国立がんセンター研究所
放射線研究部　部長

田矢　洋一

「 p53によるゲノム防御機構 」

研究期間：平成１１年１１月１日～平成１６年１０月３１日

1.　研究実施の概要

(1)　研究の背景と目的

p53 が高等生物のゲノムを保護する守護神の役割を持った非常に重要な蛋白質らしいことは多くの研究者による多方面からの研究で示されてきた。例えば、 p53 が失活すると遺伝子増幅などの遺伝子異常が起き易くなるし、また、ガンマ線、紫外線や抗癌剤など、DNA に傷害を与えるようなさまざまなものを細胞に処理すると、p53 が誘導されてきて活性な状態になり、細胞の増殖を G１期に一時的に停止させておいて、その間に DNA 傷害を直すための蛋白質類を動員するような指令を出す。 DNA 傷害がひど過ぎる場合にはアポトーシスを誘導して細胞を殺すように働く。したがって、 DNA が傷害を受けた際に p53 を誘導・活性化させるシグナル伝達のメカニズムや、p53 がアポトーシスか G１停止かを選択するメカニズムを解明することは、ゲノムの構造と機能を理解する上で大変に重要である。

研究代表者である田矢は、これらの p53 の生理活性の制御が p53 のリン酸化によってなされていると 1996 年に予想し、p53 上の多数のリン酸化部位を特異的に認識する抗体をほとんどすべて作製し、これらを用いて、1997 年には DNA 傷害によって誘導される p53 の N 末端側のリン酸化が、 p53 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初めて示した。続いて、1998 年に、癌にもなり易い遺伝病 Ataxia telangiectasia の原因遺伝子の蛋白質であり、かつ、 DNA 傷害の情報を p53 に伝える経路で重要な役割を演じると推定されていた ATM 蛋白質が、プロテインキナーゼの活性を有し、かつ、p53 の Ser15 を直接にリン酸化することを共同研究で初めて示した。

こういう経緯から、この研究を拡大して発展させれば p53 によるゲノム防御の機構を分子レベルでかなり具体的に解明できるであろうと考えるに至った。

一方、もう一つの代表的な癌抑制蛋白質である RB 蛋白質も多くの癌で失活が見られ、かつ、この蛋白質はリン酸化で活性を調節されている。しかも、この RB 蛋白質を中心とする径路（RB 径路）は p53 径路とつながっていて、チェックポイントコントロール、アポトーシスや細胞癌化において、深く関連している。そこで、RB 蛋白質リン酸化意義の解明も目標にした。

（2）研究成果

p53のSer46がリン酸化されるとミトコンドリアに局在してアポトーシスを誘導する蛋白質 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。この部位は細胞のDNAが深く傷ついてアポトースが誘導される時期に一致してリン酸化が誘導される。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、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 のリン酸化と一致した。それゆえ次のようなモデルを考えている。 放射線などでDNAに傷がついた時、先ずSer15やSer20のリン酸化が起きてp53は安定化・活性化され、 $p21^{Waf1}$ のようなG1停止関係の遺伝子のプロモーターに結合してそれらの発現を誘導する。しかし、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親和性が高まり、 p53AIP1 が発現して細胞はアポトーシスで死ぬ。

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出した。この蛋白質をマス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持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 p53 の転写活性化能に必須の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、$p21^{Waf1}$ などのプロモーターが取れてくることで確認した。さらには、p53もクラスリン軽鎖もクラスリン重鎖のC末端側に結合し、結合領域は一部分オーバーラップしていることがわかった。そこで、p53とクラスリン軽鎖がクラスリン重鎖への結合で競合するのではないかと考えて実験を進めた結果その通りの結果が得られた。従って、クラスリン重鎖が一部分、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能に必須の働きをするという誰も予想していなかった結論となった。

Mdm2及びMdmxはp53の分解促進に働き、p53の機能をネガティブに調節する最も重要な因子と考えられている。Mdm2及びMdmxを過剰発現したCOS1細胞中から免疫沈降法によりMdm2及びMdmxと共沈殿する蛋白質類をSDS-PAGEゲルにより分離後、マススペクトロメトリーにより同定した。Mdm2及びMdmxのいずれの場合においても、20-30の結合蛋白が同定されたが、それらの半数以上が未報告の蛋白質であった。これらの結合蛋白質のうち、Mdm2及びMdmxの癌遺伝子蛋白質としての働きに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 が結合することを見つけたし、さらに、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 遺伝子の発現により誘導されることを見出した。ras 遺伝子は NIH3T3 のような immortalize した細胞はトランスフォームするが、MEF のような immortalize していない正常細胞には p53 依存性の細胞老化を誘導することが知られているが、そのメカニズムは不明であった。そこで MEF を用いて細胞老化との関係を調べた結果、Ser367 を Ala に置換した Mdmx を発現させると ras による p53 依存性の細胞老化誘導が阻害されて細胞増殖が続くことがわかった。従って、Mdmx の Ser367 のリン酸化は ras による p53 依存性の細胞老化誘導の本質をなす反応と考えられる。

一方、癌抑制 RB 蛋白質上には約 13 カ所のリン酸化部位があり、Cdk4-Cyclin D1 か Cdk2-Cyclin E でリン酸化される。我々はこれらのリン酸化部位を別々に認識する抗体をほぼすべて作製して利用することにより、どの部位がどのキナーゼでリン酸化されるかを明らかにした。さらに、Cdk4-Cyclin D1 特異的な部位は E2F との解離に、Cdk2-Cyclin E 特異的な部位はクロマチンリモデリング蛋白質 Brg-1 やヒストンデアセチラーゼをリクルートする RBP-1 などの LXCXE モチーフを持つ RB 結合蛋白質類の解離に使われることを明らかにした。

また、細胞内での p53 のアセチル化の動態を調べる目的で、アセチル化 p53 に対する特異抗体を作製した。解析の結果、既知の脱アセチル化酵素阻害剤以外に種々の薬剤処理によっても、p53 のアセチル化が亢進することを見出した。そして、In vitro において GCN5 と PCAF が Lys373 を、CBP が Lys382 をアセチル化することを示した。

さらに、Trichostatin A 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た。今回開発した測定系を用いることにより、今までより詳細に脱アセチル化酵素を解析することが可能となったのに加え、操作が簡便な homogenous 測定系なので、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、SIRT1 のキネッティクス解析や p53 の活性を上昇させる可能性のある新たな SIRT1 阻害物質、および促進物質探索に有用であると考えられる。

２．研究構想

本研究を開始した時、我々は p53 上に多数存在するリン酸化部位やアセチル化部位を特異的に認識する抗体をほぼ作製して持っていて、それらを用いた p53 の生理機能の研究ですでに世界をリードしている状態にあった。そして、重要な問題でありながら不明であった、p53 がいかにして G1 停止とアポトーシス誘導という異なった経路を選択するのかという問題もこれらの抗体を用いて解明できるのではないかと思い、研究を進めた。その結果、Ser46 のリン酸化が p53 によるアポトーシス誘導と深く関係するらしいというデータを得た。

ちょうど同じ頃、東大医科研の中村祐輔教授の研究室で新しくクローニングされ、p53 によって誘導されてアポトーシスを誘導するミトコンドリア蛋白質 p53AIP1 の発現がいつも $p21^{Waf1}$ などの発現に比べて遅れることがわかり、我々の Ser46 のリン酸化が ser15 や Ser20 のリン酸化よりも遅れるというデータと似ていたので、共同研究を始めることになった。

この共同研究は非常にうまく進み、DNA に傷がついた時、先ず Ser15 や Ser20 のリン酸化が起きて p53 は安定化・活性化され、 $p21^{Waf1}$ のような G1 停止関係の遺伝子のプロモーターに結合してそれらの発現を誘導する。しかし、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親和性が高まり、 p53AIP1 が発現して細胞はアポトーシスで死ぬという結論に至った。

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出した。この蛋白質をマス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。この研究をさらに進め、クラスリン重鎖が一部分、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能に必須の働きをするという全く誰も予想していなかった新発見に至ったわけである。

リン酸化部位特異的な抗体の作製は、1990 年頃から、田矢が有機化学者に協力してもらって、リン酸化ペプチドの化学合成法の改良から進めてきたものであったが、玉井グループの抗体作製と精製の豊富な経験があったので良い抗体を作製することができた。我々の論文を見て、世界中のメーカーが p53 や RB 蛋白質のリン酸化部位特異的な抗体を売り出しているが、それらは質の良くないものが多く、今でも我々の抗体を使わせてくれるようにとのリクエストが多い。

３．研究成果

本研究で対象とした p53 と RB 蛋白質とは図 1 のような関係にあると考えられてきた。これは G1/S 移行期を示している。

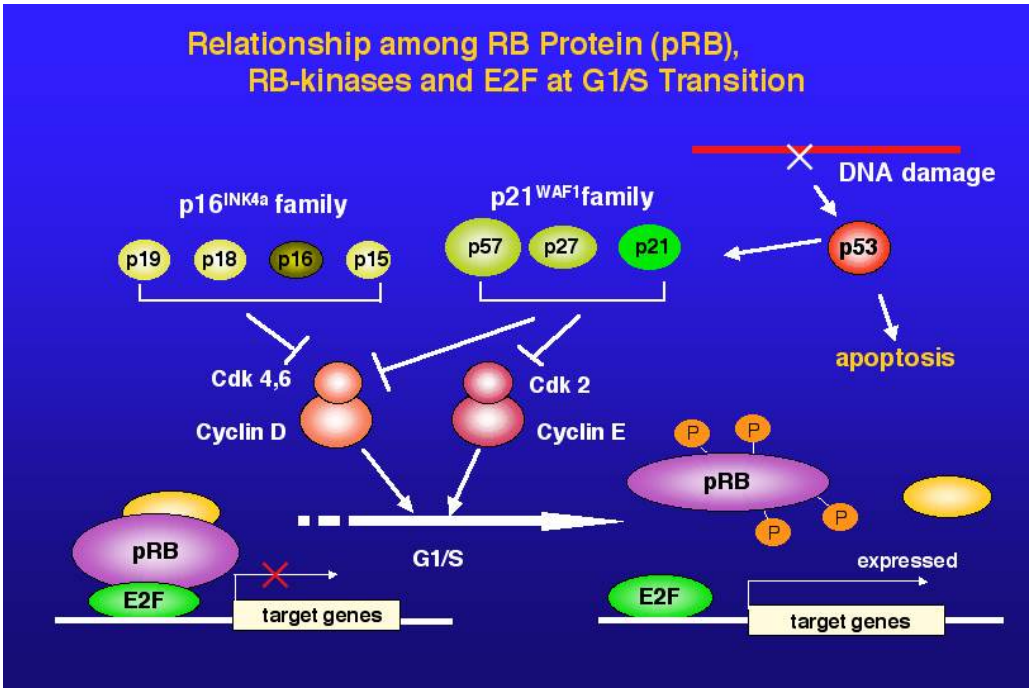


図１　G1/S 移行期における p53 と RB 蛋白質との関係
G1 期においては RB 蛋白質（pRB）は転写因子 E2F の活性を抑制することによって S 期への進行を抑えている。しかし、G1 期の後期に pRB はサイクリン依存性キナーゼによる 2 段階のリン酸化を受けて E2F から解離すると E2F は増殖に必要な DNA ポリメラーゼαなどの遺伝子の発現を誘導する。一方、p53 は Cdk インヒビターである $p21^{Waf1}$ を誘導して pRB のリン酸化を阻害することによって G1 期に停止させたり、アポトーシスを誘導したりする。

p53 は転写因子であり、図 2 のようにいくつかのドメインを持ち、in vivo で約 13 ヶ所のリン酸化部位と少なくとも３ヶ所のアセチル化部位が見つかっているが、我々はほとんどすべてのリン酸化部位とアセチル化部位を特異的に認識する抗体を用いて以下の研究を進めた。

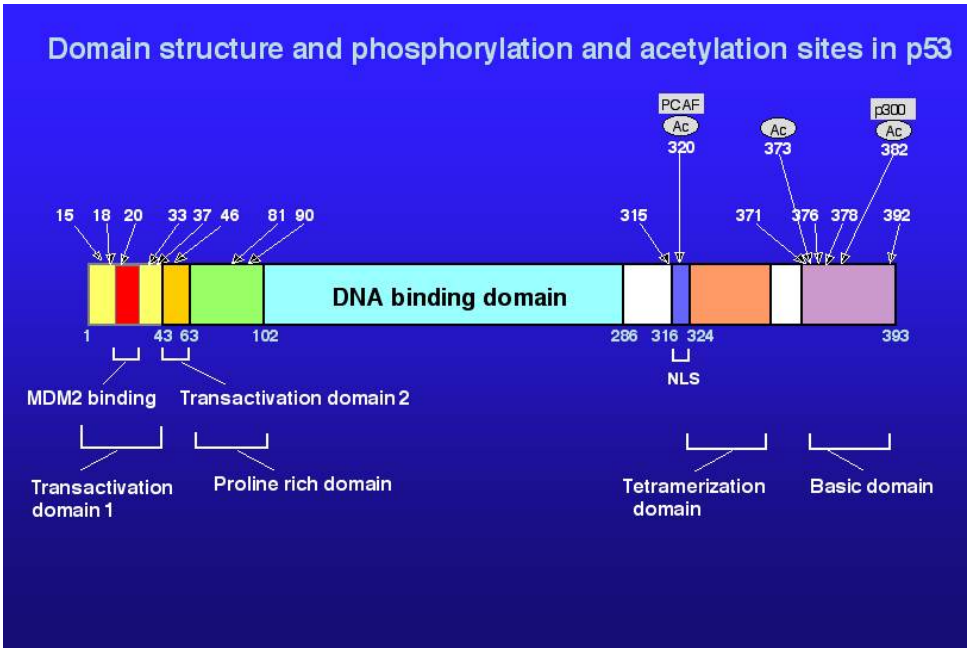


図２ p53 のドメイン構造とリン酸化、アセチル化部位
リン酸化はほとんどが Ser 残基である。

そして、本研究を始める以前に、DNA ダメージによって誘導される p53 の Ser15 のリン酸化が p53 の安定化・活性化に重要であり、しかも、生理機能のわかっていなかった Ataxia telangiectasia の原因蛋白質 ATM が DNA ダメージ後に p53 の Ser15 のリン酸化を行うことまで見出していた（図 3)。

