

特集：タンパク質修飾がもたらす遺伝子発現調節

転写因子 p53 の翻訳後修飾と転写活性化機構

田中 知 明

がん抑制遺伝子産物 p53 には、「ゲノムの守護神」としての生体のがんから防ぐという機能以外にも実に多彩な生理作用を発揮することがわかってきた。それは主に p53 が転写因子として機能し、生理作用の異なる様々な下流遺伝子群を、生体ストレスの種類や程度に応じて、時間的・空間的・選択的に巧妙に支配しているからである。DNA 傷害などの細胞ストレスに応答して、p53 は、種々の翻訳後修飾を受ける。その結果、タンパク質は安定化し DNA 配列特異的に結合して、標的遺伝子を転写活性化する。そのプロセスにおいて、リン酸化・アセチル化・メチル化・ユビキチン化などの化学修飾と、多くの分子との相互作用が、転写特異性の制御や多様な機能発現にとっても重要な役割りを果たしている。本稿では、p53 の翻訳後修飾と転写活性化機構について概説する。

1. はじめに

がん抑制遺伝子産物 p53 は、多種多様な生体ストレスから細胞を守り、がんを防ぐという働きから、「cellular gatekeeper：細胞の番人」、「the guardian of the genome：ゲノムの守護神」などと称されている¹⁾。実際、多くのがんの約半分以上で p53 やそのシグナル伝達経路に関わる分子に変異が見つかっている。p53 とそのファミリーは、主に転写因子として作用し、多種多様な下流遺伝子を転写活性化することで、その機能を発揮する。よく知られている細胞周期停止・アポトーシス誘導以外にも、最近、解糖系や活性酸素調節、ミトコンドリアでの呼吸・エネルギー代謝²⁾、オートファジー、iPS 誘導や老化シグナルとのクロストークなど新たな細胞生理機能が報告され、実は、p53 は想像以上に多彩な生理機能を持つことがわかってきた^{1,3,4)}。p53 による様々な反応の誘導や多彩な細胞応答は、ストレスの種類や強さにより、p53 によって制御を受ける下流遺伝子が異なるためと考えられている。ゲノムワイドの解析か

ら、p53 には 200 種類以上の機能の異なる標的遺伝子が存在し、これらの遺伝子群を転写活性化または転写抑制することで、細胞の受けたストレスに対して正確に且つ柔軟性を持って対応している。また、p53 及びそのファミリー分子は、特に N 末端部や C 末端部に多くの Ser 残基や Thr 残基が存在しているが、構造解析や活性調節機構の研究から、p53 タンパク質自体がリン酸化やアセチル化などの化学修飾を介し、量的・質的の制御を受けて、その転写活性機能が緻密にコントロールされていることが次第に明らかになりつつある (図 1, 図 2)。これまでに、p53 タンパク質のうち 40 以上のアミノ酸残基が化学修飾を受けていることが報告されている (図 1)。本稿では、p53 とそのファミリー分子における翻訳後修飾について、p53 の活性化段階に従って、我々の研究成果を交えながら概説する。

2. p53 タンパク質の安定化に関わる翻訳後修飾

p53 は、大きくわけて三つの領域から構成されている (図 1)。1 番目は、転写活性化ドメインを持つ N 末端領域である。この領域はさらに多くの Ser/Thr 残基を有し、転写因子としての活性に重要な N 末端部と、これに続くドメイン (アミノ酸 61-94 番目) の二つに分けられる。このドメインには PXXP モチーフが 5 回繰り返される特徴的な配列が認められ、プロリンリッチドメインと呼ばれている。2 番目は、DNA 結合ドメインとしてのコアドメインである。これは、3 箇所の疎水性部位を含み、電荷を帯び

千葉大学大学院医学研究院細胞治療学講座 (〒260-8670 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

Regulation of p53 function and promoter selectivity by post-translational modifications

Tomoaki Tanaka (Department of Clinical Cell Biology, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-8670, Japan)

