

「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はアポトーシスを誘導して細胞を自殺に追い込む能力も有するが、主にそのメカニズムの研究を続けている。今年度はp53と結合してp53の転写活性化能を大きく強める蛋白質を発見し、質量分析法にて同定したところ、エンドサイトーシスで重要な役割を果たすことの知られているクラスリン重鎖であった。核内では軽鎖とは結合せずに全く別の機能をもつことがわかった。

また、S期におけるDNA複製の停止に呼応してMdm2のSer407のリン酸化が起きること、そして、そのリン酸化がATMファミリーであるATRによって起きることを見いだした。さらに、そのリン酸化がMdm2によるp53の核外輸送を抑制し、p53の核内での蓄積を誘導することも見いだした。

さらに、Mdm2およびMdmxに結合する蛋白質を質量分析法にてそれぞれ20種類以上同定した。特に、Mdmxには14-3-3が結合することを見つけたが、RasからのシグナルによるMdmxのSer367のリン酸化によってその結合が促進され、そうするとp53の活性化が起きて増殖が抑制されることもわかった。

2. 研究実施内容

<田矢グループ>

1) p53のSer46のリン酸化とアポトーシス

以前の研究で、p53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の発現が起こり、アポトーシスが誘導されることを示したので、このSer46キナーゼの精製と同定を、カラムクロマトグラフィーや質量分析などによって進めた結果、p53によって誘導され、アポトーシス誘導能をもつ蛋白質p53DINP1を含み、カゼインキナーゼ2と他の蛋白質からなる複合体であることがわかった。

2) p53と結合してアポトーシス誘導能を高める蛋白質

p53のSer46をさまざまなアミノ酸に変えた変異体を作製して活性を測定していたところ、S46Fはp53AIP1のプロモーター活性を野生型よりもかなり高め、しかも、細胞に強くアポトーシスを誘導するという予想外の結果を得た。さらに、Flag-tagをつけたp53をトラン

スフェクトして共沈殿してくる蛋白質を解析したところ、S46Fの場合のみ、分子量17万の蛋白質が強く共沈殿することがわかった。この蛋白質はp53と結合してアポトーシス誘導能を高めるので、マスマスペクトロメロリーにかけて同定したところ、細胞質でエンドサイトーシス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であった。核内では軽鎖とは結合せずにp53と結合して全く別の役割を演じるらしい。

3) Mdm2及びMdmxの機能解析

Mdm2癌遺伝子蛋白質は、p53癌抑制因子に結合し、p53の最も重要な抑制因子として働くと考えられる。Mdm2によるp53抑制の制御機構を調べるため、Mdm2のリン酸化による修飾の解析、及びMdm2結合蛋白質の同定を進めている。また、そのファミリーとして最近見つかったMdmxについても同様な実験を進めた。

Flag-tagをつけたMdm2及びMdmxをトランスフェクトした細胞から共沈殿してくる蛋白質類をマスマスペクトロメトリーにかけて同定した。いずれの場合においても、20-30の結合蛋白質が同定されたが、それらの半数以上が未報告の蛋白質であった。そのうち重要と推測される幾つかの蛋白質について、解析を進めた。特に、Mdm2には転写のコリプレッサーであるKAP-1が、Mdmxには14-3-3が結合を制御し、しかもMdmxのSer367のリン酸化が14-3-3との結合を制御することも見つけた。さらに、そのリン酸化がRas癌遺伝子の発現により誘導される事を見いだした。Ras癌遺伝子は正常なマウス繊維芽細胞にトランスフェクトすると、細胞をトランスフォームせずに老化させるという有名な事実があるが、このMdmxのSer367のリン酸化はそのメカニズムの本質を担うものと思われる。

