

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291027

研究課題名(和文) 多機能増殖制御因子 / 新規ヒストンシャペロンGRWD1の新規機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel functions of GRWD1, a multifunctional protein with histone chaperone activity

研究代表者

藤田 雅俊 (Fujita, Masatoshi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30270713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：GRWD1は、RPL11-MDM2経路およびRPL23-MDM2経路を介してp53を抑制し、発がんを促進する新規がん遺伝子であることが明らかとなった。また、がん患者臨床サンプルを用いた解析から、ある種のがんにおいてはGRWD1の発現量が多い場合は予後不良となることが示唆された。今後、GRWD1発現量の検査が、有用な診断法となる可能性がある。また、GRWD1とRPL11(あるいはRPL23)の結合を阻害できる化合物を創出できたなら、有力な新規抗がん剤となる可能性も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Here, we show that GRWD1 is a novel oncogene that negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 and RPL23-MDM2 pathways. Furthermore, analyses of several cancer databases reveal that high expression of GRWD1 is associated with poor prognosis of patients suffering from certain cancers. It will become a useful diagnostic method for certain cancers to test the expression levels of GRWD1 in clinical samples. If novel compounds that can interfere with the interaction between GRWD1 and RPL11 (or RPL23) will be identified, they will be powerful novel anti-neoplastic agents.

研究分野：分子生物学

キーワード：新規がん遺伝子 新規がん診断法 GRWD1 p53 RPL11 MDM2

1. 研究開始当初の背景

Cdt1は染色体DNA複製の開始反応に必須のタンパク質であり、複製ヘリカーゼ MCM複合体の染色体への装着反応を行っている (Fujita *Cell Div* 1, 22, 2006)。我々は新規 Cdt1 結合タンパク質として GRWD1 を発見した (Sugimoto *et al. Mol Biol Cell* 19, 1007, 2008)。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 Chromatin Assembly Factor1 のヒストン結合サブユニット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 (Iouk *et al. Mol Cell Biol* 4, 1260, 2001; Schaper *et al. Curr Biol* 11, 1885, 2001)。また、ヒト細胞でもリボソーム生合成に関与していると考えられている。しかし、他の機能を含め詳細の多くは不明なままであった。

その後の研究で、我々は以下のことを明らかにしていた。①GRWD1 は Cdt1 依存的に複製開始領域に結合する。②GRWD1 は MCM のローディングを促進する。③GRWD1 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。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緩めることにより MCM ローディングを促進しているというモデルが考えられる。この点をさらに解析するために、FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Element) 法によるオープン構造クロマチン領域の単離と次世代シーケンス法 (以下 Seq) を組み合わせ、GRWD1 及び CDC6 ChIP (クロマチン免疫沈降法)・Seq で同定された pre-RC 領域でのクロマチン構造への siRNA による GRWD1 抑制の影響を調べた所、④GRWD1 が pre-RC 周辺のクロマチン構造に大きな影響を与えていることを示唆する結果を得た。併せて、GRWD1 は pre-RC 領域以外のゲノム領域にも広く結合しており、それらの領域のクロマチン構造制御を行っていることも示唆された。よって、GRWD1 が転写制御にも関与している可能性が考えられる (これらの成果の発展を含め、本研究期間中に以下の論文として発表した。Sugimoto *et al. Nucleic Acids Res* 43, 5898, 2015)。

加えて、GRWD1 は Cul4-DDB1 ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットである可能性も示唆されていた (標的等詳細は不明) (Higa *et al. Nat Cell Biol* 8, 1277, 2006; He *et al. Genes Dev* 20, 2949, 2006)。このように、GRWD1 はタンパク質合成や細胞周期進行などの細胞増殖を統合的に制御している重要な因子である可能性が浮かび上がってきた。興味深いことに、調べた幾つかのがん細胞株で GRWD1 は過剰発現しており (Sugimoto *et al. Nucleic Acids Res* 43,

5898, 2015)、癌の発生や増殖にも関与している可能性も考えられた。

2. 研究の目的

以上のように、その重要性が浮かび上がって来た GRWD1 であるが、その制御の詳細や新規機能の可能性については、まだほとんど不明なままであった。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た。FLAG-GRWD1 発現ベクターを 293T 細胞に導入後細胞抽出液を作製して、抗 FLAG 抗体による免疫精製標品をマスマスペクトロメトリーによって解析した。その結果、既知のものも含め興味深い因子が複数同定された。このことから、GRWD1 が多機能因子であることが支持される (図 1)。

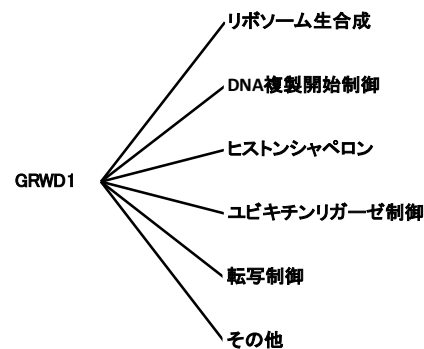


図1.ヒトGRWD1の機能予想

それらの中で当初は本研究では、新規 GRWD1 結合因子である転写因子 Pura とユビキチンリガーゼ EDD 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 標的プロモーターの転写抑制制御 (Kim *et al., J Biol Chem* 283, 9113, 2008) への関与などが報告されている。一方、EDD (E3 identified by differential display) のショウジョウバエオルソログ Hyd の変異は、imaginal disc の過形成を引き起こす (Mansfield *et al. Dev Biol* 165, 507, 1994)。その一方で、種々のがん細胞では EDD の過剰発現が見られる (Clancy *et al. Oncogene* 22, 5070, 2003)。このように EDD および Pura については興味深い知見が得られているものの、その機能や制御には不明な点が多い。そこで、これらの因子を中心に、他の関連因子も解析し、GRWD1 を中心とする新規細胞増殖制御ネットワークの全貌を明らかにすることを目標に研究を開始した。

その後の解析で、GRWD1 は代表的な癌抑制因子 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来た。また、GRWD1

が過剰発現した場合は、がん遺伝子として働くことも示された。この GRWD1 機能には、新規結合因子として同定されていた RPL11 および RPL23 との結合が重要であることがわかった。また、GRWD1 は EDD ユビキチンリガーゼと共に、RPL23 を分解制御することも判明した。以上から、本研究では、がん遺伝子としての GRWD1 の機能ネットワークの解明も研究目的として、研究を進めていった。

3. 研究の方法

(1) GRWD1 と各因子の結合様式の解析を、免疫沈降法や組換えタンパク質を用いた結合アッセイを用いて行った。

(2) GRWD1 の過剰発現や siRNA による抑制の、細胞増殖や p53 活性に与える影響を調べた。

(3) GRWD1 のがん遺伝子活性を、HPV E7 (RB を抑制)、活性型 RAS と共にヒト正常線維芽細胞に発現させることで調べた。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獲得で調べた。

(4) がん患者登録データの解析から、GRWD1 過剰発現と予後の関連を調べた。

(5) EDD-GRWD1 がユビキチンリガーゼとして RPL23 の量的制御を行っている可能性を、細胞内ユビキチン化アッセイで検討した。

(6) 常法通り、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、p53 転写活性化能への GRWD1 の影響を調べた。

