

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013089

研究課題名（和文） p53 標的遺伝子の単離とその機能解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of p53-target genes

研究代表者

荒川 博文 (ARAKAWA HIROFUMI)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・生物物理部・部長

研究者番号：70313088

研究成果の概要（和文）：

新規 p53 標的遺伝子として、DFNA5, SEMA3F, BLNK, UNC5A, TMPS, NEEP21, Mieap 遺伝子を同定し、その機能を明らかとして、p53 によるがん抑制機能のメカニズムに新しい概念を提起した。特に、p53 による細胞死誘導機能の新規経路のメディエーターとして、DFNA5, UNC5A, TMPS, NEEP21 などを同定し、さらに、腫瘍血管新生抑制因子として SEMA3F を同定したことは、従来から重要とされてきた p53 の機能に、新しいメディエーターを加え、それらのメカニズムの詳細な解明に大きく貢献できた。一方、BLNK は、細胞質分裂を抑制することで、ゲノムの安定性維持に関与することを明らかとし、さらには、Mieap は、ミトコンドリアの品質管理に全く新しい機序で貢献することを明らかとした。これらの成果は、p53 の機能に全く新しいメカニズムを追加するだけでなく、がんの本態解明に大きく貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we identified and characterized seven novel p53-target genes; DFNA5, SEMA3F, BLNK, UNC5A, TMPS, NEEP21 and Mieap. DFNA5, UNC5A, TMPS and NEEP21 are involved in p53-dependent apoptosis. SEMA3F is a mediator of p53-regulated anti-angiogenesis. Discovery of these genes could provide more information to two major functions of p53; cell death and anti-angiogenesis. On the other hand, discovery of BLNK and Mieap demonstrates that there are very novel pathways for p53 tumor suppression. BLNK prevents aneuploidy by inhibiting cytokinesis after DNA damage, leading to maintenance of genomic stability. Moreover, Mieap plays an essential role in mitochondrial quality control. These findings could not only shed light on the mechanism of p53 tumor suppression but also contribute to understanding of cancer nature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,600,000	0	8,600,000
2006年度	8,300,000	0	8,300,000
2007年度	8,300,000	0	8,300,000
2008年度	8,300,000	0	8,300,000
2009年度	8,300,000	0	8,300,000
総計	41,800,000	0	41,800,000

研究分野：010 発がん

科研費の分科・細目：A03

キーワード：p53、転写、標的遺伝子、がん、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 p53 はヒトがんで最も高頻度に異常の認められる重要な遺伝子であり、そのコードする蛋白質は転写因子である。従ってその標的遺伝子として転写制御を受ける遺伝子群は、p53 の生理機能を実行する重要な因子であると考えられているが、その数は 200 から 300 近くに達すると予測されている。これまでの研究から、p53 の機能には細胞死誘導、細胞周期停止、DNA 修復、血管新生抑制などが重要であることが分かっており、それぞれの機能が標的遺伝子によって実行されている。さらには、これら p53 標的遺伝子の中に、それ自体ががん抑制遺伝子として機能するものが存在する事実が明らかとなってきた。しかしながら、これまでの研究はその技術的な限界から、標的遺伝子の網羅的かつ迅速なゲノムワイドなスクリーニングが難しく、多くの p53 標的遺伝子が不明のままであり、p53 によるがん抑制メカニズムの全貌は明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

近年のゲノム解析技術の進歩により、網羅的かつ迅速なゲノムワイドの発現解析が可能となった。今回の研究において、p53 によるがん抑制メカニズムの全貌解明のために、網羅的かつ迅速なゲノムワイドのスクリーニングを行い、不明である p53 標的遺伝子の同定とその機能解析を行う。この研究の目的は、p53 によるがん抑制メカニズムの全貌解明を行うとともに、がんの本態解明に資する成果を挙げ、さらにはその応用によりヒトがんの新しい予防法や治療法の開発の基盤を作り、もって人類の健康福祉に貢献することにある。

