

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770178
 研究課題名 (和文) DNA 損傷時における p53 の新規標的遺伝子産物による細胞分裂期の制御機構の解析
 研究課題名 (英文) Mitotic regulation by novel p53 target gene product
 研究代表者
 佐藤 (織田) 恵理 (SATO (ODA) ERI)
 日本医科大学・老人病研究所・講師
 研究者番号：90339440

研究成果の概要：

癌抑制因子 p53 の発現レベルは通常非常に低く保たれているが、DNA 損傷などのストレス刺激や癌遺伝子の活性化などにより安定化され転写調節因子として標的遺伝子の発現を誘導し、細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシスの誘導を行うことが知られている。本研究で、DNA 損傷時に、p53 依存的に Cullin3 を中心とする複合体型 E3 ユビキチンリガーゼのサブユニットであるクロン#130 の発現が誘導され、基質である#130-BP1 をプロテアソーム分解経路により分解し Aurora-A を不活性化することにより G2 期から分裂期への進行を抑制するという、新たな抑制機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期、p53、ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

癌抑制因子 p53 の発現レベルは通常非常に低く保たれているが、DNA 損傷などのスト

レス刺激や癌遺伝子の活性化などにより安定化され、転写調節因子として標的遺伝子の発現を誘導し、細胞周期の停止、DNA 修復、

アポトーシスの誘導を行うことが知られている。私は、マイクロアレイ法により、p53 依存的に抗癌剤アドリアマイシンにより発現誘導される遺伝子群 18 種類を単離した。そのうちクローン#130 は Cullin3 を中心とする複合体型 E3 ユビキチンリガーゼの新規サブユニットであった。これまでに、p53 の誘導因子でユビキチンリガーゼとして機能する蛋白質は、MDM2 や Pirh2 などが知られている。これらの蛋白質は、p53 の誘導因子でありながら、p53 をユビキチン化し分解を促進させ、フィードバック抑制機構によって p53 の蛋白質の量を調節するのに働いている。一方、#130 は、p53 自身の分解には関与しておらず、別の標的蛋白質の分解に関与していると考えられた。そこで、#130 を bait とした yeast two-hybrid 法によりこの蛋白質の基質の同定を行った。その結果、#130 に結合する蛋白質#130BP-1 を単離した。これまでに、過剰発現系で、#130BP-1 は#130 に結合し、ユビキチン化され分解されることを明らかにした。またこの分解はプロテアソームインヒビターにより阻害される。また、#130-BP1 は分裂期に中心体に局在することが観察され、中心体の制御に関与することが示唆された。

Aurora-A は G2 期より中心体に集積し始め、その後分裂前期の核に移行する。核膜崩壊後は紡錘体極とそこから伸びる紡錘体上に集積し、分裂後期の開始とともに分解され、細胞分裂が終わるとほとんど検出されなくなる。Aurora-A は中心体成熟に不可欠であることが知られている。前述のとおり、#130-BP1 は中心体の制御に関与する可能性

が考えられたので、Aurora-A と結合を調べたところ、#130-BP1 は Aurora-A と結合した。更に、in vitro kinase アッセイ法により #130-BP1 は Aurora-A のキナーゼ活性を上昇させ、また、同時に#130 を過剰発現させると Aurora-A のキナーゼ活性を抑制することを見出した。また、HeLa 細胞にチミジンを添加し、G1/S 期に同調させ、チミジン除去により細胞周期を進行させると同時に #130 をアデノウイルスによる発現系により発現させ、細胞周期の進行を FACS 解析により調べたところ、G2/M 期の遅延が起きることが分かった。

2. 研究の目的

これまでの研究より、通常#130-BP1 は分裂期に中心体に存在し、Aurora-A の機能を補佐する役割をしているが、DNA 損傷時には、p53 依存的に#130 の発現が誘導され、#130-BP1 をプロテアソーム分解経路により分解し Aurora-A を不活性化することにより G2 期から分裂期への進行を抑制するのではないかと考えた。

本研究において、この経路について詳しく解析し、DNA 損傷時における p53 の新規標的遺伝子産物による新たな細胞分裂期の制御について明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) #130BP-1 の M 期での役割を調べる。

①#130BP-1 の発現を RNAi 法により抑え、細胞分裂への影響を調べる。具体的には、HeLa 細胞にチミジンを添加し、G1/S 期に同調させ、RNAi 法により#130 BP-1 の発現を

抑え、細胞周期を FACS 法により調べる。また、タイムラプスにより細胞分裂の様子を観察する。

②#130BP-1 のない細胞での Aurora-A の局在を免疫染色法により調べる。また、中心体の複製、分離が正常に起きるかについても免疫染色法により調べる。

(2) #130BP-1 のリン酸化部位を同定する。

①予測リン酸化部位の変異体を作製し、キナーゼアッセイ法によりリン酸化部位を特定する。

②リン酸化抗体を作製し、Aurora-A によってリン酸化されるか、また、M 期でリン酸化されるかを検討する。

③リン酸化の意義について、リン酸化部位のアラニン変異体を作製し、検討する。

4. 研究成果

DNA 損傷時に p53 により誘導されるクローン #130 は、ユビキチンリガーゼのサブユニットで、これまでに、基質として #130BP-1 を単離した。過剰発現系で、#130BP-1 は #130 に結合し、ユビキチン化され分解されることを明らかにした。RNAi 法により #130BP-1 の発現を抑えた細胞において細胞周期の進行を調べたところ、G2/M 期の遅延が起きることが分かった。また、免疫染色により染色体の状態を調べたところ、metaphase 期に染色体の整列が正常に起きていないことが分かった。また、#130BP-1 は中心体に局在し、分裂期キナーゼ Aurora-A と結合し、キナーゼ

活性を上昇させる。また、#130BP-1 は、Aurora-A によってリン酸化されることを見出した。さらに、リン酸化部位を同定し、抗リン酸化抗体を作製し、Aurora-A によりリン酸化されることを明らかにした。このリン酸化部位の変異体を作製し、RNAi 法により #130BP-1 のない細胞に導入し、M 期進行における影響を調べたところ、M 期進行が起きにくくなることが分かった。以上のことから、通常 #130BP-1 は分裂期に中心体に存在し、他の活性化タンパクとともに、Aurora-A の機能を補佐する役割をしているが、DNA 損傷時には、p53 依存的に #130 の発現が誘導され、#130BP-1 をプロテアソーム分解経路により分解し Aurora-A を不活性化することにより G2 期から分裂期への進行を抑制するという、新たな抑制機構を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Oda-Sato E, Tanaka N., Abnormal Centrosome Amplification and Aurora-A Activation in p53-deficient Cells., J. Nippon Med. Sch., 74, 2007, 234-235, 査読 無
- ② Abe Y, Oda-Sato E, Tobiume K, Kawachi K, Taya Y, Okamoto K, Oren M, Tanaka N., Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 105, 2008,
4838-4843, 査読 有

- ③ Yagi S, Oda-Sato E, Uehara I, Asano Y,
Nakajima W, Takeshita T, Tanaka N.,
5-Aza-2'-deoxycytidine restores
proapoptotic function of p53 in cancer
cells resistant to p53-induced apoptosis,
Cancer Invest., 26, 2008, 680-688, 査読
有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 佐藤(織田) 恵理、Mitotic regulation by
novel p53 target gene product、第 30 回
日本分子生物学会年会、2007 年 12 月 14
日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 (織田) 恵理 (SATO(ODA) ERI)

日本医科大学・老人病研究所・講師

研究者番号：90339440

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者