

- Courage, N.L., Lu, X., Cerasoli, F., Jr., Gilman, M., & Holt, D. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 10437-10442.
- 11) Koshi, Y., Nakata, E., Miyagawa, M., Tsukiji, S., Ogawa, T., & Hamachi, I. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 245-251.

築地 真也¹, 石田 学¹, 浜地 格²

(¹長岡技術科学大学

産学融合トップランナー養成センター,

²京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻)

Selective chemical labeling and engineering of endogenous cellular proteins

Shinya Tsukiji, Manabu Ishida (Top Runner Incubation Center for Academia-Industry Fusion, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan) and Itaru Hamachi (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura Campus, Nishikyō-ku, Kyoto 615-8510, Japan)

DNA 損傷刺激に応答した p53 の活性化機構における RUNX3 の新たな役割とアポトーシス誘導

1. はじめに

抗がん剤処理や放射線照射などの DNA 損傷刺激に暴露された細胞のレスポンスは、その細胞の生死を分ける重要なイベントの一つである。DNA 損傷刺激に曝された細胞の核内では、リン酸化された ataxia telangiectasia mutated (p-ATM) が損傷を受けた DNA を含むクロマチン領域のヒストン H2AX をリン酸化し、リン酸化された H2AX (γH2AX) が損傷部位に集積し、損傷部位のマーキングが迅速に行われる。その後、γH2AX と親和性の高い nuclear factor with BRCT domain 1 (NFB1)/mediator of the DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) が DNA 修復複合体を損傷部位に集積させ、損傷 DNA の修復を介して当該細胞の正常な細胞周期への復帰を促進する¹⁻³⁾。しかしながら、重篤な DNA 損傷を受けた細胞では、修復不可能と判断され p53 依存性のアポトーシス誘導経路が起動し、その細胞はアポトーシスによって生体から排除される⁴⁾。このように、p53 の活性化は特にがん細胞の抗がん剤や放射線に対する感受性の決定にあずかる重要なプロセスの一つであり、その詳細な分子機構の解明は急務である。そのためには、DNA 損傷刺激に応答して p53 の機能を制御する因

子の同定と、その詳細な機能解析が不可欠である。本稿では、ヒト胃がんのがん抑制タンパク質である RUNX3 が p53 のコアクチベーターとして機能するという新たな知見が得られたので紹介する⁵⁾。

2. RUNX ファミリーの構造と機能

RUNX3 は進化的に保存された Runt ドメインを持つ RUNX ファミリーに属する。RUNX ファミリーは、この Runt ドメインを介して様々な転写因子とヘテロダイマーを形成し、その下流標的遺伝子群の転写を特異的に制御する。哺乳類の RUNX ファミリーは RUNX1, RUNX2 および RUNX3 から構成される。これらのメンバーの生理的な機能には大きな隔たりが認められる。すなわち、これまでの報告によれば、RUNX1 および RUNX2 はそれぞれ血球系への分化および骨分化において重要な役割を担っていると考えられている。一方で、RUNX3 は胃腸管の形成および神経分化に関与している⁶⁾。注目すべきは、RUNX ファミリーの異常は様々な疾患に密接にリンクしているという事実である。RUNX1 は急性骨髄性白血病 (AML) における染色体転座の標的であり、また RUNX2 の LOH (loss of heterogeneity) は鎖骨頭蓋骨異形成の原因であるとされている⁷⁾。LOH とは、対立遺伝子の片方が染色体不安定性のために欠落する現象のことである。さらに、RUNX3 のノックアウトマウスの解析から、RUNX3 は胃がんのがん抑制遺伝子であることが指摘されている⁸⁾。

