

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370083

研究課題名（和文）ALK キナーゼによるがん抑制因子 p53 のチロシンリン酸化と転写活性化の抑制機構

研究課題名（英文）Inhibitory mechanism of p53 transactivation by anaplastic lymphoma kinase (ALK) through direct p53 tyrosine phosphorylation

研究代表者

江成 政人（ENARI MASATO）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：90294058

研究成果の概要（和文）：リンパ腫や肺癌において、ある種の染色体転座が認められており、その転座はがん化を促進することが知られている。この原因遺伝子は、がん促進因子を活性化する一方で、がん抑制因子の働きを阻害すること、そして、がん化に重要ながん抑制因子を直接的にリン酸化することで、その機能を阻害していることを私達は発見した。また、その機能阻害には、がん抑制因子の細胞質への集積の増強が関与していると推察された。

研究成果の概要（英文）：Certain chromosomal translocations have been found in lymphomas and lung cancers and their translocations are known to promote tumor formation. We found that translocated genes have both abilities to activate oncogenic factors and to inactivate tumor suppressors. Moreover, we found that pathologically activated genes by translocations inhibit an important tumor suppressor through its direct phosphorylations and that these phosphorylations inactivate the tumor-suppressive function through enhancement of cytoplasmic retention of the tumor suppressor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写

## 1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 p53 はヒト癌の 50% で変異が認められ、p53 を正もしくは負に調節する制御因子をコードする遺伝子の変異を合わせると 85% 程度の癌で p53 経路の失活が起

っている。例えば、神経芽腫の多くは p53 遺伝子に変異は認められないが、p53 の負の制御因子であるがん遺伝子 Mdm2 や MdmX といった遺伝子の増幅が報告されている。p53 は Ras 等のがん遺伝子産物によって活性化される

ことで、細胞増殖の停止や細胞老化を引き起こし、がん化を抑制していると考えられている。そのため、がん化を起こすためには、p53経路の失活が極めて重要である。一方でがん遺伝子産物はそれ自身細胞増殖のシグナルを伝達すると共にp53の活性化を抑制することが示唆されているが、その機構に関して実はあまりよくわかっていなかった。

未分化大細胞リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma, ALCL) では p53 の変異があまり認められていないが、ALCL で p53 タンパク質が蓄積していることが多いことが報告されていた。ALCL において、主に anaplastic lymphoma kinase ( ALK ) 遺伝子と nucleophosmin (NPM) や clathrin heavy chain (CHC) 等の遺伝子間での転座が生じており、この転座によって生じる遺伝子産物が ALCL 発症に深く関わっていると考えられていた。ALK は細胞膜貫通型チロシンキナーゼファミリーに属するタンパク質であるが、転座によって生じる融合タンパク質では、細胞膜貫通領域はなく、NPM や CHC と細胞内領域のチロシンキナーゼを含む領域との融合タンパク質として細胞内に発現する。

私達は以前の研究から CHC は核内に存在し、p53 を介した転写のコアクチベーターとして機能することを報告した。そこで転座によって生じる CHC-ALK 融合タンパク質が p53 の転写活性化に影響を与えるかどうか検討したところ、その融合タンパク質が p53 の転写活性化能を抑制すること、そして、意外なことに、核内に存在する ALK のチロシンキナーゼ活性がその抑制には必要であることを発見した。また、ALK が p53 内にあるチロシン残基をリン酸化することも見出しており、p53 のチロシンリン酸化は世界で初めての報告であった。

## 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、平成 21 年度から平成 23 年度の 3 年間にわたり、ALK による p53 転写活性化の抑制機構を解明することを目的とした。具体的には、ALK チロシンキナーゼが p53 をリン酸化することを抗ホスホチロシン抗体で検出されたことから、まず、p53 のどの部位のチロシン残基がリン酸化されているか遺伝子工学的手法を用いて同定した。また、同定した p53 のチロシン残基のリン酸化が、実際 ALK によってリン酸化されるか、そして、そのリン酸化部位をフェニルアラニンに置換した p53 変異体が ALK による p53 転写活性化の抑制が解除されるかどうか調べるとともに、その阻害がどのようなメカニズムで起こっているのかを解明することを目的とした。これらの研究は、ALCL 発症の機構解明ばかりでなく、p53 研究の新たな制御機構の解明に発展していくこ

とが期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下のことについて実施した。まず p53 のどのチロシン残基が ALK によってリン酸化修飾を受けるか p53 の欠失変異体及びチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体をそれぞれ用いて調べた。その解析には、p53 欠損細胞に FLAG エピトープタグしたヒト p53 と ALK 融合蛋白質を発現させ、その細胞抽出液を調製する。そして、その細胞抽出液から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、抗ホスホチロシン抗体を用いてウエスタンブロットを行い、チロシンリン酸化部位の同定を試みた。

ヒト p53 のチロシンリン酸化部位を同定した後、その部位特異的な抗体の作製に着手した。すなわち、p53 の欠失変異体及びチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体を用いた解析より同定された 3 カ所のホスホチロシンに対する部位特異的な抗体を作製した。また、ALK による p53 転写活性化の阻害効果に関して、野生型 p53 および上記 p53 変異体を用いて検討した。

