

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 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			
論文調査委員	主 査	九州大学	教 授	松永 直哉
	副 査	九州大学	教 授	片山 勉
	副 査	九州大学	准教授	仲矢 道雄
	副 査	九州大学理学院	教 授	高橋 達郎

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

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。一方、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 の主な症状は骨髓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、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、本論文の第 1 章では、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て研究が行われた。

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が行われた。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可能性が新たに示唆された。

そこで本研究ではまず、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 細胞が樹立され、ヌードマウスにおける造腫瘍試験が行われた。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も行われた。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ことが示された。

次に、RPS19 のがん抑制機構の解明が試みられた。質量分析法による RPS19 新規結合因子の網羅的探索の結果等から、p53 の転写活性化能を抑制することが報告されている SET が特異的結合因子として同定された。重要なことに、SET との結合を特異的に失った RPS19 変異体は、野生型と異なりがん抑制活性を失うことが示された。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 はその 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。以上から、RPS19 がヒト細胞においてがん抑制活性を持っており、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 の転写活性化能を促進的に制御していることが示唆された。これらの研究内容は、DBA の最も重要な原因遺伝子である RPS19 を新規がん抑制性リボソームタンパク質として特徴付け、DBA の高い発がん性を説明できる新たなリボソームタンパク質のがん抑制機構を明らかにしたものと考えられる。

一方、核小体タンパク質でありリボソーム生合成にも関与している 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。その後の研究により、GRWD1 はがん細胞で過剰発現していること、RPL11 や RPL23 と結合し、それにより p53 を抑制することにより細胞のがん化を促進することが判明していた。本論文の第 2 章では、GRWD1 が p53 と結合し、そ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という新たな分子機構が明らかにされた。

先行研究において、GRWD1 が p53 による p21 プロモーターの活性化を抑制し得ること等が示唆されていた。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、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が行われた。

まず、ChIP-qPCR 解析によって、GRWD1 は p21 遺伝子と同様に 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された。さらに、GRWD1 および p53 の部位欠失変異体を用いた解析から、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が明らかにされた。最後に、公共のデータベースを用いたメラノーマ患者のデータ解析により、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る一方、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いことが示された。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ることも示された。以上から、GRWD1 が p53 と直接結合することで、p53 標的遺伝子のプロモーター上にリクルートされ、当該領域のクロマチンのオープンネスを抑制することで、p53 の転写活性化能を抑制することが明らかとなった。

以上第 1 章および第 2 章の研究は、リボソーム生合成関連タンパク質 RPS19 および GRWD1 による p53 を介した新たな発がん制御機構を明らかにした興味深いものであり、薬学および生命科学の観点からも重要な研究であると考えられる。したがって、本学位請求論文は博士（創薬科学）の学位に値すると認めた。