(7) GRWD1 の p53 応答性プロモーターへの結合を ChIP 法で調べた。

4. 研究成果

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

本研究費の支援を受けた研究から、以下のことが明らかとなった。①GRWD1 の siRNA による抑制は、アクチノマイシン D による核小体ストレスやブレオマイシンによる DSB による p53 活性化を促進する。逆に、GRWD1 の過剰発現は p53 を不安定化し抑制する。② GRWD1 はがん抑制因子 RPL11 と直接結合することで RPL11 による MDM2 抑制を阻害し、結果として p53 誘導に対して抑制的に働く。③ GRWD1 を HPV16 E7 (RB を不活化)、活性化 Ras G12V と共にヒト正常細胞に発現させると、細胞を transform する。この際、Ras と E7 による p53 誘導を、GRWD1 は抑制する。④ この GRWD1 の transform 活性は、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) 遺伝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 (図 2)。更に、④ GRWD1 の transforming 活性と一致して、GRWD1 の過剰発現は p53 が野生型のグリオーマ患者において予後不良と強く関連していた。変異 p53 をもつ同患者では、そのような相関は認められなかった (図 3)。以上の結果を論文として報告した (Kayama *et al. EMBO Rep* 18, 123, 2017)。

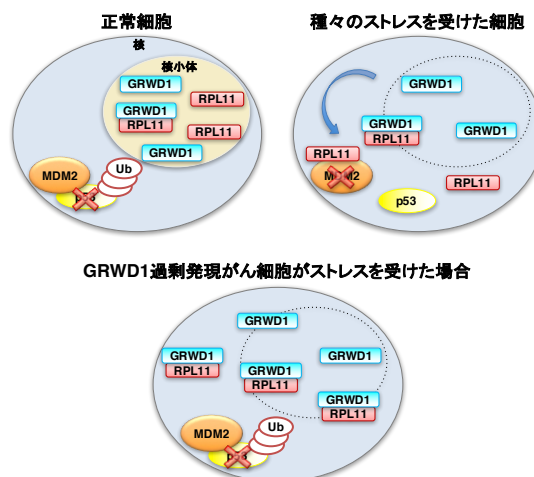


図2. GRWD1過剰発現によるp53誘導抑制のモデル図

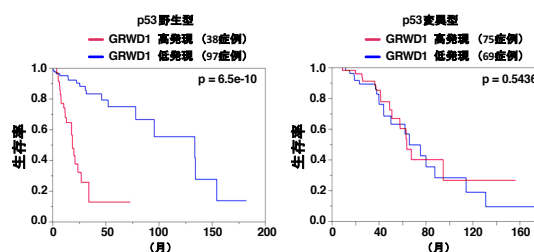


図3. p53が正常な脳グリオーマ患者では、GRWD1高発現は予後不良の診断指標となる

(2) GRWD1 はユビキチンリガーゼ EDD と共に RPL23 を分解制御しており、この経路も GRWD1 の p53 抑制活性に寄与している

本研究によって以下のことも明らかとなった。①GRWD1 の過剰発現は、がん抑制因子 RPL23 のプロテアソームを介した分解を促進する。②siRNA による GRWD1 発現抑制は、低容量アクチノマイシン D 処理による核小体ストレス誘導時に、RPL23 量を増加させる。③EDD の過剰発現でも RPL23 タンパク質量が減少し、GRWD1 および EDD の共発現で相乗的な RPL23 量の減少が見られる。④RPL23 は細胞内でユビキチン化を受けており、またその RPL23 ユビキチン化が GRWD1 および EDD の過剰発現で増加する。更に、⑤以前の報告と一致して、細胞における RPL23 過剰発現は MDM2 ユビキチンリガーゼ活性を抑制し、腫瘍原性を低下させる。この RPL23 の活性を、GRWD1 過剰発現は部分的に打ち消すことができる。以上から、GRWD1 はユビキチンリガーゼ EDD と共に