NPM-ALK を発現している ALCL 細胞を用いて、NPM-ALK に対する siRNA をその細胞に導入し、p53 経路が活性化するかどうか検討した。その実験には 3 つの異なった NPM-ALK に対する siRNA を作製し、発現抑制の効果を調べ、発現抑制効率の良いものについて上記実験を遂行した。また、ALK チロシンキナーゼに対する特異的低分子阻害剤を用いて、p53 の転写活性化の回復が見られるか検討した。

本来、ALK は受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する蛋白質である。そして主に、脳組織特異的に発現していることが報告されている。私達は、近年、p53 が核内ばかりでなく細胞膜近傍にも局在していることを発見している。そこで、p53 が野生型でかつ野生型 ALK 受容体が発現している神経芽腫細胞を用いて、そのリガンドである Midkine あるいは Pleiotrophin でそれら細胞を処理した際、p53 が細胞膜近傍に集積するのかを共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて検討した。また、ALK のリガンドによって p53 がチロシン残基のリン酸化修飾を受けるのかを上記作製した p53 のリン酸化チロシン特異的な抗体を用いて検討した。

更に、p53 の負の調節因子 Mdm2 がその阻害に関与しているか調べた。Mdm2 は p53 の分解や細胞内局在を調節する E3 ユビキチンリガーゼであるため、ALK 融合蛋白質の発現の有無により、その p53 の分解や細胞内局在に影響を与えるかどうか、ウエスタンブロット法や免疫染色法を用いて調べた。また、ALK 融合蛋白質の発現によって、p53 と Mdm2 との相互作用に影響を与えるかについても検討し

た。

#### 4. 研究成果

私達は、まず、p53 のどのチロシン残基が ALK によってリン酸化修飾を受けるか様々な p53 欠変異体を用いて調べた。その結果、p53 の C 末端 226-393 アミノ酸残基からなる領域を欠失させるとリン酸化チロシンのシグナルが消失することから、この領域に存在する 3 つのチロシン残基 (コドン 234、236 及び 327) がリン酸化部位の候補として同定された。更に、これら 3 つのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体を用いた解析より、この 3 つのチロシン残基すべてがそのリン酸化に重要であることがわかった。そこで、これら 3 つのホスホチロシンに対する特異的な抗体を作製したところ、327 番目のチロシンリン酸化を認識する良好な抗体は得られたが、234 番目、236 番目のチロシンリン酸化を認識する良好な抗体は得られなかった。また、3 つのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した p53 変異体を用いて、ALK 融合蛋白質による p53 転写活性化の阻害効果について検討した。その結果、ALK 融合蛋白質による 234 番目、236 番目および 327 番目のチロシン残基が、p53 転写活性化の阻害に重要であることが判明した。

更に、ALK 融合蛋白質を発現している細胞株を用いて、ALK 融合蛋白質を siRNA でノックダウンした際の p53 活性について調べた。その結果、ALK 融合蛋白質の発現を抑制すると、p53 下流の標的遺伝子である p21 の発現が著しく増大し、その p21 の発現誘導は、p53 の発現に依存的であった。また、ALK チロシンキナーゼに対する特異的低分子阻害剤を用いて、p53 の転写活性化の回復が見られるか調べたところ、siRNA を用いた実験と同様の結果が得られ、ALK 融合蛋白質が p53 経路を阻害していることが裏付けられた。本来、ALK は受容体型チロシンキナーゼファミリーに属するタンパク質であり、主に、脳組織で発現している。そこで、本来の ALK の機能に p53 経路が関与しているかどうか、p53 が野生型でかつ野生型 ALK 受容体が発現している神経芽腫細胞を用いて調べた。そのリガンドとして知られる Pleiotrophin で細胞を処理したが、p53 の細胞膜近傍への集積はあまり見られず、刺激依存的な p53 のチロシンリン酸化も検出されなかった。ただし、Pleiotrophin による ALK の活性化が非常に弱く、他の ALK リガンドや条件等再度検討する余地があると思われる。

最後に、ALK による p53 のチロシンリン酸化によって引き起こる p53 機能の阻害メカニズムを解析した。まず、ALK 発現の有無によって、p53 の他の修飾部位へ影響を与えるか

どうか調べたが、ALK 発現によって p53 の他の修飾部位へ影響はなかった。また、一つのチロシンリン酸化部位が p53 の 4 量体形成化部位近傍に存在していたことから、架橋剤を用いて 4 量体化能について調べたが、ALK による p53 のチロシンリン酸化が 4 量体形成には影響を与えなかった。一方、p53 の負の調節因子 Mdm2 がその阻害に関与しているか調べた。Mdm2 は p53 の分解や細胞内局在を調節するため、ALK 融合蛋白質の発現の有無により、その p53 の分解や細胞内局在に影響を与えるかどうか調べた。まず、蛋白質合成阻害剤を用いて p53 の分解を調べたところ、ALK 融合蛋白質の発現によって、p53 の分解が促進された。そして、p53 の細胞内局在に与える影響を調べたところ、ALK 発現によって野生型 p53 は細胞質内へ移行するが、3 つのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した非リン酸化型 p53 は、ALK の発現の有無にかかわらず、そのほとんどが核内に存在した。また、免疫沈降法を用いて p53 と Mdm2 との相互作用を解析したところ、ALK 融合蛋白質の発現によって、野生型 p53 と Mdm2 との相互作用が増強した。一方、非リン酸化型 p53 では、その増強効果は認められなかった。以上の結果から、ALK は p53 のチロシンリン酸化を介して、Mdm2 系による分解及び核外輸送に影響を与えるものと推察された。