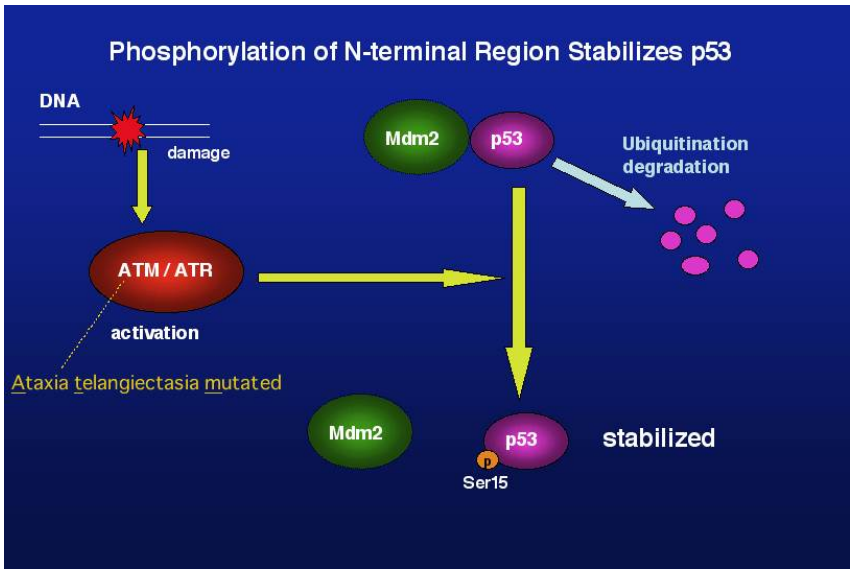


図３ p53 の Ser15 のリン酸化が p53 の安定化・活性化に重要

３．１　p53 と RB 蛋白質の生理機能の解析（田矢グループ）

(1)研究内容及び成果

1)　p53 の Ser46 のリン酸化とアポトーシス

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。この部位は細胞の DNA が深く傷ついてアポトースが誘導される時期に一致してリン酸化が誘導される。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、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 のリン酸化と一致した。それゆえ図 4 のようなモデルを考えている。 DNA に傷がついた時、先ず Ser15 や Ser20 のリン酸化が起きて p53 は安定化・活性化され、 $p21^{Waf1}$ のような G1 停止関係の遺伝子のプロモーターに結合してそれらの発現を誘導する。しかし、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親和性が高まり、 p53AIP1 が発現して細胞はアポトーシスで死ぬ。

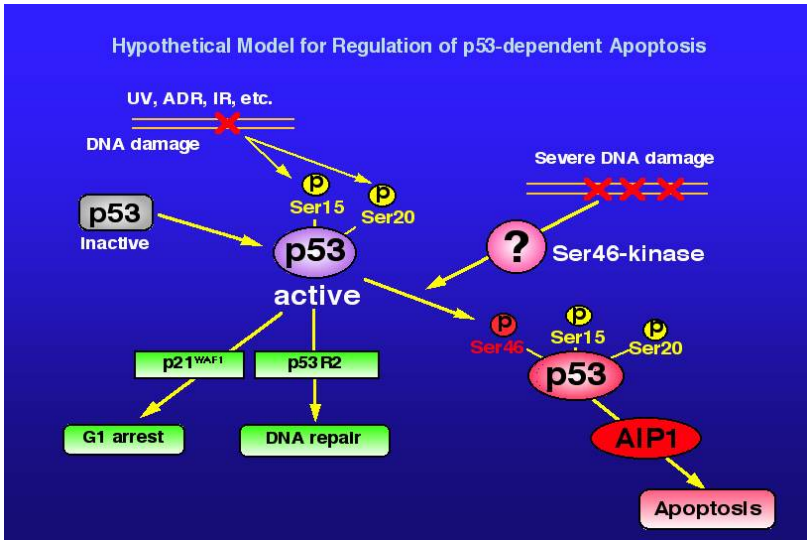


図４

2)　p53 と結合してアポトーシス誘導能を高める蛋白質

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出した。この蛋白質をマス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（CHC）であった（図 5)。

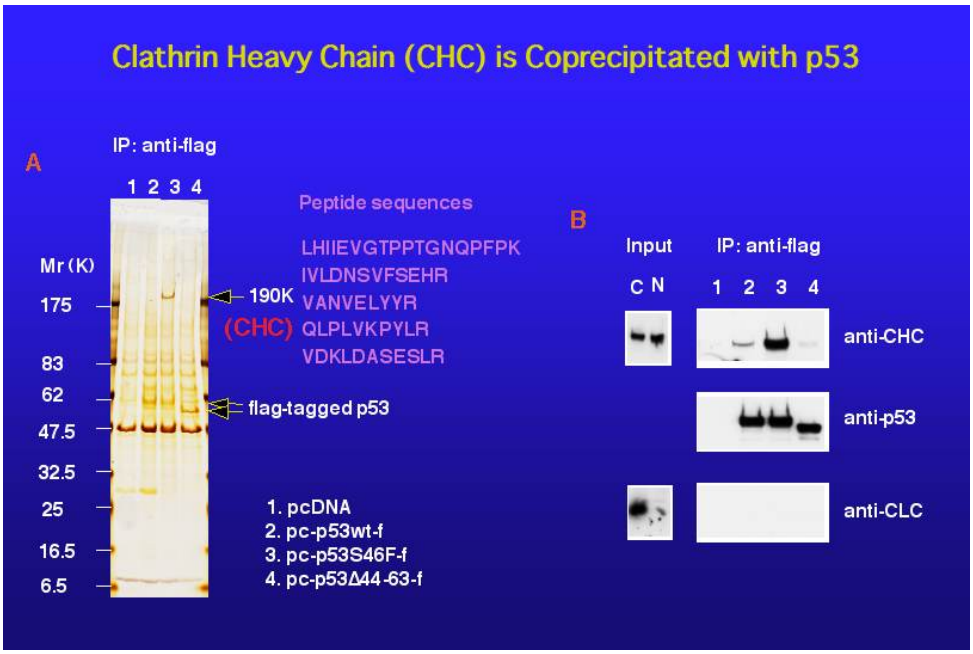


図５

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約 5%存在して（図 6）全く異なった機能をも持つことを発見したわけである。

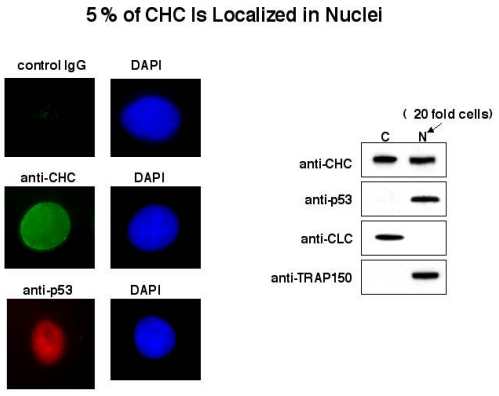


図６　約 5%のクラスリン重鎖は核内にも存在する

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 p53 の転写活性化能に必須の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（図 7）、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、$p21^{Waf1}$ などのプロモーターが取れてくることで確認した（図 8）。

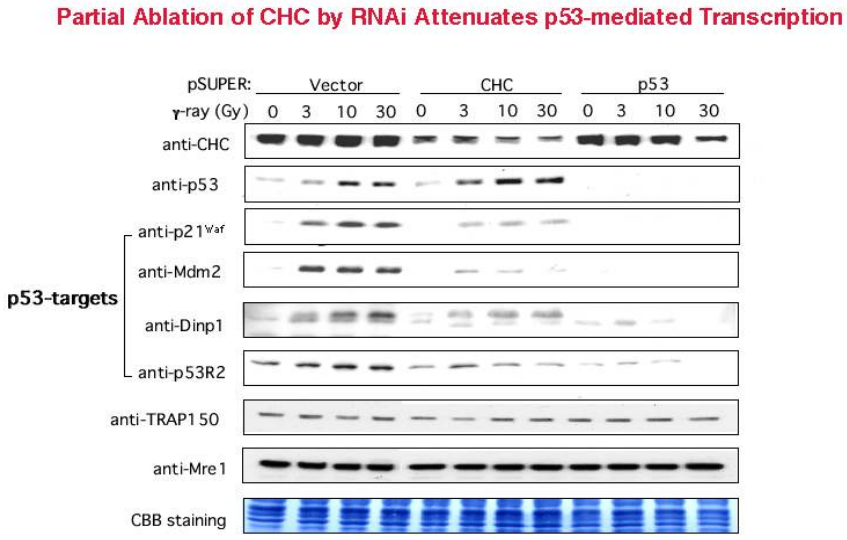


図 7　siRNA でクラスリン重鎖の発現を抑制すると p53 依存性転写活性化能が抑制される

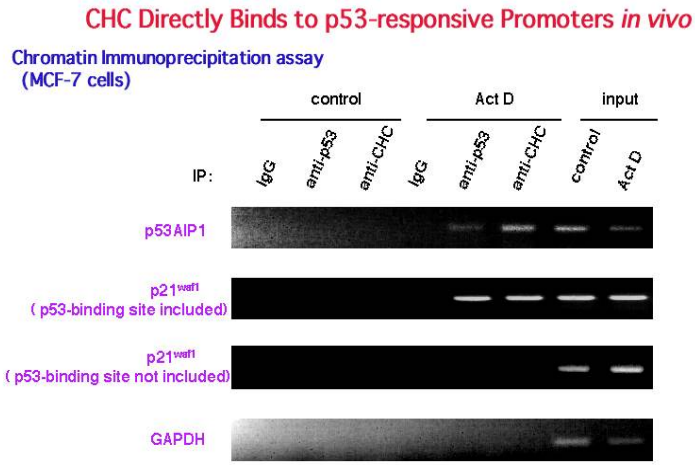


図 8　クラスリン重鎖の抗体でクロマチン免疫沈降を行うと、p53 のターゲット遺伝子がとれてくる

お互いの結合領域を解析した結果、p53 の N 末端側の３つのドメインがクラスリン重鎖との結合に必要であることがわかった（図 9）。さらには、p53 の N 末端側の 100 アミノ酸残基だけで結合に十分であることもわかった（図 10）。

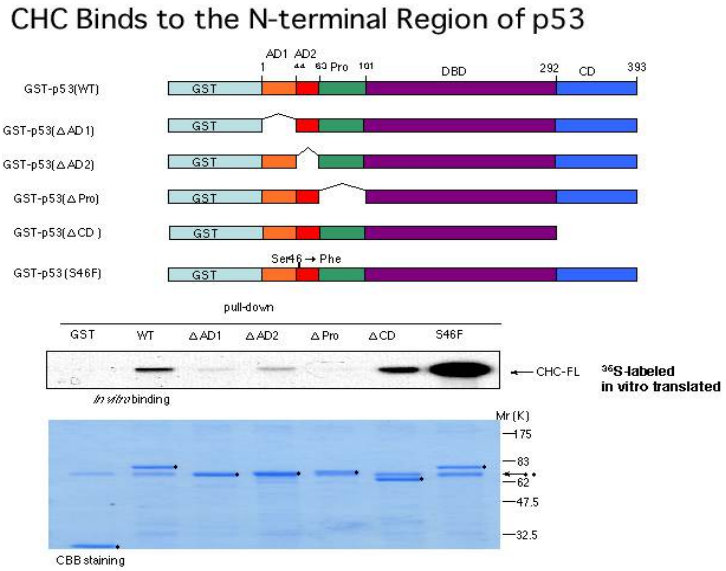


図９

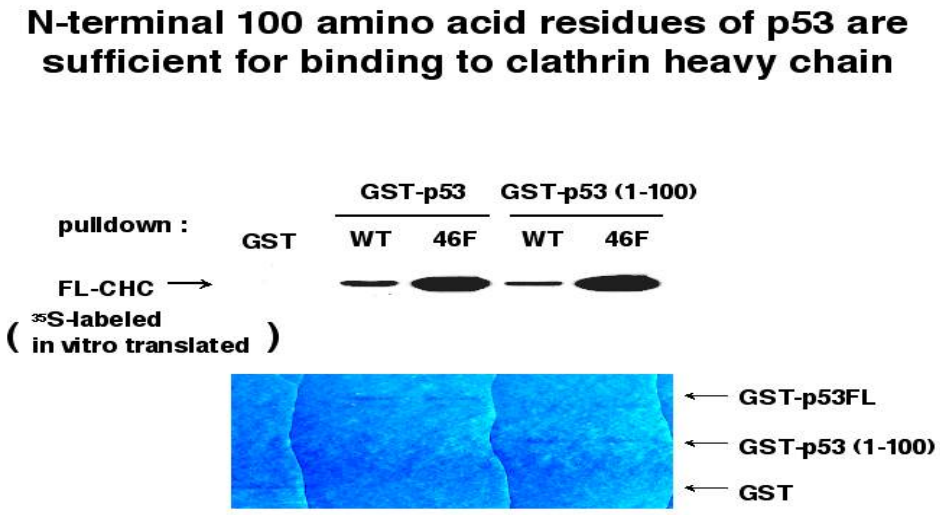


図 10

逆に、クラスリン重鎖のさまざまな欠失変異体を in vitro translation で ^{35}S-Met ラベルしておき、GST との融合蛋白質にした p53 やクラスリン軽鎖との結合を調べた結果、図 11 のように、p53 もクラスリン軽鎖もクラスリン重鎖の C 末端側に結合し、結合領域は一部分オーバーラップしていることがわかった。そこで、p53 とクラスリン軽鎖がクラスリン重鎖への結合で競合するのではないかと考えて実験を進めた結果その通りの結果が得られた。

