



ATM/IKK- α /p73 経路：新たな p53 非依存性アポトーシス誘導制御

1. はじめに

1997年に分離、同定された p73 はがん抑制遺伝子産物である p53 の新たなファミリーメンバーであり、p53 と同様に核内転写制御因子として機能し、がん細胞の細胞周期停止や細胞死（アポトーシス）を誘導する生物活性を持つ^{1,2)}。p53 の機能喪失を伴う遺伝子変異は約 50% のヒト腫瘍組織で検出されるが、我々が行った精力的な変異解析の結果、腫瘍組織における p73 の変異は極めて稀であることが判明した。従って、p53 とは異なり p73 は多くの腫瘍組織において正常型として発現していることになる³⁾。制がん剤処理や放射線照射に伴うがん細胞死に伴って、p73 の発現量は上昇するが、この現象は主としてタンパク質レベルでの安定化に起因する。刺激の無い状態での p73 の発現量は極めて低いレベルで維持されている。細胞死誘導活性を持つ p73 を低レベルで維持しておくことは細胞の生存（サバイバル）にとっては必須な条件であると言える。一方で、がん組織で正常型として発現する p73 の安定化を促す仕組みの解明は、新たながん治療法の開発の糸口になるものと期待される。本稿では、p73 のタンパク質としての安定化を制御する仕組みについての新たな知見を紹介したい。

2. p73 の発現量

逆転写 PCR を用いた mRNA レベルでの発現解析は別にして、DNA 損傷を伴う刺激を与えない条件下で、内在性の p73 を一般的なストレートウェスタン法を用いて検出することは一部の培養細胞（COS7, HEK293 および HEK293 T 細胞）を除いて極めて困難である。従って、定量性には欠けるものの免疫沈降法を用いて内在性の p73 を検出する

のが常法となっているのが現状である。La Tangué らの研究チームは、培養細胞にプロテアソームの阻害剤を添加すると p73 の安定性が顕著に昂進することを見いだした⁴⁾。彼らの実験結果は、p53 と同様に p73 のタンパク質レベルでの制御がユビキチン/プロテアソーム系を介して実行されていることを物語っている。同時期に、Lu らの研究チームは p53 に対する E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 (murine double minute 2) の p73 に対する効果を調べる過程で意外な事実と直面することになった⁵⁾。すなわち、MDM2 は p53 と同様に p73 によってもその発現が誘導される標的遺伝子産物の一つであり、さらに MDM2 は p73 のアミノ末端近傍に結合しその転写制御因子としての活性および細胞死誘導因子としての活性を著しく阻害するが、驚くべきことに MDM2 は p73 の分解を促進する機能を持たず、むしろ p73 のタンパク質としての安定化を促すという実験結果であった。その後、相次いで報告された関連論文はほとんど全てと言っていいぐらいに彼らの実験結果を支持するものであった。それでは、p73 に対する E3 ユビキチンリガーゼの正体は一体何者なのであろうか。その疑問に万人が納得する回答を得る目的で多くの研究者達がしのぎを削ることになった。

3. Itch の発見

p53 のタンパク質としての安定化の仕組みの一つは、DNA 損傷に応答して p53 のアミノ末端の複数のセリン残基がリン酸化されることによって、MDM2 と p53 との結合が阻害されることにある。従って、リン酸化を含めた化学修飾が p53 の安定化において極めて重要な役割を果たしていると言える⁶⁾。1999年に、非受容体型チロシンキナーゼである c-Abl による p73 のチロシン 99 のリン酸化が p73 の安定化および活性化に関与していることを示唆する報告がなされた⁷⁾。また、2002年および2003年には PKC の触媒サブユニットによる p73 のセリン 289 のリン酸化および Chk1 (checkpoint effector kinase 1) による p73 のセリン 47 のリン酸化が、p73 の安定化ならびに活性化に必須であることが示された^{8,9)}。これらの実験結果は、p53 と同様に DNA 損傷に応答した p73 のリン酸化がその安定化や活性化に寄与していることを強く示唆する。しかしながら、p73 の分解を触媒する E3 ユビキチンリガーゼの正体は未だに不明であった。ようやく 2005 年になって、Melino らの研究チームがついに p73 に対する E3 ユビキチンリガーゼの候補の一つとして HECT (homologous to E6AP carboxyl terminus) タイプの E3 ユビキチンリガーゼである Itch の

