

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791961

研究課題名 (和文) 変異型 p53 に特異的に結合する Daxx ペプチドを用いたがん治療法の開発

研究課題名 (英文) The study of Daxx peptide interacting with mutant p53 in peculiarity.

研究代表者

北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00451451

研究成果の概要 (和文)：多くのがんでは遺伝子の異常を監視している p53 というタンパク質が変異している。p53 遺伝子に変異を起こすと、それ自信の機能が失われるだけでなく、新たな機能を獲得してがんの悪性を促進することがわかってきた。今回、変異型 p53 が Daxx タンパク質に結合し細胞死を誘導するシグナル伝達を阻害すること、そしてその詳細なメカニズムが明らかになった。またそれを応用して変異型 p53 を阻害できる新たな可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The observer of aberrant gene, p53 has mutated in a lot of cancer. When the p53 gene has mutation, p53 not only lost its function but acquire new function to promote malignancy. We showed in detail the role of Daxx in TNF-alpha signaling and that mutant p53 inhibited this signaling through the interaction with Daxx. Moreover a new possibility of obstructing mutant p53 by Daxx peptide was suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,400,000 | 720,000   | 3,120,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：変異型 p53, Daxx, gain of function

## 1. 研究開始当初の背景

p53 タンパク質は、細胞ががん化しないように監視しているタンパク質である。細胞ががん化するようなある種の有害刺激によって DNA が傷ついたときには、p53 タンパク質は細胞周期を停止させ、修復可能であれば遺伝子を修復し、修復不可能であるならば細胞にアポトーシスを誘導させる。これが、p53 タンパク質が遺伝子の守護神といわれる所以であるが、なんらかの原因で p53 遺伝子に変

異がはいると、細胞はがんを引き起こしやすくなる。実際に 50%以上の悪性腫瘍では p53 タンパク質に変異がみられる。それらのがんでは p53 タンパク質が正常な機能を果たせなくなる (loss of function) ことががん化の一原因と考えられてきた。しかしそれだけではなく、変異型 p53 が新たな機能を獲得して (gain of function) がんの悪性を亢進させることが明らかになってきた。例えば、p53 を完全に欠失したマウスと変異型 p53 を発現するマウスを比べると、

明らかに後者ががんの悪性が高い。これは先の p53 の loss of function だけでは説明がつかず、変異型 p53 が細胞内でなんらかの働き、特にがんの悪性度を亢進させる働きをしていることを示唆している。培養細胞を用いた実験系においても、p53 遺伝子が欠失した SaOS2 細胞に変異型 p53 を強制発現させると、足場非依存的に増殖することや、親株に比較して抗癌剤に抵抗性を持つことなどが知られている。

これまで Ohiro らは、Daxx というタンパク質が野生型 p53 には結合しないが、変異型 p53 と結合することを見出した。そしてその結合力が p53 の悪性度と関連していることが明らかとなった。(Ohiro et. al. Mol Cell Biol. 2003 Jan, 23(1):322-324)。

Daxx はデスレセプターである Fas とストレスセンサーである ASK1 に直接結合するアダプタータンパクとして同定された。ASK1 の活性化は下流の JNK の活性化を引き起こし、アポトーシスを引き起こす。また ASK1 を活性化させる別のシグナル伝達経路として TNF レセプター経路がある。サイトカインの一つである TNF  $\alpha$  が結合すると、TNF レセプターは TRAF2 を介して ASK1 を活性化し FAS 経路同様 JNK を活性化する。しかし、この経路と Daxx の関係は明らかではなかった。また変異型 p53 と Daxx との結合が TNF  $\alpha$  シグナル伝達を阻害するのかどうか明らかではなかった。

申請者はこれらについてさらに研究を進めるうちに、Daxx の発現量が ASK1 によって上昇することが明らかとなり、その機序について研究を進めた。

## 2. 研究の目的

TNF  $\alpha$  の刺激は TRAF2 を介して ASK1 を活性化させ、その下流にある JNK を活性化させると考えられていた。しかし TNF  $\alpha$  が ASK1 の上流に位置すると考えられていた Daxx の発現を上昇させることから、TNF  $\alpha$  のシグナル伝達経路に Daxx がなんらかの働きをしていると考えられ、そのメカニズムを明らかにすること、さらに変異型 p53 がどのようにその経路に関与するのかを明らかにすることを目的とした。さらに変異型 p53 の gain of function を阻害することでがんの悪性度を減少させることが可能であると考えられ、そのための基本的な研究を主な目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞

HeLa, Me180, A431, A2058, HEK293 細胞を用いた。また遺伝子導入には FuGene6 (Roche) または Nucleofactor (Amaxa Biosystems) を用いた。

