

機関番号：13201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790066

研究課題名 (和文) 遺伝子発現制御から迫る癌抑制遺伝子産物 p53 を介するアポトーシス経路の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of apoptotic pathway through the tumor suppressor protein p53 approached from gene expression control

研究代表者

田中 亜紀 (TANAKA AKI)

富山大学・医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50432109

研究成果の概要 (和文)：基本転写因子 TFIIE と TFIIH は、RNA ポリメラーゼ II による転写の開始段階に重要な機能を担う。この二つの因子の相互作用に、癌抑制遺伝子産物 p53 の 46 番目セリンおよび 55 番目スレオニンのリン酸化修飾が影響を及ぼす可能性が示された。また紫外線や抗癌剤などによる DNA 損傷を受けて、細胞内で p53 タンパク質が安定化されると、その翻訳後修飾により p53 と TFIIH の相互作用が、TFIIE との相互作用より優先されることが示された。

研究成果の概要 (英文)：The general transcription factors TFIIE and TFIIH play essential roles in transcription initiation by RNA polymerase II. The possibility is shown that the phosphorylation modification of tumor suppressor protein p53 at serin 46 and threonine 55 influence the interaction of two factors. It is shown that p53 received DNA damage by ultraviolet and anti-cancer drug stabilized in the cell, the interaction with TFIIH is given to priority more than interactive with TFIIE by the post-translational modification of p53.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学・分子生物学

キーワード：転写

1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子産物 p53 はゲノムの守護神とも呼ばれ、すべてのヒトの癌の 50-55%で変異が見つかり、野生型および変異体を用いた解析、翻訳後修飾の影響など様々な方向から非常にさかんに研究が行われている。一方、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と基本転写因子群による転写制御の機構解析もさかんに行われ、12 サブユニットからなる Pol II の結晶

構造の同定をきっかけにそのメカニズムは分子レベルで明らかにされてきている。しかし、この二者をつなぐ研究はほとんどされていなかった。

2. 研究の目的

細胞は代謝産物などの生理的ストレス、および紫外線、電離放射線による非生理的ストレスにより DNA に損傷が生じる。我々は DNA

損傷時に p53 と基本転写因子 TFIIE が、もう一つの基本転写因子 TFIIH を介して競合し合う可能性を示唆する結果を得た。そこで我々は、細胞周期、DNA 損傷、アポトーシスなど様々な生理的機能に関わる p53 のアポトーシス経路における新たな役割を探るため、遺伝子発現制御から p53 を介するアポトーシス経路の分子機構に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

基本転写因子 TFIIE と TFIIH は Pol II による転写開始に必要であることが知られているが、この機構にどのように p53 が関わるのかを調べるために、以下 4 点を行った。

(1) リン酸化型 p53 による TFIIE α と p62 の相互作用への影響

p62 と結合する p53 の転写活性化領域 (26-65 番目アミノ酸領域) のうち、46 番目セリンと 55 番目スレオニンがリン酸化修飾を受けることが報告されている。またこれらのアミノ酸のうち、46 番目セリンのリン酸化はアポトーシス経路に関わり、細胞の癌化を抑制するための経路と考えられている。そこで p53 の 46 番目セリンおよび 55 番目スレオニンのリン酸化型ペプチドを用いて、TFIIE α 酸性領域と p62 PH ドメインによる *in vitro* 結合実験を行った。

(2) DNA 損傷刺激による TFIIH と p53 の相互作用への影響

DNA 損傷刺激により p53 が翻訳後修飾を受けて細胞内濃度が上昇することが知られている。この p53 の量的な変化が TFIIE と TFIIH にどのように影響するのかを調べることにした。そこで DNA 損傷処理を行ったヒト乳癌由来 MCF-7 細胞株より経時的に全細胞抽出液を調製して、抗 p62 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。

(3) DNA 損傷刺激による TFIIE と TFIIH の相互作用への p53 の影響

細胞内で TFIIE α 、p62、p53 の三者の相互作用を調べるため、UV (30J/m²) 処理した MCF-7 細胞株より全細胞抽出液を調製して、抗 XPB 抗体 (TFIIH のサブユニットの一つ) で免疫沈降実験を行い、抗 p53 抗体、抗 TFIIE α 抗体、抗 p62 抗体で検出を行った。

(4) p53 標的遺伝子における TFIIE と TFIIH の局在

UV (30J/m²) 処理またはアドリアマイシン処理した MCF-7 細胞を回収し、TFIIE α 、p62、p53 の抗体を用いてクロマチン免疫沈降実験を行った。このサンプルから DNA のみを回収し、p53 標的遺伝子の一つである *p21* 遺伝子のプロモーター領域のプライマーで PCR を行

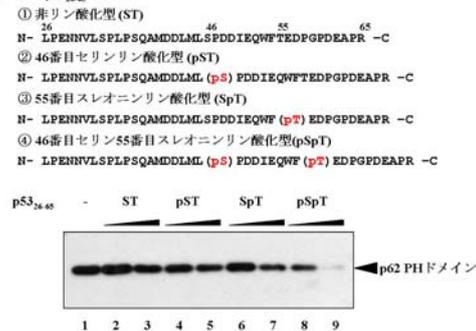
い、プロモーターでの三者の局在を調べた。

4. 研究成果

(1) リン酸化型 p53 による TFIIE α と p62 の相互作用への影響 (図 1)

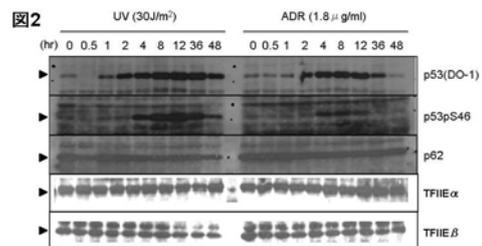
非リン酸化型 p53 と比べて、リン酸化型 p53 は p62 PH ドメインにより強く結合して、p62 PH ドメインと TFIIE α 酸性領域の結合を阻害した。特に 46 番目セリンと 55 番目スレオニンの二箇所がリン酸化されると、その傾向が増強された。このことから TFIIE と TFIIH の相互作用に、p53 のリン酸化修飾が影響を及ぼす可能性が示唆された。

図1 ヒト p53₂₆₋₆₅ペプチド



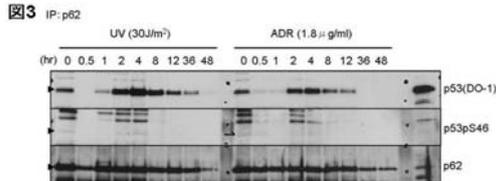
(2) DNA 損傷刺激による TFIIH と p53 の相互作用への影響 (図 2, 3)

UV 処理およびアドリアマイシン処理により p53 タンパク質が安定化し、処理 8 時間後にピークとなり、その後減少した。また p53 タンパク質の安定化から遅れて、46 番目セリンのリン酸化修飾が起こった。一方、TFIIE α と p62 はサンプルを調製した時間内で量的な変化はあまり見られなかった。



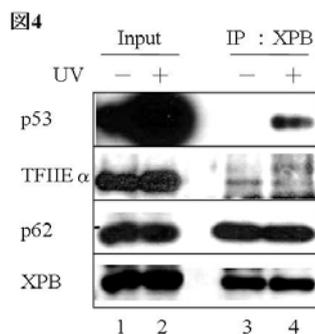
このような全細胞抽出液を用いて、抗 p62 抗体で免疫沈降実験を行った。p53 タンパク質の安定化のピークが処理 8 時間後であったのに対して、p62 と共沈した p53 のピークは処理 4 時間後であり、処理 2 時間後でも多くの p53 が p62 と共沈していることが分かった。また 46 番目セリンリン酸化型 p53 が、処理 2

～4 時間後に p62 と共沈しているが、46 番目セリンリン酸化型 p53 の抽出液中のピークが 4～8 時間であることは時間的にずれていることが分かった。これらのことから p62 と p53 は細胞内で相互作用し、その結合には一部 p53 の 46 番目セリンのリン酸化が関わる可能性が示唆された。しかしその相互作用には 46 番目セリンのリン酸化以外の要素を含むと考えられる。



(3) DNA 損傷刺激による TFIIIE と TFIIH の相互作用への p53 の影響(図 4)