3. がん抑制遺伝子としての RUNX3

Li らは、RUNX3 のノックアウトマウスの解析から胃粘膜の過形成を見出した。次に、彼らは胃がん組織を用いた発現解析を行ったところ、RUNX3 が座位するヒト染色体 1p36 領域の LOH と、RUNX3 のプロモーター領域のメチレーションの組み合わせによる顕著な RUNX3 の発現低下を見出した。さらに、RUNX3 の変異解析を行ったところ、変異の頻度は極めて稀ではあるが、彼らは Runt ドメインをコードする領域内に R122C 変異を見出した。Runt ドメインは RUNX3 の機能発現にとって重要な意味を持つことから、R122C 変異による Runt ドメインの構造異常は、RUNX3 のがん抑制機能に大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。実際に、ヌードマウスを用いた実験から、R122C 変異は RUNX3 のがん抑制機能を顕著に阻害することが示された⁸⁾。その後の精力的な発現解析の結果、メチレーションによる RUNX3 の発現抑制は胃がんに限定されているわけではなく、肺がん、肝細胞がん、乳がん、膵

臓がんおよび前立腺がんにおいても高頻度で認められることが判明した。従って、各種がん細胞における RUNX3 の機能喪失は、主としてエピジェネティックなサイレンシングに起因するものと考えられている⁶⁾。しかしながら、RUNX3 がどのような分子機構を介して細胞のがん化を抑制するののかについては不明である。

4. 抗がん剤処理にตอบสนองした p53 依存性の アポトーシス誘導と RUNX3

我々は DNA 損傷型の抗がん剤にตอบสนองしたアポトーシス誘導過程における RUNX3 の役割を調べる目的で、siRNA による RUNX3 のノックダウンを行い、アドリアマイシンに対する各種がん細胞株の感受性の変化を MTT 法および FACS 法を用いて検討した。興味深いことに、野生型の p53 を持つ骨肉腫由来の U2OS 細胞および肺がん由来の A549 細胞では、RUNX3 のノックダウンによるアドリアマイシン感受性の明らかな低下が観察された。一方で、ウイルス由来の E6 タンパク質によって p53 が不活化されている子宮頸がん由来の HeLa 細胞、p53 が欠失している肺がん由来の H1299 細胞および骨肉腫由来の SAOS-2 細胞では、RUNX3 のノックダウンの効果は認められなかった。アドリアマイシンに暴露された U2OS 細胞では、p53 の Ser-15 のリン酸化を伴う安定性の昂進、p53 の活性化による下流標的遺伝子群の転写誘導、ならびにカスパーゼ 3 の基質の一つである PARP の切断を伴うアポトーシスの誘導が観察された。すなわち、アドリアマイシンにตอบสนองした U2OS 細胞のアポトーシスの誘導は、少なくとも p53 依存性の経路を介して実行されることになる。注目すべきは、アドリアマイシンにตอบสนองした RUNX3 の発現誘導が検出されること、および RUNX3 のノックダウンによってアドリアマイシン処理による p53 の Ser-15 のリン酸化の昂進、その下流標的遺伝子群の転写誘導および PARP の切断が顕著に阻害されたという事実である。これらの実験結果は、DNA 損傷刺激にตอบสนองした p53 の活性化のプロセスにおいて RUNX3 が必須の役割を担っていることを示している。

5. RUNX3 と p53 との複合体形成

RUNX3 の細胞内での局在は、その機能発現にとって極めて重要な意味を持っている⁹⁾。すなわち、細胞質に存在する RUNX3 は不活性型であり、一方で核に存在する RUNX3 は活性型である。そこで我々は、間接免疫染色法を用いてアドリアマイシンにตอบสนองした RUNX3 の細胞内局在の変化の有無を調べた。その結果、アドリアマイシン処