同定に成功した¹⁰⁾。彼らは p73 のカルボキシル末端近傍に存在する PY モチーフに着目し、ファージディスプレイ法を用いて p73 の PY モチーフに結合する細胞性タンパク質因子を探索することによって Itch にたどり着いた訳である。彼らの実験結果によれば、Itch はその WW ドメインを介して p73 の PY モチーフに結合し、そのユビキチン化を誘導しプロテアソームによる分解を促進する。また、DNA 損傷に伴って Itch の発現は p73 の発現レベルとは逆相関することが示されている。従って、現時点においては Itch が p73 のユビキチン/プロテアソームを介した分解を触媒する E3 ユビキチンリガーゼの最有力の候補であると考えられている。

4. DNA 損傷にตอบสนองした IKK- α と p73 の発現

我々の研究室では、制がん剤にตอบสนองしてその発現レベルが顕著に変化する遺伝子群の解析を精力的に行ってきた。ヒト骨肉腫由来の細胞株である U2OS 細胞を制がん剤の一つであるシスプラチンで処理すると、細胞は時間及び濃度依存的に細胞死に陥る。シスプラチン処理後、経時的に粗抽出液を調整しウェスタン法あるいは免疫沈降法を用いて様々なタンパク質の発現量の変化を解析したところ、興味

深いことに p73 の発現誘導と IKK- α のそれとがほぼ一致していることに我々は気づいた。一般的に、IKK- α は細胞外からの刺激にตอบสนองして活性化される I κ B kinase complex (IKK complex) の構成メンバーの一つであり、細胞質に存在して細胞の生存に関与する転写因子である NF- κ B と結合し、その核内移行を阻害する I κ B のリン酸化を介してその分解を誘導し、NF- κ B の核内移行を促す役割を担う分子である (図 1)。興味深いことに、シスプラチン処理によって細胞質に存在する I κ B の量は顕著に減少するが、NF- κ B の核内移行は阻害される。その具体的な分子機構については未解決の課題ではあるが、シスプラチンによる細胞死誘導過程において、NF- κ B を介した細胞生存シグナルが遮断されるという現象は理にかなっていると考えられる。一方で、シスプラチンにตอบสนองした IKK- α の発現誘導は意外なことに細胞核内で観察された。間接免疫染色法を用いた解析から、IKK- α は細胞質のみならず核マトリックスにも存在し、しかも核マトリックス上で p73 と共局在していることが明らかとなった。この実験結果は IKK- α が核マトリックス上で p73 と結合し、p73 の活性を制御する可能性を強く示唆するものであった。2003 年になって、IKK- α が細胞核内においてヒストン H3 をリン酸

