

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)



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

(分野名) 医薬細胞生化学分野 (学籍番号) 3PS20003W (氏名) 藤山 拓己

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

【序論】

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。その一部は高い発がん性を伴うことが報告されており、代表的疾患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であり、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 関連遺伝子として多く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、その分子機構を解明することを目的とした。

【方法】

・ヒト培養細胞を用いた軟寒天コロニー形成試験

ヒト正常線維芽細胞 HFF2/T 細胞に 16 型ヒトパピローマウイルス E7 および活性型 KRAS^{G12V} を導入した HFF2/T/E7/KRAS 細胞あるいは大腸がん細胞株 HCT116 細胞に RPS19 野生型および変異体を安定発現させた細胞を用いて、軟寒天培地中でのコロニー形成能を調べた。数週間培養した後、形成されたコロニーの数とサイズを解析した。

・ヌードマウスを用いた造腫瘍性試験

HFF2/T/E7/KRAS 細胞にレトロウイルスを用いて RPS19 を標的とする shRNA を導入して、安定的に RPS19 を発現抑制した細胞を樹立した。それらの細胞をヌードマウスの右肩に皮下注射し、形成される腫瘍のサイズを測定した。

・質量分析法による RPS19 結合タンパク質の網羅的同定

FLAG タグ融合型 RPS19 を発現させた HCT116 細胞から可溶性画分を回収し、抗 FLAG 抗体付きビーズを用いて免疫沈降を行い、共沈降物を質量分析によって網羅的に同定した。

・免疫沈降法によるタンパク質相互作用解析

HCT116 細胞に FLAG タグ融合型の RPS19、RPS17、RPS7、RPL11 あるいは HA タグ融合型 SET を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物と input に対してイムノブロッティングを行うことで、タンパク質間相互作用を解析した。

・siRNA を用いた発現抑制と核小体ストレス応答の解析

HFF2/T/E7/KRAS 細胞に siRNA を導入し、各種リボソームタンパク質を発現抑制した。その後、

低用量(5nM)のアクチノマイシン D(ActD)処理を行うことで、核小体ストレスを与え、12 時間後に全細胞抽出液を回収し、免疫ブロットイングあるいは RT-qPCR によって p53 および p53 標的遺伝子である p21 の発現量を解析した。

・ Luciferase assay による p21 プロモーター活性の測定

種々の発現ベクターおよび p21 プロモーター配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを導入した HCT116 p53 knockout 細胞の全細胞抽出液を回収し、ルシフェラーゼシグナルを測定することで、p53 により誘導される p21 プロモーター活性を評価した。

・ クロマチン免疫沈降法(ChIP)による SET および RPS19 のクロマチン結合調査

3×FLAG タグ融合型 RPS19 および SET を発現させた HCT116 細胞の抽出液に対し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、結合した DNA を精製し、qPCR によって RPS19 および SET の p21 プロモーター領域への結合量を調べた。

【結果】

・ RPS19 はヒト細胞においてがん抑制活性を示す

先行研究において、siRNA により RPS19 を発現抑制した HFF2/T/E7/KRAS 細胞を用いた軟寒天コロニー形成試験が行われた。その結果、RPS19 の発現抑制により軟寒天培地中での巨大コロニーの形成が認められた(データは示していない)。したがって、RPS19 がヒト正常細胞においてがん抑制活性を有する可能性が初めて示唆された。そこで、同細胞に RPS19 に対する shRNA を導入して安定的に発現抑制した細胞を樹立し、ヌードマウスにおける造腫瘍性試験を行った。その結果、RPS19 安定発現抑制細胞を用いた場合はコントロール細胞と比較して有意な腫瘍サイズの増大が認められた (図 1)。以上から、RPS19 がヒト細胞においてがん抑制的に機能することが強く示唆された。

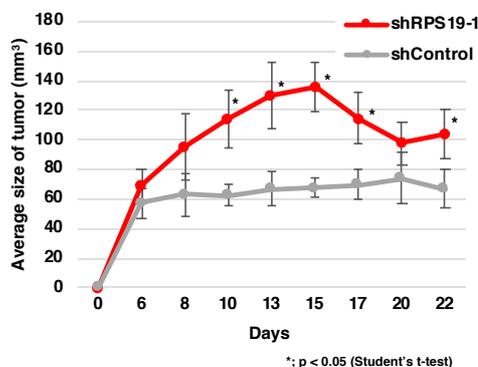


図 1. RPS19 はヒト細胞においてがん抑制活性を示す

・ RPS19 は p53 標的遺伝子 p21 の発現を制御する

RPS19 によるがん抑制機構解明のため、HFF2/T/E7/KRAS 細胞に各種 RP を発現抑制する siRNA を導入し、その後アクチノマイシン D 処理を行うことで細胞に核小体ストレスを与え、p53 および p21 の誘導量を調査した。その結果、RPL11 を発現抑制すると核小体ストレスによる p53 誘導が减弱されるのに対し、RPS19 および RPL26 の発現抑制は p53 誘導を増強した。一方で、RPL26 の発現抑制とは異なり、RPS19 の発現抑制では p21 の誘導は増強されなかった(図 2A)。また、p21 の mRNA の誘導においても同様の傾向が認められた(図 2B)。このことから、

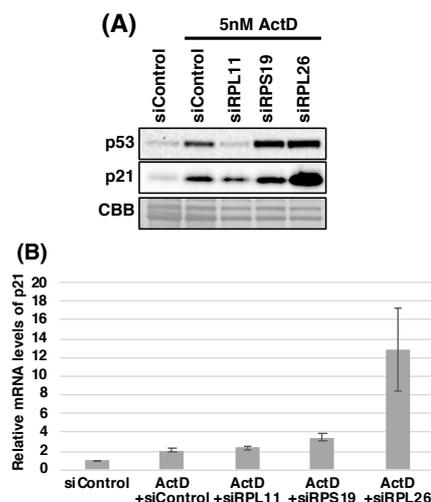


図 2. RPS19 は p21 の発現を mRNA レベルで制御する

RPS19 は p21 の発現を mRNA レベルで制御している可能性が示唆された。p21 の mRNA の誘導においても同様の傾向が認められた。このことから、RPS19 は p21 の発現を mRNA レベルで制御している可能性が示唆された。

・質量分析法による RPS19 新規結合因子 SET の同定

新規がん抑制機構の解明に向け、質量分析法により RPS19 結合因子の網羅的探索を行った結果、p53 標的遺伝子の転写を抑制する SET というがん遺伝子を同定し、これが他のリボソームタンパク質と比較して RPS19 特異的に結合することを見出した(図 3A)。さらなる相互作用解析の結果、RPS19 の R101、R102 のアミノ酸残基の変異により、RPS19 と SET との結合が特異的に減弱することが明らかとなった(図 3B,C)。

・RPS19 は SET との結合を介してがん抑制活性を発揮する可能性がある

siRNA 耐性を付与した FLAG タグ融合型 RPS19 野生型と RPS19 RA 変異体を安定発現させた HFF2/T/E7/KRAS 細胞に、RPS19 に対する siRNA を処理した上で軟寒天コロニー形成試験を行った。その結果、RPS19-FLAG を安定発現させていない細胞では、RPS19 の発現抑制によって巨大コロニーが形成したが、RPS19-FLAG の安定発現によって巨大コロニーの形成は抑えられた(図 4)。一方で、RPS19-FLAG RA 変異体の安定発現は巨大コロニーの形成を抑えなかった(図 4)。また、RPS19-FLAG あるいは RPS19-FLAG RA 変異体を安定発現させた HCT116 細胞を用いて軟寒天コロニー形成試験を行った結果、野生型は巨大コロニーの形成を抑えた一方で、RA 変異体は巨大コロニーの形成をむしろ促進した(データは示していない)。以上の結果から、RPS19 のがん抑制活性において SET との結合が重要であることが示唆された。

・SET は p53 による転写活性化を抑制し、RPS19 はその SET の機能を阻害する

SET は p53 による p53 標的遺伝子の転写活性化を抑制する報告があったため、p53 による転写活性化に SET および RPS19 が及ぼす影響を Luciferase assay によって調査した。その結果、p53 によって活性化したシグナルは、以前の報告と一致して、SET の過剰発現によって 6 割ほどまで抑制された。そして、RPS19 の共発現によって SET による抑制は十分に打ち消された(図 5A)。一方、

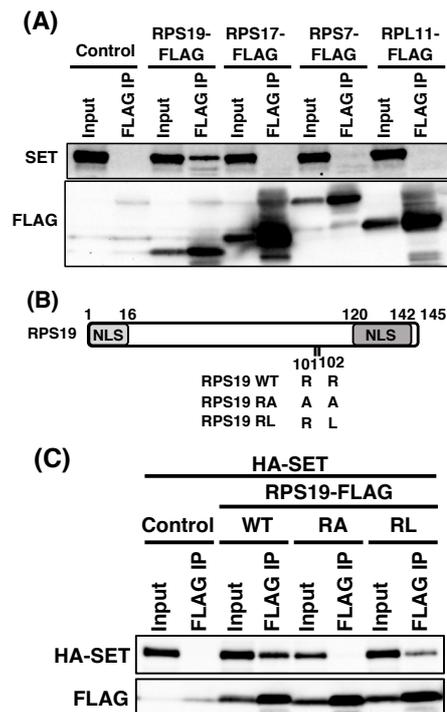


図 3. RPS19 新規結合タンパク質 SET と RPS19 野生型および変異体との結合
RA: RPS19 R101A.R102A 変異体
RL: RPS19 R102L 変異体

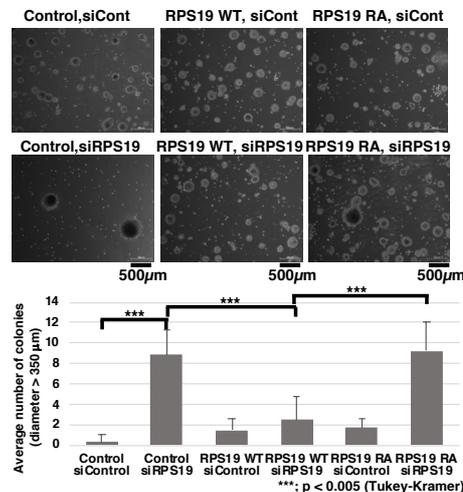


図 4. RPS19 野生型は巨大コロニーの形成を抑制し、RPS19 RA 変異体は巨大コロニーの形成を抑制しない

RPS19 RA 変異体は野生型と比較して SET による抑制を阻害する効果が減弱していた(図 5A)。以上のことから、RPS19 は少なくとも部分的には SET との結合を介して SET による p53 転写抑制を阻害し、p53 標的遺伝子の転写をポジティブに制御していることが示唆された。また、ChIP 法によって p21 プロモーター領域への SET および RPS19 の結合を調べた結果、当該領域に SET および RPS19 が結合することが示唆された(図 5B)。以上の結果から、RPS19 は p21 プロモーター領域で SET を阻害し、p53 による転写活性化をポジティブに制御している可能性が考えられる。

【考察】

本研究の結果、RPS19 がヒト細胞においてがん抑制性を示すことが明らかとなった。さらに、そのがん抑制機構の 1 つとして、RPS19 はがん遺伝子 SET と相互作用し、SET による p53 転写抑制能を阻害している可能性が示唆された。さらに、SET との結合が減弱した RPS19 R101、R102 アミノ酸残基の変異体は野生型と比較して、がん抑制活性を失っていた。このことから、RPS19 のがん抑制活性における R101、R102 アミノ酸残基の重要性と SET との相互作用の重要性が示された。本研究は 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。

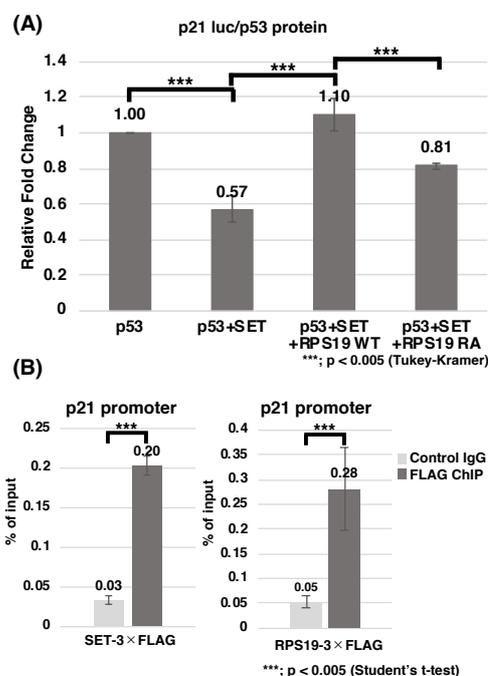


図 5. RPS19 は p21 プロモーター領域に結合し、SET による p53 転写抑制能を阻害する

第 2 章. GRWD1 による p53 転写活性化能の制御機構の解明

本学位論文の 2 章では、当研究室でがん遺伝子として特徴付けられてきた核小体タンパク質 GRWD1(Glutamate-rich WD repeat containing 1)による p53 制御機構を解析した。その結果、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 転写活性化能を抑制することを明らかにした。本研究結果は Journal of Biochemistry 誌にて論文発表している(発表論文 1)。

【発表論文】

1. [Fujiyama, H.](#), Tsuji, T., Hironaka, K., Yoshida, K., Sugimoto, N., Fujita, M. GRWD1 directly interacts with p53 and negatively regulates p53 transcriptional activity. *J. Biochem.* 167.pp15-24 (2020).
2. Watanabe, S., [Fujiyama, H.](#), Takafuji, T., Kayama, K., Matsumoto, M., Nakayama, KI., Yoshida, K., Sugimoto, N., Fujita, M. GRWD1 regulates ribosomal protein L23 level via the ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci* 131: jcs213009 (2018).