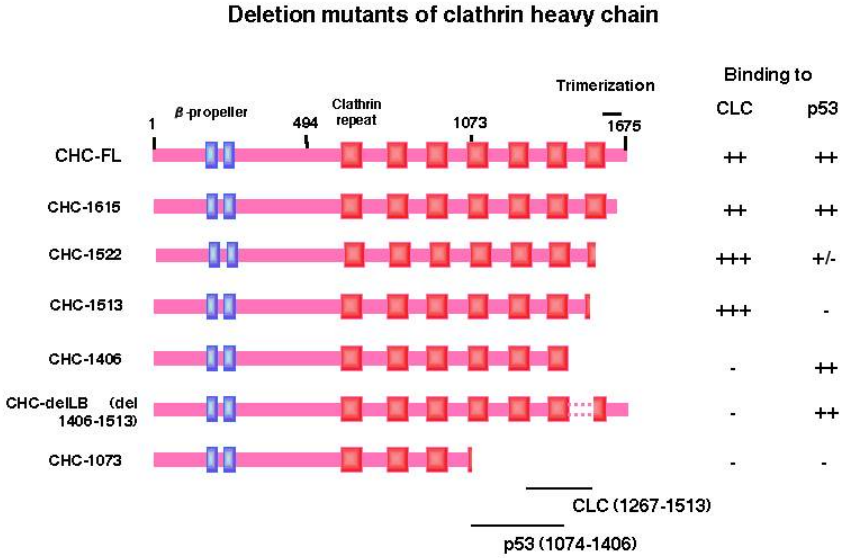


図11　p53もクラスリン軽鎖もクラスリン重鎖のC末端側に結合し、結合領域は一部分オーバーラップ

従って、クラスリン重鎖が一部分、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能に必須の働きをするという誰も予想していなかった結論となった（図 12)。（論文投稿中）

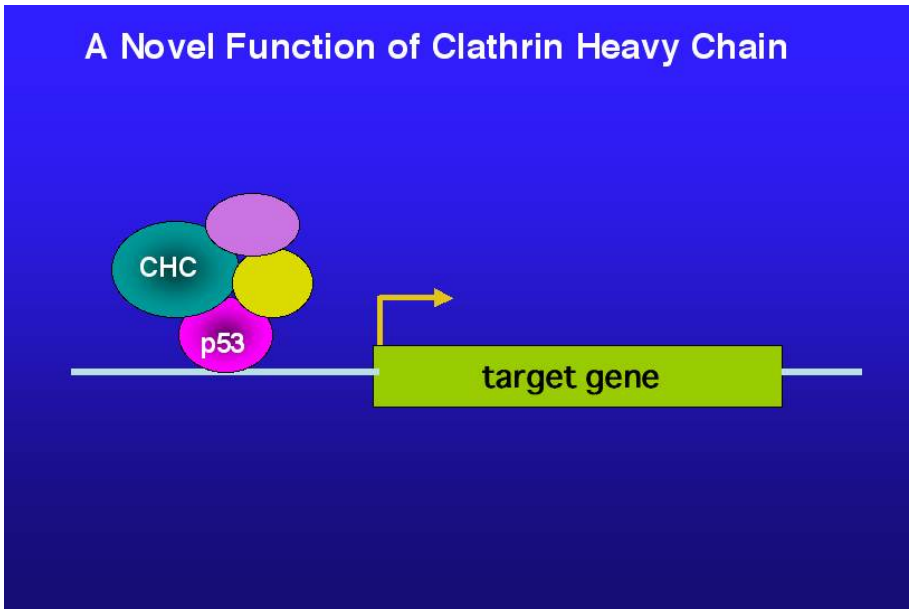


図 12

3）Mdm2 及び Mdmx の機能解析

Mdm2 及び Mdmx は p53 の分解促進に働き、p53 の機能をネガティブに調節する最も重要な因子と考えられている。

Mdm2 及び Mdmx を過剰発現した COS1 細胞中から免疫沈降法により Mdm2 及び Mdmx と共沈殿する蛋白質類を SDS　PAGE ゲルにより分離後、マススペクトロメトリーにより同定した。Mdm2 及び Mdmx のいずれの場合においても、20-30 の結合蛋白が同定されたが、それらの半数以上が未報告の蛋白質であった。これらの結合蛋白質のうち、Mdm2 及び Mdmx の癌遺伝子蛋白質としての働きに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 が結合することを見つけた（図 13)。

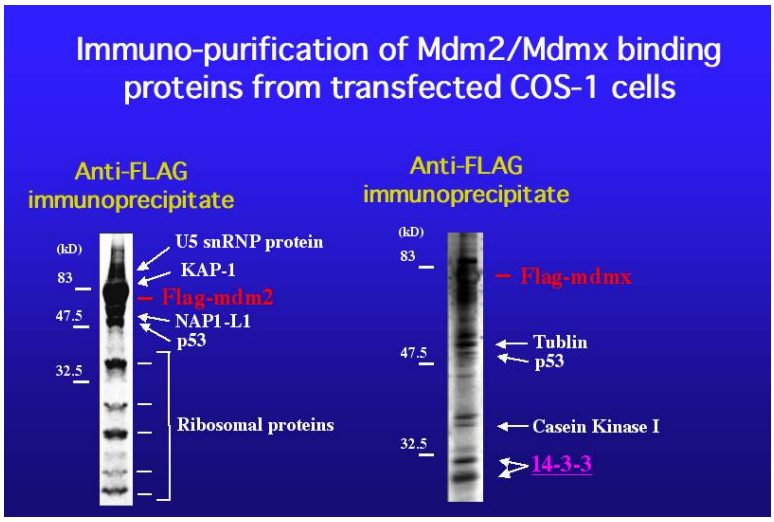


図 13

14-3-3 蛋白質は蛋白質のある特定のリン酸化された配列の所に結合することが知られているので、そういう配列が Mdmx 上にあるか否か調べたら、Ser367 の周辺がまさにそういう配列であった。そこで Ser367 を Ala に置換した変異体を作製し、一方ではリン酸化された Ser367 の周辺を特異的に認識する抗体を作製して解析を進めた結果、確かにここがリン酸化されることがわかった。さらに、さまざまな癌遺伝子などをトランスフェクトしてみると、ras 癌遺伝子によって特異的にこのリン酸化が誘導されることがわかった。

ras 遺伝子は NIH3T3 のような immortalize した細胞はトランスフォームするが、MEF のような immortalize していない正常細胞には p53 依存性の細胞老化を誘導する。しかし、そのメカニズムは不明であった。そこで MEF を用いて細胞老化との関係を調べた結果、Ser367 を Ala に置換した Mdmx を発現させると ras による p53 依存性の細胞老化誘導が阻害されて細胞増殖が続くことがわかった（図 14)。

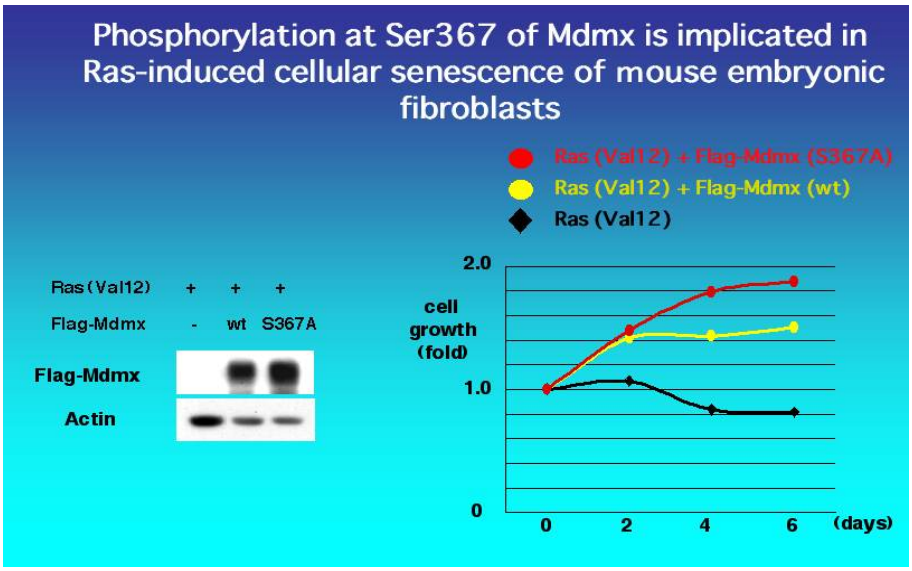


図 14

従って、Mdmx の Ser367 のリン酸化は ras による p53 依存性の細胞老化誘導の本質をなす反応と考えられる（図 15)。(論文作成中)

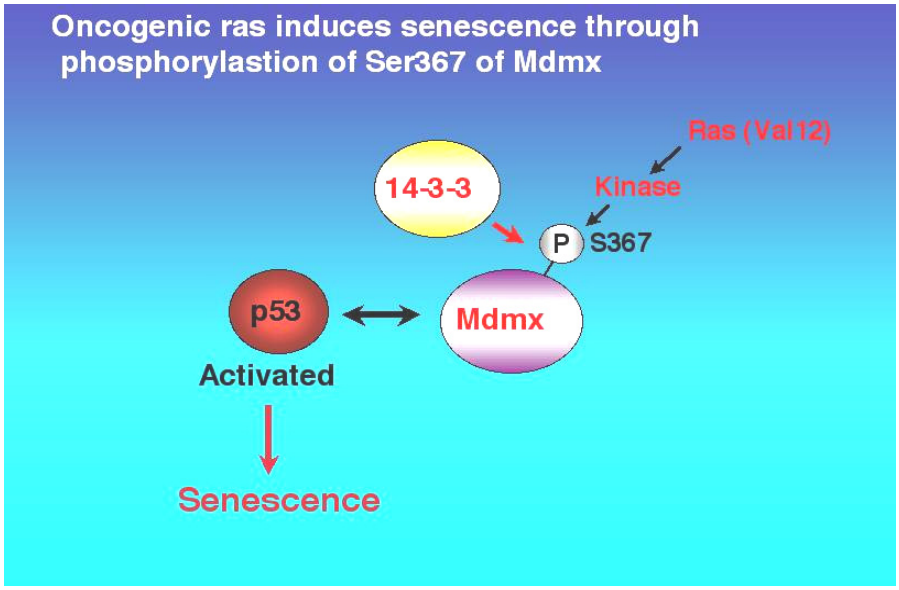


図 15　ras 癌遺伝子による Mdmx の ser367 リン酸化誘導は
p53 による細胞老化を誘導する

4)　RB 蛋白質(pRB)上のリン酸化部位の使い分けの意義

図 1 で示したように、pRB は G1/S 移行期に先ずサイクリンＤ１-Cdk4 でリン酸化を受け、続いてサイクリン E-Cdk2 でリン酸化される。しかし、なぜ 2 段階のリン酸化を受けるのか不明であった。我々は特定のリン酸化部位のみを認識する抗体を多数作製して、それらを用いて、RB 蛋白質上にはサイクリンＤ１-Cdk4 あるいはサイクリン E-Cdk2 特異的なリン酸

化部位があることを示した（図 16)。

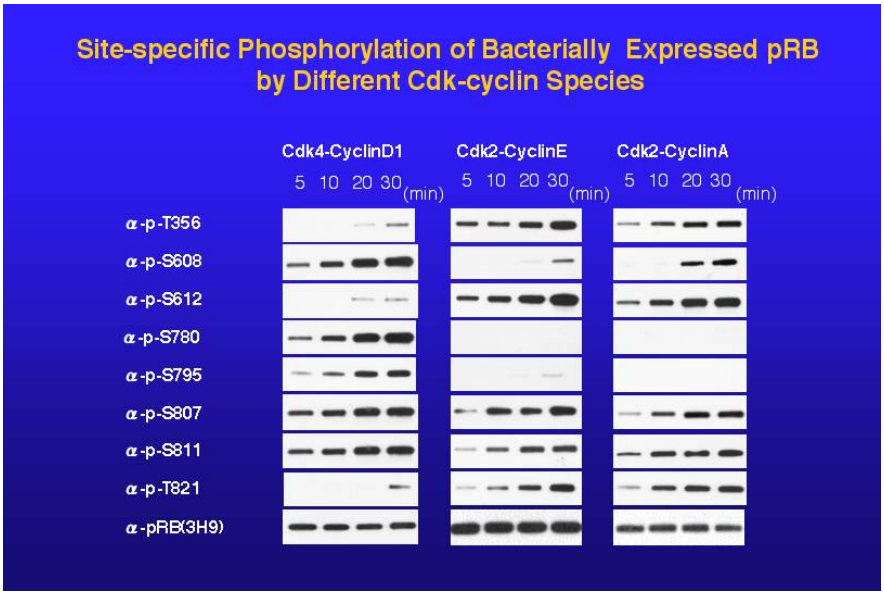


図 16

さらに、pRB の 2 段階のリン酸化の意味を考え、E2F-1 との解離には主に Cdk4-cyclin D1 特異的な部位のリン酸化が、逆に、ヒストンンデアセチラーゼをリクルートしてくる RBP1 やクロマチンリモデリング蛋白質 Brg1 など LXCXE というモチーフを持つ蛋白質類との解離には Cdk2-cyclin E 特異的な部位のリン酸化が使われるのではないかという仮説を立てた（図 17)。