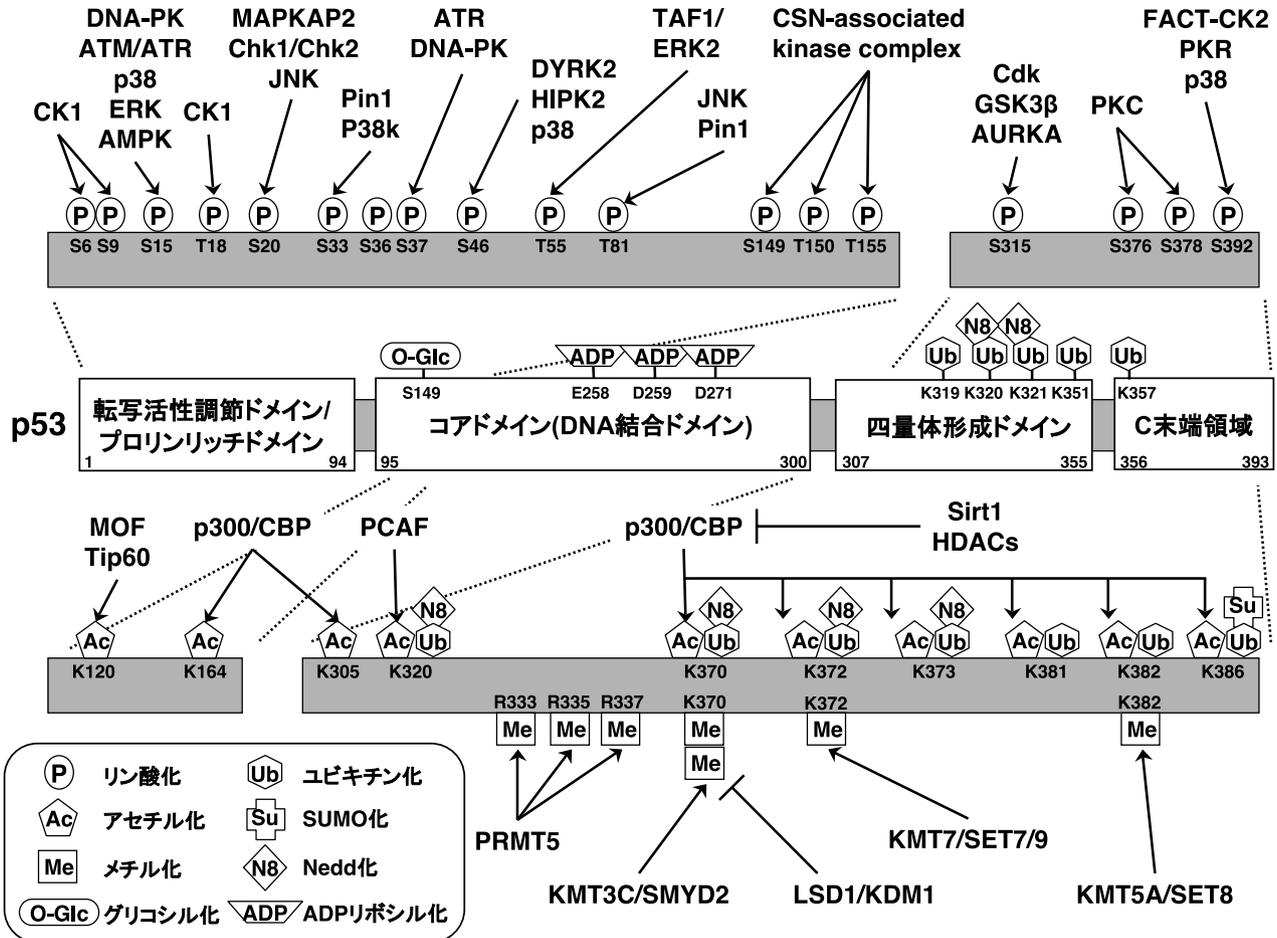


図1 ヒト p53 翻訳後修飾と修飾酵素の一覧

上段のパネルに、リン酸化を受ける Ser 及び Thr 残基を示す。それらのリン酸化を引き起すことが報告されている酵素と対応するリン酸化部位を矢印で結んである。また中段には、p53 のドメイン構造とグリコシル化・ADP リボシル化・ユビキチン化・Nedd 化部位を示してある。下段には、上側にアセチル化部位を中心に、ユビキチン化・Nedd 化部位を示し、下側にはメチル化部位を示してある。対応する酵素は矢印で結んである。

た酸性及び塩基性アミノ酸をほとんど含まない。3番目は、C末端領域であり、親水性で塩基性アミノ酸に富む。核移行シグナル(NLS)や四量体形成ドメインを有し、非特異的にDNAに結合し、アセチル化やメチル化されるLysやArg残基を多く有している。p53は、非ストレス時(定常状態)には、ユビキチン-プロテアソーム経路によって恒常的に分解され、細胞内のp53の発現レベルが非常に低く保たれている。DNA傷害などの細胞ストレスに応じてp53タンパク質は安定化し、急速に発現が増強する(図3C)。筆者が、細胞1個あたりに含まれるp53の量を概算したところ(あくまでもおおよその計算量であり実際の量を正確に反映している訳ではない)、乳がん細胞株MCF7にて、0.08-0.2pg/cellで、ADRによるDNA傷害で、約8~20倍に増える(図3C, 3D)⁵⁾。p53のリン酸化はp53タンパク質を安定化する第一段階と考えられている。図1に示すように、ATMやATR, DNA-PK, Chk1, Chk2など

様々な酵素がp53をリン酸化することが報告されている^{6,7)}。N末に存在するSer15(マウスSer18)とSer20(マウスSer23)のリン酸化はp53のユビキチンリガーゼであるMdm2の会合を抑制することでp53タンパク質の安定化を誘導することが知られている(図2)。Ser15とSer20のリン酸化はDNAダメージなどによって誘導され、リン酸化酵素としてはATMやATR, DNA-PK, Chk1, Chk2などが知られている。ストレスの種類の違いによるリン酸化酵素の使い分けや、どの程度のリン酸化がp53とMdm2との会合を阻害するかなどについては明らかにされていない。N末に存在するリン酸化を受けるSerに変異を導入したノックインマウスが作製され、*in vivo*でのp53タンパク質の安定化の誘導におけるそれぞれのリン酸化の役割が明らかにされた^{7,8)}。Ser18Ala, Ser23Ala変異体では、p53の発現レベルにわずかに変化がみとめられるものの、胸腺や脾臓、繊維芽細胞などの臓器においてストレス応答性の

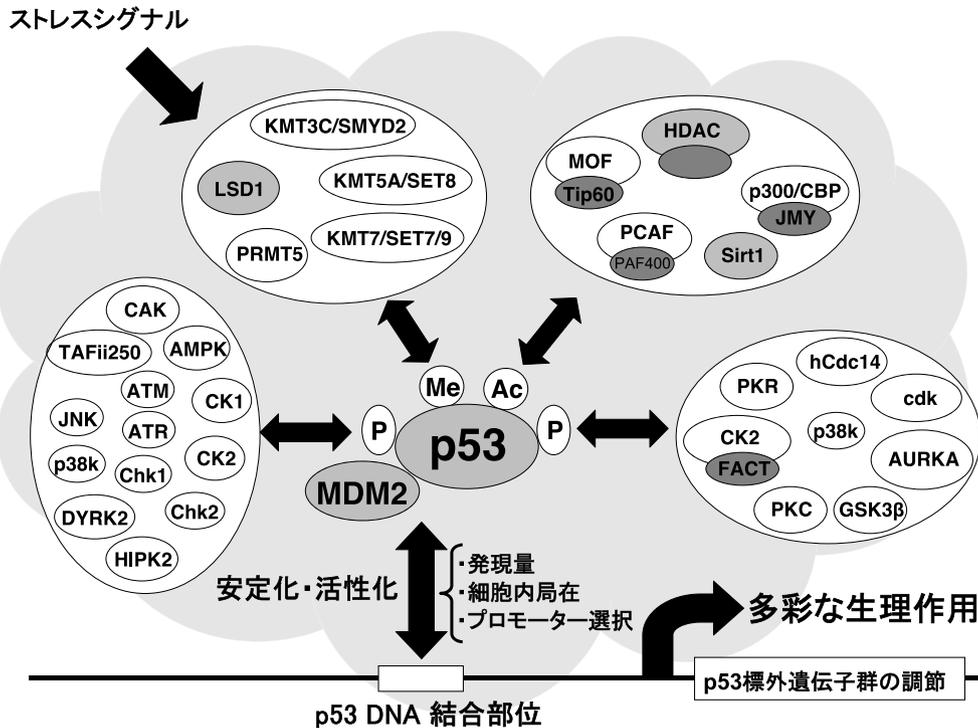


図2 ストレスシグナルにตอบสนองする p53 の多彩な生理作用とその翻訳後修飾
細胞へのストレスに応じて、種々のシグナル経路が活性化し、その結果として p53 の様々な化学修飾が引き起こされる。そして、時間的・空間的な制御を介して p53 の安定化と転写活性化が引き起こされ、標的遺伝子群の発現を調節し、多彩な生理作用を発揮する。

p53 タンパク質の安定化に有意な変化は認められなかった^{7,8)}。また、Ser18, Ser23 に同時に変異を導入した Ser18/23Ala マウスでは、p53 の発現レベルの低下と p53 機能の抑制が認められたことから、これらの Ser のリン酸化が生理的にも重要であることが示された^{7,8)}。しかし、これらの p53 機能喪失は特定の臓器や DNA 傷害後のアポトーシス誘導だけに限られるなど、限定した条件においてのみ観察された。この結果は、p53 が多彩な生理作用を発現するために、これらのリン酸化だけが絶対不可欠という訳ではないことを示している。これらの生化学的・遺伝学的な研究から、生体内における p53 タンパク質の安定化・活性化は、一つのリン酸化経路だけにとどまらず、精巧で複雑なネットワークによって制御されていると考えられる。つまり、生体にとって重要な分子の機能を損なわないように、幾重ものセーフティネットによって守られているのである。

3. Mdm2 による p53 タンパク質の分解

これまでの研究から p53 に特異性の高い、最も重要な E3 リガーゼとして Mdm2 が同定されている。Mdm2 欠損マウスでは、p53 レベルの上昇が認められるものの p53 タンパク質の分解が検出されることから、細胞内では Mdm2 を介さない p53 分解メカニズムの存在がわかっていた⁹⁾。最近、COP1 や Pirh2, Arf-BP1 などの E3 リガーゼが p53

をユビキチン化することが、*in vitro* における生化学的な解析から明らかにされた⁷⁾。しかし、Mdm2 に依存しないこれらの E3 リガーゼが、*in vivo* におけるストレス誘導性の p53 の活性化に重要な役割を果たしているかについては不明である。

興味深いことに、p53 の安定性を制御する Mdm2 の機能もやはり何重ものメカニズムによって厳重に制御されている。がん抑制遺伝子として知られる Arf は Mdm2 の機能を制御する重要な分子である。Arf は p53 と Mdm2 の会合を阻害することにより p53 タンパク質の安定化と活性化を誘導する。Arf の発現レベルは正常状態では低く、がん原性のストレスにより劇的に発現が上昇する。Arf の発現上昇は p53 依存的な細胞増殖の停止やアポトーシスを誘導し、がん細胞の異常な増殖を抑制する。MdmX は Mdm2 と同様に p53 に直接作用し、抑制因子として働くが、同時に Mdm2 の活性制御因子としても働く。MdmX は Mdm2 とお互いの C 末にあるリングフィンガードメインを介し会合し、Mdm2 の E3 リガーゼ活性を亢進させる。筆者は質量分析を用いて、Mdm2 結合タンパク質をスクリーニングした結果、リボソームタンパク質 L5 や L11, L23 を同定した (未発表データ)。これらは Mdm2 に会合し、その機能を抑制することで、リボソームストレスによる p53 の活性化を制御している⁹⁻¹¹⁾。

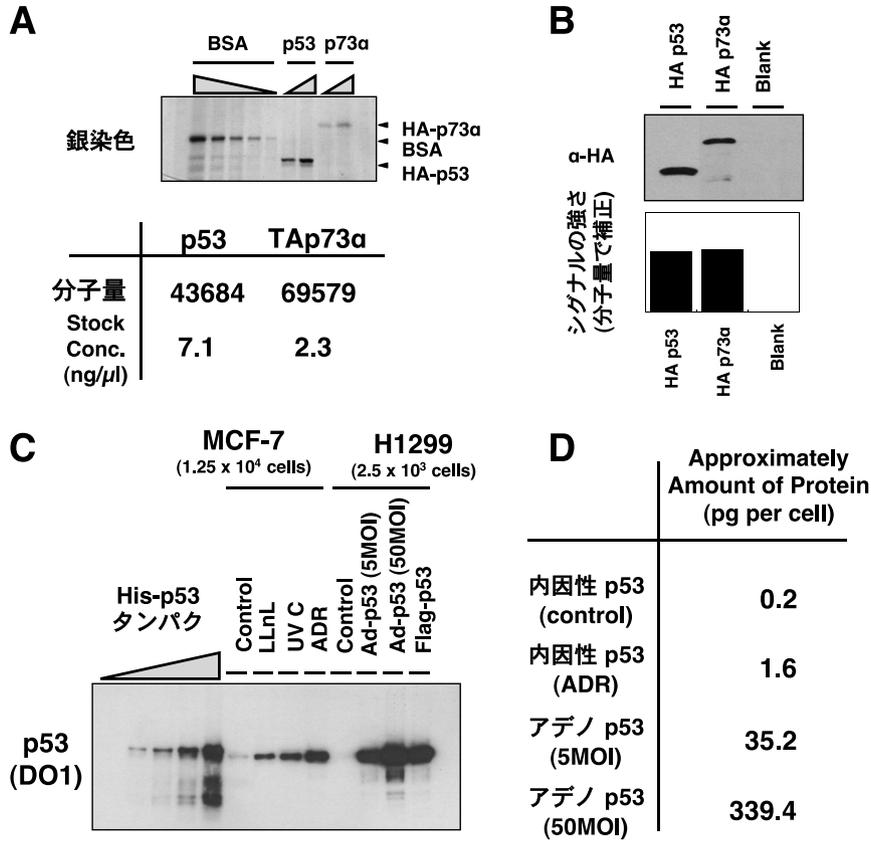


図3 DNA 傷害後の p53 の発現誘導と単位細胞当りの発現量
 A. 銀染色を用いた標準 p53 及び p73 リコンビナントタンパク質の定量
 B. 標準 p53 及び p73 リコンビナントタンパク質のシグナルとモル比の比較
 C. MCF-7 細胞における DNA 傷害後の p53 発現誘導とアデノ p53WT による発現誘導
 D. 単位細胞当りの p53 発現量の概算

