

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24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370084

研究課題名（和文） 染色体複製開始及び分配制御に関与する新規ヒストン結合蛋白質
GRWD1の解析研究課題名（英文） Analysis of GRWD1, a novel histone-binding protein involved in
chromosomal replication initiation and segregation

研究代表者

藤田 雅俊（FUJITA MASATOSHI）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：30270713

研究成果の概要（和文）：

DNA複製反応の正確な制御は、遺伝情報の完全性を保つために必須である。Cdt1はORC及びCDC6と協調して、複製ヘリカーゼMCM複合体を複製開始点に結合させる。GRWD1は新規Cdt1結合蛋白として同定された。本研究で以下のことが明らかとなった。（1）GRWD1はCDC6及びCdt1と結合し、複製開始点に集積する。（2）GRWD1は新規ヒストン結合蛋白であり、ヒストンシャペロン活性を持つ。また、GRWD1は実際にクロマチン構造のopenness（一般にオープン構造は、種々の反応を促進すると考えられている）を制御している。（3）GRWD1をsiRNAで抑制するとMCM結合が抑制される。よって、GRWD1は複製制御において重要な役割を担っているであろう。

研究成果の概要（英文）：

Precise regulation of DNA replication reaction is essential for integrity of genome information. Cdt1, together with ORC and CDC6, loads MCM replication helicase complex onto DNA replication origin. GRWD1 has been identified as a novel Cdt1-binding protein. In this research project, we have obtained following findings. (1) GRWD1 binds to Cdc6 and Cdt1, thereby accumulates onto replication origins. (2) GRWD1 is a novel histone-binding protein and has a histone chaperon activity. Furthermore, GRWD1 is actually involved in regulation of chromatin openness (in general, it is believed that open chromatin structure promotes various transactions on chromatin). (3) GRWD1 silencing by siRNA inhibits MCM loading. Therefore, GRWD1 may play a crucial role in regulation of replication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野：分子生物学、分子腫瘍学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：GRWD1・Cdt1・複製開始複合体・細胞周期・ヒストンシャペロン・MCM・クロマチン

1. 研究開始当初の背景
細胞周期に完全かつ一度だけDNAを複製する

ための分子機構（ライセンス制御）の概要が明らかとなって来た。(Diffley, Curr.

Biol. 14: 778, 2004; Fujita, Cell Div. 1:22, 2006)。哺乳動物細胞におけるモデルは、以下のものである (図1)。

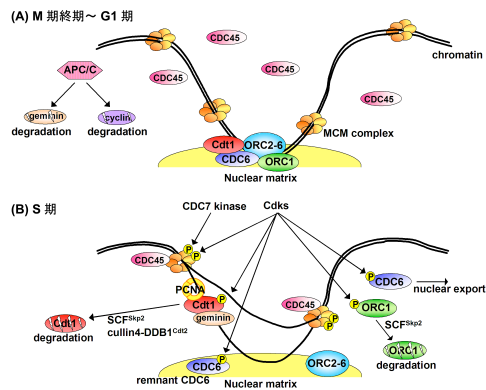


図1. ヒト細胞におけるライセンス制御のモデル

M 期終期～G1 期に、複製開始領域に ORC1-6 六量複合体が結合し、これに CDC6 と Cdt1 が結合し、これらが複製ヘリカーゼ MCM2-7 六量複合体をクロマチンにロードし、複製開始複合体 (pre-RC; pre-replication complex) が形成される。S 期になると、Cdk 依存的に MCM は活性化される。一方、S 期以降は ORC、CDC6、Cdt1 の機能は抑制され、これによって MCM 再結合、再複製が抑制される。例えば、CDC6 は Cdk リン酸化に依存して細胞質に排出される。従来、Cdt1 機能抑制は geminin タンパク質との結合が主なものだと考えられていた。しかし研究代表者らは、Cdt1 が3つのユビキチンライゲースにより巧妙かつ厳密に細胞周期制御されていることを明らかにして来た。これら厳密な制御から予想される通り、Cdt1 の脱制御は再複製を強く促進する。