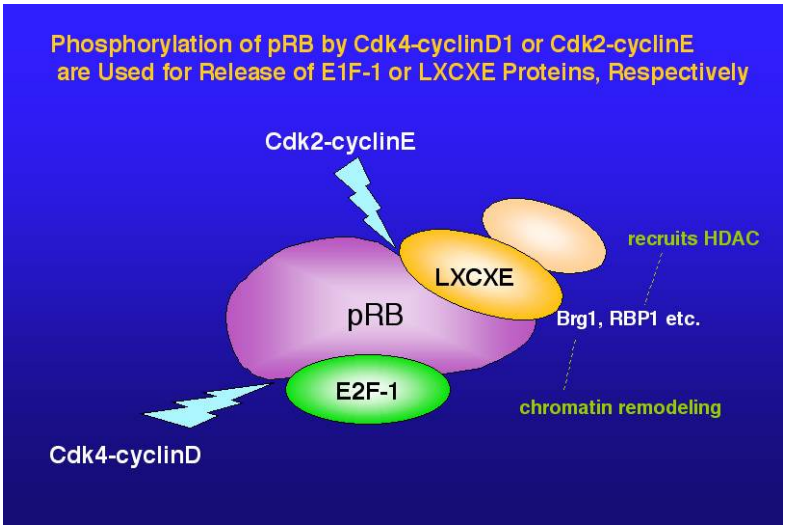


図 17

そして、これらの抗体をもちいてこの仮説を試す実験を行ったところ、まさにその通りの結果が得られた（図 18　投稿中)。

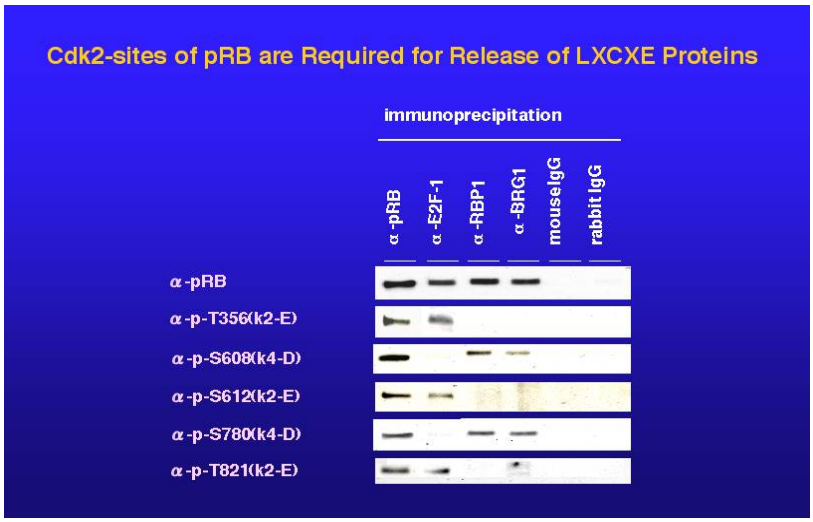


図 18

(2)研究成果の今後期待される効果

クラスリン重鎖が一部分、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能に必須の働きをするという誰も予想していなかった新発見である。その後の研究で、核内のクラスリン重鎖には p300 ヒストンアセチラーゼやある核マトリックス蛋白質が結合することも見つけつつある。一方では、p53 とクラスリン重鎖を共結晶化させて X 線解析にかける実験を進めようとしている。これらの結果が出れば、クラスリン重鎖が p53 による転写活性化でどのような役割を演じているのかがわかるであろう。また、これは、エンドサイトーシスと p53 という、これまで全く無関係と思われていた２つのものをつなぐ全く新しい研究分野を開くかも知れない。クラスリンそのものは癌での変異が見つかっていないが、エンドサイトーシスに際してクラスリン重鎖と結合する何種類かの蛋白質では最近、は癌での変異が見つかっている。このことも p53 との関係が深い生理的意味のあることであることの示唆ではないかと思わせる。

Mdmx の Ser367 のリン酸化は ras による p53 依存性の細胞老化誘導の本質をなす反応と考えられるが、この研究も、今後、細胞老化と癌化の関係を解き明かすために貢献できるであろう。

以前は Cdk2-Cyclin E は細胞増殖に必須であるというのが常識であったが、最近、Cdk2 や Cyclin E のノックアウトマウスが世界中で作製されて必須でないことがわかった。Cdk4-cyclin D の方が細胞増殖には重要らしい。pRB の 2 段階のリン酸化において、E2F-1 との解離には主に Cdk4-cyclin D1 特異的な部位のリン酸化が、逆に、ヒストンンデアセチラーゼをリクルートしてくる RBP1 やクロマチンリモデリング蛋白質 Brg1 など LXCXE というモチーフを持つ蛋白質類との解離には Cdk2-cyclin E 特異的な部位のリン酸化が使われるという我々の結果は、Cdk2-Cyclin E が細胞増殖に必須でないという結果と一致すると考えられる。我々の作製した pRB 上のリン酸化部位特異的な抗体も、それぞれの部位の生理的意義の解明に今後も役立つことが期待できる。

３．２　p53 のアセチル化及び脱アセチル化の分子機構の解析および Plk ファミリーによる機能制御機構の解析（玉井グループ）

(1)研究内容及び成果

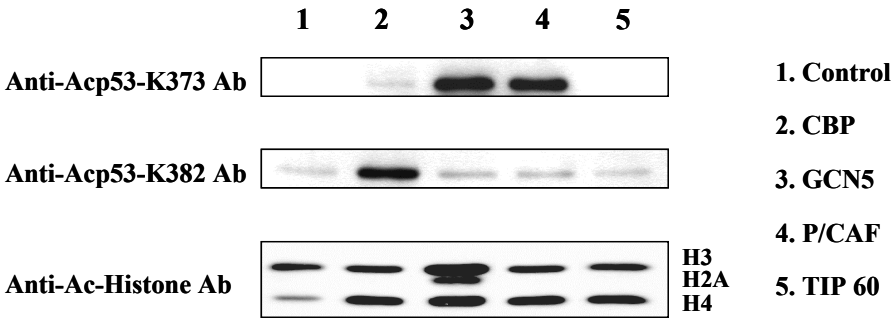
p53 アセチル化の動態

近年、p53 の機能解析が進むにつれ、N 末端領域や C 末端領域により p53 の機能が調節されていることが明らかになってきた。これらの領域ではがん細胞において変異の頻度は低いにもかかわらず、複数のタンパク質が結合することによって、p53 は量的、質的に制御されていることが判明している。また、これらの領域において、複数のセリン/スレオニン残基のリン酸化が p53 の機能調節に重要な役割を果たしていると考えられている。Taya Y をはじめとする複数のグループは、細胞内での p53 のリン酸化の状態を正確に且つ簡便に把握する手段として、リン酸化部位特異的抗体を用い、各部位のリン酸化が p53 の活性におよぼす影響や p53 結合タンパク質との会合に与える作用を明らかにしている(1)。また、新たな p53 の修飾として、アセチル化が 1997 年に Roeder のグループにより報告された(2)。この C 末端領域のアセチル化は p53 の配列特異的 DNA 結合活性を上昇させるという。このように、今まで知られていた以上に複雑な p53 の機能調節機構の存在が明らかになってきている。

1996 年、CBP/p300 がコアクチベイターとして初めてヒストンアセチル基転移酵素(HAT)活性を持つことが明らかにされた(3, 4)。さらに、CBP/p300 は他のコアクチベイターである P/CAF や SRC-1 と直接結合しており、これらの分子は CBP/p300 と同様 HAT 活性を持つことが相次いで明らかにされた。このことは複数の異なる HAT を含む巨大な転写複合体が形成されることにより、初めてヌクレオソーム構造を持つ真核生物おいて効率的な転写が可能になることを示唆している。一方、転写因子 p53 の N 末端領域に CBP/p300 が結合することにより、その転写活性能が増強されることが報告されていた(5, 6)。しかし、その CBP/p300 の HAT 活性はヒストンだけに向けられたものではなく、p53 をもアセチル化し、その転写活性を直接、正に調節している可能性が報告されたのである。Gu らは、CBP/p300 が p53 の C 末端領域のアミノ酸 373 番目と 382 番目のリジン残基をアセチル化し、p53 の特異的 DNA 配列への結合能がおよそ 10～20 倍増強することを示した(2)。この部位のアセチル化はリン酸化と同様、C 末端領域がコアドメインに分子内結合した latent な状態を解除することで作用するの可能性が考えられる。

我々は現在知られているいくつかの HAT 活性を持つタンパク質のどれが p53 をアセチル化できるのかを検討した。まず大腸菌で発現させた GCN5、CBP、P/CAF 、TIP60 が GST-p53Cter (a.a.284-393)をアセチル化できるか否かを [3H]-Acetyl CoA を用いた方法とアセチル化部位特異的抗体(Ac-K373、Ac-K382 抗体)を用いた方法で調べた。その結果、CBP だけでなく、GCN5、P/CAF にも p53 アセチル基転移酵素 (p53AcT) 活性があることが明らかになった。CBP は Lys382 を確かにアセチル化するが、Lys373 のアセチル化の程度は非常に低かった。対照的に、GCN5、P/CAF は Lys373 のみを特異的にアセチル化した（図 1、２）。

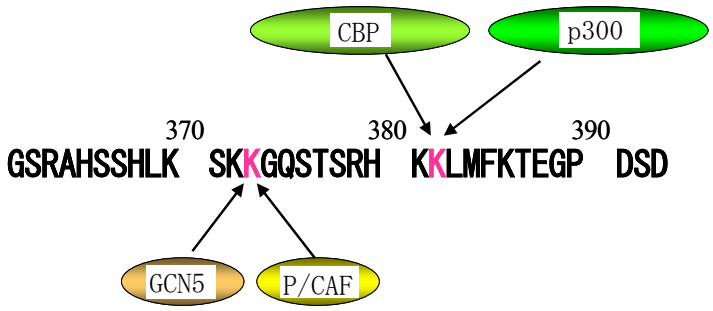
図１　p53 can be acetylated by several recombinant HATs *in vitro*
: Detected by Immunoblotting with
anti-p53 acetylation site specific antibodies



GST-p53C-ter (248-393a.a.) and GST-Histone Acetyltransferases (HAT) , CBP, GCN5, P/CAF and TIP 60, were expressed in E.coli and purified by GSH-column. Each of HAT was incubated with GST-p53C-ter (248-393a.a.) and Histone. Acetylation on GST-p53C-ter (248-393a.a.) was detected with anti-Acp53-K373 and -K382 specific antibodies. Acetylation of histone was also detected with anti-AcHistone specific antibody.

GCN5 と P/CAF の HAT 領域の相同性は高く、GCN5 型 HAT ファミリーを形成している。しかし、GCN5 型 HAT ファミリーと CBP/p300 との間には強い相同性は認められない。また、CBP/p300 と GCN5、P/CAF どちらの HAT 領域とも相同性が低い TIP60 では、HAT 活性があるにもかかわらず、p53AcT 活性は検出されなかった。以上のことから、少なくとも CBP/p300 と GCN5、P/CAF の２つの基質特異性が異なるファミリーが p53AcT として働いている可能性があると考えている。

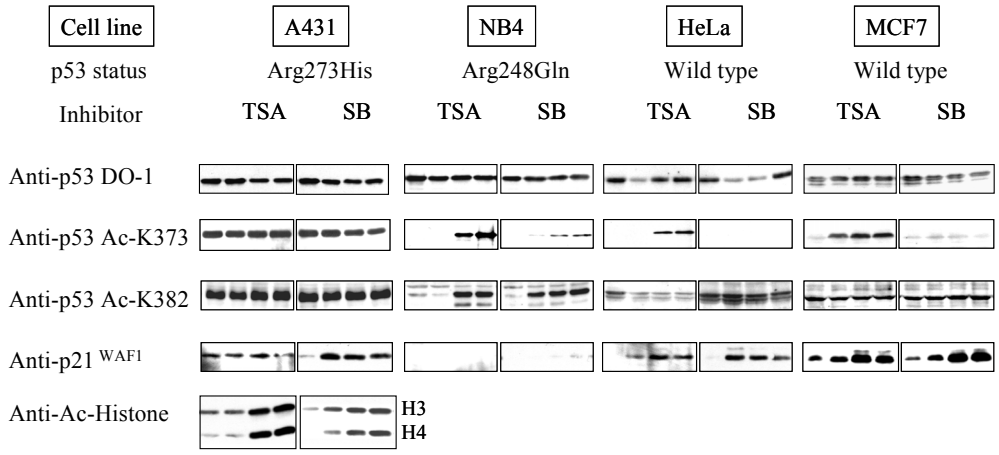
図２　　p53 C-terminus acetylation sites



次に、我々は細胞内における p53 のアセチル化の検討を行った（図３）。p53 の status の異なる複数のがん細胞株をヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤である、トリコスタチン A（TSA)、酪酸(Sodium Butyrate：S.B.)で処理し、Lys373 アセチル化、Lys382 アセチル化の誘導と変化を調べた。Lys373 アセチル化の誘導は、NB4 細胞、HeLa 細胞、MCF7 細胞において、それら薬剤の濃度依存的に認められた。しかし、TSA でのアセチル化の誘導は、これら３種の細胞で認められたのに対して、S.B.での誘導は NB4 細胞でしかみられなかった。また、Lys382 アセチル化の誘導は NB4 細胞だけで認められ、他の３つの細胞ではその変化は確認されなかった。

以上のことから、p53 のアセチル化の程度と部位は使用する細胞株や薬剤により異なり、複雑な制御がなされていることが示唆されたと同時に、確実に in vivo においても p53 のアセチル化が確実におこっていることが明らかとなった。また、HDAC の阻害剤 TSA によって p53 のアセチル化が誘導されることから、細胞内には TSA 感受性の“p53 脱アセチル化酵素（p53DAC)”が存在していると考えられる。

図３　Induction of p53 acetylation in several cell lines by treatment of HDAC inhibitors



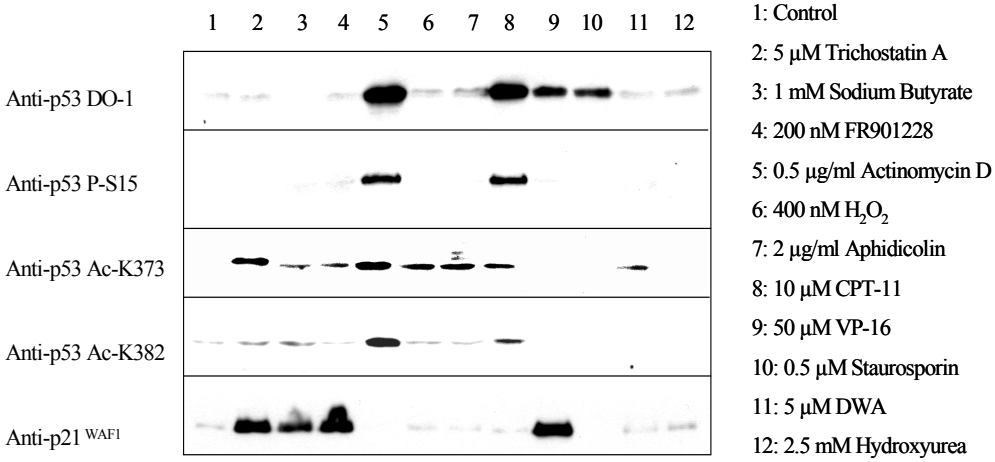
TSA: Trichostatin A

SB: Sodium Butyrate

一方、A431 細胞では、Lys373、Lys382 の両方が構成的に高アセチル化状態にある。このアセチル化は高濃度の TSA、S.B.によっても全く影響を受けない。しかしながら、A431 細胞は TSA、S.B.両方によって、他の細胞で見られるのと全く同じ濃度で、正常にヒストンのアセチル化が誘導されている。つまり、A431 細胞では HDAC は全く正常に発現、機能しているが、p53DAC は、その活性が低いか、発現していないと考えることができる。また、このことは、細胞内に、HDAC とは明らかに異なる p53DAC が存在する可能性を示している。しかし、A431 細胞の p53 は変異型であり、このことがアセチル化に何らかの影響を与え、脱アセチル化が異常になっている可能性もあるので、注意深い検討が必要であろう。

野生型 p53 を持つ MCF7 細胞を種々の薬剤で処理しアセチル化の誘導を調べたところ、いくつかの薬剤によってアセチル化が誘導されることが明らかになった（図４）。p53 の N 末端に対する抗体である DO-1 のイムノブロット結果より、アクチノマイシン D と CPT-11 が p53 のタンパク量を著しく増加させることがわかった。この時、平行して Ser15 の著しいリン酸化が検出された。同様に Lys382 のアセチル化が観察された。このことから、Lys382 のアセチル化は Ser15 のリン酸化と同じく、p53 の安定化に関連しているのではないかと考えている。今回の実験条件では CPT-11 処理により p53 の量的増加が認められているにもかかわらず、下流遺伝子である p21 の誘導が見られなかった。このことは Ser15 のリン酸化を伴う p53 のタンパク量の増加と、転写因子としての活性化とは異なる次元で調節されていることを示唆している。今後、Ser15 以外のリン酸化と Lys382 のアセチル化誘導の経時的な変化を含め、さらに詳細な検討を進める必要がある。

図４　Acetylation and phosphorylation of p53 in MCF7 induced by treatment of various drugs



一方、Lys373 のアセチル化は、アクチノマイシン D や CPT-11 だけでなく、p53 の量的変化や Ser15 のリン酸化がみられない薬剤においても検出され、Lys382 と比較して、広く誘導されるようである。各部位のアセチル化が機能的にどのような意味があるのか、どのような機構でアセチル化され、脱アセチル化されるのか、など解明しなければならない課題は多い。

まとめ

我々は細胞内での p53 のアセチル化の動態を調べる目的で、アセチル化 p53 に対する特異抗体を作製した。解析の結果、既知の脱アセチル化酵素阻害剤以外に種々の薬剤処理によっても、p53 のアセチル化が亢進することを見出した。In vitro において GCN5 と PCAF が Lys373 を、CBP が Lys382 をアセチル化することを示した。

p53 脱アセチル化酵素

癌抑制遺伝子産物 p53 の転写活性化能はリン酸化と協調的にアセチル化されることで、より上昇すると考えられている。p53 アセチル化酵素として p300/CBP、p/CAF が同定され、C 末端側数カ所のリジン残基がアセチル化されることが示され(5, 6)、反対に p53 は、Trichostatin A 感受性脱アセチル化酵素 class I 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SIRT1 が in vivo および in vitro において p53 と結合し、脱アセチル化することが報告されている(7, 8)。この SIRT1 による脱アセチル化の結果、p53 の転写活性を抑制し、ストレス時の細胞の生存を促すと考えている。しかしながら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。今回、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。酵素として、HeLa 細胞より得た HDAC 画分と酵母 Sir2 のヒトオーソローグである SIRT1 の組み換え酵素を使用した。それらの酵素については、それぞれ Trichostatin A 感受性（図８）や NAD 依存性（図９）を持つことを確認した。それぞれ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検定用酵素を組み合わせて反応させた。脱アセチル化酵素活性は、リジルエンドペプチダーセ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。原理を図５、６に示す。構築し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７）。この結果は、脱アセチル化酵素においても Sir2 ファミリーSirtuin と class I HDAC とは基質嗜好性がかなり異なることを示唆している。

図５

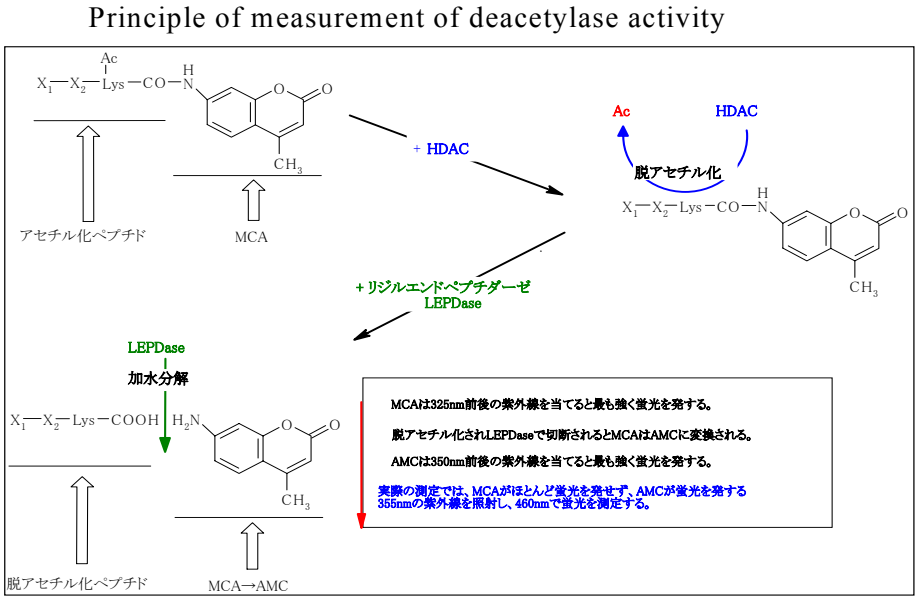


図６

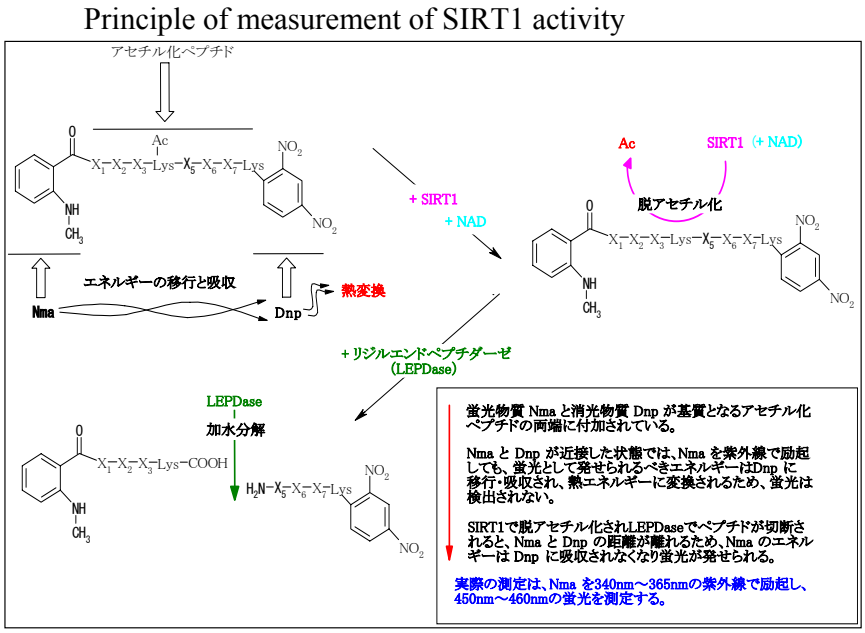
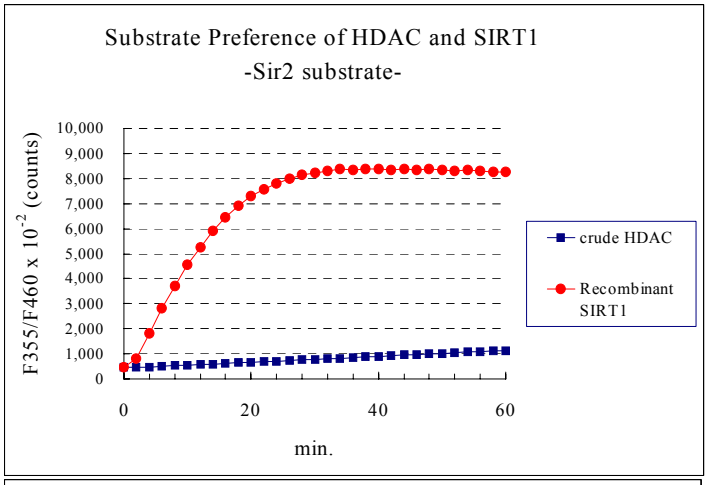

Principle of measurement of SIRT1 activity
アセチル化ペプチド
Ac
NO2
NH
CH3
+ SIRT1
+ NAD
Ac
SIRT1 (+ NAD)
脱アセチル化
エネルギーの移行と吸収
Nma
Dnp
熱変換
+ リジルエンドペプチダーゼ
(LEPDase)
LEPDase
加水分解
蛍光物質 Nma と消光物質 Dnp が基質となるアセチル化ペプチドの両端に付加されている。
Nma と Dnp が近接した状態では、Nma を紫外線で励起しても、蛍光として発せられるべきエネルギーはDnp に移行・吸収され、熱エネルギーに変換されるため、蛍光は検出されない。
SIRT1で脱アセチル化されLEPDaseでペプチドが切断されると、Nma と Dnp の距離が離れるため、Nma のエネルギーは Dnp に吸収されなくなり蛍光が発せられる。
実際の測定は、Nma を340nm～365nmの紫外線で励起し、450nm～460nmの蛍光を測定する。

図７


Substrate Preference of HDAC and SIRT1
-Sir2 substrate-
F355/F460 x 10-2 (counts)
10,000
9,000
8,000
7,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
0
20
40
60
min.
crude HDAC
Recombinant SIRT1

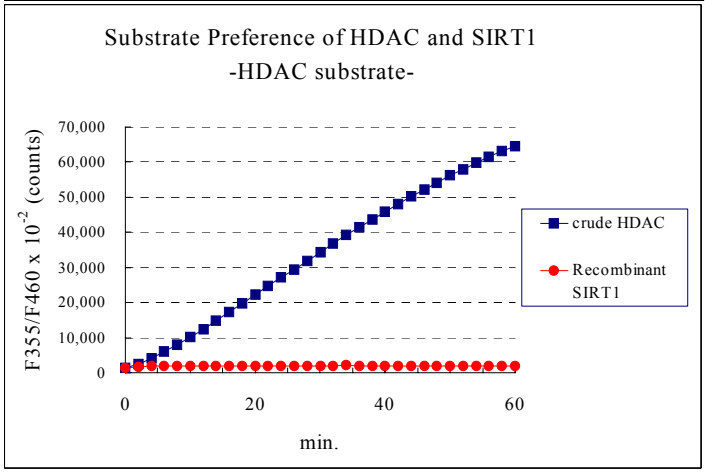
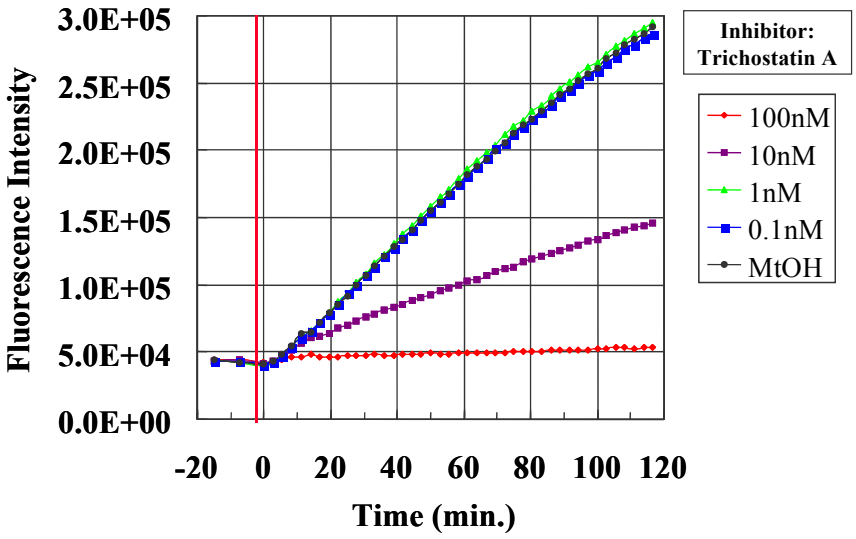

Substrate Preference of HDAC and SIRT1
-HDAC substrate-
F355/F460 x 10-2 (counts)
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0
20
40
60
min.
crude HDAC
Recombinant SIRT1

図８　**Measuring HDAC Activity by Fluorometric Assay**



SIRT1 の脱アセチル化酵素活性測定系の基本的な性能の試験をおこなった。図９ B に NAD 依存性を示す。NAD への Km は 44.4 μM であった。Trichostatin A には耐性であり、1 μM の高濃度を添加しても阻害されなかった（図９ A）。SIRT1 の阻害剤であると報告されている Sirtinol および splitomicin の影響を検討したところ、Sirtinol は用量依存的に SIRT1 活性を阻害したが、splitomicin は高濃度において、SIRT1 活性を促進することが判明した（図１０）。操作が簡便な homogenous 測定系であるので、SIRT1 の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニングに使用するのに最適な方法であると思われた。

図９　Effect of Trichostatin A and NAD on recombinant SIRT1 activity

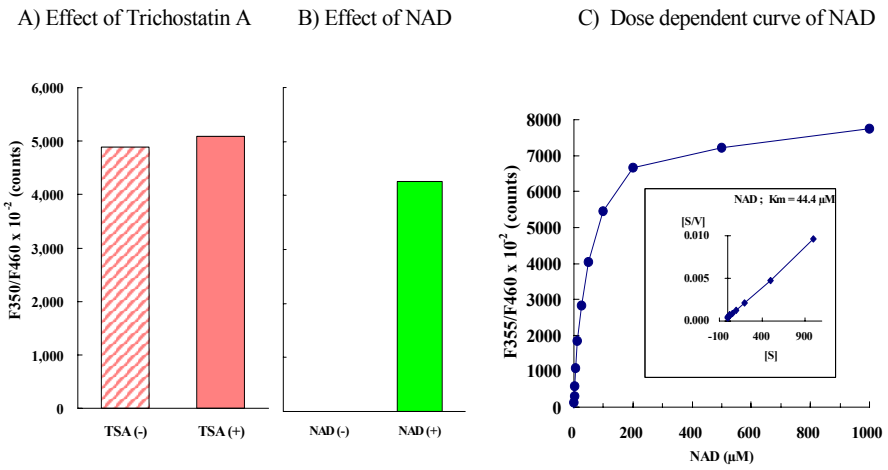
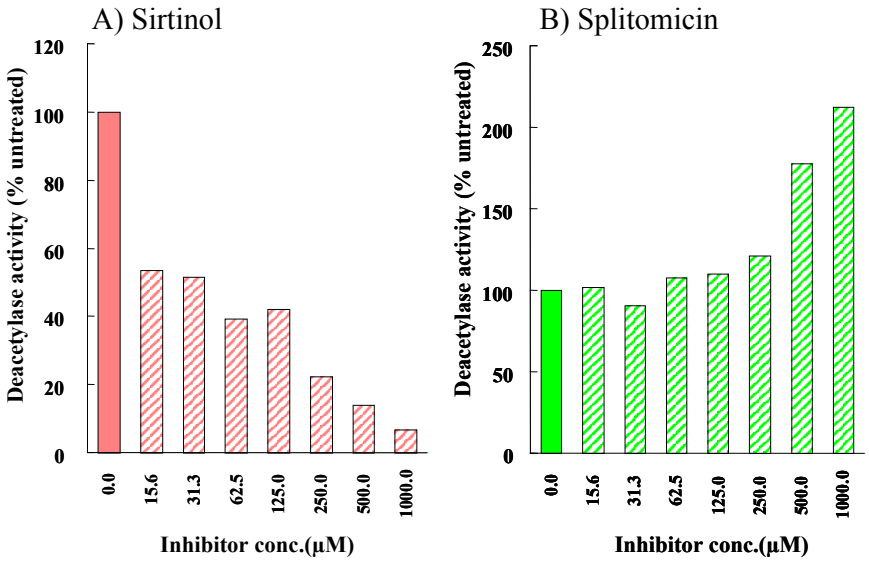


図 10　　Effect of Sir2 inhibitors on recombinant SIRT1 activity



内在性の SIRT1 活性が測定できるかどうかを検討した。まず、はじめに、myc-tagーSIRT1 cDNA の発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトし、myc-tag-SIRT1 を過剰発現させ、anti-myc tag 抗体で免疫沈降した。この免疫沈降物中の SIRT1 活性を測定した（図１１）。anti-myc tag 抗体で免疫沈降した時のみの NAD 依存的なシグナルが観察された。このことより、過剰発現させた試料中の SIRT1 活性が測定できることが判明した。次に anti-SIRT1 抗体を用いて免疫沈降し、内在性の SIRT1 活性測定した（図１２）。免疫沈降物中には過剰発現させた試料中の SIRT1 活性より強度は低いものの、NAD 依存的なシグナルが観察された。

図 11　　Measurement of NAD(+) dependent deacetylase activity in immunoprecipitates using anti-tag antibody and tagged-SIRT1 cDNA transfected 293T cell extract

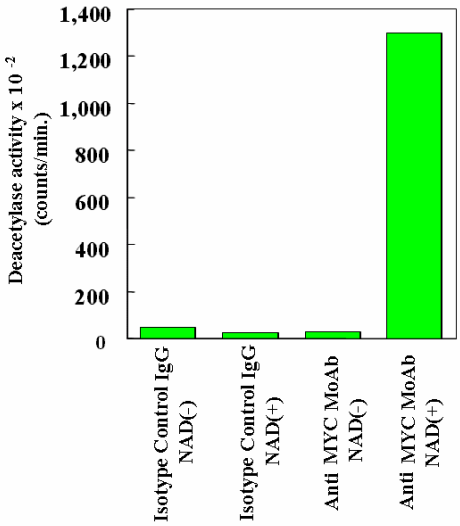
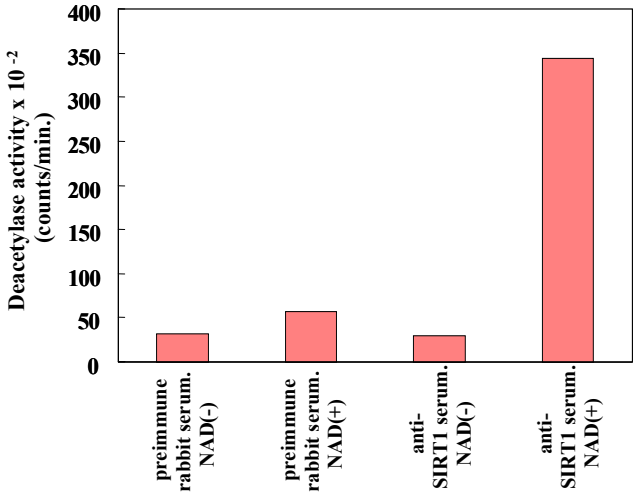
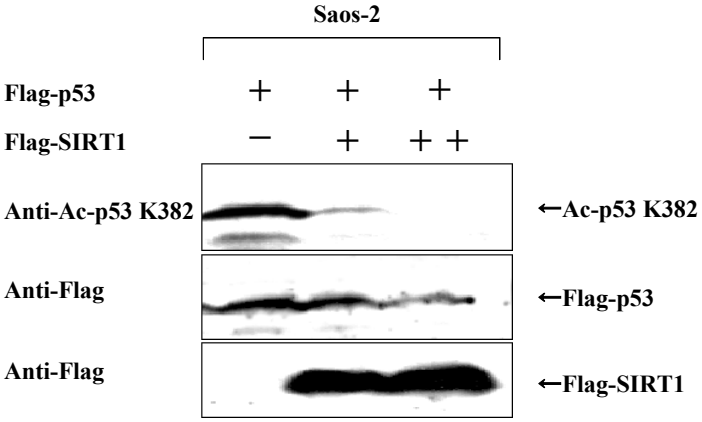


図 12　Measurement of NAD(+) dependent deacetylase activity in anti-SIRT1 antiserum immunoprecipitates of 293T cell extract



細胞内において、SIRT1 がアセチル化 p53 K382 を脱アセチル化する可能性を調べた。Flag-tag-SIRT1 および Flag-tag-p53 の発現ベクターを、野生型 p53 を保持する乳がん細胞株 MCF7 に同時にトランスフェクトし、1 μM CPT11 で処理後、anti-Acetylated p53 K382 抗体用いて、p53 のアセチル化 K382 のレベルを調べた。図１３に示すとおり、Flag-tag-SIRT1 の発現ベクターを増やすに従い、p53 K382 のアセチル化が減少することが観察された。発現ベクターを強制発現させた実験の結果ではあるが、細胞内において、SIRT1 がアセチル化された p53 を脱アセチル化することが示唆された。以前の実験から、強制発現させた Flag-tag-p53 は核に局在することがわかっているので（データ示さず）、脱アセチル化するには SIRT1 も核に存在すると都合が良いはずである。そこで、強制発現させた Flag-tag-SIRT1 の細胞内局在を調べたところ、やはり p53 と同じく核小体以外の核内に局在することが観察された。

図 13　Effect of ectopic expression of SIRT1 on p53 acetylation level *in vivo*



まとめ

1. Trichostatin A 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た。

2. Sir2 inhibitor であると報告されている Sirtinol (9)は濃度依存的に Sir2 酵素活性を阻害し、報告されている IC_{50} とほぼ同等の結果が得られた。

3. Sir2 inhibitor であると報告されている Splitomicin (10)は Sir2 酵素活性を阻害しなかった。報告とは異なる結果であった。

4. 本測定系を用いて、SIRT1 遺伝子を強制発現させた培養細胞の抽出液を免疫沈降したもの、および粗核抽出液における SIRT1 酵素活性の検出が可能であった。

5. 本測定系を用いて、全細胞抽出液を anti-SIRT1 抗体で免疫沈降した内在性 SIRT1 の酵素活性を検出することが可能であった。

6. 今回開発した測定系を用いることにより、今までより詳細に脱アセチル化酵素を解析することが可能となったのに加え、操作が簡便な homogenous 測定系なので、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、SIRT1 のキネッティクス解析や p53 の活性を上昇させる可能性のある新たな SIRT1 阻害物質、および促進物質探索に有用であると考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

p53 はゲノムの守護神であり、たとえば DNA が損傷を受けるような、ゲノムの不安定が引き起こされる状況に陥ると、細胞周期を停止させ、DNA 損傷を修復されるための酵素の発現を誘導し、損傷した DNA を修復させる。さらに修復不可能な重篤な障害を受けた場合には、その細胞のみをアポトーシスに導き、異常細胞の出現を抑え、個体全体の安定性を保証している。このように、p53 はゲノムの安定に重要な機能を発揮している。この p53 が欠失したり、変異したりすると、癌になる可能性が著しく高まる。逆に、過半数を超える癌はこのゲノムの守護神 p53 に変異を生じている。それ故に p53 の機能制御の詳細な解明は、癌の治療法の開発に重要な指針を与えることとなる。

我々は、一つには p53 のアセチル化、脱アセチル化という新しい機能制御の機構に焦点を当てた。アセチル化により p53 は活性化される。この際、多くの癌にみられる変異型の p53 であっても、アセチル化により野生型と同様な効果がみられることもあると報告されている。p53 をアセチル化するには、通常、p53 の脱アセチル化酵素を阻害すればよい。細胞中では脱アセチル化酵素が優勢であり、通常 p53 はアセチル化されていない状態であることが知られている。このためには、p53 の脱アセチル化を担う酵素酵素の同定をおこなうことが必要である。我々は、従来知られているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤 TSA を用いた実験から、p53 の脱アセチル化を担う酵素は TSA 感受性のものと非感受性のものと

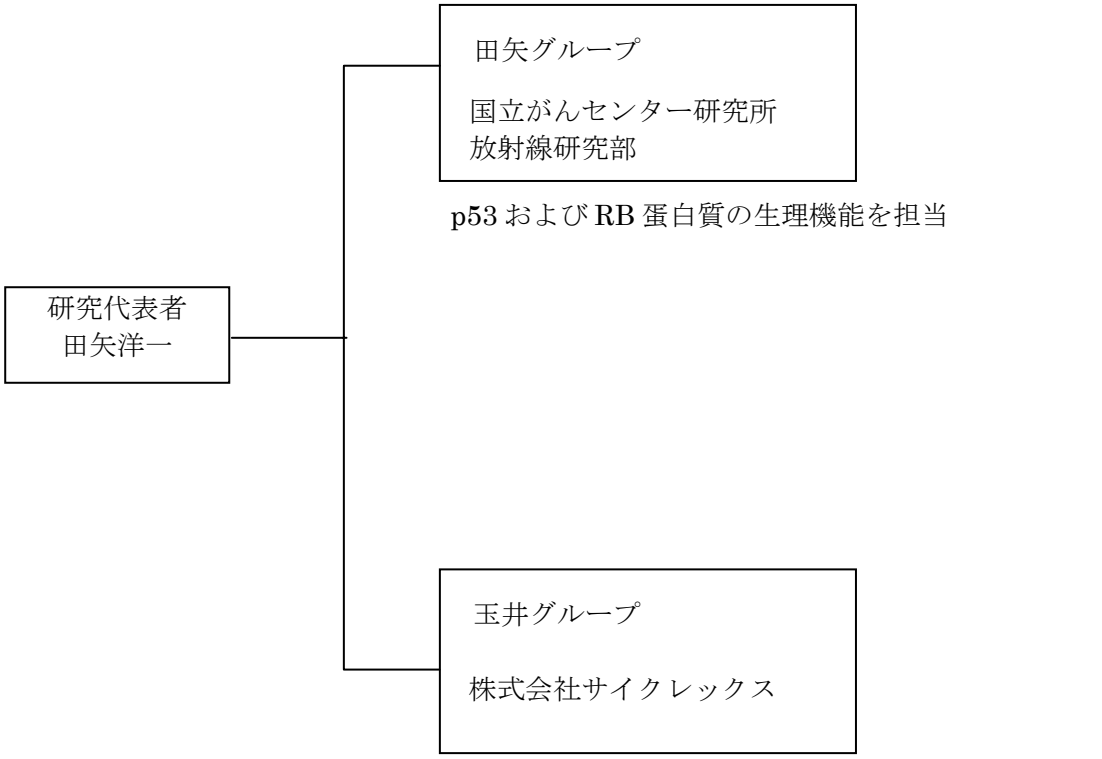
が存在している事を示した。後になって、他の研究室の精力的な研究により、それぞれはNAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素(SIRT1)および既知のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC1)であることが明らかになった。我々は、基礎的な研究とともに、その成果をいかに社会に還元し、実用化するかという視点に立った研究(Translational Research)を推進してきた。その一端として、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)および NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素(SIRT1)の活性測定系の開発おこなった。この方法は従来の測定法、即ち、RI 標識したヒストンから遊離される RI 標識酢酸を測定するといった煩雑な方法とは全く異なり、蛍光基質を用いた画期的な方法で、操作が簡便な homogenous 測定系であるので、新たな HDAC 阻害剤や SIRT1 の阻害剤もしくは促進剤のハイスループットスクリーニングに使用するのに最適な方法であると思われた。

現在、製薬企業が開発した、いくつかの HDAC 阻害剤は有力な制癌剤として、臨床試験中であることを考えると、このような効率の良いスクリーニング系は、次世代の HDAC 阻害剤の探索に貢献すると確信している。SIRT1 の活性測定系も同様なことが言える。SIRT1 のノックアウトマウス由来の細胞では、p53 が恒常的に高アセチル化されていたという報告から、SIRT1 は主な p53 の脱アセチル化酵素であると考えられている。しかし一方で、代謝制御に関するエネルギーセンサーの役割をしており、SIRT1 に最も類似の homolog である Sir2 は長寿に関与していることが酵母、線虫でおいて明らかにされており、阻害剤だけでなく、促進剤を開発することにより、肥満などの病態の研究に用いられる可能性が高い。

このように p53 を中心としたシグナル経路の詳細を解明することにより、新たな制癌剤の道がひらけ、さらに細胞を用いた新規薬剤の適切な評価系が使用可能になると思われる。今回のプロジェクトにおいて、Translational Research の視点からは十分満足のいくでの成果が得られたと考えている。しかしながら、やり残したことも多く、今後、精力的に継続した研究を進める必要を痛感している。

４．研究実施体制

(1) 体制


田矢グループ
国立がんセンター研究所
放射線研究部
p53 および RB 蛋白質の生理機能を担当
研究代表者
田矢洋一
玉井グループ
株式会社サイクレックス
リン酸化部位特異的抗体作製、および、ヒストンデアセチラーゼを担当

