

リボソームタンパク質RPS19によるがん抑制機構の解明およびGRWD1によるp53転写活性化能の制御機構の解明

藤山, 拓己

<https://hdl.handle.net/2324/6787545>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 藤山 拓己

論文題名 : リボソームタンパク質 RPS19 によるがん抑制機構の解明および
GRWD1 による p53 転写活性化能の制御機構の解明

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

第 1 章 : リボソームタンパク質 RPS19 によるがん抑制機構の解明

リボソームとは、全ての生物に必須なタンパク質合成を担う複合体である。リボソームタンパク質遺伝子の欠失などによるリボソーム生合成の異常はリボソーム病と呼ばれる一連の疾患群を引き起こす。近年、リボソーム病の一部において高い発がん性を示すものが報告されており、その代表例としてダイヤモンドブラックファン貧血(DBA)が挙げられる。DBA は先天性の造血不全症として知られており、主な症状は骨髄前駆細胞数の減少に伴う大球性貧血であるが、白血病や大腸がん、骨肉腫など様々ながんを併発するリスクが高い疾患である。DBA 患者において変異や欠失が認められる DBA 関連遺伝子として 10 以上ものリボソームタンパク質遺伝子が報告されており、その中で最も高頻度に変異が見られる遺伝子が RPS19 遺伝子である。しかしながら、RPS19 の機能と DBA の高い発がん性との機能的関連はこれまで全く不明であり、RPS19 のがん抑制活性の有無を実験的に示した報告も存在しない。そこで本研究は、RPS19 のがん抑制活性の有無を明らかにし、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

当研究室の先行研究において、16 型 HPV E7 および活性型 KRAS を導入したヒト正常線維芽細胞である HFF2/T/E7/KRAS 細胞において siRNA を用いて RPS19 を発現抑制し、軟寒天コロニー形成試験を行われた。その結果、RPS19 の発現抑制により大型コロニーの形成が観察された。すなわち、ヒト正常細胞において RPS19 ががん抑制活性を有することが新たに示唆された。

本研究ではまず、RPS19 のがん抑制活性についてさらなる知見を得るため、shRNA を導入して RPS19 を安定的に発現抑制した HFF2/T/E7/KRAS 細胞を樹立し、ヌードマウスにおける造腫瘍試験を行った。その結果、RPS19 発現抑制細胞で有意な腫瘍サイズの増大が認められた。さらに、RPS19 を安定過剰発現させた p53 野生型の HCT116 細胞を用いて軟寒天コロニー形成試験を行った。その結果、RPS19 安定発現細胞はコントロールと比較して大型コロニーの形成が減少した。一方で、p53 を欠損させた HCT116 細胞ではそのような傾向は見られなかった。以上から、RPS19 はヒト細胞において p53-status 依存的にがん抑制活性を示す可能性が示唆された。

次に、RPS19 のがん抑制機構の解明に着手した。質量分析法による RPS19 新規結合因子の網羅的探索を行った結果、p53 の転写活性化能を抑制することが報告されている SET が同定された。重要なことに、SET が RPS19 と特異的に結合しており、SET との結合を失った RPS19 変異体を HCT116 細胞において過剰発現しても大型コロニーの形成は抑制されなかった。さらに、ルシ

フェラーゼアッセイによって SET および RPS19 野生型もしくは変異体が p53 の転写活性化能に及ぼす影響を調査した結果、SET の発現によって p53 の転写活性化能は抑制され、RPS19 は SET の p53 転写抑制能を阻害した。一方で、SET との結合を失った RPS19 変異体は野生型と比較して SET 阻害機能が減弱していた。このことから RPS19 は少なくとも部分的には SET との結合を介してがん抑制活性を発揮していることが示唆された。

以上から、RPS19 がヒト細胞においてがん抑制活性を示し、SET との相互作用を介して SET の機能を阻害することによって、p53 の転写活性化能を制御していることが示唆された。

第 2 章：GRWD1 による p53 転写活性化能の制御機構の解明

GRWD1 は DNA 複製前複合体(pre-RC)の形成において重要な Cdt1 の新規結合因子として同定されたタンパク質である。GRWD1 はヒストンシャペロンとして機能し、複製ヘリカーゼである MCM のローディングを促進すること、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すること、がん細胞で過剰発現しており、細胞のがん化を促進することが報告されていた。また、GRWD1 が p53 の標的遺伝子のプロモーター上に結合する可能性も示されていた。以上の知見から、本研究では、GRWD1 が p53 の転写活性化能を抑制することによっても発がんを促進する可能性を検討することにした。

先行研究において、GRWD1 が p53 による p21 転写反応を抑制すること、および p53 依存的に p21 遺伝子プロモーターに結合することが示唆されていた。しかしながら、GRWD1 と p53 の詳細な結合様式や、GRWD1 による p53 の転写抑制機構は明らかではなかった。そこで私は、GRWD1 と p53 の機能的および物理的な相互作用について詳細な解析を開始した。

まず、ChIP-qPCR 解析によって GRWD1 の MDM2 遺伝子プロモーターへの結合を調査した。その結果、GRWD1 は p21 遺伝子だけでなく、MDM2 遺伝子のプロモーター領域にも p53 依存的に結合することが示唆された。また、FAIRE-qPCR 解析によって、GRWD1 発現抑制時の p21 プロモーター領域のクロマチン構造を調査した結果、GRWD1 がストレス時の p21 プロモーター領域のクロマチンオープンネスを抑制することが示唆された。次に、精製タンパク質を用いたプルダウンアッセイによって、GRWD1 が p53 と直接結合することが示唆された。さらに、GRWD1 および p53 の部位欠失変異体を用いて結合部位を調査したところ、GRWD1 の N 末端領域と p53 の DNA 結合ドメインがそれらの結合に重要であることを明らかにした。最後に、公共のデータベースを用いてメラノーマ患者におけるデータを解析したところ、p53 野生型の患者群では、GRWD1 高発現群は低発現群より有意に予後不良であったが、p53 変異型の群では、GRWD1 の発現量の高低と予後との相関は見られなかった。また、p53 野生型、かつ、GRWD1 高発現の患者群では、p53 標的遺伝子である GADD45A および NOXA の発現低下が認められ、それらの症例は有意に予後不良であった。

以上から、GRWD1 が p53 と直接結合することにより p53 の転写活性化能を抑制すること、そしてその結果がんの進行を促進する可能性が考えられる。