

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1日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700871

研究課題名（和文）MDM2によるp53のユビキチン化を制御する核タンパク質LDOC1の機能解析

研究課題名（英文）Study of the function of the nuclear protein LDOC1 in the regulation of MDM2-mediated p53 ubiquitination

研究代表者

那須 亮 (NASU RYO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30466859

研究成果の概要（和文）：核タンパク質 LDOC1 が、DNA 障害性薬剤により誘導される p53 標的遺伝子の発現を制御していることを見出した。さらに p53 標的遺伝子は、LDOC1 による制御を受ける群と、受けない群に分かれることが明らかになった。これらのデータは LDOC1 が p53 の安定性の調節のみではなく、リクルート制御にも関与していることを示唆している可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：The nuclear protein LDOC1 is found to regulate the expressions of p53-target genes induced by DNA-damaging reagents. Moreover, p53-target genes are divided into the LDOC1-dependent and -independent groups. These data raise the possibility that LDOC1 is involved not only in the regulation of p53 stability but also in the control of the recruitment of p53.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌抑制遺伝子、細胞死、クロマチン、p53、MDM2

1. 研究開始当初の背景

TP53 は半数以上のヒトの悪性腫瘍で欠失と変異が認められる、最も重要な癌抑制遺伝子である。その遺伝子産物 p53 は、細胞に対するストレスを受け、増殖抑制、細胞死及び細胞老化を誘導する転写因子である。さらに

近年、p53 がミトコンドリアを介して直接あるいは間接的に細胞死を誘導できる可能性が示されている。p53 の活性は主に、ユビキチン-プロテアソーム系による発現量の制御によって調節されていることが知られている。ストレスを受けていない細胞において

p53 の半減期は非常に短く、その発現量は低レベルに維持されている。しかし、放射線や DNA 障害性薬剤の刺激を細胞に加えると、p53 はユビキチン化が阻害されることによりプロテアソーム依存的分解から回避し、その発現量が増加する。p53 のユビキチン化は主に、RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 が担っている。MDM2 をコードする *mdm2* は、ヒトの悪性腫瘍において高頻度に遺伝子増幅が認められる癌遺伝子である。さらに *mdm2* は p53 の直接の標的遺伝子であることが知られており、フィードバックループが形成されていることが明らかになっている。細胞に対するストレス後の p53 の活性化は、MDM2 による p53 のユビキチン化が抑制されることが主たる要因となっている。したがって、この抑制機構の分子メカニズムを明らかにすることは、DNA 損傷後の細胞応答に関する理解を深めるだけでなく、野生型 p53 を持つ癌細胞に対する治療法の開発に貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、MDM2 の RING フィンガーモチーフに着目した。RING フィンガーは多くのユビキチンリガーゼ複合体に共通する、E2 ユビキチン結合酵素との相互作用部位である。しかし、同種の E2 が結合することが知られている RING フィンガーモチーフ間においてもその相同性は非常に低く、各々の E3 リガーゼに特異的な制御因子が結合する可能性が考えられた。我々は MDM2 のリングフィンガー部位のみ (アミノ酸 423-491) をベイトとした酵母 two-hybrid スクリーニングを行い、LDOC1 (leucine zipper protein down-regulated in cancer cells) を見出した。LDOC1 は 146 アミノ酸から構成され、ヒト

の悪性腫瘍で高頻度に発現が抑制されていることが報告されていた (Nagasaki et al. *Cancer Lett.* 140, 227-234 1999)。我々は、LDOC1 が MDM2 の RING フィンガー部位への結合だけではなく、p53 のカルボキシル末端に対する結合能も有していることを明らかにした。さらに、*in vitro* 及び *in vivo* でのユビキチン化アッセイを行い、LDOC1 が MDM2 による p53 のユビキチン化を抑制することを見出した。野生型 p53 を持つ癌細胞に DNA 障害性薬剤であるアドリアマイシンを作用させると、p53 依存性の細胞死が誘導されることが知られている。しかし、siRNA を用いて LDOC1 の発現を抑制した細胞では、*bax*、*puma*、*noxa* 等の細胞死に関与している p53 の標的遺伝子の刺激後の誘導が抑制されることが見出された。