そのように複製開始の細胞周期制御において中心的な役割を持っている Cdt1 の新規結合タンパク質として研究代表者らが同定したのが GRWD1 である (Sugimoto et al., Mol. Biol. Cell 19:1007, 2008: 図2)。

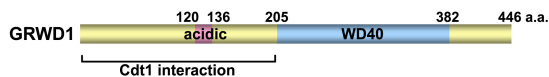


図2. GRWD1 タンパク質の構造

GRWD1 は酵母からヒトまで保存されており、N 末に glutamate-rich なドメイン、C 末にタンパク質・タンパク質相互作用に関わる WD repeat を持つ。その WD ドメインは CAF (chromatin assembly factor1) のヒストン結合サブユニット p48 の WD ドメインとホモロジーがある。GRWD1 の出芽酵母ホモログである RRB1 は、60S リボソームサブユニットの assembly に必要である。また興味深いことに、RRB1 は ORC6 と遺伝的相互作用があることが報告されている。さらに、RRB1 はリボソ-

ム合成に関わる Yph1 との物理的相互作用があることが報告された。この Yph1 は ORC や MCM と相互作用し、DNA 複製に関わる可能性が示唆されている。このように GRWD1/RRB1 や Yph1 などのリボソーム合成に関わるタンパク質が、DNA 複製にも関与している可能性がある。しかし、その後解析は進んでいない。高等真核生物においてリボソーム合成系の因子が複製開始などの細胞周期制御に関与しているのかは全く不明である。特に GRWD1 の機能解明はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

GRWD1 による複製開始制御、M 期制御を明らかにし、本因子がタンパク質合成・複製・細胞分裂を通して細胞増殖を統合的に制御している可能性を検討する。以下にまず、研究開始時までの予備的結果の概要を示す。

抗ヒト GRWD1 抗体を作成し、Cdt1 との結合を確認した。免疫染色によって細胞内局在を調べたところ、M 期 prophase～metaphase までは染色体から解離しており、anaphase～telophase で染色体に再結合し、その後は interphase を通じて核内に局在していた。また、生化学的解析により、interphase を通じてその一部がクロマチンに結合することが示された。一方、RNAi による GRWD1 発現抑制細胞を G0 期に同調しリリースしたところ、pre-RC 形成が一部抑制されるという知見を得つつあった。また、細胞周期非同調時に GRWD1 を発現抑制すると、M 期の進行遅延と異常な有糸分裂像が誘導された。興味深いことに、GRWD1 がヒストンと直接結合することもわかった。一方、GRWD1 が癌細胞株において過剰発現していることを見出した。そこで細胞に GRWD1 を強発現させたところ、M 期の進行異常が引き起こされた。このがん化との関わりを示唆するデータも GRWD1 研究の重要性を支持する。

以上の結果を踏まえ、本研究では以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) GRWD1 の pre-RC 形成促進能の解明: GRWD1 はヒストンや Cdt1 と結合することにより複製開始領域に集積し、MCM loading の促進に機能しているという作業仮説を検討する。そのために、我々が従来用いてきたヒト培養細胞系のみならず、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた in vitro 複製系も用いる。本申請では、卵抽出液実験系の専門家である和賀博士に分担研究者・共同研究者として参画していただいた。また、GRWD1 がヒストンシャペロン活性を持つ可能性の検討も行う。

(2) GRWD1 による M 期制御機構の解明：
ここでも、ヒト培養細胞系と卵抽出液を用いた系を併用する。M 期機能の証明にも卵抽出液系が有用である。ヒト細胞では M 期異常が S 期異常の結果である可能性を否定するのが難しいが、卵抽出液系では M 期抽出液を直接得ることができ、そこから XGRWD1 (Xenopus GRWD1) を immunodepletion し、そこに精子核を加えることで M 期を誘導し、染色体分配に異常が生じるのかを検証するといった実験が可能だからである。GRWD1 が分裂期制御に関わるとしても、その分子機構はまったく不明である。そこで、GRWD1 と結合する M 期因子の探索も行う。