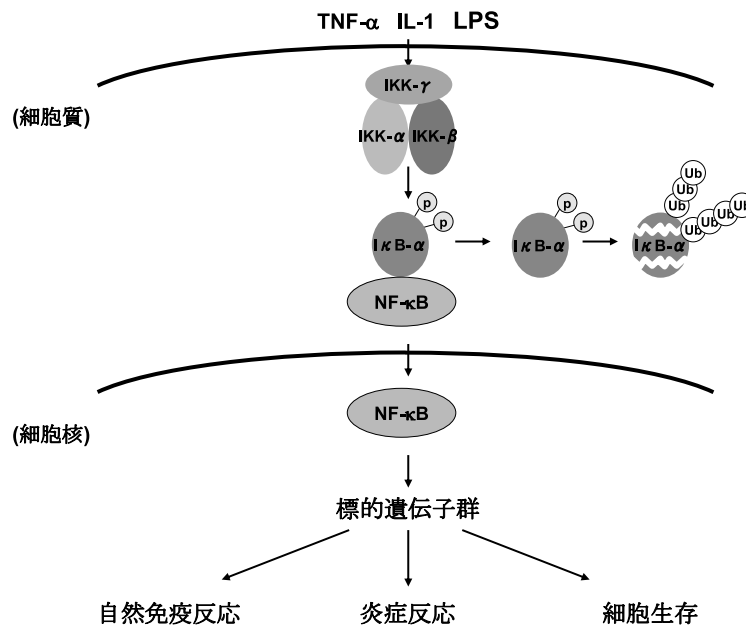


図 1 細胞外からの刺激にตอบสนองした NF- κ B の活性化機構

細胞外からの刺激にตอบสนองして細胞質に存在する IKK complex が活性化され、I κ B の分解を誘導し、細胞質に局在していた細胞生存因子である NF- κ B が細胞核内へ移行し本来の転写因子としての活性を発現し、細胞の生存を含めた様々な細胞活動に関与する。

化することによって NF- κ B の標的遺伝子群の転写を促進することが相次いで報告された^{11,12)}。これらの実験結果は IKK- α の新たな細胞核内での生理機能の存在を示すものであり画期的な発見であったと言える。従って、我々が観察していた細胞核内における IKK- α と p73 との相互作用を示唆する実験結果も、あながちの外れな現象を見ていた訳ではないと考えられた。

5. IKK- α による p73 の安定化と活性化

シスプラチンで処理した U2OS 細胞由来の粗抽出液を用いた免疫沈降実験の結果、内在性の IKK- α と p73 との複合体形成の可能性が示唆された。また、過剰発現系を用いた免疫沈降実験の結果も上記の実験結果を支持するものであった。この過剰発現系での実験の過程で、我々は IKK- α の容量依存的に p73 の安定性が増加することに気が付いた。この IKK- α による p73 の安定化はそのユビキチン化の阻害に起因することが判明した。さらに、野生型の MEF (mouse embryonic fibroblast) とは対照的に、IKK- α のノックアウトマウス由来の MEF をシスプラチンで処理しても内在性の p73 の安定化は認められなかった。加えて、野生型の MEF に比べて IKK- α のノックアウトマウス由来の MEF では、シスプラチンに対する感受性が顕著に低下していた。これらの実験結果は、IKK- α の欠損によってシスプラチンにตอบสนองした p73 のタンパク質としての安定化が阻害されたことに起因するものと考えられた。p73 にレスポンスするプロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイの結果は予想通り、IKK- α との共発現による p73 の転写活性化能の上昇を示していた。同様に、トリパンプルーの取り込みの有無を指標としたアポトーシスアッセイの結果も、IKK- α との共発現による p73 の細胞死誘導能の昂進を示していた。従って、DNA 損傷に伴って IKK- α は細胞核内に蓄積して p73 の安定化を介してその生物活性を正に制御することが明らかになった¹³⁾。

6. IKK- α による p73 のリン酸化

IKK- α はセリン/スレオニンキナーゼであり、その代表的な基質は前述の通り I κ B である。我々は IKK- α による p73 の制御におけるそのキナーゼ活性の意義を調べる目的で、キナーゼ活性を欠いた人為的変異体 IKK- α (K44A) を作成し、p73 の安定性および活性に及ぼす効果を調べた。免疫沈降法による解析の結果は p73 と IKK- α (K44A) との安定な複合体の形成を示唆するものであった。しかしながら、このキナーゼ活性を欠いた変異体は p73 の転写活性