ヒストンはクロマチンの最小基本単位であるヌクレオソームを構成する DNA 結合タンパク質である。ヒストンは多様な翻訳後修飾を受け、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしていることが知られている。LDOC1 特異的抗体を作製して内在性タンパク質の細胞内局在を観察したところ、核内に局在することを確認した。明らかな DNA 結合領域を持たない LDOC1 は、ヒストンに結合することにより核内に局在する可能性が考えられた。*In vitro* での結合実験を行ったところ、LDOC1 はそのカルボキシル末端に存在する酸性アミノ酸リピートを介して、塩基性タンパク質であるヒストンと相互作用することが見出された。したがって LDOC1 は、p53 のユビキチン化の制御だけではなく、クロマチン上での転写調節にも関与している可能性が考えられた。

本研究はこれらの実験結果をふまえて、LDOC1 による p53 制御のメカニズムをさらに明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

1) LDOC1により制御される p53 依存性細胞死の *in vitro* 解析

野生型 p53 を持つ細胞に DNA 障害性薬剤による刺激を与えると p53 が安定化し、その標的遺伝子の発現を促進することにより細胞死を誘導する。野生型 p53 を持つ乳癌細胞である MCF-7 細胞を i) 野生型 LDOC1 及び p53 に結合しない LDOC1 変異体を強制発現させた後、及び ii) siRNA を導入して LDOC1 の発現を抑制した後に、DNA 障害性薬剤であるアドリアマイシンを作用させ、p53 依存性細胞死をアネキシン V 染色法にて解析する。p53 は UV 照射後にも安定化し、その標的遺伝子の発現を促進することが知られている。MCF-7 細胞を UV 照射した後に上記の実験を行い、結果を比較検討する。

2) LDOC1により制御される p53 依存性細胞死の *in vivo* 解析

野生型 p53 を持つ癌細胞は、p53 の活性及び発現量を増加させることにより、細胞死を誘導できる可能性があると考えられている。MCF-7 細胞にレンチウイルスベクターを用いて i) 野生型 LDOC1 及び p53 に結合しない LDOC1 変異体を強制発現させた後、及び ii) shRNA を導入して LDOC1 の発現を抑制した後に、免疫不全マウスへ移植して造腫瘍能を観察する。さらに、アドリアマイシンを移植後のマウスに投与し、抗癌剤に対する感受性を調べる。

3) LDOC1 の制御機構の解析

LDOC1 が、アドリアマイシン処理後の p53 標的遺伝子の誘導に関与していることが見出された。したがって、LDOC1 の発現量及

び局在が、アドリアマイシン処理後に変化する可能性が考えられた。MCF-7 細胞にアドリアマイシンを作用させた後に、特異的抗体を使用した Western blotting 及び RT-PCR を行い、LDOC1 の発現量の変化を観察する。さらに、特異的抗体を使用した免疫染色を行い、LDOC1 の細胞内局在の変化を調べる。

4) LDOC1 による制御における p53 の翻訳後修飾の機能解析

p53 はリン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化などの様々な化学的修飾を受けることが知られている。特に p53 のカルボキシル末端には、それらの標的となるアミノ酸残基が集中している。LDOC1 との結合部位も p53 のカルボキシル末端に見出されたことから、p53 の翻訳後修飾が LDOC1 との結合を調節している可能性があると考えられた。p53 の各修飾アミノ酸部位の変異体を作製し、LDOC1 に対する結合能を解析する。さらに、修飾 p53 特異的抗体を使用した結合実験を行い、結果を比較検討する。

5) LDOC1 が制御する遺伝子群の解析

LDOC1 は p53 の他にも、転写因子 MZF-1 と相互作用することにより細胞死を誘導することが報告されている (Inoue et al. *FEBS Lett.* 579, 604-608 2005)。また、NF- κ B シグナルを抑制することにより、TNF- α 及び PMA による細胞死を促進することが示されている (Nagasaki et al. *Int. J. Cancer* 105, 454-458 2003)。さらに、LDOC1 とヒストンとの相互作用が見出されたことから、LDOC1 が p53 の制御だけではなく、多様な転写因子の活性をクロマチン上で制御することにより細胞死を促進している可能性が考えられた。MCF-7 細胞に i) 野生型 LDOC1 を強制発現させた後、及び ii) siRNA を導入

して LDOC1 の発現を抑制した後に、遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法にて解析する。さらに、上記の実験をアドリアマイシン処理、UV 照射、TNF- α 及び PMA 処理等の細胞死を誘導する刺激後に行う。また、変異型 p53 を持つ乳癌細胞 T47D を用いて同様の実験を行い、結果を比較検討することにより、LDOC1 による MDM2 依存性転写制御と非依存性転写制御の割合を算出する。

6) LDOC1 のゲノム上の結合部位とヒストン修飾制御の解析

LDOC1 はそのヒストン結合領域を介してクロマチン上に局在すると予想される。MCF-7 細胞から可溶性クロマチンを調製し、LDOC1 特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降-シーケンシング解析を行う。得られたゲノム上の結合位置と、5) のデータを比較検討し、LDOC1 の直接の標的遺伝子を同定する。さらに、LDOC1 を強制発現させた細胞及び siRNA を導入して LDOC1 の発現を抑制した細胞を使用して、修飾ヒストン特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降-シーケンシング解析を行い、LDOC1 のヒストン修飾制御への関与を調べる。

7) LDOC1 を含む核内複合体の解析

転写制御には様々なタンパク質が複合的に関与していることが知られている。LDOC1 による転写制御のメカニズムを総合的に解析するためには、LDOC1 を含む核内複合体を単離同定することが必要であると考えられた。MCF-7 細胞に FLAG タグを融合させた LDOC1 を強制発現させ後に、FLAG タグに対する抗体を用いた免疫沈降法にて、核抽出液から LDOC1 を含む複合体を分離する。その後質量分析法によって複合体の構成因子を同定する。

4. 研究成果

p53 野生型の乳がん細胞株 MCF-7 細胞に siRNA を導入して、LDOC1 の発現を抑制した場合の p53 標的遺伝子の発現を RT-PCR にて確認した。その結果、LDOC1 の発現を抑制した細胞では、p53 標的遺伝子の発現量減少が観察された。p53 野生型の乳がん細胞株 ZR-75-1 細胞でも同様の効果を確認した (図 1)。さらに、様々な DNA 障害性薬剤による刺激を与えた結果、LDOC1 は抗癌剤エトポシドによって誘導される p53 標的遺伝子の発現を顕著に制御していることを見出した (図 2)。

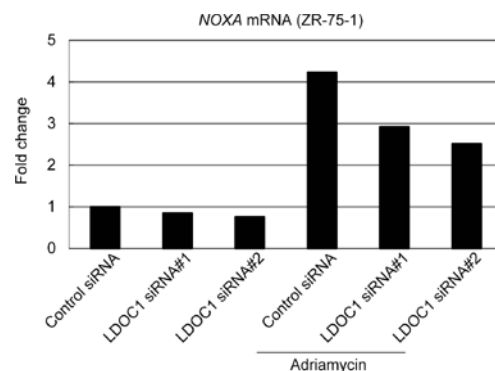


図 1 NOXA の RT-PCR 解析 ZR-75-1 細胞

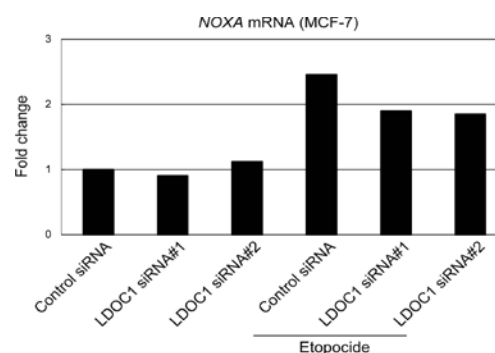


図 2 NOXA の RT-PCR 解析 MCF-7 細胞

上記の結果をさらに検討したところ、p53 標的遺伝子は LDOC1 によって発現が制御される群と、制御を受けない群に分かれること

が明らかになった。これは LDOC1 が p53 の安定性だけでなく、標的遺伝子へのリクルートに関与している可能性を示唆していると考えられた。この分子メカニズムを明らかにするために、MCF-7 細胞に FLAG タグを融合させた LDOC1 を強制発現させた後に免疫沈降を行い、核抽出液から LDOC1 を含む複合体を分離した。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 那須 亮、西村 教子、川崎 善博、藤堂 具紀、稲生 靖、武笠 晃丈、高柳 俊作、齊藤 延人、新井 健明、眞鍋 瑛美、秋山 徹

The molecular mechanisms of the regulation of Wnt signaling in glioblastoma stem cells

第 34 回日本分子生物学会年会
平成 23 年 12 月 14 日
パシフィコ横浜

- ② 那須 亮、西村 教子、藤堂 具紀、稲生 靖、齊藤 延人、油谷 浩幸、船戸 洗佑、越前 佳奈恵、春田 諒、松井 真弓、高橋 理那、小田 健昭、秋山 徹

The critical role of cyclin D2 in glioblastoma stem cells

第 69 回日本癌学会学術総会
平成 22 年 9 月 22 日
大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 亮 (NASU RYO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：30466859

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：