

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「p53によるゲノム防御機構」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

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）

主たる研究参加者 玉井 克之（株式会社サイクレックス 社長）

3. 研究内容及び成果：

p53 蛋白質は、高等生物のゲノム DNA を様々な外的要因から保護する重要な蛋白質である。特に、p53 の遺伝子の障害により、細胞の増殖、ひいては細胞の異常、発癌に至ることが様々な研究によって証明されていた。特に、DNAが障害を受けた際、p53 蛋白質が誘導、活性化され、細胞がアポトーシスか G1 停止かを選択することになるが、その詳細なメカニズムは不明な点が多かった。田矢グループは、p53 蛋白質のリン酸化がこれらの反応と極めて密接な関係を持つことを p53 蛋白質上の多くのリン酸化部位を特異的に認識する抗体をほぼすべて作成し、これを駆使することによって明らかにしようとした。特に、このリン酸化部位認識抗体を用いて p53 の N 末端側のリン酸化が p53 蛋白質を Mdm2 から解離させて安定化させるために重要であることを示したことは特記されよう。田矢グループは、研究成果をその後更に発展させ、p53 によるゲノムの構造の保護のメカニズムを分子レベルで詳細に解明を行った。更に、もう一つの代表的な癌抑制蛋白質である RB 蛋白質も同様にリン酸化によるその活性が制御されていることが分かっていたが、田矢グループは同じような手法を用い、RB 蛋白質のリン酸化の生物学的意義の解明もあわせて行った。以下に田矢グループの具体的研究成果を列記する。

(1) Ser46 のリン酸化は DNA の損傷の結果見られるが、田矢グループはまず p53 蛋白質の Ser46 がリン酸化されるとミトコンドリアのアポトーシス誘導蛋白質 (p53AIP1) の発現が誘導され、アポトーシスが惹起されることを示した。この DNA 損傷によるアポトーシスは、p53 の Ser46 のリン酸化により p53AIP1 遺伝子プロモーターへの親和性が高まり、p53AIP1 遺伝子が発現し、細胞はアポトーシスによって死に至ることが証明された。(2) Ser46 を様々なアミノ酸に置換した変異体 p53 蛋白質を作製し、p53 依存性転写活性化能を測定したところ、Phe に置換したものが強い転写活性を示し、アポトーシスを強く誘導することを見出し、この変異体 p53 蛋白質と結合する蛋白質を見出した。この蛋白質は予想外にクラスリン重鎖 (CHC) であることが判明した。クラスリンは、細胞のエンドサイトーシスにおいて膜小胞の構造形成に重要な役割を果たすことが従来知られていたが、p53 蛋白質と結合することはこの重鎖が核内にも存在し、エンドサイトーシスと異なった役割を果たしている可能性を強く示唆している。更に、田矢グループは内在性のクラスリン重鎖が実際 p53 複合体を形成して、p53 の転写活性に必須の働きをしていることを証明した。この p53 蛋白質とクラスリン重鎖の結合には、p53 の N 末端側の 3 つのドメインが関与していることが分かり、更に p53 蛋白質の N 末端側の 100 アミノ酸残基でも十分であることが分かった。また、クラスリン重鎖側の p53 蛋白質との結合領域を調べると C 末端側に結合し、この領域はクラスリン重鎖のクラスリン軽鎖との結合領域と一致する。このことは、クラスリン重鎖が一部分核内にも存在し、p53 蛋白質による転写活性とアポトーシスに必須の働きをするという興味深い結論を導くに至った。(3) 田矢グループはまた、Mdm2 および Mdmx という p53 蛋白質の分解に促進的に働き、p53 蛋白質の機能をネガティブに調節する蛋白質の機能解析を行った。更に、Mdm2 および Mdmx と細胞内に結合する蛋白質を同定し、少なくとも 20 以上の結合蛋白質を同定し、そのうちのいくつかの蛋白質について詳細な解析を行った。(4) RB 蛋白質のリン酸化についてもその生物学的意義を明らかにするための一連の実験を行った。RB 蛋白質は、2 段階のリン酸化を受けることが知られていたが、その生物学的意義は明らかでなかった。田矢グループは、RB 蛋白質のリン酸化部位のみを認識する抗体を作製し、それらを用いて RB 蛋白質の 2 段階に及ぶリン酸化の生物学的役割の解明を行った。

田矢グループに属する玉井グループは、TSA 感受性脱アセチル化酵素 HDAC ファミリーと NAD 依存性脱アセチル化酵素 Sir2 ファミリーの酵素活性を極めて選択的に高感度に検出する測定系

を開発し、脱アセチル化酵素の機能をより詳細に解析した。この測定系は、操作が極めて簡単であり、抗癌・抗生作用を持つことが知られている HDAC 阻害剤の開発や特異性の確認、SIRT1 の酵素活性の検出、また p53 の活性を上昇させる可能性のある新たな SIRT1 阻害物質および促進物質の探索への道を開いた。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

事後評価において、p53 蛋白質リン酸化特異抗体を用いて p53 蛋白質の機能について様々な知見を得たことについては評価された。特に、p53 蛋白質の部位特異的リン酸化がこの蛋白質の多様な機能において重要な役割を果たしていることを明らかにしたことは、評価者ほぼ全員が高く評価した。また、p53 結合蛋白質としてのクラスリン重鎖の発見もまだその生物学的な役割は明らかになっていないとは言え、極めて興味ある知見である。このように事後評価においては、田矢グループの研究は概して高い評価を受けたが、発表論文についてはその多くが p53 リン酸化特異抗体を他グループに供与した結果、論文に名を連ねた場合が多く、代表者がイニシアティブをとって研究を完成させたという論文は少ないとの意見もあった。確かに重要な抗体を広く研究者に配布して貢献する姿勢は評価できるが、できれば代表者が積極的に関与し、そのうちのいくつかの研究を独自に発展させるべきであったのではないとも言える。いずれにせよ、田矢グループの成果はこの分野の水準を越えた高いものであるという評価が評価者の大部分を占めた。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

田矢グループの p53 蛋白質のリン酸化部位に対応する抗体は、既に世界中の研究者において広く用いられ、その有用性が高く評価されている。田矢グループの最近の研究における重要な成果は、クラスリン重鎖が一部核内にも存在し、p53 による転写活性化能とアポトーシス誘導に必須の働きをする可能性を明らかにしたことである。田矢グループは、p53 とクラスリン重鎖を共結晶化させて X 線解析による研究を進めようとしている。この結果によって、クラスリン重鎖の p53 による転写活性化における役割が明らかになることが期待される。本研究の興味ある点は、エンドサイトーシスと p53 の機能という全く関係がないと思われていた 2 つの細胞内現象に接点があることを示唆しており、発癌においてクラスリン重鎖が何らかの役割を果たしている可能性もある。また、田矢グループにおける pRB の 2 段階のリン酸化の詳細なメカニズムの解析およびその生物学的意義の解明は癌抑制遺伝子としての pRB の役割について新たな視点から光を当てる可能性が強い。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

平成13年度 高松宮妃癌研究基金学術賞 田矢 洋一
「癌抑制 RB 蛋白質と p53 のリン酸化の意義の研究」