4) ATRキナーゼによるMdm2のリン酸化

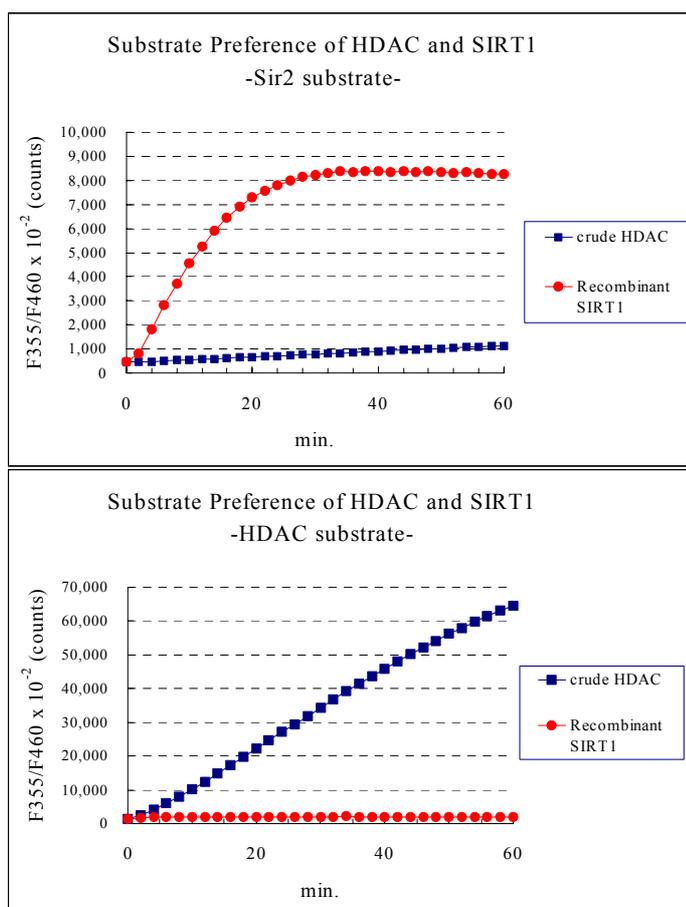
細胞のDNAがダメージを受けるとMdm2のSer407がATMのファミリーであるATRキナーゼでリン酸化されることを見いだした。さらに、このリン酸化の生理的意義を研究した結果、このリン酸化の結果、Mdm2はp53を核から細胞質へ放出する能力が弱まり、p53が核内に留まって活性化されるらしいことがわかった。

<玉井グループ>

p53は、TrichostatinA感受性脱アセチル化酵素HDACファミリーとTrichostatinA抵抗性かつNAD依存性脱アセチル化酵素Sir2ファミリーにより脱アセチル化されることが報告されている。脱アセチル化酵素によるp53の機能調節機構についてはまだ不明な部分が少なくない。我々は、アセチル化によるp53の機能制御の解明を目指して、両脱アセチル化酵素活性を区別することができる測定系の開発をおこなった。それぞれの酵素の基質となり得るアセチル化ペプチド配列を検討し、蛍光/消光基付加アセチル化ペプチドを合成した。合成した基質ペプチドとそれぞれの酵素を組み合わせ反応させた。脱アセチル化酵素活性は、リジルエンドペプチダーゼがアセチル化リジン残基を分解できない原理を利用し、ペプチド分解による蛍光量の変化として検出した。構築された両活性測定系を用いて、極めて選択的に各々の脱アセチル化酵素活性を検出することが可能であった(図1)。

これらの測定系を用いることにより、今までより容易に脱アセチル化酵素を詳細に解析することが可能となったのに加え、抗癌・抗生作用を持つことが知られているHDAC阻害

剤の開発や選択性・特異性の確認、Sir2/hSIRT1のキネティック解析や阻害物質探索に有用であると考えられる。また、hSIRT1については、内在性の酵素に関する生化学的研究をおこなった報告はなく、細胞内での動態も不明である。現在、これらの測定系を用いて細胞粗精製分画中におけるhSIRT1活性の分離して追跡することを進めている。



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のSer46のリン酸化とアポトーシスの関係の解析
- 2) p53と結合してアポトーシス誘導能を高める蛋白質
- 3) Mdm2及びMdmxの機能解析
- 4) ATRキナーゼによるMdm2のリン酸化

< 玉井グループ >

① 研究分担グループ長：玉井克之（（株）サイクレックス、社長）

② 研究項目：脱アセチル化・脱アセチル化によるp53の機能調節機構の解析

- ・アセチル化p53特異抗体の開発
- ・種々のHATsのクローニングおよびrecombinant HATsタンパク質の発現・精製
- ・種々のHDACsのクローニングおよびrecombinant HDACsタンパク質の発現・精製
- ・種々のp53 mutantsの作製
- ・細胞内におけるp53のアセチル化の検出
- ・種々の薬剤処理によるp53のアセチル化の検出

・HDACおよびSIRT1アッセイ系構築

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

- 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)
- 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).
- Goldberg, Z., Sionov, R.V., Berger, M., Zwang, Y., Van Etten, R.A., Oren, M., Taya, Y. and Haupt, Y.: Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J.*, 21, 3715-3727 (2002).
- Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, Nakamura K, Nakamura Y, Arakawa H.: p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res.*, 62, 2883-2889 (2002).
- 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)
- Oren, M., Damalas, A., Gottlieb, T., Michael, D., Taplick, J., Leal, J.F., Maya, R., Moas, M., Seger, R., Taya, Y. and Ben-Ze'Ev, A.: Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 973: 374-383 (2002)
- 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)

（2）特許出願

1件