



飢餓ストレスに応答した新たな p53 の発現 制御機構とアポトーシス誘導

1. はじめに

がん抑制遺伝子産物である p53 のストレスに応答した発現誘導および転写因子としての活性化は、翻訳後のリン酸化やアセチル化を介したタンパク質レベルでの安定性の昂進に起因する¹⁾。安定化した p53 は転写因子として標的遺伝子群の転写量を上昇させるが、これらの遺伝子産物は細胞周期の停止、損傷 DNA の修復、細胞老化あるいはアポトーシスの誘導を実行する因子群である。従って、p53 は様々なストレスに応答した細胞の運命決定の制御において極めて重要な役割を担っている。このような背景から、p53 の活性調節機構の研究は、様々なストレスに応答したタンパク質としての安定化を前提とした解析に重きが置かれており、p53 の転写制御機構やその重要性については不明である。最近になって、我々は飢餓ストレスである低グルコース処理によるアポトーシス誘導系において、p53 の誘導が転写レベルで制御されているという興味深い知見を得た²⁾。本稿では、低グルコース処理による新たな p53 依存性のアポトーシス誘導機構を紹介する。

2. AMPK の機能と構造

AMP-activated protein kinase (AMPK) は、細胞が低酸素、筋収縮あるいは栄養障害などのストレスに応答して過剰に ATP が消費され AMP 量が上昇すると、この細胞内のエネルギー状態の変化を AMP:ATP 比として感知し、その上流のキナーゼによるリン酸化を介して活性化される酵素である。リン酸化された AMPK は糖や脂質の代謝などの ATP 合成経路を活性化し、一方で ATP 消費経路を抑制してエネルギー枯渇に対応する役割を担うことから、エネルギー代謝における“master enzyme”の一つであると考え

られている³⁾。

AMPK は活性サブユニットである α と制御サブユニットである β および γ の三つのサブユニットからなるヘテロトリマーとして存在しており、 α サブユニットの Thr-172 がリン酸化を受けることにより、あるいは AMP が γ サブユニットに結合することにより、アロステリックに活性化されると考えられている⁴⁾。最近の報告によれば、AMPK は AMP のみならず様々な因子群によってもその活性が調節されることが示されており⁵⁾、さらに糖や脂質代謝のみならずタンパク質合成、細胞増殖および細胞極性の制御にも積極的に関与していることが明らかになりつつある⁶⁾。

3. 飢餓に応答した胸腺細胞での AMPK と p53 の発現

免疫系は栄養障害の影響を受けやすく、その栄養障害に伴う胸腺の萎縮は免疫系の異常を示す臨床所見の一つであり、この胸腺の萎縮は胸腺細胞のアポトーシスに起因する。そこで、我々は栄養障害によるアポトーシス誘導過程における AMPK の役割を検討する目的で、マウス胸腺細胞を用いて AMPK の発現レベルの変化の有無を検討した。飢餓状態に曝されたマウスから経時的に胸腺細胞を採取し FACS 法による解析を行ったところ、アポトーシスに陥った細胞数の顕著な増加が観察された。また、飢餓マウス由来の胸腺細胞における AMPK α 、その活性型である Thr-172 がリン酸化された AMPK α (p-AMPK α) および p53 の発現誘導が認められた。さらに、p53 ノックアウトマウスにおいては、飢餓ストレスによる胸腺細胞のアポトーシス誘導が著しく抑制されていた。従って、飢餓による胸腺細胞のアポトーシスは、p53 依存性のアポトーシス誘導経路を介して実行されることが明らかになった。飢餓に応答した p53 と p-AMPK の発現誘導との間には密接な正の相関関係が認められたことから、飢餓ストレスによる p53 依存性のアポトーシス誘導経路における AMPK の関与が強く示唆された。

4. 低グルコース処理に応答した p53 依存性のアポトーシス誘導と AMPK

飢餓ストレスによるアポトーシス誘導過程における p53 と AMPK との間の機能的相互作用の有無を検討する目的で、我々は低グルコース存在下で野生型 p53 を持つヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞を培養した。この条件下で培養した U2OS 細胞では、カスパーゼ 3 の基質の一つである PARP [poly (ADP-ribose) polymerase] の切断を伴うアポトーシスの誘導が認められ、低グルコース処理に応答した p53

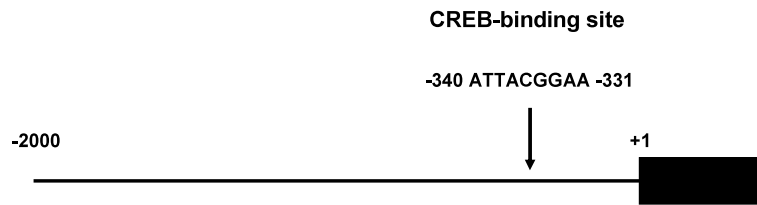


図1 *p53* 遺伝子のプロモーター構造
p53 遺伝子の転写開始点を+1としたときに、-340/-331領域にCREB結合配列の候補が存在する。

の蓄積、*p53* の Ser-46 のリン酸化の誘導および AMPK α のリン酸化の昂進が観察された。さらに、*p53* をノックダウンすると、低グルコース処理によるアポトーシスの誘導が抑制されたことから、マウスの胸腺細胞と同様に、飢餓ストレスによる U2OS 細胞のアポトーシスの誘導は *p53* 依存性の経路を介して実行されることが判明した。RT-PCR 法による遺伝子発現の解析結果は上記の仮説を支持している。すなわち、低グルコース処理に反応して *p53* の下流標的遺伝子である *BAX* および *p53AIP1* の顕著な発現昂進が検出された。冒頭で述べたように、様々なストレスに反応した *p53* の発現誘導はタンパク質レベルでの安定化の昂進に起因する。特筆すべきは、U2OS 細胞では低グルコース処理に反応して *p53* mRNA の発現量が明らかに増加していたことである。つまり、低グルコース処理によるアポトーシス誘導過程における *p53* の蓄積には、*p53* の転写レベルでの調節機構が重要な役割を果たしていることになる²⁾。それでは、*p53* の転写を調節する因子は何かという問題が次に浮上する。

過去の報告によれば、AMPK を含む複合体が遺伝子の転写レベルでの制御に関与する可能性が指摘されている⁷⁾。そこで、U2OS 細胞において AMPK α を過剰発現させたところ、*p53* mRNA の発現量および *p53* の標的遺伝子の一つである *p53AIP1* mRNA の発現量の明らかな増加が検出された。さらに、AMPK α をノックダウンすると、低グルコース処理による *p53* mRNA および *p53* の発現誘導は認められず、*p53* の Ser-46 のリン酸化の誘導も検出されなかった。従って、これらの実験結果は AMPK あるいは AMPK を含む複合体が、低グルコース処理によるアポトーシス誘導過程における *p53* の転写を促進する機能ならびに *p53* の Ser-46 をリン酸化する機能を持つ可能性を示唆している。

5. *p53* のプロモーター解析

我々は低グルコース処理および AMPK に反応する領域

を *p53* の 5'-上流領域に同定する目的で、*p53* の転写開始点を含む上流 2 kb をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクター [p53-luc(-2000/+22)] を構築した。このレポーターベクターでは、低グルコース処理あるいは AMPK α の過剰発現に反応したルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。さらに、*p53* の 5'-上流領域を欠失させた様々な変異体を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、同様のルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、*p53* の 5'-上流領域 (-531/-238) 内に、低グルコース処理および AMPK α に反応する配列が存在することが示唆された。興味深いことに、この領域内には転写因子である cAMP-response element-binding protein (CREB) の標的配列が存在していた (図1)。従って、低グルコース処理および AMPK 依存的に *p53* の転写を促進する転写複合体の中に CREB が含まれており、*p53* の転写誘導に関与している可能性が考えられた⁸⁾。

6. CREB による *p53* の転写制御

p53 の転写制御における CREB の役割を検討する目的で、U2OS 細胞で CREB を過剰発現させたところ、*p53* mRNA 量の増加が認められた。同様に、CREB 結合領域を含むルシフェラーゼレポーターベクターに由来するルシフェラーゼ活性の上昇が検出された。さらに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) による解析の結果、低グルコース処理に反応して *p53* の CREB 結合部位を含む 5'-上流領域への CREB の結合が検出され、しかも CREB の発現誘導ならびに CREB の Ser-121 のリン酸化の昂進が観察された。CREB をノックダウンすると、低グルコース処理による *p53* mRNA の発現量の増加およびアポトーシスの誘導が著しく抑制された。従って、CREB あるいは CREB を含む複合体が *p53* に対する転写因子として機能するとともに、低グルコース処理による *p53* 依存性のアポトーシス誘導経路において、極めて重要な役割を担っていると考えられる⁸⁾。

7. CREB/AMPK 複合体の意義

これまでの実験結果から、低グルコース処理にตอบสนองしたアポトーシス誘導過程における *p53* の転写量の増加は、AMPK および CREB に依存した現象であることが示唆される。それでは、AMPK と CREB はお互いに協調することによって、*p53* の転写レベルでの活性化を介したアポトーシスの誘導を促進するのであろうか。注目すべきは、AMPK α をノックダウンさせた U2OS 細胞では、CREB の過剰発現によるアポトーシスの誘導が顕著に抑制され、また CREB のノックダウンでは、低グルコース処理にตอบสนองした *p53* の転写誘導の抑制、AMPK α のリン酸化の阻害およびアポトーシス誘導の抑制が観察されたことである。すなわち、低グルコース処理にตอบสนองした *p53* 依存性のアポトーシス誘導には、AMPK および CREB の存在が不可欠であると考えられる。この仮説を支持する証拠として、低グルコース処理にตอบสนองして p-AMPK α /CREB 複合体の量が顕著に増加することが挙げられる。しかも、AMPK α あるいは CREB のいずれかをノックダウンさせると、低グルコース処理にตอบสนองした *p53* の転写誘導は検出されない。これらの実験結果は、低グルコース処理にตอบสนองして少なくとも AMPK と CREB を含む転写複合体が形成され、*p53* の転写を促進する可能性を示唆する⁹⁾。

8. おわりに

本稿で紹介した実験結果から、低グルコース処理という飢餓ストレスによるアポトーシスの誘導は *p53* 依存性の経路を介して実行されるが、飢餓ストレスによる *p53* の蓄積は、主として AMPK/CREB を含む転写複合体による *p53* の転写促進に起因することが判明した。また、飢餓ストレスにตอบสนองして、AMPK α および CREB ではそれぞれ Thr-172 および Ser-121 のリン酸化の誘導が検出されることから、リン酸化がこの転写複合体の活性化に寄与している可能性が示唆されるが、その検証は今後の重要な検討課題の一つである。一方で、飢餓ストレスにตอบสนองして *p53* の Ser-46 のリン酸化の特異的な誘導が観察された。ストレスによってリン酸化が誘導される *p53* のセリン残基の中でも、この Ser-46 のリン酸化は *p53* 依存性のアポトーシスと密接に結びついている⁹⁾。この Ser-46 のリン酸化を触媒するキナーゼの候補として、HIPK2 (homeodomain interacting protein kinase 2) および PKC δ が知られている¹⁰⁻¹³⁾。我々は、飢餓ストレスにตอบสนองして p-AMPK α が *p53* と複合体を形成すること、および AMPK α の過剰発現によって *p53* の

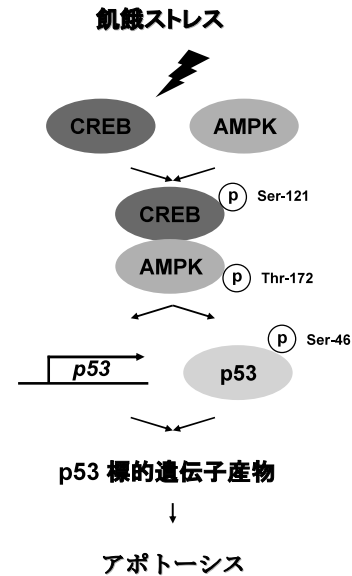


図2 飢餓ストレスにตอบสนองした *p53* 依存性の新たなアポトーシス誘導機構

飢餓ストレスにตอบสนองして AMPK と CREB がリン酸化され、両者は転写複合体を形成し *p53* の転写誘導を介して *p53* の蓄積を促す。さらに、蓄積した *p53* は AMPK による *p53* の Ser-46 のリン酸化を介して活性化され、その標的遺伝子群の発現を誘導し、飢餓ストレスに曝された細胞のアポトーシスを引き起こす。

Ser-46 がリン酸化されることを見出している⁹⁾。従って、AMPK は CREB と複合体を形成して *p53* の転写制御に関与するとともに、飢餓ストレスにตอบสนองした *p53* の Ser-46 のリン酸化を触媒する活性を持つ可能性が示唆される (図2)。

謝辞：本稿で紹介した研究成果は、千葉県がんセンター研究所の多くの研究者の方々との共同研究であり、ここに深く感謝致します。また、本研究の推進に際して貴重なコメントを戴きました太田一正氏 (東京医科大学) に厚く御礼申し上げます。

- 1) Vousden, K.H. & Lu, X. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2, 594-604.
- 2) Okoshi, R., Ozaki, T., Yamamoto, H., Ando, K., Koida, N., Ono, S., Koda, T., Kamijo, T., Nakagawara, A., & Kizaki, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 3979-3987.
- 3) Carling, D. (2004) *Trends Biochem. Sci.*, 29, 18-24.
- 4) Hardie, D.G., Carling, D., & Carlson, M. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 821-855.
- 5) Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie,

- D.G., & Alessi, D.R. (2004) *EMBO J.*, **23**, 833–843.
- 6) Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Embler, E., Wang, Y.X., Banayo, E., Mihaylova, M.M., Nelson, M.C., Zou, Y., Juguilon, H., Kang, H., Shaw, R.J., & Evans, R.M. (2008) *Cell*, **134**, 405–415.
 - 7) Hardie, D.G. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 5479–5487.
 - 8) Okoshi, R., Ando, K., Suenaga, Y., Sang, M., Kubo, N., Kizaki, H., Nakagawara, A., & Ozaki, T. (2009) *Genes Cells*, **14**, 1429–1440.
 - 9) Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., & Taya, Y. (2000) *Cell*, **102**, 849–862.
 - 10) Hofmann, T.G., Moller, M., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., & Schmitz, M.L. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 1–10.
 - 11) D’Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., & Soddu, S. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 11–19.
 - 12) Dauth, I., Kruger, J., & Hofmann, T.G. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 2274–2279.
 - 13) Yoshida, K., Liu, H., & Miki, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 5734–5740.

大越 林太郎¹⁾, 久保 奈津実¹⁾, 木崎 治俊²⁾,
 中川原 章¹⁾, 尾崎 俊文¹⁾
 (¹⁾千葉県がんセンター研究所, ²⁾東京歯科大学)

A novel molecular mechanism behind p53-dependent apoptosis in response to energetic stress
 Rintaro Okoshi¹⁾, Natsumi Kubo¹⁾, Harutoshi Kizaki²⁾, Akira Nakagawara¹⁾, and Toshinori Ozaki¹⁾ (¹⁾Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuou-ku, Chiba 260-8717, Japan; ²⁾Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261-8502, Japan)

アンギオテンシン変換酵素の新しい顔： Aβ変換酵素

1. はじめに

数多くの研究から、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) から産生されるアミロイドβタンパク質 (amyloid β-protein, Aβ) の重合や蓄積が、アルツハイマー病発症の要因とされている。分泌されるAβは、主にAβ40とAβ42の2種存在し、Aβ40がその9割を占める。Aβ42は重合能および神経毒性が強い分子であり、Aβ42の増加、またはAβ42/Aβ40比の増加がアルツハイマー病の発症を引き起こす原因であることが示唆されてい

る。一方、筆者らの研究から、単体で存在しうるAβ40は、抗酸化作用と抗Aβ42凝集作用を持つことによって神経保護作用を発揮することが明らかとなった。更に、筆者らは、毒性の強いAβ42をAβ40へ変換する酵素 (Aβ変換酵素) として、アンギオテンシン変換酵素 (angiotensin-converting enzyme, ACE) を同定した。ACEは、血圧調節に重要な酵素であり、高血圧症治療のために多くのACE阻害薬が臨床に用いられている。本稿では、新しく見出されたACEの持つAβ変換活性について紹介し、Aβ代謝及びアルツハイマー病発症におけるACEの役割について考察したい。

2. アルツハイマー病の発症機構における Aβ40とAβ42の異なる役割

アルツハイマー病は、認知症の原因のおおよそ60%を占める進行性の神経変性疾患である。APPがβおよびγセクレターゼで切断され、生じたAβが脳内に蓄積してアミロイドが沈着する。生理的条件下で産生・分泌されるAβは、主に2種類 (アミノ酸40個から成るAβ40ならびに42個から成るAβ42) あり、Aβ40:Aβ42比はほぼ10:1である。アルツハイマー病の発症機序にはアミロイドカスケード仮説が最も有力視され、広く受け入れられている。すなわち、Aβの凝集・沈着が引き金となって、それ以降の現象、すなわち神経原繊維変化、神経細胞脱落、引いては認知症を引き起こすという考え方である。この考え方は、1984年から1995年にかけて家族性アルツハイマー病原因遺伝子としてAPP、プレセニリン1、そしてプレセニリン2の3種類が発見され、この何れの遺伝子の変異もAβ42の増加、またはAβ42/Aβ40比の増加を引き起こすことが明らかになったことによって支持されている。更に、臨床病理学的研究では、大脳皮質のAβ42やアミロイド沈着の増加が認知機能障害を増悪する結果が得られている。しかし、一方で、Aβが神経保護作用を持つ分子であることを主張している研究者もいる。確かに、アミロイド沈着と認知機能障害が相関しないことや正常脳にもアルツハイマー病患者なみのアミロイド沈着が見つかっていることが知られている。また、脳内アミロイド沈着の増加に伴って酸化ストレスを表すマーカーが減少していくという報告や、脳脊髄液または血漿中のAβは脂質タンパク質の酸化を防ぐ作用を持つという報告もある。これらの状況を整理して理解することはできないだろうか。以下に筆者らの実験結果ならびに他の研究結果を基に一つの考え方を提案したい。