3. 研究の方法

(1) GRWD1 の pre-RC 形成促進能の解明：
GRWD1 はヒストンや Cdt1 と結合することにより複製開始領域に集積し、MCM loading を促進している可能性を検討する。

ヒト細胞系

- ① GRWD1 が複製開始点に集積しているのかを、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) で調べる。また Cdt1 を siRNA で抑制する事により、それが抑制されるのかどうかを調べる。
- ② RNAi を用いて GRWD1 を発現抑制させた細胞を G0 期に同調した後リリースし、pre-RC 形成への影響を調べる。
- ③ GRWD1 はヒストン結合能を持つ。GRWD1 がヒストンシャペロンとして機能することにより pre-RC 形成促進を行っている可能性を検討する。

アフリカツメガエル卵抽出液系

- ① XGRWD1 の cDNA クローニングを行い、XGRWD1 に対する特異的抗体を作製。
- ② XGRWD1 と XCdt1 の結合を調べる。
- ③ XGRWD1 が細胞周期依存的にクロマチンに結合するのか、また XGRWD1 の特異抗体による免疫除去により pre-RC 形成が低下するのかを、検証する。

(2) GRWD1 による M 期制御機構の解明：
ここでも、ヒト培養細胞系と卵抽出液を用いた系を併用する。

ヒト細胞系

- ① 非同調細胞で GRWD1 を発現抑制すると、M 期進行遅延と異常な有糸分裂像が誘導される。そこで、異常がどの phase で起こっているのか、分裂装置のどの部分に異常があるのかを明確にする。
- ② GRWD1 が centrosome や mitotic spindle あるいは centromere などの特定の部位に集積しているのかを、免疫染色を行い検討する。

③ GRWD1 は何らかの M 期関連蛋白質と結合し、M 期制御に関わっている可能性がある。GRWD1 新規結合因子の探索を行いたい。

アフリカツメガエル卵抽出液系

① ツメガエル成熟卵から M 期抽出液を得て、そこから XGRWD1 を免疫除去し、そこに精子核を加えることで M 期を誘導し、染色体分配等に異常が生じるのかを検証したい。

4. 研究成果

(1) GRWD1 の pre-RC 形成促進能の解明：
ヒト細胞系において、以下のことが明らかとなった。

- ① GRWD1 は CDC6/Cdt1 と物理的に相互作用することが、免疫共沈降実験、試験管内 pull down assay 等から明らかになった。
- ② ChIP 法により、MCM4 遺伝子領域複製開始点及び LaminB2 遺伝子領域複製開始点において、GRWD1 が細胞周期特異的に結合すること、その結合は G1 期に最大になり G2/M 期には減少すること、及び GRWD1 の複製開始点結合は CDC6 および Cdt1 に依存することが明らかとなった。
- ③ siRNA により GRWD1 発現を抑制すると、複製開始点における MCM 結合が阻害されることがわかった。
- ④ GRWD1 は新規ヒストン結合蛋白質であることがわかった。現在までの結果からは、H2A/H2B dimer 及び H3/H4 dimer の両方と結合し得ることが示されている。
- ⑤ 試験管内での mononucleosome 形成アッセイおよび polynucleosome 形成アッセイから、GRWD1 はヒストンシャペロン活性を持つことが示された。
- ⑥ histone eviction によるクロマチンの openness を調べる方法として、FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) 解析を行った。可溶化したクロマチン DNA を qPCR により定量することにより、openness の程度を調べたところ、siRNA による GRWD1 発現抑制により、MCM4 遺伝子複製開始点及び LaminB2 遺伝子複製開始点のクロマチン構造の openness が減少することが示唆された。

以上結果から、現時点で考えられる GRWD1 による MCM loading (licensing) 促進のモデルを図 3 に示す。転写制御で一般的に考えられているモデルは、ヒストンアセチル化酵素、ATP 依存性クロマチンリモデラー、そしてヒストンシャペロンが協調して働くことで、クロマチン構造を制御し (弛緩させ、開く)、転写を促進すると言うものである。Licensing 反応においても、同様のメカニズムが働いていると考えている。つまり、Cdt1

結合性ヒストンアセチル化酵素と報告されている HBO1、我々が同定、報告した Cdt1 結合性クロマチンリモデラー SNF2H、そして本研究で明らかとなった CDC6/Cdt1 結合性新規ヒストンシャペロン GRWD1 が協調してクロマチン構造を制御し、Licensing 反応を促進しているというモデルが考えられる。これらの研究は、転写制御に較べて遅れていた、複製開始におけるクロマチン制御の分子機構を世界に先駆けて明らかにしたものである。今後も、その詳細なメカニズムを解析して行きたいと考えている。

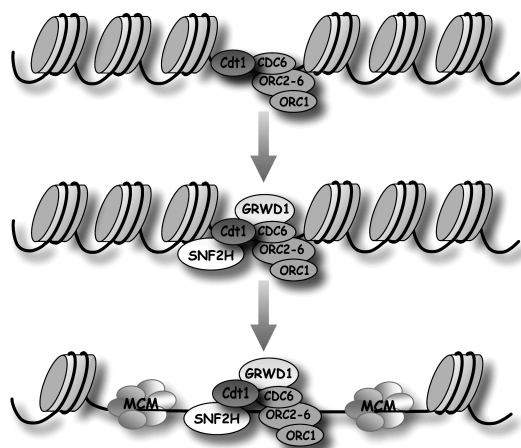


図3. Cdt1を介したGRWD1によるMCM loading促進のモデル図

上述したような GRWD1 の機能が、カエル卵抽出液系でも働いているのかどうかを解明することを目的に、研究を進めている。現時点で、以下のことが明らかとなっている。

- ① XGRWD1 cDNA をクローニングし、組換え GST-XGRWD1 を作成、それを用いて特異的抗 XGRWD1 ウサギ抗体を得た。
- ② 免疫沈降法により XCdt1 及び XCDC6 と XGRWD1 の結合が確認された。
- ③ XGRWD1 もヒストン結合能を持つことがわかった。
- ④ 特異的抗体により、効率よく XGRWD1 を卵抽出液より免疫除去できることがわかったので、その XMCM loading や DNA 複製への影響を現在解析している。また、細胞周期における XGRWD1 のクロマチン結合パターンの検討も行いつつある。

(2) GRWD1 による M 期制御機構の解明：
ヒト細胞系において GRWD1 を発現抑制すると、M 期進行遅延と異常な有糸分裂像が誘導されることがわかっていた。そこで、centrosome や mitotic spindle あるいは centromere などへの GRWD1 局在を免疫染色で調べたが、特徴的な局在は観察されなかった。

カエル卵抽出液系の解析も、現時点では行っておらず、上記のように XGRWD1 の免疫除去

が可能となったので、今後検討したい。

一方、GRWD1 の分裂期制御の分子機構を解明するための手がかりが、プロテオミクスアプローチによる新規 GRWD1 結合蛋白質の網羅的同定から得られつつある。すなわち、ch-TOG や ZBT24 などの M 期制御因子と GRWD1 との結合が示唆されつつあり、これらの生物学的意義を解明して行くことで、GRWD1 による M 期制御機構が明らかになることが期待される。

(3) GRWD1 の新規機能解明への手掛かり：
上述した FAIRE 解析を、特定の部位における qPCR 定量ではなく、次世代シーケンサーを用いた FAIRE-Seq により行った。その結果、いくつかの転写開始領域を含む多くの領域で、GRWD1 がクロマチン構造の openness に影響を与えていることを示唆する結果を得つつある。現在、GRWD1 抗体等を用いた、ChIP-Seq 解析を行っている。この FAIRE-Seq の結句は、GRWD1 が複製のみならず、種々のクロマチン制御に関与している可能性を示唆している。実際に、プロテオミクスアプローチにより GRWD1 の新規結合因子を網羅的に同定したところ、いくつかの転写因子を含む種々の興味深い因子との相互作用が認められた。以下に、いくつかの同定因子と今後の研究の作業仮説を記す。

- ① ミスマッチ修復因子 Msh2、Msh6 およびミスマッチ修復にも関与している PCNA との相互作用：ヒストンシャペロンとして、ミスマッチ修復におけるクロマチン制御を行っている可能性が考えられる。
- ② Pura α 、WDR5 等の転写制御関連因子：これらと共役して、ヒストンシャペロンとして、転写制御を行っている可能性が考えられる。
- ③ EDD、UBR4 などのいくつかのユビキチンリガーゼ：GRWD1 は Cu14-DDB1 の基質認識サブユニットとして働いている可能性が以前に報告されている。これに加えて、いくつかのユビキチンリガーゼの制御に関与している可能性が考えられる。

これらを解析して行くことにより、GRWD1 によるグローバルなクロマチン制御そして細胞増殖制御が明らかになって行くことが期待される。

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 6 件)

- ① Sugimoto, N., Yugawa, T., Iizuka, M.,

Kiyono, T. & Fujita, M. Chromatin remodeler Sucrose Non-Fermenting 2 Homolog (SNF2H) is recruited onto DNA replication origins through interaction with Cdc10 protein-dependent transcript 1 (Cdt1) and promotes pre-replication complex formation. *J. Biol. Chem.* 286, 39200-39210, 2011.

② Yoshida, K., Sugimoto, N., Iwahori, S., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Kiyono, T. & Fujita, M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *J. Cell Sci.* 123, 225-235, 2010.

③ Sugimoto, N., Yoshida, K., Tatsumi, Y., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Waga, S., Kiyono, T. & Fujita, M. Redundant and differential regulation of multiple licensing factors ensures prevention of rereplication in normal human cells. *J. Cell Sci.* 122, 1184-1191, 2009.

[学会発表] (計8件)

① Sugimoto, N., Yasukouchi, S., Watanabe, S., Kiyono, T., Kurumizaka, H. & Fujita, M. The Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone chaperone involved in replication licensing. 第34回日本分子生物学会年会ワークショップ. 2011年12月16日. パシフィコ横浜. (招待講演)

② 藤田雅俊. 複製開始複合体形成に関与しているCdt1結合性ヒストン制御蛋白質. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「ゲノム機能の記憶の成立機序とその制御」. 2010年11月19日. 大阪大学蛋白質研究所. (招待講演)

③ Sugimoto, N., Waga, S., Kiyono, T. & Fujita, M. A chromatin remodeler SNF2H is involved in pre-RC formation and Cdt1-induced checkpoint activation. Keystone Symposia "Telomere Biology and DNA Repair", Ashmore, Queensland, Australia. 2009.

④ Yoshida, K., Iwahori, S., Kiyono, T. & Fujita, M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. Keystone Symposia "Telomere Biology and DNA Repair", Ashmore, Queensland, Australia. 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: G2/M期停止及び細胞死を誘導するベンゾヒドラジド誘導体.

発明者: 藤田雅俊、大嶋孝志、森本浩之

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-234309

出願年月日: 2011年10月25日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ:

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

九州大学薬学研究院公開講座:

遺伝情報を過不足無く受け継ぐためのしくみ -分子生物学的解明と医薬研究への応用-

平成22年9月26日、九州大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 雅俊 (FUJITA MASATOSHI)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号: 30270713

(2) 研究分担者

和賀 祥 (WAGA SHOU)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号: 60222402