 (名古屋市)

[2] **杉本のぞみ**, 吉田和真, 前原一満, 大川恭行, 藤田雅俊, ヒト細胞における pre-RC 形成と firing の時空間的制御のゲノムワイド解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[3] 渡邊心也, **杉本のぞみ**, 嘉山皓太, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 藤田雅俊, GRWD1 は核小体ストレス誘導因子 RPL23 タンパク質を制御している. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[4] 廣中研介, 渡邊心也, 吉田和真, **杉本のぞみ**, 藤田雅俊, GRWD1 による p53 転写活性化能の抑制機構の解明. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[5] 吉田和真, 比嘉允宣, **杉本のぞみ**, 藤田雅俊, TRF2 は二量体 TRFH ドメインを介して ORC をリクルートする. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[6] 行弘政樹, 岩崎優香, 田中智佳, 大平誠, 吉田和真, **杉本のぞみ**, 森本浩之, 大嶋孝志, 小迫英尊, 藤田雅俊, 分裂期停止作用を持つ新規抗がん化合物 NP-10 の作用機序解明. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[7] 森澄子, 森井一成, 吉田和真, **杉本のぞみ**, 鐘巻 将人, 藤田 雅俊, MCM8/9 ヘリカーゼ阻害によるシスプラチン増感療法開発のための基礎検討. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[8] Masatoshi Fujita, **Nozomi Sugimoto**, Kota Kayama, Shinya Watanabe, Masahiro Aizawa, Kazumasa Yoshida, GRWD1 counteracts p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis, The 10th International 3R (DNA Replication,

Recombination, and Repair) Symposium, 2016 年 11 月 17 日. ホテル一畑 (松江市)

[9] Mitsunori Higa, Kazumasa Yoshida, Daisuke Koumon, **Nozomi Sugimoto**, Masatoshi Fujita, TRF2 recruits ORC through the dimerized TRFH domain. The 10th International 3R (DNA Replication, Recombination, and Repair) symposium, 2016 年 11 月 14 日. ホテル一畑 (松江市)

[10] Masatoshi Fujita, **Nozomi Sugimoto**, Kazumasa Yoshida, Keiichi Nakayama, Tohru Kiyono, GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[11] 森井一成, **杉本のぞみ**, 吉田和真, 鐘巻将人, 藤田雅俊, Basic study for establishment of cisplatin-sensitization therapy by inhibition of MCM8/9. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[12] **杉本のぞみ**, 會澤誠大, 吉田和真, 前原一満, 大川恭行, 藤田雅俊, Genome-wide analysis for spatiotemporal regulation of the pre-RC formation and firing in human cells. BMB2015, 2015 年 12 月 3 日. 神戸ポートアイランド (神戸市)

[13] 比嘉允宣, 向門大介, 倉重誠一郎, 榎谷光熙, **杉本のぞみ**, 吉田和真, 藤田雅俊, TRF2 は二量体化した TRFH ドメインを介して ORC をリクルートする. BMB2015, 2015.12.03. 神戸ポートアイランド (神戸市)

[14] 倉重誠一郎, 吉田和真, **杉本のぞみ**, 藤田雅俊, 複製ストレス時における ATR 及び関連因子のクロマチン結合動態の解析. BMB2015, 2015.12.01. 神戸ポートアイランド (神戸市)

[15] **杉本のぞみ**, 吉田和真, 前原一満, 大川恭行, 藤田雅俊, ヒト細胞における複製前複合体(pre-RC)形成と firing の時空間的制御のゲノムワイド解析. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2015 年 10 月 20 日. 焼津グランドホテル (焼津市)

[16] 會澤誠大, **杉本のぞみ**, 渡邊心也, 吉田和真, 胡桃坂仁志, 藤田雅俊, 新規 Cdt1 結合蛋白質 GRWD1 のヌクレオソーム形成活性及び崩壊活性の解析. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2015 年 10 月 19 日. 焼津グランドホテル (焼津市)

[17] Kota Kayama, **Nozomi Sugimoto**,

Kazumasa Yoshida, Keiichi Nakayama, Tohru Kiyono, Masatoshi Fujita, GRWD1 negatively regulates p53 via the RP (ribosomal protein)-MDM2 pathway and promotes anchorage-independent growth. 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.08. パシフィコ横浜 (横浜市)

[18] **Nozomi Sugimoto**, Masahiro Aizawa, Kazumasa Yoshida, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Masatoshi Fujita, Genome-scale analysis for spatiotemporal regulation of the pre-RC formation and firing in human cells. International Symposium on Non-Coding DNA and Chromosomal Integrity, 2015年8月7日. 淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)

[19] **Nozomi Sugimoto**, Kazumasa Yoshida, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Fujita, M., Genome-wide analysis for spatiotemporal regulation of the pre-RC formation and firing in human cells. Eukaryotic DNA replication & Genome maintenance on Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2015年9月1日. コールドスプリングハーバー研究所 (米国・ニューヨーク州)

[20] Mitsunori Higa, Kazumasa Yoshida, Daisuke Koumon, **Nozomi Sugimoto**, Fujita, M., TRF2 recruits ORC through the dimerized TRFH domain. Eukaryotic DNA replication & Genome maintenance on Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2015年9月2日. コールドスプリングハーバー研究所 (米国・ニューヨーク州・ロングアイランド)

〔その他〕

ホームページ:

<http://tansaku.phar.kyushu-u.ac.jp/saito/top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉本のぞみ (SUGIMOTO NOZOMI)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号: 00633108