

136. ヒストンシャペロン GRWD1 の新機能解明

杉本 のぞみ

Key words : GRWD1, EDD, RPL23, Pur a, p53

九州大学 大学院薬学研究院
創薬科学部門 生体分子情報学講座
医薬細胞生化学分野

緒 言

真核生物における DNA 複製開始反応は、いくつかの複製開始因子が DNA 上に集積し複製開始前複合体 (pre-RC) を形成することで始まる。GRWD1 (glutamate-rich WD40 repeat domain 1) はヒトから出芽酵母まで高度に保存されたタンパク質で、新たな pre-RC 構成因子候補の一つとして同定された¹⁾。我々は、現在までに GRWD1 について以下の知見を得ている。(1) GRWD1 はクロマチン結合性タンパク質である。(2) 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。(3) GRWD1 は Cdt1 依存的に複製開始領域に結合し、クロマチンをオープンな構造にすることで MCM ローディングを促進する。(4) クロマチン免疫沈降 (ChIP) と次世代シーケンシング (seq) を組み合わせた解析の結果、GRWD1 は複製開始領域のみならず、ゲノムワイドにクロマチン構造の制御に関与している。(5) GRWD1 はがん細胞で過剰発現している²⁾。これらの知見に加えて、他の研究グループにより、リボソーム生成やタンパク質のユビキチン化など、その他の細胞内反応への関与もいくつか報告されている。さらに GRWD1 がヒストンシャペロンであることから、転写制御に関与している可能性も高いと考えられる。そこで、GRWD1 の新規機能の解明を目的として、プロテオミクスアプローチを用いた GRWD1 結合タンパク質の網羅的探索を行った。本研究では、新たに同定された新規 GRWD1 結合性因子の中から、E3 ユビキチンリガーゼ EDD、核小体ストレス誘導因子 RPL23、さらには転写因子 Pur a に着目し、解析を進めた。

EDD は DDB1 や VprBP と共に EDVP E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成し、TERT およびカタニンのタンパク質量制御に機能していることが報告されている。RPL23 は核小体ストレス応答時のがん抑制タンパク質である p53 の安定化を誘導する因子である。核小体ストレス応答とは、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し、RPL23 等が核へ放出されることで p53 経路を活性化することにより、細胞の恒常性維持を計る重要なストレス応答である。これまでの研究により、GRWD1 が核に加え、核小体にも多く局在することや、それが核小体ストレス時に核質へと放出されることを観察していた。そこで、GRWD1 が EDD と共に RPL23 の量的制御を行っている可能性を考え、検討を行った。

一方、Pur a は一本鎖 DNA、RNA 結合能を持ち、転写に対して抑制、促進の両方に作用することが報告されている。加えて、p53 による標的遺伝子の転写制御への関与も報告されている。GRWD1 は種々のがん細胞で過剰発現していることから、GRWD1 が転写因子 Pur a と協調して p53 による転写活性化に抑制的に関与することで、細胞のがん化に寄与している可能性を考え、解析を進めた。

方法および結果

1. GRWD1 および EDD による RPL23 タンパク質量の制御機構の解明

これまでの研究によって、GRWD1 と RPL23、あるいは GRWD1 と EDD の細胞内結合は確認していた。そこで、GRWD1 が EDD と共に RPL23 の量的制御に関わっているか調べるため、まずは細胞に GRWD1 を過剰発現させたところ、RPL23 タンパク質量の減少が認められた。この減少は、プロテアソーム阻害剤 MG132 の添加によって抑制されたことから、26S プロテアソーム依存的である可能性が示唆された。また、EDD の過剰発現によっても RPL23 量は減少した。このとき、GRWD1 を共発現させると、相乗的な RPL23 量の減少が観察された。

次に、RPL23の細胞内でのユビキチン化にGRWD1およびEDDが影響を及ぼすか調べた。HAタグが付加されたユビキチン、RPL23、GRWD1およびEDDの発現ベクターを細胞に導入後、抗RPL23抗体を用いた免疫沈降を行い、抗HA抗体を用いたimmunoblottingによりユビキチン化されたRPL23を検出した。GRWD1あるいはEDDの一方を過剰発現させると、RPL23のユビキチン化は促進され、両者の共発現により、相乗的なユビキチン化の促進が確認された。