### (2) ウェスタンブロッティング

TNF  $\alpha$  (PetroTech Inc) によって刺激した HeLa 細胞、および遺伝子導入したそれぞれの HEK293 細胞は 48 時間後に PBS で洗浄後、NP-40 Lysis Buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaF, 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.7  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10% glycerol) にて可溶化、遠心後上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液は SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) にて展開後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) に転写した。自家製抗 Daxx ポリクローナル抗体、抗 HA モノクローナル抗体 (Roche)、抗 FLAG モノクローナル抗体 (Sigma)、抗 p53 モノクローナル (Santa Cruz) 抗体、抗アクチンポリクローナル抗体 (Santa Cruz)、抗 EGFP モノクローナル抗体 (Santa Cruz) を用い、二次抗体には HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Pierce) HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Pierce), HRP 標識抗ラット IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce) にて検出を行った。

### (3) 免疫沈降

遺伝子導入されたそれぞれの細胞は 48 時間後に PBS で洗浄後、TENT Lysis buffer (100 mM NaCl, 0.5% NP40, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.7  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10% glycerol) に溶解、遠心し上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液は抗 HA モノクローナル抗体、または抗 FLAG モノクローナル抗体、protein G-Sepharose 4B (Zymed) を用いて 4°C にて 4 時間反応させ免疫沈降した。免疫沈降複合物は SDS-PAGE にて展開後、PVDF メンブレンに転写した。一次抗体として、抗 FLAG モノクローナル抗体または抗 HA モノクローナル抗体を用い、二次抗体には HRP 標識抗マウス IgG, HRP 標識抗ラット IgG 抗体を用い、SuperSignal West Femto detection kit にて検出を行った。

### (4) キナーゼアッセイ

HEK293 細胞に pcASK1-HA、

pcASK1-K709M-HA を遺伝子導入し、48 時間後、TENT Lysis buffer (100 mM NaCl, 0.5% NP40, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.7  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10% glycerol) に溶解、遠心し上清を細胞溶解液とした。細胞溶解液は抗 HA モノクローナル抗体、protein G-Sepharose 4B を用いて免疫沈降した。リン酸化反応の基質として GST-Daxx 70-216 を用いた。またポジティブコントロールとして、リコンビナント GST-MKK612)、およびネガティブコントロールとして GST タンパクを用いた。免疫沈降複合物と基質は、Kinase buffer (50 mM NaCl, 10 mM Hepes [pH 7.0], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10  $\cdot$  Ci of [<sup>32</sup>P]ATP, 80  $\cdot$  M ATP) にて 30°C で 20 分反応させ、SDS-PAGE にて分離し、PhosphorImager (Molecular Dynamics) にて検出した。

(5) コロニーフォーメーションアッセイ H1299 に Daxx625-740 を transfection 後、G418 にて選択し、それらの細胞を 6cm Dish に 5000 個播種した。24 時間後にシスプラチンを加え 2 週間後に固定後クリスタルバイオレットにて染色しコロニー数を数えた。

#### 4. 研究成果

Daxx および ASK1 の関係を図に示す (図 1)。

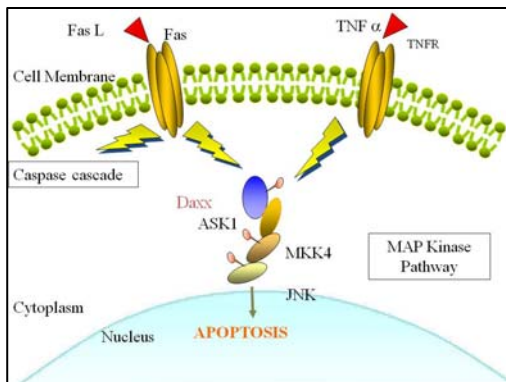


図 1 Daxx と ASK1、JNK の関係

Daxx、ASK1 および変異型 p53 の関係を解析していたところ、野生型 ASK1 は Daxx の発現量を上昇させるが、709 番目のリジンにメチオニンに置換したリン酸化能を持たない変異型 ASK1KM は Daxx の発現量を上昇させなかった。また ASK1

による発現上昇はプロテアソーム阻害薬処理によって阻害された (図 2B)。また TNF  $\alpha$  で細胞を刺激したところ、内因性の Daxx の発現量を上昇することがわかった (図 2A)。つまり、ASK1 は自身のリン酸化能を利用して、なんらかの修飾が Daxx に起こり、プロテアソームによる分解を免れることによって発現量が上昇すると考えられた。