理によって RUNX3 は核内に移行し、p53 と共局在することが判明した。この実験結果は、両者が核内において複合体を形成する可能性を示唆する。この可能性を検証する目的で、アドリアマイシン処理をした U2OS 細胞から抽出液を調整し、免疫沈降/ウエスタン法による解析を行ったところ、両者は細胞内で複合体を形成することが判明した。次に、我々は両者の欠失変異体を用いて両者の結合に必須な領域の同定を試みた。RUNX3 を含む細胞の抽出液と、アイソトープで標識した p53, p53 (1-353), p53 (1-292), p53 (1-101) および p53 (102-393) を試験管内で混合しプルダウンを行ったところ、カルボキシル末端を保持した p53 のみが RUNX3 と共沈した。同様に、p53 を含む細胞の抽出液とアイソトープで標識した RUNX3, RUNX3 (1-198) および RUNX3 (1-67) を用いた試験管内結合実験から、全長の RUNX3 のみが p53 と結合することが明らかになった。従って、両者はお互いのカルボキシル末端を介して複合体を形成することが判明した。

6. RUNX3 による p53 の正の制御

p53 は細胞のアポトーシス誘導や細胞周期を停止させる機能を持つ転写因子である⁴⁾。従って、p53 の活性はその転写活性化能およびアポトーシス誘導能を調べることによって測定することが可能である。まず、p53 の転写活性化能に対する RUNX3 の効果を調べる目的で、H1299 細胞に p53 の発現ベクター、あるいは p53 の発現ベクターおよび RUNX3 の発現ベクターを導入したところ、RUNX3 との共発現によって p53 依存性の p21, BAX および p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) の明らかな転写量の増加が観察された。また、p21 あるいは BAX のプロモーター領域を含んだルシフェラーゼレポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにおいても、p53 と RUNX3 との共発現によるルシフェラーゼ活性の上昇は、p53 の単独発現によって検出されるルシフェラーゼ活性の上昇を凌駕していた。従って、RUNX3 は p53 との複合体形成を介して p53 の転写活性化能を顕著に促進することが明らかになった (図 1)。次に、p53 のアポトーシス誘導能に対する RUNX3 の効果を検討する目的で、野生型の p53 を発現する U2OS 細胞あるいは p53 を欠損した H1299 細胞に、GFP 発現ベクターおよび RUNX3 発現ベクターを導入した。GFP 陽性で、しかもアポトーシスに陥った細胞数をカウントしたところ、U2OS 細胞では RUNX3 の発現量に応じたアポトーシス細胞の明らかな増加が認められたが、その一方で H1299 細胞ではアポトーシス細胞の顕著

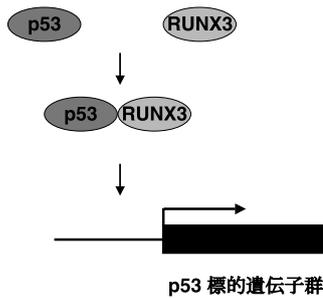


図1 複合体形成を介したRUNX3によるp53の転写活性機能の昂進

RUNX3は細胞核内においてp53と結合することによって、細胞周期停止やアポトーシス誘導に関与するp53標的遺伝子群の発現を転写レベルで正に制御する。

な増加は観察されなかった。これらの実験結果は、RUNX3がp53のコアクチベーターとして機能する可能性を示唆している。

7. RUNX3とATM

これまでの実験結果から、RUNX3によるp53の活性化の分子機構の一端は、両者の複合体形成を介したp53のSer-15のリン酸化の昂進にあることは間違いない。DNA損傷をいち早く感知し、その損傷シグナルを下流の因子群に伝達する役割を担うのはSer-1981がリン酸化されたp-ATMである。これまでの研究から、p-ATMはDNA損傷に反応してp53のSer-15のリン酸化を触媒するタンパク質リン酸化酵素の一つであると考えられている⁴⁾。事実、ATMを欠損したA-T細胞に対してアドリマイシンを処理しても、またRUNX3を過剰発現させてもp53のSer-15のリン酸化の誘導は検出されない。一方で、興味深いことにRUNX3のノックダウンはU2OS細胞におけるアドリマイシンに反応したATMのリン酸化の程度には影響を及ぼさないが、RUNX3がp-ATMと複合体を形成することを我々は見出した。この実験結果は、RUNX3がp-ATMをp53上にリクルートすることによって、p53のSer-15のリン酸化を仲介する新たな分子機構の存在を示唆する⁵⁾。