(2) メンバー表

研究グループ名： 田矢グループ(田矢 洋一)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
田矢 洋一	国立がんセンター研究所	部長	研究全体の統括	H11.11～H16.10	
岡本 康司		室長	Mdm2 と Mdmx	H13.4～H16.10	
江成 政人		室長	p53 ターゲット プロモーターに結合する p53 の解析およびクラスリン	H13.6～H16.10	
大木 理恵子		研究員	マウス p53 のアポトーシス誘導を制御する領域の解析	H14.6～H16.10	
田中 知明		CREST 研究員	アポトーシス誘導を制御する p53 リン酸化酵素の同定	H11.11～H14.7	CREST 研究員
臺野 華子		CREST 研究員	p53 リン酸化部位に結合する蛋白質	H12.5～H14.4	CREST 研究員
田原 さやか		医薬品機構ポスドク	ARF によって誘導される p53 リン酸化部位の解析	H13.4～H.16.3	
児玉 昌美		任期付研究員	Ser46 キナーゼ	H14.4～H.15.9 H.15.10～H16.10	CREST 研究員 国立がんセ・任期付研究員
菅原 未央子		研究補助員	RB タンパクのリン酸化	H13.4 ～H.15.10	国立がんセ・研究補助員
藤中 恭子		CREST 研究補助員	細胞の培養・維持	H11.11～H13.6 H13.7～H16.10	国立がんセ・研究補助員 CREST 研究補助員
篠崎 智美		大学院生	Mdm2 のリン酸化	H13.4～H15.3	
野田 亜由美		大学院生	Mdm2 と Mdmx	H13.4～H.16.3	
小澤 悟		大学院生	ARF によって誘導される p53 リン酸化部位の解析	H13.4～H15.3	
山崎 智美		大学院生	Mdm2 のリン酸化	H14.4～H16.10	
高橋 理恵子		秘書	事務全般	H13.4～H16.10	
大森 一二		大学院生	クラスリンと p53	H14.4～H.16.3 H.16.4～16.10	CREST 技術員 大学院生
唐澤 隆俊		CREST 研究員	RB のアポトーシス抑制機構	H15.1～H16.10	CREST 研究員
遠藤 克枝		大学院生	クラスリンと p53	H15.4～H16.10	
佐藤 渉		CREST 研究員	p53 依存性アポトーシス誘導遺伝子	H16.4～H16.10	CREST 研究員
井上 靖道		リサーチレジデント	RB のリン酸化	H16.4～H16.10	

玉井グループ(研究グループ代表の氏名:玉井克之)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
玉井　克之	(株)サイクレックス	社長	玉井グループの統括	H11,9～H16.10	
福澤　章子	事業団	技術員	抗体作製	H11,9～H16.10	CREST 技術員
宮崎　敏昭	(株)サイクレックス	研究開発部長	PLK と p53	H11,9～H16.10	
和田　恵美子	(株)サイクレックス	研究員	p53 のアセチル化	H11,9～H12,3	
立澤　あゆみ	(株)サイクレックス	研究員	p53 のアセチル化	H11,9～H14,9	
柴山　まゆみ	(株)サイクレックス	研究員	p53 のアセチル化	H12,4～H16.10	
杉浦　克則	(株)サイクレックス	研究員	PLK と p53	H14,9～H16.10	

５．研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2004年11月6日～ 2004年11月10日	第12回 p53 国際ワークショップ	ニュージーランド ダニーディン市 オタゴ大学	２００名	２年に一度、世界中の主なp53 研究者ほぼ全員が集まって開催される。オーガナイザーの一人となった。

(2) 招聘した研究者等

氏　名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Rene Bernards オランダ癌研究所　部長	情報・意見交換 および国立がんセンターでのセミナー	国立がんセンター研究所	平成12年10月12日～ 平成12年10月13日
Mariano Barbacid スペイン国立がんセンター　所長	共同研究打ち合わせ および国立がんセンターでのセミナー	国立がんセンター研究所	平成12年12月7日～ 平成12年12月10日
Arthur Grollman ニューヨーク州立大学ストーニーブルック校　教授	共同研究打ち合わせ および国立がんセンターでのセミナー	国立がんセンター研究所	平成12年12月5日～ 平成12年12月10日

６．主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表　（国内　9　件、海外　54　件）　原著論文

1. Tibbetts, R.S., Williams, J.M., Taya, Y., Shieh, S-Y., Prives, C. and Abraham, R.T.　ATR is a DNA damage-responsive protein kinase that phosphorylates the p53 tumor suppressor protein. ***Genes & Dev.***, 13: 152-157 (1999)
2. Cuddihy, A.R., Li, S., Tam, N.W.N., Wong, A.H.T., Taya, Y., Abraham, N., Bell, J.C. and Koromilas, A.E. The interferon-inducible protein kinase PKR mediates the　transcriptional activation of the tumor suppressor p53.　***Mol. Cell. Biol.***: 19, 2475-2484 (1999)
3. Adams, P.D., Li, X., Sellers, W.R., Baker, K.B., Leng, X., Harper, J.W., Taya, Y. and Kaelin, W.G.　The retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin/cdk2 complexes.　***Mol. Cell. Biol.***, 19, 1068-1080 (1999)
4. Nakagawa, K., Taya, Y., Tamai, K. and Yamaizumi, M.　Requirement of ATM in the phosphorylation of the human p53 protein at serine 15.　***Mol. Cell. Biol.***, 19, 2828- 2834 (1999)
5. Brugarolas, J., Moberg, K., Boyd, S.D., Taya, Y., Jacks, T. and Lees, J.A.: Inhibition of　CDK2 by p21 is necessary for pRB-mediated G1 arrest following g-irradiation. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 96, 1002-1007 (1999)
6. Shieh, S.-Y., Taya, Y. and Prives, C.: DNA damage-inducible phosphorylation at N-terminal sites including a novel site, serine 20, requires oligomerization of p53. ***EMBO J.***, 18, 1815-1823 (1999)
7. Nagata, Y., Anan, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Taya, Y., Fujiwara, T., Kato, H., Saya, H. and Nakao, M.　The stabilization mechanism of mutant-type p53 by impared ubiquitination: the loss of wild-type p53 function and the hsp90 association. ***Oncogene***, 18, 6037-6049 (1999)
8. Burma, S., Kurimasa, A., Xie, G., Taya, Y., Araki, R., Abe, M., Crissman, H. A., Li., G. C. and Chen, D. J.: DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage.　***J. Biol. Chem.***, 274, 17139-17143 (1999)
9. Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Karnitz, L. M., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y. and　Abraham, R.T.: Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing　agent, caffeine. ***Cancer Res***.,59, 4375-4382 (1999).
10. Watanabe, Y., Watanabe, T., Kitagawa, M., Taya, Y., Kakayama, K. and　Motoyama, N.: pRB phosphorylation is regulated differentially by cyclin-dependent kinase Cdk2 and Cdk4 in retinoicacid-induced neuronal differentiation of P19 cells. ***Brain Res.***, 842, 342-350 (1999)
11. Araki, R., Fukumura, R., Fujimori, A., Taya, Y., Shiloh, Y., Kurimasa, A., Burma, S., Li, G. C., Chen, D. J., Sato, K., Hoki, Y., Tatsumi, K. and Abe, M.: Enhanced phosphorylation of Ser18 on p53 following DNA damage in DNA-PKcs-deficient cells.　***Cancer Res***.,59, 3543-3546 (1999)
12. Keller, D., Zeng, X., Li, X., Kapoor, M., Iordanov, M.S., Taya, Y., Lozano, G., Magun,B. and Lu, H.: The p38MAPK inhibitor SB203580 alleviates ultraviolet-induced phosphorylation at serine 389 but not serine 15 and activation of p53. ***Biochem Biophys. Res. Commun.***, 261, 464-471 (1999).
13. Gao, C., Nakajima, T., Taya, Y. and Tsuchida, N.: Activation of p53 in MDM2 overexpressing cells through phosphorylation.: ***Biochem. Biophys Res. Commun.***,　264, 860-864 (1999)
14. Duckett, D. R., Bronstein, S. M., Taya, Y. and Modrich, P.: hMutSa- and hMutLa-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, 96, 12384-12388 (1999)
15. Sugimoto, M., Nakamura, T., Ohtani, N.,　Hampson, L., Hampson, I. N., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Okumura, K., Niwa, S.., Taya, Y. and Hara, E.:　Regulation of CDK4 activity by a

novel CDK4 binding protein, p34SEI-1. ***Genes & Dev.***,13, 3027-3033 (1999)
16. Shieh, S-Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C.: The human homologues of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage inducible sites. ***Genes & Dev.***, 14, 289-300 (2000)
17. 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.
18. Ashcroft, M., Taya, Y. and Vousden, K. H.: Stress signal utilize multiple pathways to stabilize p53: Involvement of MDM2 expression, cytoplasmic localization of p53 and ARF independent nucleolar sequestration of MDM2. ***Mol. Cell. Biol.***, 20: 3224-3233, 2000.
19. 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
20. 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.
21. 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)
22. 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)
23. 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)
24. 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
25. 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.
26. 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.
27. Panigone S, Debernardi S, Taya Y, Fontanella E, Airoldi R, Delia D: pRb and cdk regulation by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. ***Oncogene*** , 19: 4035-4041, 2000.
28. 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: 369-6375, 2000
29. Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Y, Imai K.: p53-inducible Wip1 phosphatasemediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. ***EMBO J***, 19: 6517-6526, 2000.
30. Kashiwagi, M., Ohba, M., Watanabe, H., Ishino, K., Kasahara, K., Sanai, Y., Taya, Y., and Kuroki, T.: PKCh associates with cyclin E/cdk2/p21 complex, phosphorylates p21 and inhibits cdk2 kinase in keratinocytes.. ***Onocogene***, 19: 6334-6341, 2000
31. 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.
32. 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).

33. 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).
34. 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).
35. 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 surveilliance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. ***Genes Dev***., 15: 2215-2228 (2001).
36. 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).
37. 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)
38. 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).
39. 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).
40. Damia, G, Filiberti, L, Vikhanskaya, F, Carrassa, L, Taya, Y, D'Incalci, M, Broggini, M. Cisplatinum and Taxol Induce Different Patterns of p53 Phosphorylation. ***Neoplasia***, 3: 10-16, (2001)
41. 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)
42. 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).
43. 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)
44. 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: mplications for p53 regulation. ***EMBO J***.,21, 3715-3727 (2002).
45. Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, Nakamura K, Nakamura Y, Arakawa H.: p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. ***Cancer Res.***, 62, 2883-2889 (2002).
46. 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)
47. 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)
48. 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)
49. 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)
50. 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)
51. Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y. and Okamoto, K. : Functional role of Mdm2 hosphorylation by ATR in p53 activation. ***Oncogene***, 22, 8870-8880 (2003)
52. Takagi, M, Tsuchida, R, Oguchi, K, Shigeta, T, Nakada, S, Shimizu, K, Ohki, M, Delia, D, hessa, 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)
53. 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 β . ***Genes Dev.***, 18, 261-277 (2004)
54. 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)

総説

1. Taya, Y., Nakajima, K. and Tamai, K.:
   Generation and application of phospho-specific antibodies for p53 and pRB.
   Tumor Suppressor Genes: Methods and Protocols
   ed. Wafik El-Deiry, Humana Press, USA, pp.17-26 (2003)
2. 田矢洋一: 癌化の 2 つの基本経路
   イラスト医学&サイエンスシリーズ「わかる細胞周期と癌」
   （田矢洋一　編、羊土社、2000）pp. 12−17
3. 田矢洋一: 解明進む p53 の生理機能： 実験医学：18，2220-2243 (2000)
4. 田中知明、田矢洋一: p53 によるアポトーシス誘導能を制御するリン酸化
   実験医学、18，2212− 2218 (2000)
5. 田矢洋一、田中知明: p53 のアポトーシス誘導能を制御する Ser46 のリン酸化
   実験医学：18, 2338-2339 (2000)
6. 田矢洋一: RB と p53
   わかる実験医学シリーズ 3− 細胞周期（中山敬一　編、羊土社）89−98（2001）
7. 田矢洋一: リン酸化による p53 の生理機能の制御
   実験医学：19，1064−1068（2001）
8. 田矢洋一　監修： p53 経路と RB 経路：細胞工学：2003 年 1 月号特集
9. 田矢洋一：RB タンパク質の新しい生理機能：実験医学: 21, 708-712 (2003)

(2) 口頭発表　　招待講演　（国内　26　件、海外 25　件）

国際会議

1. Tanaka, T., Tamai, K. and Taya, Y. : Phosphorylation of Ser46 regulates apoptosis-inducing ability of p53. 10th International p53 Workshop.(Monterey, USA, 5-8 April, 2000)
2. Tanaka, T., Tamai, K. Arakawa, H., Nakamura, Y. and Taya, Y. : Phosphorylation of Ser46 regulates apoptosis-inducing ability of p53. Mendel-Brno 2000, Conference on DNA structure and interactions. (Brno, Czech, July 19-23, 2000)
3. Tanaka, T., Arakawa, H., Tamai, K., Nakamura, Y. and Taya, Y. : Phosphorylation of Ser46 regulates apoptosis-inducing ability of p53. Cold Spring Harbor Meeting “Cancer Genetics &Tumor Suppressor Genes” (Cold Spring Harbor, USA, August 16-20, 2000)
4. Taya, Y. : Phosphorylation of Ser46 regulates apoptosis-inducing ability of p53. Japan-France Cooperative Cancer Research Workshop (Strasbourg, France, October 17-20, 2000)
5. Taya, Y. : Selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53. The 2000 Meeting of the Korean Society for Gerontology. (Seoul, Korea, November 17, 2000).
6. Taya, Y. : Phosphorylation of Ser46 regulates apoptosis-inducing ability of p53. US-Japan Cooperative Cancer Research Workshop (Tokyo, March 8-9, 2001)
7. Taya, Y. : Selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53. International Symposium “From RNA to Cancer Research” (Tokyo, December 9, 2000)
8. Tanaka, T., Daino, H. and Taya, Y. : Purification and identification of the Ser46-kinase which regulates apoptosis-inducing ability of p53. (DNA Tumor Virus Meeting) (Cambridge, UK, July 24-28, 2001)
9. Taya, Y.: New targets for cancer therapy based on the mechanism of apoptosis induction by p53. (Symposium: Novel Molecular Targets for Cancer Therapy) (Buenos Aires, Argentine,)
10. Taya, Y. : Selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53. (American Association for Cancer Research Special Conference: Apoptosis and Cancer) (Hawaii Island, USA, February 13-17, 2002).
11. Taya, Y. : Selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53.
    （シンガポール・日本合同シンポジウム：ゲノム医学における学問から産業へ）