化能および細胞死誘導能に対しては有為な効果を及ぼすことはなかった。従って、IKK- α による p73 のリン酸化がその活性や安定性の制御に必須であることが想定された。Kalin の報告によれば、IKK- α によるリン酸化の標的配列は DSG ψ XS (ψ : 疎水性アミノ酸) となっている¹⁴⁾。我々は IKK- α による p73 のリン酸化の有無を調べる目的で系統的な p73 の欠失変異体を GST 融合タンパク質として作成し、それらを基質として精製された活性型 IKK- α を用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果は明らかに IKK- α は p73 (1-62) をリン酸化しようというものであった。p73 のアミノ酸配列を改めて検索してみたところ、上記の標的配列に類似したアミノ酸配列を p73 上に見いだすことは出来なかった。しかしながら、IKK- α によってリン酸化を受けるヒストン H3 上にも上記の標的配列に類似したアミノ酸配列が存在しないことから、IKK- α によるリン酸化の標的配列には多様性が存在することが示唆された¹³⁾。

7. DNA 損傷にตอบสนองした ATM (ataxia telangiectasia mutated) による IKK- α の核内蓄積とリン酸化

それでは DNA 損傷にตอบสนองした IKK- α の核内蓄積がどのような分子機構を介して実行されるのかを解析することが次の課題となる。我々は PI3 キナーゼファミリーのメンバーである ATM に着目して研究を引き続き行った。免疫沈降法による解析の結果、ATM は IKK- α と共沈することが明らかとなった。また、PI3 キナーゼファミリーメンバーの阻害剤の一つであるワートマニンでヒト肝細胞がん由来の HepG2 細胞を処理したところ、シスプラチンにตอบสนองした IKK- α および p73 の核内蓄積が顕著に抑制された。さらに、ATM を欠いた A-T 細胞では DNA 損傷に伴う IKK- α および p73 の核内蓄積が観察されなかった。ATM は DNA 損傷にตอบสนองして活性化されるセリン/スレオニンキナーゼであり、その代表的な基質はがん抑制タンパク質である p53 である。ATM によるリン酸化の標的配列は S/TQ であると考えられている。IKK- α のアミノ酸配列を詳細に調べたところ、IKK- α 上には 6 箇所の ATM の標的配列と考えられる配列が存在していた。そこで、IKK- α が ATM の基質の一つであるか否かを調べる目的で、それぞれの標的配列のセリンあるいはスレオニンをアラニンに置換した人為的変異体を GST 融合タンパク質として合成し、シスプラチンで処理した HeLa 細胞から免疫沈降法で精製した活性型 ATM を用いて、ATM による IKK- α のリン酸化の有無を *in vitro* キナーゼアッセイ法で検討した。その

結果, IKK- α のセリン 473 が ATM によってリン酸化される可能性が示唆された. 加えて, IKK- α のノックアウトマウス由来の MEF をシスプラチンで処理したところ, ATM の活性化の誘導を検出することは認められたが p73 の核内蓄積を観察することは出来なかった. 従って, これらの実験結果により DNA 損傷シグナルが活性型 ATM によるリン酸化を介して IKK- α に伝達され, 活性型 IKK- α による p73 の核内蓄積が誘導されることによって細胞死が実行されるという新たな細胞死誘導機構の存在が想定された (図 2)¹⁵⁾.

8. おわりに

IKK- α による p73 の安定化は, そのユビキチン化の阻害にあると考えられる. 前述した通り p73 に対する E3 ユビキチンリガーゼとしては HECT タイプの E3 ユビキチンリガーゼである Itch が現時点では最有力の候補であることは間違いない. IKK- α による p73 との結合を介したリン酸化が Itch による p73 のユビキチン化の誘導を阻害するの可否については不明であり今後の研究課題の一つであると言えよう. あるいは, Itch 以外の E3 ユビキチンリガーゼの存在も否定することは出来ない. 実際に, p53 に対する

E3 ユビキチンリガーゼは MDM2 だけではないことが最近になって報告されている. 我々の研究結果によれば, IKK- α は p53 の安定化および活性化に対しては影響を及ぼさない. 従って, IKK- α と p73 の機能的相互作用は極めて特異性の高いものであると考えられる. 我々が調べた限りでは, DNA 損傷にตอบสนองした IKK- α による p73 の安定化を伴う活性化は, がん細胞の p53 の変異の有無に関わらず観察されることから, 我々の研究結果はがん細胞において正常型として発現する p73 の活性化の仕組みの一端を明らかにしたものであり, 将来的にはがん治療の現場において大きな問題となっている制がん剤に対するがん細胞の耐性克服に貢献するものと期待される.