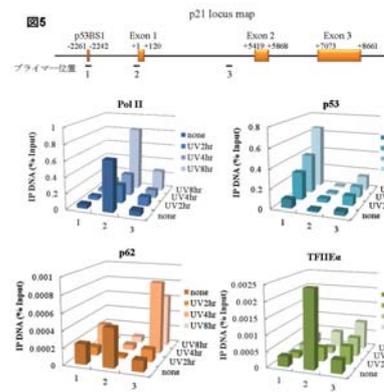
(2) の実験では抗 p62 抗体で免疫沈降実験を行ったが、TFIIIE α との共沈が検出されなかった。そこで抗 XPB 抗体(TFIIH のサブユニットの一つ)で免疫沈降実験を行った。その結果、TFIIIE と TFIIH の共沈が検出されたが、UV 処理によりその結合が低下した。一方 p53 は、UV 処理により p62 との共沈が検出された。これらのことから TFIIIE と TFIIH は結合して協調的に転写開始段階で機能しているが、細胞が DNA 損傷を受けて p53 が安定化されると、その修飾により TFIIH との相互作用が、TFIIIE との相互作用より優先されることが示唆された。



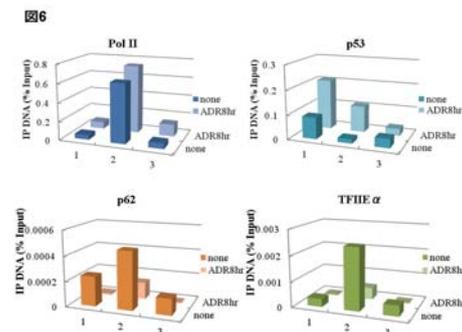
(4) p53 標的遺伝子における TFIIIE と TFIIH の局在(図 5, 6)

UV 処理(2, 4, 8 時間)では、Pol II はプロモーター付近(2: -20)に局在し、UV 処理により減少して、8 時間後に再びプロモーター領域に存在した。p53 は p53 結合サイト(1: -2283)に経時的に増加した。TFIIIE α および p62 はプロモーター付近に局在しているが、

UV 処理により遺伝子の下流(3: +4001)に蓄積した。



一方、アドリマイシン処理(8 時間)では、Pol II と p53 は UV 処理と同様の応答であったが、TFIIIE α と p62 はアドリマイシン処理後にプロモーター領域および遺伝子の下流領域に局在しなかった。



これらの結果より、UV 処理とアドリマイシン処理による p21 遺伝子の転写活性化において p53 と p62 は共局在しておらず、TFIIIE α と p62 は類似の局在を示した。このことは TFIIIE と TFIIH が協調的に p21 遺伝子の転写活性化機構に関わる可能性を示しているが、そこに p53 が直接関わる可能性見られなかった。

本解析から Pol II による転写の開始段階に重要な機能を担う TFIIIE と TFIIH の相互作用に、p53 が DNA 損傷刺激によりリン酸化修飾を受けて関わる可能性が示唆された。また細胞周期の制御に重要とされる p21 遺伝子のプロモーターにおいて、TFIIIE α と p62 は共局在するが、p53 と局在しなかった。この p21 遺伝子の転写活性化には p53 の 46 番目セリンのリン酸化は関わっておらず、本解析結果と一致する。

p53 標的遺伝子がすべて同じ経路で転写の活性化が起こっているわけではなく、46 番目

セリンリン酸化型 p53 に応答するとされている *p53AIP1* 遺伝子での局在が興味深い。我々がこれまで蓄積してきた p62 および TFIIE α の変異体解析の情報を含めて、この遺伝子における解析を進めることで、p53 の 46 番目セリンのリン酸化がアポトーシス経路へとつながる分子機構を示すことができると考える。

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 1 件)

Tanaka A, Watanabe T, Iida Y, Hanaoka F, Ohkuma Y. Central forkhead domain of human TFIIE beta plays a primary role in binding double-stranded DNA at transcription initiation. *Genes Cells*. 査読有、Vol. 14, 2009, 395-405.

[学会発表] (計 12 件)

① 田中亜紀、基本転写因子 TFIIE の機能ドメインの解析、BMB2010 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

② 山田華那、基本転写因子 TFIIE-TFIIH の機能解析、BMB2010 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

③ Ohkuma Yoshiaki、Functional roles of TFIIE in conformational changes of RNA polymerase II during transcription initiation. 9th EMBL Conference: Transcription and Chromatin、2010 年 8 月 28-31 日、EMBL Laboratory, Germany.

④ 山田華那、基本転写因子 TFIIE の機能ドメインの解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑤ 田中亜紀、基本転写因子 TFIIE の機能ドメインの解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21-24 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

⑥ 吉國達也、基本転写因子 TFIIE-TFIIH の機能解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21-24 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 亜紀 (TANAKA AKI)

富山大学・医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50432109

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：