RPL23 を分解制御しており、この経路も GRWD1 の p53 抑制活性に寄与していることが明らかとなった。

(3) GRWD1 は p53 と相互作用し p53 応答性プロモーターにリクルートされることで、p53 の転写活性化能を抑制している可能性がある

加えて以下のことも明らかとなりつつある。①GRWD1 は p53 と物理的に相互作用している。直接的か間接的かは未だ明らかでない。②いくつかの細胞株で GRWD1 を siRNA で抑制すると、DNA ダメージ時に p53 レベルの上昇なく p21 発現誘導が促進される。③ p21 プロモーターを含む p53 反応性プロモーターにおいて、GRWD1 の過剰発現は p53 発現による転写活性化を抑制する。更に、④ GRWD1 は p53 応答性プロモーターに p53 依存的に結合することが、ChIP 法により示唆されつつある。以上から、GRWD1 は p53 と相互作用し p53 応答性プロモーターにリクルートされることで、p53 の転写活性化能を抑制し、この経路も GRWD1 のがん遺伝子活性に関与している可能性が考えられる。これについては、今後更に検討を続けて行きたい。

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 Kayama, K., Watanabe, S., Takafuji, T., Tsuji, T., Hironaka, K., Matsumoto, M., Nakayama, K., Enari, M., Kohno, T., Shiraishi, K., Kiyono, T., Yoshida, K., Sugimoto, N., and *Fujita, M. (2017) GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. *EMBO Rep.* 18, 123-137. 査読あり doi: 10.15252/embr.201642444

② Higa, M., Kushiyama, T., Kurashige, S., Kohmon D., Enokitani, K., Iwahori, S., Sugimoto, N., *Yoshida, K., and *Fujita, M. (2017) TRF2 recruits ORC through TRFH domain dimerization. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 191-201. 査読あり doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.004

③ Aizawa, M., Sugimoto, N., Watanabe, S., Yoshida, K., and *Fujita, M. (2016) Nucleosome assembly and disassembly activity of GRWD1, a novel Cdt1-binding protein that promotes pre-replication complex formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2739-2748. 査読あり doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.008

④ Sugimoto, N., Maehara, K., Yoshida, K.,

Yasukouchi, S., Osano, S., Watanabe, S., Aizawa, M., Yugawa, T., Kiyono, T., Kurumizaka, H., Ohkawa, Y., and *Fujita, M. (2015) Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding proteins that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. *Nucleic Acids Res.* 43, 5898-5911. 査読あり doi: 10.1093/nar/gkv509

⑤ Ohira, M., Iwasaki, Y., Tanaka, C., Kuroki, M., Matsuo, N., Kitamura, T., Yukuhiro, M., Morimoto, H., Pang, N., Liu, B., Kiyono, T., Amemiya, M., Tanaka, K., Yoshida, K., Sugimoto, N., Ohshima, T., and *Fujita, M. (2015) A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1676-1684. 査読あり doi: 10.1016/j.bbagen.2015.04.013

⑥ Iwahori, S., Kohmon, D., Kobayashi, J., Tani, Y., Yugawa, T., Komatsu, K., Kiyono, T., Sugimoto, N., and *Fujita, M. (2014) ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S phase to prevent re-replication. *Cell Cycle* 13, 471-481. (Selected for "News & Views") 査読あり doi: 10.4161/cc.27274

[学会発表] (計 5 件)

① 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因因子 RPL23 タンパク質量を制御している. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.11.30. パシフィコ横浜 (横浜)

② 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 転写活性化能の制御機構の解明. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.11.30. パシフィコ横浜 (横浜)

③ Masatoshi Fujita, Nozomi Sugimoto, Kota Kayama, Shinya Watanabe, Masahiro Aizawa, Kazumasa Yoshida. GRWD1 counteracts p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. 10th 3R International Symposium, 2016.11.17. 松江市ホテル一畑 (松江)

④ 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.

名古屋国際会議場（名古屋）

⑤ 嘉山皓太, 渡邊心也, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 杉本のぞみ, 藤田雅俊. GRWD1による核小体ストレス応答 RP-MDM2-p53経路の制御. 第37回日本分子生物学会年会ワークショップ, 2014.11.27. パシフィコ横浜（横浜）

〔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

藤田 雅俊 (FUJITA MASATOSHI)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号: 30270713