また、脱ユビキチン化酵素が Mdm2 の機能制御をさらに複雑にしている。Mdm2 はもともと自己ユビキチン化を介して分解されることから、非常に不安定なタンパク質である。HAUSP は p53 だけでなく Mdm2 を脱ユビキチン化する酵素である。最近、RASSF1A は Mdm2 を脱ユビキチン化する機能的な HAUSP 複合体の活性を抑制し、分解を促進することで、結果的に p53 タンパク質の安定化に関与していることが報告された⁷⁾。このように、Mdm2 の発現量や活性制御を介して細胞内の p53 レベルに影響を与える分子群が続々と報告され、複雑な分子機構が明らかにされつつある。

さらに Mdm2 は、リン酸化やアセチル化といった翻訳後修飾を受けることで、その機能の抑制または活性化が誘導されることが知られている。Ser395 や Tyr394 のリン酸化は Mdm2 の活性を抑制し、Ser166 や Ser186 のリン酸化は E3 リガーゼ活性を促進する。一方、Mdm2 を脱リン酸化する WIP1 は Mdm2 タンパク質を安定化し、p53 タンパク質の分解を促進するなどが知られている。ヒストンアセチル化酵素として知られる p300/CBP は Mdm2 をアセチ

ル化することでその活性を抑制する。おもしろいことに p300/CBP は p53 の C 末にある Lys 残基もアセチル化する (図 1)。一つの Lys 残基に対してアセチル化とユビキチン化は排他的に働き、p300/CBP によってアセチル化された p53 は Mdm2 によるユビキチン化を受けにくいことが生化学的な解析から明らかになっている⁷⁾。このように、p300/CBP は Mdm2、p53 をアセチル化することで、p53 タンパク質の安定化を誘導している。

p53 の C 末にある六つの Lys 残基が Mdm2 依存的なユビキチン化の重要なターゲットサイトであると考えられてきた。しかし最近、これらの六つの Lys 残基を Ala 残基に置換した変異体を発現するノックインマウスが作製されたが、p53 タンパク質の安定性に変化は認められなかった^{7,8)}。この結果から、生理的な条件下では他の Lys 残基も Mdm2 依存的なユビキチン化のターゲット部位になっていると推定されている。また、p53 の DNA 結合領域や N 末にある Lys 残基がユビキチン化を受けていることが、*in vitro* の解析から明らかにされた (図 1)。これらの Lys 残基が生理的な Mdm2 のターゲットになっているのかもし

れない。

このように、p53のリン酸化サイトのノックインマウスの解析から、*in vivo*におけるp53タンパク質の安定化機構は非常に複雑であることがわかった。これまでに作製されたノックインマウスでは、*in vitro*における生化学的な研究のようにp53の安定性が劇的に変化することはなかった。現在、生体におけるp53の安定化機構はp53のリン酸化によって制御されるモデルだけでなく、より複雑な制御をうけるMdm2の活性調節を介したモデルの重要性が認識されている。

4. DNAへの配列特異的な結合、リン酸化とプロモーター特異性

がん細胞で認められるp53変異のほとんどがDNA結合領域に認められることは、p53のがん抑制機能の発揮にDNAへの結合が重要であることを示唆している。p53による下流遺伝子の転写活性化プロセスにおいて、標的遺伝子のプロモーター領域へのp53の結合が重要であることはいうまでもないが、ストレスの種類や強さによってp53の翻訳後修飾パターンが変化し、その結果、異なる下流遺伝子座に特異的に結合できるようになると考えられていた(図2)。実際に筆者らは、Ser46のリン酸化によってアポトーシス誘導遺伝子の一つであるp53AIP1遺伝子プロモーターへの親和性が高まることを報告した^{12,13)}。しかし、最近の研究ではストレスを受けていない状態でも不活性化p53が下流遺伝子座へ結合していることが示され、細胞ストレスのシグナルによりプロモーター上でp53が活性化されるモデルが提唱されている。筆者らは、ChIP(chromatin immunoprecipitation)アッセイによりMdm2とp53がCDKN1A/p21のプロモーター上に同時に結合し、その転写活性を抑制していることを示し¹⁴⁾、またChIPシーケンス解析から、定常状態のp53が特定のプロモーター領域に結合していることを確認している(未発表データ)。

p53は生体ストレスの種類や強さの程度により、異なった下流遺伝子の発現を制御するが、これら遺伝子の特異性はp53が特異的なコファクターと会合し複合体を形成することが重要と考えられている。そして、コファクターとの会合は、タンパク質コードとしてのp53の翻訳後修飾パターンの違いとその「読み取り分子」によって、もしくは逆に、あるコファクターが結合することで、特徴的なp53タンパク質の修飾が誘導され、その結果、特異的な下流遺伝子のプロモーター領域に会合できるようになる、もしくは特定の領域のクロマチン構造を変換するといったモデルが考えられている。例えば、Pin1は、Ser33やThr81のリン酸化依存的にそのシストラン構造を変化させて機能制御を行っている⁷⁾。しかしながら、p53のシストラン構造が変化した後、どのような分子機構で転写活性化が

調節されているか、どのようにプロモーターの選択性が制御されるのかよく分かっていない。また、過去に数多くのp53会合分子が報告されており、p53の転写調節機能に重要な役割を果たすことが示されているが、*in vivo*における下流遺伝子選択のメカニズムと、その結果として生じる細胞運命の決定機構については、本質的には解決されていない。

5. p53のアセチル化とプロモーター特異性

ヒストンアセチル化酵素はp53の機能、特に転写活性化を制御する重要な分子である。ヒストンはアセチル化されることが初めて示されたタンパク質で、ヒストンのアセチル化が転写制御に大きな役割を担っている。p53はヒストン以外ではじめてアセチル化による機能が制御されると報告されたタンパク質である。p300/CBPはp53をアセチル化する酵素で、いくつかのがん細胞で変異が認められる。p53のアセチル化はコファクターとの会合やターゲット遺伝子の転写活性化効率を上昇させる。p53とp300/CBP複合体がプロモーター領域に結合すると、p300/CBPはその近傍のヒストンをアセチル化することで転写の起こりやすいクロマチン状態を作り出す。p53のアセチル化は細胞ストレスにより誘導され、p53タンパク質の安定化や活性化とよく相関している。p53のC末領域におけるアセチル化が報告されているLys残基6箇所に変異を導入したp53-6KRノックインマウスでは、ES細胞や胸腺細胞においてDNA傷害後のp53依存的な遺伝子発現誘導に障害が認められた^{7,8)}。この結果は、これまで*in vitro*で示されてきたp53のアセチル化の役割が実際に*in vivo*でも重要であることを証明している。しかしながら、これらの現象は一部の組織に限定して生じることから、C末のアセチル化の重要性には組織特異性が認められ、またリン酸化同様、p53の機能の全てにおいて、特にアポトーシスの誘導や細胞増殖の制御に必ずしも重要なわけではないことが示された。

PCAFはp53のLys残基K320(マウスではK317)をアセチル化するコアクチベーターである。驚いたことに、このLys残基に変異を導入したK317Rノックインマウスでは、胸腺細胞におけるproapoptotic遺伝子の発現上昇が認められ、放射線照射後のアポトーシス誘導が亢進していた^{7,8)}。この結果は、もともとの予想に反しており、生体レベルでの条件ではK320のアセチル化は非常に複雑な作用を持っていることを示唆している。

最近の研究からp53のアセチル化はC末領域に限られたことではないことが明らかにされつつある。DNA結合ドメインにあるK120は生物種を越えて保存されており、MofやTip60によりアセチル化される⁷⁾。K120のアセチル化はproapoptoticなp53下流遺伝子であるPumaやBaxの発現誘導に重要であるが、CDKN1A/p21やMdm2の誘導

には影響を与えない⁷⁾。さらに、K120のアセチル化はDNA傷害により誘導されるp53タンパク質の安定性や転写活性化能にも影響を与えない。さらに、K164もp300/CBPによってアセチル化されることが、最近明らかにされた。K120と同様にK164はDNA結合ドメインに存在し、どちらのLys残基もがん細胞でよく変異が認められるアミノ酸である。C末のアセチル化を受けるLys残基とともにK120、K164に変異を導入する(p53-8KR)と、p53によるp21や細胞増殖制御遺伝子の発現誘導が完全に消失する⁸⁾。興味深いことに、C末のアセチル化を受けるLys残基とK120、K164に単独で変異を導入しても、それぞれのアセチル化が機能を補いあって、p21の発現誘導には全く影響を与えない。さらに、p53-8KR変異体はDNAに結合し、転写因子として働く機能は残っており、Mdm2の発現を正常に誘導することはできる。p53-8KR変異体はアポトーシスの誘導や細胞増殖の制御を行うことができず、これらの残基ががん抑制遺伝子としてのp53の働きに極めて重要であることが推測される^{7,8)}。K120やK164を含むDNA結合ドメインは種を越えて高度に保存されており、がん細胞におけるp53変異のうちほとんどがこの領域に集中していることを考えると、K120やK164に変異を導入したノックインマウスの作製とその解析を通じて、これらのLys残基のアセチル化が*in vivo*においてどのような役割を果たしているか明らかにされることが期待されている。

これまでの報告から、p53がアセチル化されるタイミングや部位がp53の機能やストレスを受けた細胞の運命を決定する上で非常に重要であると考えられる。p53依存的な転写活性化のプロセスにおいて、下流遺伝子の中でも、異なるタイプの遺伝子群が異なるメカニズムによって誘導されているようである。このp53依存的なストレス応答は、p53の活性化レベルによって少なくとも3段階に分類することができる。1段階目は、p53の過剰な活性化を抑制する反応である。p53の過剰な反応は細胞の生存に重大な損害を与えかねない。従って、p53はMdm2やPirh2といった遺伝子を活性化することで、自分自身の過剰な活性化を

抑制するネガティブフィードバック経路を持っている。p53によるMdm2やPirh2の活性化にはp53のアセチル化やコアクチベーターとの会合は必要ない。2段階目は、p53による細胞増殖の制御である。この場合p53の標的となる遺伝子はp21などのDNA修復に関わる遺伝子群である。このステップにはp53の部分的なアセチル化やp300/CBP、Tip60/Mofといったコアクチベーターとの会合が必須である。3段階目はp53によるアポトーシスの誘導である。このとき標的になる遺伝子はPUMAやBAX、NOXAといったproapoptotic遺伝子群である。この反応は不可逆的な細胞死を誘導するため、p53の完全な活性化が必要である。例えば、p53の活性化に必要なアセチル化が全て起こり、全てのコアクチベーターと会合するとともに、p53の活性を抑制するMdm2やMdmXからは完全に逃れなければならない。

一方、アセチル化によって活性化されたp53はHDAC1やSir2α/Sirt1により脱アセチル化されることで、不活性化される。HDAC1によるp53の脱アセチル化はp53の転写活性化能や細胞増殖の制御、アポトーシスの誘導などを強く抑制する^{15,16)}。また、Sir2α/Sirt1によるp53の脱アセチル化はDNAダメージ誘導性のアポトーシスを抑制し、ドミナントネガティブ型Sir2α/Sirt1を過剰発現させると細胞ストレスに対する感受性が増加する^{7,15,16)}。さらに、Sir2α/Sirt1欠損マウス由来の細胞ではp53の過剰なアセチル化状態と放射線照射後のアポトーシス誘導の亢進が認められる。p53の脱アセチル化は、p53依存的な転写が不要になった際に素早くp53を不活性化する負のフィードバック機構であると考えられている。アセチル化したp53はMdm2によって分解されにくいことを考えると、p53の脱アセチル化はMdm2を介したp53のユビキチン化と分解に重要なステップであると考えられる。DNA修復の終了後にp53が定常状態に戻ることは、細胞の恒常性を保つために非常に大切である。

6. メチル化, SUMO化, Nedd化によるp53の転写活性化

ユビキチン化やアセチル化だけがp53に起こる翻訳後修

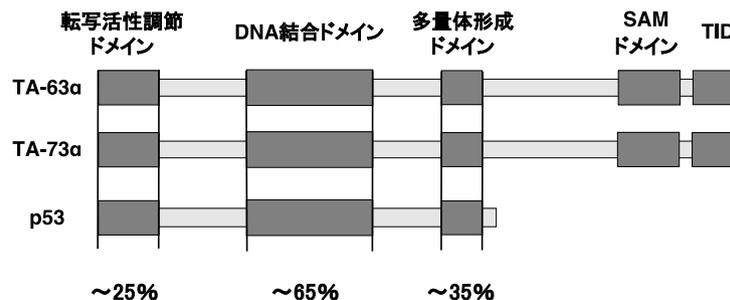


図4 p53とp53ファミリーのTA-p63α, TA-p73αのドメイン構造

転写活性調節ドメイン

TAp63a	----MSQSTQTNEFLSPEVFQHIWDFLEQPICSVQPIDLNFVDEPSEDGATNKIEISMDCIRM	59
TAp73a	----MAQSTATSP-DGGTTFEHLWS-----SLEP-DSTYFDLPQSSRGNNVVGGTDS-SM	49
p53	MEEPQSDPSVEPP-LSQETFSDLWK-----LLPE-NNVLSPLPSQA-----MDD-LM	44

TAp63a	QSDLSLSDPMWPQYTNLGLLNSMDQQIQNGSSSTSPYNTDHAQNSVTAPSPYAQPSSTFDALSP	122
TAp73a	DVFHLEGMTTSVMAQFNLLSSTMDQMSRAASAPYTPHAA-SVPTHSPYAQPSSTFDTMSP	111
p53	-----LSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPVAPAPAA-PTPA-APAPAPSWPLSS---	95

TAp63a	SPAIPSNNTDYPGPHSFDVSSFQSSSTAKSATWTYSTELKKLYCQIAKTCPIQIKVM-TPPPQGAV	185
TAp73a	APVIPSNTDYPGPHFEVTFQSSSTAKSATWTYSPLLKKLYCQIAKTCPIQIKV-STPPPPGTA	174
p53	--SVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCFVQLWVDSTPPP-GTR	156

TAp63a	IRAMPVYKKAEHVTEVVKRCPNHELSTREFNEGQIAPPSHLIRVEGNSHAQYVEDPITGRQSVL	248
TAp73a	IRAMPVYKKAEHVTDVVKRCPNHELGRDFNEGQSAPASHLIRVEGNLSQYVDDPVTGRQSVV	237
p53	VRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE--RCSDSDGLAPPQHILIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVV	217

DNA結合ドメイン

TAp63a	VPEYPPQVGTFTTVLYNFMCNSSCVGGMNRRPILIIIVTLETRDGQVLGRRCFEARICACPGR	311
TAp73a	VPEYPPQVGTFTTILYNFMCNSSCVGGMNRRPILIIITLEMRDGQVLGRRSFEGRICACPGR	300
p53	VPEYPEVEGSDCTTIHYNMCMNSMCMGMNRRPILITITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGR	280

TAp63a	DRKAEDSIRKQVSD--STKNGDGTKRPFQNTHTGIQM--TSIKRRSPDDELLYLVPVGRG	370
TAp73a	DRKAEDHYREQQALNESSAKNGAASKRAFQSPPAVPALGAGVKKRRHGDEDTYYLQVGRG	363
p53	DRRTEENLRKKGEPH--HELPPGSTKRALPNNTSS-----SPQPKKKPLDGEYFTLQIRG	336

多量体形成ドメイン

TAp63a	TYEMLLKIKESLELMQYLPQHTIETYPQQQQQHQHLLQKQTSIQSPSSYGNSPPLNKMNS-	432
TAp73a	NFEILMKLKESLELMELVPLVDSYRQQQQ-----LLQRPSHLQ-PPSYGPVLSMKNVHGG	420
p53	RFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHS-----SHLKSKK--GQSTSRHKKLMF-	385

TAp63a	MNKLPSVSQQLIN--PQQRNALTPPTIPDGMGANIPMMGTHMPMAGDMNGLSPTQALPPPLSMP	493
TAp73a	MNKLPSVNQLVQPPHSSAATPNLGPVPGPM-LNNHGHAVPANGEMSSSHSAQ-----SMV	476
p53	KTEGPDSD-----	393

SAMドメイン

TAp63a	STSHCTPPPPYPTDCSIVSFLARLGCSSCLDYFTTQGLTTIYQIEHYSMDDLASLKIPEQFRH	556
TAp73a	SGSHCTPPPPYHADPSLVSFLTGLGCPNCIEYFTSQGLQSIYHLQNLTIEDLGALKIPEQYRM	539
p53	-----	

TAp63a	AIWKGILDHRQLHEFSPPSHLLRTPSSASTVSVGSS-ETRGERVIDAVRFTTLRQTISFPPR--	616
TAp73a	TIWRGLQDLKQGHYSTAQQLRS-SNAATISIGSGELQRQRVMEAVHFRVRHTITIPNRGG	601
p53	-----	

TAp63a	-----DEWNDFNFDMDARRNKQQRKEEGE-----	641
TAp73a	PGGGPDEWADFGFDLPDCKARKQPIKEEFTEAEIH	636
p53	-----	

赤: 新規リン酸化部位; 青: 新規アセチル化部位;
 緑: 過去に報告されたリン酸化部位; 黄色: LC-MS/MS解析で確認された既知のリン酸化部位.

図5 p53, TA-p63α, TA-p73αの amino 酸一次構造の比較と同定された翻訳後修飾部位

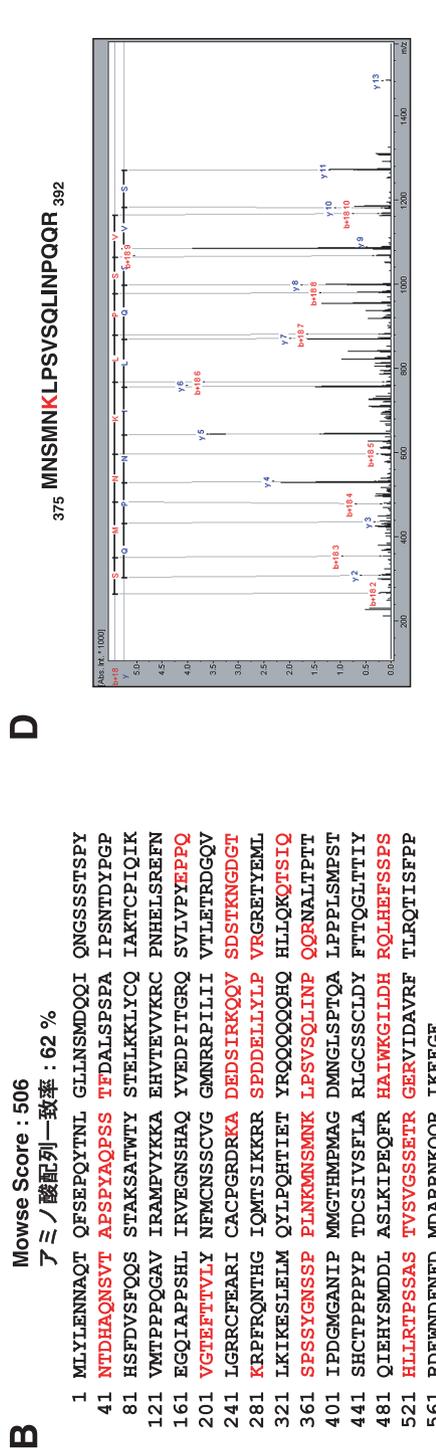
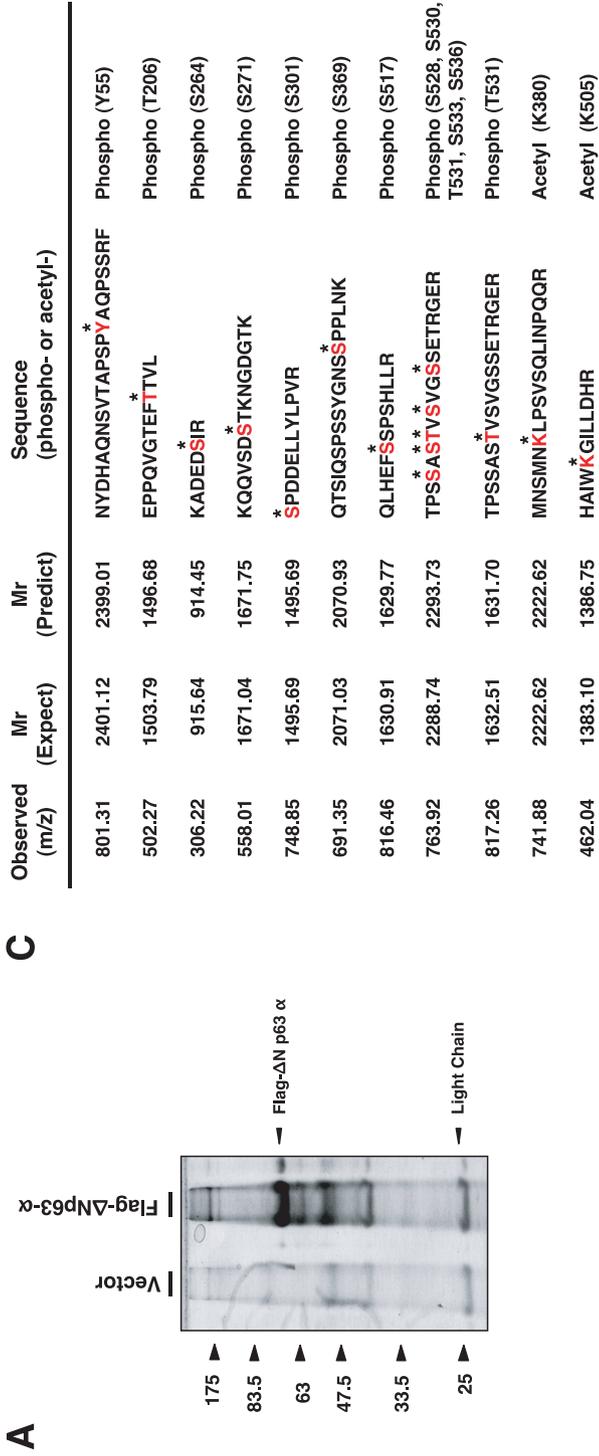


図6 LC-MS/MS を用いた p63α の翻訳後修飾解析
 A. FLAG-ΔN-p63α の免疫複合体
 COS-7 細胞に FLAG-ΔN-p63α を遺伝子導入を用いて発現させ、36 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を調整し、抗-FLAG (M2) 抗体を用いて、p63α の複合体を免疫沈降した。その後、SDS-PAGE で展開し、CBB で染色したイメージ画像。
 B. FLAG-ΔN-p63α バンドを切り出し、トリプシン消化後に LC-MS/MS 解析を施行。相当するバンドを切り出し、トリプシン消化後に LC-MS/MS 解析結果相当するバンドを切り出し、トリプシン消化後に LC-MS/MS 解析を施行。マスコットサーチによる解析結果、上側にアミノ酸配列一致率を示す。
 C. 同定されたリン酸化及びアセチル化されているペプチドのリスト
 D. アセチル化を受けているペプチドにおける MS-MS 解析結果

飾ではない。p53は特異的な部位にメチル化、SUMO化、Nedd化といった修飾を受けることが知られており、これらの修飾状態の相互作用によって、p53の結合するプロモーターの特異性に影響を与えられていると考えられている。

p53をメチル化する酵素は現在3種類知られており、KMT7/Set7/9はK372をモノメチル化し、p53を活性化する。KMT3C/Smyd2とKMT5A/Set8/PR-Srt7はそれぞれK370とK382をモノメチル化し、p53を不活性化する^{7,17}。K370とK382のジメチル化はDNA修復に関わるコファクター、53BP1との会合を促進し、DNA傷害によってジメチル化が誘導されたp53は53BP1と効率よく会合できることが報告されている¹⁷。メチル化によるp53の制御はLys残基だけでなくArg残基にも見られる。アルギニンメチル化酵素PRMT5によってR333, 335, 337がメチル化されるが、その結果p53は標的遺伝子への特異性が変化することが示されている¹⁸。

さらに、p53のC末はSUMO化やNedd化される。これらの修飾の生理的な役割については不明な点が多いが、K386のSUMO化はp53を活性化することやSUMO化されたp53は細胞質に局在することなどが報告されている¹⁷。また、Mdm2によるK370, K372, K373, FBXO11によるK320, K321のNedd化はp53の活性を抑制している可能性が高い。しかしながら、SUMO化やNedd化が*in vivo*においてどのような局面で必要なのか、今後の解析が待たれるところである。

7. クロマチン会合分子によるp53の機能制御

遺伝子の発現調節において、クロマチンの構造的変換や核内のダイナミクス制御が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。上述したように多くのヒストン修飾酵素が、ヒストンばかりでなく転写因子であるp53タンパク質自体を化学修飾して、その機能を調節していることが明らかにされている。従って、p53のクロマチン会合分子群を同定し、コファクターの組み合わせと化学修飾コード、そしてp53のプロモーター特異性との関係を明らかにすることが、生体内におけるp53の機能を理解する上で重要になってくるであろう。筆者は、実際の生きた細胞の核内において作用しているp53を想像した時に、その精密な仕組みをきちんと明らかにするには、クロマチンを足場として機能する大きなクロマチン複合体として解析対象をとらえる必要があるのではないかと考えた¹¹。そこで、ChIPアッセイのプロトコルを応用し、不安定な分子間を架橋し、細胞内のクロマチン上で機能しているp53複合体に含まれる機能的な分子群の同定を試みた¹⁹。この方法によって同定されてきた分子には、プロモドメイン、PHDジンクフィンガーモチーフや塩基性領域など、クロマチンやDNAと相互作用する因子が含まれていた。その中の一

つhCAS (human cellular apoptosis susceptibility protein)/CSE1Lはクロマチンと結合し、主にその領域のヒストンのtri-MeK27-H3のメチル化制御を介して、p53標的遺伝子の選択的転写活性化に関与していることが示唆された¹⁹。しかしながら、p53のリン酸化やメチル化と関連して機能しているかどうかはわかっておらず、今後の解析が期待される。

8. p53ファミリー分子、p73とp63の翻訳後修飾

p53ファミリーは、大きく分類してp53, p63, p73の三つのメンバーから構成される(図4)。C末端領域は、大きく異なっており、p73とp63にはSAMドメインが存在する。転写活性調節ドメイン・DNA結合ドメイン・多量体形成ドメインは、相同性を認め、特にDNA結合ドメインはアミノ酸レベルで約65%の相同性を保っている。一次構造配列の比較を図5に示す。p53と同様、p63とp73もリン酸化を受け、転写活性化やアポトーシス誘導能に重要な役割を果たしていることが報告されている^{20,21}。また最近、p73とp63もSUMO化・Nedd化などのユビキチン様の化学修飾を受けることが明らかにされている²⁰。筆者は、細胞内にTA-p73 α , Δ N-p63 α (図6)、p53を発現させ過去に用いた、LC-MS/MSによるリン酸化同定方法を用いて²²、それらの化学修飾解析を施行した(未発表データ)。過去に報告されているリン酸化部位やアセチル化部位の化学修飾が確認された(図5, 6)。興味深いことに、p63では、C末端領域のSAMドメイン近傍に新規のリン酸化やアセチル化部位を認めたが、この領域は、ヒトの疾患であるankyloblepharone-ectodermal dysplasia-cleftingにおいて変異が集中している。p53に比較して、p63とp73では、その化学修飾を引き起こすモジュレーターやリン酸化・アセチル化による転写活性調節や機能制御など、まだまだ未知の問題が多く、ファミリー分子間での共通性と特異性について、今後の解析が期待される。

9. おわりに

1979年にp53が発見されてから30年以上が経過し、数多くの研究からp53の重要性が明らかにされてきた。なかでもがん抑制遺伝子としてのp53の活性化は、アセチル化やリン酸化によるタンパク質の安定化と他の修飾やコファクターとの会合によって調節されるプロモーター特異的p53の動員によって制御されることが明らかになった。p53が幾重もの複雑な段階を経て活性化することは、細胞死と細胞増殖の停止を振り分けを監視するというp53の機能の重要性を示している。今後、これまでに明らかにされてきた翻訳後修飾がどのように相互作用しているのか? また、翻訳後修飾の組み合わせがどのようにコファクターとの会合やプロモーター特異性を決定しているのか? が明らか

かにされるとともに、これらの基礎研究に基づいた、新たな治療戦略の開発が期待される。

文 献

- 1) 田中知明 (2010) 「p53 ワールド」実験医学, 羊土社.
- 2) Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Yokote, K., Tatsuno, I., & Prives, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 3) Levine, A.J. & Oren, M. (2009) *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 749–758.
- 4) Vousden, K.H. & Ryan, K.M. (2009) *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 691–700.
- 5) Tanaka, T., Lokshin, M., & Prives, C. (2005) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **70**, 121–128.
- 6) Bode, A.M. & Dong, Z. (2004) *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 793–805.
- 7) Kruse, J.P. & Gu, W. (2009) *Cell*, **137**, 609–622.
- 8) Donehower, L.A. & Lozano, A. (2009) *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 831–841.
- 9) Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L., & Lu, H. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7654–7668.
- 10) Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M., & Vousden, K.H. (2003) *Cancer Cell*, **3**, 577–587.
- 11) Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhardt, W.A., & Xiong, Y. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8902–8912.
- 12) Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., & Taya, Y. (2000) *Cell*, **102**, 849–862.
- 13) Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C. C., Taya, Y., Monden, M., Nakamura, Y., & Taya, Y. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 85–94.
- 14) Ohkubo, S., Tanaka, T., Taya, Y., Kitazato, K., & Prives, C. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 16943–16950.
- 15) Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., & Krämer, O.H. (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 185–198.
- 16) Brooks, C.L. & Gu, W. (2008) *Cancer Cell*, **13**, 377–378.
- 17) Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., & Klose, R.J. (2009) *Cell Mol. Life Sci.*, **66**, 407–422.
- 18) Jansson, M., Durant, S.T., Cho, E.C., Sheahan, S., Edelman, M., Kessler, B., Nicholas, B., & La Thangue, N.B. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1431–1439.
- 19) Tanaka, T., Ohkubo, S., Tatsuno, I., & Prives, C. (2007) *Cell*, **130**, 638–650.
- 20) Watson, I.R. & Irwin, M.S. (2006) *Neoplasia*, **8**, 655–666.
- 21) Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., & Prives, C. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 3041–3054.
- 22) Kass, E.M., Ahn, J., Tanaka, T., Freed-Pastor, W.A., Keezer, S., & Prives, C. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 30311–30321.