本研究は, 当時大学院生であった古屋一茂氏 (山梨大学医学部) および吉田佳織氏 (東京医科歯科大学歯学部) が中心になって行われたものである. また, 本研究を支えてくれた多くの研究者の皆様へ深く感謝致します.

- 1) Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalou, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., & Caput, D. (1997) *Cell*, 90, 323-331.

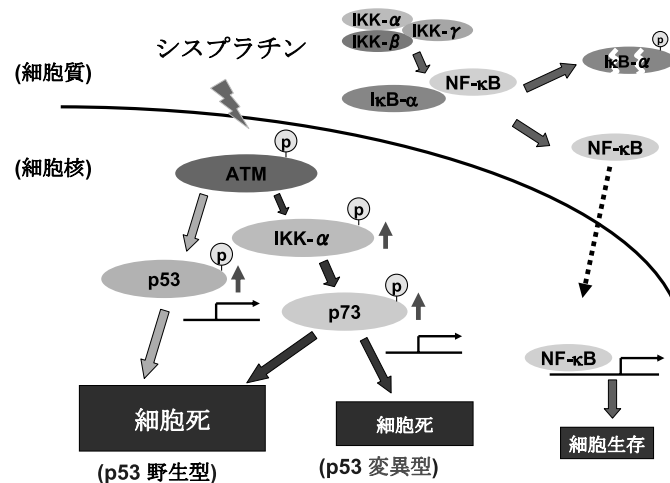


図 2 DNA 損傷刺激にตอบสนองした ATM/IKK- α の活性化を介した p73 の新たな誘導機構

シスプラチン処理に起因する DNA 損傷にตอบสนองして, ATM がリン酸化され活性化される. リン酸化された ATM は細胞核内で IKK- α との結合を介してそのセリン 473 をリン酸化する. 活性化された IKK- α は p73 のアミノ末端領域をリン酸化することによって, その転写活性化能および細胞死誘導能を昂進させる. 一方で, シスプラチン処理によって I κ B の分解は促進されるが, 細胞生存因子である NF- κ B の核内移行は未知の仕組みによって阻害される (点線).

- 2) Ozaki, T. & Nakagawara, A. (2005) *Cancer Sci.*, 96, 729-737.
- 3) Ikawa, S., Nakagawara, A., & Ikawa, Y. (1999) *Cell Death Differ.*, 6, 1154-1161.
- 4) Lee, C.W. & La Thangue, N.B. (1999) *Oncogene*, 18, 4171-4181.
- 5) Zeng, X., Chen, L., Jost, C.A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W.G. Jr., Oren, M., Chen, J., & Lu, H. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, 19, 3257-3266.
- 6) Vousden, K.H. & Lu, X. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2, 594-604.
- 7) Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, W. G. Jr., Levrero, M., & Wang, J.Y. (1999) *Nature*, 399, 806-809.
- 8) Ren, J., Datta, R., Shioya, H., Li, Y., Oki, E., Biedermann, V., Bharti, A., & Kufe, D. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 33758-33765.
- 9) Gonzalez, S., Prives, C., & Cordon-Cardo, C. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, 23, 8161-8171.
- 10) Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D.R., Liu, Y. C., Vousden, K.H., Cesareni, G., & Melino, G. (2005) *EMBO J.*, 24, 836-848.
- 11) Yamamoto, Y., Verma, U.N., Prajapati, S., Kwak, Y.T., & Gaynor, R.B. (2003) *Nature*, 423, 655-659.
- 12) Anest, V., Hanson, J.L., Cogswell, P.C., Steinbrecher, K.A., Strahl, B.D., & Baldwin, A.S. (2003) *Nature*, 423, 659-663.
- 13) Furuya, K., Ozaki, T., Hanamoto, T., Hosoda, M., Hayashi, S., Barker, P.A., Takano, K., Matsumoto, M., & Nakagawara, A. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 18365-18378.
- 14) Karin, M. (1999) *Oncogene*, 18, 6867-6874.
- 15) Yoshida, K., Ozaki, T., Furuya, K., Nakanishi, M., Kikuchi, H., Yamamoto, H., Ono, S., Koda, T., Omura, K., & Nakagawara, A. (2008) *Oncogene*, 27, 1183-1188.

