

「ゲノムの構造と機能」
平成11年度採択研究代表者

田矢 洋一

(国立がんセンター研究所放射線研究部 部長)

「p53によるゲノム防御機構」

1. 研究実施の概要

p53はある場合にはG1停止を誘導するけれども別の場合にはアポトーシスを誘導する。この選択のメカニズムは重要な問題でありながら不明であったが、我々は、p53の新規リン酸化部位Ser46がアポトーシスを誘導を制御することを見いだした。この部位は細胞のDNAが深く傷ついてアポトーシスが誘導される時期に一致してリン酸化が誘導される。しかも、この部位を他のアミノ酸に置換すると、p53のアポトーシス誘導能が大きく変化する。そして、p53によって発現誘導されることが知られているターゲット遺伝子のうち、東大医科学研究所の中村祐輔教授の所で単離された新規遺伝子*p53AIP1*の発現のみがSer46のリン酸化と一致することも見出した。*p53AIP1*蛋白質はミトコンドリアで働き、アポトーシスを誘導する。したがって、DNAの傷が深く、G1停止やDNA修復が不可能になるとSer46キナーゼが活性化されて、p53のSer46がリン酸化され、*p53AIP1*遺伝子のプロモーターへのアフィニティーが高まり、*p53AIP1*が発現して細胞はアポトーシスで死ぬと考えられる。

このメカニズムは今後、癌細胞にのみアポトーシスを起こさせて死滅させる方法の開発などに応用できるかも知れない。

2. 研究実施内容

< 研究目的 >

p53はヒトの癌全体の約50%で失活の見られる最も重要な癌抑制蛋白質であるので、これの細胞内での生理機能を明らかにすることは新しい癌治療法の開発にもつながると期待される。

p53は、細胞がDNAにダメージなどを受けると増加して活性化状態になるが、活性化されたp53は、G1停止あるいはアポトーシスを引き起こす。その際のp53の活性の制御がp53上のリン酸化部位の違いでなされると推定するので、作製したp53の多数のリン酸化部位特異的抗体を用いて、どの部位のリン酸化がp53のどのような活性の制御を行うのかを明らかにする。昨年度までに、すでに、Ser15やSer20のリン酸化がp53の活性化に重要であることを明らかにしてきたが、他の部

位についてもこれらの抗体を用いて意義を明らかにする。

< 研究方法 >

細胞がアポトーシスを起こすのと一致してリン酸化されるp53の部位を、作製したp53の多数のリン酸化部位特異的抗体を用いて同定する。

< 結 論 >

p53の新規リン酸化部位Ser46がアポトーシス誘導を制御することを見いだした。この部位は細胞のDNAが深く傷ついてアポトーシスが誘導される時期に一致してリン酸化が誘導される。しかも、この部位を他のアミノ酸に置換すると、p53のアポトーシス誘導能が大きく変化する。そして、p53によって発現誘導されることが知られているターゲット遺伝子のうち、東大医科学研究所の中村祐輔教授の所で単離された新規遺伝子*p53AIP1*の発現のみがSer46のリン酸化と一致することも見出した。*p53AIP1*蛋白質はミトコンドリアで働き、アポトーシスを誘導する。したがって、DNAの傷が深くて、G1停止やDNA修復が不可能になるとSer46キナーゼが活性化されて、p53のSer46がリン酸化され、*p53AIP1* 遺伝子のプロモーターへのアフィニティーが高まり、*p53AIP1* が発現して細胞はアポトーシスで死ぬと考えられる。

p53がいかにしてアポトーシスを誘導するかということは大きな謎であったが、p53上のある特定の部位のリン酸化がそれを制御するらしことを発見したことは大きな意義がある。p53の生理機能の重要な部分を解明したことになるし、今後Ser46キナーゼを同定できれば、癌細胞にのみアポトーシスを誘導させて死滅させる方法の開発などにも応用できることが期待できるからである。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. and Taya, Y. ; *p53AIP1*, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser46-phosphorylated p53. *Cell*, 102 : 849-862, 2000

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K. and Nevins, J.R. : Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & Dev.*, 14: 2501-2514, 2000.

Shieh, S-Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C. ; The human homologues of checkpoint kinases Chk 1 and Cds 1 (Chk 2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage inducible sites. *Genes & Dev.*, 14 : 289-300, 2000

Ashcroft, M., Taya, Y. and Vousden, K. H. ; Stress signal utilize multiple pathways to stabilize p53 : Involvement of MDM 2 expression, cytoplasmic localization of p53 and ARF independent nucleolar sequestration of MDM2.

Mol. Cell. Biol., 20: 3224-3233, 2000.

Sanchez-Prieto, R., Rojas, J. M., Taya, Y. and Gutkind, J. S. ; A role for the p38 MAPK pathway in the transcriptional activation of p53 upon genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, 60 : 2464-72, 2000.

Pandita, T., Lieberman, H., Lim, D.-S., Dhar, S., Zheng, W., Taya, Y. and Kastan, M. B.; Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene*, 19 ; 1386-1391, 2000.

Kapoor, M., Hamm, R., Yan, W., Taya, Y. and Lozano, G. ; Cooperative phosphorylation at multiple sites is required to activate p53 in response to UV radiation. *Oncogene*, 19 ; 358-364, 2000.

Xiao, g., Chicas, A., Olivier, M., Taya, Y., Tyagi, S., Kramer, F. and Bargonetti, J.: A DNA Damage Signal Is Required for p53 to Activate gadd45. *Cancer Res.*, 60 : 1711-1719, 2000.

Chan, DW, Son, SC, Block, W., Ye, R., Khanna, K.K., Wold, M.S., Douglas, P., Goodarzi, A.A., Pelley, J., Taya, Y., Lavin, M.F. and Lees-Miller, S.P. : Purification and characterization of ATM from human placenta. A manganese-dependent, wortmannin-sensitive serine/threonine protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 17 : 7803-7810, 2000.

Panigone S, Debernardi S, Taya Y, Fontanella E, Airoidi R, Delia D : pRb and cdk regulation by N(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Oncogene* , 19 : 4035-4041, 2000.

Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J-Y., Masui, O., Hirota, M., Yamaoka, S., Taya, Y. and Shimotohno, K. ; HTLV-1 Tax oncoprotein represses the p53- mediated transactivation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene*, 19 : 1491-1499, 2000.

Delia, D., Mizutani, S., Tagliabue, E., Fontanella, E., Asada, M., Yamada, T., Taya, Y., Prudente, S., Saviozzi, S., Frati, L., Pierotti, M. A. and Chessa, L. : ATM protein and p53-serine 15 phosphorylation in ataxia telangiectasia (AT) patients and at heterozygotes. *Br. J. Cancer*, 82 : 1938-1945, 2000

Nakaya, N., Lowe, S.W., Taya, Y. and Enikolopov, G. : Nitric oxide uses p53 to establish cell cycle arrest and induces a specific pattern of phosphorylation of p53. *Onocogene*, 19 : 6369-6375, 2000

Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Y, Imai K. : p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J*, 19: 6517-6526, 2000.

Kashiwagi, M., Ohba, M., Watanabe, H., Ishino, K., Kasahara, K., Sanai, Y., Taya, Y., and Kuroki, T. : PKC η associates with cyclin E/cdk 2 /p21 complex, phosphorylates p21 and inhibits cdk 2 kinase in keratinocytes.. *Oncogene*, 19: 6334-6341, 2000

Gottifredi, V., Shieh, S.-Y., Taya, Y. and Prives, C. : p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 1036-1041, 2001.