#### 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 5 件)

- (1) Takashi Kohno, Hitoshi Ichikawa, Yasushi Totoki, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nanno, Hiromi Sakamoto, Koji Tsuta, Koh Furuta, Yoko Shimada, Reika Iwakawa, Hideaki Ogiwara, Takahiro Oike, Masato Enari, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Aage Haugen, Vidar Skaug, Suenori Chiku, Itaru Yamanaka, Shun-ichi Watanabe, Ikuo Sekine, Seishi Ogawa, Curtis C. Harris, Hitoshi Tsuda, Teruhiko Yoshida, Jun Yokota and Tatsuhiro Shibata: KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat. Med., 18, 375-377, 2012.
- (2) Yuudai Kondo, Kentaro Nagai, Shingo Nakahata, Yusuke Saito, Tomonaga Ichikawa, Akira Suekane, Tomohiko Taki, Reika Iwakawa, Masato Enari, Masafumi Taniwaki, Jun Yokota, Sumio Sakoda and Kazuhiro Morishita: Overexpression of DNA sensor proteins, AIM2 and IFI16, contributes to tumorigenesis of OSCC

with p53 inactivation. Cancer Sci., 103, 782-790, 2012.

- (3) Reika Iwakawa, Takashi Kohno, Masato Enari, Tohru Kiyono, and Jun Yokota\*: Prevalence of Human Papillomavirus 16/18/33 Infection and p53 Mutation in Lung Adenocarcinoma. Cancer Sci., 101, 1891-1896, 2010.
- (4) Masami Kodama, Chihiro Otsubo, Toru Hirota, Jun Yokota, Masato Enari\*, and Yoichi Taya: Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. Mol. Cell. Biol., 30, 1620-1633, 2010.
- (5) Hirokazu Ohata, Nobuyuki Ota, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Jun Yokota, Yoichi Taya and Masato Enari\*: Identification of a function-specific mutation of clathrin heavy chain (CHC) required for p53 transactivation. J. Mol. Biol., 394, 460-471, 2009.

(  
〔学会発表〕(計9件)

- (1) 大坪 千裕、岩川 麗香、市川 仁、清野 透、横田 淳、江成 政人: "p53 不活性化による細胞の運動能と浸潤能の制御機構に関する研究" 第 70 回日本癌学会学術総会. (2011.10.4).名古屋
- (2) 江成 政人、大坪 千裕、田矢 洋一: "ALK による p53 不活性化機構" 第 70 回日本癌学会学術総会. (2011.10.3).名古屋
- (3) 田矢 洋一、江成 政人: "p53 は癌における ALK 融合蛋白質によるチロシン残基リン酸化で失活する" 第 70 回日本癌学会学術総会. (2011.10.3).名古屋
- (4) 江成政人、児玉昌美、大坪千裕、横田淳、田矢洋一: "ATM による p53Ser46 の直接的リン酸化" BMB2010. (2010.12.7).神戸
- (5) 江成政人、児玉昌美、大坪千裕、横田淳、田矢洋一: "Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences" 第 15 回 p53 国際ワークショップ. (2010.10.11).フィラデルフィア
- (6) 江成政人、瓦谷泰之、上里新一、横田淳: "p53 と Mdmx との相互作用を阻害する低分子化合物の同定" 第 69 回日本癌学会学術総会. (2010.9.22).大阪
- (7) 大坪 千裕、大友 亮、横田 淳、江成 政人: " p53 による細胞運動制御機構の解析" 第 32 回日本分子生物学会年会. (2009.12.09).横浜
- (8) 江成 政人、大畑 広和、田矢 洋一: " Nuclear mitotic apparatus (NuMA)タンパク質による p53 を介した転写選択制御機構" 第 82 回日本生化学会大会.

(2009.10.23). 神戸

- (9) 江成 政人、吉田 祐輔、横田 淳、田矢 洋一: "チロシンキナーゼ ALK による p53 を介した転写の抑制機構" 第 68 回日本癌学会学術総会. (2009.10.02). 横浜

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: p 5 3 - m d m x 相互作用を阻害する低分子抗がん剤

発明者: 江成 政人、上里 新一

権利者: 学校法人 関西大学、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許権

番号: 特願 2010-43548

出願年月日: 2010 年 2 月 26 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/refractory/refractory.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 江成 政人

(ENARI MASATO)

独立行政法人国立がん研究センター・  
ユニット長

研究者番号: 90294058

(2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号: