

「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はヒトの癌の約50%で変異による失活が見られる癌抑制遺伝子産物であり、細胞癌化のメカニズムの解明や癌治療法を考える上で最も重要な蛋白質と考えられている。p53はまた転写因子であり、さまざまなターゲット遺伝子の発現を誘導することによって、アポトーシスやG1停止などを引き起こすが、我々はアポトーシスを誘導して細胞を自殺に追い込むメカニズムの研究を主に続けている。

エンドサイトーシスに際して、膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られているクラスリンの重鎖が核内にも存在してp53と結合し、p53の転写活性化能に必須の働きをするという全く予想外のことを発見した。この発見はエンドサイトーシスとp53という全く別の研究領域をつなぐ新しい研究分野を開くと期待される。

一方、小胞体ストレスがp53依存性アポトーシスを阻害することを明らかにした。この阻害はグリコーゲン合成酵素3β (GSK-3β)でSer315とSer376がリン酸化されるとp53の細胞質における局在が増加することによって起きる。

また、p73はp53ファミリーであるが、そのThr86が細胞周期依存的にリン酸化されることを発見した。このリン酸化はS期に誘導され、G2/M期に最大となる。そして、このリン酸化はp21の発現を誘導するp73の能力を抑制することも見いだした。

#### 2. 研究実施内容

<田矢グループ>

##### 1) p53と結合してアポトーシス誘導能を高める蛋白質

我々は以前にp53のSer46のリン酸化がp53によるアポトーシス誘導能を制御することを示してきた。そこで、Ser46をさまざまなアミノ酸に置換した変異体p53を作製してp53依存性転写活性化能を測定していたところ、Pheに置換したものが、野生型よりもはるかに強い転写活性化能を有し、しかも細胞のアポトーシスも強く誘導するという予想外の結果を得た。さらに、S46F置換体p53に結合して共沈殿する蛋白質があるのではないかと考えて解析したところ、分子量約180KDの蛋白質が強く共沈殿することを見いだした。この蛋白質をマスマスペクトロメトリーで同定したら、全く予想外のクラスリン重鎖であった。ク

ラスリンは重鎖と軽鎖とが重合して細胞外からの物質の取り込みであるエンドサイトーシスに際して、膜小胞の構造形成に重要な役割を演じることが知られている。しかし、我々は重鎖のみが核内にも一部分存在して全く異なった機能をもつことを発見したわけである。このクラスリン重鎖のcDNAをp53と共に細胞にトランスフェクトすると、野生型p53でもp53依存性転写活性化能を促進するが、S46F置換体p53ではずっと強く転写活性化能が増強された。内在性のクラスリン重鎖が実際にp53と複合体を形成してこういう働きをしていることは、siRNAでクラスリン重鎖の発現を抑制するとp53依存性転写活性化能が抑制されること、及び、クラスリン重鎖の抗体でクロマチン免疫沈降を行うと、p53のターゲット遺伝子であるp53AIP1やNOXA、p21Waf1などのプロモーターが取れてくることで確認した。

2) 小胞体ストレスがp53依存性アポトーシスを阻害することを明らかにした。この阻害はグリコーゲン合成酵素3β (GSK-3β)でSer315とSer376がリン酸化されるとp53の細胞質における局在が増加することによって起きる。小胞体ストレスは核内におけるp53へのGSK-3βの結合を誘導し、p53の細胞質における局在を増強する。小胞体ストレスによって引き起こされたアポトーシス阻害はGSK-3βを必要とし、Ser315かSer376をAlaに置換した変異p53を発現する細胞では起きない。細胞質局在の増加の結果、小胞体ストレスはDNAダメージ後のp53の安定化とp53依存性アポトーシスを阻害する。p53の不活性化は小胞体ストレスに適応するために細胞が用いる防御機構であると結論された。

3) p73はp53ファミリーであり、発生プロセスとDNAダメージ応答に関与する。p73の発現は細胞周期で制御されていることが示されており、これはp73が細胞増殖に役割を演じ、サイクリン依存性キナーゼのターゲットかも知れないということを示唆する。この仮説に合致して、p73がさまざまなサイクリン (A、B、DとE) と物理的に相互作用することを見いだした。さらに、Cyclin A-Cdk1/2、Cyclin B-Cdk1/2やCyclin E-Cdk2がin vitroでp73の多くのアイソフォームのThr86をリン酸化することを見いだした。リン酸化されたThr86を特異的に認識する抗体を作製して解析すると、この部位はin vivoでも細胞周期依存的にリン酸化されることがわかった。このリン酸化はS期に誘導され、G2/M期に最大となる。そして、このリン酸化はp21の発現を誘導するp73の能力を抑制することも見いだした。

#### <玉井グループ>

研究の目的：p53は、M期の進行に重要であると考えられているPlk1によりリン酸化される可能性が示されている。我々はc-Junも同様にPlk1によりリン酸化を受ける可能性を見出した。c-Junはp53の細胞周期停止誘導や発癌抑制に対して抑制的に機能すると考えられている。一方、PlkファミリーであるPlk3は、Chk1、Chk2と同様にCdc25Cをリン酸化し細胞周期停止を誘導しPlk1と相反する機能を示すことが報告されている。細胞周期制御や染色体安定性の保持に関連していると考えられるこれらPlkファミリーがp53やc-Junを介して細胞周期の制御に関与している分子機構を明らかにする第一歩として、Plk1によるp53、c-Junのリン酸化部位の同定をおこない、その部位に対する抗体を用いて細胞内でのこれらリン酸化の解析をおこなう。

研究の経過： 大腸菌で発現・精製したPlk1とPlk3を用いて、in vitro においてp53をリン酸化することを確認した。同様にc-JunもPlk1によりリン酸化を受けることを確認した。

研究の成果： 従来から作製してきたp53上の各種リン酸化部位特異的抗体を用いて、Plk1のin vitro におけるp53のリン酸化部位の特定を試みた。その結果、Thr18残基がリン酸化部位であることが明らかになった。一方、c-Junは、各種truncate mutantsおよびAlanine mutantsを作製し、リン酸化部位を特定したところ、Thr8残基をリン酸化することを明らかにした。このリン酸化部位特異的抗体を作製した。

今後の見通し： p53をリン酸化してその機能を制御するPlkファミリーのPlk1とPlk3は相反する作用があると考えられている。すなわち、Plk1はp53の機能を抑制する一方、Plk3はSer20残基をリン酸化して、p53の機能を促進させることが示されている。今回、Plk1によるp53上のリン酸化部位を同定したことにより、リン酸化によるp53の機能を負に制御する機構を明らかにする道筋が整ったことになった。

### 3. 研究実施体制

#### < 田矢グループ >

研究分担グループ長： 田矢 洋一（国立がんセンター研究所放射線研究部 部長）

研究項目：

- 1) p53と結合してアポトーシス誘導能を高める蛋白質
- 2) p53のSer46のリン酸化とアポトーシスの関係の解析
- 3) 小胞体ストレスとp53
- 4) p73のリン酸化
- 5) Mdm2及びMdmxの機能解析

#### < 玉井グループ >

研究分担グループ長： 玉井克之（株）サイクレックス、社長）

研究項目：Plkファミリーによるp53のリン酸化による制御の解明

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文発表

- Gaiddon, C., Lokshin, M., Gross, I., Levasseur, D., Taya, Y., Loeffler, J.-P., and Prives, C.: Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at threonine 86 in a cell cycle dependent manner and negatively regulate p73. *J. Biol. Chem.*, 278: 20480-20489 (2003)
- Oguchi, K., Takagi, M., Tsuchida, R., Taya, Y., Ito, E., Isoyama, K., Ishii, E., Zannini, L., Delia, D. and Mizutani, S.: Missense mutation and

defective function of ATM in childhood acute leukemia patient with MLL gene arrangement. *Blood*, 101, 3622-3627 (2003)

- Huang, S, Qu, LK, Cuddihy, AR, Ragheb, R, Taya, Y and Kolomilas, AE:  
Protein kinase inhibitor 2-aminopurine overrides ,ultiple genotoxic induced cellular pathways to promote cell survival. *Oncogene*, 22, 3721-3733 (2003)
- Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y. and Okamoto, K. : Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in p53 activation. *Oncogene*, 22, 8870-8880 (2003)
- Takagi, M, Tsuchida, R, Oguchi, K, Shigeta, T, Nakada, S, Shimizu, K, Ohki, M, Delia, D, Chessa, L, Taya, Y, Nakanishi, M, Tsunematsu, Y, Bessho, F, Isoyama, K, Hayashi, Y, Kudo, K, Okamura, J, Mizutani, S. : Identification and characterization of poly,orphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgikin disease. *Blood*, 103, 283-290 (2004)
- Qu, L., Huang, S., Baltzis, D., Rivas-Estilla, A., Hatzoglou, M., Koumenis, C., Taya, Y., Yoshimura, A. and Koromilas, A.E. : Endoplasmic reticulum stress impairs the nuclear import of p53 and prevents p53-mediated apoptosis through the activation of the glycogen synthetase kinase 3  $\beta$  . *Genes Dev.*, 18, 261-277 (2004)
- Ohtani, S., Kagawa, S., Tango, Y., Umeoka, T., Tokunaga, N., Tsunemitsu, Y., Roth, J.A., Taya, Y., Tanaka, N. and Fujiwara, T. : *Mol. Cancer Ther.*, 93-100 (2004)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数 : 0件 (CREST研究期間累積件数 : 2件)