尾崎 俊文, 中川原 章

(千葉県がんセンター研究所がん遺伝子研究室)

p53-independent apoptosis through a novel ATM/IKK- α /p73-mediated apoptotic pathway

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

投稿受付：平成 19 年 10 月 25 日

損傷DNA前駆体の誘発変異とヌクレオチド プール浄化酵素/DNA修復酵素による抑制

はじめに

酸素呼吸を行う生物(細胞)は、エネルギー代謝の面で有利な反面、内なる敵である活性酸素の絶え間なき産生という問題に直面している。また、活性酸素はある種の化学

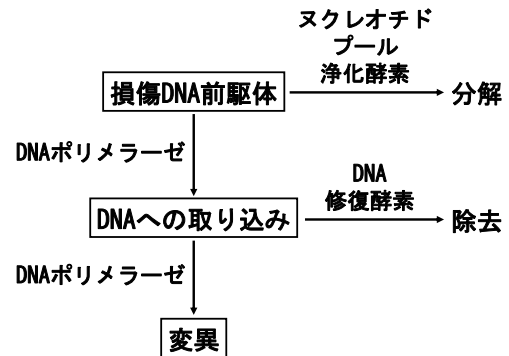


図1 損傷DNA前駆体の変異を誘発する経路とその抑制機構

物質や放射線的作用によっても生ずる。活性酸素により様々な種類のDNA損傷が生じ、個々の損傷についての変異誘発能が調べられている¹⁾。DNA損傷の生成は、変異・発がん・神経変性・老化の過程と関係があると広く認識されている。

DNA前駆体であるデオキシリボヌクレオシド-三リン酸も活性酸素により酸化され、種々の損傷DNA前駆体が生成すると考えられる。生じた損傷DNA前駆体は、DNAに取り込まれて変異を誘発する(図1)。本稿では、活性酸素によってdGTPから生ずる8-ヒドロキシ-dGTP(8-OH-dGTP)とdATPから生ずる2-ヒドロキシ-dATP(2-OH-dATP)の変異誘発能について述べる。また、損傷DNA前駆体が誘発する変異を抑制する、ヌクレオチドプール浄化酵素及びDNA修復酵素についても言及する(図1)。

1. 損傷DNA前駆体の重要性

著者らは、試験管内酸化反応において、DNA前駆体(dGTP/dATP)がDNAよりも数倍~数十倍酸化されることを見出した²⁾。細胞内では、ヒストン等のタンパク質がDNAを保護しているため、DNAの反応性はさらに低下していると考えられる。したがって、損傷DNA前駆体は従来考えられていた以上に、活性酸素による変異の誘発に大きく関与している可能性がある。大腸菌DNA中の酸化塩基8-ヒドロキシグアニンの蓄積には、DNAの直接酸化とヌクレオチドプール中の8-OH-dGTPの取り込みが、同程度に寄与している³⁾。布柴らは、細胞内に活性酸素や鉄が蓄積していると考えられる *sodA sodB fur* 三重欠損大腸菌株で観察される自然突然変異は、8-OH-dGTP及び2-OH-dATPが原因で生ずることを種々の実験から結論している⁴⁾。これらの結果は、損傷DNA前駆体が生物学的に非常に重要であることを示している。