

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870509

研究課題名(和文)新規ヒストンシャペロンGRWD1によるPuraを介した転写制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of transcription regulation mechanism by Pura and novel histone chaperone GRWD1

研究代表者

杉本 のぞみ (Sugimoto, Nozomi)

九州大学・薬学研究科(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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GRWD1はDNA複製開始だけでなく、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、転写因子Puraを同定した。PuraとGRWD1との関連を明らかにすることが本研究の目的である。解析の結果、PuraとGRWD1は腫瘍抑制因子p53と複合体を形成し、協調してp53の転写活性化能を負に制御していることが示唆された。GRWD1ががんで過剰発現していることから、GRWD1およびPuraを介したp53制御機構の解明により、新たな染色体不安定性の誘導や発がんの分子機構の理解につながると考えられる。

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 transcription factor Pura as a putative GRWD1 binding factor. The aim of this study was to investigate the biological relevance between Pura and GRWD1. We found that GRWD1 and Pura form a complex with p53 in vivo and negatively regulate p53 transcriptional activity. GRWD1 is overexpressed in several cancer cells. Therefore, elucidation of the p53 regulation mechanism(s) by GRWD1 and Pura may help to understand novel molecular mechanisms for induction of chromosomal instability and carcinogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：GRWD1 Pura p53 次世代シーケンサー

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、別の複製因子である CDC6 および 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) といい、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。これまでに我々は、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てきた。

この Cdt1 の新規結合タンパク質として我々が同定した因子が GRWD1 (glutamate-rich WD40 repeat containing 1) である (Sugimoto et al., *Mol. Biol. Cell*, 2008)。GRWD1 は酵母からヒトまで保存されており、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、詳細な機能は不明であった。

最近の我々による検討の結果、以下のことが明らかとなっていた。

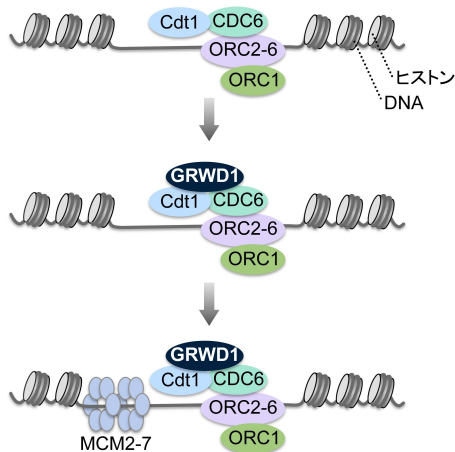


図1. Cdt1を介したGRWD1によるMCMローディング促進のモデル図

(1) GRWD1 はクロマチン結合性タンパク質である。(2) 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サーを組み合わせた ChIP-seq 解析から、GRWD1 は CDC6 とゲノムワイドに共同在することも示された。(3) GRWD1 は複製開始領域での MCM ローディングを促進する。(4) 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、(5) 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 (図 1、発表論文 1)。これらと一致して、(6) GRWD1 はがん細胞株で過剰発現している。

2. 研究の目的

複製開始における新規機能が明らかになる一方で、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が報告されている (He et al., *Genes Dev.*, 2006; Higa et al., *Nat. Cell Biol.*, 2006)。また、GRWD1 が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は高い。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 (発表論文 1)。このような知見から、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。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ている。FLAG タグ付き GRWD1 発現ベクターを HEK293T 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 2)。それらの中で、同定された転写因子 Pura との関連を探ることが本研究の目的である。

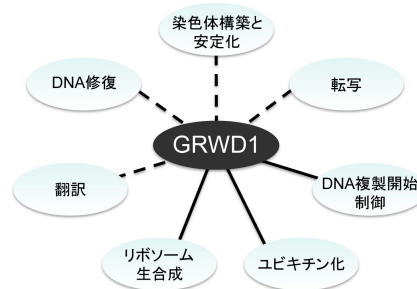


図2. ヒトGRWD1の機能
実線はこれまでの研究から明らかになった機能、点線は予想される機能を意味している。

Pura (purine-rich element binding protein A) は p53 標的プロモーターにおいて転写抑制的に働く (Kim et al., *J. Biol. Chem.*, 2008)。また Pura ノックアウトマウスでは脳発育異常が観察され (Khalili et al., *Mol. Cell Biol.*, 2003)、Pura 遺伝子の欠失や

