

「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 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 がアポトーシス誘導を制御することを昨年度の研究で見出していた。そこで、この Ser46 キナーゼの精製とマスペクトロメトリーなどを使った同定を進めた結果、p53Dinp1 とカゼインキナーゼ2を含む複合体であることがわかった。このメカニズムは人工的に癌細胞にのみアポトーシスを誘導して死滅させる新しい癌治療法の開発などに応用できるはずなので、今後はそれを目指したい。

また、p14ARF は Mdm2 に結合することによって p53 を活性化するというのが通説であったが、我々は p14ARF を発現させると p53 の Ser33 のリン酸化が誘導されて p53 の活性化が起きることを発見した。

さらに、Mdm2 に結合する新しい蛋白質を見つける目的で、Mdm2 と共沈殿する蛋白質をマスペクトロメトリーで解析した結果、コリプレッサーである KAP-1 や TFII-1 などを新たに同定した。一方、DNA ダメージを細胞に起こすと Mdm2 の Ser407 のリン酸化が誘導され、これが Mdm2 による p53 の分解を抑制するために重要であることがわかった。

## 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、Ser20 や Ser46 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>

1) p53 の Ser46 をリン酸化する酵素を精製・同定するために、アドリアマイシンで細胞を処理して

DNA にダメージを与え、その核抽出物を数段階のカラムクロマトグラフィーにかけて精製した。精製された酵素を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、バンドを質量分析機にかけて何者であるか同定した。

- 2) p14ARF を細胞内で発現させた後、p53 上のさまざまなリン酸化部位に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、p53 上のどの部位のリン酸化が誘導されたかを解析した。
- 3) Flag をつけた Mdm2 を細胞にトランスフェクトし、一緒に共沈殿してくる蛋白質をマスマスペクトロメトリーで解析した。
- 4) Mdm2 上の約 10 ヶ所の推定されるリン酸化部位を認識する抗体を作製し、細胞の DNA にダメージを与えた後の Mdm2 上のリン酸化部位を解析した。また、その部位の Ser や Thr を Asp や Ala に置換した変異体も作製して解析に用いた。

#### < 結論 >

- 1) 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昨年度の研究で見出していた。そこで、この Ser46 キナーゼの精製とマスマスペクトロメトリーなどを使った同定を進めた結果、p53Dinp1 とカゼインキナーゼ2を含む複合体であることがわかった。p53Dinp1 は東大医科研の中村祐輔のグループによって、p53 によって誘導されてくる蛋白質として最近発見されていたものである。p53 がいかん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いことを発見し、その Ser46 キナーゼを同定したことは大きな意義がある。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。
- 2) また、p14ARF は Mdm2 に結合することによって p53 を活性化するというのが通説であったが、我々は p14ARF を発現させると p53 の Ser33 のリン酸化が誘導されて p53 の活性化が起きることを発見した。このことも大きな意義がある。多くのヒトの癌で失活している重要な癌抑制蛋白質である p14ARF の作用メカニズムに関して、従来の通説を覆すことになるからである。
- 3) Mdm2 に結合する新しい蛋白質を見つける目的で、Mdm2 と共沈殿する蛋白質をマスマスペクトロメトリーで解析した結果、コリプレッサーである KAP-1 や TFII-1 などを新たに同定した。
- 4) DNA ダメージを細胞に起こすと Mdm2 の Ser407 のリン酸化が誘導され、これが Mdm2 による p53 の分解を抑制するために重要であることがわかった。この発見も大いに意義がある。このキナーゼを同定すべく、現在、解析を続けている。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 田矢グループ

田矢 洋一 国立がんセンター研究所放射線研究部 部長

- 1) アポトーシス誘導を制御する p53 の Ser46 キナーゼの精製と同定
- 2) Mdm2 上のリン酸化部位の解析
- 3) p14ARF によって誘導される p53 上のリン酸化部位の解析

(2) 玉井グループ

玉井 克之 サイクレックス 開発本部長

- 1) p53 のリン酸化およびアセチル化部位に特異的なポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製
- 2) p53 のアセチル化および脱アセチル化酵素の解析

4. 研究発表

(1) 論文発表

- Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C-C., Taya, Y.: Monden, M. and Nakamura, Y.: p53DINP1, a novel p53-inducible gene regulates p53-dependent apoptosis. *Molecular Cell*: 8, 85-94 (2001).
- Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., Derr, J., Taya, Y., Lowe, S.W., Kasatan, M. and Giaccia, A.: Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol. Cell. Biol.*: 21: 1297-1310, (2001).
- Yamashita, A., Ohnishi, T., Kashima, I., Taya, Y. and Ohno, S.: Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.*, 15: 2215-2228 (2001).
- Kishi, H. Nakagawa, K., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Taya, Y. and Yamaizumi, M.: Osmotic shock induces G1-arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J. Biol. Chem.*, 276: 39115-391122 (2001).
- Latonen L, Taya Y., Laiho M.: UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene* , 20: 6784-93 (2001)
- Takemura, M., Yamamoto, T., Kitagawa, M., Taya, Y., Akiyama, T., Asahara, H., Linn, S., Suzuki, S., Tamai, K., and Yoshida, S. : Stimulation of DNA polymerase alpha activity by cdk2-phosphorylated Rb protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 984-990 , (2001).
- Germano, D., Pacilio, C., Cancemi, M., Cicatiello, L., Altucci, L., Petrizzi, V.B., Sperandio, C., Salzano, S., Michalides, R.J.A.M., Taya, Y., Bresciani, F., and Weisz, A.: Inhibition of human breast cancer cell growth by blockade of the mevalonate-protein prenylation pathway is not prevented by overexpression of cyclin D1. *Breast Cancer Res. Treat.*, 67: 23-33 (2001).
- Damia, G, Filiberti, L, Vikhanskaya, F, Carrassa, L, Taya, Y., D'Incalci, M, Broggin, M. Cisplatin and Taxol Induce Different Patterns of p53 Phosphorylation. *Neoplasia*, 3: 10-16, (2001)

- Gottlieb, T.M., Leal, J.F.M., Seger, R., Taya, Y., and Oren, M. : Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* , 21: 1299-1303 (2002)
  - Hoffman, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H. and Scmitz, M.L.: Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain interacting protein kinase 2. *Nature Cell Biol.* 4, 1-10 (2002).
  - Okamoto, K., Li, H., Jensen, M., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, S. and Prives, C.: Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Molecular Cell.* 9, 761-771 (2002)
- (2) 特許出願  
国内特許 1 件