（シンガポール、２００２年3月 25−26 日）

12. Y. Taya: The selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53.11th International p53 Workshop, May15-18, 2002, Barcelona, Spain.
13. Y. Taya: The selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53.17th Workshop on Japan-France Cooperative Cancer Research Program, October 15-19, 2002, Montpellier, France.
14. Y. Taya: The selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53.
    19th Radiation Biology Center international Symposium “Crisis Control in the Cell Cycle” November 5-6, 2002, Kyoto
15. Y. Taya: The selection mechanism between apoptosis and G1-arrest by p53.
    Nagoya University COE International Symposium. November 28-29, 2002, Nagoya
16. Y. Taya: Phosphorylation of RB by Cdk4-cyclin D and Cdk2-cyclin E are distinctively used for release of E2F and chromatin remodeling proteins.
    9th Japanese-German Workshop on “Molecular and Cellular Aspects of Carcinogenesis” September 18-20, 2003, Essen, Germany
17. Y. Taya: Regulation of anticancer drug-induced apoptosis by p53 and RB protein. 76th Annual meeting of Japanese Biochemical Society, symposium　October 2003, Yokohama
18. M. Enari, K. Ohmori, Y. Taya: Identification of a novel protein that enhances p53-mediated transcription. 26th annual Meeting of Molecular biology Society of Japan, Symposoium. December 2003, Kobe
19. Y. Taya: A novel function of clathrin heavy chain in p53-mediated transcription. 6th Join Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. January 25-29, 2004, Hawaii Island, USA
20. Yoichi Taya, Kazuji Ohmori, Masato Enari: A novel function of clathrin heavy chain in p53-mediated transcription. Workshop on “Molecualar Mechanismsof vesicle Selectivity”March 29-31, 2004 Madrid, Spain
21. Yoichi Taya: A novel function of clathrin heavy chain in p53-mediated transcription 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop. April 2004
22. Masato Enari, Kazuji Ohmori, Yoichi Taya
    A novel function of clathrin heavy chain in p53-mediated transcription and apoptosis 3rd China-Japan Cancer Research Workshop, September 2-4, Xi’an, China.
23. Masato Enari, Kazuji Ohmori, Yoichi Taya: A novel function of clathrin heavy chain in p53-mediated transcription. 9th World congress on Advances in OncologyCrete, Greece
24. Masato Enari, Kazuji Ohmori, Yoichi Taya　A novel function of clathrin heavy chain in p53-mediated transcription and apoptosis 12th p53 International Worksho. Dunedin, New Zeeland
25. Masato Enari, Kazuji Ohmori, Yoichi Taya
    A novel function of clathrin heavy chain in p53-mediated transcription and apoptosis 27th annual Meeting of Molecular biology Society of Japan, Symposoium. December 2004, Kobe

国内学会

1. 田矢洋一：ATM ファミリーキナーゼによる p53 の生理機能の制御。
   日本分子生物学会大会シンポジウム　（福岡、1999 年 12 月 7 日～10 日）
2. 人見泰恵、福慶あゆみ、小野達也、北川雅敏、東　秀明、玉井克之、田矢洋一：
   ＲＢ蛋白質上の Cdk4 と Cdk2 特異的リン酸化部位と生理的意義.
   日本分子生物学会大会　（福岡、1999 年 12 月 7 日～10 日）
3. 田矢洋一：リン酸化とアセチル化による p53 の生理機能の制御。

（横浜、日本癌学会総会シンポジウム、２０００年１０月４ー６日）
4. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス経路と G1 停止経路の選択のメカニズム。
（横浜、日本生化学会大会シンポジウム、２０００年１０月１１ー１４日）
5. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス経路と G1 停止経路の選択のメカニズム。
（福岡、日本人類遺伝学会大会シンポジウム、２０００年１０月２５日）
6. 田中知明、荒川博文、小林稔子、玉井克之、中村祐輔、 田矢洋一：
Ser46 のリン酸化と p53AIP1 による p53 依存性アポトーシスの誘導機構
（神戸、日本分子生物学会大会ワークショップ、２０００年１２月１４日）
7. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス経路と G1 停止経路の選択の分子機構
第５７回小児血液・腫瘍懇話会　特別講演　2001 年 1 月 17 日
東京医科歯科大学
8. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス誘導の分子機構
第１９回高峰カンファレンス　2001 年 2 月 24 日　東京
9. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス経路と G1 停止経路の選択のメカニズム
(つなぎ温泉、盛岡市、日本分子生物学会第一回春季シンポジウム、
２００１年 5 月 10- 13 日)
10. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス経路と G1 停止経路の選択のメカニズム
平成１３年度　金沢大学がん研究所分子標的薬剤開発センター公開シンポ
ジウム　2001 年 7 月 14 日　金沢大学
11. 田矢洋一： p53 のアポトーシス誘導能
アポトーシス研究会　第１０回研究集談会シンポジウム
2001 年 8 月 24 日　東京歯科大学水道橋校舎　血脇ホール　東京
12. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス誘導の分子機構
第３回血液フォーラム２１　特別講演　2001 年 9 月 1 日　名古屋
13. 田矢洋一： p53 のアポトーシス誘導能を制御する Ser46-kinase
（横浜、日本癌学会総会シンポジウム：がんと細胞周期、２００１年９月２７日）
14. 田矢洋一：p53 のアポトーシス誘導能を制御する Ser46-kinase
（京都、日本生化学会大会シンポジウム、２００１年１０月２５日）
15. 田矢洋一：ATM ファミリーキナーゼによる p53 の生理機能の制御
（横浜、日本分子生物学会大会ワークショップ：ATM キナーゼファミリーによる細胞機
能統御の全容、２００１年１２月１０日）
16. 田矢洋一：p53 によるアポトーシス経路と G1 停止経路の選択のメカニズム
第６１回日本癌学会総会　シンポジウム「p53 研究の最前線」
2002 年 10 月、東京
17. 田矢洋一：癌遺伝子の最近の知見について
秋田癌遺伝子セミナー　特別講演　2003 年 2 月 28 日　秋田大学医学部
18. 田矢洋一：細胞癌化の基本経路：p53 経路と RB 経路
第９回　家族性腫瘍研究会学術集会　ランチョンセミナー　　2003 年 6 月 13 日、東京
19. 田矢洋一：p53 と RB 研究の新展開
第 62 回　日本癌学会総会モーニングレクチャー　　2003 年 9 月、名古屋
20. 菅原未央子、人見奏恵、小林稔子、玉井克之、北川雅敏、田矢洋一：
Cdk4 と Cdk2 による RB 蛋白質のリン酸化の使い分けの意義
第 26 回 日本分子生物学会年会　シンポジウム　 2003 年 12 月、神戸
21. 岡本康司、野田亜由美、山崎智美、加島健史、田矢洋一：
Mdmx のリン酸化は細胞老化誘導を制御する
第 26 回日本分子生物学会年会　シンポジウム　　2003 年 12 月、神戸
22. 田矢洋一：p53 と RB 蛋白質によるアポトーシス誘導制御機構とその癌治療への応用
第 41 回　日本癌治療学会総会　シンポジウム
2003 年 10 月、札幌

23. 田矢洋一：p53 研究の新展開　第６回癌治療増感研究シンポジウム
特別講演　2004 年 2 月 7 日　奈良
24. 田矢洋一：p53 と RB 蛋白質による細胞増殖とアポトーシスの制御
第６８回日本生化学会中部支部例会シンポジウム
2004 年 5 月 22 日　藤田保健衛生大学
25. 田矢洋一：p53 と RB 研究の新展開　　第 63 回　日本癌学会総会教育講演
2004 年 9 月、福岡
26. 田矢洋一：細胞癌化の基本経路：p53 経路と RB 経路
第２０回小児がん学会　教育講演　2004 年 11 月 22 日　京都

(3) 特許出願（国内　2　件、海外　2　件）

① 国内

発明者：田矢洋一、田中知明、中村祐輔、荒川博文
発明の名称：p53 の Ser46 をリン酸化する酵素
出願人：科学技術振興事業団、国立がんセンター
出願日：平成 13 年 9 月 26 日
出願番号：特願　2001-292953

発明者：江成政人、田矢洋一
発明の名称：癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子
出願人：科学技術振興事業団、国立がんセンター
出願日：平成 15 年 4 月 9 日
出願番号：特願　2003-048658

②海外

発明者：田矢洋一、田中知明、中村祐輔、荒川博文
発明の名称：p53 の Ser46 をリン酸化する酵素
出願人：科学技術振興事業団、国立がんセンター
出願日：平成 15 年 7 月 11 日
出願番号：PCT / JP02 / 09914

発明者：江成政人、田矢洋一
発明の名称：癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子
出願人：科学技術振興事業団、国立がんセンター
出願日：平成 16 年 9 月 10 日
出願番号：PCT/JP2004/002238

(4) 新聞報道等

① 新聞報道

「がん細胞「自殺」促す新遺伝子」　2000年9月15日　　朝日新聞朝刊
「細胞自殺　主役の遺伝子を発見」　2000年9月15日　　読売新聞朝刊
「がん発症防ぐ細胞の「自殺」　主役の遺伝子を発見」
2000年9月15日　　日本経済新聞朝刊
「最先端技術で重要な貢献　日本人16人選出　米トムソン」
2004年9月28日　日経産業新聞

② 受賞

平成13年度　高松宮妃癌研究基金学術賞　受賞

「癌抑制RB蛋白質とp53のリン酸化の意義の研究」

田矢　洋一

2002 年 2 月 22 日

トムソン・サイエンティフィック・リサーチ・フロント・アワード

（米国トムソン社）　受賞　田矢　洋一

2004 年 11 月 2 日

世界の最先端科学技術に対する重要な貢献に対して

③その他

Editorial Board Member:

Cancer Cell (Cell Press, USA)　2002年より

Oncogene　2002年9月より

Cancer Biology & Therapy (USA)　2002年より

Cell Cycle (USA)　2002年より

Int. J. Oncology　2002年より

日経バイオビジネスInnovation UKセミナー「細胞周期研究とがん医学」
にて、2001年度のノーベル医学生理学賞受賞者であるTim Hunt博士と１時間ずつ
講演　　2003年12月5日　東京厚生年金会館

主催：日経バイオビジネス　　後援：英国大使館

７．結び

私がCRESTに採択された5年前は、私は当研究所の生物学部の室長であり、正式のスタッフを採用することができず、研究費の謝金で雇っているテクニシャンや他の大学に籍を置いて来ている学生など３～４人の弱小体制で研究を進めざるを得ない状況にありました。しかしCRESTに採択されたおかげで、ポストドクや技術員なども採用でき、体制をずっと強化できるようになり、研究も大きく進みだし、大変感謝しています。そして、2001年の1月から私は放射線研究部の部長となり、4月には岡本康司・室長、7月には江成政人・主任研究官、そして2002年の6月には大木理恵子・研究員などの優秀な正式のスタッフを採用することができ、私のグループの研究体制は大幅に強化され、やっとまともな研究室の体制になってきました。

そして、前述の研究テーマはいずれもかなり順調に進み面白い結果が得られましたが、多くのテーマはスタートしたのが2年半以内であるために、まだ論文は多くが投稿中などの状況にあります。しかし、現在の研究の進展状況からすると、多分ごく近いうちに世界中の研究者を感心させる意義深い論文をかなり出せると思っています。　なかでも、クラスリンとp53の研究は世界中の研究者にインパクトを与えると思っています。つい先日ニュージーランドで開催された第12回p53国際ワークショップで発表した際にもこの研究は大きな反響を呼びました。

また、世界中の研究者と行った共同研究は、多くの論文としてこの5年間に発表することができました。

文科省科研費などと比べて､CRESTのありがたさは特に自由度の高さと人件費にあります。文科省の科研費や厚生科学研究費補助金など他の研究費では人件費に正当に使うのが簡単ではないのですが、CRESTではポストドク、技術員や研究補助員などさまざまなレベルの人を必要に応じて雇うことができます。この５年間、CRESTの研究代表者を続けている間に、CRESTをもっと良くするためにはどうしたらよいかという意見を何度もJSTの方から聞かれ、私は、CRESTの研究費の自由度は大変ありがたいので、この自由度をもっと拡大してくれるようにと答えていました。しかし、今JSTが進めている研究機関への委託の方針に関して、委託された結果どうなるかを考えてみますと、研究代表者にとってはほとんど何もメリットはなく、デメリットばかりという結論に至りました。日本の優れた研究者を特別に優遇して日本の科学・技術を大きく発展させるというCRESTの目的に逆行するものと考えます。
ちょっと考えただけでも思い浮かぶデメリットは次の通りです。

１）ポストドクや技術員などの給料が大抵の場合に下がるのでトラブルが生じる。

２）これまでの業績や能力でポストドクや技術員などの給料に差をつけるのはむしろ公平なやり方であり、優秀な人を採用しやすい。研究機関へ委託されれば給料が一律になってしまい、優秀な人材の獲得が困難になる。

３）他の文部科学省や厚生労働省などの普通の研究費では、研究代表者や分担者以外の若い研究者などの国内・国外出張旅費はほとんど使えなくなっていますが、CREST では若い研究者などの旅費にも使えてありがたかったです。しかし、研究機関へ委託されるとそれができなくなります。

４）国内・国外出張に際しての研究代表者の宿泊費・日当は国家公務員指定職の金額になっていますが、研究機関へ委託されると、普通の教授や部長の金額へ格下げとなります。

５）CRESTの研究費は必要になれば高額な研究機器をすぐにでも購入できることなどのように、研究費の内訳を変更することが比較的簡単で、年度始めに書いた旅費も、余れば消耗品の購入に回すなどの変更がほとんど自由です。しかし、研究機関へ委託されるとそれが非常に困難になります。

最後になりましたが、私の研究室の現在のメンバー全員の写真をここにお見せしておきます。