転座と骨髄性白血病の関連も示唆されている (Lezon-Geyda et al., *Leukemia*, 2001)。このように、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、GRWD1 は転写因子 Pura と共に p53 の転写制御に抑制的に働くのではないかと考えた。つまり、GRWD1 が Pura と共にプロモーター上にリクルートされ、ヒストンシャペロンとして Pura による p53 標的のプロモーターでの転写抑制に関与することで、細胞がん化に寄与している可能性を考えた。抗 GRWD1 抗体を用いた ChIP-seq の結果 (発表論文 1) と p53 ChIP-seq の結果 (Aksoy, et al., *Genes Dev.*, 2012) を照合したところ、GRWD1 はいくつかの p53 標的の遺伝子プロモーター近傍に p53 と共局在している可能性が示されており (図 3)、GRWD1 と p53 との関連性が支持された。

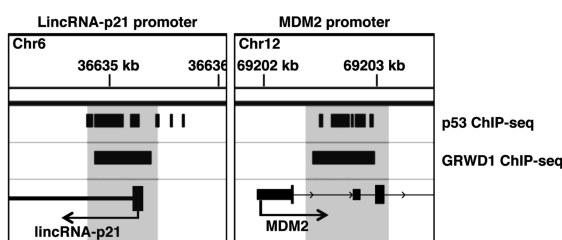


図3. GRWD1およびp53は p53標的遺伝子のプロモーターに共局在する。p53 ChIP-seq: 不活化したヒト胎児肺線維芽細胞、GRWD1 ChIP-seq: HeLa細胞

3. 研究の方法

in vivo および in vitro での各因子間の相互作用解析

in vivo interaction 解析には、HCT116 細胞を使用し、抗 Pura 抗体による免疫沈降を行った。また、同細胞に p53 と FLAG タグ付き GRWD1 もしくは T7 タグ付き Pura を過剰発現させ、それぞれ抗タグ抗体を用いた免疫沈降を行った。その後、免疫精製標品をイムノプロットにより解析した。

in vitro interaction 解析には、大腸菌を用いて精製組換えタンパク質を作成し、pull-down assay により直接結合するか調べた。

siRNA を用いた発現抑制と細胞ストレス応答の誘導

HCT116 細胞に siRNA を導入し、GRWD1 もしくは Pura を発現抑制したのち、8 μ M Bleomycin 処理を行うことで細胞に DNA 二本鎖切断によるストレスを与えた。その後、全細胞抽出液および RNA を回収し、イムノプロットと RT-qPCR によって各因子の発現量を解析した。

ルシフェラーゼアッセイ

H1299 細胞 (p53⁻) に、p53 と GRWD1、および Pura の発現ベクター、p21 プロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポーターベクター、コントロールとしてレニラルシ

フェラーゼ発現ベクターを co-transfection した。細胞抽出液を回収後、各ルシフェラーゼ活性を測定した。各レポーターにおけるルシフェラーゼ活性をレニラルシフェラーゼの値で補正することで各プロモーター活性を算出した。

ChIP assay

Pura 発現ベクターをトランスフェクションして24時間後のHCT116細胞を使用した。ホルマリンにより細胞を固定後、SDSを含むbufferで回収し、超音波処理によってDNAを断片化した。抗Pura抗体を用いた免疫沈降を行い、脱クロスリンク処理後、RNase処理およびProteinase処理を行い、共沈降したDNAを精製した。p21遺伝子のプロモーター領域に対するプライマーを使用して、qPCRにより解析した。

4. 研究成果

GRWD1、Pura、p53 は in vivo において複合体を形成する

抗 Pura 抗体を用いた免疫沈降の結果、GRWD1 の共沈降が認められた。さらに、細胞に p53 と FLAG タグ付き GRWD1、もしくは T7 タグ付き Pura を導入し、抗タグ抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、それぞれ p53 の共沈降が認められた。以上から、in vivo における GRWD1-Pura、GRWD1-p53、Pura-p53 間の相互作用が明らかとなった。次に、これらが直接結合するのかを調べるため、各因子の精製組換えタンパク質を作成し、in vitro における結合試験を行った。その結果、Pura-p53 の結合は見られたものの、GRWD1-Pura および GRWD1-p53 の in vitro における直接的相互作用は見られなかった。これらの結果から、GRWD1-Pura-p53 複合体形成には何らかの因子が必要だと考えられる。今後、以前行った GRWD1 結合候補因子の探索の結果をもとに、GRWD1-Pura-p53 複合体の他のサブユニットを同定したい。

GRWD1 および Pura のノックダウンは DNA 損傷時の p53 活性化による p21 の発現誘導を促進する

GRWD1 もしくは Pura をノックダウンした HCT116 細胞に Bleomycin 処理を行った。その結果、コントロール siRNA 処理と比較して GRWD1 もしくは Pura 発現抑制により、p53 下流因子の一つである p21 のタンパク質量および mRNA 量の増加が観察された。

GRWD1 および Pura は p53 による p21 プロモーターの転写活性化を負に制御する

p21 プロモーター領域を組み込んだレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイによって、GRWD1、Pura が p53 による p21 遺伝子プロモーターの転写活性化に与える影響について検討した。その結果、GRWD1 も