8. おわりに

DNA損傷刺激に反応したp53の活性化は、リン酸化やアセチル化などの化学修飾を介して実行される。特に、p53のSer-15を含むアミノ末端のリン酸化はMDM2の解離を促し、p53の安定化および活性化に寄与する⁴⁾。p-ATMはp53との直接結合を介してそのリン酸化を触媒することが示されているが¹⁰⁾、本稿で紹介した実験結果か

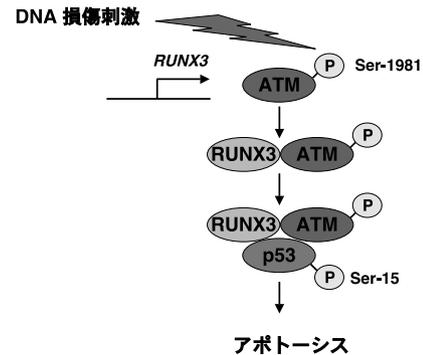


図2 DNA損傷刺激に反応したRUNX3、p53およびATMの機能的相互作用とアポトーシス誘導

DNA損傷刺激に反応してRUNX3の発現誘導が起こり、リン酸化を受け活性化されたATM (p-ATM) とRUNX3は複合体を形成する。RUNX3はp53との結合を介してp-ATMによるp53のSer-15のリン酸化を促すことによってp53を活性化させ、p53依存性のアポトーシスを引き起こす。

ら、RUNX3はp-ATMと協調してDNA損傷刺激に反応したp53のSer-15のリン酸化を誘導すると考えられる(図2)。また、定常状態においてはp53のカルボキシル末端領域が、そのDNA結合領域をマスクすることによってp53のDNA結合能を阻害している^{11,12)}。RUNX3がp53のカルボキシル末端領域に結合することから、その結合がp53のDNA結合領域を露出させることによって、p53の配列特異的な転写活性機能を昂進させる可能性が示唆される。一方で、RUNX3はTGF- β に反応して核内に移行し、Bimの発現誘導を介してアポトーシスを促進することが報告されている¹³⁾。TGF- β 依存性のアポトーシス誘導過程におけるRUNX3とp53の機能的相互作用の有無については今後の検討課題である。

謝辞：本研究の推進に際して貴重なコメントを戴きました伊藤嘉明氏（シンガポール国立大学）、宮崎勝氏（千葉大学）および井上建一氏（独協医科大学）に厚く御礼申し上げます。

- 1) Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Barte, J., & Jackson, S.P. (2003) *Nature*, 421, 952-956.
- 2) Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., & Elledge, S.J. (2003) *Nature*, 421, 961-966.
- 3) Xu, X. & Stern, D.F. (2003) *FASEB J.*, 17, 1842-1848.
- 4) Vousden, K.H. & Lu, X. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2, 594-604.
- 5) Yamada, C., Ozaki, T., Ando, K., Suenaga, Y., Inoue, K., Ito, Y., Okoshi, R., Kageyama, H., Kimura, H., Miyazaki, M., & Nakagawara, A. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 16693-16703.

- 6) Ito, Y. (2008) *Adv. Cancer Res.*, **99**, 33–76.
 7) Ito, Y. (2004) *Oncogene*, **23**, 4198–4208.
 8) Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H. M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, M., Yano, T., Ikeda, T., Ito, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S.C., & Ito, Y. (2002) *Cell*, **109**, 113–124.
 9) Ito, K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yano, T., Tada, K., Ida, H., Huang, C., Shah, N., Inoue, M., Rajnakova, A., Hiong, K.C., Peh, B.K., Han, H.C., Ito, T., Teh, M., Yeoh, K.G., & Ito, Y. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 7743–7750.
 10) Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Lees-Miller, S.P., & Lavin, M.F. (1998) *Nat. Genet.*, **20**, 398–400.
 11) Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., & Lane, D.P. (1992) *Cell*, **71**, 875–886.
 12) Friend, S. (1994) *Science*, **265**, 334–335.
 13) Yano, T., Ito, K., Fukamachi, H., Chi, X.Z., Wee, H.J., Inoue, K., Ida, H., Bouillet, P., Strasser, A., Bae, S.C., & Ito, Y. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 4474–4488.

尾崎 俊文, 山田 千寿, 中川原 章
 (千葉県がんセンター研究所)

A novel role of RUNX3 in the regulation of p53-mediated apoptosis in response to DNA damage

Toshinori Ozaki, Chizu Yamada and Akira Nakagawara
 (Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuoh-ku, Chiba 260-8717, Japan)

投稿受付：平成 23 年 2 月 9 日

新規ラジカル反応を用いた細胞膜上分子間相互作用の解析

1. はじめに

細胞は生体を構成する最も基本的な単位である。例えば、ヒトの体は約 60 兆個の細胞の集合体であるといわれており、個々が整然と協調し機能を果たすことにより正常な生体機能が維持される。近年では、京都大学の山中伸弥教授らによって作製された人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell ; iPS 細胞) など、細胞生物学の目覚ましい発展により、様々な細胞を実験的に作り出すことが可能となり、多様な視点から個々の細胞機能について研究することが可能となっている。

一方、細胞下のレベルに視点を移すと、細胞は様々な細胞小器官、さらにはタンパク質・脂質・糖質などの様々な

生体分子から構成されている。興味深いことに、生体と細胞の関係と同じく個々の生体分子は相互作用し協調的に働くことで細胞機能に影響を与えている。従って、現在では生体分子個々の研究に加え、異なる生体分子同士の相互作用研究 (interactome) が注目されている。

このような背景の下、筆者らは細胞膜上に存在する生体分子の相互作用 (細胞膜上分子間相互作用) に焦点を当て、これらの解析法の開発および相互作用によって細胞機能がどのような影響を受けているかに注目し研究を進めてきた。本稿では、筆者らの研究の背景および新規に開発した「細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法」を中心に解説し、細胞膜上分子間相互作用が今後の生物学の発展にどのように寄与できるかについての展望を述べる。

2. 細胞膜上分子間相互作用

細胞の構造物を包んでいる細胞膜は外界との区切りとしての役割に留まることなく、外界からの物質輸送やシグナル伝達に関与している。細胞膜には細胞機能にとって重要な役割を果たしている多数の“細胞膜上分子”が埋没した状態で存在する。Singer と Nicolson の流動モザイクモデル¹⁾によると、これら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイナミックに自由運動している。これらの運動により、特定の生体分子同士が非常に短い一定時間内に膜上において会合、拡散を繰り返し相互作用している事象が観察されている (図 1)。

これらの「細胞膜上分子間相互作用」およびその結果形成される生体分子の集合体 (一般的には脂質ラフトや膜マイクロドメインと呼称される) は細胞内シグナル伝達機構に寄与していることや、細胞増殖やウイルス感染、免疫機構などの細胞機能ひいては生体機能にとっても重要な役割を果たしていることが示唆されている²⁾ (図 1)。従って、細胞膜上分子間相互作用の意義について研究するためには、第一にどのようなタイミングで、どのような細胞膜上分子が相互作用しているかを知る必要がある。

3. 細胞膜上分子間相互作用の解析

実際の細胞膜上分子間相互作用の解析法は、1) 主に生化学的な実験手法により相互作用分子を解析・同定する方法、2) 研究対象の任意分子を様々な方法で標識することにより形態学的に相互作用を観察する方法、の二つに大別される。1) では、免疫沈降法および detergent-insoluble membrane (DIM) 法³⁾がよく用いられる。前者は任意の細胞膜上分子について、抗体を用いて免疫沈降し、同時に沈