さらに、siRNAを用いてGRWD1を発現抑制し、低用量アクチノマイシンD処理による核小体ストレス応答p53経路の活性化を引き起こしたところ、GRWD1 siRNA処理細胞ではRPL23量の上昇が認められた。さらに、p53量の上昇も観察された。以上の結果から、GRWD1およびEDDはRPL23の分解促進を介してp53制御を行っている可能性が示唆された(図1)。

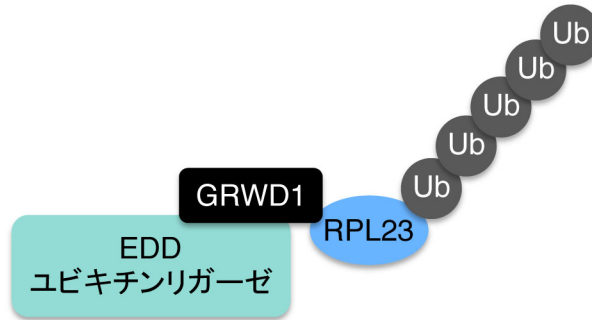


図1. GRWD1およびEDDユビキチンリガーゼ複合体によるRPL23分解促進のモデル図。

GRWD1は、EDDやDDB1を含むユビキチンリガーゼ複合体とRPL23をつなぐアダプターとして機能することでRPL23分解を促進している可能性が考えられる。

2. GRWD1およびPur aによるp53転写活性制御機構の解明

まずはGRWD1、Pur aおよびp53の結合様式を調べるため、免疫沈降を行った。その結果、*in vivo*におけるGRWD1-Pur a、GRWD1-p53、Pur a-p53間の相互作用が明らかとなった。さらに、これらの因子が直接的に相互作用するのかが検討するため、大腸菌で精製組換えタンパク質を作製し、*in vitro*における結合試験を行った。Pur a-p53間の相互作用は認められたものの、GRWD1-Pur a、GRWD1-p53間の*in vitro*における直接的相互作用は認められなかった。以上から、GRWD1はPur aおよびp53と、細胞内で何らかの因子を介して間接的に相互作用していることが示された。

GRWD1-Pur a-p53の細胞内相互作用が明らかになったため、GRWD1がPur aと共にp53による転写反応を負に制御しているのではないかと考えた。そこで、GRWD1、Pur aがストレス応答時におけるp53とその下流因子の発現に与える影響を観察するため、細胞にGRWD1あるいはPur aのsiRNAを導入して発現抑制を行い、その後、プレオマイシン処理を行うことでDNA鎖の切断とそれによる細胞傷害ストレスを誘導した。その結果、GRWD1あるいはPur aの発現抑制により、p53の下流因子の一つであるCdkインヒビターp21タンパク質量の増加が観察された。さらに、このタンパク質量の増加がmRNA量の増加によるものであることが明らかになった。以上の結果から、GRWD1およびPur aがDNA損傷時におけるp53によるp21の転写活性化を負に制御している可能性が考えられた。

次にp53 nullのH1299細胞にp53、GRWD1、Pur aの発現ベクターおよび種々のp53反応性のプロモーターを持つレポーターベクター等をトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った。その結果、p21プロモーターを組み込んだレポーターを用いた場合には、GRWD1あるいはPur aの発現によってp53による転写が有意に抑制された。しかしながら、GRWD1とPur aを共発現させても、相加的な抑制活性の増加は観察されなかった。以上から、GRWD1およびPur aは、p53によるp21遺伝子の転写に抑制的に作用する可能性が強く示唆された(図2)。

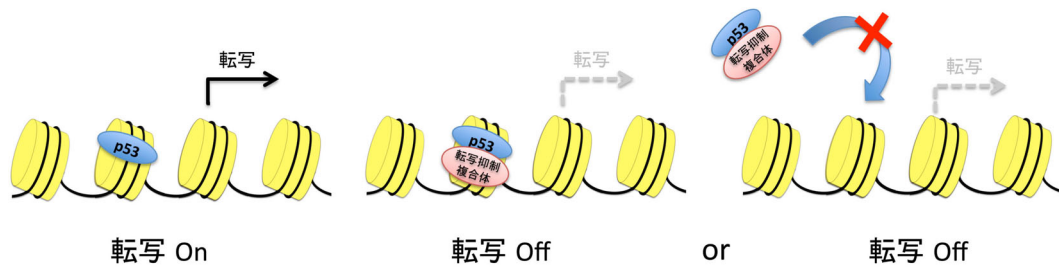


図2. GRWD1 および Pur a による p53 転写活性抑制のモデル図。

GRWD1 や Pur a を含む転写抑制複合体が p53 と結合することで、標的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 (中図)、あるいは p53 のリクルートを抑制している可能性 (右図) などが考えられる。