しくは Pura の過剰発現によって、p21 遺伝子プロモーターからの転写が有意に抑制された。

Pura は p21 プロモーターに結合する

作成した抗 Pura 抗体を用いた ChIP assay により、Pura は p21 プロモーターおよびその周辺に結合していることがわかった。

考察

得られた結果から、GRWD1 および Pura が、p53 による p21 遺伝子の転写活性化に対して抑制的に機能することが示唆された。現在その機構として、(1)GRWD1 や Pura を含む複合体が p53 と結合し、その p21 遺伝子プロモーター領域へのリクルートを抑制している可能性、あるいは (2)これらがプロモーター上における p53 の転写活性化能を抑制している可能性などが考えられる。また、GRWD1 がヒストンシャペロンであることから、当該領域におけるヌクレオソーム構造を変化させることで、その転写活性に影響を及ぼしている可能性も考えられる。加えて、p53 はストレス条件下において、リン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けることで転写活性が制御されることが知られている。そのため、両因子が結合することで、その翻訳後修飾に影響を与えている可能性も否定できない。一方、Pura は p21 プロモーターおよびその周辺に結合していることがわかった。in vitro における結合試験の結果と併せて考えると、Pura は p53 依存的に p21 プロモーターおよびその周辺領域にリクルートされている可能性が示唆される。今後は、その可能性について、p53 siRNA 処理細胞やプレオマイシン処理により p53 を活性化させた細胞を用いて調べたい。さらに、GRWD1 の同領域への結合も ChIP assay で調べたい。加えて、p21 遺伝子プロモーターおよびその周辺領域に GRWD1 と Pura が結合することによるクロマチン構造の変化や、p53 の翻訳後修飾、および当該領域へのリクルートに対する両因子の影響なども解析する予定である。

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3件)

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.: Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. *Nucleic Acids Res.*, 2015. 査読有。

doi: 10.1093/nar/gkv509

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.: A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1850**, 1676-1684, 2015. 査読有。

doi: 10.1016/j.bbagen.2015.04.013

Iwahori, S., Kohmon, D., Kobayashi, J., Tani, Y., Yugawa, T., Komatsu, K., Kiyono, T., Sugimoto, N. and Fujita, M.: ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S phase to prevent re-replication. *Cell Cycle*, **13**: 471-481, 2014. 査読有。

doi: 10.4161/cc.27274

[学会発表](計6件)

杉本のぞみ、前原一満、吉田一真、安河内周平、渡邊心也、會澤誠大、清野透、胡桃坂仁志、大川恭行、藤田雅俊：新規ヒストンシャペロン GRWD1 はゲノムワイドにクロマチン制御を行い複製ライセンスを促進する。第 37 回日本分子生物学会年会・ワークショップ、神奈川県横浜市、11 月 2014 年。(招待講演)

都地崇弘、杉本のぞみ、吉田和真、中山敬一、藤田雅俊：新規ヒストンシャペロン GRWD1 による p53 機能制御。第 73 回日本癌学会学術総会、9 月 2014 年。

杉本のぞみ、前原一満、安河内周平、吉田和真、清野透、胡桃坂仁志、大川恭行、藤田雅俊：Cdt1 結合蛋白質 GRWD1 は新規ヒストンシャペロンでありクロマチン構造と MCM 結合を制御している。第 36 回日本分子生物学会年会・ワークショップ、兵庫県神戸市、12 月 2013 年。(招待講演)

杉本のぞみ、前原一満、渡邊心也、清野透、胡桃坂仁志、大川恭行、藤田雅俊：Cdt1 結合蛋白質 GRWD1 はクロマチン構造および MCM ローディングを制御する新規ヒストンシャペロンである。第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、宮城県仙台市、11 月 2013 年。

Sugimoto, N., Maehara, K., Yasukouchi, S., Watanabe, S., Kiyono, T., Kurumizaka, H., Ohkawa, Y. and Fujita, M.: Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone chaperone that regulates chromatin structure and MCM loading. *Cold Spring*

Harbor Laboratory Meeting on
"Eukaryotic DNA replication &
Genome Maintenance", Cold spring
harbor, USA. September, 2013.

杉本のぞみ、前原一満、清野透、胡桃坂
仁志、大川恭行、藤田雅俊：Cdt1 結合
蛋白質 GRWD1 はクロマチン構造およ
び MCM ローディングを制御する新規
ヒストンシャペロンである。第 65 回細
胞生物学会・シンポジウム、愛知県名古
屋市、6 月 2013 年。(招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://tansaku.phar.kyushu-u.ac.jp/saito/to
p.html](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)

九州大学大学院薬学研究院医薬細胞生化学
分野・助教

研究者番号：00633108

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし