

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20710044

研究課題名（和文）MDM2-MDMX 複合体による新規の p53 放射線応答制御機構

研究課題名（英文）Analysis of a novel mechanism for the p53 response to radiation by the MDM2-MDMX E3 ubiquitin ligase complex

研究代表者

河合 秀彦 (KAWAI HIDEHIKO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30379846

研究成果の概要（和文）：試験管内で p53 を効率的にユビキチン化修飾できる反応系の確立に成功し、MDM2 と MDMX による新たな p53 ユビキチン化機構を明らかにした。また、培養細胞において MDMX 発現量の変化が p53 の DNA 損傷応答に顕著に影響を与える事が明らかとなり、MDMX の p53 安定性や活性制御機構における機能が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the molecular mechanisms of p53 ubiquitination, a novel *in vitro* assay system has been established. Using this assay system, we have found out more about how P53 is ubiquitinated by MDM2 and MDMX. Furthermore, alteration of the amount of cellular MDMX significantly affects on the response of p53 to genotoxic stress. Taken together, these results indicate that MDMX is indispensable for the regulation of the P53 response to genotoxic stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線、がん、P53、MDM2、ユビキチン化修飾

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子産物 p53 は、放射線被ばくを含む様々なストレスに対する細胞応答現象としての細胞周期停止、アポトーシス、DNA 損傷修復、細胞老化などにおいて重要な役割を果たしている。また、ほぼ全てのがんに共通して、その遺伝子やシグナル経路に何らかの異常が検出され、生体でのがん抑制

機構において極めて重要な因子である事から、「ゲノムの守護神」とも称される。最近では、腫瘍の発生した p53 欠損マウスにおける内在性 p53 の発現回復が、正常組織に影響を与えること無しにリンパ腫や肉腫の退縮を誘導する事が報告され、p53 のがん抑制機能の失活は発がん過程のみならず、がん細胞の維持においても必須である事が明らかに

された。「ゲノムの守護神」である p53 の機能を制御する分子機構の完全なる解明は、様々な環境因子や放射線被ばくの生体への影響研究においてのみならず、それらによる発がん機構の研究、更には、がんを含む様々な疾病に対する効果的な化学・放射線療法の開発研究など、幅広い分野において期待されているものである。

これまでの p53 機能の制御機構研究に関しては、その転写下流因子の一つである MDM2 (Murine Double Minute 2) が、p53 の安定性や活性を制御する主要な因子として注目されてきた。MDM2 は、p53 の主要なユビキチン化酵素であり、*mdm2* 欠損マウスが胎生致死を示すのに対して、*mdm2* と *p53* を同時に欠損したマウスが正常に発生できることから、その p53 抑制機能の重要性は明らかである。MDM2 の機能に関しては、1991 年の発見以来、精力的に研究がなされてきたが、生化学的な機能も含めて、未だその詳細は解明できてはいない。そのような状況の中、近年、MDM2 の構造的ホモログである MDMX が同定され、その機能解析が行われ始めている。興味深い事に、MDMX は MDM2 とは異なりユビキチン化酵素活性を有しない。それにも関わらず *mdmx* 遺伝子欠損マウスもまた *mdm2* 欠損マウス同様に胎生致死を示し、*p53* の同時欠損によって正常に発生する事が報告された。また、MDMX の過剰発現が、正常 p53 を維持したがんにおいて高頻度に検出される事から、MDMX もまた p53 の主要な活性制御因子であると考えられる。

申請者は、これまで MDM2 と MDMX の構造や機能の共通点と相違点に着目して、様々な観点から解析を行い、細胞内で MDM2 と MDMX が結合し p53 を制御する複合体として機能している事を明らかにしてきた。MDM2 と MDMX のキメラタンパク質を用いた機能解析からは、MDM2 の酸性アミノ酸領域が p53 のポリユビキチン化に必要であり、MDM2 と MDMX が細胞内で複合体を形成して機能している事を明らかにした。また、放射線照射などのストレスによって MDMX がリン酸化を受け、細胞質から核への移行、MDM2 によるポリユビキチン化、分解とダイナミックに応答している事を見出した。更に、MDM2 と MDMX のリングフィンガー部位間での結合による複合体形成が p53 のポリユビキチン化に必須である事を明らかにした。これらの研究成果によって、これまで MDM2 及び MDMX に関してそれぞれ単独の機能を解析する事によって行われてきた p53 制御の分子機構研究は、世界的にも MDM2 と MDMX を複合体として捉えた研究へと変わりつつある。本研究では、MDM2-MDMX 複合体を、放射線被ばくなどの細胞に対するストレスに応答する複合体

として捉えて機能解析し、p53 の分解制御機構とストレス応答機構を完全に明らかにする事を目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MDM2-MDMX 複合体をストレス応答性複合体として捉えたアプローチから、p53 の活性制御及びストレス応答の分子機構を解明する事である。p53 は正常状態の細胞においては MDM2 のユビキチン E3 リガーゼ活性によって、ポリユビキチン化-プロテアソーム経路を介して効率的に分解されている。一方、放射線照射など様々なストレス状況下の細胞においては、MDM2 は自身のポリユビキチン化・分解を促進し、p53 の蓄積・活性化を誘導する。このシグナル機構に関しては、最近、ATM や Chk-1、Chk-2 などのストレス応答性のリン酸化酵素の関与が報告されたが、リン酸化によるユビキチン化酵素の活性や基質特異性変化に関する分子機構、また MDM2-MDMX の核移行や分解の分子機構など、多くの部分に関しては未解明である。我々は、これまでに MDM2、MDMX、p53 の様々な機能部位を用いたキメラタンパク質を作成し、それらを用いて細胞内での MDM2-MDMX の機能解析を行ってきた。また、最近では、p53、MDM2、MDMX を効率的にポリユビキチン化する解析系を開発している。本研究では、これまで得られた研究成果と手法を基に、*in vivo* 及び *in vitro* 解析系を用いて、p53、MDM2、MDMX のユビキチン化機構とストレス応答機構を解析し、また、新たな複合体構成因子や修飾の変化を同定する事によって、新しい側面から MDM2-MDMX 及び p53 のストレス応答機構を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、MDM2-MDMX のストレス応答の分子機構を解析し、新規の p53 のストレス応答機構を解明する。本研究目的を達成する為に、初年度は、*in vitro*-ユビキチン化アッセイ法を樹立する。また、MDM2、MDMX、p53 のキメラタンパク質の *in vivo*、*in vitro* でのユビキチン化機能解析を行い、更に、TAP (Tandem Affinity Purification) システムを用いて MDM2-MDMX 結合因子をスクリーニングする。次年度は、同定した因子の p53 制御機構における機能解析、また、ユビキチン化アッセイ法を用いた p53 のユビキチン化機構の生化学的な解析や p53 活性制御因子のスクリーニングを行う。

(1) MDM2-MDMX 複合体による *in vitro* 及び *in vivo* p53 ユビキチン化アッセイ法の樹立

① MDM2、MDMX、p53 タンパク質の精製

- ② MDM2-MDMX 複合体を用いた p53 ユビキチン化解析法の樹立
- (2) MDM2-MDMX 複合体の結合因子の分離、同定
 - ① TAP-MDM2-MDMX 発現細胞の樹立
 - ② TAP-MDM2-MDMX のストレス応答性の解析
 - ③ TAP 精製システムを用いた複合体の精製と結合因子の同定
- (3) MDM2-MDMX-p53 ユビキチン化機構の解析
 - ① MDM2-MDMX-p53 ユビキチン化機構の生化学的解析
 - ② MDM2-MDMX-p53 ユビキチン化機構に作用する因子のスクリーニング
- (4) p53 分解機構と活性化機構因子の同定及び機能解析
 - ① MDM2-MDMX-p53 結合因子の機能解析
 - ② 同定因子の過剰発現、発現抑制、ターゲットニングによる機能解析
 - ③ MDM2-MDMX-p53 の制御機構に関与する機能の解析

4. 研究成果

本研究課題では、MDM2-MDMX 複合体のストレス応答の分子機構を解析し、新規の p53 のストレス応答機構を解明する事を目的としている。本年度の研究計画どおりに実施し、以下の研究成果を得た。

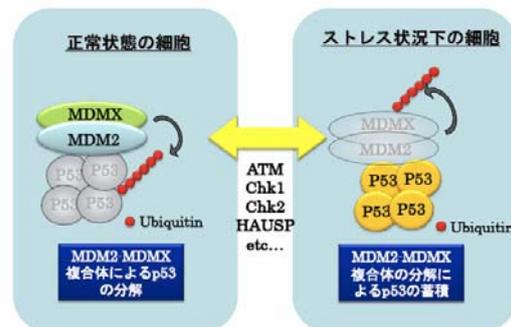
- (1) 大腸菌内で産生させた MDM2, MDMX, P53 タンパク質の精製法の検討を行い、それらのタンパク質を用いて、高効率にユビキチン化反応を行うことが可能な *in vitro* ユビキチン化アッセイ法の確立に成功した。
- (2) 確立した *in vitro* ユビキチン化アッセイ法によって、ユビキチン化に必要な部位などを同定した。
- (3) p53 のユビキチン化による制御機構を解析するため、ユビキチン化 p53 を用いた脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン化アッセイ法やプロテアソームを用いたプロテアソーム分解アッセイ法の確立を試みた。
- (4) Streptavidin⁻、Calmodulin-Binding Protein を付加した、P53, MDMX, MDM2 の遺伝子発現ベクターを構築し、それらを発現する培養細胞株を樹立した。
- (5) TAP システムを用いてヒト培養細胞より、精製した複合体を用いてのユビキチン化アッセイ法を樹立した。
- (6) MDM2, MDMX の発現量による電離放射線照射等によるストレス応答に対する p53 の動態変化を解析した。
- (7) TAP システムを用いて MDM2-MDMX 複合体を精製、SDS-PAGE、染色を行い、得られたバンドを精製した。
- (8) ユビキチン化アッセイ法によって、p53、

MDM2、MDMX のユビキチン化機構を解析し、新たなユビキチン化の分子メカニズムを解明した。また、新規の p53 のユビキチン化修飾とその機構を同定し、それらのユビキチン化修飾によるストレス応答に対する細胞内での p53 の機能変化解析を行い、p53 の新たな制御機構を見出した。

(9) *in vitro*-ユビキチン化アッセイ法を用いて、MDM2-MDMX 複合体のユビキチン化やユビキチン化因子の分解や脱ユビキチン化に対する影響因子について解析し、それらの因子による影響の相違点を明らかにした。

(10) TAP システムを用いて MDM2-MDMX 複合体を精製する事によって、複合体に相互作用する因子を分離し、質量分析によって同定した。培養細胞を用いて、同定した相互作用因子の遺伝子導入による過剰発現又は siRNA による発現抑制を行い、それらの因子が p53 に与える影響及び機能解析を行い、p53 の機能及び制御機構について新たな知見を得ることができた。

これらの結果から、放射線などの細胞に対するストレス応答機構における新たな p53 の機能と MDM2-MDMX 複合体によるユビキチン化メカニズムを介した新しい制御機構を見出した (図 1)。



(図 1) MDM2-MDMX 複合体による p53 のストレス応答機構

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 5 件)

- (1) 河合 秀彦, MDM2 ファミリーによる P53 の安定性と放射線応答の制御機構 日本放射線影響学会第 5 2 回大会、2009 年 11 月 11 日、広島市
- (2) 河合 秀彦, Analysis of the molecular mechanism of p53 ubiquitination by the MDM2-MDMX E3 ubiquitin ligase complex, 2nd Asian Congress of Radiation Research, 2009 年 05 月 17 日、ソウル (大韓民国)

(3) 河合 秀彦、MDM2-MDMX複合体とE3
ユビキチンリガーゼ活性、第31回日本分子
生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合
同大会、2008年12月11日、神戸市

(4) 河合 秀彦、p53 制御機構における
MDM2/MDMXヘテロ複合体の機能解析、日
本放射線影響学会第51回大会、2008年11
月19日、北九州市

(5) 河合 秀彦、The functional analysis of
the MDM2-MDMX complex as an E3
ubiquitin ligase for p53、第67回日本癌学
会学術総会、2008年10月28日、名古屋市

6. 研究組織

(1)研究代表者

河合 秀彦 (KAWAI HIDEHIKO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：30379846

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：