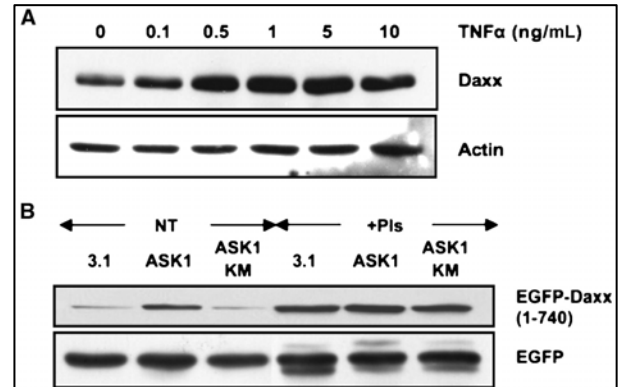


図 2 ASK1 はリン酸化依存的に Daxx の発現量を上昇させる

そこで実際に ASK1 が Daxx をリン酸化するのか、またその部位はどこかを調べた。その結果、ASK1 は Daxx の 176 番目と 184 番目のセリンを直接リン酸化することが明らかになった (図 3)。また Daxx の 174 番目から 184 番目のアミノ酸の中にあるセリン及びスレオニンを含めてアラニンに置換した変異体 (S/T0) は、わずかながら ASK1 にリン酸化されたことから、これ以外の部位も ASK1 によってリン酸化させる可能性が示唆された。ST0 から 176 番目のアラニンをセリンに、184 番目のアラニンをセリンに戻した変異体はそれぞれ ASK1 にリン酸化されたが、両方ともセリンに戻した変異体はより強くリン酸化されることから、174 番目と 184 番目の両方のセリンが重要であることが示唆された。

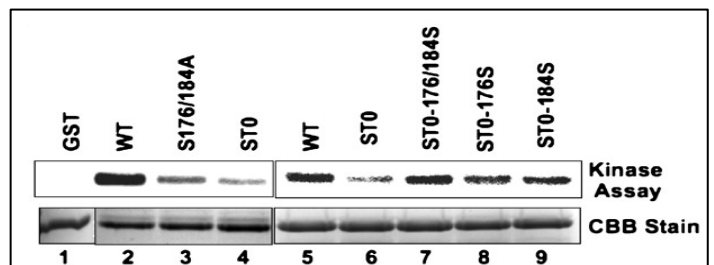


図 3 ASK1 は Daxx の 176 番目と 184 番目のセリンをリン酸化する

Daxx の 176 番目と 184 番目のセリンを

アラニンに置換した変異体は、ASK1 の強制発現や TNF  $\alpha$  の刺激を与えても JNK の活性化が起こらなかった (図 4)。

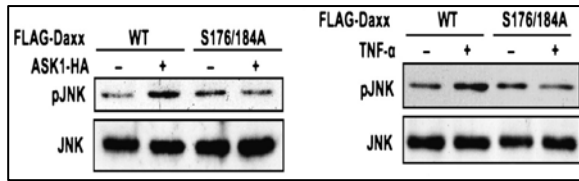


図 4 リン酸化されない Daxx は ASK1 の下流である JNK を活性化できない

従来の考えでは TNF  $\alpha$  から JNK へのシグナル伝達には Daxx は不必要であると考えられてきたが、今回申請者によってこのシグナル伝達に ASK1 による Daxx のリン酸化が必要であることが明らかとなった。

では、これらの働きに変異型 p53 ほどのように影響するであろうか。内在性に変異型 p53 をもつ細胞株を TNF  $\alpha$  で処理すると、野生型 p53 を発現する細胞でみられたような Daxx の発現上昇は見られなかった (図 5)。

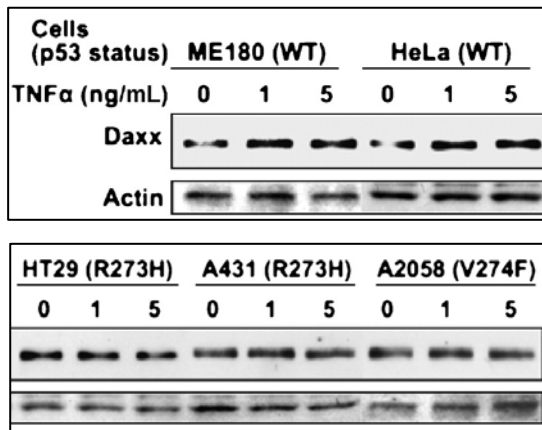


図 5 野生型 p53 細胞では TNF  $\alpha$  によって Daxx の発現増加がみられるが、変異型 p53 を発現する細胞では Daxx 発現増加はみられない

このことから変異型 p53 は Daxx に結合することによって、Daxx のリン酸化による発現上昇を阻害すること、さらにその下流にある JNK の活性化を阻害することが明らかとなった。これは変異型 p53 の gain of function の一つと考えられた。

そこでこの変異型 p53 の働きを抑制すれば、がんの悪性度を下げることができると考えられた。そこで、変異型 p53 に結合する領域の Daxx の小ペプチドを細胞内に導入すれば、変異型 p53 の gain of

function を阻害できると考えられた。まず変異型 p53 に結合し、野生型 p53 に結合しない Daxx の領域を調べた。Daxx C 末端側の 625 番目から 740 番目を含む領域は変異型 p53 と強く結合するが、野生型 p53 とはわずかにしか結合しないことがわかった (図 6)

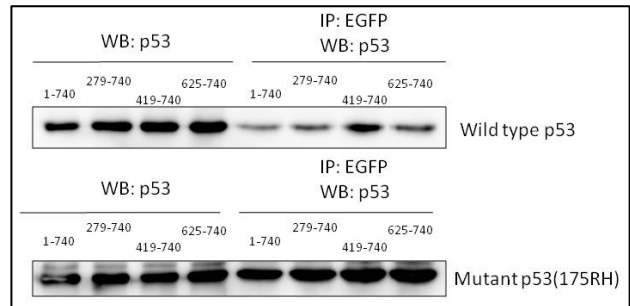


図 6 Daxx625-740 領域は変異型 p53 に強く結合する

変異型 p53 は核内に局在する。Daxx も核内に局在するが、Daxx625-740 も同様に核内に局在するのかわかった。EGFP ベクターに組み込んだ Daxx625-740 を細胞内に強制発現させたところ、核内に局在することが明らかとなった。(図 7)

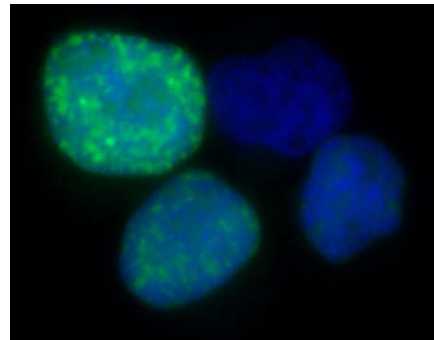


図 7 Daxx625-740 は核内に局在する

Daxx625-740 を p53 が欠失した H1299 細胞に発現させ、コントロール細胞とシスプラチンの感受性を比較した。Daxx625-740 を発現した細胞はシスプラチンに抵抗性を示すことがわかった (図 8)。

この領域が変異型 p53 以外の部分になんらかの作用をしてシスプラチン経路を阻害している可能性があり、もしかすると Daxx の C 末端側のみが発現する腫瘍が存在するかもしれない。

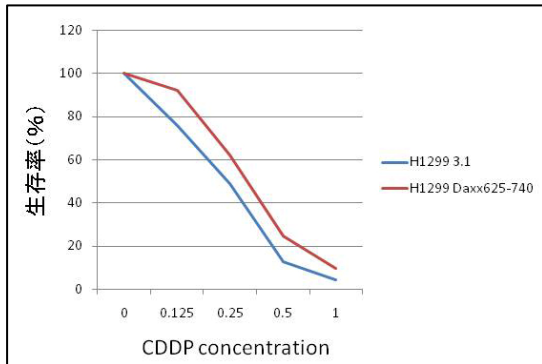


図8 *Daxx625-740* を発現する細胞はシスプラチンに抵抗性を示す。

- (1) 研究代表者  
北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：00451451
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし

#### 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 Takeshi Kuroshima, Tetsuya Kitamura, Fumihiko Higashino (他 7 名 4 番目) Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. *Oncogene*. 査読有り, advanced online publication, 2011 in press.
- ② Wataru Kakuguchi, Tetsuya Kitamura, Fumihiko Higashino (他 5 名 2 番目) HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Molecular cancer research*, 査読有り, 8(4): 520-8, 2010.
- ③ Tetsuya Kitamura, Nobuo Horikoshi (他 6 名 1 番目) Mutant p53 disrupts the stress MAPK activation circuit induced by ASK1-dependent stabilization of Daxx, *Cancer research* 査読有り, 69(19):7681-8, 2009.
- ④ Fukuyo Yayoi, Tetsuya Kitamura, Nobuo Horikoshi (他 5 名 2 番目) Phosphorylation-dependent Lys63-linked polyubiquitination of Daxx is essential for sustained TNF- $\alpha$ -induced ASK1 activation. *Cancer research* 査読有り, 69(19):7512-7, 2009.

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Tetsuya Kitamura, Spindle cell carcinoma in lower gingival. Report of a case. 日本臨床口腔病理学会、2010年7月31日、大阪歯科大学 (大阪府)
- ② Tetsuya Kitamura, DaxxはTNF- $\alpha$ によるJNK活性化経路に重要な役割を果たす, 日本病理学会、2009年5月2日、京都国際会議場 (京都府)

#### 6. 研究組織