3. 研究の方法

国立がんセンターへ導入されている米国アフィメトリックス社の Gene Chip 及びその解析装置を用いて p53 依存性に発現変化を示す遺伝子群をゲノムワイドにスクリーニングする。その際用いる材料は、最低 3 種以上の肺がん、大腸がん、肝がん細胞株で行い、アデノウイルスベクターによる外来性 p53 導入による強制発現系と、siRNA によって内在性 p53 の発現をノックダウンした DNA 損傷誘導性の内在性 p53 活性化の系を用いる。これらの細胞株から経時的に RNA を抽出し、解析に用いる。候補遺伝子は、RT-PCR、ノザンブ

ロット、ウエスタンブロットによってその発現誘導を確認し、データベースよりゲノム情報を入手後、候補 p53 結合配列を探索し、それらの配列に対して、クロマチン免疫沈降法やレポーターアッセイによって標的遺伝子の証明を行う。プラスミドやアデノウイルスベクターを用いた強制発現系や、siRNA によるノックダウン系によって機能解析を進める。機能未知遺伝子については大腸菌で精製タンパク質を作成し、ウサギポリクローナル抗体を作成して細胞内局在や、結合タンパク質の解析を行う。興味深い遺伝子については、ヌードマウスを用いた移植腫瘍に対する影響評価や、ノックアウトマウス作成による機能解析を進める。さらには、国立がんセンターにおける様々ながん患者の臨床検体を用いたヒトがんにおける異常の有無についての解析を進める。

4. 研究成果

上記、マイクロアレイによるスクリーニングにより、p53 によって発現誘導される約 300 遺伝子を抽出し、p53 依存性である性質が良好な 100 遺伝子について、RT-PCR による確認実験を行った。結果として p53 による発現制御が特異的である 30 遺伝子を選び、うち既にデータベースに遺伝子名が登録されている 20 遺伝子と、機能未知の 10 遺伝子について、それぞれ確認実験を進めた。様々な細胞株で、様々な刺激に応じて、普遍的に p53 によって厳格に制御されていた遺伝子群については、その後の機能解析を進め、現在までに 6 遺伝子について既に論文発表を行い、1 遺伝子については、極めて重要かつ興味深い結果が得られたため、現在論文発表準備を行いながら、さらなる機能解析などを進めている。

論文発表した 6 遺伝子は、DFNA5, SEMA3F, BLNK, UNC5A, TMPS, NEEP21 であり、その機能は細胞死制御 (DFNA5, UNC5A, TMPS, NEEP21)、腫瘍血管新生抑制 (SEMA3F)、ゲノム安定性維持 (BLNK) に関与することが明らかとなった。この中でも、BLNK によるゲノムの安定性維持機構は、細胞における異常発現時における、細胞周期 M 期の細胞質分裂抑制による染色体異数性発生の防御を行うことによるもので、世界に先駆けて全く新しいゲノム安定性維持機構を報告した。

未発表の成果である Mieap 遺伝子は、機能未知遺伝子として同定されたが、今回の研究

によって極めて重要かつ画期的なメカニズムが明らかとなった。p53 の標的遺伝子である *Mieap* は、そのタンパク質は、ミトコンドリアの品質管理に極めて重要な役割を有することを発見した。*Mieap* によるミトコンドリア品質管理機構は、不良ミトコンドリアを修復するか排除するかのいずれの方法によって、ミトコンドリアの機能を維持している。また、排除においては従来からのオートファジーに関連したメカニズムにより、一方修復においてはリソソームを主体とした全く新しいメカニズムによって行われていることが明らかとなった。ヒトがん細胞においては p53 の変異あるいは *Mieap* 遺伝子のプロモーターメチル化によって、この経路が完全に不活性化されており、不良なミトコンドリアの蓄積が引き起こされている。このことが永年不明であった Warburg effect の原因の一つである可能性がある。今後は、さらなるメカニズムの解明とともに、がん細胞に特徴的な不良ミトコンドリアを標的とした新しい癌治療法の開発への応用が期待される。

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 11 件)

英文原著 (すべて査読有り)

1. Nakamura Y, Futamura M, Kamino H, Yoshida K, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of p53-46F as a super p53 with an enhanced ability to induce p53-dependent apoptosis. *Cancer Sci* 97, 633-641, 2006

2. Masuda Y, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Ohnishi S, Miyamoto Y, Ichikawa H, Ohta T, Ohki M, Kiyono T, Egami H, Baba H, Arakawa H. The potential role of DFNA5, a hearing impairment gene, in p53-mediated cellular response to DNA damage. *J Hum Genet* 51, 652-664, 2006

3. Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y, Arakawa H. Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res* 67, 1451-1460, 2007

4. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chretien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A, Rotig A. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled

ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 39, 776-780, 2007

5. Kamino H, Futamura M, Nakamura Y, Kitamura N, Kabu K, Arakawa H. B-cell linker protein prevents aneuploidy by inhibiting cytokinesis. *Cancer Sci* 99, 2444-2454, 2008

6. Tanikawa C, Furukawa Y, Yoshida N, Arakawa H, Nakamura Y, Matsuda K. XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene* 28, 3081-3092, 2009

7. Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y, Baba H, Arakawa H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol* 36, 1253-1260, 2010

8. Cui H, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H, Futamura M. Regulation of apoptosis by p53-inducible transmembrane protein containing sushi domain. *Oncol Rep* (in press)

9. Ohnishi S, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto Y, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H. Identification of NEEP21, encoding neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa, as a transcriptional target of tumor suppressor p53. *Int J Oncol* (in press)

英文総説 (査読有り)

1. Arakawa H. p53, apoptosis and axon-guidance molecules. *Cell Death Differ* 12, 1057-1065, 2005

和文総説 (査読なし)

1. 荒川博文 「p53 によるオートファジーの制御」 *実験医学* 28, 397-403, 2010

[学会発表] (計 16 件)

1. 増田佳子、荒川博文他 「P53 標的遺伝子としての難聴遺伝子 DFNA5 の同定」 第 64 回日本癌学会総会 2005 年 9 月 14 日 ロイトン札幌 (札幌)

2. 中村康之、荒川博文他 「アポトーシス誘導型変異体 P53-46F の腫瘍抑制機序について」 第 64 回日本癌学会総会 2005 年 9 月 15 日 ロイトン札幌 (札幌)

3. 二村学、荒川博文他 「P53 癌抑制機能における semaphorin 3F の役割」 第 64 回日本癌学会総会 2005 年 9 月 15 日 ロイトン札幌 (札幌)

4. 二村学、荒川博文他 「P53 による SEMA3F-NRP2 経路の制御」 第 65 回日本癌学会総会 2006 年 9 月 28 日 パシフィコ横浜 (横浜)

5. 加美野宏樹、荒川博文他 「BLNK によるがん抑制のメカニズムについて」 第 65 回日本癌学会総会 2006 年 9 月 28 日 パシフィコ横浜 (横浜)

6. 中村康之、荒川博文他 「ガンマ線照射後に p53 によって制御される遺伝子群の解析」 第 65 回日本癌学会総会 2006 年 9 月 28 日 パシフィコ横浜 (横浜)

7. 大西志保、荒川博文他 「p53 標的遺伝子としてのニューロ遺伝子 NCCRI1 の同定」 第 65 回日本癌学会総会 2006 年 9 月 28 日 パシフィコ横浜 (横浜)

8. 宮本裕士、荒川博文他 「NCCRI2 による細胞死誘導のメカニズムについて」 第 65 回日本癌学会総会 2006 年 9 月 29 日 パシフィコ横浜 (横浜)

9. 荒川博文 「p53 and dependence receptors」 第 66 回日本癌学会総会 2007 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜 (横浜)

10. 二村学、荒川博文他 「Identification of UNC5A as a novel p53-target gene and its involvement in caspase-dependent apoptosis」 第 66 回日本癌学会総会 2007 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜 (横浜)

11. 宮本裕士、荒川博文他 「p53 のがん抑制機能に関与する新規オートファジー関連タンパク質の同定」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

12. 中村康之、荒川博文他 「BLNK は細胞質分裂を阻害することにより染色体異数性を防ぐ」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

13. 加峰弘毅、荒川博文他 「p53 制御性の新規オートファジーがん抑制経路解析」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

14. 二村学、荒川博文他 「Mieap のヒトがんにおける不活性化」 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 1 日 パシフィコ横浜 (横浜)

15. 宮本崇史、荒川博文他 「IP-2DICAL を用いた Mieap 結合タンパク質の探索」 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 1 日 パシフィコ横浜 (横浜)

16. 荒川博文 「ミトコンドリアの品質管理とがん」 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜 (横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/06biop/06biop.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 博文 (ARAKAWA HIROFUMI)

研究者番号 : 70313088