考 察

1. GRWD1 および EDD による RPL23 タンパク質の量的制御について

RPL23 は核小体ストレス時にユビキチンリガーゼ MDM2 と結合することでその機能を抑制し、p53 の安定化に関与している。得られた結果から、GRWD1 および EDD が RPL23 タンパク質量制御に関与していることが示唆された。また、その制御はユビキチンプロテアソーム系を介していることが示唆された。EDD と共にユビキチンリガーゼ複合体を形成する DDB1 も GRWD1 結合因子としてマスマスペクトロメトリーで同定されており、DDB1 の過剰発現によっても RPL23 量は減少することを認めている。以上から、EDD は DDB1 と複合体を形成し、RPL23 の量的制御に関与している可能性がある。現在、GRWD1 は EDD-DDB1 E3 ユビキチンリガーゼ複合体と RPL23 をつなぐアダプターとして機能することにより、RPL23 タンパク質分解を促進するのではないかと考えている。GRWD1 が RPL23 を分解促進し (図1)、核小体ストレス応答時の p53 を抑制するという仮説は、GRWD1 ががん細胞で過剰発現しており、がん細胞増殖に促進的に機能しているという可能性を支持する。この仮説を証明するべく、現在はさらに研究を進めている。

2. GRWD1 および Pur a による p53 転写活性抑制機構について

得られた結果から、GRWD1 および Pur a 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 Pur a を含む抑制複合体が 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 (図2右)、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 (図2中) 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ていることが知られている。そのため、p53 に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。以上を踏まえた上で、今後はその詳細なメカニズムを解析していきたい。具体的には、p21 遺伝子のプロモーター領域への GRWD1 および Pur a の結合や、それによるクロマチン構造の変化、加えて p53 の翻訳後修飾や当該領域へのリクルートに対する両因子の影響を解析する予定である。解析にあたっては、タンパク質の特定の遺伝子領域への結合を検出可能な ChIP-qPCR や、部位特異的なクロマチン構造の変化を検出する事ができる FAIRE-qPCR 等の手法を用いる予定である。

3. GRWD1 による p53 抑制機構について

以前の我々の解析から、GRWD1 は DNA 複製開始時にヒストンシャペロンとして機能することが明らかとなっていた²⁾。しかしほかにも未知の機能を持つことが示唆されたため、結合因子の網羅的探索を行ったところ、EDD や Pur a などの因子が同定された。また、GRWD1 は核だけでなく、核小体にも多く局在することや、核小体ストレス時には核質へと放出されることを観察していた。本研究により、核内では EDD と共に RPL23 の分解促進を行うことで p53 を抑制し、一方、クロマチン上では Pur a と共に p53 の転写活性を抑制することで、GRWD1 は統合的に細胞増殖促進

的に機能することが示唆された (図3)。このため、GRWD1 の過剰発現はがん化の一因となる可能性が考えられ、実際、がん細胞において GRWD1 は過剰発現している²⁾。また、EDD も種々のがん細胞で過剰発現していることが知られており、本研究で得られた所見と一致する。今後は、GRWD1 と EDD および Pur α との関連についてより詳細に調べると共に、ほかの GRWD1 結合因子との関わりについての解析も行い、GRWD1 を中心とした新たな細胞増殖ネットワークを明らかにすることで、その正常細胞での役割、染色体不安定性、および発がん誘導への関与の分子機構の理解を深めていきたい。

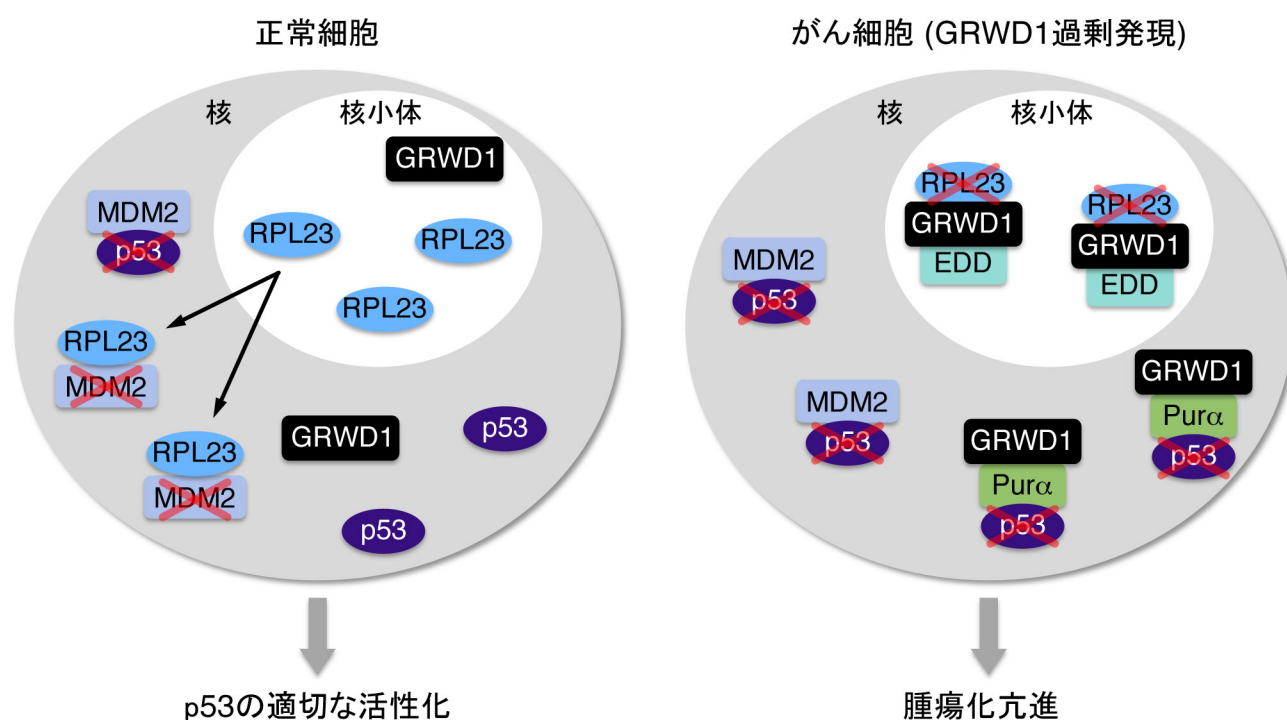


図3. GRWD1 による p53 抑制機構のモデル図。

正常細胞では、ユビキチンリガーゼ MDM2 は p53 を分解に導いている。核小体ストレス時、核小体に局在している RPL23 は核へと放出され、MDM2 を抑制する。その結果 p53 が安定化し、細胞は細胞周期停止などの適切な制御を受ける。一方、がん細胞では GRWD1 が過剰発現しており、EDD と共に RPL23 を分解に導くため、核小体ストレス時においても MDM2 が抑制されず、p53 は分解される。また、GRWD1 は Pur α と共に p53 の転写活性を抑制する。結果として、GRWD1 過剰発現細胞では、p53 は量的にも機能的にも抑制され、ストレスが生じて適切な反応が行われないまま細胞増殖が促進し、腫瘍化の亢進につながる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院薬学研究院の藤田雅俊である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) Sugimoto, N., Kitabayashi, I., Osano, S., Tatsumi, Y., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Matsukage, A., Kiyono, T. & Fujita, M. : Identification of novel human Cdt1-binding proteins by a proteomics approach: proteolytic regulation by APC/CCdh1. *Mol. Biol. Cell*, **19**: 1007-1021, 2008.
- 2) Sugimoto, N., Maehara, K., Yoshida, K., Yasukouchi, S., Osano, S., Watanabe, S., Aizawa, M., Yugawa, T., Kiyono, T., Kurumizaka, H., Ohkawa, Y. & Fujita, M. : Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. *Nuc. Acids Res.*, doi: 10.1093/nar/gkv509, 2015.